



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA INFECCIÓN POR *Trypanosoma cruzi*

Y ACTIVIDAD DE FENOLOXIDASA EN *Meccus pallidipennis*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. GONZÁLEZ RETE BERENICE

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARGARITA CABRERA BRAVO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021.



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
OFICIO CPCB/036/2021
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del **Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas y Biología Evolutiva y Sistemática** del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **09 de noviembre de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **GONZÁLEZ RETE BERENICE** con número de cuenta **304120176** con la tesis titulada **“EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA INFECCIÓN POR *Trypanosoma cruzi* Y ACTIVIDAD DE FENOLOXIDASA EN *Meccus pallidipennis*”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARGARITA CABRERA BRAVO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. PAZ MARÍA SILVIA SALAZAR SCETTINO
Vocal: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA
Secretario: DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR
Suplente: DR. ROGELIO AGUILAR AGUILAR
Suplente: DR. ATILANO CONTRERAS RAMOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de enero de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por todas las facilidades otorgadas en mis estudios de doctorado, por ser una institución de excelencia, muchas gracias.

Al Programa de Becas CONACyT con número: 545229.

A los proyectos DGAPA-PAPIIT: IN227816 e IN216118, por el apoyo en el desarrollo de este proyecto.

Al Programa de Apoyo de Estudios de Posgrado (PAEP) Convocatoria 2018 por el apoyo económico para asistir al “International Congress of Parasitology (ICOPA 2018)”, Daegu, Corea del Sur.

A la Dra. Margarita Cabrera Bravo, por ser mi tutora, por guiarme en el desarrollo de éste trabajo, por su acogida y formación en el laboratorio, por enseñarme a ser responsable y darme ánimos siempre.

Al Dr. Alex Córdoba Aguilar, por sus valiosas aportaciones, apoyarme académicamente y profesionalmente.

Al Dr. Humberto Lanz Mendoza, por sus comentarios, sugerencias y apoyo académico.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la realización de mis estudios de doctorado.

A la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo en las asignaciones presupuestales.

Al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. Paz María Silvia Salazar Schettino por todo su apoyo y enseñanzas académicas, por el apoyo económico brindado en la asistencia a congresos y presentaciones de trabajos, así como en la realización de este proyecto. Gracias por toda la confianza, por formarme y acogerme en el laboratorio.

A la Dra. Martha Irene Bucio Torres, por brindarme su apoyo, por hacerme fuerte, por sus valiosos consejos, por sus enseñanzas académicas y valiosas sugerencias.

A la Dra. Elia Torres Gutiérrez, por sus aportaciones académicas, enseñanzas y apoyo técnico en la supervisión de la supervivencia de triatominos.

A la M. en C. Mariana C. De Alba Alvarado, por su asesoría para la estandarización de la técnica de inoculación de ratones.

A la Dra. Laura Flores Villegas, por el apoyo técnico en la estandarización de fenoloxidasa y extracción del aparato digestivo en triatominos.

Al Biól. Mauro Vences Blanco, por proporcionarme las ninfas de triatominos utilizadas en este proyecto.

A la Laboratorista Evangelina Anaya Gil y al Auxiliar de Laboratorio Diego Alejandro Falcón Celis, por su apoyo en la disposición del material y elaboración de reactivos.

DEDICATORIAS

A mis padres, Daniel González Zuñiga y Margarita Rete Ramirez, quienes me han heredado el tesoro más valioso que pueda heredársele a un hijo: amor. Que sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme. A quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho y a quienes nunca podre pagar todos sus desvelos ni aun con las riquezas más grandes del mundo. Por eso y más los amo. Gracias.

A mi hermano Daniel González Rete, por su cariño y los momentos alegres que hemos vivido, gracias por tu apoyo siempre que lo necesite, pero sobre todo por estar ahí cuando te necesito. A Citlalli Magaña, por ser parte de la familia y mi amiga, por todo su apoyo. Gracias.

A mis amigos, Alfredo Florían, Gaby Carapia, Isabel Hernández, Laura Soto, Aarón Rodriguez, Diego, Coria Mariana De Alba, Eli Torres, Ale Falcón, por todas esas risas inolvidables, por todos esos momentos de cariño, aunque a veces no estemos juntos por nuestras ocupaciones, saben que tienen todo mi apoyo y mi cariño. Los quiero mucho.

A mis profesores y todas aquellas personas que me brindaron su apoyo y su perseverancia constante, la adquisición de conocimientos y el amor a la Biología.

A mi familia y a todas aquellas personas que han formado parte de mi vida, por las experiencias, enseñanza y conocimientos.

Gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
• Los triatominos y <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
• Efecto de la temperatura en la interacción triatomino – <i>T. cruzi</i>	8
• El sistema digestivo de triatominos	9
• El sistema de activación de la cascada enzimática de profenoloxidasa	11
OBJETIVOS	14
ANTECEDENTES	15
METODOLOGÍA	
Individuos de <i>Meccus pallidipennis</i>	18
Aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Respuesta inmune	19
a) Alimentación de ninfas de <i>M. pallidipennis</i>	19
b) Incubación de insectos	19
c) Confirmación de la infección y disección de insectos	20
d) Obtención y tratamiento del IMA, IMP y recto de ninfas infectadas y no infectadas	21
e) Actividad de proPO y PO en el IMA, IMP y recto	21

Supervivencia	
a) Alimentación de ninfas de <i>M. pallidipennis</i>	23
b) Incubación de insectos	24
Análisis estadístico	24
RESULTADOS	
Respuesta inmune	26
1. Actividad de proPO según estatus de infección, temperatura y región del intestino	26
2. Actividad de PO según estatus de infección, temperatura y región del intestino	30
Supervivencia	33
1. Efecto de la temperatura en la supervivencia de ninfas de quinto estadio de <i>M. pallidipennis</i>	33
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
APÉNDICE- Artículo requisito para la obtención del grado:	60
Activity of the prophenoloxidase system and survival of triatomines infected with different <i>Trypanosoma cruzi</i> strains under different temperatures: understanding Chagas disease in the face of climate change.	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- DTU:** Unidades discretas de clasificación
- IMA:** Intestino medio anterior
- IMP:** Intestino medio posterior
- IPCC:** Panel Intergubernamental de Cambio Climático
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- PBS:** Buffer de fosfatos
- PO:** Fenoloxidasa
- proPO:** Profenoloxidasa

Resumen

Conocemos poco sobre cómo los vectores de enfermedades humanas, modificarían sus patrones de historias de vida y capacidad vectorial ante el cambio climático. Un caso particular es el de la enfermedad de Chagas, en el cual los triatomíneos y *Trypanosoma cruzi*, fungen como vectores y parásitos respectivamente. En este estudio se demostró como varía la capacidad inmunocompetente de los triatomíneos mediante la cuantificación de la actividad enzimática de fenoloxidasa y profenoloxidasa en tres regiones del intestino (intestino medio anterior (IMA), intestino medio posterior (IMP) y recto) de las chinches no infectadas e infectadas con los aislados Morelos y Chilpancingo de *Trypanosoma cruzi* incubados a temperaturas de 20°C, 30°C y 34°C, así como el tiempo de supervivencia de las chinches con esas mismas tres temperaturas e infección por *T. cruzi*. Se determinó que la respuesta inmune medida por profenoloxidasa y fenoloxidasa disminuye a temperaturas altas, desde los 30 °C a 34 °C. Los aislados de *T. cruzi* produjeron diferente intensidad de respuesta inmune, la cual fue mayor en Chilpancingo con respecto a Morelos tanto para profenoloxidasa y fenoloxidasa. El IMA es la región del intestino donde se detectó mayor respuesta inmune tanto de profenoloxidasa y fenoloxidasa que en la región de IMP y recto. La supervivencia en las chinches fue menor a temperaturas más altas (34 °C) y se redujo de manera drástica en las chinches infectadas con aislado Chilpancingo en comparación con Morelos. Estos resultados indican que el cambio climático podría llevar a una menor respuesta inmune y supervivencia de las chinches ante diferentes aislados de *T. cruzi*, lo cual podría disminuir la capacidad vectorial de *M. pallidipennis*.

Abstract

Little is known about how human disease vectors will modify their life history patterns and survival capacity as a result of climate change. One case is that of Chagas disease, which has triatomine bugs and *Trypanosoma cruzi* as vectors and parasite, respectively. In this study it was demonstrated how the immunocompetent capacity of triatomines varies by quantifying the enzymatic activity of phenoloxidase and prophenoloxidase in three regions of the intestine (anterior midgut (AMI), posterior midgut (IMP) and rectum) of triatomines non infected and infected with the Morelos and Chilpancingo isolates of *Trypanosoma cruzi* incubated at temperatures of 20 ° C, 30 ° C and 34 ° C, as well as the survival time of the triatomines with those same three temperatures and infection by *T. cruzi*. It was determined that the immune response measured by prophenoloxidase and phenoloxidase activity decreases at high temperatures, from 30°C to 34°C. The isolates of *T. cruzi* produced different intensity of immune response, which was higher in Chilpancingo with respect to Morelos for both prophenoloxidase and phenoloxidase activity. The IMA is the region of the intestine where a greater immune response of both prophenoloxidase and phenoloxidase activity was detected than in the IMP and rectum region. Survival in triatomines was lower at higher temperatures (34 °C) and was drastically reduced in triatomines infected with Chilpancingo isolate compared to Morelos. These results indicate that climate change could lead to lower prophenoloxidase activity and survival rates in triatomines when infected by different *T. cruzi* isolates, which could reduce the vector capacity of *M. pallidipennis*.

Introducción

Uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la humanidad en la actualidad es el calentamiento global. Al respecto, el consenso es que la temperatura promedio a escala global aumentará entre 1.1 y 5.8°C en el próximo siglo (Manabe y Wetherald, 1975; Hansen *et al.*, 2006; Solomón *et al.*, 2007; IPCC 2007, 2014). El incremento de la temperatura global en las últimas décadas ha generado una multitud de cambios ecológicos, entre las principales consecuencias del cambio climático global en los insectos, se encuentran: desde alteraciones en sus ciclos de vida, fenología, supervivencia, mortalidad, respuesta inmune e interacción con sus patógenos, hasta modificaciones en su distribución geográfica natural, y que en muchos casos se verán ampliados tanto en latitud como altitud (Epstein 2000; Gage *et al.*, 2008; Wolinska y King, 2009; Forrest, 2016; Frainer *et al.*, 2018).

Un grupo de insectos que presenta particular importancia, por sus efectos en la salud humana, son los insectos vectores, entre ellos dípteros como mosquitos (Culicidae), flebótomos (Psychodidae), moscas tsé tsé (Glossinidae), hemípteros como las chinches besuconas (Triatominae), fitiráteros como piojos y sifonáteros como pulgas (Semenza y Menne, 2009; OMS, 2016). Para el caso de los insectos vectores y los agentes patógenos que transmiten al humano, entender estas interacciones es crucial porque de esto dependerá el futuro sobre el riesgo de las enfermedades que se transmiten por vectores (Wu *et al.*, 2016; Cable *et al.*, 2017).

Relacionado con esto, las proyecciones futuras indican que habrá un aumento en la distribución de los insectos vectores así como en la prevalencia de las enfermedades que éstos causen (WHO, 2015; Booth, 2018). Esto basado en el

supuesto de que los insectos vectores son ectotermos por lo que, incrementos en temperatura promoverán ciclos de vida más cortos y una reproducción más rápida (Sternberg y Thomas, 2014; Sgro *et al.*, 2016). Aunque este proceso no se puede generalizar para todos los ectotermos (e, g, Yee *et al.*, 2017) y ni siquiera vectores (Sternberg y Thomas, 2014; Jia *et al.*, 2017), lo que sí es cierto es que requerimos datos empíricos de animales sujetos a condiciones de laboratorio que provean de datos certeros y que soporten modelos teóricos (Ogden y Lindsay, 2016). En especial, requerimos datos de cómo la interacción entre vectores y sus agentes patógenos cambiarán ante diferentes escenarios de temperatura.

Los triatominos y *Trypanosoma cruzi*

Los triatominos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) (Fig. 1a) son insectos vectores del protozoario *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida) (Chagas, 1909; Lent y Wygodzinsky, 1979) (Fig. 1b), agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Esta enfermedad es endémica de 21 países en el continente americano, desde el norte de México, hasta el sur de Argentina y Chile (OMS, 2015) (Fig. 2).

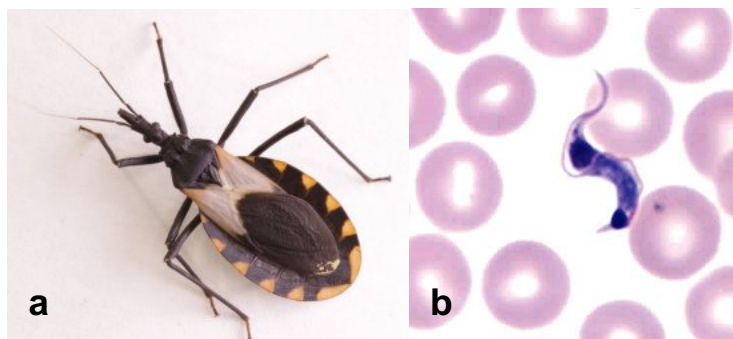


Figura 1. a) Adulto hembra de la especie *Meccus pallidipennis*; b) Tripomastigote metacíclico de *Trypanosoma cruzi* (CDC, 2015).

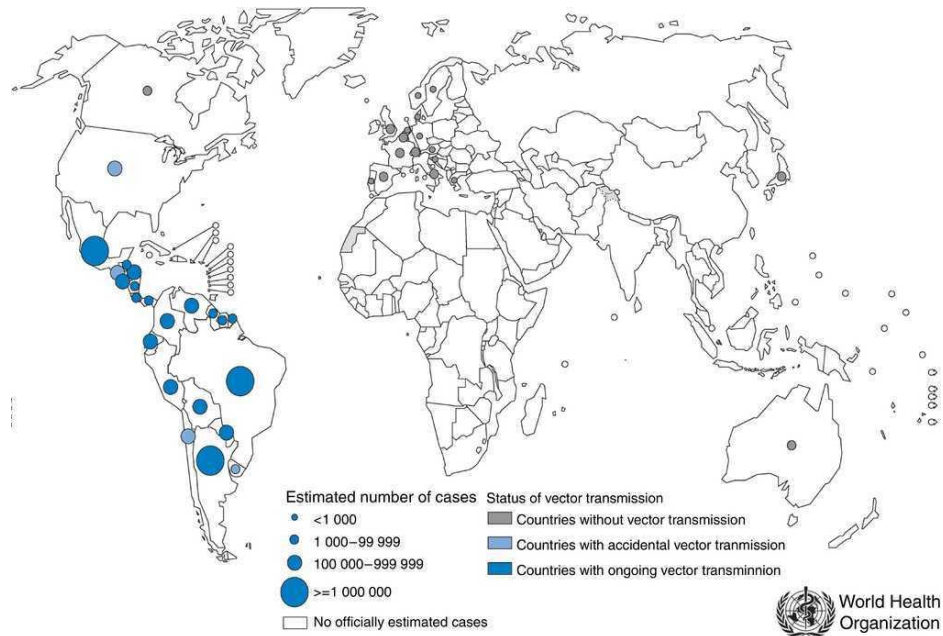


Figura 2. Distribución de la enfermedad de Chagas a nivel mundial (OMS, 2015).

Los triatominos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) son insectos hematófagos, se estima que existen más de 140 especies solo en el continente Americano, son organismos ectotérmicos y hemimetábolos (presentan etapa de huevo, cinco estadios ninfales y el adulto o imago), dependiendo de la especie suelen medir entre 5 mm y 5 cm, presentan un sistema digestivo con órganos diferenciados, así como diferentes tiempos de alimentación y defecación (Ceccarelli *et al.*, 2018).

En México, existen cerca de 32 especies de triatominos (Galvao *et al.*, 2003). Una de ellas es *Meccus pallidipennis*, un vector de suma importancia epidemiológica en la transmisión de *T. cruzi* en nuestro país (Salazar-Schettino *et al.*, 2005; Martínez-Ibarra *et al.*, 2006) (Fig. 3), el cual se distribuye en trece estados de la República Mexicana con hábitat de predominio peridomiciliario (Carcavallo *et al.*, 1999; Salazar-Schettino *et al.*, 2010; Martínez-Ibarra *et al.*, 2014).

Los rangos de temperatura, cuando *Meccus pallidipennis* está infectada con *T. cruzi*, se localizan entre los 18°C y 30°C, siendo su preferencia térmica entre los 27- 28°C (Vidal-Acosta *et al.*, 2000; Benítez-Alva *et al.*, 2012) alcanzando altitudes desde 0 hasta 2400 msnm (Tay-Zavala *et al.*, 2008).

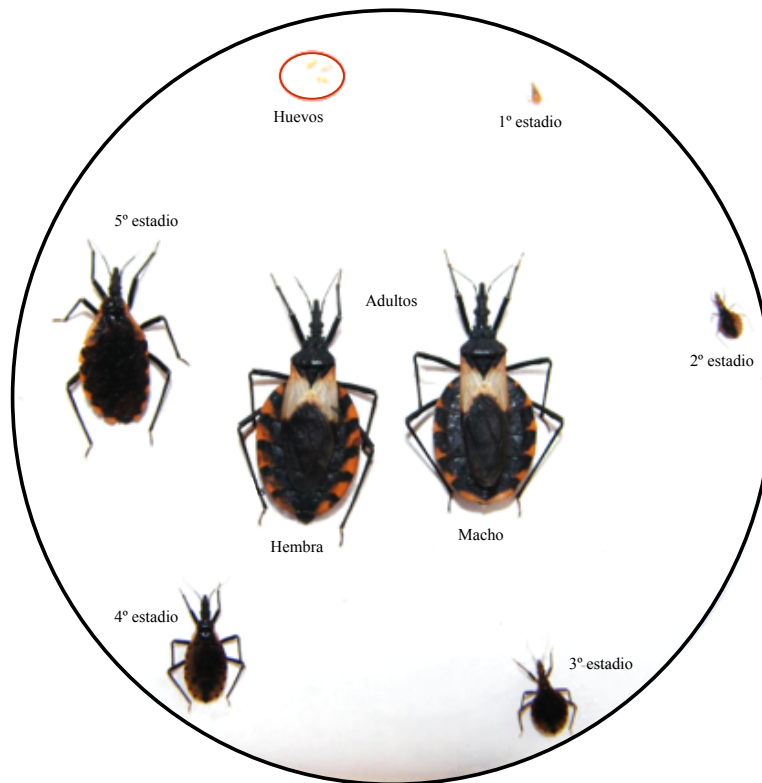


Figura 3. Desarrollo de *M. pallidipennis* (huevo – adulto). Laboratorio de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina, UNAM.

Por su parte, *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) es un protozooario hemoflagelado, presenta núcleo, kinetoplasto y flagelo. Presenta un ciclo de vida complejo que alterna entre dos hospederos, un insecto y un vertebrado mamífero. Durante el ciclo se pueden distinguir diferentes fases morfológicas del parásito con base en la posición del flagelo respecto al núcleo y su ubicación en el huésped (Kollien y Schaub, 2000) (Fig. 4).

El amastigote es la forma intracelular del parásito, se encuentra en los tejidos del huésped vertebrado, carece de flagelo exterior y membrana ondulante, mide entre 2 y 6.5 μm de diámetro, se reproduce dentro de las células del vertebrado (Kollien y Schaub, 2000; Martins *et al.*, 2012) (Fig. 4a). El epimastigote se encuentra en el tracto digestivo del triatomino y en medios de cultivo, es alargado con flagelo libre, anterior al núcleo; mide 18 μm de largo, presenta una alta actividad replicativa en el IMA del vector (Kollien y Schaub, 2000; Tyler y Engman, 2001; Martins *et al.*, 2012) (Fig. 4b). El tripomastigote es la forma infectiva no replicativa, mide aproximadamente 21 μm , es alargado, el flagelo se ubica posterior al núcleo con una membrana ondulante estrecha, se encuentra tanto en el vector y el vertebrado como tripomastigote metacíclico y sanguíneo, respectivamente. El tripomastigote metacíclico se encuentra en recto o proctodeo del insecto vector y es eliminado junto con las heces (Fig. 4c). El tripomastigote sanguíneo se observa en la sangre de los huéspedes vertebrados (Garcia *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2012) (Fig. 4d).

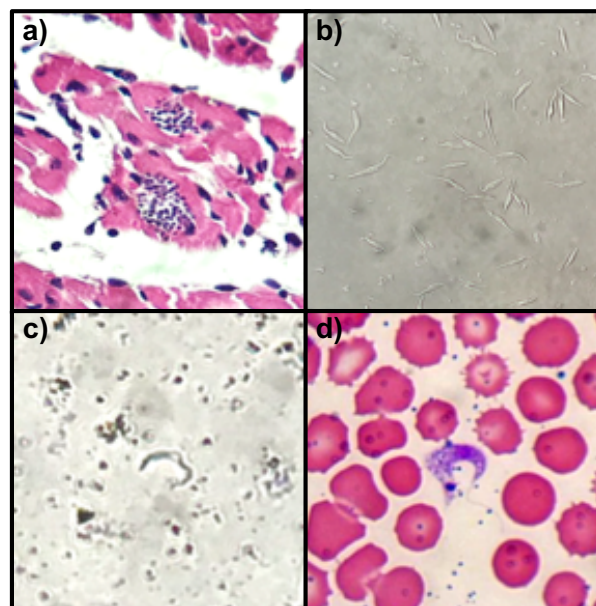


Figura 4. Fases morfológicas de *Trypanosoma cruzi*, a) Amastigote, b) Epimastigote, c) Tripomastigote metacíclico, d) Tripomastigote sanguíneo. Microfotografías tomadas en el Laboratorio de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina, UNAM.

Efecto de la temperatura en la interacción triatomo – *T. cruzi*

Por lo general, los triatominos se localizan desde áreas tropicales donde soportan temperaturas de alrededor de 40°C (Moncayo, 1992; Carcavallo, 1999) hasta áreas más templadas con temperaturas de alrededor de 18°C (Piccinali *et al.*, 2010; Dilorio y Gürtler, 2017). Sin embargo, la interacción *T. cruzi*–hospedero podría moldear estos umbrales de temperatura (e. g. Fellet *et al.*, 2014, Fuentes-Vicente *et al.*, 2017) presumiblemente por los costos y posible manipulación del parásito (e. g. Botto-Mahan *et al.*, 2006). Por ejemplo, se ha visto que los efectos en la supervivencia de *Rhodnius prolixus* ante infecciones por *T. cruzi* varían dependiendo de la temperatura (Elliot *et al.*, 2015; Hinestroza *et al.*, 2016).

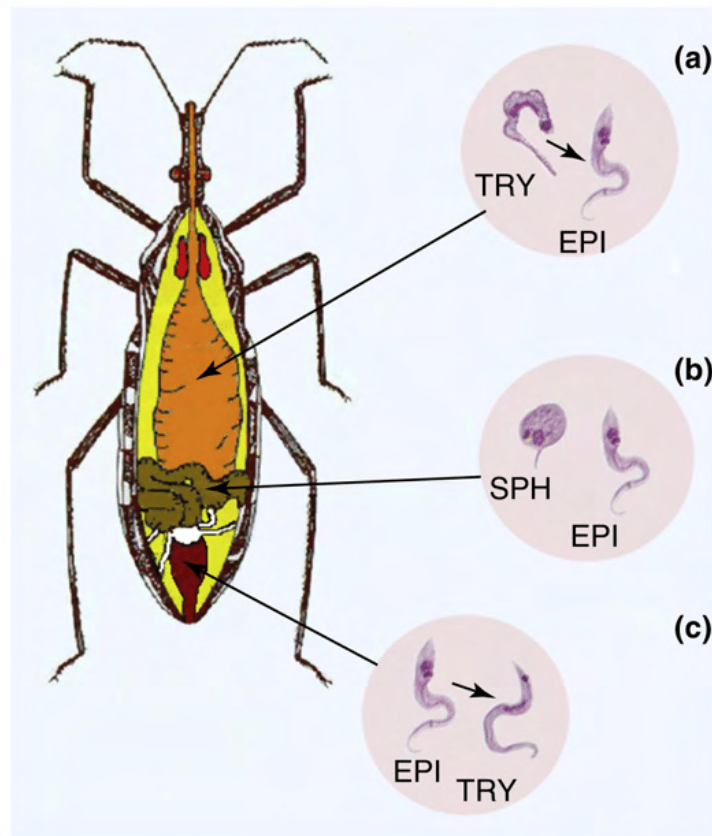
Estudios *in vitro* en triatominos, demuestran que el aumento de la temperatura provoca un incremento en la tasa de desarrollo y reproducción del vector (Martinez-Ibarra *et al.*, 2008; Villegas-García y Santillán-Alarcón, 2004). Estimaciones teóricas, indican que el incremento de temperatura global aumentará los patrones de distribución geográfica (Gorla *et al.*, 1997; Githeko *et al.*, 2000; Garza *et al.*, 2014; Medone *et al.*, 2015; Carmona-Castro *et al.*, 2018) lo cual, junto con un incremento en la demanda metabólica, dará lugar a una mayor frecuencia de episodios de alimentación (Catalá, 1992; Lazzari, 1991; Asin y Catalá, 1995; Garza *et al.*, 2014). Si bien estos dos factores darían lugar a mayor riesgo de transmisión de *T. cruzi* (Klotz *et al.*, 2009; Gürtler *et al.*, 2009; Garza *et al.*, 2014), existiría un balance dado por un posible decremento en la supervivencia de los triatominos (Lazzari, 1991; Gage *et al.*, 2008; Ibarra-Cerdeña *et al.*, 2014; Elliot *et al.*, 2015). No es claro si este decremento es producto de la interacción con el parásito, ya que se espera que

incrementos en temperatura llevarán a una respuesta inmune más robusta del vector (Azambuja *et al.*, 2005; Barreto-Santana *et al.*, 2015; Hinestroza *et al.*, 2016; Guarneri y Lorenzo, 2017). Sin embargo, como se indicó antes, carecemos de datos que validen estas predicciones.

El sistema digestivo de triatominos

La interacción hospedero-parásito (triatomino–*T. cruzi*) se desarrolla en el tracto digestivo del vector dividido en intestino medio anterior (estómago), intestino medio posterior y recto (proctodeo) (Kollien y Schaub, 2000; Tyler y Engman, 2001; Garcia *et al.*, 2010) (Fig. 5). Cuando los triatominos se alimentan de sangre de un vertebrado infectado, los parásitos de *T. cruzi* colonizan el intestino medio anterior (IMA), el intestino medio posterior (IMP) y el recto (Garcia *et al.*, 2010; Azambuja *et al.*, 2017). El IMA es el sitio de almacenamiento del alimento que incluye los tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* ingeridos (Garcia *et al.*, 2010). Posteriormente ocurre la diferenciación a epimastigotes y replicación por fisión binaria de los parásitos, los cuales se adhieren a diferentes zonas en la membrana perimicrovellosa (PMM; Kollien y Schaub, 2000; Garcia y Azambuja, 2004; Garcia *et al.*, 2010; Gutiérrez-Cabrera *et al.*, 2015) (Fig. 5a). Debido a la digestión de la sangre, algunos parásitos son conducidos al IMP, donde muy pocos parásitos aún se replican (Kollien y Schaub, 2000; Garcia *et al.*, 2010) (Fig. 5b). Finalmente, los parásitos llegan al recto donde absorben nutrientes aunque en menor cantidad (Garcia *et al.*, 2010; Schaub *et al.*, 2011). Es en este sitio donde los parásitos se diferencian de nuevo en tripomastigotes metacíclicos (metacicloogénesis), que es la

forma infectiva y completan su ciclo cuando son excretados junto con las heces sobre un vertebrado susceptible (Kollien y Schaub, 2000; Garcia *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2010; Rassi *et al.*, 2010) (Figura 5c).



TRENDS in Parasitology

Figura 5. Sistema digestivo en triatominos. a) Intestino medio anterior donde ocurre la diferenciación de tripomastigote sanguíneo a epimastigote (forma replicativa en vector); b) Intestino medio posterior con epimastigotes y formas intermedias; y, c) recto con epimastigotes donde ocurre la diferenciación a tripomastigote metacíclico (forma infectiva) (Garcia *et al.*, 2010).

El sistema digestivo de los triatominos es de vital importancia para el éxito del parásito (Castro *et al.*, 2012; Gutiérrez-Cabrera *et al.*, 2014; Baxter *et al.*, 2017). De hecho, el IMA es el campo de batalla entre el parásito y el hospedero; ya que, casi inmediatamente ocurrida la ingestión, cerca del 80% de los parásitos mueren (Schaub *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2016).

El sistema de activación de la cascada enzimática de profenoloxidasa

Se sabe que la respuesta inmune puede estar asociada a la defensa y eliminación del parásito en triatominos siendo la cascada enzimática de profenoloxidasa (proPO)-fenoloxidasa (PO), una parte clave (Daquinag *et al.*, 1995; Flores-Villegas *et al.*, 2015; Favila-Ruiz *et al.*, 2018).

El sistema de activación de la cascada enzimática de profenoloxidasa desempeña un papel fisiológico importante para los triatominos, está involucrado en la esclerotización de los insectos como parte de la formación de la cutícula, cicatrización de heridas y mecanismo de defensa (Daquinag *et al.*, 1995). Esta enzima se ha identificado en hemocitos, hemolinfa y en las células de la pared intestinal de los insectos (García *et al.*, 2010; Genta *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2012).

La profenoloxidasa (proPO), también conocida como fenoloxidasa total (Genta *et al.*, 2010) es una pro enzima que tiene un peso molecular de 70-80 kDa (Ashida y Yamasaki, 1990; Ashida y Brey, 1997; Lu *et al.*, 2014). La profenoloxidasa es activada por serin proteasas que dan origen a una enzima activa, la fenoloxidasa (PO) (Ashida y Yamasaki, 1990; Ashida y Brey, 1997; Genta *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2014). Esta enzima tiene un peso molecular de entre 50-60 kDa y forma parte de la familia de las tirosina-cinasas cuya principal función es la oxidación de grupos fenoles a quinonas (Söderhäll y Cerenius, 1998), las cuales se polimerizan espontáneamente para formar melanina (Nation, 2008; González-Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2012).

La actividad de la enzima fenoloxidasa debe estar regulada, no debe existir una activación descontrolada, si no se produciría una cantidad enorme de melanina y otras moléculas citotóxicas que pueden ser letales para el triatomino (Lu *et al.*, 2014). La melanina es un pigmento marrón que participa en la defensa de los insectos, se deposita en el sitio de la infección o daño, tiene actividad citotóxica y participa en la encapsulación de patógenos (Cerenius *et al.*, 2008; Eleftherianos y Revenis, 2011). Este sistema es activado por enzimas como tripsina y quimi tripsina (Gomes *et al.*, 2003) o por componentes estructurales presentes en la pared celular de bacterias Gram (+) como los peptidoglicanos, lipopolisácaridos de bacterias Gram (-), β 1-3 glucanos pertenecientes a hongos o glicoproteínas de protozoarios (Genta *et al.*, 2010) (Fig. 6).

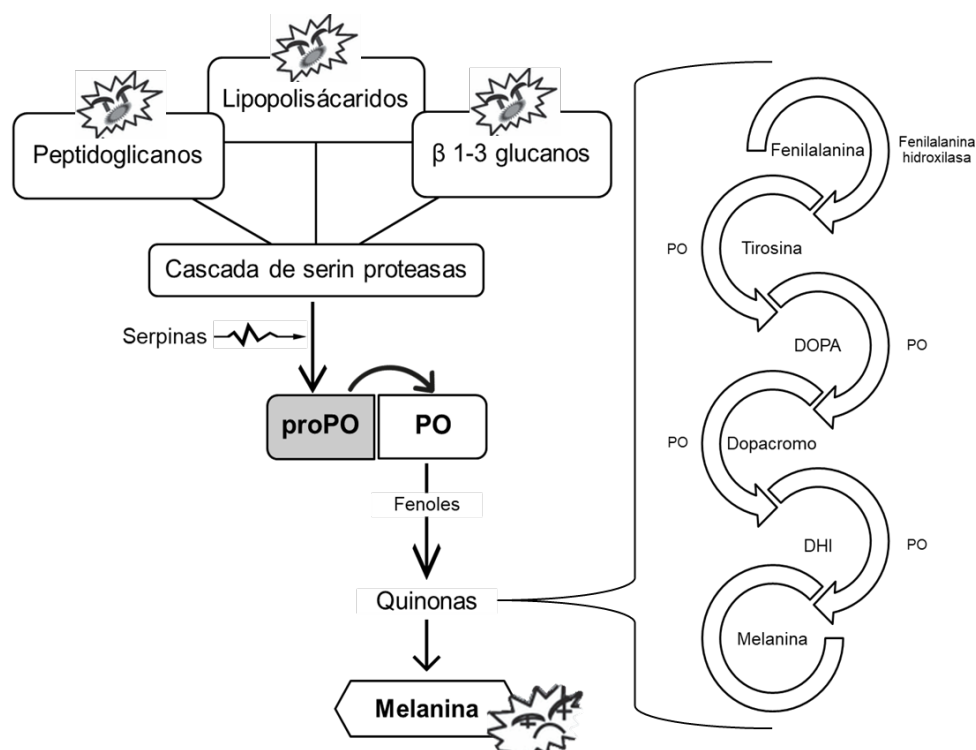


Figura 6. Sistema de activación de la cascada enzimática de profenoloxidasa (proPO)-fenoloxidasa (PO) (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2012. Modificado).

Existen estudios acerca de la participación de fenoloxidasa en la regulación de la infección por *Trypanosoma rangeli* y *Trypanosoma cruzi* cuando se infectan *in vitro* a especies como *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Meccus pallidipennis* y se ha encontrado que la cantidad de fenoloxidasa producida por el insecto es variable en hemolinfa e IMA (Genta *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2015; de Fuentes-Vicente *et al.*, 2017; Fávila-Ruiz *et al.*, 2018). A este respecto, se ha encontrado una asociación entre la actividad de proPO y PO a nivel del intestino después de una semana de infección (Fávila-Ruiz *et al.*, 2018).

Objetivos

Comparar la capacidad inmunocompetente del vector mediante la cuantificación de la actividad enzimática de fenoloxidasa y profenoloxidasa en tres regiones del intestino de *M. pallidipennis* no infectados e infectados con los aislados Morelos y Chilpancingo de *Trypanosoma cruzi* incubados a temperatura de 20°C, 30°C y 34°C.

Comparar el tiempo de supervivencia de las ninfas de quinto estadio de *M. pallidipennis* no infectadas e infectadas con los aislados Morelos y Chilpancingo de *T. cruzi* bajo temperaturas de 20°C, 30°C y 34°C.

Antecedentes

Aunque son pocos los estudios que se han enfocado en determinar el impacto de la temperatura en la susceptibilidad de los vectores por la infección con parásitos, estos demuestran que las poblaciones de vectores presentan diferencias fenotípicas y genéticas como consecuencia de su adaptación a las distintas condiciones del medio ambiente (Sternberg y Thomas, 2014). Es decir, la susceptibilidad de estas especies está determinada tanto por el genotipo del parásito, como por el genotipo del vector, así como la influencia del ambiente donde se lleva a cabo la interacción (Thomas y Blanford, 2003; Sternberg y Thomas, 2014).

En especies de mosquitos de la familia Culicidae como *Anopheles spp.* y *Aedes spp.*, se ha demostrado una mayor tasa de infección por el parásito de malaria al incrementarse la temperatura. Dicha susceptibilidad está dada por la alta tasa de replicación del parásito en un menor tiempo en comparación con temperaturas bajas, lo cual también se refleja en la disminución de su esperanza de vida (Gillies, 1953; Paaijmans *et al.*, 2009; Gehman *et al.*, 2018).

En triatominos, como *Triatoma sordida* y *Rhodnius robustus* se ha visto que la susceptibilidad está relacionada con la variabilidad genética de *T. cruzi* (Messenger *et al.*, 2015), es decir, cuando los triatominos se enfrentan a una cepa que no es de la misma área geográfica, pueden responder disminuyendo o aumentando su supervivencia en función a la replicación del parásito con respecto al incremento de la temperatura (Dworak *et al.*, 2017). En *Rhodnius prolixus* infectados con *T. cruzi*, se observó que el incremento de la temperatura genera una competencia por nutrientes entre el hospedero y parásito, esto origina un retraso de la muda, lo cual

impacta en la adecuación del vector y esto se ve reflejado en su respuesta inmune, capacidad reproductiva y supervivencia (Elliot *et al.*, 2015).

El sistema inmune de los insectos es innato y depende de una variedad de actividades celulares y humorales (Lavine y Strand, 2002). Se conoce que los componentes del sistema inmune suelen ser sensibles diferencialmente al incremento de la temperatura (Ferguson y Sinclair, 2017) dependiendo del reto inmunológico, y tienen la capacidad de reconfigurarse a sí mismos, es decir, que la actividad celular puede aumentar para compensar el deterioro de la defensa humoral o viceversa (Adamo, 2014).

Específicamente se ha encontrado que la actividad de los hemocitos y la fenoloxidasa es sensible a los cambios térmicos, por lo tanto la inmunidad de los insectos depende directamente de éste factor ambiental (Catalán *et al.*, 2012; Murdock *et al.*, 2012; Ferguson *et al.*, 2016), así como a la prevalencia de patógenos y las reservas de energía (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2009; Fedorka *et al.*, 2012, 2013; Ferguson y Sinclair, 2017).

En los mosquitos, específicamente en el caso de *An. stephensi*, se ha estudiado en condiciones de laboratorio que la reproducción del parásito está mediada por el efecto que tiene la temperatura en la respuesta inmune (Murdock *et al.*, 2012). En *G. morsitans* el incremento de la temperatura en el ambiente ejerce un estrés nutricional, se ha observado que la limitación del alimento tiene un efecto negativo en la activación de la respuesta inmune del vector cuando se encuentran infectadas con *T. brucei rhodesiense* (Hao *et al.*, 2001; Akoda *et al.*, 2009).

En triatominos como *R. prolixus* se conoce que la respuesta inmune es activada tanto cuando son infectados por *Trypanosoma rangeli*, la cual no es transmitida a humanos, y *Trypanosoma cruzi* (Mello *et al.*, 1995; 1996), donde las diferencias en la supervivencia de los parásitos se han relacionado con una inducción de lisozimas, péptidos antimicrobianos; fagocitosis, la activación de la profenoloxidasa y encapsulación que son dependientes de la temperatura (Mello *et al.*, 1996; Azambuja *et al.*, 1999).

En definitiva, se ha observado en condiciones de laboratorio que muchas de las respuestas de defensa se ven favorecidas en rangos de temperatura altos (Asin y Catalá, 1995; Noden *et al.*, 1995; Halstead, 2008; Parham *et al.*, 2015). Por otra parte, un incremento de la temperatura ha registrado una disminución de la supervivencia, esto provocaría una reducción o incluso extinción local de las poblaciones de insectos, incluidas varias especies de vectores cuando la temperatura alcance el máximo umbral térmico específico (Cornelissen, 2011; Cahill *et al.*, 2013; Mordecai *et al.*, 2013; Lafferty y Mordecai, 2016).

Metodología

Individuos de *Meccus pallidipennis*

Se utilizaron ninfas recién mudadas al quinto estadio de un insectario (28°C y 60% humedad relativa, 12/12 h de ciclo luz/oscuridad) del Laboratorio de Biología de Parásitos del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Estos insectos son descendientes de triatomíneos provenientes del estado de Morelos, México, los cuales fueron recolectados en 1998. Para todos los experimentos, las chinches fueron escogidas aleatoriamente.

Aislados de *Trypanosoma cruzi*

Los aislados se usaron para infectar ratones hembra (15-18 g) de la cepa CD-1. Los aislados utilizados fueron ITRI/MX/12/MOR, que desde este momento llamaremos Morelos, el aislado fue obtenido de un macho de *M. pallidipennis*, capturado en 2012 en Cuernavaca, Morelos, México. Esta cepa ha sido caracterizada como TcI (Mendoza-Rodríguez, 2015). Y el aislado ITRI/MX/14/CHIL, que desde este momento llamaremos Chilpancingo, fue obtenido de una hembra de *M. pallidipennis* capturado en 2014 en Chilpancingo, Guerrero, México. La cepa aún no ha sido caracterizada.

Respuesta inmune

a) Alimentación de ninfas de *M. pallidipennis*

Trescientas ninfas fueron infectadas por alimentación con los dos aislados de *T. cruzi* a partir de ratones hembra CD-1 (15 -18 g) previamente inoculados con una concentración de 20,000 tripomastigotes sanguíneos/mL (Favila-Ruiz *et al.*, 2018): 150 ninfas se alimentaron con ratones infectados con el aislado Morelos (grupo Morelos) y 150 con el aislado Chilpancingo (grupo Chilpancingo). Los ratones fueron usados 15 días post inoculación, que corresponde a la fase exponencial del crecimiento de *T. cruzi* (Favila-Ruiz *et al.*, 2018). Adicionalmente, 150 ninfas que correspondieron al grupo control, fueron alimentadas con ratones de la misma cepa y peso, libres de infección. Las ninfas se alimentaron durante 15–20 minutos por separado en grupos de cinco ninfas por ratón (infectados y control) en condiciones de obscuridad hasta que se desprendieron de la fuente de alimentación y mostraron signos claros de incremento considerable de peso (engrosar el abdomen al doble aproximadamente de antes de comer).

b) Incubación de insectos.

Al término de la alimentación, las ninfas se colocaron en frascos de plástico (una por cada frasco) y fueron etiquetadas para su identificación. Ciento cincuenta ninfas se incubaron a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, de las cuales 50 ninfas estaban infectadas con el aislado Morelos, 50 ninfas infectadas con el aislado Chilpancingo y 50 ninfas correspondientes al grupo control. De la misma forma, 150 ninfas se incubaron a

30±2°C y 150 a 34±2°C. El periodo de incubación fue de 15 días después de la alimentación. La distribución de los insectos fue al azar.

c) Confirmación de la infección y disección de insectos.

Después del tiempo de incubación, el contenido rectal fue examinado por compresión abdominal para confirmar la presencia de la infección por *T. cruzi* mediante la observación directa del parásito en las heces (Zeledón, 1997). En un portaobjetos, se depositó una gota de PBS 1X 7.2 pH y heces, se homogenizó la muestra, se tomaron 10 µL y se observó al microscopio con un aumento de 40x. Después de confirmar la infección, los insectos fueron disectados bajo un microscopio estereoscópico (Stemi 2000, Carl Zeiss, Jena, Germany 426126). Las extremidades fueron removidas con pinzas de disección para luego colocar el insecto en una placa Petri a 4°C. El abdomen fue desinfectado con alcohol al 70%. El conxivo se identificó y cortó para exponer la cavidad abdominal, se removieron los túbulos de Malpighi y el cuerpo graso. Se identificó el sistema digestivo (García *et al.*, 2010) y se disectó el intestino medio anterior (IMA), el intestino medio posterior (IMP) y el recto. Las regiones o porciones del sistema digestivo se colocaron por separado en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 200 µL de PBS 1X 7.2 pH estéril, el cual contiene fosfato de sodio dibásico anhidro (Na₂HPO₄, 8x10⁻⁶ M), fosfato monopotásico anhidro (KH₂PO₄, 1x10⁻⁶ M), cloruro de potasio (KCl, 3x10⁻⁶ M), y cloruro de sodio (NaCl, 1x10⁻⁴ M). Los tubos se conservaron a 4°C hasta su uso.

d) Obtención y tratamiento del IMA, IMP y recto de ninfas infectadas y no infectadas.

El IMA, IMP y recto de las ninfas infectadas y control previamente extraídos como se indicó antes, fueron colocados en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 200 μ L de PBS 1X 7.2 pH estéril donde se lavaron para eliminar restos de sangre no digerida del vertebrado. Se eliminó el sobrenadante y se colocaron de nuevo 200 μ L de PBS 1X 7.2 pH estéril frío. El tejido de las porciones fue macerado con pistilo para su completa disgregación, se centrifugó en una Microcentrifuga (Allegra 64R Centrifuge, Beckman Coulter) a 10, 000 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se tomaron 20 μ L del sobrenadante y se colocaron en 180 μ L de PBS 1X 7.2 pH estéril frío (1:10) (Castro *et al.*, 2010). Los tubos se colocaron a 4°C hasta su uso.

e) Actividad de proPO y PO en el IMA, IMP y recto

La actividad de proPO y PO en el IMA, IMP y recto fue determinada por espectrofotometría. Para la actividad de proPO se utilizó α -quimiotripsina (α -Chymotrypsin from bovine pancreas, Sigma®) como un activador de la enzima y para determinar la conversión catalítica a dopacromo (marrón) se utilizó L-DOPA (3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine, Sigma®, incolora) como sustrato empleando el coeficiente de extracción molar ($3.715 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Daquinag *et al.*, 1995; Laughton y Siva-Jothy, 2011). Se tomaron 25 μ L del sobrenadante de IMA, IMP y recto de cada ninfa y se colocaron en una microplaca de 96 pozos (Costar 96, Corning, USA). Se

agregaron 10 μL de PBS 1X 7.2 pH estéril a cada pozo donde se colocó el sobrenadante y 5 μL de α -quimiotripsina en una concentración de 1 mg/mL. Como blanco se colocaron 35 μL de PBS 1X 7.2 pH estéril y 5 μL de alfa-quimiotripsina. Tanto las muestras como el blanco se colocaron por duplicado. La microplaca fue incubada por 1 hora a 37°C en oscuridad. Posteriormente se colocaron 25 μL de L-DOPA (4 mg/mL, Sigma) en el blanco y en las muestras, y se incubó durante 1 hora a 37°C en oscuridad (Genta *et al.*, 2010; Jiménez-Cortés y Córdoba-Aguilar, 2013).

La actividad de PO se observó a través de la conversión catalítica de L-DOPA (incolora) a dopacromo (marrón). Se tomaron 25 μL del sobrenadante de IMA, IMP y recto de cada ninfa y se colocaron en una microplaca de 96 pozos (Costar 96, Corning, USA). Se agregaron 10 μL de PBS 1X 7.2 pH estéril a cada pozo donde se colocó el sobrenadante. Como blanco se colocaron 35 μL de PBS 1X 7.2 pH. Posteriormente se colocaron 25 μL de L-DOPA (4 mg/mL, Sigma) en las muestras y en el blanco. Tanto las muestras como el blanco se colocaron por duplicado. La microplaca fue incubada por 3 horas a 37°C en oscuridad (Genta *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2015).

Las lecturas de la actividad de proPO y PO fueron tomadas en el espectrofotómetro cada 5 minutos durante 1 hora a una absorbancia de 490 nm, el cual fue expresado en unidades de actividad enzimática. Se determinó la actividad enzimática a través de la absorbancia versus el tiempo calculando la pendiente (Daquinag *et al.*, 1995). Se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad enzimática: } \frac{m \left(\frac{\text{Abs}}{\text{min}} \right) * v f (L) * F}{\varepsilon (M^{-1} \text{cm}^{-1}) * b (cm)}$$

Donde, m corresponde a la pendiente definida por la absorbancia versus el tiempo (minutos), vf es el volumen final de la reacción expresado en litros, F es el factor de dilución, E es el coeficiente de extinción molar del dopacromo ($3.715 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), y b es el campo óptico que corresponde a 0.5 cm.

Supervivencia

a) Alimentación de ninfas de *M. pallidipennis*

120 ninfas fueron infectadas por alimentación con los dos aislados de *T. cruzi* a partir de ratones hembra CD-1 (15 -18 g) previamente inoculados con una concentración de 20,000 tripomastigotes sanguíneos/mL: sesenta ninfas se infectaron con el aislado Morelos (grupo Morelos) y sesenta con el aislado Chilpancingo (grupo Chilpancingo). Los ratones fueron usados 15 días post inoculación. Adicionalmente, sesenta ninfas que correspondieron al grupo control, fueron alimentadas con ratones de la misma cepa y peso, libres de infección. Las ninfas se alimentaron durante 15–20 minutos por separado en grupos de 5 ninfas por ratón (infectados y control) en condiciones de obscuridad hasta que se desprendieron de la fuente de alimentación y mostraron signos claros de incremento considerable de peso (engrosar el abdomen al doble aproximado de antes de comer).

b) Incubación de insectos.

Al término de la alimentación, las ninfas se colocaron en frascos de plástico (una por cada frasco) y fueron etiquetadas para su identificación. Sesenta ninfas se incubaron a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, de las cuales 20 ninfas estaban infectadas con el aislado Morelos, 20 ninfas infectadas con el aislado Chilpancingo y 20 ninfas correspondientes al grupo control. De la misma forma, sesenta ninfas se incubaron a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ y sesenta a $34\pm 2^{\circ}\text{C}$. El periodo de incubación inicio después de la alimentación. Las ninfas se monitorearon diariamente desde su fecha alimentación hasta la fecha de su muerte. La muerte del insecto se determinó cuando no presentaba ningún movimiento en patas, antenas y proboscide después de ser manipulados por un minuto con pinzas de disección. Esta revisión se realizó diariamente.

Análisis estadístico.

Se utilizó el test de Kruskal-Wallis (K-W) para determinar normalidad y heterogeneidad de varianzas. Una vez confirmado que la distribución de los datos fue normal, se puso a prueba si la capacidad inmunocompetente de las ninfas fue diferente entre tratamientos con un modelo lineal general univariado teniendo la actividad de proPO y PO como variables dependientes y como variables predictoras el estatus de infección (infectados Chilpancingo, infectados Morelos y control), la región del intestino (IMA, IMP y recto) y las diferentes temperaturas (20°C , 30°C y 34°C). La finalidad era saber si tanto el modelo, como cada una de las variables

predictoras por separado y la interacción estatus de infección por región del intestino y temperatura eran significativos. Para el caso de esta última interacción, se compararon los grupos usando intervalos de confianza del 95%. Este análisis fue realizado utilizando el programa SPSS versión 24.0. Los datos fueron expresados mediante el promedio de la actividad enzimática \pm error estándar. Para determinar el efecto de la infección (infectados Chilpancingo, infectados Morelos y control) y la temperatura (20°C, 30°C y 34°C) en los días de supervivencia de las ninfas se utilizó la prueba de Log-rank (Mantel-Cox). Las diferencias dentro de los grupos se determinaron mediante la prueba de χ^2 entre grupos infectados y no infectados, y entre grupos de infectados. El análisis fue realizado utilizando el programa Graph Padh versión 7.0 (Favila-Ruiz *et al.*, 2018).

Resultados

Respuesta inmune

1. Actividad de proPO según estatus de infección, temperatura y región del intestino

El modelo indicó que hubo diferencias significativas según el estatus de infección (grupo Chilpancingo, grupo Morelos, control), temperatura (20°C, 30°C y 34°C) y región del sistema digestivo (IMA, IMP y recto; Tabla 1). Las interacciones de todas estas variables predictoras también fueron significativas (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados del modelo lineal general univariado de actividad de proPO según el estatus de infección (infectados con aislado Chilpancingo, Morelos y control), temperatura (20, 30 y 34°C) y región del intestino (IMA, IMP y recto) y sus interacciones.

Origen	gl	MC	F	p
Modelo corregido	26	84.547	237.914	0.0001
Intersección	1	1034.247	2910.346	0.0001
Estatus de infección	2	49.491	139.266	0.0001
Temperatura	2	22.076	62.122	0.0001
Región	2	868.939	2445.174	0.0001
Estatus * Temperatura	4	3.518	9.898	0.0001
Estatus * Región	4	48.998	137.879	0.0001
Temperatura * Región	4	19.892	55.975	0.0001
Estatus * Temperatura * Región	8	3.449	9.704	0.0001
Error	1323	0.355		
Total	1350			
Total corregido	1349			

gl= grados de libertad; MC= media cuadrática; F= F-test; p= p-value.

En general, conforme se incrementó la temperatura, la actividad de proPO disminuyó (Fig. 7). El estatus de infección también afectó la proPO, donde el grupo

Chilpancingo dio lugar a mayor actividad de proPO seguido de Morelos y luego el grupo control (Fig. 8). La región del intestino también fue buen predictor de la proPO donde el IMA dio lugar a valores más altos que el IMP y el recto, sin haber diferencias entre estos dos últimos grupos (Fig. 9). Dado que el IMA es el lugar cuya expresión de proPO es considerablemente más alta y que no hay diferencias entre IMP y recto, usaremos sólo el IMA para las siguientes comparaciones.

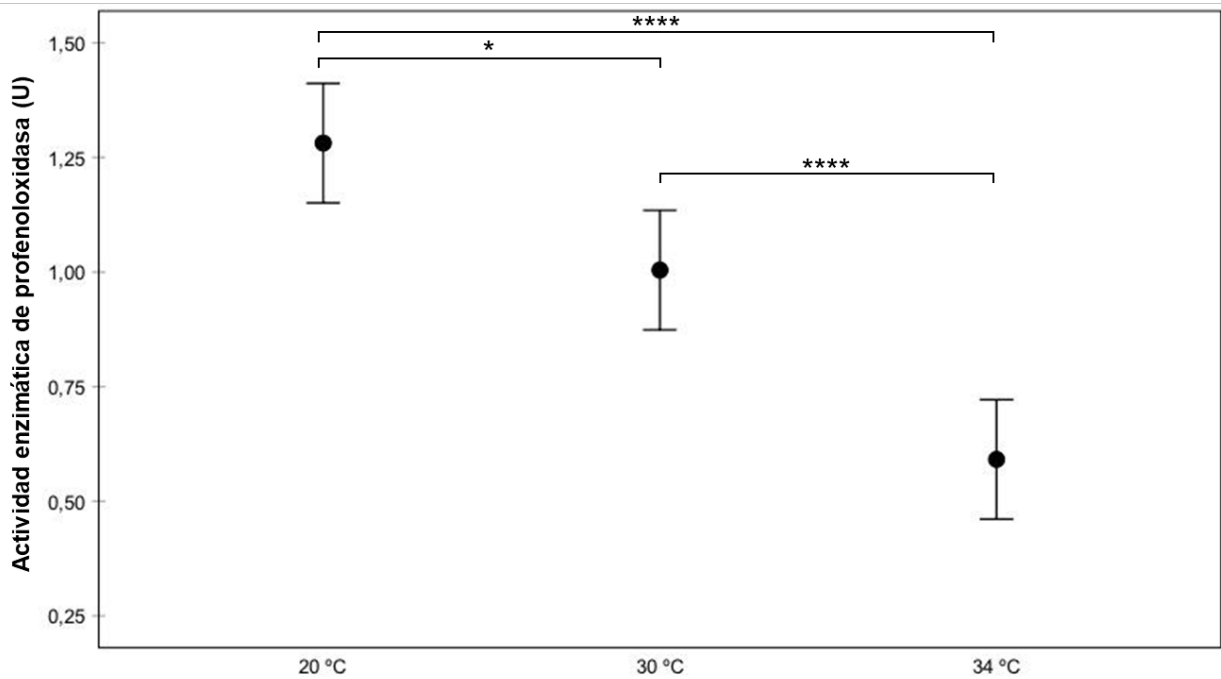


Figura 7. Actividad enzimática de profenoloxidasa (proPO) de ninfas de quinto estadio de *M. pallidipennis* expuestas a tres diferentes temperaturas (20 °C, 30 °C and 34 °C). *P < 0.05, **P < 0.0001.**

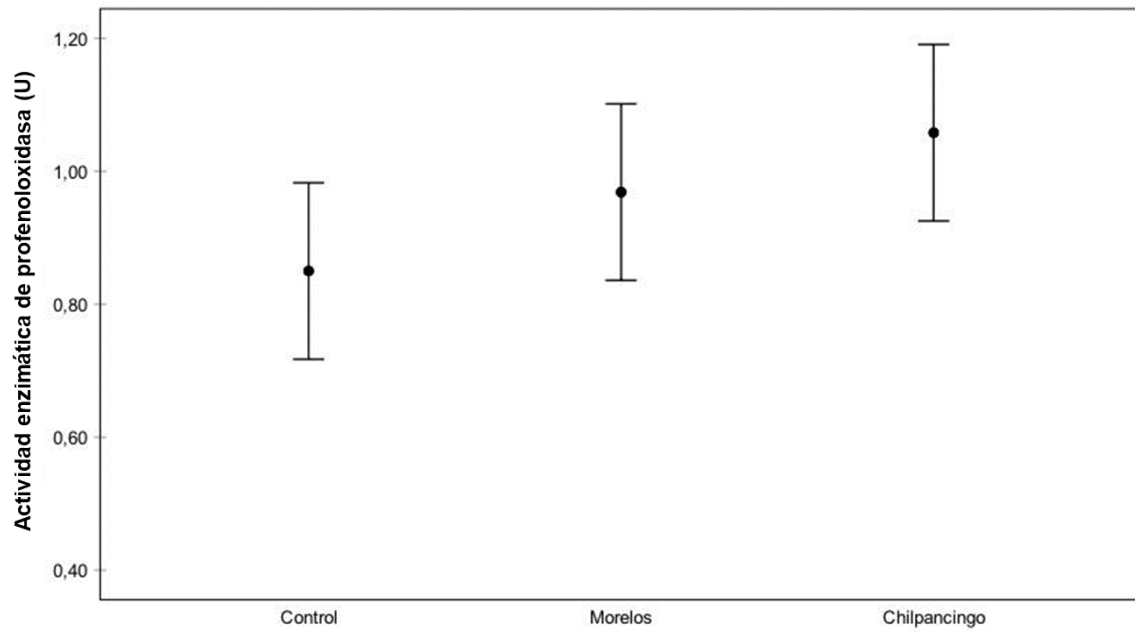


Figura 8. Actividad enzimática de profenoloxidasa (proPO) de ninfas de quinto estadio de *M. pallidipennis* infectadas y grupo control.

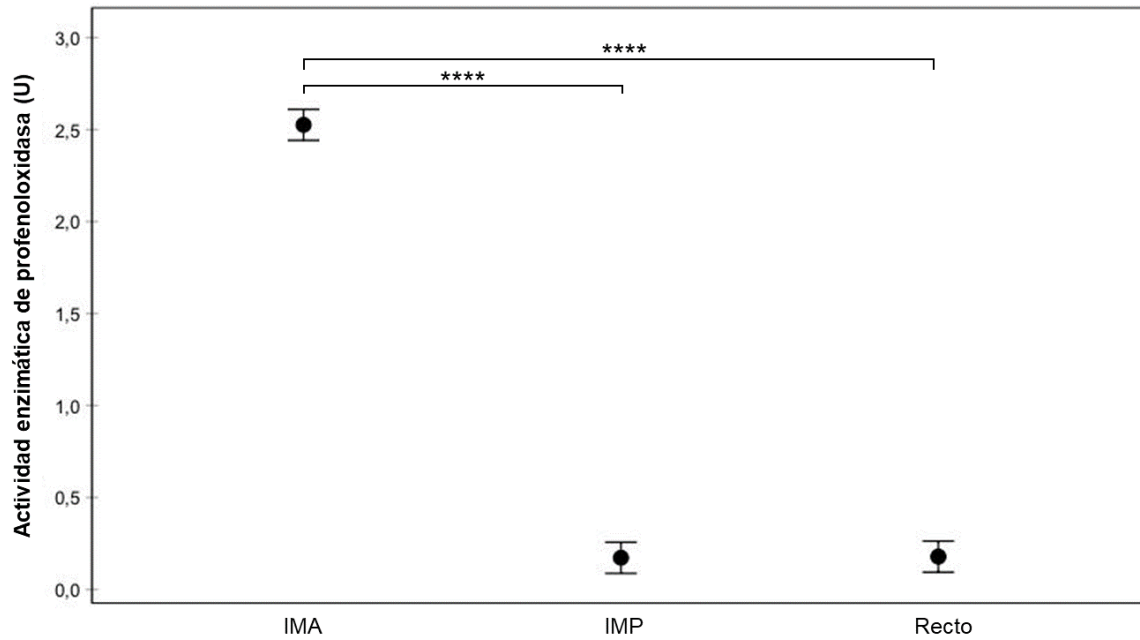


Figura 9. Actividad enzimática de profenoloxidasa (proPO) en las diferentes regiones del sistema digestivo de ninfas de quinto estadio de *M. pallidipennis*. ****P < 0.0001.

La proPO fue más alta cuando la infección fue con Chilpancingo con respecto a Morelos y control a temperaturas bajas, aunque estas diferencias desaparecieron a temperaturas altas (Fig. 10).

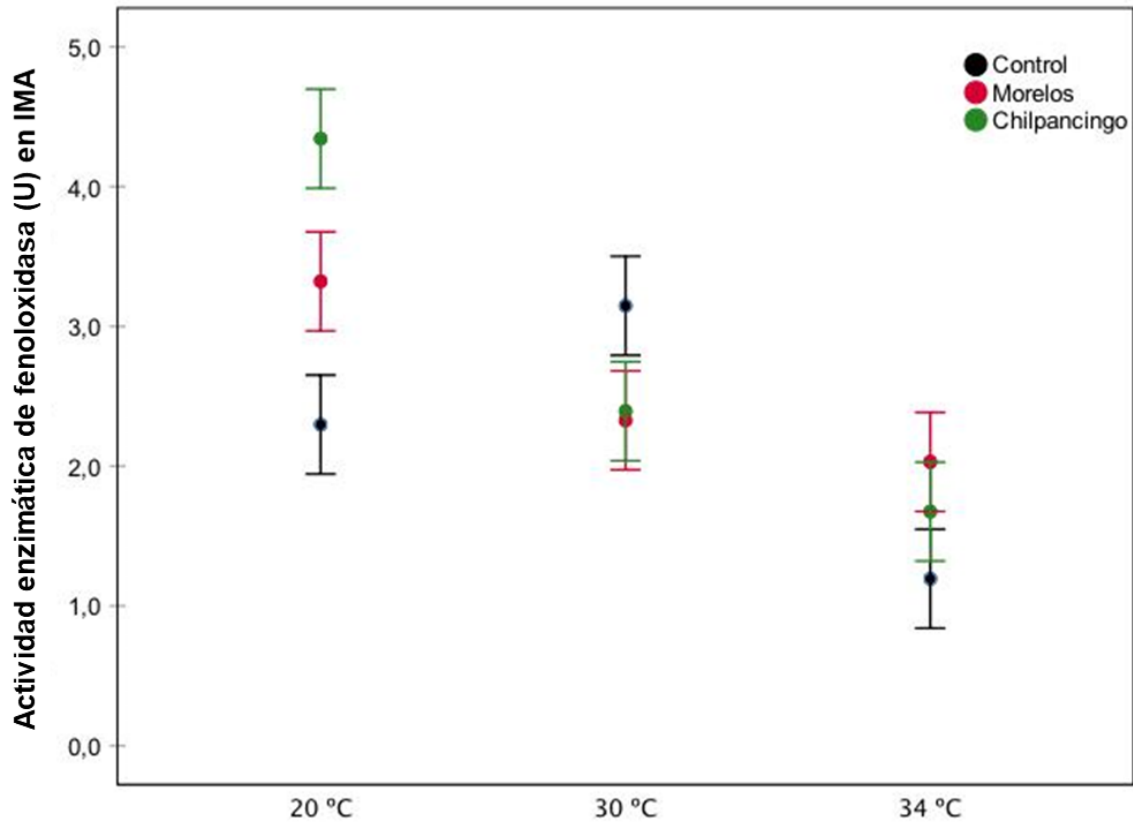


Figura 10. Actividad enzimática de profenoloxidasa (proPO) en el IMA de ninfas de quinto estadio de *M. pallidipennis* infectadas (aislados Chilpancingo y Morelos) y grupo control a diferentes temperaturas (20 °C, 30 °C and 34 °C).

2. Actividad de PO según estatus de infección, temperatura y región del intestino

Hubo diferencias significativas según el estatus de infección (grupo Chilpancingo, grupo Morelos, control), temperatura (20°C, 30°C y 34°C), y región del sistema digestivo (IMA, IMP y recto; Tabla 2). Las interacciones de todas estas variables predictoras también fueron significativas (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del modelo lineal general univariado de actividad de PO según el estatus de infección (infectados con aislado Chilpancingo, Morelos y control), temperatura (20, 30 y 34°C) y región del intestino (IMA, IMP y recto), y sus interacciones.

Origen	gl	MC	F	p
Modelo corregido	26	77.800	135.060	0.0001
Intersección	1	1240.545	2153.567	0.0001
Condición	2	4.967	8.622	0.0001
Temperatura	2	54.434	94.496	0.0001
Región	2	829.031	1439.184	0.0001
Condición * Temperatura	4	11.036	19.158	0.0001
Condición * Región	4	4.133	7.176	0.0001
Temperatura * Región	4	28.153	48.874	0.0001
Condición * Temperatura * Región	8	9.081	15.764	0.0001
Error	1323	0.576		
Total	1350			
Total corregido	1349			

gl= grados de libertad; MC= media cuadrática; F= F-test; p= p-value.

Los valores más altos de PO fueron a 30°C y considerablemente menores a 34°C (Fig. 11). Según el estatus de infección, la PO fue más alta en el grupo Chilpancingo seguido de Morelos y luego el grupo control (Fig. 12). La región del intestino indicó que el IMA produce la mayor respuesta, sin diferencias entre IMP y recto (Fig. 13). Igual que con la proPO, usaremos los valores de PO del IMA para las siguientes comparaciones dado que no hay diferencias entre IMP y recto.

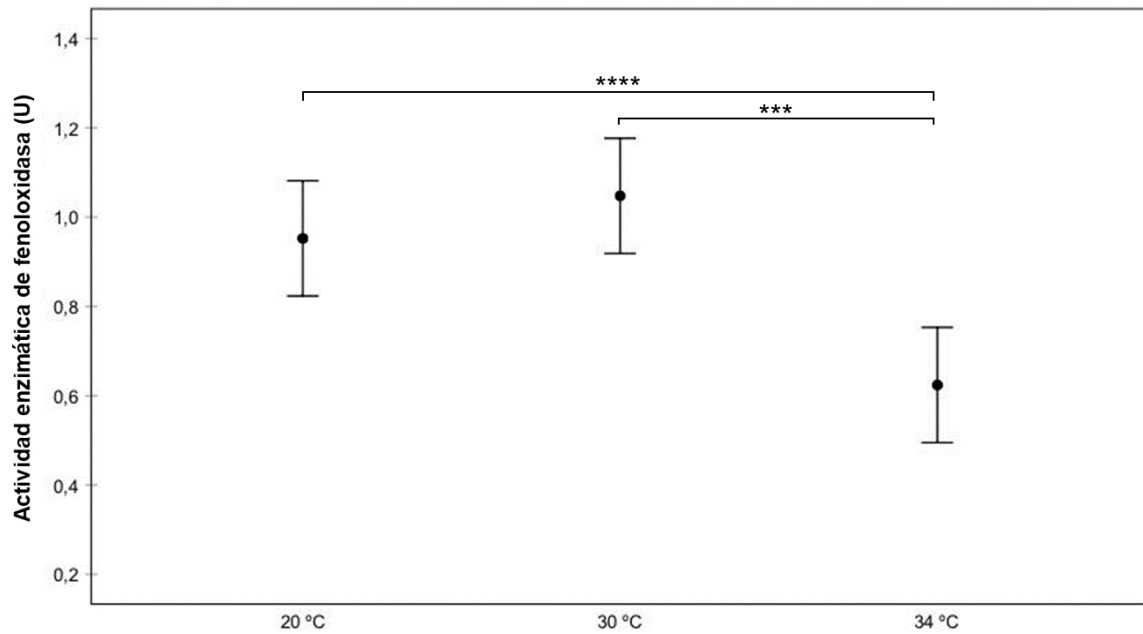


Figura 11. Actividad enzimática de fenoloxidasa (PO) de ninfas de quinto estadio de *M. pallidipennis* expuestas a tres diferentes temperaturas (20 °C, 30 °C and 34 °C). ***P < 0.0005, ****P < 0.0001.

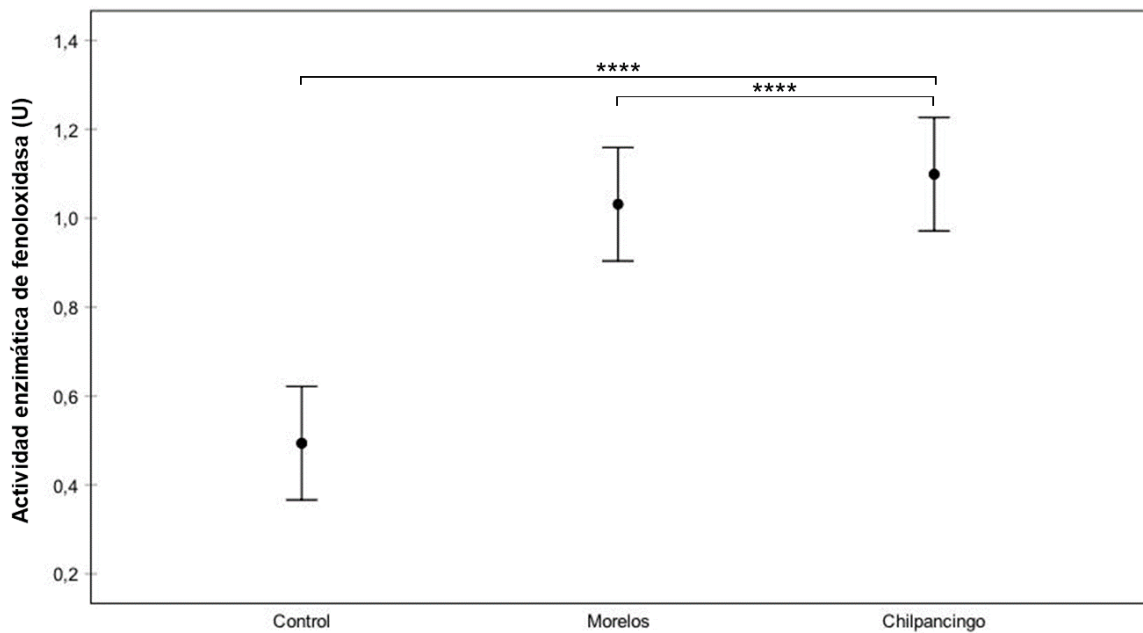


Figura 12. Actividad enzimática de fenoloxidasa (PO) de ninfas de quinto estadio de *M. pallidipennis* infectadas y grupo control. **** = P < 0.0001.

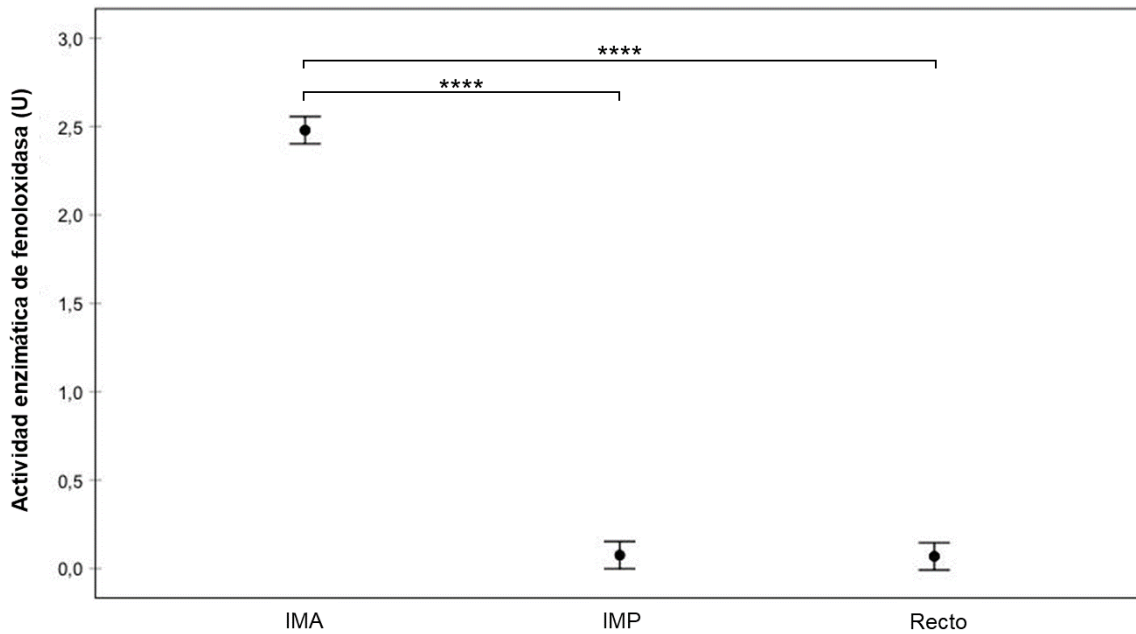


Figura 13. Actividad enzimática de fenoloxidasa (PO) en las diferentes regiones del sistema digestivo de ninfas de quinto estadio de *M. pallidipennis*. ** = $P < 0.0001$.**

La PO fue más alta cuando la infección fue con Chilpancingo con respecto a Morelos y control a 20°C, aunque estas diferencias desaparecieron a temperaturas altas (Fig. 14).

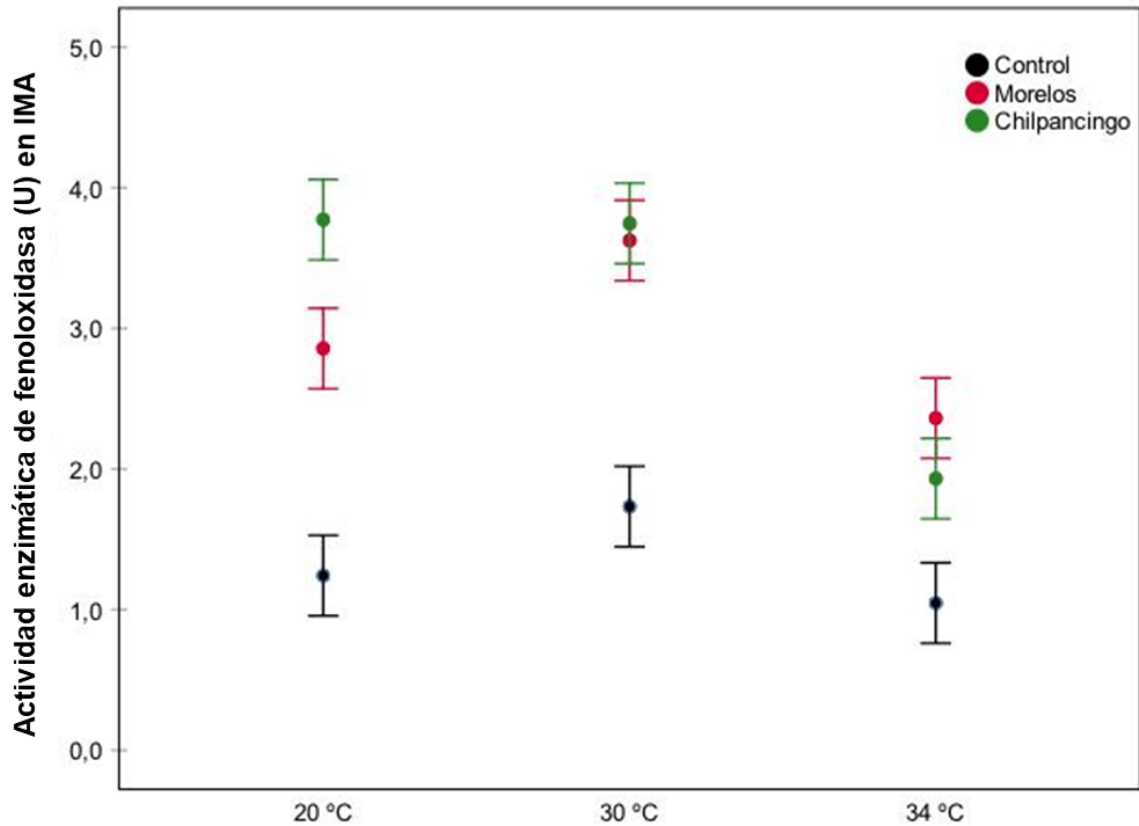


Figura 14. Actividad enzimática de fenoloxidasa (PO) en el IMA de ninfas de quinto estadio de *M. pallidipennis* infectadas y grupo control a diferentes temperaturas (20°C, 30°C y 34°C).

Supervivencia

1. Efecto de la temperatura en la supervivencia de ninfas de quinto estadio de *M. pallidipennis*.

En general, incrementos de temperatura redujeron la vida de las chinches (Fig. 15). Hubo un efecto también de la infección la cual disminuyó la supervivencia de las chinches, donde el aislado Morelos reduce más el tiempo de vida a temperaturas bajas que el aislado Chilpancingo aunque este efecto se invierte a 34 °C (Tabla 3; Figs. 15 y 16).

Tabla 3. Supervivencia (en días) de ninfas de *M. pallidipennis* según estatus de infección (aislado Chilpancingo, Morelos y control) expuestas a tres diferentes temperaturas

Temperatura	Estatus	Tamaño muestra (n)	Supervivencia promedio (días)
20°C	Control	20	166
	Morelos	20	102
	Chilpancingo	20	112
30°C	Control	20	117
	Morelos	20	80
	Chilpancingo	20	80
34°C	Control	20	90
	Morelos	20	71
	Chilpancingo	20	60

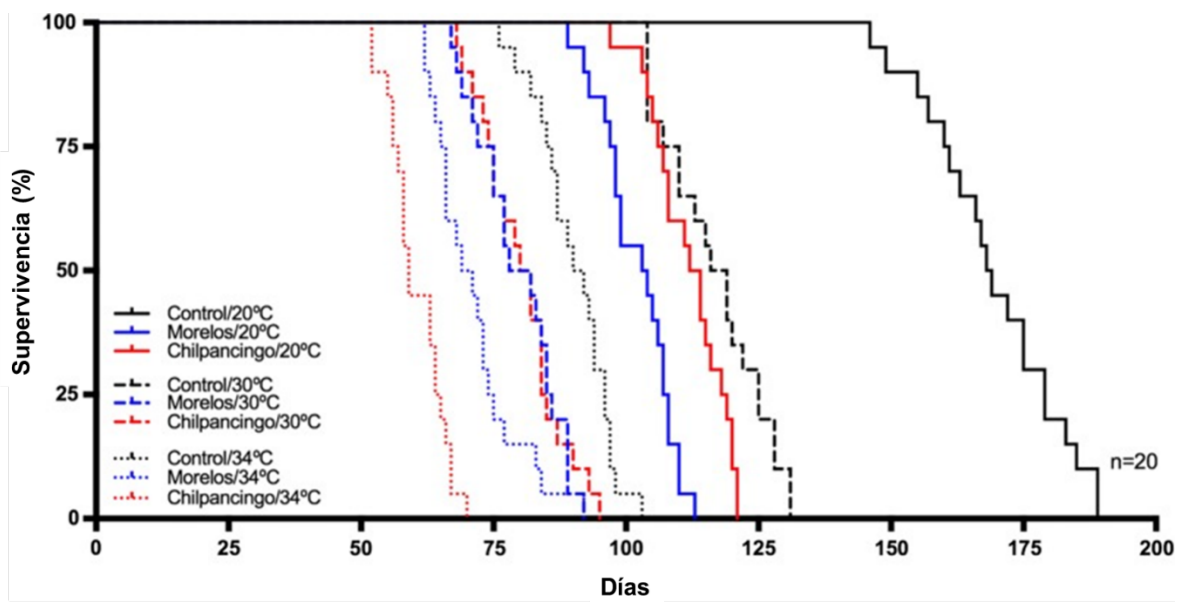


Figura 15. Supervivencia en ninfas de quinto estadio de *M. pallidipennis* infectadas y grupo control a diferentes temperaturas (20 °C, 30 °C and 34 °C).

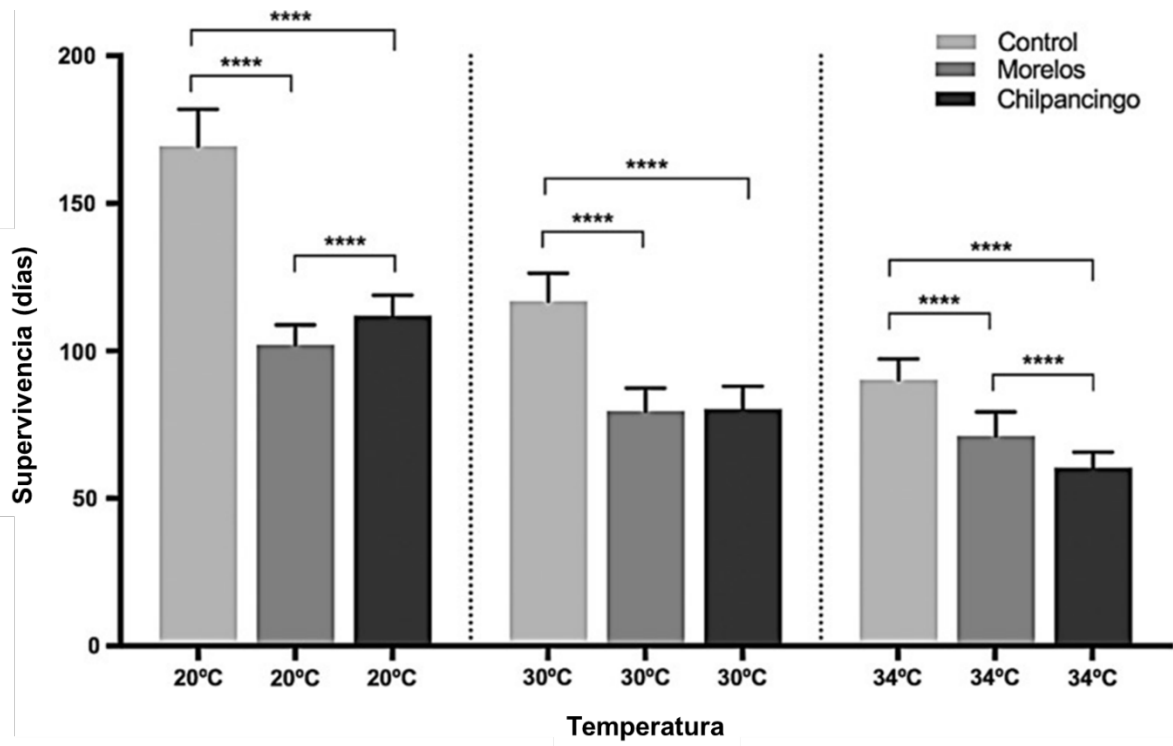


Figura 16. Tiempo de supervivencia de ninfas de quinto estadio de *M. pallidipennis* a diferentes temperaturas (20 °C, 30 °C and 34 °C). ****P < 0.0001.

Discusión

Las chinches expuestas a un incremento de 20 a 30 °C ante infecciones de *T. cruzi* incrementan su capacidad inmune pero este patrón se invierte dramáticamente a 34°C. Nuestros resultados de mejor respuesta inmune ante un incremento sutil de temperatura son similares a los reportados de otros insectos (e.g. Dang *et al.*, 2012). Esto se puede interpretar como una mejor respuesta inmunológica, vía plasticidad fenotípica, a temperaturas moderadamente altas pero inviables a temperaturas más letales. No sabemos los mecanismos que explican estos cambios. Uno de los efectos de las altas temperaturas, sobretodo letales (como es el caso de nuestras chinches, ya que arriba de 34°C sobreviven por un par de días), es un incremento en demanda de oxígeno donde las actividades cardiacas y/o ventilatorias ya no compensan tal demanda y el insecto muere (Frederich y Portner, 2000). La capacidad de tolerar la hipoxia es variable entre especies (Verbak *et al.*, 2016) y, de hecho, no sabemos de esta capacidad en triatominos. En términos de defensa ante un patógeno, una temperatura cercana a la letal (34°C) podría hacer más difícil la acción de la respuesta inmune ante una infección lo cual es coherente con nuestros resultados de supervivencia. Lamentablemente, no existen estudios para comparar nuestros resultados sobre el efecto de temperaturas letales sobre la fisiología e historia de vida de los vectores. De hecho, la mayoría de las discusiones sobre este tema son verbales o bien basados en modelos matemáticos (e.g. Epstein, 2001; Samy *et al.*, 2016; Chalgaf *et al.*, 2018).

Se sabe que la respuesta inmune del triatomo ante *T. cruzi* está relacionada con la región intestinal (Favila-Ruiz *et al.*, 2018). Dado que la primera parte que el

parásito coloniza y se reproduce es el IMA y en menor medida, el IMP (Schaub *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2016), es en este sitio donde se espera que la respuesta inmune debe ser mayor, como indican nuestros resultados. Esto es coherente con la muerte masiva del parásito en esta región a las pocas horas de infección (Ferreira *et al.*, 2016) aunque no queda claro porqué la respuesta inmune no se mantenga suficientemente alta en las otras regiones. Una explicación es que quizás el costo de infección ocurra sólo en el IMA, que es donde la replicación del parásito y quizás el secuestro de recursos por parte del parásito hacia el hospedero sea mayor. Según esto, uno esperaría que la reproducción del parásito en el IMP y recto sea considerablemente menor que el IMA. Sin embargo, no hay manera de saber esto porque nunca se ha bloqueado la respuesta inmune en triatominos como para saber en qué zonas del intestino se favorece más la reproducción. Otra explicación es que quizás sea energéticamente prohibitivo para el triatomino mantener una respuesta inmune alta para matar a los pocos parásitos sobrevivientes. Una tolerancia de este tipo supondría que niveles relativamente bajos del patógeno son mejores para las chinches que estarlos eliminarlos completamente. Esta tolerancia bajo estos supuestos, de hecho, se han demostrado teórica (Moreno-García *et al.*, 2014) y experimentalmente (Goic *et al.*, 2016; Matetovici *et al.*, 2016), y explica porque la resistencia a patógenos no es total. Será interesante poner a prueba la idea de la tolerancia al *T. cruzi* en triatominos.

A diferencia de la respuesta inmune, nuestras predicciones de supervivencia se cumplieron. Los efectos negativos del parásito en la adecuación de las chinches no son nuevos. Por ejemplo, Botto-Mahan (2009) encontró que el *T. cruzi* retrasa el

desarrollo y reduce la supervivencia en *Mepraia spinolai*. En un estudio más relacionado con el nuestro, Elliot y colaboradores encontraron que *T. cruzi* reduce la supervivencia de *Rhodnius prolixus* pero sólo a temperaturas de 24 y 27°C pero sin efecto a temperaturas de 20 y 30°C (Elliot *et al.*, 2015, sin embargo ver Hinestroza *et al.*, 2016). En nuestro caso, las chinches fueron más afectadas por el aislado Chilpancingo que por el aislado Morelos. Estos resultados de supervivencia ante los diferentes aislados están relacionados con los de respuesta inmune, lo que sugiere que la chinche dedica más recursos a la defensa contra aislados más virulentos u otros patógenos. Resultados parecidos se han observado con aislados de *T. cruzi* que varían en virulencia. En relación con una escala altitudinal se han reportado aislados de *T. cruzi* más virulentos obtenidos de triatomíneos localizados a 700 msnm que a 300 o 1400 msnm, lo cual varía con la respuesta inmune de las chinches (De Fuentes-Vicente *et al.*, 2017). La muerte más rápida con el aislado Chilpancingo puede ser quizás, porque el parásito tome más recursos de la chinche en comparación con el aislado Morelos, aunque no conocemos los mecanismos precisos del porqué de los costos de las infecciones para los triatomíneos (de Fuentes-Vicente *et al.*, 2017). De forma interesante, estos efectos letales del aislado Chilpancingo son aún más frecuentes a temperaturas más altas (34°C).

A diferencia del estudio de Elliot y colaboradores (2015), quienes no encontraron un efecto negativo de la supervivencia a temperaturas altas en *R. prolixus*, ellos no usaron una temperatura tan alta (30°C) como la utilizada en este trabajo (34°C). Podría ser que esta temperatura estuviera más cerca de la temperatura letal para *M. pallidipennis* que la que usaron Elliot *et al.*, (2015) para *R. prolixus*. Podría

también ser que las diferencias entre nuestro estudio y el de Elliot *et al.*, (2015) reflejen diferentes momentos co-evolutivos en la interacción entre las chinches y sus parásitos *Trypanosoma rangeli* y *T. cruzi* (e.g. Urrea *et al.*, 2005; Vallejo *et al.*, 2009). Por otra parte, nuestros resultados pueden usarse también para entender la adaptación de las chinches a los umbrales térmicos en la naturaleza. Por un lado, el límite térmico superior actual de *M. pallidipennis* parece raramente rebasar los 34 °C (Vidal-Acosta *et al.*, 2000; Benítez-Alva *et al.*, 2012) lo cual es coherente con nuestros resultados. Aunque nosotros usamos los umbrales predichos según diferentes escenarios de cambio climático, es probable que estos escenarios ya estén ocurriendo en algunas zonas cálidas de México donde *M. pallidipennis* se distribuye (Carmona-Castro *et al.*, 2018). Por otra parte, el límite térmico superior puede ser más bajo si *M. pallidipennis* está infectada con *T. cruzi*. Esto sugeriría que el nicho térmico de las chinches podría ser moldeado por el *T. cruzi* aunque esto tendría que validarse con datos directamente del campo.

Nuestros resultados ilustran la importancia de utilizar variantes de un patógeno que difieren en patogenicidad ya que los costos de estos también pueden variar para los vectores. De hecho, se tienen datos de que diferentes DTUs están asociados a diferentes sintomatologías en humanos (Llewellyn *et al.*, 2009). En el caso de la chinche, la exposición a diferentes aislados es realista ya que diferentes grupos de *T. cruzi* circulan y pueden coincidir en los mismos individuos (e.g. Curtis-Robles *et al.*, 2018); sin embargo, no se conocen la repercusión y costos en la respuesta inmune y en otros parámetros biológicos. La existencia de las variantes de *T. cruzi* en la naturaleza podrían depender del tiempo de vida en los triatomíneos, donde a

mayor es el costo del aislado de *T. cruzi*, menor es el tiempo que tendrá en un vector antes de pasar al siguiente hospedero. A este respecto, conocemos poco sobre el mantenimiento de los diferentes aislados en las poblaciones naturales (Vallejo *et al.*, 2009).

Finalmente, estos resultados tienen implicaciones para el entendimiento de la dinámica de la enfermedad de Chagas en la naturaleza. Asumiendo estos escenarios experimentales como reales, la enfermedad de Chagas reduciría su prevalencia en términos de efectividad vectorial medida como tiempo de vida de las chinches. Esta forma cruda de conclusión claramente omite otras complejidades como es el hecho de que las chinches modifiquen su conducta de alimentación en respuesta a la infección. En este sentido, estudios previos han encontrado que las chinches infectadas se alimentan y defecan más rápido (Botto-Mahan *et al.*, 2006), son más activas y pueden ser capaces de encontrar los olores humanos de forma más rápida (resultados no publicados por los autores). De esta manera, se podría predecir que si bien las chinches infectadas viven menos, podrían ser igualmente peligrosas si su tasa de consumo de alimento es más alta que las de chinches libres de infección. De ser este el caso, entonces el cambio climático podría llevar a las chinches a ser igualmente o quizás más peligrosas. Futuros experimentos deberían poner a prueba si las temperaturas altas modifican la capacidad vectorial de los triatomíneos.

Conclusiones

Existe una variación entre la capacidad inmune del triatomino y la temperatura frente a una infección por *T. cruzi*.

La actividad enzimática de profenoloxidasa y fenoloxidasa fue menos robusta a temperaturas que simulan cambio climático, es decir, a temperaturas superiores a 30 °C existe un impacto drástico en la respuesta inmune de los triatominos

La actividad enzimática de profenoloxidasa y fenoloxidasa fue mayor en triatominos infectados con el aislado Chilpancingo que con el aislado de Morelos de *T. cruzi*.

El IMA es la única región del intestino de triatomino que presenta actividad enzimática de profenoloxidasa y fenoloxidasa, la cual disminuye conforme incrementa la temperatura desde los 20 °C hasta los 34 °C.

La supervivencia de triatominos se redujo a altas temperaturas que simulan cambio climático (34 °C), efecto que fue más letal cuando se infectó a los triatominos con el aislado de Chilpancingo en comparación con el aislado Morelos.

Los triatominos no infectados tuvieron el tiempo de supervivencia más alto a las tres diferentes temperaturas.

Los escenarios de cambio climático pueden reducir tanto la aptitud del triatomino como su capacidad vectorial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamo SA. 2014. The effects of stress hormones on immune function may be vital for the adaptive reconfiguration of the immune system during fight-or-flight behavior. *Int Comp Biol* 54:419–426.
- Akoda K, Van den Bossche P, Marcotty T, Kubi C, Coosemans M, De Deken R, Van den Abbeele J. 2009. Nutritional stress affects the tsetse fly's immune gene expression. *Med Vet Entomol* 23:195–201.
- Ashida M, Brey P. 1997. Recent advances on the research of the insect prophenoloxidase cascade, in *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*, Eds Brey P., Hultmark D., editors. (London: Chapman & Hall) 135–72.
- Ashida M, Yamazaki HI. 1990. Biochemistry of phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation, In E Ohnishi, H Ishizaki (Eds), *Moulting and Metamorphosis*, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin. pp. 239-65.
- Asin S, Catalá S. Development of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*: influence of temperature and blood consumption. *J Parasitol.* 1995; 81(1):1-7.
- Azambuja P, Feder D, Mello CB, Gomes SAO, Garcia ES. 1999. Immunity in *Rhodnius prolixus*: Trypanosomatid-vector interactions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (suppl I):219-22.

- Azambuja P, Garcia ES, Waniek PJ, Vieira SC, Figueiredo MB, Gonzalez MS, Mello CB, Castro DP, Ratcliffe NA. *Rhodnius prolixus*: from physiology by Wigglesworth to recent studies of immune system modulation by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. J Insect Physiol. 2017; 97: 45-65. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.11.006
- Barreto-Santana D, Santos-Schuenker L, da Fonseca AR, Gurgel-Gonçalves R, Cuba-Cuba CA. Susceptibility of different *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) to a Brazilian strain of *Trypanosoma rangeli* (SC58/KP1-). Biomedica. 2015; 35(1):81-9. doi: 10.1590/S0120-41572015000100011.
- Benítez-Alva JI, Herón-Huerta, Téllez-Rendón JL. 2012. Distribución de triatominos (Heteroptera: Reduviidae) asociados a la vivienda humana y posibles zonas de riesgo en seis estados de la República Mexicana. BIOCYT. 2012; (17): 327-40.
- Booth M. Climate change and the neglected tropical diseases. Adv Parasitol. 2018; 100:39-126. doi: 10.1016/bs.apar.2018.02.001.
- Botto-Mahan C, Cattán PE, Medel R. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. Acta Trop. 2006; 98(3):219-23.
- Botto-Mahan C. *Trypanosoma cruzi* induces life-history trait changes in the wild kissing bug *Mepraia spinolai*: implications for parasite transmission. Vector-Borne Zoo Dis 2009; 9(5): 505-10. doi: 10.1089/vbz.2008.0003

- Cable J, Barber I, Boag B, Ellison AR, Morgan ER, Murray K, Pascoe EL, Sait SM, Wilson AJ, Booth M. Global change, parasite transmission and disease control: lessons from ecology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017; 372(1719). pii: 20160088. doi: 10.1098/rstb.2016.0088.
- Cahill AE, Aiello-Lammens ME, Fisher-Reid MC, Hua X, Karanewsky CJ, Ryu HY, Sbeglia GC, Spagnolo F, Waldron JB, Warsi O, Wiens JJ. 2013. How does climate change cause extinction?. *Proc Biol Sci* 7; 280 (1750): 20121890.
- Campbell-Lendrum D, Manga L, Bagayoko M, Sommerfeld J. Climate change and vector-borne diseases: what are the implications for public health research and policy?. *Phil Trans R Soc B.* 2015; 370: 20130552. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0552>
- Carcavallo RU, Curto de Casas SI, Sherlock IA, Galíndez Girón I, Jurberg J, Galvao C. Geographic distribution and alti-latitudinal dispersion. In: Carcavallo, R.U., American Trypanosomiasis Chagas Disease. Galindez Girón I, Jurberg J, Lent H. (Eds.), *Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas*, vol. II. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil; 1999. p. 747-92.
- Carmona-Castro O, Moo-Llanes DA, Ramsey JM. Impact of climate change on vector transmission of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) in North America. *Med Vet Entomol.* 2018; 32(1):84-101. doi: 10.1111/mve.12269.
- Castro DP, Moraes CS, González MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, García ES. *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decrease microbiota in

- Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasites survival and development. PLoS One. 2012; 7(5):e36591. doi: 10.1371/journal.pone.0036591.
- Catalá S, Gorla D, Basombrio M. Vectorial transmission of *Trypanosoma cruzi* in an experimental system with susceptible and immunized host. Am J Trop Med Hyg. 1992; 47(1):20-6.
- Catalán TP, Wozniak A, Niemeyer HM, Kalergis AM, Bozinovic F. 2012. Interplay between thermal and immune ecology: effect of environmental temperature on insect immune response and energetic costs after an immune challenge. J Insect Physiol 58:310–7.
- CDC. 2015. Parasites – American Trypanosomiasis (Chagas Disease). <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/index.html>
- Ceccarelli S, Balsalobre A, Medone, P, Cano ME, Gurgel RG, Feliciangeli D, Vezzani D, Wisivesky-Colli, Gorla DE, Marti GA, Rabinovich JE. 2018. DataTri, a database of American triatomine species occurrence. Sci Data 5, 180071: 1-9.
- Cerenius L, Luel-Lee B, Söderhäll K. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends in Immunology 29: 263-71.
- Chagas C. Nova tripanosomiazze humana: estudos sobre a morfologjia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999. 1: 159-218. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>.

- Córdoba-Aguilar A, Jiménez-Valdés JG, Lanz-Mendoza H. 2009. Seasonal variation in ornament expression, body size, energetic reserves, immune response and survival in males of a territorial insect. *Ecol Entomol* 34: 228-39.
- Cornelissen T. 2011. Climate change and its effects on terrestrial insects and herbivory patterns. *Neotrop Entomol* 40 (2): 155-63.
- Dang VT, Speck P, Benkendorff K. Influence of elevated temperatures on the immune response of abalone, *Haliotis rubra*. *Fish Shellfish Immunol*. 2012; 32(5):732-40. doi: 10.1016/j.fsi.2012.01.022.
- Daquinag AC, Nakamura S, Takao T, Shimonishi Y. Primary structure of a potent endogenous dopa-containing inhibitor of phenol oxidase from *Musca domestica*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(7):2964-8.
- de Fuentes-Vicente JA, Cabrera-Bravo M, Enríquez-Vara JN, Bucio-Torres MI, Gutiérrez-Cabrera AE, Vidal-López DG, Martínez-Ibarra JA, Salazar-Schettino PM, Córdoba-Aguilar A. Relationships between altitude, triatomine (*Triatoma dimidiata*) immune response and virulence of *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas' disease. *Med Vet Entomol*. 2017;31(1):63-71. doi: 10.1111/mve.12198.
- Deutsch CA, Tewksbury JJ, Huey RB, Sheldon KS, Ghalambor CK, Haak DC, Martin PR. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *PNAS*. 2008; 105 (18): 6668-72. <http://doi.org/10.1073/pnas.0709472105>.
- Di Iorio O, Gürtler RE. Seasonality and Temperature-Dependent Flight Dispersal of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) and Other Vectors of Chagas

- Disease in Western Argentina. *J Med Entomol.* 2017; 54(5):1285-1292. doi: 10.1093/jme/tjx109.
- Dworak ES, Araújo SM, Gomes ML, Massago M, Ferreira EC, Toledo MJO. 2017. Sympatry influence in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with triatomine. *Rev Soc Bras Med Trop* 50(5): 629-37.
- Eleftherianos I, Revenis C. 2011. Role and Importance of Phenoloxidase in Insect Hemostasis. *J Innate Immunity* 3: 28-33.
- Elliot SL, Rodrigues JdO, Lorenzo MG, Martins-Filho OA, Guarneri AA. 2015. *Trypanosoma cruzi*, Etiological Agent of Chagas Disease, Is Virulent to Its Triatomine Vector *Rhodnius prolixus* in a Temperature-Dependent Manner. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(3):e0003646. doi: 10.1371/journal.pntd.0003646.
- Epstein PR. 2000. Is global warming harmful to health? *Sci Am* 283: 50–7.
- Favila-Ruiz G, Jiménez-Cortés JG, Córdoba-Aguilar A, Salazar-Schettino PM, Gutiérrez-Cabrera AE, Pérez-Torres A, de Fuentes-Vicente JA, Vences-Blanco MO, Bucio-Torres MI, Flores-Villegas AL, Cabrera-Bravo M. Effects of *Trypanosoma cruzi* on the phenoloxidase and prophenoloxidase activity in the vector *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae). *Parasit Vectors.* 2018; 11(1):434. doi: 10.1186/s13071-018-3016-0.
- Fedorka KM, Copeland EK, Winterhalter WE. 2013. Seasonality influences cuticle melanization and immune defense in a cricket: support for a temperature-

dependent immune investment hypothesis in insects. *J Exp Biol* 216:4005-10.

Fedorka KM, Lee V, Winterhalter WE. 2012. Thermal environment shapes cuticle melanism and melanin-based immunity in the ground cricket *Allonemobius socius*. *Evol Ecol* 27:521–31.

Fellet MR, Lorenzo MG, Elliot SL, Carrasco D, Guarneri AA. Effects of infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the reproductive performance of the vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS One*. 2014;9(8):e105255. doi: 10.1371/journal.pone.0105255.

Ferguson LV, Heinrichs DE, Sinclair BJ. 2016. Paradoxical acclimation responses in the thermal performance of insect immunity. *Oecol* 181:77–85

Ferguson LV, Sinclair BJ. 2017. Insect immunity varies idiosyncratically during overwintering. *J Exp Zool* 1-13.

Ferreira RC, Kessler RL, Lorenzo MG, Paim RM, Ferreira Lde L, Probst CM, Alves-Silva J, Guarneri AA. Colonization of *Rhodnius prolixus* gut by *Trypanosoma cruzi* involves an extensive parasite killing. *Parasitol*. 2016; 143:434–43. doi: 10.1017/S0031182015001857.

Flores-Villegas AL, Salazar Schettino PM, Córdoba- Aguilar A, Gutiérrez- Cabrera AE, Rojas- Wastavino GE, Bucio-Torres MI, Cabrera-Bravo M. Immune defence mechanisms of triatomines against bacteria, viruses, fungi and parasites. *Bull Entomol Res*. 2015; 105(5):523-32. doi: 10.1017/S0007485315000504.

- Forrest JRK. 2016. Complex responses of Insect phenology to Climate change. *Current Op Insect Sci* 17: 49-54.
- Frainer A, McKie BG, Amundsen PA, Knudsen R, Lafferty KD. Parasitism and the biodiversity-functioning relationship. *Trends Ecol Evol.* 2018; 33(4):260-268. doi: 10.1016/j.tree.2018.01.011.
- Gage KL, Burkot TR, Eisen RJ, Hayes EB. 2008. Climate and vector borne diseases. *Am J Prev Med* 35: 436–50.
- Gage KL, Burkot TR, Eisen RJ, Hayes EB. Climate and vector borne diseases. *Am J Prev Med.* 2008; 35(5):436-50. doi: 10.1016/j.amepre.2008.08.030.
- Galvao C, Carcavallo R, Da Silva D, Jurgberg J. 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatomine Jeannel, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic studies notes. *Zootaxa* 202: 1-36.
- Garcia ES, Genta FA, Azambuja P, Schaub GA. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol.* 2010; 26(10):499-505. doi: 10.1016/j.pt.2010.07.003.
- Garza M, Feria Arroyo TP, Casillas EA, Sánchez-Cordero V, Rivaldi CL, Sarkar S. Projected Future Distributions of Vectors of *Trypanosoma cruzi* in North America under Climate Change Scenarios. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(5):e2818. doi: 10

- Gehman ALM, Hall RJ, Byers JE. 2018. Host and parasite thermal ecology jointly determine the effect of climate warming on epidemic dynamics. PNAS 115 (4) 744-9.
- Genta FA, Souza RS, Garcia ES, Azambuja P. Phenol oxidases from *Rhodnius prolixus*: Temporal and tissue expression pattern and regulation by ecdysone. J Insect Physiol. 2010; 56(9):1253-9. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.03.027.
- Gillies MT. 1953. The duration of the gonotrophic cycle in *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*, with a note on the efficiency of hand catching. East Afr Med J 30 (4): 129-35.
- Goic B, Stapleford KA, Frangeul L, Doucet AJ, Gausson V, Blanc H, Schemmel-Jofre N, Cristofari G, Lambrechts L, Vignuzzi M, Saleh MC. Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. Nat Commun. 2016; 7:12410. doi: 10.1038/ncomms12410.
- Gomes SAO, Feder D, Garcia ES, Azambuja P. 2003. Suppression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*. J Insect Physiol 49: 829-37.
- González-Santoyo I, Córdoba-Aguilar A. 2012. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. Entomol Exp App 142: 1-16.
- Guarneri AA, Lorenzo MG. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. J Insect Physiol. 2017; 97:66-76. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.07.005.

- Gürtler RE, Ceballos LA, Ordóñez-Krasnowski P, Lanati LA, Stariolo R, Kitron U. 2009. Strong Host-Feeding Preferences of the Vector *Triatoma infestans* Modified by Vector Density: Implications for the Epidemiology of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3(5):e447. doi: 10.1371/journal.pntd.0000447.
- Halstead SB. 2008. Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol* 53: 273-91.
- Hansen J, Sato M, Ruedy R, Lo K, Lea DW, Medina-Elizade M. 2006. Global temperature change. *PNAS* 103 (39): 14288-93.
- Hao ZR, Kasumba I, Lehane MJ, Gibson WC, Kwon J, Aksoy S. 2001. Tsetse immune responses and trypanosome transmission: implications for the development of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12648-53.
- Hinestroza G, Ortiz MI, Molina J. Behavioural fever response in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae) to intracoelomic inoculation of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;49(4):425-32. doi: 10.1590/0037-8682-0415-2015.
- Ibarra-Cerdeña CN, Zaldívar-Riverón A, Peterson AT, Sánchez-Cordero V, Ramsey JM. Phylogeny and Niche Conservatism in North and Central American Triatomine Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), Vectors of Chagas' Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(10):e3266. doi: 10.1371/journal.pntd.0003266.

IPCC, 2007. 4th Assessment Report “Climate Change 2007: Synthesis Report”.
Download from <http://www.ipcc.ch/ipccreports/ar4-syr.htm> (2008-11-24).

IPCC, 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report Contributions of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the IPCC. Edited by Core Writing Team, Pachauri R.K., Meyer L.A. Intergovernmental Panel on Climate Change, Geneva.

IPCC. 2007. 4th Assessment Report “Climate Change 2007: Synthesis Report”.
Download from <http://www.ipcc.ch/ipccreports/ar4-syr.htm> (2018-11-24).

Jia P, Chen X, Chen J, Lu L, Liu Q, Tan X. 2017. How does the dengue vector mosquito *Aedes albopictus* respond to global warming?. *Parasit Vectors*. 2017; 10(1):140. doi: 10.1186/s13071-017-2071-2.

Jiménez-Cortés JG, Córdoba-Aguilar A. Condition dependence and trade-offs of sexual versus non-sexual traits in an insect. *J Ethology*. 2013; 31 (3): 275-84. doi: 10.1007/s10164-013-0377-x.

Klotz SA, Dorn PL, Klotz JH, Pinnas JL, Weirauch C, Kurtz JR, Schmidt J. Feeding behavior of triatomines from the southwestern United States: an update on potential risk for transmission of Chagas disease. *Acta Trop*. 2009; 111(2):114-8. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.03.003.

Kollien AH, Schaub GA. The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol Today*. 2000; 16(9):381-7.

Lafferty KD, Mordecai EA. 2016. The rise and fall of infectious disease in a warmer world. *F1000Res* 2040: 1-8

- Laughton AM, Siva-Jothy MT. A standardised protocol for measuring phenoloxidase and prophenoloxidase in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*.2011; 42 (2): 140–9. doi: 10.1051/apido/2010046
- Lavine MD, Strand MR. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Molec Biol* 32:1295–309.
- Lazzari CR. Temperature preference in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Bull Em Res*. 1991; 81, 273-276.
- Lee KP, Simpson SJ, Wilson K. Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Functional Ecol*. 2008; 22: 1052-61.
- Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist*. 1979; 163: 123-520.
- Lu A, Zhang Q, Zhang J, Yang B, Wu K, Xie W, Luan YX, Ling E. 2014. Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Front Physiol* 5: 1-15.
- Manabe S, Wetherald RT. 1975. The Effects of Doubling the CO₂ Concentration on the climate of a General Circulation Model. *J Atmos Sci* 32:3–15.
- Martínez-Ibarra JA, Alejandre-Aguilar R, Torres-Morales A, Trujillo-García JC, Noguera-Torres B, Trujillo-Contreras F. Biology of three species of the *Meccus phyllosomus* complex (Hemiptera: Reduviidae Triatominae) fed on blood of hens and rabbits. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(7):787-94.

Martínez-Ibarra JA, Noguera-Torres B, Salazar-Schettino PM, Vences-Blanco MO, De la Torre-Álvarez FJ, Montañez-Valdez OD. 2014. Differences on biological attributes of three populations of *Meccus pallidipennis* (Stål) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *J Vector Borne Dis.* 51: 22-6.

Martínez-Ibarra JA, Salazar-Schettino PM, Solorio-Cibrián M, Cabrera-Bravo M, Novelo-López M, Vences MO, Montes-Ochoa JY, Noguera-Torres B. Influence of temperature and humidity on the biology of *Triatoma mexicana* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(7):719-23.

Martins, André Vianna, Gomes, Andréia Patrícia, Gomes de Mendonça, Eduardo, Lopes Rangel Fietto, Juliana, Santana, Luiz Alberto, de Almeida Oliveira, Maria Goreti, Geller, Mauro, de Freitas Santos, Ramon, Roger Vitorino, Rodrigo, & Siqueira-Batista, Rodrigo. (2012). Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio*, 16(1), 45-58.

Matetovici I, Caljon G, Van Den Abbeele J. Tsetse fly tolerance to *T. brucei* infection: transcriptome analysis of trypanosome-associated changes in the tsetse fly salivary gland. *BMC Genomics.* 2016; 17(1):971.

Mello CB, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA. 1996. Differential *in vitro* and *in vivo* behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol* 82:112-21.

- Mello CB, Garcia ES, Ratcliffe NA, Azambuja P. 1995. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: Interplay hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. *J Invert Pathol* 65:261-268.
- Messenger LA, Garcia L, Vanhove M, Huaranca C, Bustamante M, Torrico M, Torrico F, Miles MA, Llewellyn MS. 2015. Ecological host fitting of *Trypanosoma cruzi* TcI in Bolivia: mosaic population structure, hybridization and a role for humans in Andean parasite dispersal. *Mol Ecol* 24(10): 2406–22.
- Moncayo A. Chagas disease: epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. *World Health Stat Q.* 1992; 45(2-3):276-9.
- Mordecai EA, Paaijmans KP, Johnson LR, Balzer C, Ben-Horin T, de Moor E, McNally A, Pawar S, Ryan SJ, Smith TC, Lafferty KD. 2013. Optimal temperature for malaria transmission is dramatically lower than previously predicted. *Ecol Lett* 16:22–30.
- Murdock CC, Paaijmans KP, Bell AS, King JG, Hillyer JF, Read AF, Thomas MB. Complex effects of temperature on mosquito immune function. *PNAS.* 2012; 279: 3357-66.
- Nation JL (Ed). 2008. *Insect physiology and biochemistry*. CRC Press. Florida, USA.
- Noden BH, Pumpuni CB, Vaughan JA, Beier JC. 1995. Non-infectious sporozoites in the salivary glands of a minimally susceptible anopheline mosquito. *J Parasitol* 81: 912-5.

- Ogden NH, Lindsay LR. Effects of climate and climate change on vectors and vector-borne diseases: ticks are different. *Trends Parasitol.* 2016; 32(8):646-656. doi: 10.1016/j.pt.2016.04.015.
- OMS. 2015. Control of Chagas Disease. *WHO Technical Report Series* 905: 82-83.
- Organización Mundial de la Salud. 2016. Reglamento Sanitario Internacional 2005. Tercera Edición. Ginebra: OMS. 93 pp.
- Paaijmans KP, Read AF, Thomas MB. 2009. Understanding the link between malaria risk and climate. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 13844-9.
- Parham PE, Waldock J, Christophides GK, Hemming D, Augusto F, Evans KJ, Fefferman N, Gaff H, Gumel A, LaDeau S, Lenhart S, Mickens RE, Naumova EN, Ostfeld RS, Ready PD, Thomas MB, Velasco-Hernandez J, Michael E. 2015. Climate, environmental and socio-economic change: weighing up the balance in vector borne disease transmission. *Phil Trans R Soc B* 370: 20130551.
- Piccinali RV, Canale DM, Sandoval AE, Cardinal MV, Jensen O, Kitron U, Gürtler RE. *Triatoma infestans* Bugs in Southern Patagonia, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16(5):887-9. doi: 10.3201/eid1605.091260.
- Salazar-Schettino PM, de Haro I, Cabrera M. 2005. Tres especies de Triatominos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. *Medicina (Buenos Aires)* 65(1): 63-9.
- Salazar-Shettino PM, Rojas-Watavino G, Cabrera-Bravo M, Bucio-Torres MI, Martinez-Ibarra JA, Monroy-Escobar MC, Rodas-Retana A, Guevara-Gómez

- Y, Vences-Blanco MO, Ruiz-Hernández AL, Torres-Gutiérrez E. 2010. A revision of thirteen species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas disease in Mexico. *J Selva Andina Res Soc* 1(1): 57-80.
- Schaub GA, Meiser CK, Balczun C. Interactions of *Trypanosoma cruzi* and Triatomines. En: Mehlhorn H. Progress in Parasitol. Springer, Germany, 2011; p. 155–78.
- Semenza JC, Menne B. 2009. Climate change and infectious diseases in Europe. *Lancet Infect Dis* 9: 365–75.
- Sgro CM, Terblanche JS, Hoffmann AA. What Can Plasticity Contribute to Insect Responses to Climate Change?. *Annu Rev Entomol.* 2016; 61:433-51. doi: 10.1146/annurev-ento-010715-023859.
- Söderhäll K, Cerenius L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol.* 10(1):23-8.
- Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Avery KB, Tignor M, Miller HL (Eds.). 2007. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, and New York, NY, USA.
- Sternberg ED, Thomas MB. Local adaptation to temperature and the implications for vector-borne diseases. *Trends Parasitol.* 2014; 30(3):115-22. doi: 10.1016/j.pt.2013.12.010.

- Tay-Zavala J, Sánchez-Vega JT, Calderón-Romero L, Romero-Cabello R, Ruiz-Sánchez D, García-Tay JA. 2008. Estudios del ciclo biológico de *Triatoma pallidipennis* (Stat 1872) y otros aspectos sobre su biología. Rev Fac Med UNAM 51 (2): 56-9.
- Thomas MB, Blanford S. 2003. Thermal biology in insect-parasite interactions. TRENDS Ecol Evol 18(7): 344-50.
- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revised. Int J Parasitol. 2001; 31(5-6):472-81.
- Vidal-Acosta V, Ibáñez-Bernal S, Martínez-Campo C. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. Salud Pública de México. ISSN: 0036-3634. 2000; 24(6): 496-503.
- Vieira CS, Mattos DP, Waniek PJ, Santangelo JM, Figueiredo MB, Gumiel M, da Mota FF, Castro DP, Garcia ES, Azambuja P. *Rhodnius prolixus* interaction with *Trypanosoma rangeli*: modulation of the immune system and microbiota population. Parasit Vectors. 2015; 8:135. doi: 10.1186/s13071-015-0736-2.
- Villegas-García JC, Santillán-Alarcón S 2004. The influence of two different temperatures on *Meccus pallidipennis* Stål, 1872 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in laboratory. Entomol Vect 11: 445-56.
- Wojda I. Temperature stress and insect immunity. J Thermal Biol. 2017; 68: 96-103.
- Wolinska J, King KC. Environment can alter selection in host-parasite interactions. Trends Parasitol. 2009; 25(5):236-44. doi: 10.1016/j.pt.2009.02.004.

World Health Organization. 2015. Global technical strategy for malaria 2016-2030.

World Health Organization.

https://www.who.int/malaria/areas/global_technical_strategy/en/. Accessed

20 Nov 2018.

Wu X, Lu Y, Zhou S, Chen L, Xu B. Impact of climate change on human infectious diseases: Empirical evidence and human adaptation. *Environ Int.* 2016; 86:14-23. doi: 10.1016/j.envint.2015.09.007.

Yee DA, Ezeakacha NF, Abbott KC. 2017. The interactive effects of photoperiod and future climate change may have negative consequences for a wide-spread invasive insect. *Oikos.* 2017; 126 (1): 40-51. <https://doi.org/10.1111/oik.03635>.

APÉNDICE

Artículo requisito para la obtención del grado:

Actividad del sistema profenoloxidasa y supervivencia de triatomos infectados con diferentes aislados de *Trypanosoma cruzi* a diferentes temperaturas: entendiendo a la enfermedad de Chagas a través del cambio climático.

Publicado en:

Parasites and Vectors

08 May 2019 | <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3477-9>

RESEARCH

Open Access



Activity of the prophenoloxidase system and survival of triatomines infected with different *Trypanosoma cruzi* strains under different temperatures: understanding Chagas disease in the face of climate change

Berenice González-Rete¹, Paz María Salazar-Schettino², Martha I. Bucio-Torres², Alex Córdoba-Aguilar^{3*} and Margarita Cabrera-Bravo^{2*}

Abstract

Background: Little is known about how human disease vectors will modify their life history patterns and survival capacity as a result of climate change. One case is that of Chagas disease, which has triatomine bugs and *Trypanosoma cruzi* as vectors and parasite, respectively. This work aimed to determine: (i) the activity of the prophenoloxidase system (prophenoloxidase and phenoloxidase activity, two indicators of immune ability) in three intestine regions (anterior midgut, posterior midgut and rectum) of the triatomine bug *Meccus pallidipennis* under three temperature conditions (20 °C, 30 °C and 34 °C) against two *T. cruzi* strains [ITRI/MX/14/CHIL (Chilpancingo) and ITRI/MX/12/MOR (Morelos)], and (ii) whether vector survival varies under these three temperatures after infection by these *T. cruzi* strains.

Results: Our results indicate that prophenoloxidase activity was lower at higher temperatures, that the level of prophenoloxidase activity elicited by each strain was different (higher in Chilpancingo than in Morelos strains), and that prophenoloxidase activity was more intense in the anterior midgut than in the posterior midgut or rectum. Survival rates were lower in insects maintained at higher temperatures and infected by Chilpancingo strains.

Conclusions: These results indicate that climate change could lead to lower prophenoloxidase activity and survival rates in triatomines when infected with different *T. cruzi* strains, which could reduce the vector capacity of *M. pallidipennis*.

Keywords: *Meccus pallidipennis*, *Trypanosoma cruzi*, Strains, Climate change, Temperature, Phenoloxidase activity, Prophenoloxidase activity

*Correspondence: acordoba@iecologia.unam.mx; imay@unam.mx

² Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

³ Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. P. 70-275, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



Background

The global temperature increase in recent decades has triggered a multitude of ecological changes, host-parasite interactions being one of such changes [1, 2]. In this regard, understanding the interactions between vector insects and the pathogen agents that they transmit to humans is crucial in assessing the future risk posed by these diseases [3–5]. Recent projections indicate an increase in the distribution of vector insects and the prevalence of the diseases they transmit [6, 7], considering that insects are ectothermic (i.e. basic physiological functions such as locomotion, growth and reproduction are strongly influenced by environmental temperature) [8] and that higher temperatures will promote shorter life-cycles and more rapid reproduction [9, 10]. While this process cannot be generalized for all ectothermic organisms [11], not even for all vectors [9, 12], it is true that empirical data on insects under controlled conditions are much needed to support theoretical models [3, 13].

Triatomines (Hemiptera: Reduviidae) are vectors for *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida) [14, 15], the causative agent of Chagas disease. In general, the geographical range of triatomines extends from tropical zones, where they withstand temperatures near 40 °C [16, 17], to more temperate zones, with temperatures of about 18 °C [18, 19]. However, the relationship between *T. cruzi* and its vectors could modulate these temperature thresholds [20, 21], possibly due to resource cost-related factors and manipulation by the parasite [22].

In vitro studies on triatomines have demonstrated that higher temperatures lead to increased development and reproduction rates for the vector [23, 24], and more frequent feeding events [25–28]. Such an increase would result in a higher risk of *T. cruzi* transmission [28–30], but a balance could be established due to a possible decrease in triatomine survival [26, 31–33]. It is not clear whether this decrease in survival rate is due to an interaction with the parasite, since higher temperatures are expected to favor a more robust prophenoloxidase activity (a proxy of the insect's immune response) in the vector [28, 34–36].

Triatomine-*T. cruzi* interactions take place in the digestive tract of the vector [37–39]. When triatomines feed from the blood of an infected vertebrate, *T. cruzi* colonize the anterior midgut (AMG), posterior midgut (PMG) and rectum [39, 40].

Interestingly, the AMG is a battlefield between parasites and the host, since almost immediately after blood ingestion, about 80% of parasites die [41, 42]. The prophenoloxidase (proPO) and phenoloxidase (PO) enzymatic cascade is known to be a key element in the immune response associated to the defense against pathogens

and their removal [43–46]. In this regard, proPO and PO activity in *M. pallidipennis* were found associated after one week of infection with *T. cruzi* [45].

This study aimed to determine the effect of temperature on the immune response in triatomine-*T. cruzi* interactions, as assessed by proPO and PO activity, in the AMG, PMG and rectum of *M. pallidipennis*. This species is the vector with the highest epidemiological importance in the transmission of Chagas disease in Mexico [47]. It can survive in a temperature range of 18–28 °C when infected by *T. cruzi*, with 27–28 °C being its optimal range [48, 49]. Considering these temperature ranges, triatomine vectors in our study were bred and kept at 20 °C, 30 °C and 34 °C. The reason for choosing the last temperature was two-fold: first, some climate change scenarios predict an increase of 4 °C above the current temperatures [50]; secondly, previous experiments have indicated that *M. pallidipennis* does not survive above 34 °C. As an additional variable, infection with two *T. cruzi* strains was considered in this work. Different isolates and discrete typing units (DTUs) are known to occur in different regions under natural conditions, but it is not clear whether they affect the vector fitness in a differential manner. Increased temperatures are expected to improve triatomine proPO activity [51, 52] at the AMG level, while vector survival rates are expected to decrease [21]. The effect of the different isolates cannot be predicted, but the effects of an isolate type on triatomine survival are expected to remain unaltered under different temperature conditions.

Methods

Meccus pallidipennis specimens

Newly-moulted, fifth-instar *M. pallidipennis* nymphs were kept in the insectarium of the Laboratorio de Biología de Parásitos (Parasite Biology Laboratory, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México) at 30 °C and a relative humidity (RH) of 60% under a 12/12 h light/darkness cycle. These triatomines are descendant of insects collected in the state of Morelos, Mexico, in 1989, with regular introduction of wild specimens. Specimens were randomly selected for the experiments.

Trypanosoma cruzi strains

The strain ITRI/MX/12/MOR (further referred to as Morelos) was obtained from a male *M. pallidipennis* specimen captured and isolated in 2012 in Cuernavaca, Morelos, Mexico. This strain has been characterized as TcI [45]. The strain ITRI/MX/14/CHIL (further referred to as Chilpancingo) was obtained from a female *M. pallidipennis* specimen captured and isolated in 2014 in Chilpancingo, Guerrero, Mexico. This strain has not

yet been characterized. Both strains were used to infect female CD-1 mice (15–18 g). Both strains were maintained in CD-1 mice by cyclical passages.

Infection, incubation and confirmation of infection

Infection of M. pallidipennis nymphs

For each strain, 150 nymphs were infected by allowing them to feed from mice that had been inoculated with 20,000 *T. cruzi* metacyclic trypomastigotes/ml 15 days before, to ensure that the parasite was in the exponential stage of growth [45]. Additionally, 150 nymphs were allowed to feed from non-infected female CD-1 mice of the same weight (15–18 g), to be used as a control group. The nymphs of each group were allowed to feed for 15–20 min in the dark, in groups of 5 nymphs per mouse (Morelos, Chilpancingo and control) until they detached themselves from the feeding source and showed clear signs of satiety (the abdomen grew to approximately the double of its pre-feeding size). Based on the levels of parasitemia in the mice, each infected insect ingested approximately 8000 parasites.

Temperature challenge

After feeding, the nymphs were placed in plastic jars (one per jar) and labeled for identification. Fifty nymphs infected with the Morelos strain, 50 nymphs infected with the Chilpancingo strain, and 50 control (non-infected) nymphs were incubated at 20 ± 2 °C, 30 ± 2 °C and 34 ± 2 °C and 60% RH for 15 days (acclimatization period) in an incubator (FE-131AD, FELISA, City, Mexico). In total, 150 nymphs were subjected to each temperature.

Confirmation of infection

After 15 days of incubation, the rectal content of each specimen was obtained by abdominal compression and examined by direct observation to confirm the presence of *T. cruzi* blood trypomastigotes [45]. A drop of PBS 1 × pH 7.2 (Na_2HPO_4 8×10^{-6} M, KH_2PO_4 10^{-6} M, KCl 3×10^{-6} M, NaCl 10^{-4} M) was placed on a glass slide. A drop of triatomine rectal content was added and the mixture was homogenized [45]. A 10- μ l aliquot was taken and microscopically observed under a 40× objective (Olympus CH-2, Center Valley, PA, USA).

Extraction of the AMG, PMG and rectum

After the infection was confirmed, the insects were dissected under a stereoscopic microscope (Stemi 2000, Carl Zeiss, Jena, Germany). The legs were removed with dissecting forceps and the insect was placed in a Petri dish at 4 °C. The abdomen was disinfected with 70% alcohol. The connexivum was identified and sectioned to expose the abdominal cavity. Malpighian tubules and the fat body

were removed [45]. The digestive system was identified [39], and the AMG, PMG and rectum were dissected. Each region of the triatomine digestive system was separately placed in a 1.5-ml Eppendorf tube with 200 μ l of sterile PBS 1 × pH 7.2.

Processing the AMG, PMG and rectum from infected and non-infected nymphs

The AMG, PMG and rectum from infected and control nymphs were dissected and placed separately in sterile PBS as described above and washed to remove any residue of vertebrate undigested blood. The supernatant was discarded and 200 μ l of ice-cold, sterile PBS 1 × pH 7.2 were added. The tissue was macerated with a pestle to completely disaggregate it and it was then centrifuged in an Allegra 64R microcentrifuge (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) at $9168 \times g$ for 10 min at 4 °C. Then, 20 μ l of supernatant were taken and placed in 180 μ l of ice-cold, sterile PBS 1 × pH 7.2 (diluted 1:10) [53]. The tubes were kept on ice until used.

proPO and PO activity in triatomine AMG, PMG and rectum

proPO and PO activity in triatomine AMG, PMG and rectum were spectrophotometrically determined [43, 54]. Briefly, 25 μ l each of AMG, PMG or rectum supernatant from each nymph was placed on a 96-well microplate (Costar 96, Corning, NY, USA). To determine proPO activity, 10 μ l of sterile PBS 1 × pH 7.2 and 5 μ l of bovine α -chymotrypsin (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) were added. The microplate was incubated at 37 °C for 1 h in the dark. Then, 25 μ l of L-DOPA (4 mg/ml, Sigma-Aldrich) was added and the plate was incubated at 37 °C for 1 h in the dark [45, 55]. A blank containing 35 μ l of sterile PBS 1 × pH 7.2 and 5 μ l of α -chymotrypsin was included. All samples were analyzed in duplicate.

To determine PO activity, 25 μ l each of AMG, PMG and rectum supernatant from each nymph was placed on a 96-well microplate (Costar 96). Ten microliters of sterile PBS 1 × pH 7.2 and 25 μ l of L-DOPA (4 mg/ml, Sigma) were added. The plate was incubated at 37 °C for 3 h in the dark [45, 56]. A blank containing 5 μ l of sterile PBS 1 × pH 7.2 and 5 μ l of α -chymotrypsin was included. All samples were analyzed in duplicate.

To determine proPO and PO activity, the absorbance of each sample was read in the spectrophotometer at 490 nm every 5 min for 1 h. Enzyme activity was determined by calculating the slope of an absorbance-time plot [45] and using the following equation:

$$\text{Enzyme activity} = \frac{m \left(\frac{\text{Abs}}{\text{min}} \right) * v f(L) * F}{\varepsilon (M^{-1} \text{cm}^{-1}) * b(\text{cm})}$$

where m is the slope of the Abs-time (min^{-1}) plot, vf is the final volume of the reaction (L), F is the dilution factor, ϵ is the molar extinction coefficient of dopachrome at 490 nm ($3.715 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [54], and b is the optical length (0.5 cm).

Triatomine nymph survival

Incubating M. pallidipennis nymphs

One-hundred and eighty nymphs (120 infected and 60 non-infected) were incubated as mentioned above. Twenty nymphs infected with the Morelos strain, 20 infected with the Chilpancingo strain and 20 non-infected (controls) were incubated at 20 ± 2 °C. Sixty nymphs were incubated at 30 ± 2 °C, and 60 were incubated at 34 ± 2 °C. Then, all nymphs were monitored daily to determine survival, from infection time to death. An insect was regarded as dead when it failed to move any appendage after being manipulated with dissecting forceps for 1 min.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnoff (K-S) test was used to determine data normality and variance heterogeneity, which indicated a normal distribution of data. Differences in nymph immunocompetent capacity between treatments were assessed by a univariate general linear model, having proPO and PO activity as dependent variables, while infection status (Morelos, Chilpancingo and control), intestine region (AMG, PMG and rectum) and incubation temperature (20 °C, 30 °C and 34 °C) were predictive variables. The significance of the whole model, of each separate predictive variable, and of the interactions between infection status with intestine region and

temperature was determined. The latter interaction was studied by comparing groups with 95% confidence intervals. This analysis was performed with the software SPSS v.24.0. All data are expressed as mean enzyme activity \pm standard error.

The Mantel-Cox log-rank test was used to determine the effect of infection status (Chilpancingo, Morelos or control) and temperature (20 °C, 30 °C or 34 °C) on nymph survival time. Intergroup differences were determined with the Chi-square test between infected and non-infected groups, and between infected groups. This analysis was performed with the software GraphPad v.7.0.

Results

proPO activity with respect to infection status, temperature and intestine region

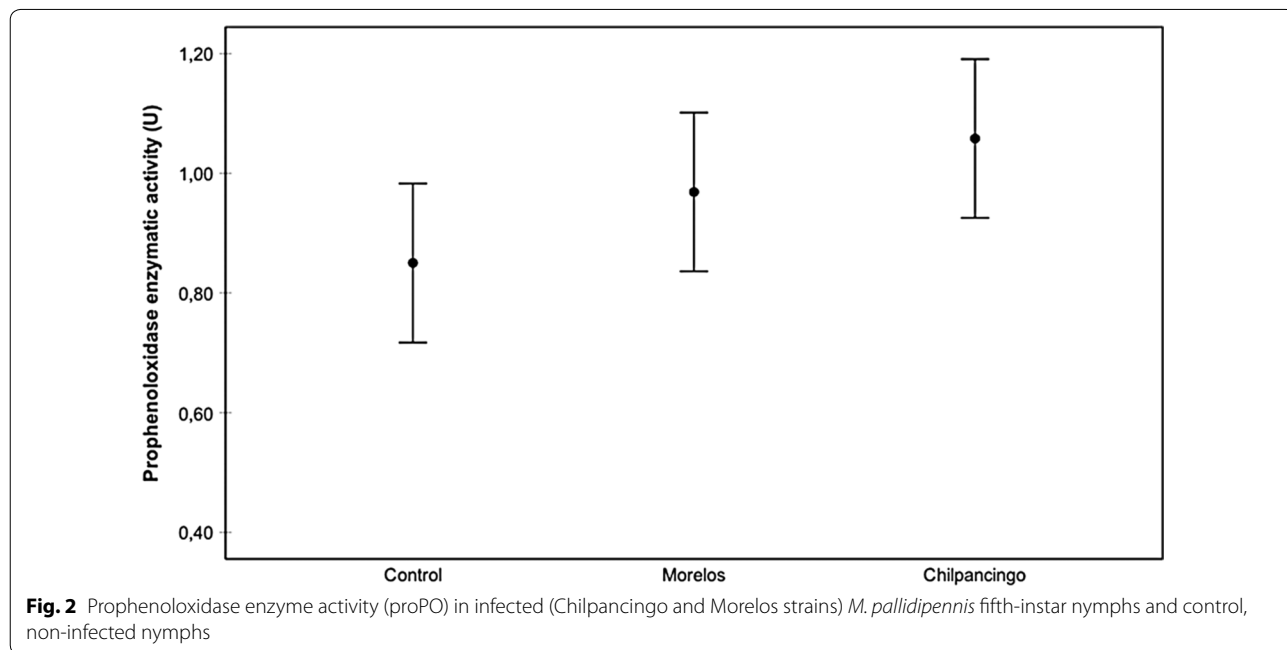
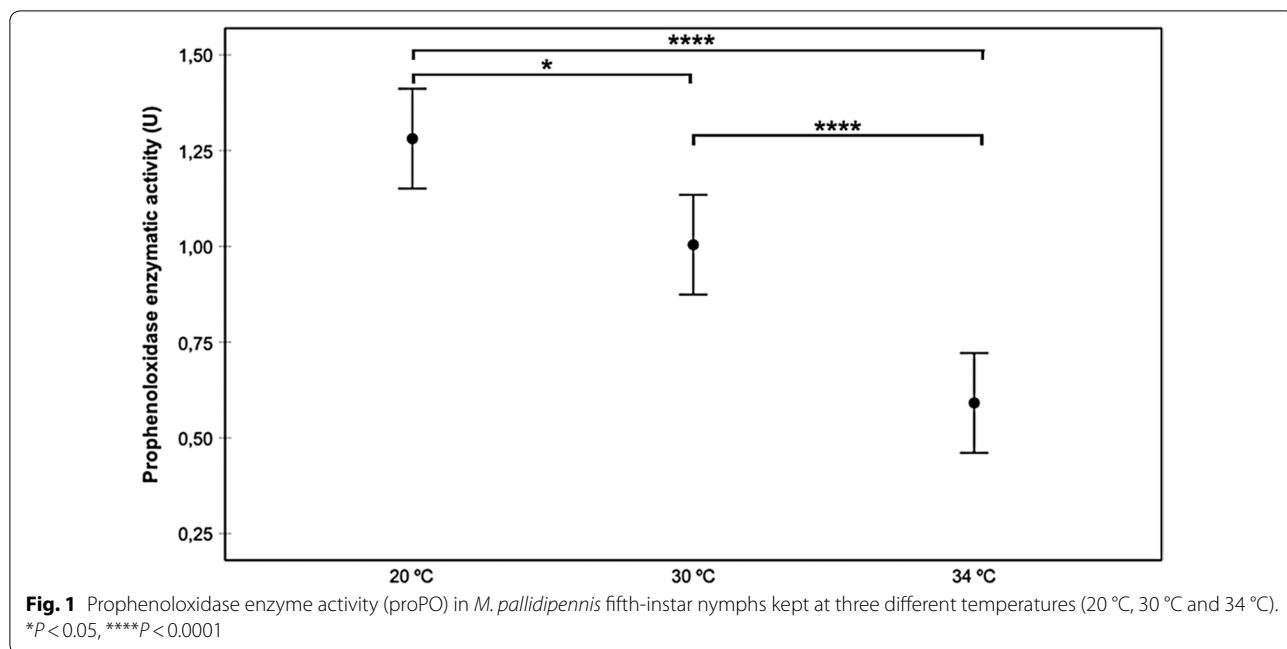
Significant differences were observed in the linear model with respect to infection status (Chilpancingo, Morelos and control), incubation temperature (20 °C, 30 °C and 34 °C) and intestine region (AMG, PMG and rectum; Table 1). Interactions between all predictive variables were also significant (Table 1).

In general, as temperature increased, proPO activity decreased (Fig. 1). Infection status also affected proPO activity, with the highest activity rate being observed in the Chilpancingo group, and the lowest in the controls (Fig. 2). The intestine region was also a good predictor of proPO, where the AMG yielded higher activity levels than the PMG and rectum, with no significant differences between the latter groups (Fig. 3). Since the AMG is the site with a significantly higher proPO expression, and no differences were observed between

Table 1 Parameters of the general linear univariate model of proPO activity with respect to infection status (infected by Chilpancingo strain, Morelos strain or control), temperature (20 °C, 30 °C and 34 °C), and intestine region (AMG, PMG and rectum), and their interactions

Origin	Type-III SS	df	MS	F-value	P-value
Corrected model	2198.229	26	84.547	237.914	0.0001
Intersection	1034.247	1	1034.247	2910.346	0.0001
Infection status	98.982	2	49.491	139.266	0.0001
Temperature	44.152	2	22.076	62.122	0.0001
Region	1737.878	2	868.939	2445.174	0.0001
Status \times temperature	14.070	4	3.518	9.898	0.0001
Status \times region	195.991	4	48.998	137.879	0.0001
Temperature \times region	79.567	4	19.892	55.975	0.0001
Status \times temperature \times region	27.589	8	3.449	9.704	0.0001
Error	470.153	1323	0.355		
Total	3702.629	1350			
Corrected total	2668.382	1349			

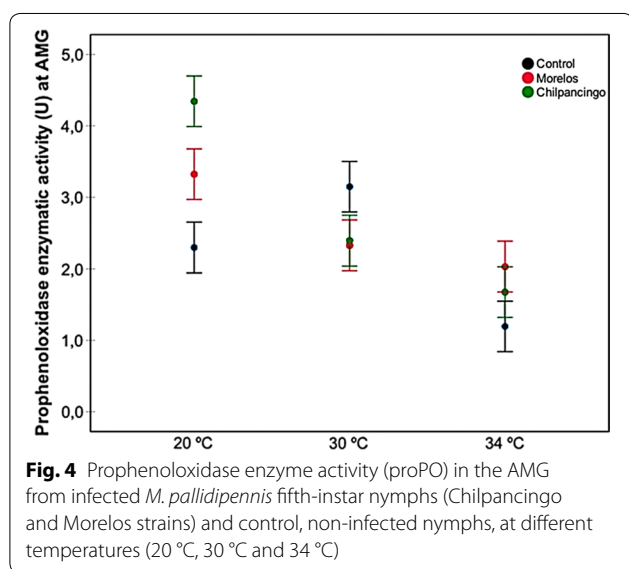
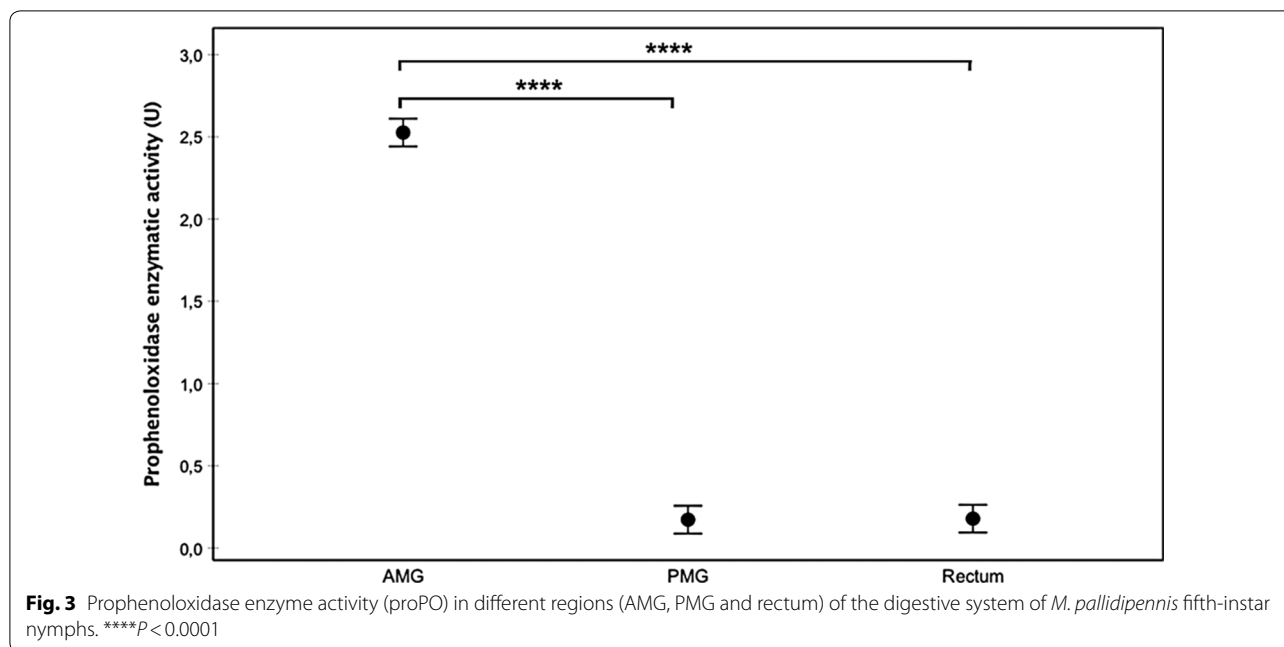
Abbreviations: df, degrees of freedom; MS, mean square; SS, sum of squares



the PMG and rectum, only the AMG will be used in the following comparisons. proPO activity was higher in the Chilpancingo group than in the Morelos and control groups at 20 °C, but these differences were not observed at 30 and 34 °C, which showed a reverse pattern with respect to 20 °C (Fig. 4).

PO activity with respect to infection status, temperature and intestine region

Significant differences were found with respect to infection status, incubation temperature and intestine region (Table 2). Interactions between all predictive variables were also significant (Table 2).



The highest PO activity values were observed at 30 °C and were significantly lower at 34 °C (Fig. 5). With respect to infection status, the Chilpancingo group showed the highest PO activity, and control showed the lowest (Fig. 6). With respect to intestine region, the AMG yielded the highest response, with no differences between the PMG and rectum (Fig. 7). As with proPO, PO activity levels in the AMG will be used in the following comparisons, since no differences between the PMG and rectum groups were observed. PO activity was higher in the Chilpancingo group than in the Morelos and control

groups at 20 °C, but these differences were not observed at 30 or 34 °C (Fig. 8). Note that while the Chilpancingo group showed higher PO activity than the Morelos group at 20 °C, this pattern was opposite at 30 and 34 °C.

Effect of temperature on survival of fifth-instar *M. pallidipennis* nymphs

In general, increased temperatures reduced triatomine lifespan (Fig. 9; Table 3). Infection status had some effect as well, decreasing insect survival. The Morelos strain had a higher effect on nymph survival than the Chilpancingo strain at 20 °C, but this effect was inverted at 34 °C (Figs. 9, 10).

Discussion

The immune capacity of triatomines against infection by *T. cruzi* was enhanced when the temperature was increased from 20 °C to 30 °C, but this pattern changed dramatically at 34 °C. Our results, indicating a more efficient prophenoloxidase activity before a subtle increase in temperatures, are in agreement with reports on other insects [57]. This could be explained as the result of a better prophenoloxidase activity *via* phenotypic plasticity at moderately higher temperatures, which become inviable as temperature reaches a lethal threshold. In terms of defense against a pathogen, a temperature close to lethal levels could preclude the action of the triatomine prophenoloxidase activity against an infection, which is consistent with our results on nymph survival. Conversely, the insect may respond in the form of fever during infection, which may help them to fight off *T. cruzi*

Table 2 Parameters of the general linear univariate model of PO activity with respect to infection status (infected by Chilpancingo strain, Morelos strain or control), temperature (20 °, 30 ° and 34 °C), and intestine region (AMG, PMG and rectum), and their interactions

Origin	Type-III SS	df	MS	F-value	P-value
Corrected model	2022.799	26	77.800	135.060	0.0001
Intersection	1240.545	1	1240.545	2153.567	0.0001
Infection status	9.933	2	4.967	8.622	0.0001
Temperature	108.867	2	54.434	94.496	0.0001
Region	1658.061	2	829.031	1439.184	0.0001
Status x temperature	44.143	4	11.036	19.158	0.0001
Status x region	16.534	4	4.133	7.176	0.0001
Temperature x region	112.613	4	28.153	48.874	0.0001
Status x temperature x region	72.647	8	9.081	15.764	0.0001
Error	762.104	1323	0.576		
Total	4025.448	1350			
Corrected total	2784.903	1349			

Abbreviations: df, degrees of freedom; MS, mean square; SS, sum of squares

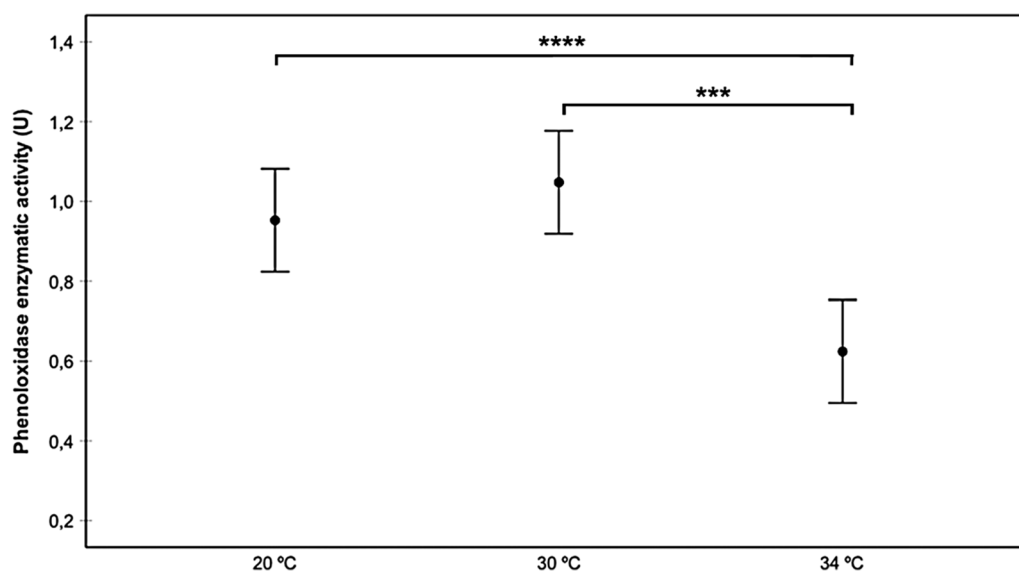
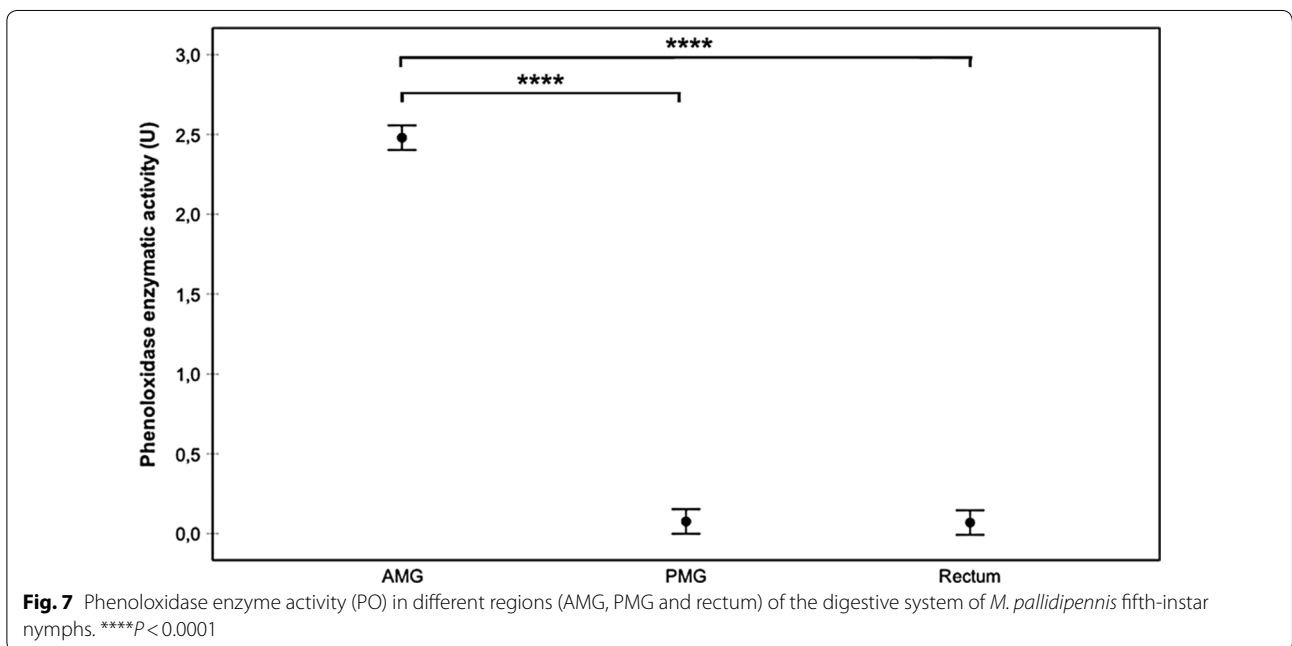
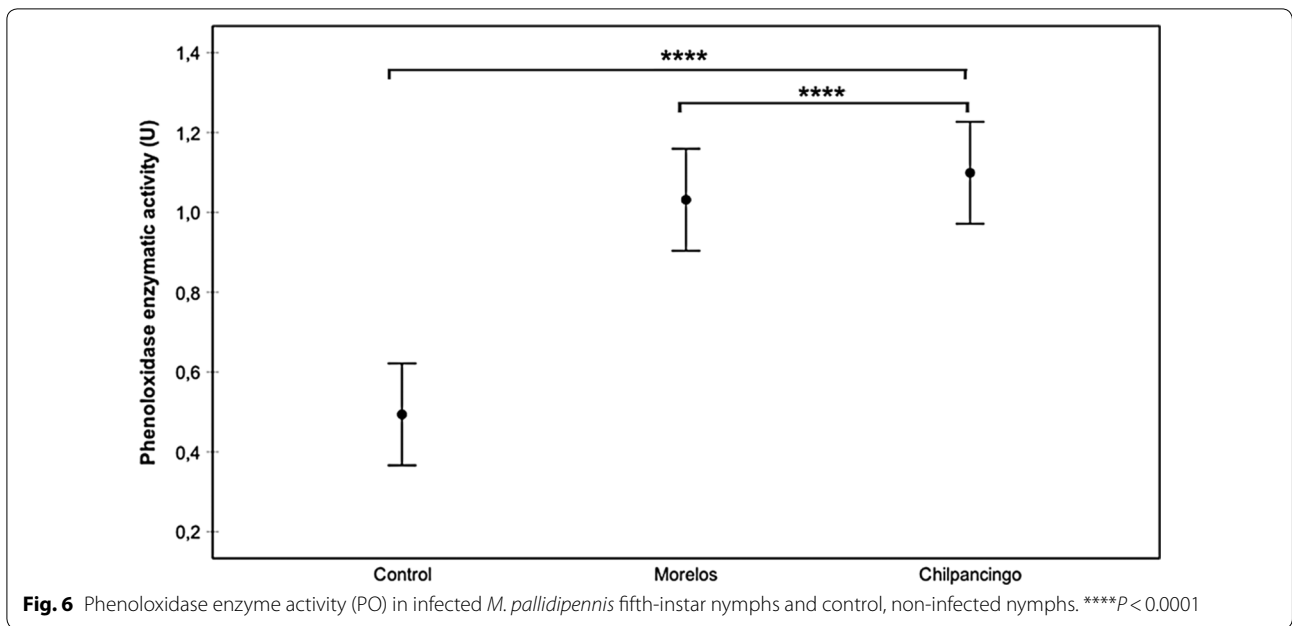


Fig. 5 Phenoloxidase enzyme activity (PO) in *M. pallidipennis* fifth-instar nymphs kept at three different temperatures (20 °C, 30 °C and 34 °C). *** $P < 0.0005$, **** $P < 0.0001$

[58]. If this were the case, however, one would expect that a high temperature may help insects to produce such an antiparasitic effect, but it is not the case as survival was lower as temperature rose. It is worth noting, however, that despite the strong effect of higher temperatures on reduced survival, this does not mean that the triatomine bugs do not rely on a fever response to deal with pathogens. Actually, other studies have found that triatomines show fever responses when sick [34]. It would be interesting to see whether *M. pallidipennis* bugs increase their fitness when allowed to choose ambient temperatures while facing different *T. cruzi* isolates.

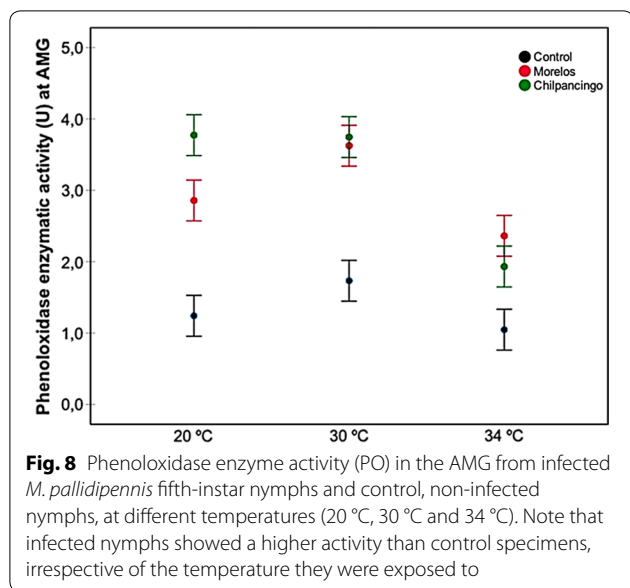
The prophenoloxidase activity against *T. cruzi* in triatomines is known to be closely related with the intestinal tract [45]. Since the AMG is the anatomic region first colonized by the parasite and where its reproduction in the vector begins (and to a lesser extent in the PMG [41, 42]), the prophenoloxidase activity in this region is expected to be more robust, as our results indicate. This is consistent with the massive death of the parasite observed within a few hours of infection [42], although it is not clear why the prophenoloxidase activity is not high enough in other gut regions to complete parasite removal. A possible explanation is that the cost of



infection can affect AMG only, where parasite replication and resource sequestering could be considerably higher. Alternatively, it could be energetically prohibitive for the triatomine to maintain a high prophenoloxidase activity to kill the few surviving parasites. Such a tolerance would imply that relatively low parasite levels would be more preferable for the insect than complete removal [59, 60].

In contrast with the prophenoloxidase activity, our expectations with respect to survival were fulfilled. The

negative effects of the parasite on triatomine fitness are not new. For instance, Botto-Mahan [61] found that *T. cruzi* infection delays the development and reduces survival rates in the triatomine *Mepraia spinolai*. Studies more closely related to our work found that *T. cruzi* reduced the survival of the triatomine *Rhodnius prolixus*, but only at 20 °C and 30 °C [31, 34]. In our case, the insects were more affected by the Chilpancingo strain than by the Morelos strain. These effects on survival are

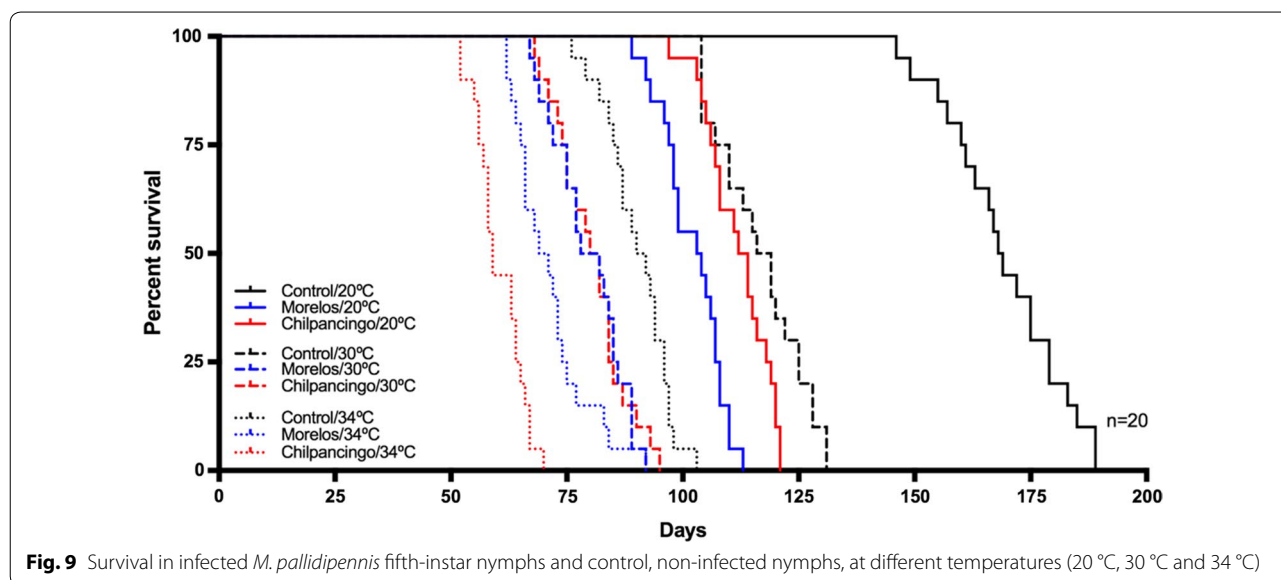


related to those on the prophenoloxidase activity, suggesting that the vector allocates more resources to defend itself from a more dangerous pathogen. The more rapid death in insects infected with the Chilpancingo strain could be because this strain extracted more resources from the insect than the Morelos strain, but the precise mechanisms underlying infection costs in triatomines are still unknown [21]. Interestingly, the lethal effects of the Chilpancingo strain are even more perceptible at higher temperatures (34 °C). On one hand, these results do not agree with the report by Elliot et al. [31], who did not find a negative effect of high temperatures on *R. prolixus*

survival. However, much lower temperatures (30 °C) were used in those experiments than in our work (34 °C). It is possible that our temperature was closer to the lethal threshold for *M. pallidipennis* than the one used by Elliot et al. [31] for *R. prolixus*. On the other hand, our results may help us to understand the adaptation of triatomines to thermal thresholds in nature. For instance, it has been reported that the optimal temperature is 30 °C and the upper thermal limit for *M. pallidipennis* rarely seems to exceed 34 °C [48, 49], which is in agreement with our results. While temperature levels in our study were selected based on the thresholds predicted by different climate change scenarios, it is likely that these scenarios are already occurring in some torrid areas of Mexico inhabited by *M. pallidipennis* [62].

Table 3 Survival of *M. pallidipennis* nymphs with respect to infection status (Chilpancingo strain, Morelos or control) and maintained at different temperatures

Temperature (°C)	Status	Sample size (n)	Mean survival (days)
20	Control	20	166
	Morelos	20	102
	Chilpancingo	20	112
30	Control	20	117
	Morelos	20	80
	Chilpancingo	20	80
34	Control	20	90
	Morelos	20	71
	Chilpancingo	20	60



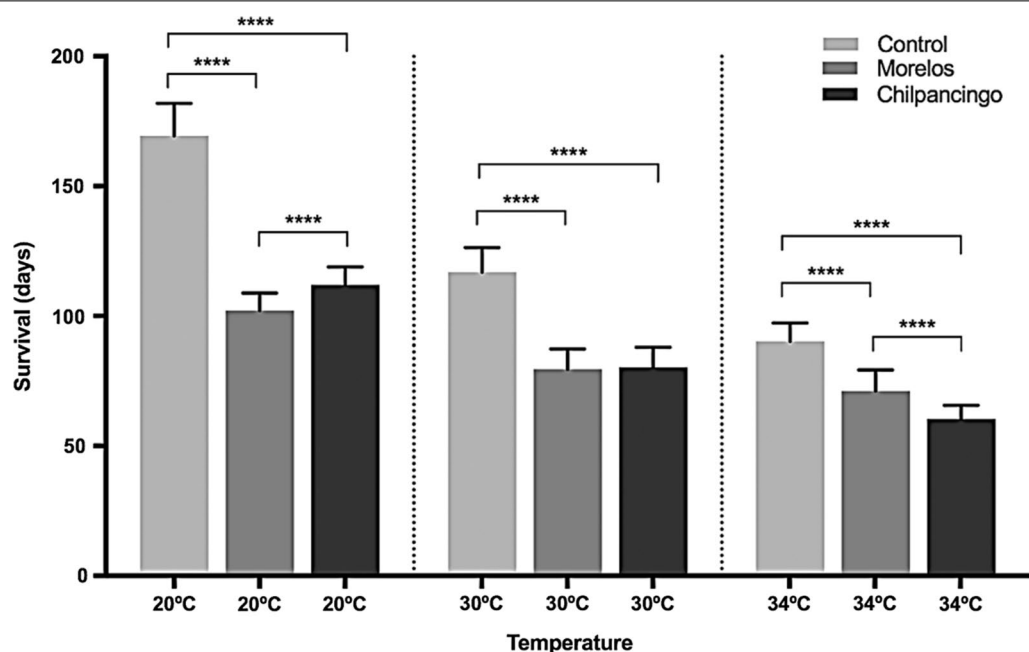


Fig. 10 Survival time in *M. pallidipennis* fifth-instar nymphs at different temperatures (20 °C, 30 °C and 34 °C). **** $P < 0.0001$

Finally, our results have implications for our understanding of the dynamics of Chagas disease in nature. Assuming our experimental scenarios as realistic, the risk of Chagas disease in terms of vector effectivity, measured as triatomine lifespan, would decrease with rising global temperatures. Clearly, this conclusion disregards other complex factors, like the possibility that triatomines modify their feeding behavior as a result of the infection. In this regard, previous studies have reported that infected triatomines feed and defecate more frequently [22] and are more active. Thus, while it can be assumed that infected triatomines live shorter lives, the risk they pose may be unchanged if their feeding rate is higher than that of non-infected insects. If feeding rate is higher, climate change could make vector triatomines as dangerous as today, or even more. Future experiments should determine whether higher temperatures modify the vector capacity of triatomines.

Conclusions

Our experimental results indicate a covariation between triatomine immune ability and temperature using two *T. cruzi* strains: (i) the prophenoloxidase activity was less robust at temperatures that simulate climate change, and (ii) prophenoloxidase activity was higher in the Chilpancingo than in Morelos strains. Furthermore, triatomine survival was reduced at high temperatures that simulate global change which was more drastic when infected by the Chilpancingo strains. These results imply

that climate change scenarios can reduce both triatomine fitness and vector capacity.

Abbreviations

AMG: anterior midgut; PMG: posterior midgut; proPO: prophenoloxidase; PO: phenoloxidase; DTU: discrete typing unit; U: enzymatic unit.

Acknowledgements

BG-R thanks Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT: 545229) for their support. This paper constitutes a partial fulfillment of the doctoral work of BG-R in the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Special thanks to M. O. Vences-Blanco for providing the biological specimens, M. C. de Alba-Alvarado for mouse inoculation, A. L. Flores-Villegas and E. Torres-Gutiérrez for technical support in PO and proPO determination and intestine identification.

Funding

Financial support was received from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) UNAM, project number IN216118. The Faculty of Medicine (UNAM) provided partial financial support to MC-B, MIB-T and PMS-S.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the present study are available from the corresponding author upon request.

Authors' contributions

BG-R, MC-B, MIB-T, PMS-S and AC-A participated in the design of the study and experiments. BG-R performed the experiments. BG-R and AC-A analyzed the data. MC-B, MIB-T and PMS-S contributed with funding and materials that made the study possible. BG-R, MC-B and AC-A wrote and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

This study was carried out in accordance with the guidelines established by the Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio". Prior to the study, the experimental protocol was evaluated and approved by the Ethics and Research Committee of the Faculty of Medicine from the Universidad Nacional Autónoma de México under project registration no. 014-60314. No human participants were used.

Consent for publication

No applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹ Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico.

² Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico. ³ Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. P. 70-275, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, Mexico.

Received: 30 December 2018 Accepted: 3 May 2019

Published online: 08 May 2019

References

- Wolinska J, King KC. Environment can alter selection in host–parasite interactions. *Trends Parasitol.* 2009;25:236–44.
- Frainer A, McKie BG, Amundsen PA, Knudsen R, Lafferty KD. Parasitism and the biodiversity-functioning relationship. *Trends Ecol Evol.* 2018;33:260–8.
- Campbell-Lendrum D, Manga L, Bagayoko M, Sommerfeld J. Climate change and vector-borne diseases: what are the implications for public health research and policy? *Phil Trans R Soc B.* 2015;370:20130552.
- Wu X, Lu Y, Zhou S, Chen L, Xu B. Impact of climate change on human infectious diseases: Empirical evidence and human adaptation. *Environ Int.* 2016;86:14–23.
- Cable J, Barber I, Boag B, Ellison AR, Morgan ER, Murray K, et al. Global change, parasite transmission and disease control: lessons from ecology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017;372:20160088.
- World Health Organization. Global technical strategy for malaria 2016–2030. 2015. https://www.who.int/malaria/areas/global_technical_strategy/en/. Accessed 20 Nov 2018.
- Booth M. Climate change and the neglected tropical diseases. *Adv Parasitol.* 2018;100:39–126.
- Deutsch CA, Tewksbury JJ, Huey RB, Sheldon KS, Ghalambor CK, Haak DC, Martin PR. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:6668–72.
- Sternberg ED, Thomas MB. Local adaptation to temperature and the implications for vector-borne diseases. *Trends Parasitol.* 2014;30:115–22.
- Sgro CM, Terblanche JS, Hoffmann AA. What can plasticity contribute to insect responses to climate change? *Annu Rev Entomol.* 2016;61:433–51.
- Yee DA, Ezeakacha NF, Abbott KC. The interactive effects of photoperiod and future climate change may have negative consequences for a widespread invasive insect. *Oikos.* 2017;126:40–51.
- Jia P, Chen X, Chen J, Lu L, Liu Q, Tan X. How does the dengue vector mosquito *Aedes albopictus* respond to global warming? *Parasit Vectors.* 2017;10:140.
- Ogden NH, Lindsay LR. Effects of climate and climate change on vectors and vector-borne diseases: ticks are different. *Trends Parasitol.* 2016;32:646–56.
- Chagas C. Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;1:159–218.
- Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist.* 1979;163:123–520.
- Moncayo A. Chagas disease: epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. *World Health Stat Q.* 1992;45:276–9.
- Carcavallo RU, Curto de Casas SI, Sherlock IA, Galíndez Girón I, Jurberg J, Galvao C, Mena Segura CA, Noireau F. Geographic distribution and altitudinal dispersion. In: Carcavallo RU, Girón I, Jurberg J, Lent H, editors. Atlas of chagas disease vectors in the Americas. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1999. p. 747–92.
- Piccinali RV, Canale DM, Sandoval AE, Cardinal MV, Jensen O, Kitron U, Gürtler RE. *Triatoma infestans* bugs in southern Patagonia, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:887–9.
- Di Iorio O, Gürtler RE. Seasonality and temperature-dependent flight dispersal of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) and other vectors of Chagas disease in western Argentina. *J Med Entomol.* 2017;54:1285–92.
- Fellet MR, Lorenzo MG, Elliot SL, Carrasco D, Guarneri AA. Effects of infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the reproductive performance of the vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS One.* 2014;9:e105255.
- Fuentes-Vicente JA, Cabrera-Bravo M, Enriquez-Vara JN, Bucio-Torres MI, Gutiérrez-Cabrera AE, Vidal-López DG, et al. Relationships between altitude, triatomine (*Triatoma dimidiata*) immune response and virulence of *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas' disease. *Med Vet Entomol.* 2017;31:63–71.
- Botto-Mahan C, Cattán PE, Medel R. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. *Acta Trop.* 2006;98:219–23.
- Martínez-Ibarra JA, Salazar-Schettino PM, Solorio-Cibrián M, Cabrera-Bravo M, Novelo-López M, Vences MO, et al. Influence of temperature and humidity on the biology of *Triatoma mexicana* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103:719–23.
- Villegas-García JC, Santillán-Alarcón S. The influence of two different temperatures on *Meccus pallidipennis* Stål, 1872 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in laboratory. *Entomol Vect.* 2004;11:445–56.
- Catalá S, Gorla D, Basombrio M. Vectorial transmission of *Trypanosoma cruzi* in an experimental system with susceptible and immunized host. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;47:20–6.
- Lazzari CR. Temperature preference in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Bull Em Res.* 1991;81:273–6.
- Asin S, Catalá S. Development of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*: influence of temperature and blood consumption. *J Parasitol.* 1995;81:1–7.
- Garza M, Feria Arroyo TP, Casillas EA, Sánchez-Cordero V, Rivaldi CL, Sarkar S. Projected future distributions of vectors of *Trypanosoma cruzi* in North America under climate change scenarios. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e2818.
- Klotz SA, Dorn PL, Klotz JH, Pinna JL, Weirauch C, Kurtz JR, Schmidt J. Feeding behavior of triatomines from the southwestern United States: an update on potential risk for transmission of Chagas disease. *Acta Trop.* 2009;111:114–8.
- Gürtler RE, Ceballos LA, Ordóñez-Krasnowski P, Lanati LA, Stariolo R, Kitron U. Strong host-feeding preferences of the vector *Triatoma infestans* modified by vector density: Implications for the epidemiology of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3:e447.
- Elliot SL, Rodrigues JO, Lorenzo MG, Martins-Filho OA, Guarneri AA. *Trypanosoma cruzi*, etiological agent of Chagas disease, is virulent to its triatomine vector *Rhodnius prolixus* in a temperature-dependent manner. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e0003646.
- Gage KL, Burkot TR, Eisen RJ, Hayes EB. Climate and vector borne diseases. *Am J Prev Med.* 2008;35:436–50.
- Ibarra-Cerdeña CN, Zaldívar-Riverón A, Peterson AT, Sánchez-Cordero V, Ramsey JM. Phylogeny and niche conservatism in North and Central American triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of Chagas' disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e3266.
- Hinestroza G, Ortiz MI, Molina J. Behavioural fever response in *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae) to intracoelomic inoculation of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;49:425–32.

35. Barreto-Santana D, Santos-Schuenker L, da Fonseca AR, Gurgel-Gonçalves R, Cuba-Cuba CA. Susceptibility of different *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) to a Brazilian strain of *Trypanosoma rangeli* (SC58/KP1-). *Biomedica*. 2015;35:81–9.
36. Guarneri AA, Lorenzo MG. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. *J Insect Physiol*. 2017;97:66–76.
37. Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol Today*. 2000;16:381–7.
38. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revised. *Int J Parasitol*. 2001;31:472–81.
39. Garcia ES, Genta FA, Azambuja P, Schaub GA. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol*. 2010;26:499–505.
40. Azambuja P, Garcia ES, Waniek PJ, Vieira SC, Figueiredo MB, Gonzalez MS, et al. *Rhodnius prolixus*: from physiology by Wigglesworth to recent studies of immune system modulation by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *J Insect Physiol*. 2017;97:45–65.
41. Schaub GA, Meiser CK, Balczun C. Interactions of *Trypanosoma cruzi* and triatomines. In: Mehlhorn H, editor. *Progress in parasitology*. Berlin: Springer; 2011. p. 155–78.
42. Ferreira RC, Kessler RL, Lorenzo MG, Paim RM, Ferreira Lde L, Probst CM, et al. Colonization of *Rhodnius prolixus* gut by *Trypanosoma cruzi* involves an extensive parasite killing. *Parasitology*. 2016;143:434–43.
43. Daquinag AC, Nakamura S, Takao T, Shimonishi Y. Primary structure of a potent endogenous dopa-containing inhibitor of phenol oxidase from *Musca domestica*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:2964–8.
44. Flores-Villegas AL, Salazar Schettino PM, Córdoba-Aguilar A, Gutiérrez-Cabrera AE, Rojas-Wastavino GE, Bucio-Torres MI, Cabrera-Bravo M. Immune defence mechanisms of triatomines against bacteria, viruses, fungi and parasites. *Bull Entomol Res*. 2015;105:523–32.
45. Favila-Ruiz G, Jiménez-Cortés JG, Córdoba-Aguilar A, Salazar-Schettino PM, Gutiérrez-Cabrera AE, Pérez-Torres A, et al. Effects of *Trypanosoma cruzi* on the phenoloxidase and prophenoloxidase activity in the vector *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae). *Parasit Vectors*. 2018;11:434.
46. Genta FA, Souza RS, Garcia ES, Azambuja P. Phenol oxidases from *Rhodnius prolixus*: Temporal and tissue expression pattern and regulation by ecdysone. *J Insect Physiol*. 2010;56:1253–9.
47. Martínez-Ibarra JA, Alejandro-Aguilar R, Torres-Morales A, Trujillo-García JC, Nogueira-Torres B, Trujillo-Contreras F. Biology of three species of the *Meccus phyllosomus* complex (Hemiptera: Reduviidae Triatominae) fed on blood of hens and rabbits. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:787–94.
48. Vidal-Acosta V, Ibáñez-Bernal S, Martínez-Campo C. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Salud Publica Mex*. 2000;24:496–503.
49. Benítez-Alva JI, Herón-Huerta, Téllez-Rendón JL. Distribución de triatomínicos (Heteroptera: Reduviidae) asociados a la vivienda humana y posibles zonas de riesgo en seis estados de la República Mexicana. *BIOCYT*. 2012;17:327–40.
50. IPCC. 4th Assessment Report “Climate Change 2007: Synthesis Report”. 2007. <http://www.ipcc.ch/ipccreports/ar4-syr.htm>. Accessed 24 Nov 2018.
51. Lee KP, Simpson SJ, Wilson K. Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Funct Ecol*. 2008;22:1052–61.
52. Murdock CC, Paaijmans KP, Bell AS, King JG, Hillyer JF, Read AF, Thomas MB. Complex effects of temperature on mosquito immune function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;279:3357–66.
53. Castro DP, Moraes CS, González MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, García ES. *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decrease microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasites survival and development. *PLoS ONE*. 2012;7:e36591.
54. Lughton AM, Siva-Jothy MT. A standardised protocol for measuring phenoloxidase and prophenoloxidase in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*. 2011;42:140–9.
55. Jiménez-Cortés JG, Córdoba-Aguilar A. Condition dependence and trade-offs of sexual versus non-sexual traits in an insect. *J Ethology*. 2013;31:275–84.
56. Vieira CS, Mattos DP, Waniek PJ, Santangelo JM, Figueiredo MB, Gumiel M, et al. *Rhodnius prolixus* interaction with *Trypanosoma rangeli*: modulation of the immune system and microbiota population. *Parasit Vectors*. 2015;8:135.
57. Dang VT, Speck P, Benkendorff K. Influence of elevated temperatures on the immune response of abalone, *Haliotis rubra*. *Fish Shellfish Immunol*. 2012;32:732–40.
58. Wojda I. Temperature stress and insect immunity. *J Thermal Biol*. 2017;68:96–103.
59. Goic B, Stapleford KA, Frangeul L, Doucet AJ, Gausson V, Blanc H, et al. Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. *Nat Commun*. 2016;7:12410.
60. Matetovici I, Caljon G, Van Den Abbeele J. Tsetse fly tolerance to *T. brucei* infection: transcriptome analysis of trypanosome-associated changes in the tsetse fly salivary gland. *BMC Genomics*. 2016;17:971.
61. Botto-Mahan C. *Trypanosoma cruzi* induces life-history trait changes in the wild kissing bug *Mepraia spinolai*: implications for parasite transmission. *Vector-Borne Zoo Dis*. 2009;9:505–10.
62. Carmona-Castro O, Moo-Llanes DA, Ramsey JM. Impact of climate change on vector transmission of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) in North America. *Med Vet Entomol*. 2018;32:84–101.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

