



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

AVIACIÓN MALHECOMPAGIADA.

EFFECTOS SOBRE *Trypanosoma cruzi* OCASIONADOS POR LA
ALIMENTACIÓN DE TRIATÓMINOS INFECTADOS SOBRE RATONES
INMUNES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

ARACELI ACOSTA RUIZ



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA



MÉXICO, D.F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN.

163615



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. VELASCO CASTREJON OSCAR.

VOCAL: Prof. RAMÍREZ GAMA ROSA MARÍA.

SECRETARIO: Prof. BECERRIL FLORES MARCO ANTONIO.

1er. SUPLENTE: Prof. GUTIÉRREZ RAMOS ABEL.

2do. SUPLENTE: Prof. GARCÍA TAMAYO FERNANDO.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorios del Departamento de Biología.
Facultad de Química, U.N.A.M.

ASESOR:


M.en C. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES

SUSTENTANTE:


ARACELI ACOSTA RUIZ

FALTAN PAGINAS

De la:

1

A la:

4

A mi mamá:
tú que sinvolizas para mi toda
la belleza, el amor , la ternura,
y que me has apoyado en todos
los momentos difíciles gracias.

Gustavo:
No tengo palabras para agradecerte
el haberme apoyado en los buenos
y malos momentos. Por t  carifio
y comprensión. Te amo.

A mi papá y hermanos:
Por formar parte de mi vida.

A mi sobrina Alondra:
Por su oportuna llegada.

A mi abuelita Soledad:
Con todo el cariño y respeto que
siento hacia ella.

A mis familiares.

A mis amigas y amigos:
con los que compartí toda la carrera.

Angeles
Patricia
Magdala
Irma
Gabriela
Leticia
Auria
Anita
Verónica
Emaluz
Alfredo
Ismael
Fernando

Al doctor Atonatiu, Ruth,
Lucí y Alejandro por
ayudarme a la culminación
de este trabajo.

A toda la gente que me quiere y
a la que yo quiero: gracias por siempre.

A MI ASESOR
M.en C. Marco Antonio Becerril Flores
con agradecimiento por conducirme en la
presentación de mi tesis.

AL HONORABLE JURADO.

A LA FACULTAD DE QUÍMICA.

I N D I C E

PAGINA

1.- INTRODUCCIÓN

1.1	El agente etiológico de la enfermedad de Chagas	5
1.2	Fases morfológicas de <i>T. cruzi</i>	5
1.3	Ciclo biológico	7
1.4	La enfermedad de Chagas	9
1.4.1	Manifestaciones clínicas de la puerta de entrada	9
1.4.2	Fase aguda	10
1.4.3	Fase indeterminada	12
1.4.4	Fase crónica	13
1.5.	Mecanismos de patogenicidad de <i>T. cruzi</i>	13
1.6	Respuesta inmune a <i>T. cruzi</i>	15
1.6.1	Mecanismos de evasión a la respuesta inmune efectuados por <i>T. cruzi</i>	16
1.6.2	Mecanismo de resistencia del huésped a la infección	17
1.7.	Importancia en salud pública	18
1.7.1	Prevalencia en el mundo	18
1.8.	El papel de los triatóminos en la transmisión de <i>T. cruzi</i>	21
1.8.1	Transmisores	21
1.8.2	Distribución de triatóminos en México	25
1.8.3	Anatomía de los triatóminos	27
1.8.4	Fisiología de los triatóminos	28
1.9.	Importancia de <i>Triatoma pallidipennis</i> en la transmisión de <i>T. cruzi</i>	30
2.	HIPÓTESIS	31
3.	OBJETIVO	31
4.	DISEÑO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL	32

5.-MATERIAL Y MÉTODOS

5.1	Resumen de las actividades desarrolladas	34
5.2	Infección de ratones con <i>T. cruzi</i>	35
5.2.1	Estandarización de ELISA indirecto.....	36
5.2.2	Detección de anticuerpos anti- <i>T. cruzi</i> en sueros de los ratones.....	37
5.2.3	Obtención de sueros de ratones	38
5.2.4	Obtención de pool de sueros de ratones inmunes a <i>T. cruzi</i>	39
5.3	Infección de triatóminos con tripomastigotes sanguíneos	40
5.4	Alimentación de triatóminos infectados sobre un ratón inmune (lote 1)	40
5.5	Alimentación de triatóminos infectados sobre un ratón no inmune a <i>T. cruzi</i> (lote 2)...	41
5.6	Alimentación de triatóminos infectados sobre sueros inmunes en membranas de látex..	41
5.7	Alimentación de triatóminos no infectados sobre ratón inmune(lote 5).....	42
5.8	Control de triatóminos (lote 6)	42
5.8.1	Presencia de parásitos en heces de triatóminos.....	43
5.8.2	Cuantificación de parásitos y determinación del porcentaje de formas de <i>T. cruzi</i>	43

6.- RESULTADOS

6.1	Búsqueda de anticuerpos anti- <i>T. cruzi</i> en ratones.....	44
6.1.1	Estandarización de la técnica de ELISA indirecto	44
6.1.2	Obtención de sueros control negativos.....	46
6.1.3	Detección de anticuerpo anti- <i>T. cruzi</i>	48
6.2	Alimentación de triatóminos sobre ratones inmunes, no inmunes y sueros inmunes	49
6.2.1	Efecto de las diferentes fuentes de alimentación de triatóminos sobre la cantidad de parásitos	51
6.2.2	Efecto de la alimentación de triatóminos sobre las fases morfológicas de <i>T. cruzi</i> presentes en heces.....	53
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	55
8.	CONCLUSIONES.....	58
9.	APÉNDICE	59
10.	BIBLIOGRAFÍA	63

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de chagas, es un protozoo hemoflagelado que se encuentra en la naturaleza adoptando tres principales formas: tripomastigote, epimastigote y amastigote; infecta de manera intracelular o extracelular al humano y a cualquier animal de sangre caliente, excepto aves; se puede encontrar infectando chinches reduídas denominadas triatóminos los que actúan como transmisores del parásito.¹

1.2. FASES MORFOLÓGICAS DE *Trypanosoma cruzi*.

a) **Tripomastigote:** Tiene un tamaño de 18-22 μm de largo por 2-5 μm de ancho; presenta en su extremo posterior una estructura prominente denominada cinetoplasto, del cual emerge un flagelo que le rodea en todo su cuerpo formando una membrana ondulante lateral que sale libremente por el extremo anterior (Fig 1). Esta fase se encuentra de manera extracelular en la sangre del huésped vertebrado y en la región posterior del intestino del insecto; es la forma infectante para cualquier huésped.²

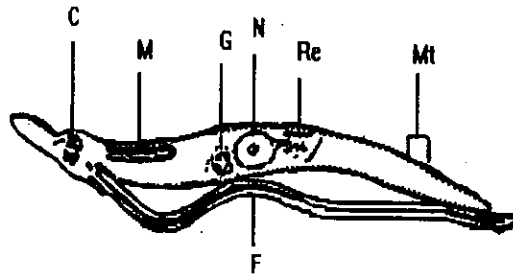


Fig. 1. Representación esquemática de la ultraestructura del tripomastigote del *T. cruzi*. C, cinetoplasto; M, mitocondria; G, Aparato de Golgi; N, núcleo; Re, Reticulo endoplásmico; Mt, microtúbulos subpeculiares; F, flagelo.³

b) **Epimastigote:** Presenta un tamaño de 18-20 μm de largo por 2-5 μm de ancho; el cinetoplasto se ubica cerca del núcleo, del cual surge el flagelo para salir por la parte posterior del parásito formando una pequeña membrana ondulante ² (Fig 2).

Esta fase es extracelular y replicativa del protozoo; se le encuentra en la parte media del intestino de los triatóminos y su desarrollo *in vitro* se logra en cultivos axénicos.

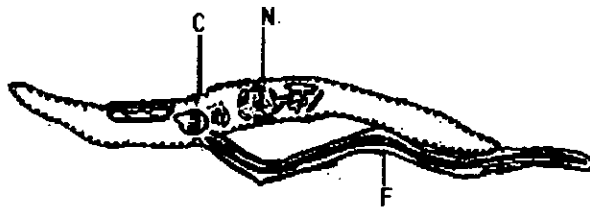


Fig. 2. Representación esquemática de la ultraestructura del epimastigote de *T. cruzi*. C, cinetoplasto; N, núcleo; F, flagelo.

c) **Amastigote:** Mide 2-6 μm , es ovoide y, aunque se le observa su cinetoplasto cerca del núcleo, no presenta flagelo ² (Fig 3).

Es el estadio intracelular y replicativo del parásito; sólo se le observa en los tejidos del huésped vertebrado o en cultivos de líneas celulares.

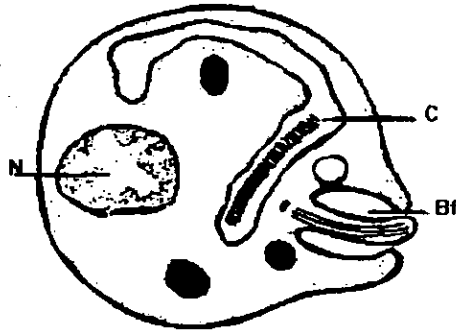


Fig.3 Representación esquemática de la ultraestructura de un amastigote de *T. cruzi*. C, cinetoplasto; N, núcleo; Bf, bolsa flagelar.³

1.3. CICLO BIOLÓGICO.

Durante el ciclo biológico de *T. cruzi* intervienen los huéspedes vertebrados e invertebrados. Si un triatómino infectado con el protozoo pica a un vertebrado para alimentarse de su sangre, defeca sobre su piel eliminando al parásito. La mayor parte de los parásitos eliminados se encuentran en fase de **tripomastigote**, que reciben también el nombre de **tripomastigotes metacíclicos**.

Los protozoos penetran por la piel y mucosas del vertebrado a través del orificio de la picadura que deja el insecto o por el rascado del mismo individuo. *T. cruzi* puede seguir dos rutas: se desplaza por vía sanguínea a diferentes tejidos, principalmente al muscular o infecta las células del huésped adyacentes al sitio de entrada del parásito. De cualquier manera los **tripomastigotes**, se mueven hasta unirse a las células del huésped a través de su flagelo; y por diversos mecanismos se introducen al citoplasma de la célula huésped; en su interior inmediatamente se transforman a fase de **amastigote**; este estadio se divide en repetidas ocasiones, y ahí mismo se convierten de nuevo en tripomastigotes lisando a la célula huésped. Los tripomastigotes liberados infectan las células adyacentes o se transportan por vía sanguínea a otros sitios. El ciclo biológico se completa cuando un triatómino se infecta al succionar la sangre del individuo con parasitemia ⁴ (Fig 4).

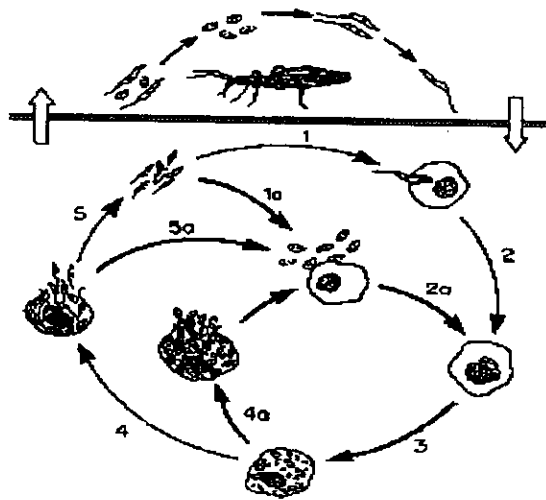


Fig.4 Ciclo de vida del *T. cruzi*. 1: Tripomastigotes metacíclicos invaden células del vertebrado; 2: transformación del tripomastigote a amastigote; 3: replicación en el citoplasma; 4: diferenciación dentro del flujo sanguíneo; 5: son liberados por ruptura de la célula huésped. Una alternativa subcíclica en el vertebrado puede ocurrir; 4: diferenciación dentro del flujo sanguíneo; 5: son liberados por ruptura de la célula huésped (4a y 5a), o proliferación extracelular de los tripomastigotes (1a).⁴

El humano se puede infectar con *T.cruzi* de diversas maneras además de la descrita anteriormente por **transfusión sanguínea** de donadores con parasitemia; ² **congénitamente** cuando en una futura madre con parasitemia el flagelado traspasa la barrera placentaria hasta el feto; ² algunos investigadores proponen que por vía **alimentación con leche materna**,² pero aún no existen suficientes evidencias; por el **transplante de órganos infectados** con amastigotes en las células del donador; ² por **infecciones accidentales** en el laboratorio,² y por **vía digestiva**.

Por cualquier vía de infección, *T.cruzi* puede llegar a ocasionar los mismos problemas en la fase crónica de la enfermedad, pero en la fase aguda los problemas difieren clínicamente en función de la vía de transmisión.

1.4. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Para describir la enfermedad de chagas se tiene que señalar la vía por la cual el parásito infectó a su huésped y las manifestaciones subsecuentes que se desencadenan.

1.4.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA PUERTA DE ENTRADA.

Como se mencionó anteriormente, si las deyecciones de triatóminos infectados con *T.cruzi* llegan a estar en contacto con la piel de un individuo, el flagelado penetra al tejido subcutáneo.

En esta zona se produce inflamación eritematosa, indurada e indolora, con diámetro de tres a

diez cm como consecuencia de la respuesta al agente invasor. A este signo se le denomina “**chagoma de inoculación**”; la lesión permanece durante una a dos semanas.¹ La dimensión del chagoma está en función del tamaño del inoculo y la reacción de hipersensibilidad efectuada por el individuo cuando ésta se ha desarrollado.

Si la lesión ocurre en el rostro del individuo, se llega a presentar una inflamación que involucra las zonas oftalmoganglionares, la conjuntiva y buena parte de músculos de la cara. La inflamación es indurada y poco dolorosa, bpalpebral, con reacción conjuntival generalmente unilateral; a este signo en el rostro del infectado se denomina “**signo de Romaña**”, el cual dura de dos a cuatro semanas.¹ No toda la gente infectada presenta el signo de Romaña se estima que sólo del 5-10% de los infectados llega a presentarlo, y es más frecuente en los niños.¹

1.4.2. FASE AGUDA.

El periodo de incubación oscila de 4-10 días. Algunas veces y cuando la transmisión se realizó por las deyecciones de los triatóminos, aparecen las manifestaciones de puerta de entrada con el signo de Romaña o bien chagomas de inoculación. El crecimiento de los ganglios linfáticos satélites es otro signo importante. En el caso del complejo oftalmoganglionar son palpables los ganglios preauriculares y los de las cadenas cervicales; y cuando la puerta de entrada está en otra parte de la piel, los ganglios vecinos son los que reaccionan. La adenopatía puede persistir durante meses.¹

La fiebre es un signo muy importante en esta etapa observándose en el 95% de los casos

agudos.

La temperatura se eleva tempranamente oscilando entre 37-38 °C con un perfil irregular, generalmente con picos vespertinos. A veces puede ser continua y elevada, su intensidad está en relación con la gravedad de la infección según lo observado por Carlos Chagas. Generalmente la fiebre se acompaña de cefaleas, astenia, malestar general, mialgias, artralgias e hiporexia. La duración del periodo febril guarda relación con la parasitemia, persistiendo de 2-4 semanas después de las cuales comienzan a ser detectados los tripomastigotes en sangre. La disminución de la parasitemia se produce por la lisis de los parásitos vía complemento que es efectuada por el sistema inmune del huésped.^{1,2}

El edema subcutáneo se observa en más de la mitad de los casos agudos, presentándose inicialmente en la cara y progresando hacia el tronco y extremidades. Es caliente, elástico e indoloro, generalmente discreto o moderado. Esto se debe al incremento de la permeabilidad capilar periférica y la salida de agua plasmática hacia los tejidos.

La hepatoesplenomegalia se presenta en el 30-40% de los casos con repercusiones clínicas y ocurre en forma discreta. El hígado suele aumentar rápida e intensamente de volumen si se instala una insuficiencia cardíaca aguda.¹

La meningoencefalitis es rara y de pronóstico sombrío, se presenta principalmente en lactantes.

En estos casos son comunes los fenómenos convulsivos generalizados, con crisis frecuentes o espaciadas. En casos menos graves el compromiso del SNC se limita a una irritación meníngea fugaz

manifestándose como contracturas o parálisis localizadas.

La cardiopatía es común en la fase aguda y parece ser la lesión anatomopatológica más importante, ocurriendo en aquellos pacientes que en vida presentan signos mínimos de compromiso cardíaco.¹

El electrocardiograma suele ser normal en más de la mitad de los casos agudos, presentando apenas taquicardia.

1.4.3. FASE INDETERMINADA.

Durante la fase indeterminada desaparece la sintomatología y el individuo se considera curado, sin embargo, la serología es positiva y si se le estudia adecuadamente, con frecuencia se les encontrarán datos electrocardiográficos y ecocardiográficos sugestivos de miocarditis.¹

La fase indeterminada es la forma más frecuente y más importante desde el punto de vista epidemiológico. Ha sido denominada “**forma subclínica**” o simplemente “**infección chagásica**”.

Este concepto comprende la gran mayoría de los chagásicos menores de 25 años de edad. Un porcentaje elevado de este tipo de casos evolucionan a las formas cardíacas o digestivas después de esta edad, aunque un número no inferior al 25% permanece indefinidamente en la “**etapa indeterminada**”.¹

Se ha demostrado que es frecuente hallar lesiones específicas mínimas en el corazón de chagásicos en la fase “**indeterminada**”, en individuos a los que se realizó autopsia después de la

defunción debida a accidente u otras causas.

1.4.4. FASE CRÓNICA.

Puede aparecer 10 o más años después de la fase aguda, en la que pudieron presentarse o no síntomas (pasar inadvertida y por tanto no haber antecedentes de signos de puerta de entrada).²

Los individuos en fase crónica, suelen presentar daño irreversible en corazón u otros órganos (esófago, intestino, etc.), que se descubren por hallazgos electrocardiográficos o radiográficos.

De los datos más sobresalientes en esta fase se pueden mencionar la cardiomegalia, con insuficiencia cardíaca de predominio derecho, alteraciones del ECG, que indican bloqueo completo de rama derecha del haz de His y hemibloqueo anterior izquierdo. Los pacientes pueden vivir muchos años asintomáticos o bien se hacen aparentes la disnea, palpitaciones, dolor precordial e insuficiencia cardíaca o presentarse muerte súbita en individuos sin síntomas importantes previos. La evolución de la miocarditis es insidiosa y en ocasiones se suelen presentar accidentes cerebrales de tipo vascular ocasionadas por trombos.²

1.5. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE *T.cruzi*

El parásito agrede al huésped de varias maneras, pero quizás la destrucción de las células del sistema reticulo endotelial y de otros tejidos, por el crecimiento y multiplicación del flagelado sea de

los más importantes: Koberle señala la producción de una tripanotoxina en la miocarditis Chagásica y en la producción de “**megas**” (megaesófago, megacolon principalmente).⁵ Los intentos por señalar la etiopatogenia de las lesiones producidas por *T.cruzi* son muy variadas y con frecuencia contradictorias, de ellos Meira de Oliveria hace una síntesis interpretativa e indica que existe la teoría inflamatoria por la teoría alérgica, en la que las lesiones se deben a fenómenos de inmunoalergia causados por los productos de la desintegración de los parásitos, así como de los tejidos dañados por los mismos.⁵ Lo que si es claro es que las lesiones en el miocardio causada por el parásito o por autoinmunidad bloquean los haces, produciendo disfunción (bloques de rama), dilatación, cardiopatías o también inflamación miocárdica (miocarditis aguda) con infiltración celular (presencia de polimorfonucleares y mononucleares) que posteriormente se traduce en infiltración mononuclear con fibrosis (miocarditis nucleares) lo que conduce a la miocarditis chagásica crónica. Los parásitos invaden gran cantidad de tejidos y órganos, como corazón, cerebro, hígado, bazo, ganglios linfáticos, músculos, etc. produciendo lesiones y cuadros clínicos diversos. También se ha demostrado que moléculas presentes en *T.cruzi* están en los tejidos nerviosos del huésped; lo anterior ocasiona amenudo, mecanismos de autoinmunidad que producen la desnervación de tejidos, los más afectados son los del miocardio; de este modo se presenta relajación del tejido muscular del órgano y por consiguiente su agrandamiento: los “**megas**”.⁵

1.6. RESPUESTA INMUNE A *T. cruzi*.

Durante la infección ocurre un contacto directo entre el parásito y la célula hospedera, con la subsecuente interiorización del parásito. Un número de antígenos en la superficie de *T. cruzi* han sido identificados y pueden tener un papel en el reconocimiento y penetración hacia dicha célula.⁶ Muchos de estos antígenos pueden estar asociados a la penetración mientras que otros participan como receptores de superficie que se enlazan con la fibronectina⁷ y la colágena⁸ de la célula huésped y por tanto pueden estar involucrados en el enlace y el reconocimiento celular.⁶ Seguido del contacto mediado por receptores entre la célula del hospedero y *T. cruzi*, es posible que proteasas⁹ y glicosidasas^{10,11} secretadas por el parásito, digieran las proteínas de membrana de las células durante su penetración y posiblemente esas enzimas usen su sitio activo para el enlace específico con la superficie de la célula del huésped.¹¹

Una vez en el interior de la célula hospedera, *T. cruzi* se transforma a la fase de amastigote y escapa a la destrucción potencial de las enzimas lisosomales,⁶ y a metabolitos derivados del oxígeno. Los productos de secreción y excreción del parásito, así como algunas de sus moléculas estructurales inducen la activación de macrófagos y linfocitos T y B, desencadenando una respuesta celular y luego humoral con la subsecuente eliminación de los parásitos presentes en la sangre por efecto de anticuerpos y complemento del huésped.⁶ Esto ocasiona la disminución gradual de la parasitemia.

Mediante estudios *in vitro*, se demostró que los tripomastigotes sanguíneos pueden ser lisados por contacto con eosinófilos y neutrófilos y por exposición a linfotoxinas, independientemente del

complemento. Con los eosinófilos y neutrófilos la citotoxicidad contra los tripomastigotes depende de la presencia de anticuerpos (ADCC).¹²

Tres de los cinco tipos de interferones conocidos, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , activan a los macrófagos, estos aumentan su capacidad tripanocida. El IFN- γ es más efectivo como estimulador de dicha actividad.¹³ Otras citocinas tales como factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF), son también efectivos en la inducción de la actividad tripanocida. Las células asesinas naturales (NK) aumentan su actividad por el efecto del IFN- α e IFN- β para matar a los tripomastigotes de *T. cruzi*.^{14,15}

Las células están involucradas en la resistencia a la infección. Las células de ratones recuperados de una infección con *T. cruzi* confieren protección a ratones normales.⁶

Las células T citotóxicas (Tc) se encuentran también presentes en la infección y actúan en contra de las células del huésped infectadas por *T. cruzi* probablemente por medio del reconocimiento de antígenos del parásito adheridos a la superficie de las células infectadas pero no matan directamente al parásito, aunque tal destrucción de la célula hospedera puede dejar al parásito vulnerable a otras formas de ataque.⁶

1.6.1. MECANISMOS DE EVASIÓN A LA RESPUESTA INMUNE EFECTUADOS POR *T. cruzi*

Los tripomastigotes son capaces de evadir los mecanismos dependientes de anticuerpos

mediante dos formas:¹²

- a) Un rápido recubrimiento de los anticuerpos anti-*T.cruzi* sobre la superficie del parásito y la incorporación y posterior destrucción de los complejos antígeno-anticuerpo en su interior.^{16,17}
- b) La producción de enzimas que *T.cruzi* secreta y rompen la porción Fc de las inmunoglobulinas evitando un mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), o bien su lisis por complemento.¹⁸

1.6.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA DEL HUÉSPED A LA INFECCIÓN.

En la enfermedad de chagas se ha demostrado, de manera importante, la participación de la respuesta inmune humoral y celular en la protección contra la infección por *T.cruzi*.

Apesar de que la inmunidad humoral, vía complemento y anticuerpos, ha conducido a la protección, experimentos de transferencia adoptiva de células inmunes de ratones previamente infectados, han demostrado que la inmunidad celular participa de manera activa.¹⁹

Por otro lado, las evidencias indican que mediante transferencia adoptiva se ha logrado protección a la infección por *T.cruzi*.²⁰ Aunque el sistema inmune influye en la resistencia a la infección, dicha resistencia también depende de la virulencia de las cepas y la susceptibilidad del hospedero.

Un aspecto muy importante de la respuesta inmune, es el sistema humoral; está demostrado claramente que los anticuerpos, vía el complemento, eliminan los tripomastigotes sanguíneos. Tay y cols. 1975, demostraron que un cultivo de epimastigotes en un medio con suero hiperinmune anti-*T.cruzi* elimina los parásitos, deformándolos.

1.7. IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA.

1.7.1. PREVALENCIA EN EL MUNDO.

La infección sólo se presenta en el Continente Americano; se calcula que existen alrededor de 24 millones de individuos infectados por *T.cruzi* y 90 millones están expuestos a la infección por vivir dentro de zonas endémicas.²

En Brasil se considera a la enfermedad de Chagas como un grave problema de salud pública, siendo las partes Centro, Sur, Este y Noroeste del país las más afectadas, presentando los pacientes daño cardíaco severo, muerte súbita en jóvenes (muerte del leñador), así como la alteración de otros órganos como el intestino y esófago (megaesófago y megacolon) que se observan con relativa frecuencia en los Estados de Minas Gerais, San Pablo y Goias.²

En Argentina se han realizado estimaciones sobre la incidencia de la infección y se señalan unos 10 millones de personas expuestas a contraer la infección, y 2.5 millones de personas infectadas.²

En Chile se calcula que el número de infectados es de 350 mil, en Perú de 80 mil; en Venezuela más de 4 millones de personas están infectadas.²

En México se ha descrito 250,000 individuos infectados, comprobados parasitológicamente y más de 1, 400,000 con diagnóstico serológico, principalmente en los estados de Oaxaca, Chiapas, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Zacatecas, Yucatán Veracruz, Estado de México, Sonora, Nayarit y Tabasco² (Fig 5).



Fig.5. Número de casos humanos de enfermedad de chagas.

En cuanto al riesgo por transmisión sanguínea, en México se han efectuado numerosos estudios en hemodonadores.¹ Los más conocidos aparecen en el cuadro 1.

CUADRO 1

SEROPOSITIVIDAD A <i>T.cruzi</i> . EN HEMODONADORES MEXICANOS.		
BANCO DE SANGRE	TÉCNICA (TÍTULO)	% POSITIVIDAD
Oaxaca	HAI (1:128)	4.8
Hosp.Universitario, Puebla	HAI (1:16)	16.5
C.N.T.S.	HAI (1:16)	1.0
Acapulco	HAI, IFI (1:16)	12.5
Hosp. Ruben Leñero D.F	HAI, IFI (1:16)	2.0
Instituto Nacional de Cardiología	HAI, CIEF	2.0

Hasta 1990, había alrededor de 300 casos agudos comprobados, posteriormente se encontraron casos en otros estados: Aguascalientes, Colima, Campeche, Durango, Guanajuato, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa. En otros estados, la casuística se ha incrementado y amenaza con continuar ascendiendo como en Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Zacatecas, Nayarit y Chiapas.¹

En cuanto a caso de miocardiopatía crónica, éstos se han incrementado notablemente con las recientes investigaciones de nuevos grupos de estudio y se puede calcular que al menos existen 300 bien comprobados.¹

Respecto a la magnitud de la infección, las cifras son controvertidas. Las encuestas seroepidemiológicas realizadas en grupos de campesinos mayores de cinco años, señalan cifras de alrededor del 20% de prevalencia serológica.¹

Por otro lado, los resultados de la encuesta serológica nacional, sugieren que aunque aparentemente poco intensa, la infección chagásica se distribuye en todo el país, sólo que situada en bolsones ubicados en las áreas rurales de prácticamente todos los estados.¹

1.8. EL PAPEL DE LOS TRIATÓMINOS EN LA TRANSMISIÓN DE *T. cruzi*.

1.8.1. TRANSMISORES.

El transmisor y su relación con la vivienda humana, juegan un papel sumamente importante en el establecimiento de zonas endémicas; no existe ningún estado de la República Mexicana en donde no se hayan encontrado estos insectos² (Fig 6).



- Triatóminos infectados por *T. cruzi*
- ▲ Triatóminos libres de infección

Fig.6. Número de colectas de triatóminos por cada estado de la República Mexicana.

Los triatóminos que transmiten a *T. cruzi* se ubican taxonómicamente como sigue:

Phylum Arthropoda

Sulophylum Mandibulata

Clase Insecta

Orden Hemiptera

Familia Reduviidae

Subfamilia Triatominae

Géneros *Triatoma*

Dipetalogaster

Paratriatoma

Eratymus

Panstrongylus

Belminus

Rhodnius

Durante su ciclo de vida atraviesan por la fase de huevo, cinco fases larvarias denominadas ninfales y una de adulto: macho o hembra. Estos insectos son hematófagos; este hecho duplica el potencial de transmisión de *T. cruzi*.

Otro factor de gran importancia es la preferencia alimentaria; ya que algunos triatóminos se alimentan del vertebrado más próximo, otros exhiben preferencias por determinado tipo de huésped, como sucede en los triatóminos silvestres.²¹ En la actualidad, al transformarse la ecología, los hábitos de estos insectos también han cambiado, y algunos de ellos realizan todo el ciclo dentro de la habitación humana, como sucede con *T. infestans* y *T. barberi* por lo que el riesgo de adquirir la infección es mucho mayor. Otro aspecto es la periodicidad en la defecación, durante o inmediatamente después de la ingesta de sangre.²¹ También es posible la infección de triatoma que ha sido observado en varias especies. Así mismo, se ha señalado que algunas personas presentan reacción de hipersensibilidad a la saliva del insecto, caracterizada por prurito, eritema y edema.⁵ Es posible que esta reacción sea importante en pacientes dormidos, que tendrían que rascarse fuertemente y ayudarían así al éxito de la infección con *T. cruzi*. En cuanto a la susceptibilidad de los triatóminos a este protozoo, se ha observado que depende de la parasitemia del huésped y de la afinidad de la cepa.²²

En el caso de *T. dimidiata*, éste adquiere más fácilmente la infección con cepas de Costa Rica que *R. prolixus* y *T. infestans*.²³

Los estudios sobre hábitos de preferencia alimentaria, horario de actividad, longevidad y algunos otros aspectos relacionados con la biología de los transmisores, son muy amplios, como es el caso de los llevados a cabo con *T. dimidiata*,²³ en donde se indica que, desde un punto de vista epidemiológico, quizá sea el triatómino la causa más importante para la transmisión de *T. cruzi* desde México hasta el norte de Perú; en México la especie de triatómino más importante en la transmisión

del parásito es *T.barberi*. Zárate y cols. han descrito claramente el ciclo biológico del triatómino, la longevidad de los adultos, relación con el clima, altura sobre el nivel del mar, hábitos domiciliarios condición en el medio urbano, preferencias alimentarias, resistencia al ayuno y patrones de defecación entre otros aspectos.²¹

1.8.2. DISTRIBUCIÓN DE TRIATÓMINOS EN MÉXICO.

En la República Mexicana se considera como área endémica probable, todo el territorio que se encuentra entre los 0 m y los 2200 m sobre el nivel del mar, es decir las dos terceras partes del territorio nacional, ya que en poblaciones localizadas dentro de las altitudes mencionadas se han encontrado Triatóminos infectados por *T.cruzi* dentro de la habitación humana.

En México los triatóminos se encuentran distribuidos por todos los estados de la República (Fig. 7), pero en mayor abundancia de géneros y especies hacia la vertiente del Pacífico.



B=*Belminus costaricensis* 1 sp.
 T=*Triatoma* sp. 26 sp. y sbsp
 P=*Paratriatoma* sp. 3 sp.
 P=*Panstrongylus* sp. 1 sp.
 D=*Dipetalogaster* sp. 1. sp.
 R=*Rhodnius* sp. 1 sp.
 E=*Eratyrus* sp. 1. sp.

Fig.7. Distribución geográfica de los siete géneros de triatóminos encontrados en la República Mexicana

1.8.3. ANATOMÍA DE LOS TRIATÓMINOS.

Estos insectos son de color café o negro, miden de dos a siete cm de longitud, poseen alas bien desarrolladas. En la parte posterior de los ojos se encuentran los ocelos, la cabeza es cónica y larga, en la porción anterior presenta un par de antenas muy delgadas. Su probóscide es larga, seccionada en tres partes y está doblada en ángulo agudo hacia la porción ventral, el abdomen es alargado y ovoide, su conexivo presenta marcas de colores brillantes que van del rojo al amarillo que se alternan con colores oscuros, según la especie^{5,24} (Fig 8). El ciclo dura de tres meses a dos años, de acuerdo al género y especie, y la disponibilidad de la sangre en una región.^{5,24}

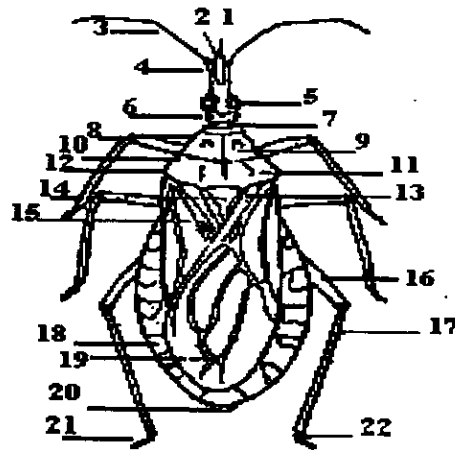


Fig.8. Morfología externa. 1. Tylus, 2. Gena, 3. Antena, 4. Jugum, 5. Ojo, 6. Ocelo, 7. Cuello, 8. Lóbulo anterior del pronoto, 9. Tubérculo distal, 10. Ángulo humeral, 11. Lóbulo posterior del pronoto, 12. Lóbulo, 13. Clavus, 14. Escutelo, 15. Corio, 16. Fémur, 17. Tibia, 18. Conexivo, 19. Membrana, 20. Ovipositor, 21. Garras, 22. Clavus.

1.8.4. FISIOLÓGÍA DE LOS TRIATÓMINOS.

El conducto alimenticio de los triatóminos está dividido en tres regiones: intestino anterior, medio y posterior (Fig 9).

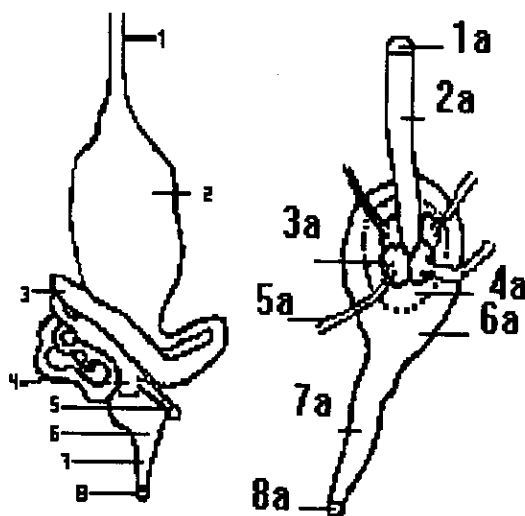


Fig.9. Esquema del tubo digestivo de un triatómino. 1. Esófago, 2. Promesenterio, 3. Post-mesenterio, 4. Ampollas de los tubos de Malpighio, 5. Tubos de Malpighio, 6. Proctodeo, 7. Íleon, 8. Ano.
1a. Inicio del piloro, 2a. Post-mesenterio, 3a. Ampollas de los tubos de Malpighio, 4a. Zona clara, 5a. Tubos de Malpighio, 6a. Proctodeo, 7a. Íleon, 8a. Ano

El intestino anterior comprende al conducto faríngeo, y al esófago. El conducto faríngeo consiste de un tubo delicado, el cual conecta la faringe con el canal de succión de sangre formado por las placas bucales. La faringe, que es un órgano alargado, puede ser considerado como la porción más altamente especializada desde el punto de vista funcional del canal alimenticio de los hemipteros. El esófago es un canal delicado que se expande en forma de vestíbulos proventricular antes de llegar al proventrículo.

El intestino medio comprende la porción principal del canal alimenticio y consiste de proventrículo, estómago y de una parte delgada. El estómago es un saco alargado que cuando está lleno de sangre ocupa una mayor porción de la cavidad general (celoma) del insecto, empujando el resto de los órganos hacia la región posterior. Por este mecanismo es que son estimuladas las glándulas productoras de hormonas de crecimiento y juvenilizantes existentes en la cavidad general del hemíptero.

El intestino posterior o proctodeo es una porción más corta del canal alimenticio y se continúa hacia el recto y los tubos de Malpighio. El recto es un saco muscular relativamente grande, de considerable capacidad de distensión que contiene normalmente materia fecal, y es donde se mantienen los tripanosomas metacíclicos que son eliminados por las heces.⁵

Las glándulas salivales secretan sustancias que probablemente facilitan la penetración de la probóscide del insecto, su composición varía de acuerdo a la especie de triatómino, sin embargo puede ser irritante y alergizante en grado variable dependiendo del huésped.⁵

1.9. IMPORTANCIA DE *Triatoma pallidipennis* EN LA TRANSMISIÓN DE *T. cruzi*.

T. pallidipennis tiene una amplia distribución en el territorio nacional, sobre todo hacia la vertiente del Pacífico y Centro de la República, que incluyen zonas secas y semidesérticas de los estados de Colima, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro y Zacatecas.² Este insecto se ha encontrado frecuentemente colonizando viviendas. En el laboratorio se mantiene alimentándolo sobre aves y mamíferos.

Los estudios realizados sobre el ciclo biológico de este triatómino evidenciaron diferencias notables en cuanto al tiempo que tarda en efectuarse dicho ciclo, sin embargo se desconocen otros aspectos de la biología de este triatómino como son: susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*, sobrevivencia a la infección, capacidad hematófaga, selectividad de huéspedes, tiempo de alimentación, hábitos de defecación y porcentaje de formas infectantes en heces que nos permitan conocer su importancia en la transmisión de *T. cruzi* en la República Mexicana.

2. HIPÓTESIS.

Por un lado se sabe que la respuesta inmune humoral mediada por complemento está involucrada en la eliminación de *T.cruzi* en huéspedes vertebrados y en medios de cultivo que contienen suero anti-*T.cruzi*. Por otro lado, se ha demostrado que en diversos artrópodos, anticuerpos y factores del complemento provenientes de un huésped inmune logran permanecer dentro del intestino de artrópodos hematófagos durante varios días conservando su actividad. Dado lo anterior es probable que *T.cruzi* sea eliminado en el mismo intestino de triatóminos infectados cuando se alimenten de un huésped inmune al parásito, ya que los componentes inmunes pasarán y permanecerán activos dentro del insecto.

3. OBJETIVOS:

1. Demostrar si la alimentación de triatóminos infectados con *T. cruzi*, sobre los ratones inmunes, afecta a los parásitos por acción de factores inmunes humorales.
2. Determinar el grado de eliminación de las distintas fases morfológicas de *T.cruzi* presentes en las heces de triatóminos infectados por efecto de su alimentación sobre ratones inmunes.

2. HIPÓTESIS.

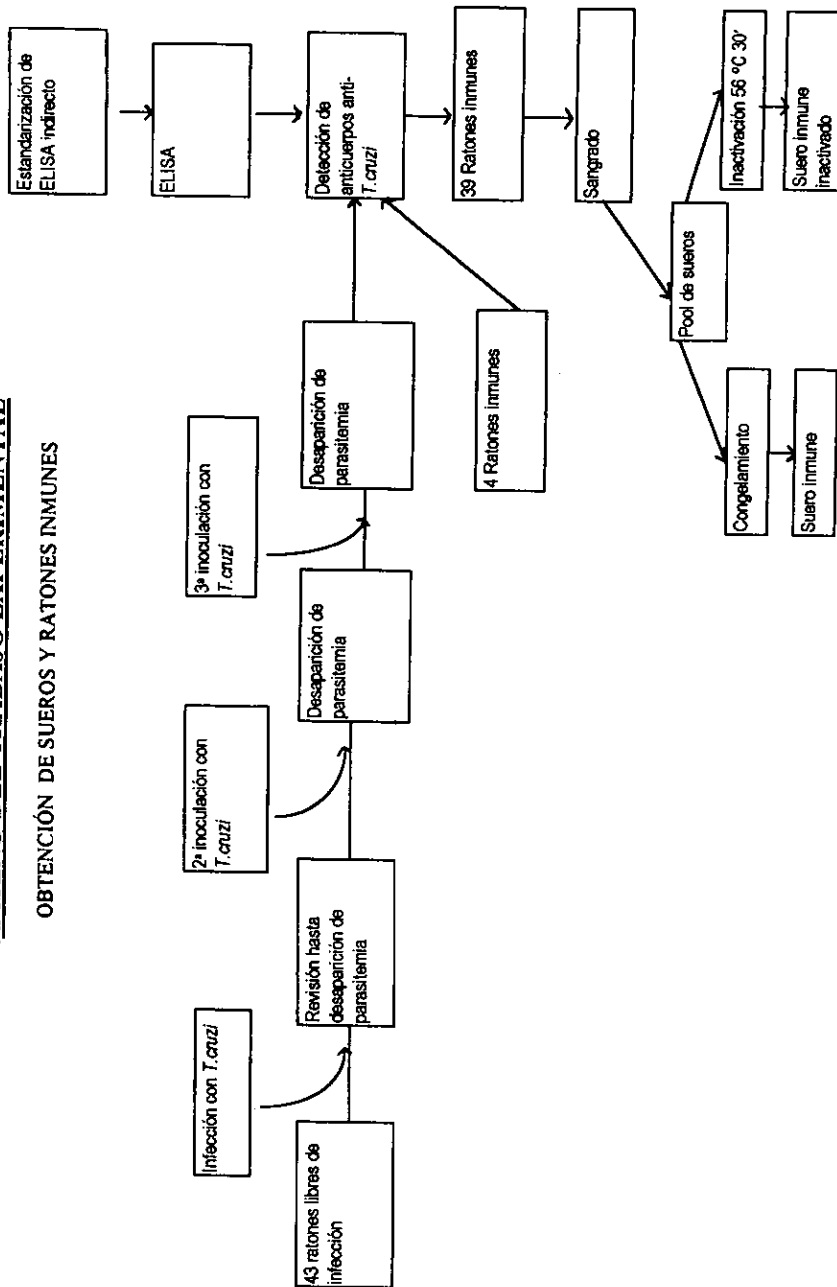
Por un lado se sabe que la respuesta inmune humoral mediada por complemento está involucrada en la eliminación de *T.cruzi* en huéspedes vertebrados y en medios de cultivo que contienen suero anti-*T.cruzi*. Por otro lado, se ha demostrado que en diversos artrópodos, anticuerpos y factores del complemento provenientes de un huésped inmune logran permanecer dentro del intestino de artrópodos hematófagos durante varios días conservando su actividad. Dado lo anterior es probable que *T.cruzi* sea eliminado en el mismo intestino de triatóminos infectados cuando se alimenten de un huésped inmune al parásito, ya que los componentes inmunes pasarán y permanecerán activos dentro del insecto.

3. OBJETIVOS:

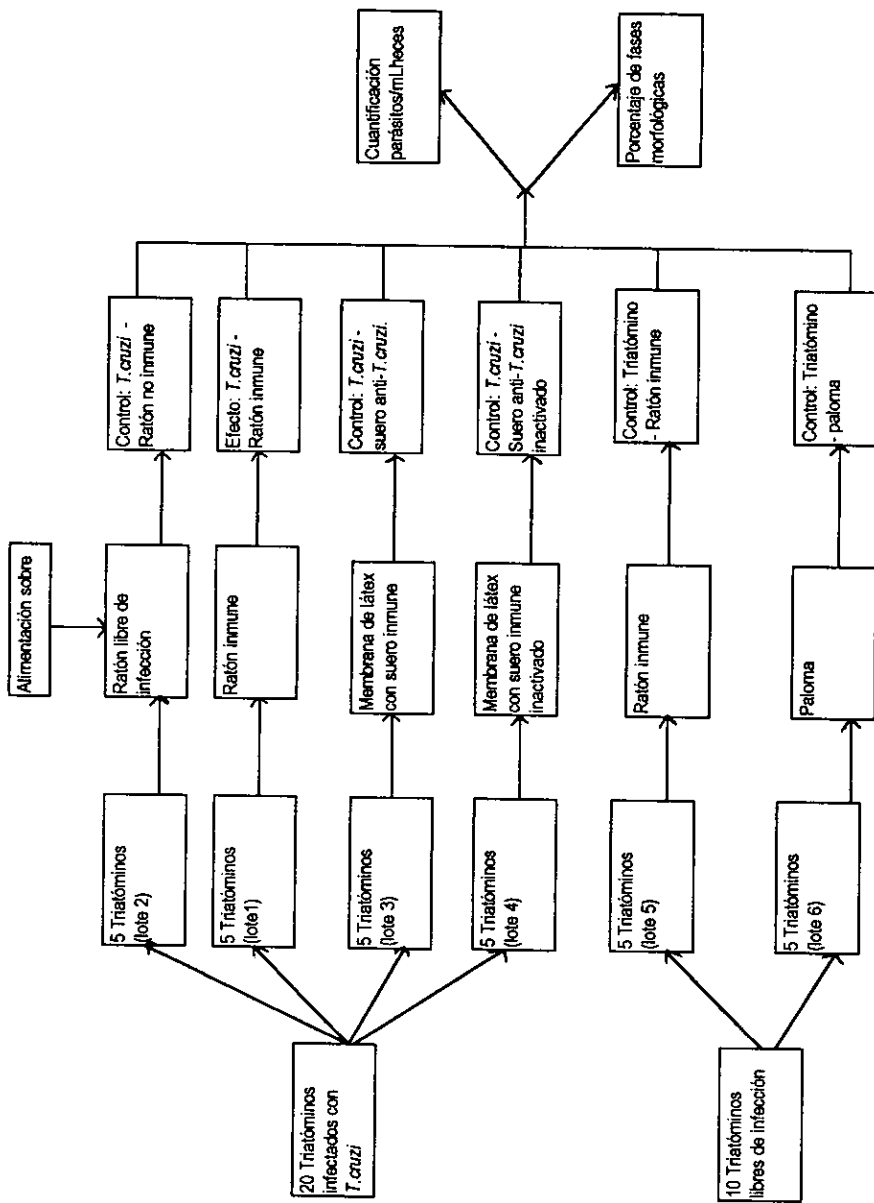
1. Demostrar si la alimentación de triatóminos infectados con *T. cruzi*, sobre los ratones inmunes, afecta a los parásitos por acción de factores inmunes humorales.
2. Determinar el grado de eliminación de las distintas fases morfológicas de *T.cruzi* presentes en las heces de triatóminos infectados por efecto de su alimentación sobre ratones inmunes.

4. DISEÑO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

OBTENCIÓN DE SUEROS Y RATONES INMUNES



ALIMENTACIÓN DE TRIATÓMINOS SOBRE SUEROS O RATONES INMUNES



5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1. Resumen de las actividades desarrolladas.

Para la realización de la investigación, se infectaron 43 ratones CFW con 1×10^6 tripomastigotes sanguíneos en un volumen de 200 μL /ratón dejando que la parasitemia se produjera y luego desapareciera, generalmente ocurre cuando se produce una respuesta inmune humoral contra *T.cruzi*. Cuando desapareció la parasitemia se re infectaron para aumentar tal respuesta humoral; del mismo modo se repitió nuevamente la inoculación. Para verificar que los ratones se encuentren inmunes a *T.cruzi* se investigó la presencia de anticuerpos anti- *T.cruzi* en los sueros de cada uno de los 43 ratones mediante la técnica de ELISA indirecto previamente estandarizada. Se separaron los cuatro ratones que presentaron mayor título de anticuerpos, es decir los más inmunes, los cuales se utilizaron como fuente de alimentación de un grupo de cinco triatóminos infectados y con ello demostrar si los parásitos presentes en el tubo digestivo de los insectos serían eliminados por los factores humorales presentes en el ratón inmune. Estos ratones inmunes también fueron utilizados como fuente de alimentación de un grupo de cinco triatóminos no infectados con la finalidad de asegurar que los ratones inmunes no tuvieran parasitemia que condujera a la infección.

Otro grupo se cinco triatóminos se alimentó sobre los ratones no inmunes para demostrar si la sangre del ratón *per se* podría eliminar los parásitos.

Los otros 39 ratones inmunes se sangraron para obtener su suero, la mitad de éste se inactivó a 56 °C durante 30 min, se colocó dentro de una bolsa de látex y se equilibró a 37 °C; la otra mitad del pool de sueros no se inactivó, se colocó dentro de otra bolsa de látex y se equilibró a 37 °C. Cinco triatóminos se alimentaron sobre la bolsa de látex con el suero inactivado y cinco sobre la que contenía el suero sin inactivar. Con esto se buscaba ver si el complemento era indispensable para la eliminación de los parásitos en caso de que ocurriera.

Cinco triatóminos se mantuvieron alimentados sobre una paloma no inmune como control de alimentación de los insectos, ya que anteriormente se alimentaban sobre aquella.

5.2. Infección de ratones con *Trypanosoma cruzi*.

Con la finalidad de obtener ratones inmunes, se inocularon por vía intraperitoneal 43 ratones hembras de 6-8 semanas de edad pertenecientes a la cepa CFW, con 1×10^6 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Qrx. por ratón. Se realizó un seguimiento de la infección durante 90 días buscando parásitos en su sangre, momento en que desapareció la parasitemia. Para ello se realizaban exámenes directos en fresco de la sangre de los ratones obtenida al cortar la punta de la cola y observándola entre cubre y portaobjetos bajo el microscopio. Cuando la parasitemia desapareció se inocularon de nuevo con la misma dosis; al desaparecer la parasitemia de nuevo se inocularon de la misma forma que la vez anterior.

5.2.1. Estandarización de ELISA indirecto.

Una vez que los 43 ratones mencionados arriba dejaron de presentar parásitos en sangre se verificó que estuvieran inmunes a *T.cruzi*, para lo cual previamente se estandarizó la técnica de ELISA indirecto y luego se detectó la presencia de inmunoglobulinas en los sueros de los animales. La estandarización se efectuó en términos de concentración de antígeno acoplado al poliestireno y la dilución del suero. Como antígeno se emplearon epimastigotes fijados con paraformaldehído al 2% desarrollados en medio LIT a concentraciones de 10^4 , 10^5 y 10^6 parásitos/pozo.

Para determinar la dilución óptima del suero se empleó suero de un ratón seropositivo a *T.cruzi* diluido 1/100, 1/1000 y 1/10000 con PBS-Tween 20 al 0.5% (PBS-T20). Como conjugado se utilizó inmunoglobulinas de cabra con reactividad a cadenas γ y de anticuerpos de ratón acopladas a peroxidasa y diluidas 1/10000 con PBS-T20 y $K_3Fe(CN)_6$. Para realizar este ensayo se emplearon placas de poliestireno de 96 pozos COSTAR, médium binding. A los pozos se colocó 200 μ L de la suspensión de parásitos desarrollados en medio de cultivo LIT, previamente lavados tres veces en PBS-T20 y fijados con paraformaldehído al 2% se dejaron evaporar las placas a temperatura ambiente (T.A.) durante 3 días evitando contaminación por polvo. Cuando los pozos de las placas estaban secos se lavaron nuevamente con PBS-T20 tres veces para eliminar las sales; enseguida se colocaron en cada pozo 200 μ L de sol.bloqueadora (BSA al 0.1% en PBS-T20 al 0.5%) por dos horas a T.A. Se lavó tres veces y se adicionaron a cada pozo 100 μ L de los sueros diluidos dejando actuar dos horas a T.A. se lavaron tres veces los pozos nuevamente y se colocaron a cada pozo 100

μL del conjugado, también se incubaron dos horas a T.A. Se lavaron de nuevo los pozos y enseguida se adicionaron a cada pozo 100 μL de tetrametil benzidina (TMB) como sustrato de la peroxidasa y después de 15 min se paró la reacción colocando 100 μL de H_2SO_4 1N. La placa se leyó a 450 nm.

5.2.2. Detección de anticuerpos anti-*T.cruzi* en sueros de los ratones.

Se buscó la presencia de anticuerpos anti-*T.cruzi* en los sueros de los 43 ratones inoculados con *T.cruzi* y los seis de referencia negativos, además de dos sueros positivos a *T.cruzi* otorgados por un laboratorio de investigación en diagnóstico de enfermedad de chagas. Durante la estandarización del ELISA indirecto, las condiciones óptimas resultaron ser: una concentración de antígeno de 10^5 parásitos/pozo (ver resultados) y una dilución del suero 1/1000.

En placas de poliestireno de 96 pozos, COSTAR, médium binding, se realizó el ensayo de ELISA indirecto. Para ello, en cada pozo se colocaron 200 μL de suspensión de epimastigotes de *T.cruzi* desarrollados en medio LIT y previamente lavados con PBS-T20 (solución de lavado) a concentraciones de 1×10^5 parásitos/pozo. Se dejaron secar a T.A. y se lavaron los pozos con la solución de lavado tres veces y se agregaron 200 μL de sol. bloqueadora (albúmina sérica bobina (BSA) con PBS-T20 al 0.5%), dejando incubar dos horas a T.A. En seguida se lavaron los pozos con sol. de lavado por tres veces y se agregó el suero de cada ratón empleando tres diluciones: 1/100, 1/1000 y 1/10000 por duplicado (dos pozos por cada dilución). Se incubaron a T.A. dos horas y

luego se lavaron tres veces con sol. de lavado para agregar el conjugado como en la estandarización de esta prueba; se incubó dos horas a T.A. y se adicionó el sustrato (TMB) y después de 15 min se paró la reacción con la adición de 100 μ L de H₂SO₄ 1N. Se leyó la placa a 450 nm.

Con este ensayo se verificó que los 43 ratones infectados con *T.cruzi* estuvieran inmunes al parásito, por la presencia de anticuerpos anti-*T.cruzi*, y que los seis ratones controles sin infectar no tuvieran anticuerpos contra el parásito.

5.2.3. Obtención de sueros de ratones.

Se obtuvo el suero de los 43 ratones inoculados con *T.cruzi* y otros seis ratones libres de infección que se emplearon como sueros de referencia negativos en la prueba de ELISA. Cada ratón se sangró por la cola, hasta obtener 100-200 μ L de sangre por ratón; cada muestra se colectó en microtubos de poliestireno de 1.5 mL secos; la sangre se dejó coagular durante dos horas a T.A., el coágulo se separó de las paredes del tubo y se dejó retraer durante toda la noche a 4 °C. Se centrifugó a 2700 xg durante 15 min a T.A., el suero obtenido se pasó a microtubos limpios y secos para repetir la centrifugación con el fin de asegurar la ausencia de glóbulos rojos; el suero final se pasó a microtubos limpios, secos y estériles y se almacenaron a -12 °C hasta su uso.

5.2.4. Obtención de pool de sueros de ratones inmunes a *T. cruzi*.

Ya que los 43 ratones infectados con *T. cruzi* estaban inmunes, se sangraron sólo 39 de éstos para obtener un pool que se empleó para alimentar triatóminos sobre membranas de látex. Para ello se realizó punción cardiaca de los 39 ratones y se obtuvo el máximo de sangre posible de cada ratón, depositándolas por separado, dentro de tubos de 16X150 mm limpios y secos, y se dejaron a T.A. durante 2-3 horas para que se coagulara la sangre. Pasado este tiempo, se separó el coágulo y se guardaron en refrigeración por dos horas más para que se retrajera el coágulo; enseguida, los tubos se centrifugaron durante 15 min a 5000 rpm y se separó el suero de cada tubo, pasando cada uno a microtubos para centrifugarlos durante 15 min a 2700 xg. Los sueros se mezclaron pasando todos a un mismo tubo de 16x150 nm y se guardaron en refrigeración. El suero se colocó en tubos graduados para conocer el volumen total obtenido. Éste se separó en dos partes iguales colocándolos en tubos limpios, secos y estériles.

Uno de los tubos se incubó en baño maría a 56 °C durante 30 min con el fin de descomplementarlo. Ambos tubos, aquél que contenía el suero inmune inactivado y el que lo contenía sin inactivar, se guardaron un día en refrigeración para observar si se formaban precipitados; éstos se separaron por centrifugación de acuerdo a las condiciones anteriores y se congelaron a -20 °C hasta su uso.

5.3. Infección de triatóminos con tripomastigotes sanguíneos.

Para la investigación se requerían triatóminos infectados con *T. cruzi*. Se emplearon ninfas de tercer estadio de la especie *Triatoma pallidipennis*. Treinta triatóminos se distribuyeron en seis lotes con cinco ejemplares cada uno. Veinte triatóminos se infectaron con *T. cruzi* de la siguiente manera: Se colocaron sobre uno de los 43 ratones infectados con *T. cruzi* y que presentaba la mayor parasitemia durante 15-30 minutos. Periódicamente se revisaban sus heces para asegurar que se habían infectado.

Cuando se observaron parásitos en las heces de los 20 triatóminos, éstos se utilizaron para los experimentos de alimentación sobre ratones y sueros inmunes.

5.4. Alimentación de triatóminos infectados sobre un ratón inmune (lote 1).

Uno de los lotes de cinco triatóminos infectados con *T. cruzi* se colocó sobre el ratón con mayor título de anticuerpos contra el parásito para alimentarse de su sangre durante 30 min, tal como se describió anteriormente. Se revisaron las heces de los insectos mediante examen en fresco y también se determinó el porcentaje de formas de *T. cruzi* y número de parásitos/mL de heces, en una observación de 5 μ L de heces.

5.5. Alimentación de triatóminos infectados sobre un ratón no inmune a *T. cruzi* (lote 2).

Al igual que la alimentación del lote 1 de triatóminos sobre el ratón inmune, uno de los cuatro lotes infectados con *T. cruzi* se expuso sobre un ratón serológicamente negativo al parásito (lote 2).

5.6. Alimentación de triatóminos infectados sobre sueros inmunes en membranas de látex.

Dos de los cuatro lotes de triatóminos infectados se alimentaron sobre sistemas de membrana de látex, uno conteniendo suero inmune inactivado (lote 3) y el otro lote sobre suero inmune sin inactivar (lote 4). Este sistema consistió en una bolsa de látex nueva lavada con extrán y seca, dentro de la cual se colocaron 4 mL de suero (inactivado o sin inactivar) el suero inmune, se amarró con un hilo del extremo abierto, para evitar su salida y se introdujeron dentro de un vaso de plástico limpio y seco.

Se incubaron en una estufa a 37 °C hasta que se equilibró, aproximadamente en 15 minutos. Después de este tiempo se pesaron cada uno de los triatóminos y se colocaron dentro de su respectivo vaso durante una hora, los cuales fueron retirados hasta que completaron su alimentación (mediante pesada) y conocer el volumen de suero inmune que habían ingerido.

5.7. Alimentación de triatóminos no infectados sobre ratón inmune (lote 5).

Dado que un ratón crónico puede, en escasas ocasiones presentar parasitemia, un triatómino puede infectarse de aquél.

De este modo, con la finalidad de asegurar que los ratones inmunes que se emplearon como fuente de alimento de un lote de transmisores, no tuvieran parasitemia que condujera a infección de triatóminos y que éstos sólo ingirieran componentes humorales inmunes. Un lote de triatóminos no infectados se expuso sobre el ratón inmune y se revisaron sus heces durante todo el experimento, de esta manera se empleó como control de infección inesperada. Por otro lado, también era necesario saber si el suero *per se* no era tóxico para los triatóminos, entonces este lote fue para asegurar que los insectos no mueren por la simple ingestión de suero inmune.

5.8. Control de triatóminos (lote 6).

Uno de los lotes no infectados conteniendo cinco triatóminos libres de infección se mantuvieron alimentados sobre una paloma no inmune como control de alimentación de los insectos, ya que anteriormente se alimentaban sobre aquella.

5.8.1. Presencia de parásitos en heces de triatóminos.

Se tomó cada uno de los triatóminos de los diferentes lotes y se provocó su defecación presionando su abdomen de manera de que las heces se colocaron sobre un portaobjetos limpio, seco y desengrasado.

La muestra de materia fecal fresca obtenida de cada triatómino revisado se depositó entre un porta y un cubreobjetos limpios y secos, se observó bajo el microscopio a 10X y 40X. Si en las heces habían parásitos se cuantificaban.

5.8.2. Cuantificación de parásitos y determinación del porcentaje de formas de *T. cruzi*.

De las heces de cada triatóminos se tomaban 5 μ L de heces y 5 μ L de DPBS, se mezclaban perfectamente y con la micropipeta se tomaban 5 μ L depositándolos entre porta y cubreobjetos y se contaba el No. de parásitos presentes en toda la muestra (5 μ L); luego se realizaba un extendido uniforme y se cubría con metanol durante 3-5 minutos para fijar la muestra; se adicionaba solución de Giemsa durante 30 minutos. aproximadamente, se lavaba bajo chorro fino de agua; después de dejar secar al aire se observaba al microscopio a 40X y 100X, para contar el número de epimastigotes u otras formas de *T. cruzi*, entonces se calculaba el porcentaje de cada fase observada.

6. RESULTADOS.

6.1. Búsqueda de anticuerpos anti-*T. cruzi* en ratones.

Para detectar anticuerpos anti-*T. cruzi* en el suero de ratones, se realizó la técnica de ELISA indirecto. En esta técnica, la cantidad de anticuerpos presentes en el suero de los ratones es proporcional a la absorbancia registrada. Primeramente se estandarizó la técnica y después se investigó la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en el suero de los 43 ratones que se infectaron y se reinocularon dos veces con *T. cruzi*.

6.1.1. Estandarización de la técnica de ELISA indirecto.

Se consideraron como condiciones óptimas de la técnica de ELISA indirecto a aquellas que permitieron obtener la mayor absorbancia a la mayor dilución de suero con la menor concentración de epimastigotes/pozo. Los resultados se muestran en la fig. 10.

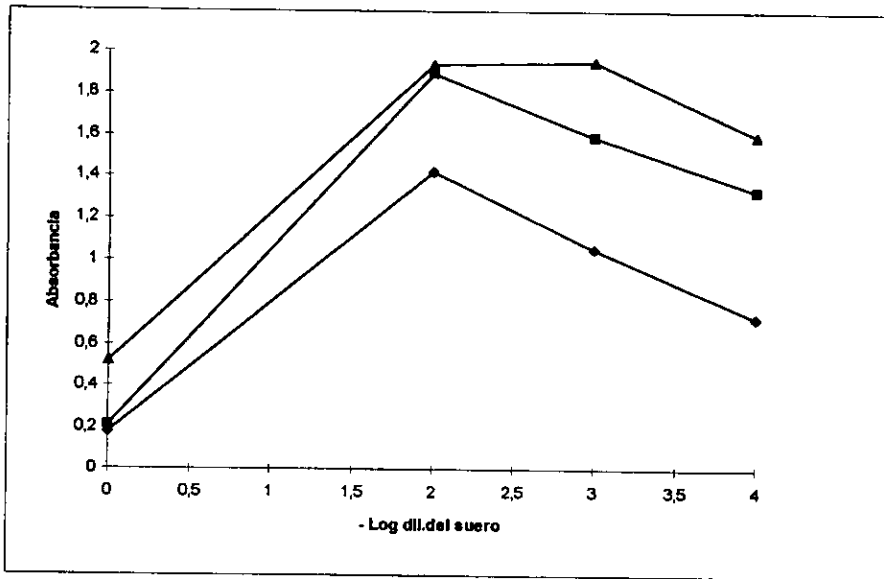


Fig. 10. Estandarización de la técnica de ELISA indirecto. La dilución del conjugado utilizada fue 1/10000. ▲ = 10^6 epimastigotes/pozo; ■ = 10^5 epimastigotes/pozo; ◆ = 10^4 epimastigotes/pozo.

En la figura 10 se puede observar que la concentración de antígeno 10^6 epimastigotes/pozo presenta los valores más altos de absorbancia a todas las diluciones del suero probadas; la diferencia de absorbancia de esta concentración con respecto a la de 10^5 epimastigotes/pozo, no es significativa, sobre todo al emplear una dilución del suero 1/100, por lo que se decidió utilizar el antígeno a la concentración de 10^5 epimastigotes/pozo con una dilución del suero 1/100, de acuerdo al criterio señalado arriba.

Por otro lado, la figura 10 muestra que las absorbancias son mayores cuando se emplea el suero 1/100 a las tres concentraciones de antígeno empleado.

Por tanto, las condiciones óptimas para realizar la técnica fueron 10^5 epimastigotes/pozo, suero diluido 1/100 y dilución del conjugado 1/10000.

6.1.2. Obtención de sueros control negativos.

Con la técnica de ELISA indirecto se verificó que los seis sueros de ratones no infectados fueron negativos a *T. cruzi* y se escogieron como controles los de menor ruido de fondo.

En la figura 11 se observa que de los seis sueros de ratones libres de infección a *T. cruzi*, el número uno y el tres son los que dieron los mayores títulos por lo que se descartaron como controles negativos.

En tanto que, los sueros dos, cuatro, cinco y seis, al presentar los valores más bajos de absorbancia, a las tres distintas diluciones del suero, con respecto al control positivo, fueron incluidos dentro del grupo de sueros control negativos.

El suero número seis no se empleó dada la escasa cantidad que se obtuvo y por muerte del ratón posterior al ensayo. De este modo se emplearon los sueros de los ratones dos, cuatro y cinco como referencia negativos.

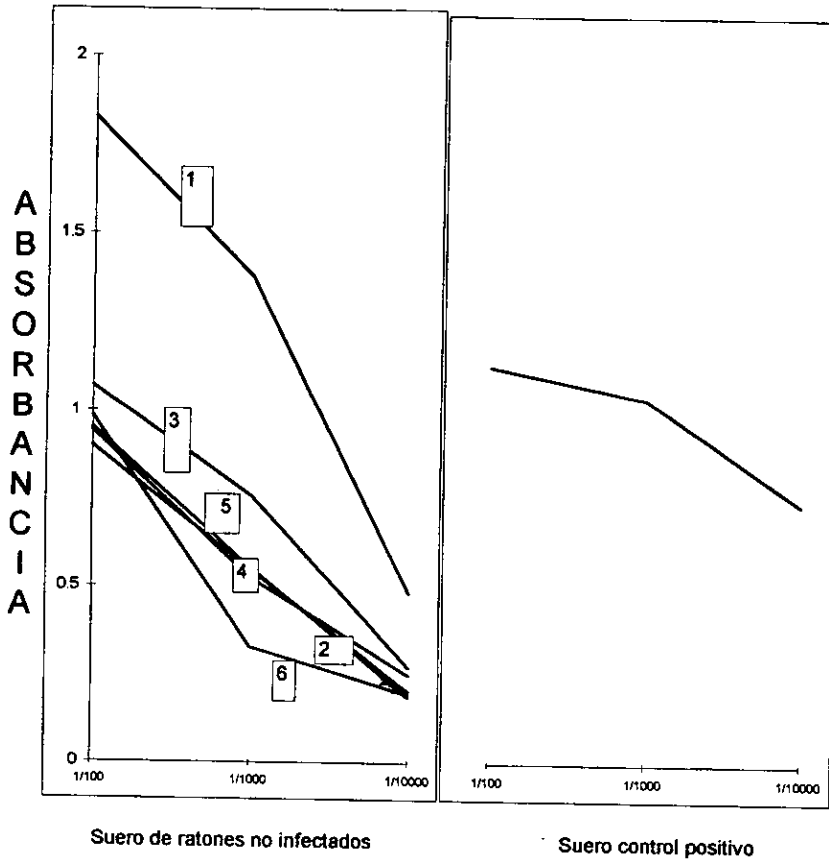


Fig. 11.- Los sueros se emplearon a diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10000 (Ver material y métodos).
Los números en cada curva representan a cada uno de los seis ratones.

6.1.3. Detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*.

Se considerarán como sueros positivos a aquellos que presentarán una absorbancia mayor a la del valor más alto de los sueros de referencia negativos, y por tanto como ratones inmunes. En la figura 12 se observan los resultados, estos indican que con todos los sueros procedentes de los ratones inoculados se obtuvieron valores de absorbancia más altos que con los de referencia negativos. La absorbancia en los sueros positivos varía desde 1.2 hasta 2.16.

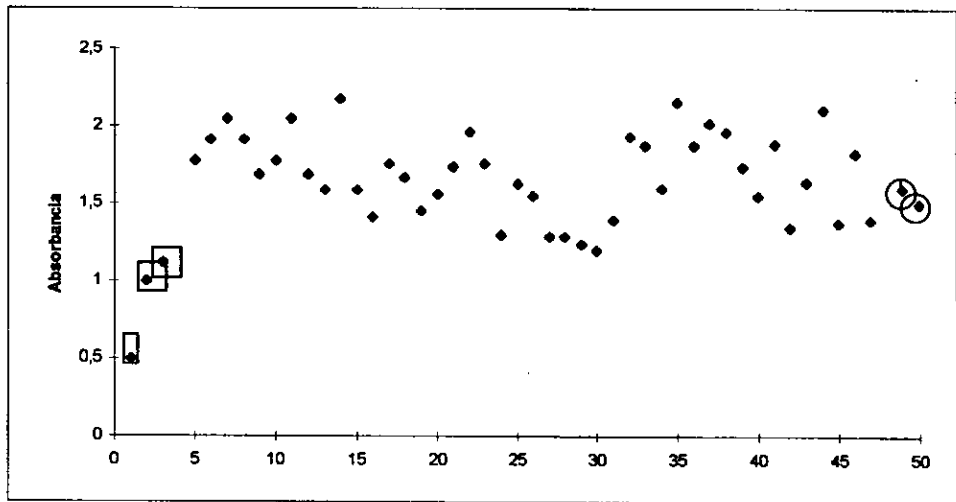


Fig 12. Los sueros diluidos 1/100 de los ratones infectados se probaron mediante un ELISA indirecto en placa de 96 pozos cubiertos con 10^5 epimastigotes/pozo fijados con p-formaldehído (ver material y métodos).

◻ = Sueros negativos; ◆ = Sueros problema; ⊙ = Sueros control positivos.

6.2. Alimentación de triatóminos sobre ratones inmunes, no inmunes o sueros inmunes.

Los triatóminos infectados se expusieron sobre un ratón inmune, no inmune, o suero activo inmune en membrana de látex y suero inactivado no inmune sobre látex: lotes 1,2,3 y 4 respectivamente. Esta alimentación se siguió durante 60 días, mismos en los que se registró el efecto sobre la eliminación de *T.cruzi*. En la tabla 1 se presentan los volúmenes y los días en que se alimentaron los triatóminos infectados y los que no están infectados (lote 5,6). Sólo uno de los triatóminos del lote 1,4 y otro del 5 no comieron en ningún momento del estudio. En general los que comieron varían en volúmenes de ingesta por día y por un triatómino desde 0.0048 mL hasta 0.77 mL.

Los triatóminos de los lotes 1, 2 y los triatóminos no infectados del lote 5 se alimentaron más en cuanto a número de ingestas y volumen total de sangre ingerida, esto puede deberse a preferencias alimenticias sobre el ratón, en cambio se alimentaron menos los que se sometieron a la ingesta de ingerieron suero inactivado inmune y también el número de ingestas fue menor, esto se debe a que el suero como fué inactivado y por tanto las proteínas se desnaturalizarón, los triatóminos perdieron el interés al comer dicho suero ya que sin embargo con el suero sin inactivar el número de ingestas y el volumen total ingerido por los triatóminos fué mayor con respecto al suero inactivado.

RESULTADOS

Tabla 1.- Volúmenes de sangre o sueros ingeridos por los triatóminos durante el experimento (mL).

Lote 1		Lote 2		Lote 3	
Relación inmune		Relación no inmune		Suero Inactivado	
Día	Alimentación promedio	Alimentación promedio		Alimentación promedio	
0	0.0778	0.0985	0.0985	0.0233	0.0233
3	0.0665	0.0595	0.0595	0.0196	0.0196
5	0.0231	0.0181	0.0181	0	0
9	0.0164	0.0014	0.0014	0.0024	0.0024
12	0.0190	0.1219	0.1219	0	0
17	0.0798	0.0465	0.0465	0	0
24	0.0602	0.0169	0.0169	0.0229	0.0229
33	0.0870	0.0219	0.0219	0.0010	0.0010
54	0.0091	0.0150	0.0150	0.0024	0.0024
60	0	0.0096	0.0096	0.0017	0.0017
No. total de ingesta por lote	18	23	23	10	10
Volúmen por lote (mL)	2.295	1.6749	1.6749	0.3638	0.3638
Lote 4		Lote 5		Lote 6 *	
Suero sin inactivar		Relación inmune		Padema control de alimentación	
Alimentación promedio		Alimentación promedio		Alimentación promedio	
Día					
0	0.0924	0.0533	0.0533		
3	0.0000	0.0241	0.0241		
5	0.0123	0.0101	0.0101		
9	0.0096	0.0080	0.0080		
12	0.0039	0.0000	0.0000		
17	0.0301	0.0530	0.0530		
24	0.0927	0.0518	0.0518		
33	0.0550	0.0108	0.0108		
54	0.0082	0.0137	0.0137		
60	0.0046	0.0785	0.0785		
No. total de ingesta por lote	19	18	18		
Volúmen por lote (mL)	1.3837	1.1636	1.1636		

* Nota: Para el lote 6 no se realizó ya que sólo se investigó a él como normal de los insectos para su alimentación.

6.2.1. Efecto de las diferentes fuentes de alimentación de triatóminos sobre la cantidad de parásitos.

Se trató de conocer el efecto que se produce en la cantidad de parásitos por la alimentación de los triatóminos infectados sobre un ratón inmune, no inmune, suero inmune pero inactivado o sin inactivar, en función del tiempo.

En la figura 13 se observa, en términos generales, que la cantidad de tripanosomas observados en las heces de los insectos disminuye con el tiempo al alimentarse en repetidas ocasiones con su respectiva fuente de alimento. Resalta que la disminución de parásitos llega a ser de cero cuando se alimentan con suero inmune sin inactivar, lo cual ocurre hasta el día 35 después de iniciar la alimentación. Para el caso de los triatóminos alimentados sobre el ratón inmune la disminución también se dio, desde 30×10^4 parásitos/ mL de heces hasta 10×10^4 parásitos/ mL de heces al día 14 después de comenzar la alimentación y luego se mantiene casi constante, entre 10 y 16×10^4 parásitos/mL heces hasta el día 60.

También ocurrió una disminución de parásitos cuando los insectos infectados se alimentaron sobre suero inmune inactivado desde 30×10^4 a 15×10^4 parásitos/mL. En cambio, cuando se alimentaron de ratón no inmune la disminución varió desde 21 hasta 17×10^4 parásitos/mL, es decir, sólo una diferencia de 7×10^4 parásitos/mL, en varias ocasiones se llegó a observar la misma cantidad que la inicial. Lo anterior indica definitivamente que factores de fuente inmune están eliminando a los parásitos. También se puede decir que el complemento es un factor indispensable en la eliminación

total de los parásitos ya que el suero sin inactivar es el que los elimina por completo. EL porqué cuando se alimentan ratón inmune hay una eliminación parcial, quizás se deba a que el complemento está diluido en la sangre completa que el suero solo.

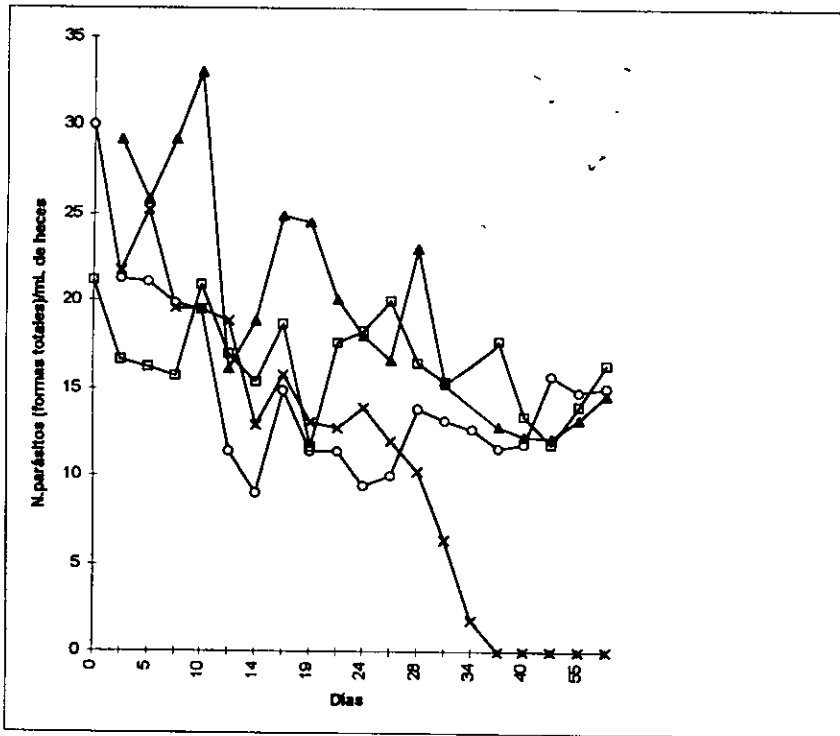


Fig. 13: Efecto de las diferentes fuentes de alimentación de triatóminos sobre la cantidad de tripanosomas.

O = Ratón inmune □ = Ratón no inmune ▲ = Suero inmune inactivado x = Suero inmune sin inactivar

6.2.2. Efecto de la alimentación de triatóminos sobre las fases morfológicas de *T. cruzi* presentes en heces.

En la figura 14 se observa que para los cuatro lotes de triatóminos el mayor número de formas que siempre se observaron corresponde a tripomastigotes, cuando los triatóminos se alimentaron de ratón inmune, no inmune o de suero inmune inactivado.

Cuando se alimentaron sobre el ratón inmune la cantidad de tripomastigotes disminuyó rápidamente y la de epimastigotes se mantiene casi constante, lo cual indica que el efecto de eliminación sobre *T. cruzi* ocurre para tripomastigotes. Esta explicación es apoyada con el resultado obtenido de los triatóminos alimentados con suero inmune inactivado y más claramente con suero inmune sin inactivar. Estos resultados también indican que la eliminación va dirigida contra tripomastigotes. Este resultado puede explicarse si recordamos que la fase que estimuló la respuesta inmune en los ratones es el tripomastigote, ya que se encuentra en la sangre; la parasitemia en los ratones dura alrededor de 30 días, de manera que la respuesta inmune del huésped se ha dirigido contra componentes de tripomastigotes por lo que el suero y dentro del intestino del triatómino, actúa sobre aquéllos. La eliminación de los epimastigotes u otras formas de *T. cruzi* se debe a que éstos contienen componentes que están presentes también en los tripomastigotes.

La figura 14 muestra los resultados obtenidos.

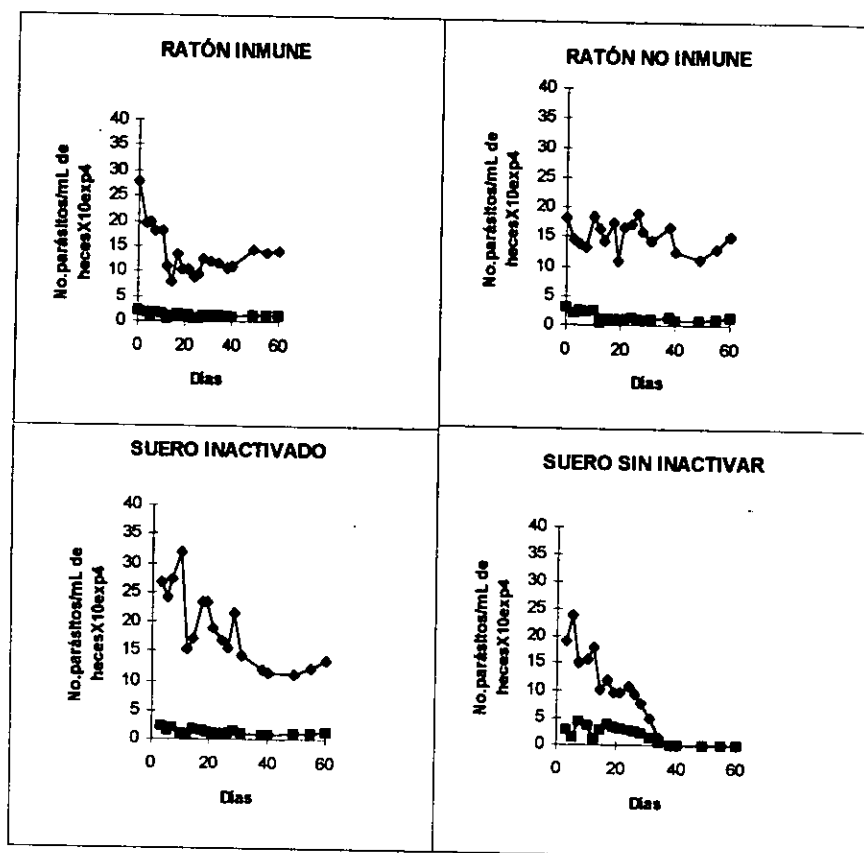


Fig 14: Efecto de la alimentación de triatóminos sobre las distintas formas de *T. cruzi*.

◆ = Tripomastigotes ■ = Epimastigotes

7.- DISCUSIÓN.

Definitivamente los resultados obtenidos durante esta investigación han demostrado clara eliminación de *T.cruzi* dentro del insecto transmisor por efecto de su alimentación sobre componentes de origen inmune, ya sea de ratón inmune o suero inmune contenido en membranas de látex; tal efecto es dirigido principalmente hacia tripomastigotes, quizá por ser las formas que indujeron la respuesta inmune anti-*T.cruzi*. El complemento es el factor inmune principal para la eliminación de los parásitos, sin embargo no se puede descartar la participación de células de la respuesta inmune que hayan sido efectoras contra el parásito puesto que esta ha sido observada en innumerables estudios.

Los resultados son congruentes con lo observado en otros trabajos relacionados con la eliminación de *T.cruzi* por la respuesta inmune. Por ejemplo el estudio de Hudson 1985 apoya fuertemente que el papel del complemento es importante para la disminución de *T.cruzi*, en particular en fase de tripomastigote sanguíneo por la vía clásica y alterna.²⁶

Por otro lado, otros estudios también apoyan estos resultados en relación a la persistencia de componentes humorales cuya actividad se conserva durante varios días, en este sentido se ha demostrado que persisten hasta por cuatro días conservando su actividad (J.A.Vaughan A.S. A.F.Azad, 1988; R.B.Tesh, et al. 1988).

Efectivamente se observó una eliminación de los parásitos cuando los insectos se alimentaron sobre suero inmune sin inactivar en membranas de látex, lo que permite inferir que su actividad eliminadora anti-*T.cruzi* se conserva por días. Quizás las fluctuaciones de dichas respuestas se deben a que la actividad de anticuerpos y complemento se pierde en pocos días, sin embargo los resultados no apoyan claramente esta suposición.

En el trabajo de Hudson 1985 se muestra claramente que el suero inmune puede eliminar a tripomastigotes sanguíneos pero cuando se inactiva por calor o por presencia de veneno de cobra (factor anticomplemento), se exagera el efecto patogénico de una cepa virulenta de *T.cruzi* en ratones, esto confirma el resultado que el complemento es un factor preponderante contra *T.cruzi*.

Una evidencia más que apoya la acción de sueros inmunes en la eliminación de *T.cruzi* es el trabajo de Tay Zavala y colaboradores (1975), en el cual formas de cultivo son deformadas por la presencia de suero inmune al parásito obtenido de un conejo inmunizado con epimastigotes.²⁷ Por tanto hay una ligera especificidad en la eliminación de las fases del parásito por los sueros inmunes que es ocasionada por la fase que induce la respuesta inmune en el huésped.

Si los triatóminos que se encuentran infectados en zonas endémicas picaran a individuos vacunados, con una respuesta inmune humoral anti-*T.cruzi*, los componentes actuarán contra el parásito en su tubo digestivo eliminando a los parásitos. Esto permitirá que no se elimine al

transmisor, organismo biológico que ha sobrevivido en la naturaleza desde antes que existiera el humano, sin embargo se podría eliminar al parásito, es decir, funcionaría como una vacuna para el propio insecto, y así cortar la transmisión.²⁷

8.- CONCLUSIONES.

- Fuentes alimenticias para triatóminos que contenían componentes de la respuesta inmune fueron capaces de eliminar a *T.cruzi* en el interior de los transmisores.
- EL complemento fue un factor importante en la eliminación de *T.cruzi*, incluso dentro del tubo digestivo del transmisor.
- La principal fase de *T.cruzi* eliminada fue el tripomastigote.

9.- APÉNDICE

1.- Detección de anticuerpos anti-*T.cruzi*.

a) p-formaldehido al 2%:

p-formaldehido	2 g
H ₂ O destilada	100 mL.

b) PBS. T20: NaCl 0.15 M, NaH₂PO₄ 10 mM, pH= 7.8, 0.05% tween 20

Stock 10x : NaCl	90 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	13.8 g
H ₂ O bidestilada	900 mL
Disolver	
Ajustar pH a 7.8 con NaOH 5M	
Aforar a	995 mL
Filtrar sobre membrana de 0.2 μ m	
Tween 20	5 mL
Se conserva 6 meses a T. ambiente.	

c) PBS.T20-BSA AL 1%:

PBS.T20 10x	10 mL
H ₂ O Dest.	90 mL
BSA (albúmina sérica bovina)	1 g

d) K₃ Fe(CN)₆: Stock 100x:

K ₃ Fe(CN) ₆	0.33 g
H ₂ O dest.	100 mL

Se conserva 6 meses a Temperatura ambiente.

e) TMB 100x:

3,3',5,5' tetrametil- benzidina	13 mg
DMSO	1 mL

Guardar a 4° en la oscuridad.

f) H₂O₂. 130 mM (100 x):

H ₂ O ₂ al 30%	143 µL
H ₂ O bidest.	10 mL

Guardar por lo menos 1 mes a T. ambiente.

g) Buffer para sustrato: 0.1 M acetato de sodio/Ácido cítrico pH = 6.0

Ácido cítrico 0.1 M (50mL):

Ácido cítrico monohidrato	1.05 g
H ₂ O bidest.	50 mL

Acetato de sodio	1.36 g
H ₂ O dest.	80 mL

Disolver

Agregar ácido cítrico 0.1 M hasta la obtención de pH = 6.0

H ₂ O dest.	Aforar a	100 mL
------------------------	----------	--------

Filtrar sobre membrana de 0.2 µm

Guardar a 4° C

h) Conjugado GAM-POD (anti-γ- globulina de ratón-peroxidasa):

Diluyente:

K ₃ Fe(CN) ₆ 100%	100 µL
PBS.T20-BSA al 1%	9.9 mL

Conjugado:

Dilución 1/10000

GAM-POD	4 µL
Diluyente	400 µL

i) Sustrato a preparar al momento de su uso:

Buffer para sustrato	9.8 mL
TMB 100	100 μ L
Agitar	
H ₂ O ₂ 100	100 μ L

J) H₂SO₄ 1N:

H ₂ SO ₄ Conc. (36N)	10 mL
H ₂ O dest.	350 mL

k) Dulbecco's PBS (DPBS):

NaCl	8 g	138 mM
Kcl	0.2 g	2.7 mM
Na ₂ -HPO ₄	1.15 g	8.1 mM
KH ₂ PO ₄	0.2 g	1.2 mM
H ₂ O Mega pura	1000 mL	

Filtrar por una membrana de 0.22 μ m y
esterilizar en autoclave. Se conserva
indefinidamente a Temperatura ambiente.

10.- BIBLIOGRAFÍA.

1. Velasco Castrejon, O. 1991. La enfermedad de chagas. Secretaría de salud. Dirección general de epidemiología. Instituto Nacional de Diagnostico y referencia epidemiológicos. " Dr. Manuel Martínez Báez ". Publicación técnica del INDRE. No. 8
2. Tay Zavala, J., Velasco Castrejon, O., Lara Aguilera, R., Gutiérrez Quiroz, M. México 1991. Parasitología Medica, Francisco Méndez Cervantes, Quinta edición.
3. Miercio, E.A. Pereira. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*, Pag. 64-78.
4. Barbara A. 1995. Burleigh and Norma W. Andrews. The Mechanisms of *T.cruzi* invasión of mammalian cell. *Annv.Rev.Microbiol.* 49: 175-200.
5. Brener, Zigman; Andrade, Ziltan, 1979. A. *Trypanosoma cruzi* e Doença de chagas. Brasil, Rio de Janeiro.
6. Garry B., 1993. Takle and David Snary., Immunology and molecular biology of parasitic infections., Kenneth S. Warren., Blackweell Scientific Publications. Bastón USA., Third edition, Pag 213-236.

7. Ovaissi MA, Cornette J., Capron A. 1986. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. Mol. Biochem. Parasitol. 19: 201.
8. Velge P., Ovaissi MA., Cornette J., Afchain D., Capron A. 1988. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: Possible role in cell-parasite interaction. Parasitology. 97:255.
9. Cazzulb JJ. 1984. Protein and aminoacid catabolism in *Trypanosoma cruzi* Comp. Biochem. Physiol. 793: 309.
10. Pereira MEA. A. 1983. Developmentally regulated neuraminidasa activity in *Trypanosoma cruzi*. Science, 219: 1444.
11. Harth G., Haidaris G., SoM. 1987. Neuraminidase formó *Trypanosoma cruzi*: Analysis of enhanced expression of the enzyme in infectivos form. Proc. Natl Acad. SCI. USA. 84: 8320.
12. Tizard Ian., Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis. De CRC, 1985., EEUU.
13. Norueira N., Cohn Z. 1976. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in

mammalian cell. J. EXP. MED., 143:1402.

14. Rottenberg M. Cardoni RL., Andersson R., Segura EL., Orné A. 1988. Role of Thelperinducer cells as well as natural Killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infections. Scand. J. Immunol., 28:573.

15. Hatcher FM., Kuhn RE. 1982. Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural Killer cells. Science, 218:295.

16. Schmunis, G.A., Szarfman, A., Langerbach, T., and Desouza, W. 1978. Induction of capping in blood stage trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* by human anti- *Trypanosoma cruzi* antibodies, Infectet. Immun. 20,567.

17. Kloetzel, J. and Drane, M.P., 1977. Presence of immunoglobulins on the surface of bloodstream *Trypanosoma cruzi* capping during differentiation in culture. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo., 19:397.

18. Krettli, A.U., and Eisen, H., 1980. Escape mechanisms of *Trypanosoma cruzi* from the host immune system, in seminaire INSERM: Relations Hote. Parasito Danzase afectivas parasitaire naturelles experimentales, Seillac, France, Jul.

19. Reed SG., Nathan CF., Dihl DL., ET AL. 1987. Recombinant granulocyte macrophage colony stimulanting facto activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hyrogen peroxide, comparison with interferon gamma. J. Exp. Med., 166:1734.
20. Okabe K., Kipnis TL., Calich VLG., Díasda Silva W. 1980. Cell mediated citotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. Y. Antibody dependet cell mediated citotoxicity to trypomastigote bloodstream forms. Clin. Immunol. Immunophatol., 16:344.
21. Zárate, L.G., Zárate, R.J., Tempelis, C.H. and Goldsmith, R.S. 1980. The biology and behavior of *Triatoma barberi* (Homiptera: Reduviidae) in México. I. Blood meal souerces and infection With *Trypanosoma cruzi*. J. Med. Eritomul. 17(2):103-116.
22. Alejandro-Aguilar, R.; Nogueta Torres, B.; Calvo-Mendez, M.L. y M. Cortés Jiménez. 1993. Estudio comparativo de la susceptibilidad de cinco especies de triatóminos (Insecta: Reduviidae) a la infección con *Trypanosoma cruzi*. Rev. Lat. Amer. Microbiol 35:201-206.
23. C.J. Schofield. 1985. Control of Chagas disease vectors. British Medical Bulletin. 41(2):187-194.
24. C.J. Schofield. 1994. Triatominae. Biología y Control. Eurocommunica Publications, U.K.

25. J.A. Vaughan and A.F. Azad. 1988. Passage of Host Immunoglobulin G From Blood Meal into Hemolymph of Selected Mosquito Species (Diptera: Culicidae). Vol. 25, No. 6., 471-475.
26. L. Hudson and V. Britten. 1985. Immune response to south american Trypanosomiasis and its relationship to Chagas' disease. *British Medical Bulletin*. 41(2):175-180.
27. Tay, J., Shenone, H., Sánchez, J.T., y L. Robert. 1992. Estado actual de los conocimientos sobre la enfermedad de chagas en la República Mexicana. *Bol. Chil. Parasitol.* 47:43-53.
28. Robert B. Tesh, Woan-Ru-Chen, and Debra Catuccio. Survival of Albumin, IgG, IgM, and Complement (C₃) in human blood after ingestion by *Aedes albopictus* and *Phlebotomus papatasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 39(1) 1988, p.p 127-130 (87-185) The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.
29. Jeremy P., Grlespie and Michael R. Kanost, Tinc Trenczek. 197. Biological Mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42. 611-43 1997 by Annual Reviews Inc. All right reserved.
30. D. Ben-Yakir, C. J. Fox, J. T. Homer, and R. W. Barker. 1987. Quantification of Host Immunoglobulin in the Hemolymph of Ticks. *J. Parasit.*, 73(3), pp. 669-671. American Society of Parasitologists 1987.

31. Rafael A. Cedillos, J. W. Torrealba, R. J. Tonn, W. Mosca y A. Ortegón. 1982. El xenodiagnostico artificial en la enfermedad de chagas. Bol of Sanit Panam 93(3).