



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Actividad de PO en *Meccus pallidipennis* y *Triatoma dimidiata* infectados con
*Trypanosoma cruzi***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

GUADALUPE FAVILA RUIZ



CIUDAD DE MÉXICO

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Abel Gutiérrez Ramos

VOCAL: Profesor: Beatriz Ruiz Villafán

SECRETARIO: Profesor: Any Laura Flores Villegas

1er. SUPLENTE: Profesor: José Cordero Hernández

2° SUPLENTE: Profesor: Julio Cesar Martínez Álvarez

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

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Any Laura Flores Villegas

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Margarita Cabrera Bravo

SUSTENTANTE:

Guadalupe Favila Ruiz

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina, UNAM con apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, proyectos: IN211613, “Estudio clínico y cardiológico en niños seropositivos a *Trypanosoma cruzi* en dos poblaciones de zonas endémicas de México” e IT200913, “Validación de métodos para la confirmación del diagnóstico de la infección de *T. cruzi* mediante el uso de marcadores biológicos específicos”. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

Lista de abreviaturas

- BCA. ácido bicinconfónico
- H-E. Tinción de Hematoxilina y eosina
- IMA. Intestino medio anterior
- IMP. Intestino medio posterior
- L-DOPA. L- dihidroxifenilalanina
- *M. pallidipennis*. *Meccus pallidipennis* (triatomino)
- MEB. Microscopía electrónica de barrido
- n5. Ninfas de quinto estadio
- p. a. posterior a la alimentación
- PAS. Tinción de ácido periódico de Schiff
- PO. Fenoloxidasa (Fenol natural)
- PO total (PO+proPO)
- proPO. Profenoloxidasa
- *T. dimidiata*. *Triatoma dimidiata* (triatomino)
- *T. cruzi*. *Trypanosoma cruzi*

ÍNDICE

1	Resumen	1
2	Introducción	2
	2.1 Enfermedad de Chagas.....	2
	2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
	2.2.1 Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	9
	2.3 Transmisores.....	11
	2.3.1 Sistema digestivo en triatominos.....	17
	2.3.1.1 Membrana perimicrovellosa en triatominos.....	18
	2.3.2 Sistema circulatorio en triatominos.....	19
	2.4 Sistema inmune de triatominos.....	21
3	Antecedentes	23
	3.1 Estudios de PO en triatominos.....	23
	3.2 Estudios de PO en otros insectos.....	27
4	Justificación	29
5	Hipótesis y objetivos	30
	5.1 Hipótesis.....	30
	5.2 Objetivo general.....	30
	5.3 Objetivos específicos.....	30
6	Diseño experimental	31
7	Metodología	33
	7.1 Insectos.....	33
	7.2 Origen de las cepas de <i>T. cruzi</i>	33
	7.3 Infección de triatominos.....	34
	7.4 Cuantificación de parásitos.....	35
	7.4.1 Triatominos utilizados para extracción de hemolinfa.....	35
	7.4.2 Triatominos utilizados para extracción de IMA.....	35
	7.5 Hemolinfa.....	35

7.5.1 Extracción y tratamientos.....	35
7.5.2 Medición de PO natural y PO total en hemolinfa.....	36
7.5.3 Actividad enzimática de PO natural.....	36
7.5.4 Actividad enzimática de PO total.....	37
7.6 Intestino Medio Anterior (IMA).....	37
7.6.1 Extracción y tratamiento.....	37
7.6.2 Medición de PO natural y PO total en IMA.....	39
7.6.3 Actividad enzimática de PO natural.....	39
7.6.4 Actividad de PO Total.....	39
7.7 Unidades de actividad enzimática.....	39
7.8 Tinción de IMA con hematoxilina-eosina (H-E) y ácido peryódico de Schiff (PAS).....	40
7.9 Microscopia electrónica de barrido (MEB) de IMA.....	40
8 Análisis estadístico.....	41
9 Resultados.....	42
9.1 Confirmación de infección con <i>T. cruzi</i> en triatomos.....	42
9.2 Actividad de PO natural y PO total en hemolinfa de ninfas de <i>M. pallidipennis</i> en los días 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28 p.a.....	46
9.3 Actividad de PO natural y PO total en IMA de ninfas de <i>M. pallidipennis</i> en los días 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28 p.a.....	48
9.4 Actividad de PO natural y PO total en IMA de ninfas de <i>M. pallidipennis</i> , <i>T. dimidiata</i> y adultos de <i>M. pallidipennis</i> en el día 9 p.a.....	51
9.5 Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-eosina y PAS.....	54
9.6 Microscopia electrónica de barrido (MEB).....	57
10 Discusión.....	58
11 Conclusiones.....	64
12 Perspectivas.....	65
13 Referencias bibliográficas.....	66

14 **Anexo**.....75

1. Resumen

La respuesta inmune en insectos está integrada por dos sistemas, el humoral y el celular. Dentro del sistema inmune humoral participa el precursor profenoloxidasa (proPO), el cual se encuentra en la hemolinfa y tracto digestivo de los triatominos. Esta proenzima es activada por componentes de la pared celular de patógenos para convertirse en fenoloxidasa (PO) y participa en reacciones de defensa contra patógenos como la melanización.

Los objetivos de este estudio fueron determinar la actividad enzimática de la PO activada de forma natural por *Trypanosoma cruzi* en el triatomino y de la PO total inducida artificialmente con α -Quimiotripsina en hemolinfa e intestino medio anterior (IMA) de ninfas de quinto estadio (n5) de *M. pallidipennis* en los días 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28 posteriores a la alimentación (p. a.) con ratones infectados, en el día 9 p. a. se presentó la actividad más significativa en IMA, se comparó con otra especie (ninfas de *Triatoma dimiata*) y adultos de *M. pallidipennis*. Se identificaron cambios morfológicos en IMA de ninfas de *M. pallidipennis* con hematoxilina-eosina (H-E), ácido peryódico de Schiff (PAS) y microscopía electrónica de barrido (MEB).

En la hemolinfa de ninfas de *M. pallidipennis* infectadas con la cepa ITRI/MX/12/MOR de *T. cruzi*, se observó una respuesta sistémica en la actividad de la PO natural y total; en el IMA sólo se identificó actividad significativa de la PO natural en el día 9 p. a. ($p < 0.05$), a diferencia de la PO total. La cantidad de PO total en hemolinfa e IMA fue mayor que la PO natural en ninfas y adultos, lo que indica que existe proPO que no es activada durante la infección con *T. cruzi*. En la comparación de la actividad de PO natural entre ninfas y adultos de *M. pallidipennis* no se encontraron diferencias significativas.

La actividad de PO natural en IMA en ninfas, fue más alta en *T. dimidiata* que en *M. pallidipennis*, lo cual podría estar influido por la especie del triatomino, la cepa de *T. cruzi* y la cantidad de parásitos.

Se identificó el desarrollo de la membrana perimicrovellosa, la adhesión y el establecimiento de *T. cruzi* en IMA de ninfas de *M. pallidipennis*.

Se concluye que *T. cruzi* activa la PO en hemolinfa en n5 de *M. pallidipennis*, lo cual indica una respuesta sistémica, ya que este lno es un sitio en donde se desarrolla el parásito. En IMA en el día 9 p. a. se observó que la actividad de PO influye en la cantidad de parásitos presentes, esto se correlaciona con cambios en la membrana perimicrovellosa y la adherencia de parásitos a ésta.

2. Introducción

2.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es el tercer padecimiento tropical más importante a nivel mundial respecto a mortalidad y morbilidad y es clasificada como una enfermedad olvidada de acuerdo a la OMS (OMS, 2013; Villa-Villanueva *et al.*, 2005). Esta enfermedad es endémica de países latinoamericanos, así como de México (WHO, 2014).

En la actualidad se estima que 10 millones de personas están infectadas crónicamente, lo cual causa una gran carga de incapacidad laboral y billones de costos anuales (Rassi *et al.*, 2010). Por otra parte, se estima que más de 25 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la enfermedad (Pereira-Marques *et al.*, 2013).

Es una enfermedad zoonótica, transmitida a humanos y a más de 150 especies de animales domésticos (como perros, gatos y cobayos) y animales silvestres (Rassi *et al.*, 2010). Es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), el cuál es transmitido al humano a través de las heces de insectos hematófagos pertenecientes a la subfamilia Triatominae (Garcia y Azambuja, 1991). Cuando se alimentan, los triatominos defecan sobre el hospedero y eliminan al parásito *T. cruzi* (Schofield, 1994). Una vez fuera del triatomino el parásito puede entrar al huésped a través de mucosas, por la piel cuando presenta heridas o por la misma lesión ocasionada por la picadura del triatomino (Schofield, 1994).

Durante el ciclo de vida de *T. cruzi*, se presentan diferentes formas del parásito en el huésped mamífero como son: tripomastigotes sanguíneos no replicativos y amastigotes replicativos intracelulares, mientras que en el triatomino (vector) se presentan epimastigotes replicativos y tripomastigotes metacíclicos infectivos (Rassi *et al.*, 2010).

Los triatominos adquieren al parásito después de alimentarse de la sangre de mamíferos infectados; una vez infectados, permanecen con el parásito durante toda su vida (Schofield, 1994).

La transmisión por medio del vector se limita a las áreas endémicas. En las áreas endémicas y en las no endémicas se han reportado otras vías de infección como: transfusión sanguínea, trasplante de órganos y medula ósea, materno-infantil (vertical), oral y accidentes en el laboratorio (WHO, 2002; Bern, 2015).

Aun con los programas de control y vigilancia epidemiológica en países endémicos de América latina, esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial; ésto debido a varios factores como el surgimiento de nuevos brotes de la enfermedad, la resistencia a insecticidas por algunas especies de triatominos, la disponibilidad del tratamiento y a las migraciones de personas infectadas con *T. cruzi* hacia países no endémicos como Estados Unidos, Europa y regiones del Pacífico occidental (Germano *et al.*, 2010; Schmunis *et al.*, 2010).

Se estima que fuera de América latina hay más de 400,000 personas con la enfermedad, siendo Estados Unidos el país más afectado (Figura 1) (Steverding, 2014).

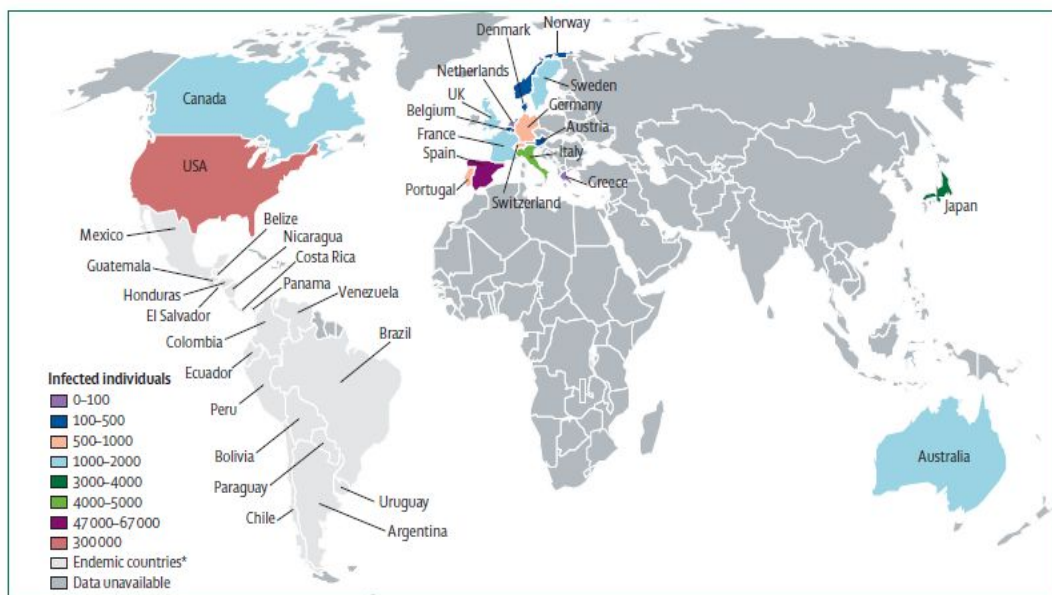


Figura 1. Estimación de inmigrantes infectados con *Trypanosoma cruzi* que habitan en países no endémicos (Tomado de Rassi *et al.*, 2010).

La enfermedad de Chagas tiene una fase aguda, la cual se presenta después de 6 a 10 días de la infección con el parásito, cursa generalmente asintomática y puede durar de 4 a 8 semanas. El único síntoma específico y observable en esta fase es un edema inflamatorio que se presenta en el sitio de entrada del parásito en el huésped, si entra en la zona del ojo se desarrolla una hinchazón periorbital unilateral conocida como signo de Romaña (Figura 2); si el parásito entra por cualquier zona del cuerpo se produce una induración, conocida como chagoma de inoculación (Figura 3) y la sintomatología cuando está presente suele ser moderada e inespecífica (fiebre, malestar, agrandamiento de hígado, bazo y ganglios linfáticos) (Rassi *et al.*, 2010; Bern *et al.*, 2015).



Figura 2. Signo de Romaña. Cortesía de la Dra. Paz María Salazar Schettino, Dra. Martha Bucio Torres, Facultad de Medicina. Tomado de: www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html

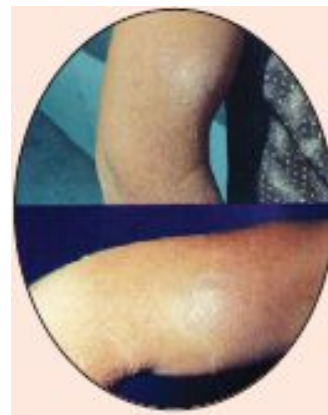


Figura 3. Chagoma de inoculación. Tomado de Rassi *et al.*, 2010.

Los síntomas de esta fase se resuelven espontáneamente en el 90% de los pacientes, incluso sin necesidad de medicamentos contra *T. cruzi* (Rassi *et al.*, 2010). El 60-70% cursan infectados y no desarrollan patología, presentan anticuerpos anti-*T. cruzi*, electrocardiograma (ECG) normal y radiografías simples de tórax, esófago y/o colon normales (Rassi *et al.*, 2010).

Se ha reportado muerte en 5-10% de los casos sintomáticos, ya sea como consecuencia de una miocarditis severa, meningoencefalitis o ambas (Figura 4) (Rassi *et al.*, 2010).

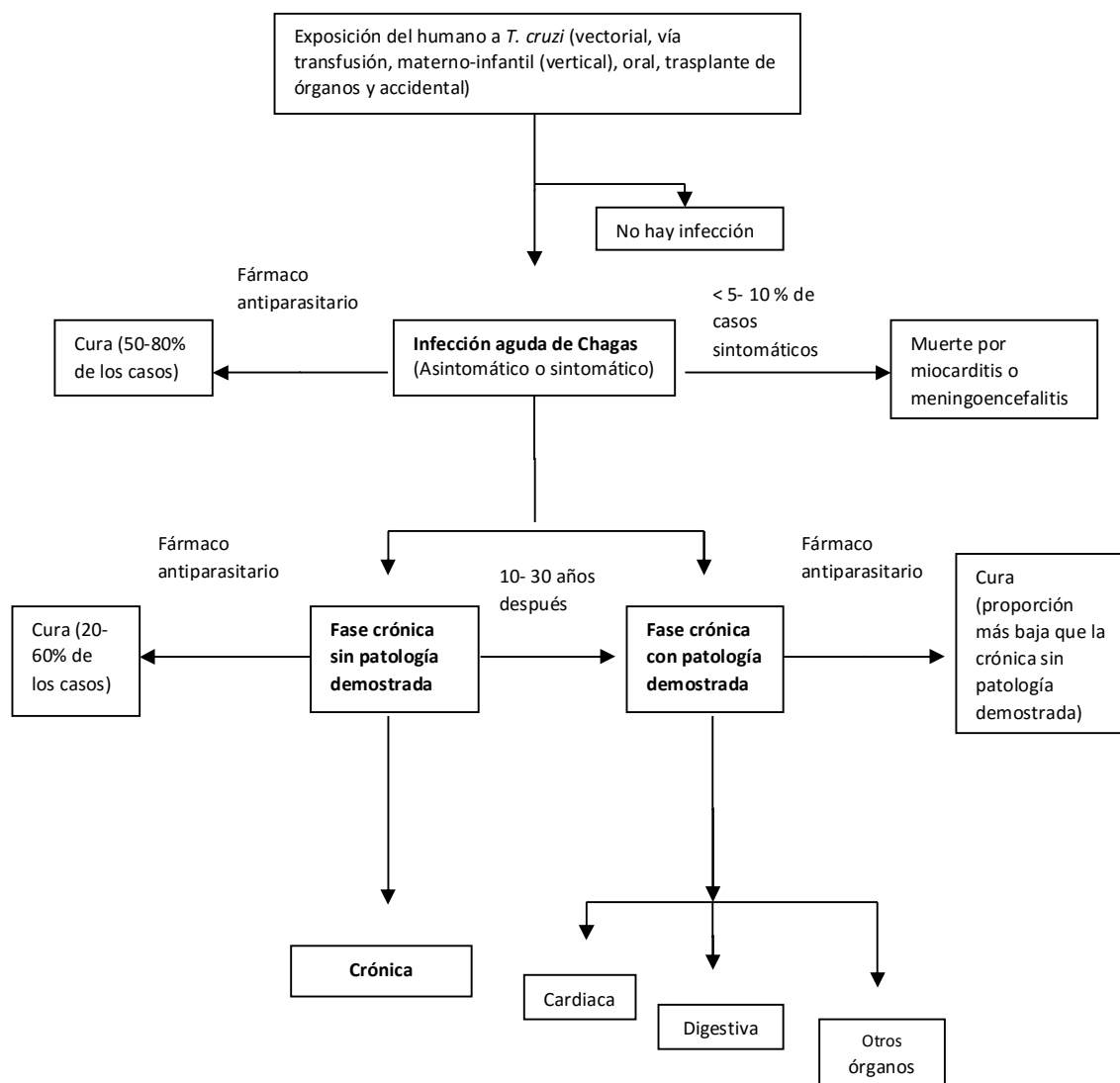


Figura 4. Fases de la enfermedad de Chagas en el hombre. Modificado de Rassi *et al.*, 2010.

En la fase crónica el 30-40% de los pacientes la desarrollará y estará asociada con daño a órganos (Rassi *et al.*, 2010). Algunos pacientes presentarán después de 10 a 30 años de la infección inicial, algunas manifestaciones y daño cardiaco como dilatación del corazón (cardiomiopatía chagásica crónica) y/o aparato digestivo (megaesófago y megacolón) (Rassi *et al.*, 2010; Steverding, 2014).

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la fase aguda se basa en la identificación o el aislamiento de *T. cruzi* mediante el examen directo en fresco, frotis, gota gruesa, microstrout, inoculación en animales, cultivo en medio bifásico de agar sangre (NNN), xenodiagnóstico e histopatología (Salazar-Schettino *et al.*, 1999).

El diagnóstico en la fase crónica sin y con patología aparente se realiza con pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*. La OMS señala que para la confirmación se debe demostrar reactividad en dos pruebas serológicas de diferente principio, las técnicas recomendadas son ELISA indirecta (inmunoensayo enzimático), IFI (inmunofluorescencia indirecta), HAI (hemaglutinación indirecta) y en caso de existir discordancia se utiliza una cuarta técnica como el Western-blot (WHO, 2005).

Respecto al tratamiento farmacológico de esta enfermedad solo hay dos medicamentos disponibles, el Benznidazol, el cual es producido actualmente por el laboratorio LAFEPE (Laboratorio Farmacéutico do Estado de Pernambuco) en Brasil y Nifurtimox por Bayer (González *et al.*, 2014).

El Benznidazol es considerado primera línea de tratamiento ya que es mejor tolerado por los pacientes y existen más evidencias de su eficacia en comparación con el Nifurtimox (Bern, 2011; Bern, 2015). Los efectos secundarios de este medicamento pueden ser dermatológicos (erupción cutánea, edema generalizado, fiebre, adenopatías, mialgia y artralgia), hematológicos (depresión de medula ósea con trombocitopenia purpura y agranulocitosis) y de compromiso neurológico (polineuropatía, parestesia y polineuritis periférica) (Apt-B *et al.*, 2008).

Los efectos secundarios del Nifurtimox pueden incluir pérdida de peso, anorexia, náuseas, vomito, dolor abdominal, diarrea, dermatitis, compromiso del SNC, parestesias y psicosis (Apt-B *et al.*, 2008). Ambos medicamentos están contraindicados para personas embarazadas, y aquellas con insuficiencia hepática o renal (Apt-B *et al.*, 2008).

Respecto a vacunas para prevenir la enfermedad de Chagas, aun no se cuenta con alguna adecuada (González *et al.*, 2014).

2.2 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoario hemoflagelado que pertenece al orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae. Este parásito se encuentra circulando entre los humanos, los insectos vectores, reservorios selváticos y animales domésticos (Guzmán- Marín *et al.*, 1999).

T. cruzi presenta las formas de:

Tripomastigote metacíclico. Mide de 17 a 22 μm de largo, tiene forma alargada en forma de “C” ó “S”, presenta un flagelo que corre hacia la parte anterior en una membrana ondulante, un núcleo central y un cinetoplasto grande localizado en su extremo posterior. Este estadio es infectante y no es replicativo. Se encuentra únicamente dentro del triatomino y se diferencia en el recto (Figura 5) (Guzmán-Marín *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2010a; Rassi *et al.*, 2010).

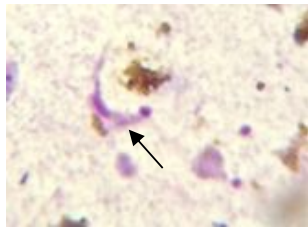


Figura 5. Tripomastigote metacíclico (flecha) en heces de triatomino. Tinción de Giemsa (100 X). Lab. Biología de Parásitos, Fac. de Medicina, UNAM

Tripomastigote sanguíneo. La morfología es semejante al tripomastigote metacíclico. No es replicativo, se encuentra en la sangre de humanos o ratones infectados experimentalmente. Así se pueden apreciar tripomastigotes en forma de “C” ó “S (Figura 6 y 7) (Carrada-Bravo, 2004).

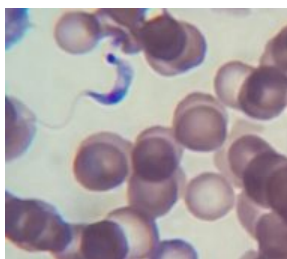


Figura 6. Tripomastigote sanguíneo de *T. cruzi*. En la imagen se puede apreciar un tripomastigote con su forma típica de “C”, el cual presenta un núcleo oval, cinetoplasto voluminoso subterminal y un flagelo libre, anterior. Tinción Giemsa (100 X). Lab. Biología de Parásitos, Fac. de Medicina, UNAM

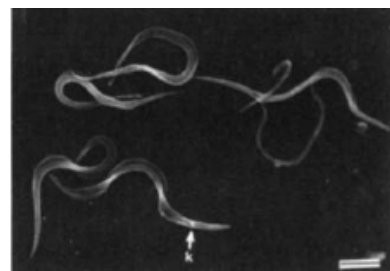


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido con Tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*. En la imagen se puede apreciar el cinetoplasto en la región posterior del parásito–flecha (Garcia v Azambua. 1991)

Epimastigote. Mide 6 -15 μm , tiene forma fusiforme, presenta un flagelo que está localizado entre el núcleo y la parte anterior, va a todo lo largo formando una membrana ondulante corta y el cinetoplasto se encuentra cercano a la parte anterior del núcleo que está localizado en el centro; presenta división binaria longitudinal. Se encuentra en el intestino del vector y en cultivos (Figura 8 y 9) (Guzmán-Marín *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2010a).



Figura 8. Epimastigote de *T. cruzi* (flecha) en heces de triatomino (40X). Lab. Biología de Parásitos, Fac. de Medicina, UNAM



Figura 9. Microscopía electrónica de barrido con epimastigotes de *T. cruzi*. Se aprecian epimastigotes adheridos al epitelio del IMA de un triatomino (Garcia *et al.*, 2007)

Amastigote. Mide 2 a 5 μm , es redondo u oval, sin flagelo, se multiplican por fisión binaria y forman nidos, se encuentran en las células del huésped y/o cultivos celulares (Figura 10 y 11) (Carrada-Bravo, 2004; Garcia *et al.*, 2010a; Rassi *et al.*, 2010).

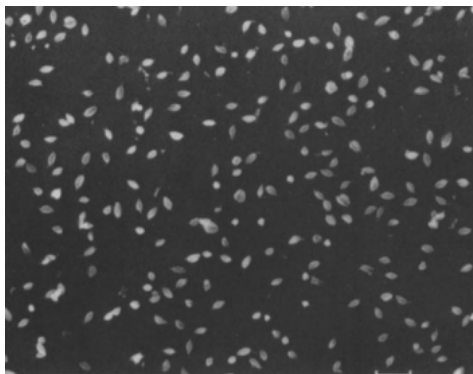


Figura 10. Amastigotes observados con microscopía electrónica de barrido (Ley *et al.*, 1988)

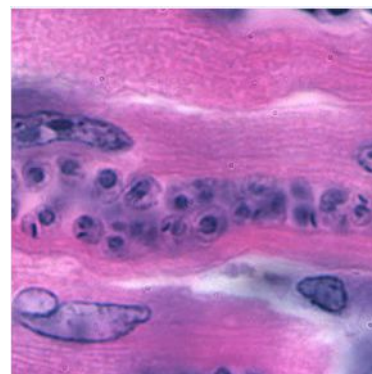


Figura 11. Amastigotes en tejido de corazón. Tinción de hematoxilina y eosina. Recuperado de <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/>

2.2.1 Ciclo biológico de *T. cruzi*

Durante el ciclo de vida, *T. cruzi* experimenta varias etapas de transformación en el huésped mamífero y en el insecto vector. En el huésped mamífero se identifican tripomastigotes sanguíneos (no replicativos) y amastigotes intracelulares (replicativos); en el insecto vector, se identifican epimastigotes (replicativos) y tripomastigotes metacíclicos (infectivos) (Figura 12) (Rassi *et al.*, 2010).

El desarrollo de *T. cruzi* en el vector inicia cuando éste se alimenta de la sangre de un mamífero infectado e ingiere tripomastigotes del torrente sanguíneo. Los tripomastigotes en el intestino medio anterior (IMA), se diferencian en epimastigotes, llevan a cabo su división repetidamente mediante fisión binaria y se fijan a la membrana perimicrovellosa de las células intestinales de este sitio y del intestino medio posterior (IMP). En el recto se adhieren a la capa cerosa de la cutícula rectal por medio de interacciones hidrofóbicas y ahí se diferencian en tripomastigotes metacíclicos (forma infectante), los cuales son eliminados junto con las heces y orina del insecto vector después de haberse alimentado del hospedero (Garcia *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2010a).

Cuando los tripomastigotes metacíclicos salen con las heces y penetran al hospedero mamífero, los tripomastigotes metacíclicos son fagocitados e invaden células nucleadas, transformándose en amastigotes para poder multiplicarse intracelularmente y transformarse en tripomastigotes sanguíneos, quienes lisan la célula huésped para circular por el torrente sanguíneo e infectar nuevas células (Garcia *et al.*, 2010a).

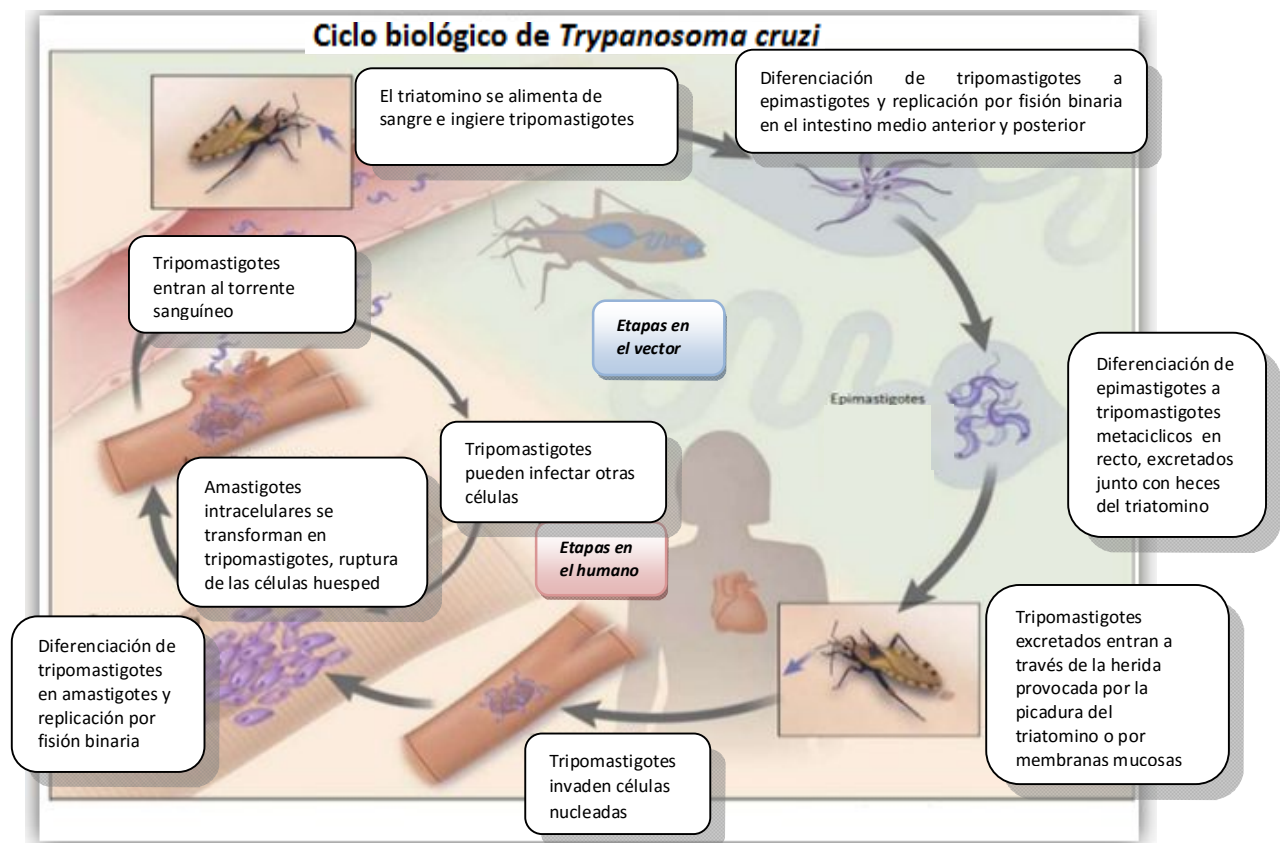


Figura 12. Ciclo biológico de *T. cruzi*. El ciclo inicia cuando el triatomino se alimenta de la sangre de un mamífero infectado e ingiere tripomastigotes. En el insecto pasan al IMA e IMP, donde se transforman en epimastigotes y se replican por fisión binaria, se adhieren a la cutícula rectal y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, los cuáles son la forma infectante y se eliminan junto con las heces y orina del triatomino (García *et al.*, 2007). La forma infectante penetra al huésped, donde los tripomastigotes metacíclicos invaden células nucleadas, transformándose en amastigotes para replicarse por fisión binaria. Los amastigotes posteriormente se transforman en tripomastigotes y lisan la célula huésped para circular por el torrente sanguíneo e infectar nuevas células (García *et al.*, 2010a; Modificado de Bern *et al.*, 2011).

2.3 Transmisores

Los insectos que transmiten a *T. cruzi* son chinches hematófagas que pertenecen a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae y orden Hemiptera. Esta subfamilia contiene más de 130 especies, dentro de los cuales hay varios vectores potenciales para transmitir al parásito (García *et al.*, 2007).

Los triatominos están presentes desde el sur de Estados Unidos y a través de América Latina hasta el sur de la Patagonia (García *et al.*, 2007). En México, han sido reportadas 32 especies de triatominos transmisores de *T. cruzi*. De éstas 19 pertenecen al género *Triatoma* y seis al género *Meccus*, dos especies al género *Pastrongylus* y una especie de cada uno de los siguientes géneros: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma* y *Rhodnius* (Salazar-Schettino *et al.*, 2010). Los vectores de *T. cruzi*, se clasifican en intradomiciliados, peridomiciliados y silvestres de acuerdo a su comportamiento. Tanto los intradomiciliados como los peridomiciliados tienen una gran importancia en la transmisión del parásito por la relación estrecha que tienen con la vivienda humana (Carcavallo *et al.*, 1997).

Los intradomiciliados se establecen dentro de las viviendas (techo, grietas de las paredes, debajo de la cama o colchón, entre otros), se alimentan del humano y/o animales domésticos. Los peridomiciliados se encuentran alrededor de la vivienda y se establecen en refugios de animales domésticos, gallineros, corrales y/o depósitos de granos donde se encuentran roedores, baúles, cajones o depósitos poco removidos, estos sitios ofrecen fuentes variadas de alimentación (gallinas, aves, perros y roedores) para los triatominos. Los silvestres, se encuentran en hábitats selváticos en nidos de aves, madrigueras de zarigüeyas, montones de rocas, árboles huecos, nidos de roedores y cuevas con murciélagos. (Schofield, 1994; Carcavallo *et al.*, 1997; Crocco *et al.*, 2002).

La dispersión de los triatominos se presenta por el transporte de los insectos en la ropa, equipaje o vehículos de las personas y mediante el transporte de huevos y ninfas entre las plumas de aves que realizan migraciones (Schofield, 1994). En varios países, la población conoce a los triatominos con distintos nombres comunes (Tabla 1).

Tabla 1. Nombres comunes de triatominos en diferentes países

(Modificado de Schofield *et al.*, 2009)

País	Nombre
Estados Unidos de América	Kissing bug, cone-nose bug, big bedbug, China bug, red- banded cone- nose
México	Chinche besucona, chinche hocicona, chinche picuda, chinchona, pik
Belice	Bush chinche
América Central	Chinche besucona, talaje, chuluyu, polvoso, chinche bebe sangre
Cuba	Sangrejuela
Colombia	Pito, chinche picuda
Venezuela	Chipo
Ecuador	Chinchorro
Perú	Chirimacha
Paraguay	Chichá guazú, itchajuponja, sham bui tá, timbucú
Bolivia	Vinchuca, uluchi, timbucú
Chile	Vinchuca
Argentina	Vinchuca
Uruguay	Vinchuca
Brasil	Barbeiro, furão, chupão, bicudo, fincão, cascudo, procotó, percevejão, vunvucum, josipak

Durante su desarrollo los triatominos pasan por el estadio de huevo, después por 5 estadios ninfales y adultos (machos y hembras). Los huevos son operculados, blancos y conforme se desarrolla el embrión se tornan rosados. Las ninfas que acaban de emerger, son blandas y

naranjas, quienes se vuelven oscuras conforme pasa el tiempo y se endurece su cutícula (Figura 13 -15) (Schofield, 1994).

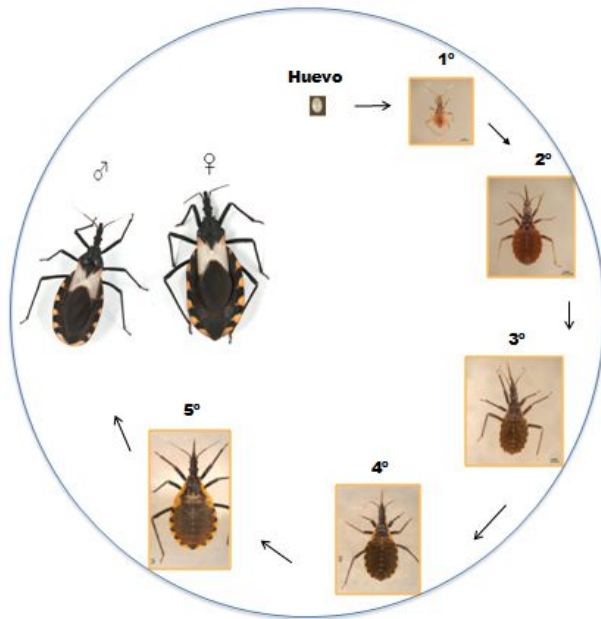


Figura 13. Ciclo biológico de *M. pallidipennis*. Se pueden apreciar todas las etapas de huevo a adultos. Lab. Biología de Parásitos, Fac. de Medicina, UNAM



Figura 14. *M. pallidipennis* ninfa de quinto estadio recién mudada. Lab. Biología de Parásitos, Fac. de Medicina, UNAM



Figura 15. Ciclo biológico de *T. dimidiata*. Se aprecian estadios de huevo hasta adultos. Lab. Biología de Parásitos, Fac. de Medicina, UNAM

Estos insectos en general, tienen hábitos nocturnos de alimentación y para orientarse hacia su fuente alimenticia lo hacen principalmente por la temperatura y el CO₂ que éstos liberan; el desarrollo de huevo a adulto dura de 3 a 6 meses y pueden vivir de 6 meses hasta 2 años dependiendo de la especie y frecuencia de alimentación (Schofield, 1994; Gourbière *et al.*, 2012).

El tamaño es variable, la más pequeña es *Alberprosenia goyovargasi* de Venezuela cuyos adultos miden 5 mm y el más grande es *Dipetalogaster máxima* de México, el adulto mide hasta 45 mm. El cuerpo es marrón o negro y varias especies presentan bandas de diferentes colores como amarillo, naranja, rosa o rojo. Es más difícil de determinar especie en los estadios ninfales (Schofield, 1994). Los triatomíneos suelen presentarse con mayor frecuencia en zonas rurales donde hay mucha condición de pobreza y las casas están hechas de ladrillos de adobe que ofrecen escondites ideales para los insectos (Schaub *et al.*, 2011).

Meccus pallidipennis

En México, es una de las especies más importantes involucradas en la transmisión de *T. cruzi*, debido a su amplia distribución geográfica en 13 estados de la República mexicana (Colima, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y Zacatecas), presenta índice de infección natural elevado y tiempo de defecación corto, 4 minutos o menos, lo que indica su alto potencial para poder transmitir el parásito *T. cruzi* a la población humana (Martínez-Ibarra *et al.*, 2004; Salazar-Schettino *et al.*, 2010). Las hembras de esta especie en la etapa adulta miden de 32 a 35 mm y los machos de 31 a 34 mm, se encuentra desde 200 a 1580 msnm, es un vector predominantemente peridomiciliado, las bardas de piedra son un ecotópo importante (Figura 16) (Vidal-Acosta *et al.*, 2000; Salazar-Schettino *et al.*, 2010; Benítez-Alva *et al.*, 2012).

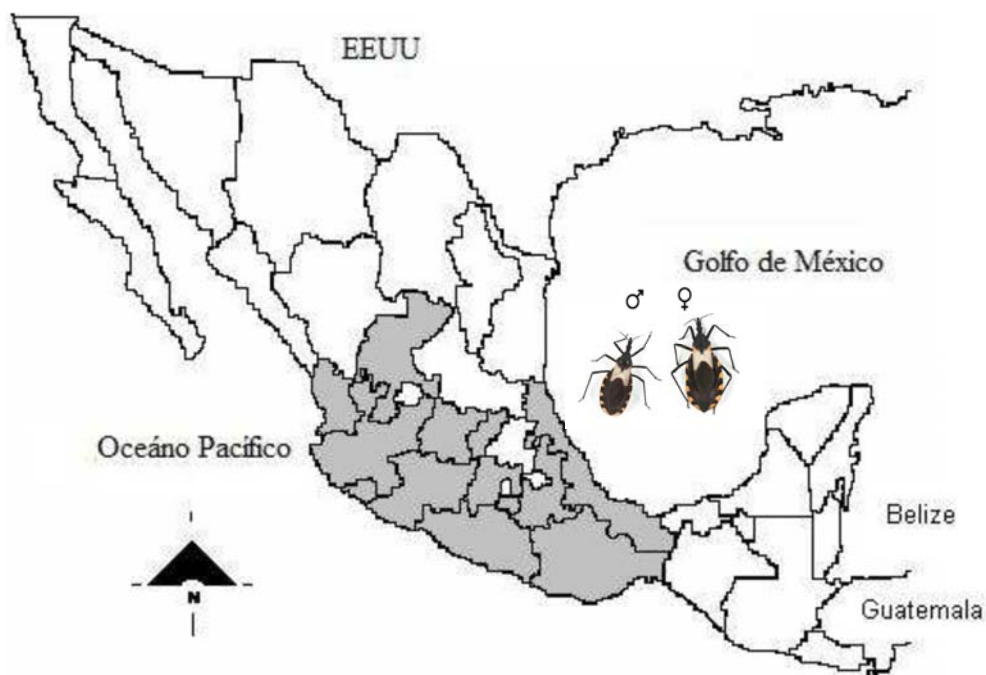


Figura 16. Mapa de México mostrando la presencia de *Meccus pallidipennis* en 13 estados de la República mexicana. Modificado de Salazar-Schettino *et al.*, 2010.

Triatoma dimidiata

Triatoma dimidiata presenta una gran variación morfológica y es considerada como uno de los principales vectores de la enfermedad de Chagas en América central y el sur de México (Hernández *et al.*, 2010). Debido a las variaciones de color, tamaño y comportamiento biológico, los taxónomos consideran que podría ser mejor aceptada como un complejo de especies (Dorn *et al.*, 2006; Dorn *et al.*, 2009). Su importancia epidemiológica radica en su capacidad para colonizar viviendas, utilizar varias fuentes alimenticias, presentar alta longevidad y gran capacidad de dispersión (Hernández *et al.*, 2010).

Esta especie ha sido reportada en diferentes estados de la República Mexicana como Campeche, Colima, Chiapas, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán. Las hembras miden de 24.5 a 35.0 mm y los machos de 24.4 a 32.0 mm, presenta una gran diversidad en cuanto a su hábitat, se ha reportado en ecotopos selváticos, peridomésticos y domésticos (Figura 17) (Dorn *et al.*, 2006; Salazar-Schettino *et al.*, 2010). En Chiapas está

ubicada dentro de las 5 especies más importantes y se encuentra intradomiciliada. En las casas suele encontrarse debajo de las camas y en la esquinas formadas por el suelo y las paredes (Salazar-Schettino *et al.*, 2010).

En Yucatán, se reportó que la presencia de gallineros en las granjas aumenta las probabilidades de encontrar a *T. dimidiata* infectada con *T. cruzi*, debido a que en estos lugares se encuentra una fuente alimenticia importante (Koyoc-Cardena *et al.*, 2015). El índice de infección natural reportado en la República Mexicana varía entre 8 y 100% (Benítez- Alva *et al.*, 2012; Koyoc-Cardena *et al.*, 2015).

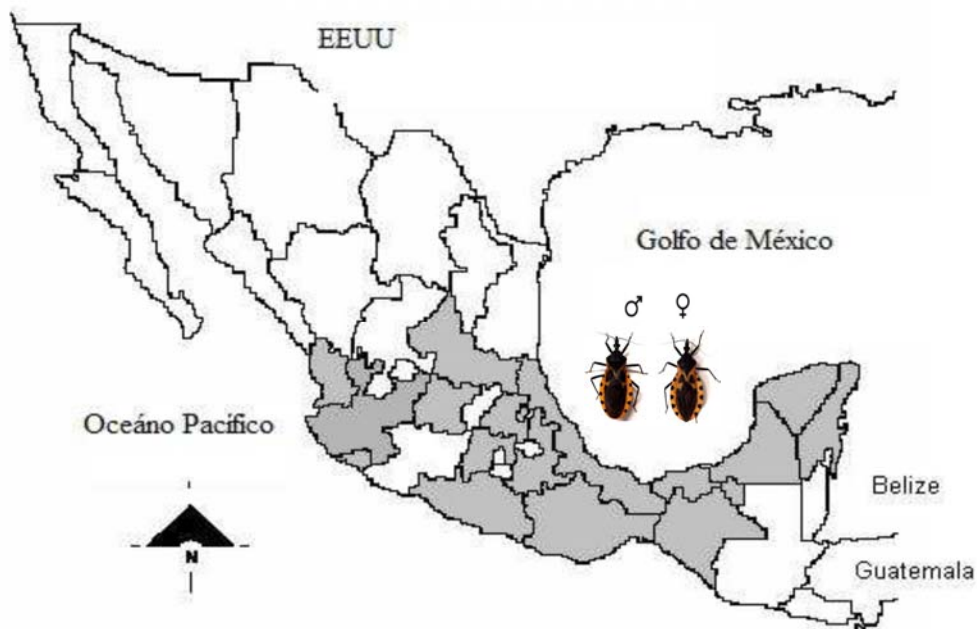


Figura 17. Mapa de México mostrando la distribución de *Triatoma dimidiata* en 16 estados de la República mexicana. Modificado de Salazar-Schettino *et al.*, 2010.

2.3.1. Sistema digestivo en triatominos

Los cinco estadios ninfales y los adultos pueden ingerir de 6-12 veces su peso corporal de sangre (Kollien y Schaub, 2000). En el caso de las ninfas de quinto estadio de convivencia estrecha con el humano (intradomiciliadas), ingieren una mayor cantidad de sangre entre 200 a 1000 mg. En condiciones de laboratorio donde las ninfas se encuentran en espacios reducidos en comparación con su hábitat natural se ha observado que estos insectos al no alcanzar al huésped vertebrado (ratón o conejo), algunos se alimentan de otras ninfas (Schofield, 1994). Estos insectos presentan anticoagulantes en glándulas salivales y estómago, lo que coadyuva a prevenir la coagulación de la sangre ingerida (Kollien y Schaub, 2000). Los triatominos pueden estar en un periodo de inanición de hasta por más de 12 meses, lo que dependerá de la especie, estadio de desarrollo y clima (Kollien y Schaub, 2000).

El tracto digestivo de los triatominos se divide en intestino medio anterior (IMA), intestino medio posterior (IMP) y recto (Figura 18) (Kollien y Schaub, 2000).

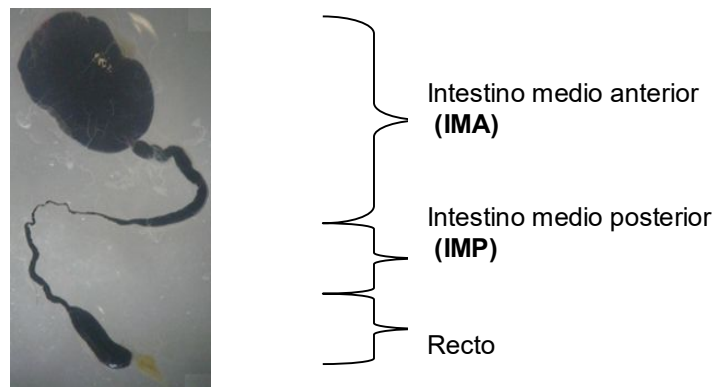


Figura 18. Principales regiones en el intestino de *M. pallidipennis*. Lab. Biología de Parásitos, Fac. de Medicina, UNAM

En los triatominos se ha descrito que la digestión es un proceso muy lento, por ejemplo en el caso de *T. infestans* dura 14 días. La sangre permanece almacenada en el estómago (parte del IMA) en donde varias enzimas actúan sobre los carbohidratos y las hemolisinas para lisar a los eritrocitos. Pequeñas cantidades de la sangre ingerida pasan al intestino medio posterior (IMP) para absorberse; posteriormente, los remanentes de la sangre digerida son almacenados en el

saco rectal para expulsarse en la siguiente deyección (Schofield, 1994; Kollien y Schaub, 2000; Schaub *et al.*, 2011).

En comparación con otros insectos hematófagos (mosquitos y piojos) que tienen un pH intestinal alcalino y digieren la sangre principalmente por serin proteasas, tripsinas y quimiotripsinas; los triatominos, presentan un pH ácido en su lumen intestinal y la digestión la realizan principalmente por tres tipos de catepsinas (Schaub *et al.*, 2011).

Debido a que los triatominos son insectos estrictamente hematófagos, no pueden obtener todos los nutrientes necesarios para su adecuado desarrollo y crecimiento, por lo que bacterias simbiotas extracelulares presentes en su intestino, les proporcionan vitaminas y otros nutrientes. Estas bacterias simbiotas las obtienen durante su primer estadio ninfal por coprofagia de heces de otros triatominos (Eichler y Schaub, 2002; Rodríguez *et al.*, 2007).

Cuando los triatominos se alimentan, deyectan, ésto debido a que durante la alimentación hay una liberación de hormonas diuréticas. Se presenta transporte de iones y agua en las paredes del estómago y la hemolinfa dentro de los túbulos de Malpighi hasta llegar al recto. Lo que deyectan primero, generalmente es el remanente de la digestión, el cual es marrón oscuro y después gotas de orina amarilla con gran cantidad de esferas de ácido úrico (Kollien y Schaub, 2000).

2.3.1.1 Membrana perimicrovellosa en triatominos

Los hemípteros se caracterizan por tener una membrana perimicrovellosa intestinal (MPM), la cual comprende desde la base de las microvellosidades hasta el lumen intestinal. Su importancia radica en que permite el establecimiento y desarrollo del parásito *Trypanosoma cruzi*. Su composición y desarrollo depende de factores relacionados a la dieta (Gutiérrez-Cabrera *et al.*, 2014), ya que conforme transcurre el tiempo de alimentación se observan cambios en las células epiteliales del intestino medio.

Se ha observado que en insectos sin alimentación, las células del intestino medio muestran células epiteliales conectadas unas con otras y libres de una MPM intestinal evidente. A diferencia de insectos con más tiempo de alimentación (15 días) donde se observa la membrana perimicrovellosa intestinal completamente desarrollada y cubriendo las microvellosidades, por lo tanto, el proceso de alimentación es importante en la formación de esta membrana.

La absorción de nutrientes depende de esta membrana intestinal, su composición es de lipoproteínas, glicoconjugados y moléculas de unión a carbohidratos. Actúa como una barrera física y fisiológica para enzimas involucradas en proceso de absorción y digestión, sus funciones son permeabilidad selectiva y absorción de nutrientes.

En la superficie apical del epitelio del intestino medio, la MPM cubre la membrana microvellosa de las células epiteliales, llena el espacio entre las microvellosidades y se extiende dentro del lumen intestinal. En *Rhodnius prolixus* la MPM se hace más evidente en el día 10 posterior a la alimentación, por lo tanto el desarrollo de esta membrana en *R. prolixus* depende de la distensión abdominal del insecto, la ingesta de sangre, de factores humorales y hormonales (Gutiérrez-Cabrera *et al.*, 2014).

En la MPM existen diferentes moléculas de unión de glicoconjugados y carbohidratos que están asociadas con la interacción con patógenos. De esta forma también la MPM actúa como un sitio de adhesión para los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, un paso esencial para el establecimiento del parásito en el insecto vector (García y Azambuja, 2004).

2.3.2 Sistema circulatorio en triatominos

Los insectos cuentan con un sistema circulatorio abierto, en el cual su sangre (hemolinfa) circula por el hemocele (cavidad interna) y baña todos sus tejidos y órganos. En ellos, no existen vasos especializados de conducción como en el caso de los sistemas circulatorios cerrados de los vertebrados, donde encontramos vasos especiales como arterias, venas y vasos capilares (Audesirk *et al.*, 2003; De la Cruz, 2006).

La hemolinfa está formada por células nucleadas, llamadas hemocitos, los cuales son semejantes en cuanto a sus funciones a los glóbulos blancos de los vertebrados, ya que participan en los sistemas de defensa del organismo. Los hemocitos en los insectos tienen un papel importante en la respuesta inmune celular participando en la fagocitosis, encapsulación, melanización y liberación de componentes del sistema profenoloxidasa. Los hemocitos también participan de forma importante en la coagulación de la hemolinfa, otra función importante de ésta es la de transporte de sales, hormonas y productos metabólicos en los insectos.

Los hemocitos en la hemolinfa varían en su actividad, número, forma y tamaño; cada tipo de hemocito recibe un nombre diferente de acuerdo a sus características; en los insectos se han establecido seis tipos de hemocitos (Gullan y Cranston, 2005; De la Cruz, 2006; Prishnee-Baishya *et al.*, 2015) (Tabla 2).

Tabla 2. Tipos de hemocitos en los insectos y su función

(Lavine y Strand, 2002; Strand, 2008).

Tipo de hemocito	Función
Prohemocitos	Células troncales de los otros tipos celulares
Granulocitos	Cuentan con capacidad de adherencia y su función primaria es la fagocitosis
Plasmatocitos	Cuentan con capacidad de adherencia y forman cápsulas celulares
Enocitoides	Contienen precursores de la fenoloxidasa involucrados en la producción de melanina

La hemolinfa también presenta plasma, que es una solución acuosa de iones inorgánicos, lípidos, azúcares, aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos y otros compuestos. El oxígeno en los insectos no es transportado por el sistema circulatorio, sino por su sistema respiratorio. La hemolinfa en los insectos es incolora y/o amarilla verdosa; en los triatominos la hemolinfa es incolora (Gullan y Cranston, 2005; De la Cruz, 2006).

2.4 Sistema inmune de triatominos

Al igual que otros seres vivos, los insectos como los triatominos están expuestos a ataques por varios patógenos y parásitos, por lo que han desarrollado diferentes sistemas de protección, encontrándose como primer línea de defensa la cutícula exoesquelética, algunas propiedades físicas y químicas epidérmicas, el epitelio intestinal y glándulas accesorias reproductivas; todos estos componentes pueden secretar lisozimas y compuestos citotóxicos para ayudar a eliminar al patógeno (Flores-Villegas *et al.*, 2015).

Aún con todas estas defensas, algunos patógenos y parásitos han sido capaces de desarrollar mecanismos para evadirlas y lograr introducirse en el cuerpo de los insectos cuando éstos presentan heridas (Vargas-Albores y Ortega-Rubio, 1994). Como respuesta a estos retos, los insectos han desarrollado una eficiente respuesta inmune innata que les ha sido suficiente para sobrevivir a un gran número de infecciones (Vargas-Albores y Ortega-Rubio, 1994); ellos y otros invertebrados no cuentan con la inmunidad adaptativa característica de los mamíferos (Nappi *et al.*, 2000).

La respuesta inmune innata de los insectos está integrada por el sistema celular y el humoral (Nappi *et al.*, 2000). La respuesta celular es mediada principalmente por los hemocitos, involucrados en varias funciones inmunes como la fagocitosis, formación de agregados multicelulares, nodulación y encapsulación de bacterias y parásitos (Eleftherianos y Revenis, 2011).

En el sistema inmune humoral existe una gran variedad de componentes, como son péptidos antimicrobianos (lisozimas, defensinas, atacinas, cecropinas, etc.) (Flores-Villegas *et al.*, 2015), lectinas, intermediarios reactivos de nitrógeno y oxígeno, y cascadas enzimáticas complejas como el sistema profenoloxidasa (Castro *et al.*, 2012). El sistema inmune celular y humoral son de gran importancia porque participan individualmente o en conjunto; por ejemplo, una vez activado el sistema proPO, éste genera factores que ayudan a estimular a los hemocitos para la eliminación del agente extraño (Vargas-Albores y Ortega-Rubio, 1994).

El sistema profenoloxidasa juega un papel fisiológico muy importante durante el desarrollo del insecto como en el caso de la esclerotización de la cutícula, cicatrización de heridas (Daquinag *et al.*, 1995) y como mecanismo de defensa, sobresaliendo el proceso de la melanogénesis

(Nappi y Christensen, 2005). Dentro del sistema profenoloxidasa (proPO) participa una proenzima conocida con el mismo nombre, la cual tiene un peso de 70-80 kDa (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2012). Algunos autores se refieren a esta proenzima como fenoloxidasa total (PO) (Genta *et al.*, 2010); la proPO se ha identificado en los hemocitos, la hemolinfa y en las células de la pared intestinal de los insectos (Daquinag *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 2010b; Castro *et al.*, 2012). La proPO es activada por una serín proteasa para dar como resultado la enzima fenoloxidasa (PO) (Genta *et al.*, 2010), la cual tiene un peso de 50-60 kDa y forma parte del grupo de las tirosin-cinasas que tienen como principal función la oxidación de fenoles (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar, 2012).

En los insectos la PO cataliza la oxidación de fenoles a quinonas, las cuales se polimerizan espontáneamente para formar melanina insoluble (Eleftherianos y Revenis, 2011). La melanina es un pigmento marrón oscuro, presente en la respuesta de defensa de los insectos, una vez formada se deposita en el sitio de la infección o daño; también posee actividad citotóxica contra los microorganismos y contiene la invasión de patógenos por medio de la encapsulación de éstos (Cerenius *et al.*, 2008; Eleftherianos y Revenis, 2011).

El sistema proPO presenta otras actividades importantes en los mecanismos de defensa del insecto contra patógenos como la fagocitosis, formación de nódulos, encapsulación, adhesión y locomoción de hemocitos (Vargas-Albores y Ortega-Rubio, 1994). En los insectos puede ser activado por enzimas como tripsina y quimiotripsina (Gomes *et al.*, 2003) o componentes presentes en la pared celular de patógenos como peptidoglicanos en bacterias Gram positivas, lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas, glucanos β -1,3 en hongos o glicoproteínas de protozoarios (Vargas-Albores y Ortega-Rubio, 1994; Genta *et al.*, 2010).

El sistema profenoloxidasa actúa contra muchos agentes invasivos en los insectos, sin embargo a pesar de tal importancia son pocos los estudios que se han realizado y éstos sólo se han enfocado en pocas especies de triatominos como *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans* (Gregório y Ratcliffe, 1991; Mello *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 2003; Genta *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2015). En las especies *M. pallidipennis* y *T. dimidiata* infectados con *T. cruzi*, no se han realizado estudios sobre el sistema proPO.

3. Antecedentes

3.1 Estudios de PO en triatominos

Hasta el momento sólo se han estudiado dos especies de tripanosomatidos en triatominos, *Trypanosoma rangeli* y *Trypanosoma cruzi* (Flores-Villegas *et al.*, 2015), ambos comparten vectores del género *Rhodnius* (Cuba-Cuba, 1998) y presentan diferencias en cuanto a su ciclo de desarrollo en los triatominos (Mello *et al.*, 1995). Cuando el triatomo ingiere sangre infectada con tripomastigotes de *T. rangeli*, estos se transforman en epimastigotes y se multiplican en su intestino, después invaden hemolinfa para posteriormente transformarse en las glándulas salivares en tripomastigotes metacíclicos y completar su ciclo de vida cuando éstos son secretados junto con la saliva durante una nueva alimentación por parte del triatomo (Vieira *et al.*, 2015). A diferencia de *T. cruzi* quien lleva a cabo su ciclo de vida en el intestino y no sale a la hemolinfa (Mello *et al.*, 1995), cuando el triatomo ingiere sangre infectada con tripomastigotes sanguíneos, estos se diferencian en epimastigotes y se replican en el intestino medio anterior (IMA) e Intestino medio posterior (IMP), después los epimastigotes se diferencian en tripomastigotes metacíclicos en el recto y completan su ciclo cuando éstos son excretados junto con las heces del triatomo (Bern, 2011).

Lopez *et al.*, 2003, sugieren que la respuesta inmune en los triatominos puede ser sistémica, ya que órganos que no son estimulados directamente con algún patógeno son capaces de mostrar una respuesta inmune, esta respuesta se observó en los niveles de transcripción de la defensina A en *R. prolixus* después de inocular bacterias en el hemocele; encontraron una mayor activación de la respuesta inmune humoral en la hemolinfa, a diferencia del cuerpo gordo e intestino medio anterior (IMA) sitios donde no fue inoculado el patógeno. Concluyen que el intestino es un tejido sensible y que probablemente esta baja respuesta permita que *T. cruzi* pueda llevar a cabo su ciclo de vida.

Recientemente se ha reconocido la importancia que juega el sistema inmune del insecto vector como un componente esencial en su relación con el parásito (Mello *et al.*, 1995). Los componentes que se están estudiando de este sistema son la proenzima proPO y la enzima PO, las cuales tienen una gran importancia ya que forman parte de las primeras reacciones de defensa humoral del insecto y pueden ayudar a evitar que se establezcan y/o eliminar microorganismos del huésped invertebrado (Gomes *et al.*, 2003).

A pesar de la importancia de tales componentes son pocos los estudios que se han realizado en triatomíneos, éstos se han enfocado principalmente a la especie *R. prolixus* (Gregório y Ratcliffe, 1991; Mello *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 2003; Genta *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2015). Con *T. infestans* sólo se ha reportado un estudio (Gregório y Ratcliffe, 1991).

Los estudios del sistema proPO realizados solo con *R. prolixus*, probablemente se deba a factores como la fácil crianza de esta especie en el laboratorio (Schofield, 1994), debido a la importancia epidemiológica, ya que fue el principal vector de *T. cruzi* en Centroamérica, la que actualmente está casi eliminada de esta región (Monroy y Rodas-Retana, 2015) y finalmente a su respuesta inmune ante el parásito *T. rangeli*, el cuál es patógeno para este triatómino (Cuba-Cuba, 1998).

Dentro de las primeras investigaciones en las que se activó *in vitro* el sistema proPO con *T. rangeli*, extractos de laminarina y lipopolisacáridos, se observó que la susceptibilidad en *R. prolixus* para infectarse con *T. rangeli* podría estar relacionada con una inhibición en la activación del sistema proPO, provocada por la presencia del parásito en el insecto (Gregório y Ratcliffe, 1991); esta idea concuerda con uno de los procesos que los parásitos han desarrollado para evitar ser reconocidos por el sistema inmune del insecto: la inhibición de los factores humorales como proPO y PO (Tabla 3) (Gomes *et al.*, 2003).

En un estudio donde se inoculó a *T. cruzi* y *T. rangeli* en el hemocele de *R. prolixus*, se pudo observar que *T. cruzi* fue reconocido rápidamente por la respuesta inmune celular, la cual junto con la actividad de la PO fueron capaces de eliminarlo de este sitio. Mientras que *T. rangeli* aunque fue reconocido por la respuesta celular y humoral, fue capaz de evadir el sistema inmune y desarrollarse en la hemolinfa. En este caso se observó que *T. rangeli*, era capaz de inhibir la activación del sistema proPO; ya que cuando disminuyó la actividad de esta enzima, se observó un rápido incremento en el número de parásitos (Tabla 3) (Mello *et al.*, 1995).

Investigaciones posteriores estudiaron el efecto de la infección oral con epimastigotes de *T. rangeli* de la cepa H14 en *R. prolixus*, encontraron valores altos de la actividad de PO en

insectos control alimentados con sangre sin infectar y posteriormente retados por inoculación torácica con epimastigotes. Por otro lado, aquellos insectos que habían sido alimentados previamente con epimastigotes pudieron inhibir más la activación del sistema proPO inducida por la inoculación torácica de epimastigotes (Tabla 3) (Gomes *et al.*, 2003).

Otros experimentos realizados con triatominos infectados oralmente con *T. rangeli*, y realizando la medición de la PO en el IMA de *R. prolixus*, demostraron que el parásito también es capaz de inhibir la actividad de la PO en este sitio. Otro hallazgo importante fue que el parásito era capaz de regular la microbiota del insecto. Se analizó la población bacteriana en el IMA de los insectos infectados con *T. rangeli* y se demostró que había un decremento en ésta (Tabla 3) (Vieira *et al.*, 2015).

Genta *et al.*, 2010, describieron y determinaron la distribución temporal de la actividad de la PO en diferentes sitios (hemolinfa, cuerpo graso, IMA e IMP) posterior a la alimentación en ninfas de quinto estadio de *R. prolixus*. Encontraron que los tejidos con mayor actividad específica de PO son la hemolinfa y el cuerpo graso, el tejido que presentó la mayor cantidad de PO, fue el IMA; no encontraron actividad en el IMP de esta enzima, lo que relacionaron con la poca cantidad de bacterias en el IMP como para requerir de la PO en este sitio (Genta *et al.*, 2010). También encontraron patrones diferentes de expresión de la actividad de la PO en cada tejido, los cuales mencionan que pueden estar regulados por la ingesta de comida, crecimiento de microbiota en intestino y por la hormona ecdisona, la cuál es un inductor de ecdisis en los insectos (Tabla 3).

Sólo se ha reportado una investigación en donde se ha llevado a cabo la medición de la PO en el IMA de triatominos infectados oralmente con *T. cruzi*. El IMA es de suma importancia, ya que *T. cruzi* solo se diferencia y replica en este sitio del triatomino. Castro *et al.*, 2012, usaron la cepa Dm28c y la cepa Y de *T. cruzi*; solo la primera provocó un aumento en la actividad específica de la PO y el parásito pudo desarrollarse en el insecto. También se observó una disminución de la microbiota intestinal de insectos infectados con la cepa Dm28c, concluyen que la actividad de la PO no afecta aparentemente el crecimiento del parásito, pero si mata a bacterias que pudieran lisar y competir con el parásito, y de esta forma, lograr que *T. cruzi* se establezca en el triatomino (Tabla 3) (Castro *et al.*, 2012).

Tabla 3. Estudios del sistema proPO en triatominos

Autores	Triatomino (especie y estadio)/Agente etiológico	Órgano blanco	Conclusiones
Gregorio y Ratcliffe, 1991.	<i>Rhodnius prolixus</i> y <i>Triatoma infestans</i> (♂ y ♀) <i>T. rangeli</i>	Hemolinfa	Susceptibilidad de infección de <i>R. prolixus</i> por <i>T. rangeli</i> debido a inhibición de proPO
Mello <i>et al.</i> , 1995	<i>Rhodnius prolixus</i> (♂) <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>	Hemolinfa	<i>T. rangeli</i> inhibe actividad de PO a diferencia de <i>T. cruzi</i>
Gomes <i>et al.</i> , 2003	<i>Rhodnius prolixus</i> (♂ y ♀) <i>T. rangeli</i>	Hemolinfa	Mayor inhibición de sistema proPO en triatominos infectados previamente con epimastigotes (cepa H14)
Genta <i>et al.</i> , 2010	<i>Rhodnius prolixus</i> Ninfas de 5to estadio —	Hemolinfa, cuerpo graso, IMA e IMP	Diferente actividad de PO en tejidos, mediada por alimentación, crecimiento de microbiota intestinal y hormona ecdisona
Castro <i>et al.</i> 2012	<i>Rhodnius prolixus</i> Ninfas de 5to estadio <i>T. cruzi</i>	IMA	Alta actividad específica de PO y disminución de microbiota intestinal
Vieira <i>et al.</i> 2015	<i>Rhodnius prolixus</i> Ninfas de 5to estadio <i>T. rangeli</i>	IMA	<i>T. rangeli</i> inhibe actividad de PO en IMA de <i>R. prolixus</i> y regula microbiota intestinal

*En algunos estudios realizados del sistema proPO en triatominos se han llevado a cabo retos con parásitos, sin embargo en otros no (marcado como —)

♂ Machos ♀ Hembras

3.2 Estudios de PO en otros insectos

Cuando Gillespie *et al.*, 2000, estudiaron la respuesta inmune de la langosta *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) durante la infección con el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, encontraron que durante el transcurso de la infección, la actividad de PO disminuía, los autores señalan que ésto podría relacionarse con metabolitos derivados del hongo. Por otra parte, también se obtuvo un aumento en los niveles de proPO, que sugieren podría estar asociado al aumento de un tipo de hemocitos denominados coagulocitos que producían a la proenzima.

Enríquez-Vara *et al.*, 2012, investigaron la respuesta de la PO y del NO (óxido nítrico) en la hemolinfa de dos especies de larvas de escarabajos: *Phyllophaga polyphylla* y *Anomala cincta* (Coleoptera: Scarabe) después de ser inoculadas con los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. Encontraron una sobrevivencia más alta en las larvas que mostraron niveles más altos de PO y menores de NO, concluyen que la sobrevivencia está correlacionada con la respuesta inmune del hospedero y que por lo menos en este caso dependen principalmente de la producción de PO.

Yassine *et al.*, 2012, estudiaron el papel que juega la respuesta de melanización del mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) en la infección con el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Encontraron la presencia de melanina durante todo el curso de la infección y a pesar de esto, el hongo continuó con su desarrollo. Otro hallazgo relevante fue que después de silenciar *TEP1* y *CLIPA8* (reguladores positivos de la melanización de *Plasmodium* y bacterias en *A. gambiae*), estos insectos eran más sensibles a la infección con *B. bassiana* y el crecimiento de este hongo en su huésped también se incrementó, concluyen que la respuesta de melanización de *A. gambiae* contra el hongo *B. bassiana* es muy importante ya que retarda su crecimiento y diseminación.

Cornet *et al.*, 2013, investigaron si la resistencia a insecticidas en mosquitos *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) seleccionados en laboratorio y capturados en la naturaleza tenía un efecto en la actividad de la PO. Utilizaron mosquitos que mostraban resistencia a insecticidas y otro grupo que era susceptible. Encontraron que la actividad de la PO fue más alta en los mosquitos

con resistencia a los insecticidas que aquellos susceptibles a éstos (la resistencia se debe al grosor de su cutícula). La PO participa en el proceso de esclerotización por lo que encontraron concordancia con sus valores. En el grupo de mosquitos que fueron capturados de la naturaleza no encontraron algún efecto de la resistencia a insecticidas con respecto a la actividad de la PO. También pudieron observar que en ambos grupos las larvas mostraban niveles más altos que los adultos, las hembras valores más altos que los machos y conforme avanzaba la edad del mosquito observaron un decremento de la actividad. Mencionan que los niveles más altos en las larvas puede deberse a que éstas deben tener un sistema inmune mas fuerte porque están expuestas a una alta densidad de parásitos en su hábitat acuático. Por otra parte, sugieren que la diferencia en los niveles de PO entre machos y hembras puede deberse a que estas últimas al alimentarse de sangre en comparación con los machos que solo se alimentan de néctar, están expuestas a varios patógenos asociados a la sangre como virus (encefalitis), protozoarios (*Plasmodium*, *Trypanosoma*) y parásitos metazoos (*Wuchereria*). Respecto al descenso de la actividad de la PO con relación al avance de la edad, mencionan que esto se ha visto en muchos invertebrados, sin embargo son pocos los estudios respecto a este tema en mosquitos (Christensen *et al.*, 1986; Hillyer *et al.*, 2005).

4. Justificación

En la respuesta humoral de los insectos, la enzima fenoloxidasa (PO) es una de las primeras defensas en activarse ante la presencia de parásitos, actúa encapsulándolos mediante la formación de melanina, junto con otros componentes de la respuesta humoral (óxido nítrico, péptidos antimicrobianos, lisozimas, etc.) y de la respuesta celular (hemocitos), lo que influye en el establecimiento de un microorganismo. Existen estudios que se han enfocado en la respuesta inmune ante *T. rangeli* y se ha reportado que éste provoca una inhibición de la PO natural y total para su establecimiento y desarrollo en el insecto; mientras que *T. cruzi*, es capaz de estimular la actividad de la PO.

Pocos han sido los estudios que se han realizado en especies de triatomíneos (Gregorio y Ratcliffe, 1991; Mello *et al.*, 1995; Gómez *et al.*, 2003; Genta *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2015) y son escasas las investigaciones que han utilizado a *Trypanosoma cruzi* como inductor de proPO con su consiguiente activación a PO (PO natural).

Por lo tanto el estudio de la actividad de PO natural y total (proPO+PO natural), brindará información sobre diferencias de éstas en hemolinfa e intestino medio anterior (sitio de desarrollo del parásito).

Por otra parte la alimentación y el establecimiento de *T. cruzi* en triatomíneos se ha asociado con el desarrollo de la membrana perimicrovellosa (Gutiérrez-Cabrera *et al.*, 2015), el estudio histológico nos permitirá identificar cambios en la membrana perimicrovellosa, confirmar la presencia y zonas de adhesión del parásito.

5. Hipótesis y Objetivos

5.1 Hipótesis

Los parásitos en insectos regulan la actividad de la PO y la alimentación el desarrollo de la membrana perimicrovellosa, entonces en triatomíneos infectados oralmente con *T. cruzi* se observará un incremento de la actividad de la PO y cambios morfológicos en la membrana perimicrovellosa.

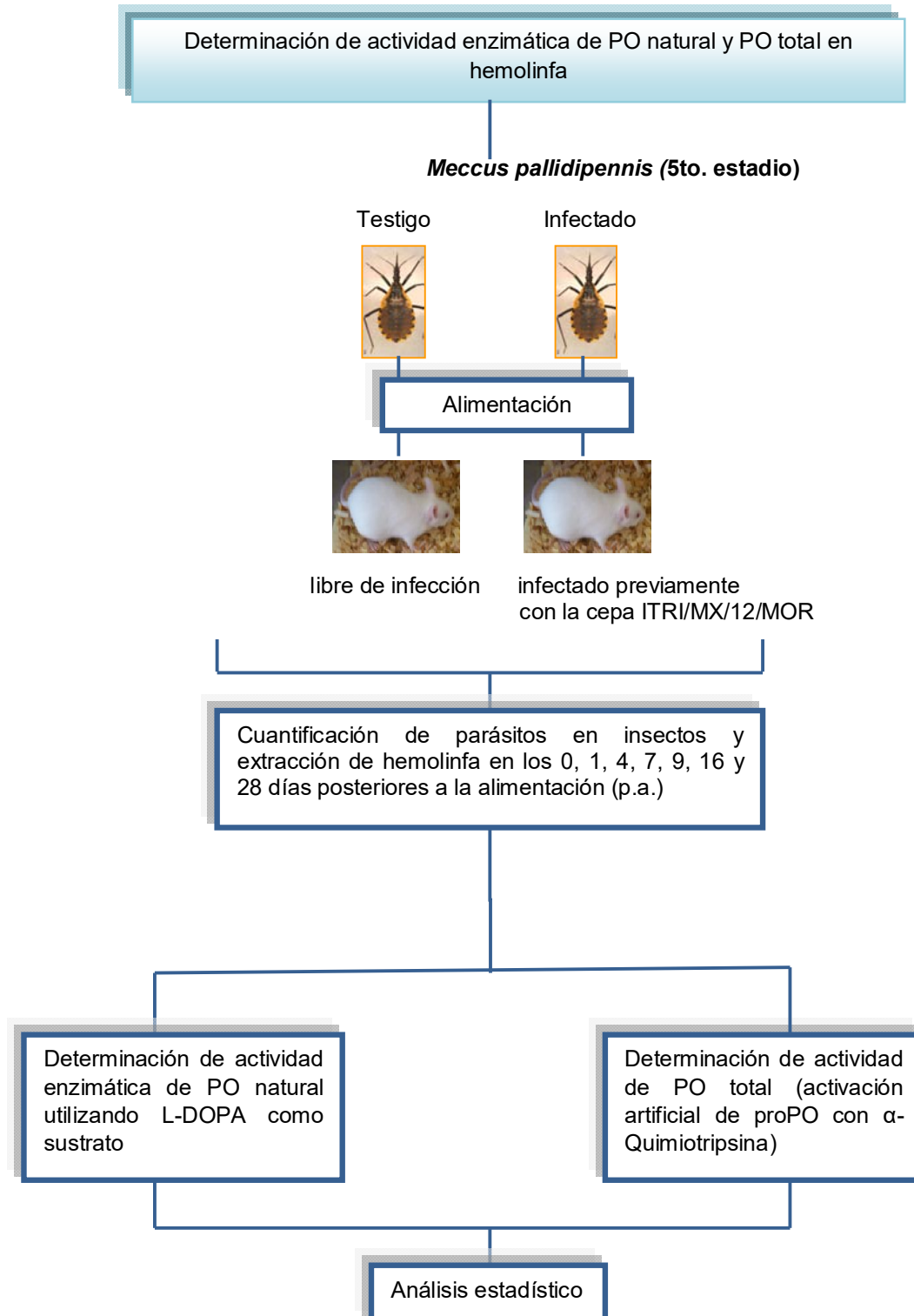
5.2 Objetivo general

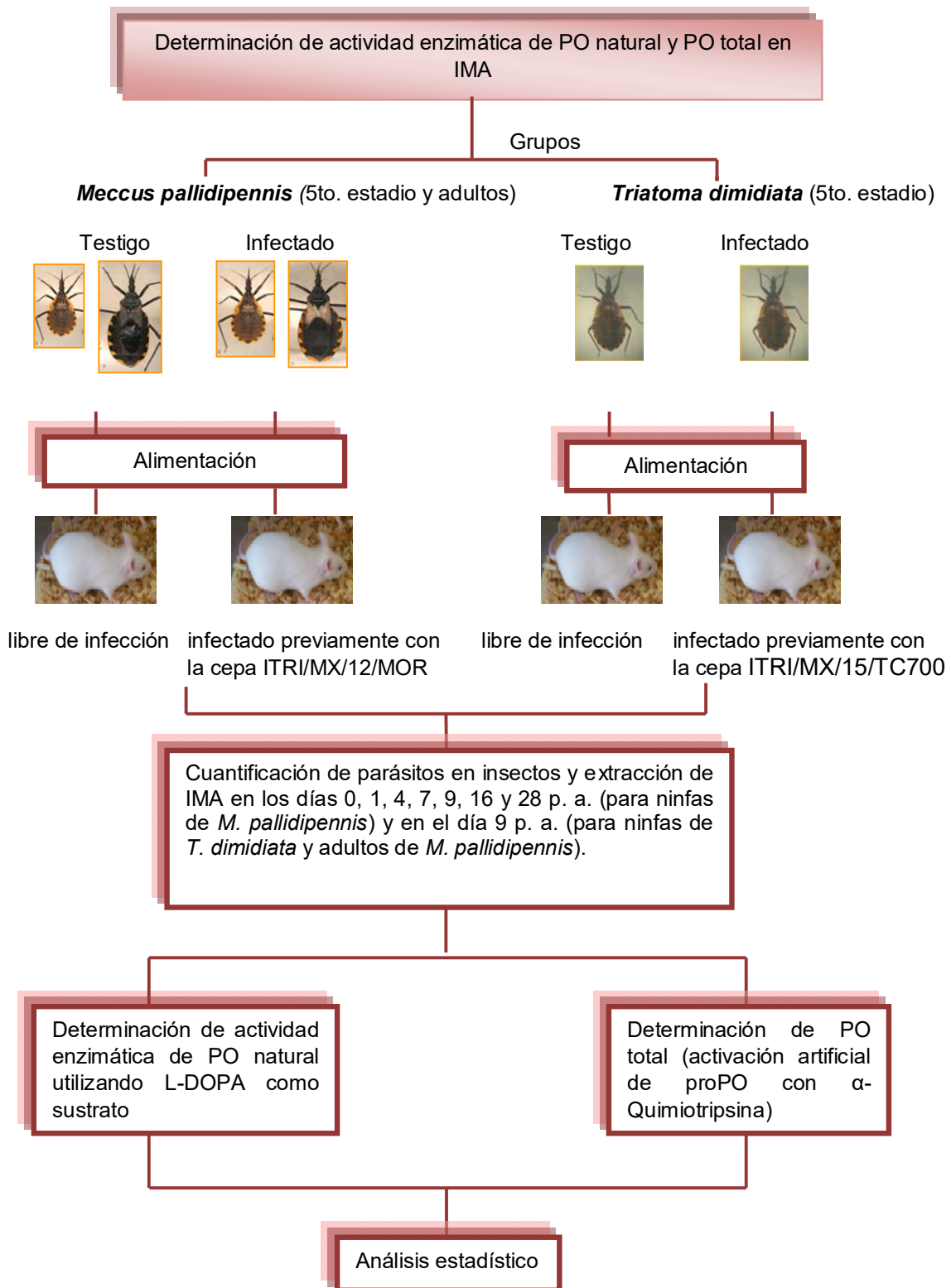
Determinar la actividad de PO natural y PO total en hemolinfa e intestino medio anterior (IMA) de *Meccus pallidipennis* y comparar la actividad de ambas PO en IMA de *M. pallidipennis* y *T. dimidiata*, para correlacionarlas con el establecimiento de la infección con *Trypanosoma cruzi*.

5.3 Objetivos específicos

- Infectar ninfas de quinto estadio (n5) y adultos de *M. pallidipennis* con la cepa ITRI/MX/12/MOR y n5 de *T. dimidiata* con la cepa ITRI/MX/15/TC700 para extracción de hemolinfa o IMA.
- Cuantificar parásitos en heces de triatomíneos.
- Determinar la actividad de PO natural y PO total en hemolinfa o IMA de n5 y adultos de *M. pallidipennis* y en n5 de *T. dimidiata*.
- Comparar la actividad de PO natural y PO total en IMA de n5 y adultos de *M. pallidipennis* con n5 de *T. dimidiata*.
- Identificar la membrana perimicrovellosa en IMA de n5 de *M. pallidipennis*.

6. Diseño experimental





7. Metodología

7.1 Insectos

Meccus pallidipennis

Los insectos de la colonia de *M. pallidipennis* (Oaxtepec, Morelos) del Laboratorio de Biología de Parásitos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, fueron mantenidos bajo condiciones controladas de humedad de 60% HR y temperatura 28° C.

Triatoma dimidiata

Los triatomínos de la especie *T. dimidiata* (localidad de Manacal de Tapachula, Chiapas) fueron otorgados por el Laboratorio del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP) del INSP, los insectos fueron mantenidos bajo condiciones controladas de humedad de 60% HR y temperatura 28° C.

7.2 Origen de las cepas de *T. cruzi*

ITRI/MX/12/MOR (WHO, 2002). La cepa fue obtenida de un ejemplar macho de *M. pallidipennis* capturado en el año 2012 en el estado de Morelos. Fue otorgada por el Laboratorio de Biología de Parásitos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

ITRI/MX/15/TC700 (WHO, 2002). La cepa fue obtenida de un ejemplar hembra de *Triatoma dimidiata*, capturada en el año 2015 en intradomicilio de la localidad El Paraíso, municipio de Copainalá, Chiapas. Fue otorgada por el Laboratorio Multidisciplinario experimental y Bioterio de la UNICAH, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

7.3 Infección de triatominos

Para la infección de las ninfas de 5to. estadio y adultos de *Meccus pallidipennis* se utilizaron ratones CD-1 de 18-20 grs. inoculados previamente con 1×10^6 parásitos / ml de la cepa ITRI/MX/12/MOR. Se utilizaron ratones de la cepa CD-1 debido a la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* y disponibilidad suficiente de ejemplares por su fácil reproducción en el bioterio (Tay *et al.*, 1969; Mendoza-Rodriguez, 2015). El grupo testigo fue alimentado con ratones de 18-20 grs. libres de infección. El tiempo de alimentación fue durante 30 minutos en condiciones de obscuridad.

Para la infección de las ninfas de 5to. estadio de *Triatoma dimidiata* se utilizaron ratones CD-1 de 18-20 grs. inoculados previamente con 1×10^6 parásitos / ml de la cepa ITRI/MX/15/TC700. El grupo testigo fue alimentado con ratones de 18-20 grs., libres de infección. El tiempo de alimentación fue durante 30 minutos en condiciones de obscuridad.

Los grupos de triatominos de cada especie y estadio que se utilizaron para los experimentos se indican en la tabla 4.

Tabla 4. Grupos de triatominos, repeticiones y días de medición de la actividad de PO natural y PO total

	<i>M. pallidipennis</i>				<i>T. dimidiata</i>	
	Hemolinfa		IMA		IMA	
Estadio	Testigos	Infectados	Testigos	Infectados	Testigos	Infectados
Quinto	30 (10 triatominos x 3 repeticiones Días: 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28)	30 (10 triatominos x 3 repeticiones Días: 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28)	30 (10 triatominos x 3 repeticiones Días: 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28)	30 (10 triatominos x 3 repeticiones Días: 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28)	16 (8 triatominos x 2 repeticiones Día: 9)	16 (8 triatominos x 2 repeticiones Día: 9)
Adultos			16 H y 16 M (8 triatominos x 2 repeticiones Día: 9)	16 H y 16 M (8 triatominos x 2 repeticiones Día: 9)		

(H) Hembras - (M) Machos

7.4 Cuantificación de parásitos

7.4.1 Triatominos utilizados para extracción de hemolinfa

En los días posteriores a la primera alimentación de los insectos del grupo infectado se llevó a cabo la revisión de las heces de cada insecto para confirmar la infección con *T. cruzi* (Zeledón, 1997). En un portaobjetos, se depositó una gota de solución salina isotónica y heces, éstas obtenidas por estimulación rectal y compresión abdominal del insecto, se homogenizó la mezcla, se tomaron 10 µl y se observó al microscopio toda la muestra con un aumento de 40x.

7.4.2 Triatominos utilizados para extracción de IMA

Durante la disección y extracción del intestino se obtuvo la mayor cantidad de heces posible del recto y se depositaron en un tubo eppendorf con 20 µl de solución salina. Se homogenizó la muestra y se tomó una alícuota de 10 µl para su observación directa al microscopio con el objetivo de 40x y otra alícuota de 10 µl se utilizó para cuantificación de parásitos en cámara Neubauer, utilizando una dilución 1:10 (Guevara-Gómez, 2015).

7.5 Hemolinfa

7.5.1 Extracción y tratamiento

La hemolinfa se extrajo en los días 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28 del grupo testigo e infectado, por medio de una punción ventral con una jeringa de 1 ml en la unión de la tercera extremidad con el tórax del triatomo, justo en la membrana que separa la coxa y el trocánter (Figura 20) y se presionó ligeramente el abdomen para inducir el flujo de hemolinfa por la herida (Espinosa de Aquino, 2012); la hemolinfa se colectó con una micropipeta de 10 µl. La muestra se colocó en un tubo eppendorf con 20 µl de PBS 1X, pH 7.2 y al volumen final de cada tubo se le agregó la cantidad requerida de PBS para tener una relación final 1:20. Los tubos se mantuvieron sobre hielo durante el proceso y posteriormente a 4° C hasta su uso.

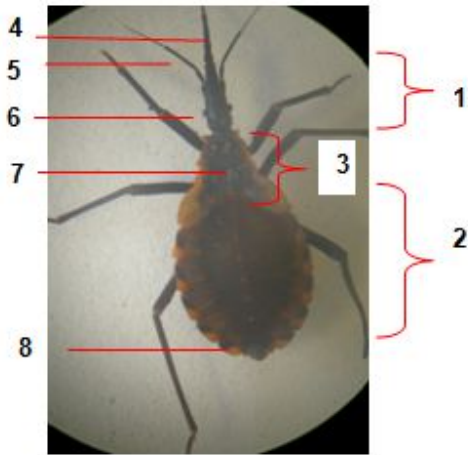


Figura 19. Vista dorsal de ninfa de 5to estadio de *M. pallidipennis*. 1: Cabeza, 2: Abdomen, 3: Tórax, 4: Probóscide, 5: Antena, 6: Ojo, 7: Pronoto, 8: Conexivo (Galíndez-Girón *et al.*, 1997). Lab. Biología de Parásitos, Fac. de Medicina, UNAM

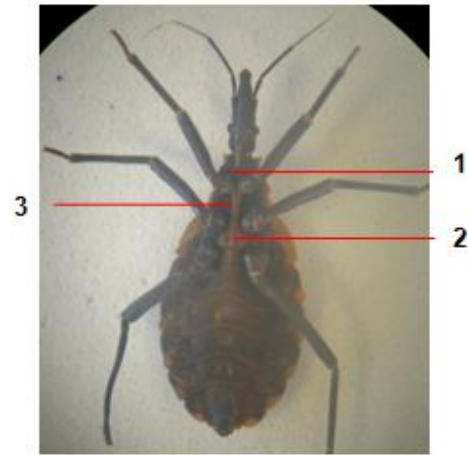


Figura 20. Vista ventral de ninfa de 5to estadio de *M. pallidipennis*. 1: Coxa, 2: Abdomen, 3: Trocánter (Galíndez-Girón *et al.*, 1997). Lab. Biología de Parásitos, Fac. de Medicina, UNAM

7.5.2 Medición de PO natural y PO total en hemolinfa

Para medir la actividad de la PO natural y de la PO total en hemolinfa se cuantificaron proteínas por el método de Pierce, utilizando el Kit comercial BCA (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois) en placas de ELISA (Costar 96; Corning, New York, New York), la absorbancia se midió con un lector de placas de ELISA (ELX 800, Biotek) a 562 nm y la cantidad de proteína para cada muestra se ajustó a 10 µg de proteína para medir ambas PO (Córdoba-Aguilar *et al.*, 2011).

7.5.3 Actividad enzimática de PO natural

La actividad de la fenoloxidasa se determinó por espectrofotometría a través de la conversión catalítica de L-dopa (3, 4-dihydroxi-L-fenilalanina que es incolora) a Dopacromo (marrón-rojizo) (Laughton y Siva-Jothy, 2010) usando el coeficiente de extinción molar de este ultimo de 3.715

$M^{-1} cm^{-1}$ (Daquinag *et al.*, 1995). La medición de la actividad enzimática se realizó en los días 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28 del grupo infectado y testigo.

En placa de ELISA (Costar 96; Corning, New York, New York) se agregaron 10 μg de proteína en 100 μl de PBS, se añadieron 100 μl del sustrato (L-DOPA) a una concentración de 4 mg/ml. La placa fue incubada a 37° C durante 20 minutos en condiciones de obscuridad. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 490 nm cada 5 minutos, durante una hora; como blanco se utilizó 100 μl de PBS con 100 μl de L-Dopa (Jiménez-Cortés y Córdoba-Aguilar, 2013). El ensayo se realizó por duplicado. La actividad de la PO fue expresada como unidades enzimáticas (U), en donde 1 U es la cantidad de enzima que produce 1 μmol de dopacromo por minuto.

7.5.4 Actividad enzimática de PO Total

La actividad de fenoloxidasa se determinó por espectrofotometría a través de la conversión catalítica de L-dopa (3, 4-dihydroxi-L-fenilalanina que es incolora) a Dopacromo (marrón-rojizo), usando el coeficiente de extinción molar de este último de $3.715 M^{-1} cm^{-1}$ (Daquinag *et al.*, 1995). La medición de la actividad enzimática se realizó en los días 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28 del grupo infectado y testigo. (Laughton y Siva-Jothy, 2010).

En microplaca de 96 pozos, se adicionaron 10 μg de proteína en 65 μl de PBS, se adicionaron 5 μl de α -Quimiotripsina a una concentración de 1 mg/ml (Sigma®), se incubó durante 20 minutos a 37°C en condiciones de obscuridad, se agregaron 130 μl de L-Dopa, las lecturas se tomaron a una longitud de onda de 490 nm, durante una hora, cada 5 minutos. Como blanco se utilizaron 5 μl de α -Quimiotripsina, 65 μl de PBS con 130 μl de L-Dopa (Jiménez-Cortés *et al.*, 2013). El ensayo se realizó por duplicado. La actividad de la PO fue expresada como unidades enzimáticas (U), en donde 1 U es la cantidad de enzima que produce 1 μmol de dopacromo por minuto.

7.6 Intestino Medio Anterior (IMA)

7.6.1 Extracción y tratamiento

El IMA de los insectos se extrajo en los días 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28 del grupo infectado y testigo. Se limpió el abdomen del insecto con una torunda impregnada con alcohol al 70%, se retiraron cada una de sus extremidades para impedir su movimiento y se colocó el insecto en una caja

de Petri con hielo, se cortó el conexivo del insecto para exponer la cavidad abdominal (Figura 19). Se removió todo el cuerpo graso y túbulos de Malpighi con ayuda de pinzas entomológicas en microscopio estereoscópico (Carl Zeiss 426126) (Figura 21). Se disectó y extrajo el sistema digestivo, se identificó el IMA y se disectó, se colocó en tubo con 200 μ l de PBS 1X, pH 7.2 y se mantuvo en hielo. Con ayuda de un pistilo se homogenizó el IMA en PBS, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4° C, posteriormente se realizó una dilución 1:10 de la muestra, tomando 30 μ l del sobrenadante y agregando 270 μ l de PBS 1X pH 7.2.



Figura 21. Proceso de extracción de IMA de triatomino. a) ninfa sin extremidades b) ninfa sin conexivo, c) exposición de órganos internos, d) sistema digestivo con sus principales regiones 1: intestino medio anterior (IMA), 2: intestino medio posterior (IMP) y 3: recto. Lab. Biología de Parásitos, Fac. de Medicina, UNAM

7.6.2 Medición de PO natural y PO total en IMA

En este experimento no se pudo ajustar la cantidad de proteínas, dado que el IMA posee un alto contenido proteico y además se obtiene con alto contenido sanguíneo del hospedero. Dadas estas condiciones se utilizaron 25 μ l de la muestra (Castro *et al.*, 2012; Genta *et al.*, 2010).

7.6.3 Actividad enzimática de PO natural

Se colocó 10 μ l de PBS, se agregaron 25 μ l de la muestra y finalmente se añadieron 25 μ l del sustrato (L-DOPA); Se incubó la placa durante 3 horas en condiciones de obscuridad (Castro *et al.*, 2012; Genta *et al.*, 2010). Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 490 nm cada 5 minutos, durante una hora y media. Como blanco se utilizó 35 μ l de PBS con 25 μ l de L-Dopa. El ensayo se realizó por duplicado en los días 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28 p.a. con sangre de ratón infectado o libre de infección.

La actividad de la PO fue expresada en unidades iguales a los valores definidos para las muestras de hemolinfa.

7.6.4 Actividad de PO Total

En una microplaca de 96 pozos, se adicionaron 45 μ l de PBS, 25 μ l de la muestra y finalmente se le agregó 5 μ l de α -Quimiotripsina. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C y posteriormente se agregaron 130 μ l de L-Dopa para incubarse durante 1 hora a 37 °C. Las lecturas se tomaron a una longitud de onda de 490 nm, durante una hora y media, cada 5 minutos. Como blanco se utilizaron 5 μ l de α -Quimiotripsina, 70 μ l de PBS con 130 μ l de L-Dopa (Jiménez-Cortés y Córdoba-Aguilar, 2013). El ensayo se realizó por duplicado en los mismos días que se realizaron los ensayos de PO.

7.7 Unidades de actividad enzimática

Se realizó una gráfica de absorbancia contra tiempo, para poder obtener la pendiente. Este valor se multiplicó por el volumen final de la reacción y por el factor de dilución utilizado. Después el valor obtenido de esta operación se dividió entre el resultado de la multiplicación del coeficiente de extinción molar del dopacromo por la medida del paso óptico.

Finalmente el resultado de las operaciones anteriores tiene las unidades de mol/min, por lo que se multiplica por 1×10^6 para convertir los moles a μ moles de producto. Y de esta forma la actividad enzimática queda expresada como unidades enzimáticas (U), en donde 1 U es la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de dopacromo (producto) por minuto.

La siguiente ecuación resume las operaciones mencionadas arriba.

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

m= Pendiente de la gráfica de absorbancia vs tiempo (min).

vf=Volumen final de reacción expresado en litros.

F=Factor de dilución utilizado

ε =Coeficiente de extinción molar del dopacromo ($3.715 M^{-1} cm^{-1}$).

b= Paso óptico que corresponde a 0.5 cm

7.8. Tinción de IMA con hematoxilina-eosina (H-E) y ácido peryódico de Schiff (PAS)

Para H-E se utilizaron 2 intestinos de ninfas de quinto estadio de *M. pallidipennis* (1 testigo y 1 infectado). El día designado fue el 9 p.a. con la cepa ITRI/MX/12/MOR de *T. cruzi*.

Para PAS se utilizaron 2 intestinos de ninfas de quinto estadio de *M. pallidipennis* (1 testigo y 1 infectado). El día designado fue el 9 p.a. con la cepa ITRI/MX/12/MOR de *T. cruzi*.

Una vez extraído el intestino se separó el IMA, se lavó con PBS, se colocó en viales de vidrio con formol amortiguado al 10% (100 ml de formol al 40%, 900 ml de agua destilada, 4 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 6.5 g de Na_2HPO_4). Las muestras fueron deshidratadas en etanol (50%, 70%, 90%, 100%), se fijaron en parafina; los cortes histológicos fueron realizados en un micrótopo Leica RM 2025 y las preparaciones se tiñeron con Hematoxilina-eosina y PAS (Ross, 2008).

7.9 Microscopía electrónica de barrido (MEB) de IMA

Se utilizó 1 intestino de ninfa de quinto estadio de *M. pallidipennis* obtenido el día 9 p.a. con *T. cruzi* de la ITRI/MX/12/MOR. Una vez extraído el intestino se separó el IMA, se fijó en buffer de

glutaraldehído 2.5% en cacodilato de sodio 0.2 M pH 7.2, se realizaron tres lavados con buffer de cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2; la post-fijación se realizó con tetra óxido de osmio 1% en el mismo buffer y un lavado con cacodilato de sodio 0.1 M pH 7.2; se deshidrató con una serie creciente de concentraciones de etanol (30, 50,60, 70, 80 90 y 100%) para desecar la muestra por punto crítico con CO₂; el montaje se realizó en porta muestras de aluminio con etiquetas de carbón doble cara para ser recubiertas con oro. La observación de las muestras se llevó a cabo con un microscopio electrónico de barrido modelo ZEISS DSM-950 (Castellanos-Moguel *et al.*, 2013).

8. Análisis estadístico

Para analizar el efecto del tratamiento en la actividad de la PO natural y la PO total, se llevó a cabo un análisis estadístico con el programa SPSS Data Editor Software (versión 21, SPSS Inc.) (Kruskal-Wallis y Mann Whitney) para medidas no paramétricas. Los datos fueron previamente transformados a logaritmo natural para asumir una distribución normal de PO natural y PO total. El criterio de nivel de significancia de 0.05 y los valores de p en el texto se refieren a experimentos independientes. Los resultados muestran la media y el error standard.

9. Resultados

9.1 Confirmación de infección con *T. cruzi* en triatominos

En los exámenes directos de heces (obtenidas por compresión abdominal) para confirmar la infección con *T. cruzi* en ninfas de *M. pallidipennis* para los experimentos con hemolinfa, se observó el parásito por primera vez el día 7. En el día 9 se observaron 15, en el 16 se observaron 5 y en el día 28 se observaron 6 parásitos (Figura 22).

En este grupo de triatominos del grupo infectado destinadas para medir la actividad de la PO en hemolinfa, no se pudo realizar conteos del parásito con la cámara de Neubauer ya que el número de éstos en las heces era muy pequeño.

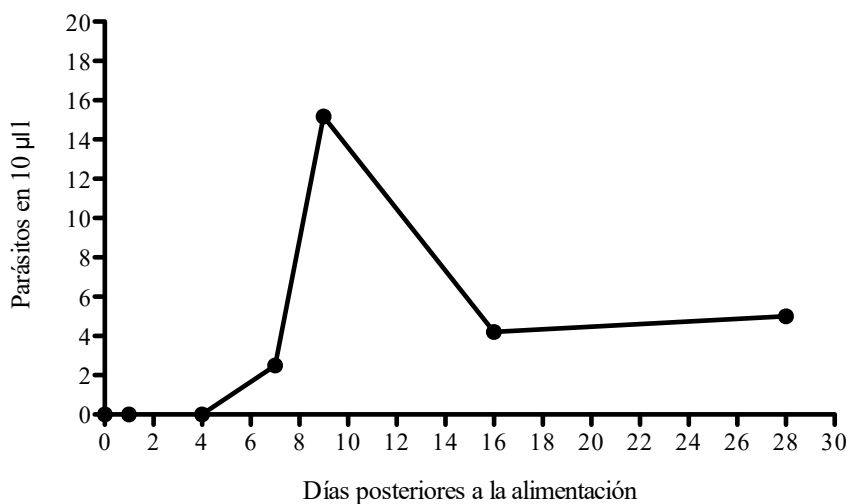


Figura 22. Cuantificación de parásitos en heces obtenidas por compresión abdominal en los días 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28 de ninfas de *M. pallidipennis* p.a con ratones infectados con *T. cruzi* utilizadas en los ensayos con hemolinfa.

En la cuantificación de los parásitos en heces obtenidas de la disección del recto de ninfas de *M. pallidipennis* de los experimentos con IMA, se observó el mayor número de parásitos en los días 7 y 9 (766,667 y 700,000) y disminuyen a 150,000 en el día 28 (Figura 23).

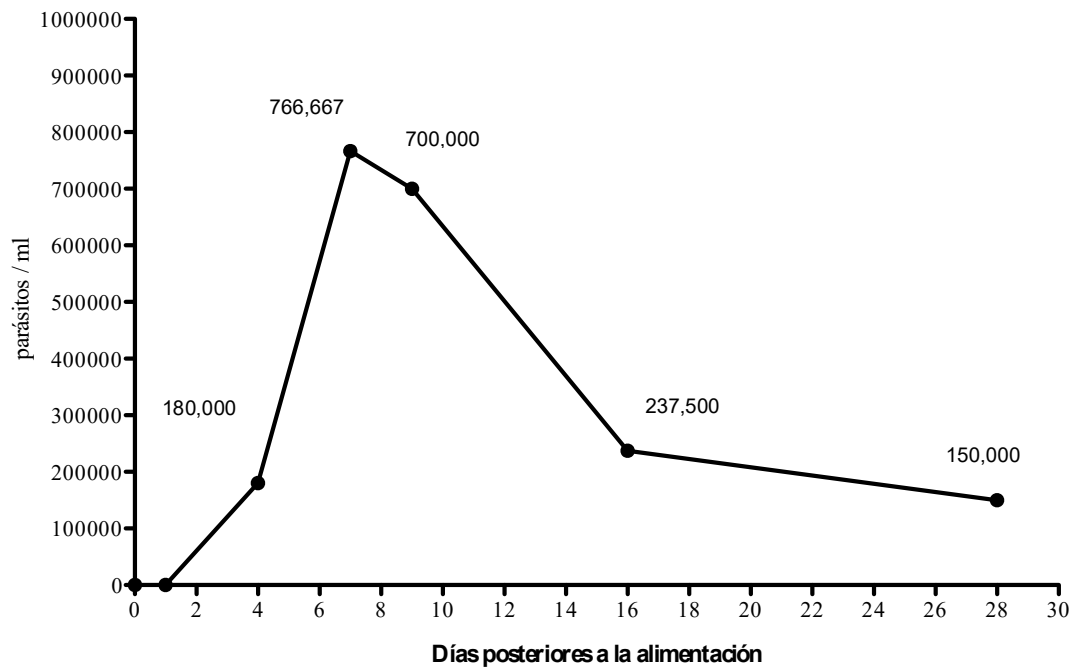


Figura 23. Cuantificación de parásitos en heces obtenidas de la disección del recto de ninfas de *M. pallidipennis* en los días 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28 p. a. con ratones infectados con *T. cruzi* utilizadas en los ensayos con IMA.

En la cuantificación de parásitos en el día 9 p. a. de ninfas de *M. pallidipennis*, ninfas de *T. dimiata* y adultos de *M. pallidipennis* se observó que las ninfas de *M. pallidipennis* tenían el mayor número de parásitos y los machos el menor ($p < 0.05$) (Figura 24).

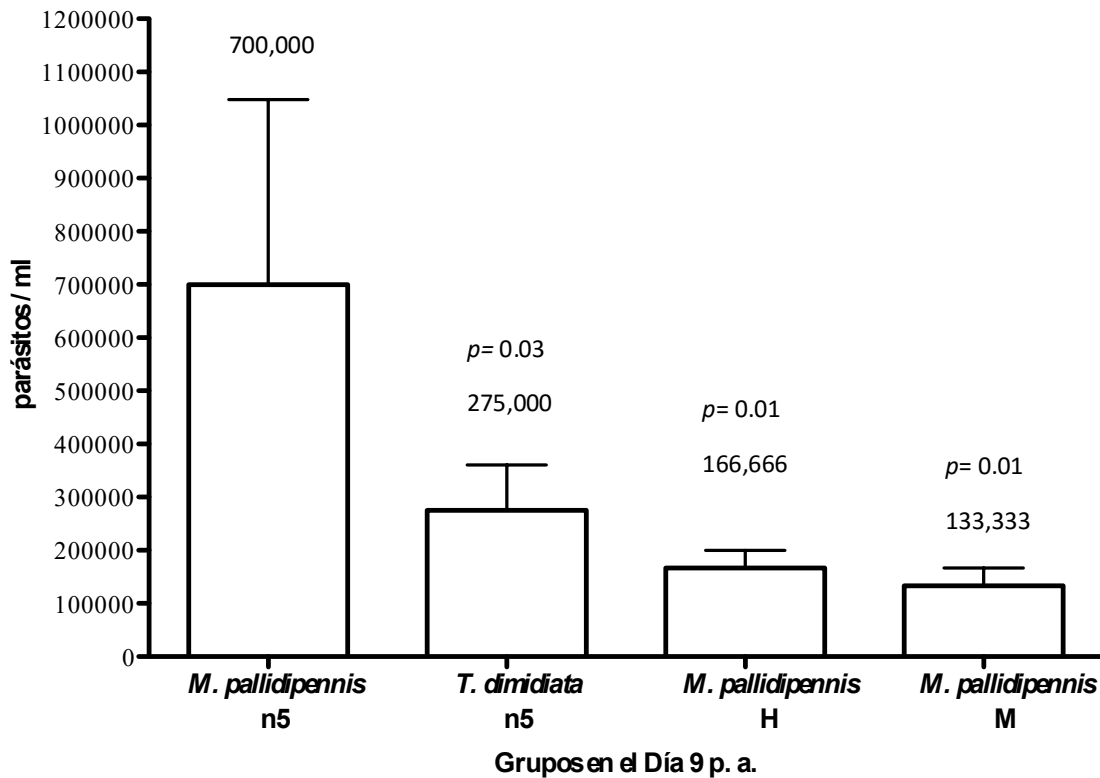


Figura 24. Cuantificación de parásitos en heces obtenidas de la disección del recto de ninfas de *M. pallidipennis*, *T. dimidiata* y adultos de *M. pallidipennis* en el día 9 p.a.

Durante las revisiones de las heces de los triatominos infectados con *T. cruzi* tanto de los experimentos con hemolinfa como con IMA, se pudieron observar diversas morfologías del parásito como esferomastigotes (Figura 25), epimastigotes (Figura 26), rosetas de epimastigotes (Figura 27 y 30), rosetas formadas por epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos (Figura 28) y tripomastigotes metacíclicos (Figura 29).



Figura 25. Esferomastigote en (flecha) heces de ninfas de *M. pallidipennis* en el día 16 p. a. con ratones infectados con *T. cruzi* (40X)

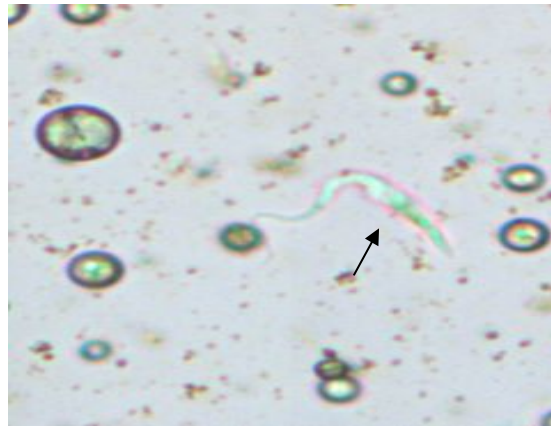


Figura 26. Epimastigote (flecha) en heces de ninfas de *M. pallidipennis* en el día 16 p.a. con ratones infectados con *T. cruzi* (40X)

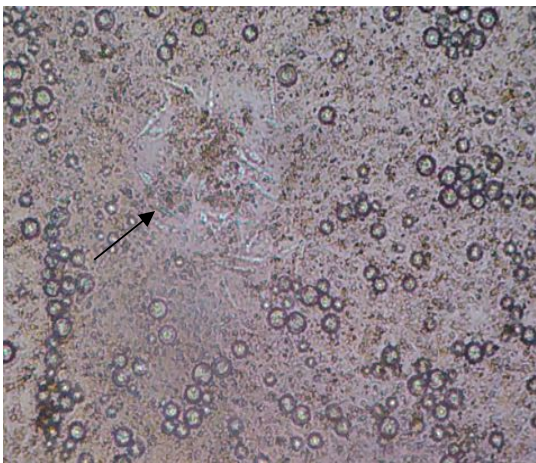


Figura 27. Roseta de epimastigotes (flecha) en heces de macho de *M. pallidipennis* en el día 9 p.a. con ratones infectados con *T. cruzi* (40X)

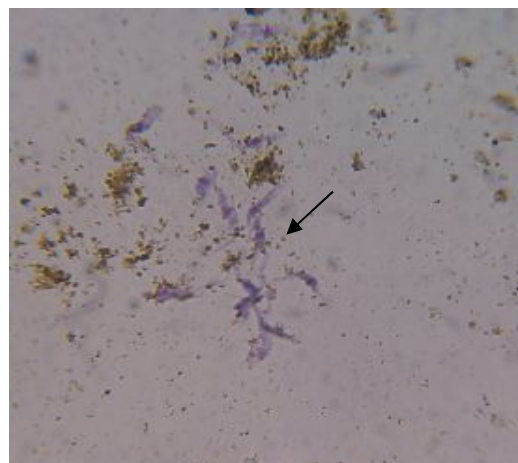


Figura 28. Epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos en heces de macho de *M. pallidipennis* en el día 9 p.a. con ratones infectados con *T. cruzi*. Tinción de Giemsa (100X)

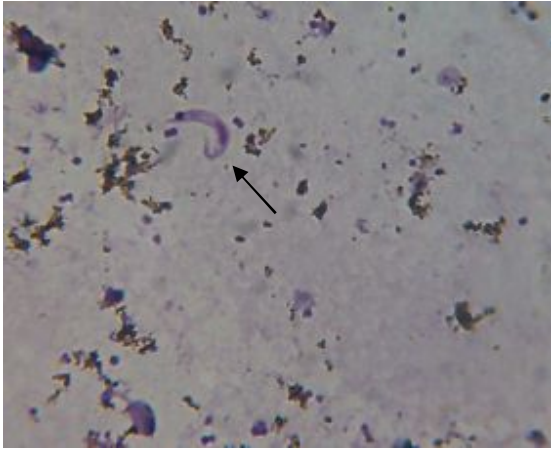


Figura 29. Tripomastigote metacíclico (flecha) en heces de macho de *M. pallidipennis* en el día 9 p.a. con ratones infectados con *T. cruzi*. Tinción de Giemsa (100X)

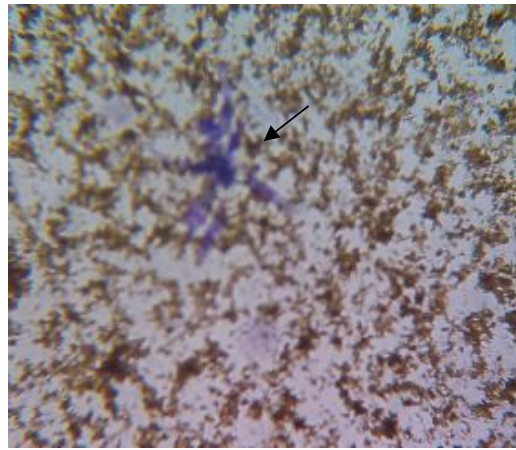


Figura 30. Roseta de epimastigotes en heces de *M. pallidipennis* macho en el día 9 p. a. con ratones infectados con *T. cruzi*. Tinción de Giemsa (100X)

9.2 Actividad de PO natural y PO total en hemolinfa de ninfas de *M. pallidipennis* en los días 0, 1 4, 7, 9, 16 y 28 p. a.

En los días posteriores a la alimentación (p. a.) se pudo observar un descenso de la actividad de PO natural en el grupo infectado ($p = 0.03$) respecto al grupo testigo ($p = 0.91$). Al comparar ambos grupos de insectos, se encontraron diferencias significativas entre grupos en los días p. a. ($p = 0.008$) (Tabla 5, Figura 31).

En la actividad de la PO total se observó una disminución en el día 4 en el grupo infectado (11.9 U) respecto al testigo y (18.1 U) ($p = 0.003$) y un aumento de esta actividad en el día 16 (26.8 U) ($p = 0.0005$), disminuyendo en el día 28 (24.3 U) ($p = 0.72$). Al comparar ambos grupos de insectos, se encontraron diferencias significativas ($p = 0.0011$) (Tabla 5, Figura 32).

Tabla 5. Cuantificación de proteínas, actividad de PO natural y PO total (U) (Medias±ES) en hemolinfa de ninfas de *M. pallidipennis* infectadas con el aislado Morelos de *T. cruzi* en los días 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28 p.a.

Días posteriores a la alimentación	Cuantificación de proteínas (µg/ml)		Actividad de PO natural (U)		Actividad de PO total (U)	
	Testigo	Infectado	Testigo±ES	Infectado±ES	Testigo±ES	Infectado±ES
	0	27600	21000	10.9±1.4	9.9±1.1	18.6±1.8
1	19200	18660	11.0±1.1	8.7±1.0	18.7±1.5	12.9±1.1
4	22060	19800	9.8±0.9	7.6±0.8	18.1±1.4	11.9±1.1
7	27700	25300	10.3±1.0	7.8±0.8	19.5±2.8	15.9±1.6
9	33220	28620	9.6±1.1	6.1±0.8	18.2±4.1	18.9±2.9
16	26640	36500	9.4±1.0	6.2±1.0	19.6±2.8	26.8±3.2
28	33300	31740	10.6±1.5	6.1±0.6	22.8±4.2	24.3±3.1

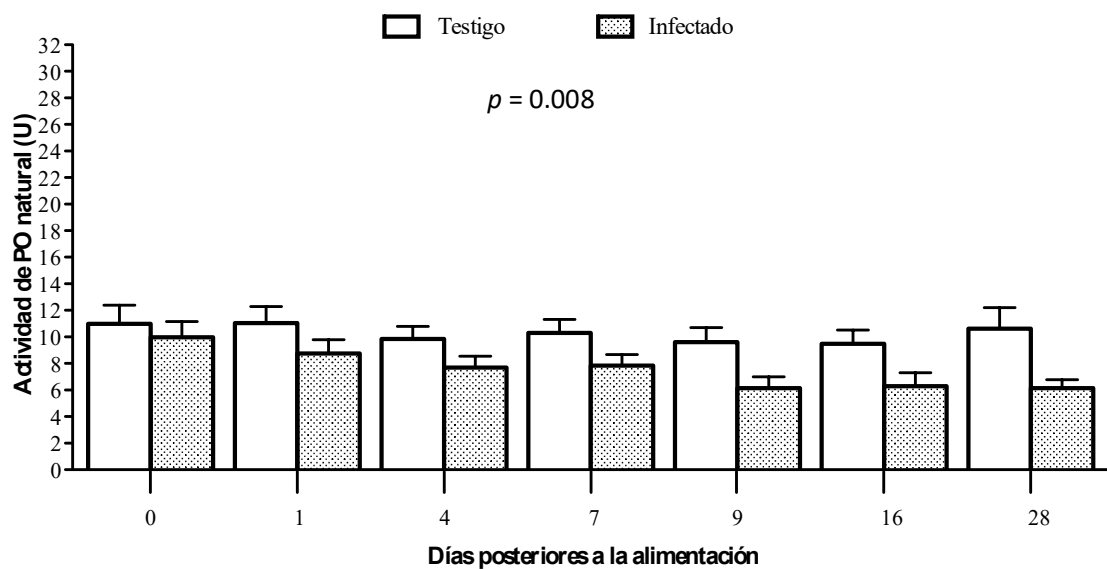


Figura 31. Actividad de PO natural en hemolinfa de ninfas de *Meccus pallidipennis*.

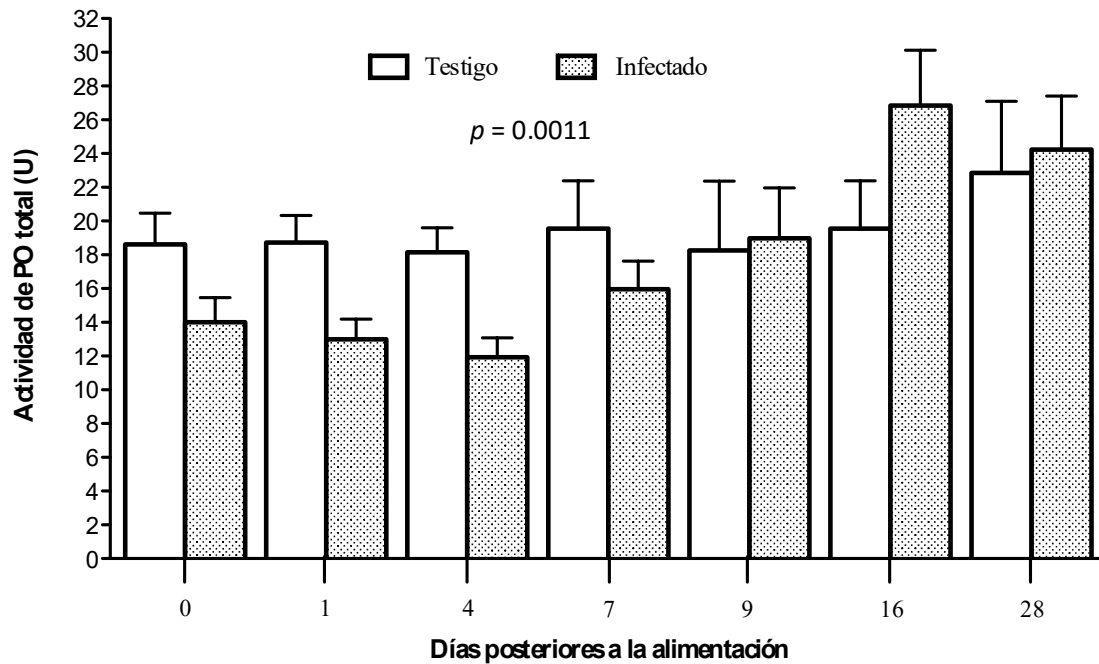


Figura 32. Actividad de PO total en hemolinfa de ninfas de *Meccus pallidipennis*.

9.3 Actividad de PO natural y PO total en IMA de ninfas de *M. pallidipennis* en los días 0, 1 4, 7, 9, 16 y 28 p.a.

La actividad de PO natural en el IMA de ninfas de quinto estadio de *M. pallidipennis* mostró un aumento en el día 4 p. a. en el grupo infectado (1.4 U) con respecto al grupo testigo (1.2 U) ($p = 0.45$), en el día 7 se observó un descenso de la actividad de PO natural en el grupo infectado (1.0 U) respecto al grupo testigo (1.2 U) ($p = 0.81$) y en los días 9, 16 y 28 los valores del grupo infectado se mantuvieron constantes (0.6 U) (Tabla 6, figura 33). Al comparar ambos grupos de insectos, sólo se encontraron diferencias significativas en el día 9 p. a. ($p = 0.03$).

En la actividad de la PO total en el IMA se observó el día 4 p. a., una disminución de la actividad de PO total del grupo infectado (2.3 U) con respecto al testigo (2.4 U) ($p = 0.55$), otro descenso en el día 9 (1.7 U) ($p = 0.034$) y un aumento en el día 28 (2.9 U) ($p = 0.001$) (Tabla 6, figura 34). Al comparar ambos grupos de insectos, se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 0.0001$).

Tabla 6. Actividad de PO natural y actividad de PO total (U) (Medias±ES) en IMA de ninfas de *M. pallidipennis* infectadas con el aislado Morelos de *T. cruzi* en los días 0, 1, 4, 7, 9, 16 y 28 p.a.

Días posteriores a la alimentación	Actividad de PO natural (U)		Actividad de PO total (U)	
	Testigo±ES	Infectado±ES	Testigo±ES	Infectado±ES
	0	0.7±0.2	0.4±0.1	2.4±0.1
1	1.0±0.2	1.1±0.2	2.4±0.1	1.9±0.2
4	1.2±0.3	1.4±0.2	2.4±0.1	2.3±0.2
7	1.2±0.2	1.0±0.1	2.1±0.2	2.3±0.2
9	1.1±0.1	0.6±0.2	2.0±0.2	1.7±0.1
16	1.1±0.2	0.6±0.1	1.9±0.2	1.7±0.1
28	1.0±0.2	0.6±0.1	2.4±0.1	2.9±0.2

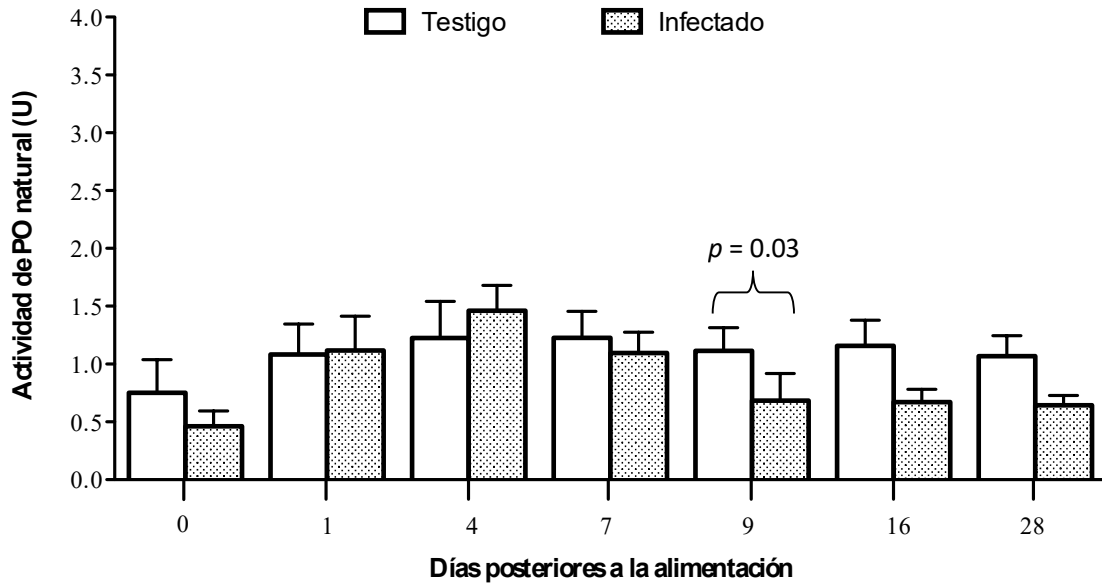


Figura 33. Actividad de PO natural en intestino medio anterior (IMA) de ninfas de *Meccus pallidipennis*.

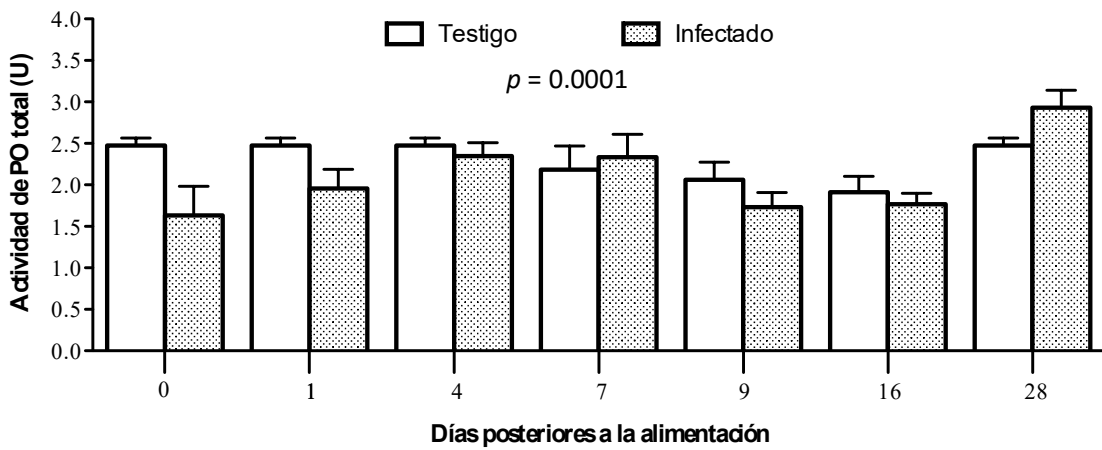


Figura 34. Actividad de PO total en intestino medio anterior (IMA) de ninfas de *Meccus pallidipennis*.

9.4 Actividad de PO natural y PO total en IMA de ninfas de *M. pallidipennis*, *T. dimidiata* y adultos de *M. pallidipennis* en el día 9 p. a.

La actividad de PO natural en el IMA de ninfas infectadas de *M. pallidipennis* en el día 9 mostró una disminución (0.6 U) en comparación con el grupo testigo (1.1 U) (Figura 35 y Tabla 7). Al comparar ambos grupos de insectos, se encontraron diferencias significativas ($p = 0.03$).

La actividad de PO natural en el IMA del grupo infectado (1.5 U) de ninfas de *T. dimidiata* en el día 9 mostró un aumento en comparación con el grupo testigo (1.2 U) (Figura 35 y Tabla 7). Al comparar ambos grupos de insectos, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$).

La actividad de PO natural en el IMA del grupo infectado de adultos hembras (0.8 U) de *M. pallidipennis* en el día 9 mostró un aumento en comparación con el grupo testigo (0.3 U) (Figura 35 y Tabla 7). Al comparar ambos grupos de insectos, se encontraron diferencias significativas ($p = 0.028$).

La actividad de PO natural en el IMA del grupo infectado de machos (0.6 U) de *M. pallidipennis* en el día 9 mostró un aumento en comparación con el grupo testigo (0.4 U) (Figura 35 y Tabla 7). Se encontraron diferencias significativas ($p = 0.024$), al comparar ambos grupos de insectos.

Al realizar la comparación de la actividad de PO natural obtenida para machos (0.6 U) y hembras (0.8 U), se pudo observar que el grupo infectado de las hembras presentó un valor más alto que los machos ($p = 0.035$) (Figura 35).

Los valores para ninfas de *T. dimidiata* infectadas (1.5 U) son mayores, a diferencia del grupo infectado de ninfas de *M. pallidipennis* (0.6 U) ($p = 0.040$) (Figura 35).

Con respecto a la actividad de la PO total, se observó que las ninfas de *T. dimidiata*, de *M. pallidipennis* y las hembras de *M. pallidipennis*, presentaron la actividad de PO similar entre los grupos infectados y la de los grupos testigos correspondientes sin diferencias estadísticas

significativas. Tampoco hubo diferencias significativas entre el grupo de machos ($p = 0.0716$) (Figura 36).

Tabla 7. Actividad de PO natural y actividad de PO total (U) (Medias \pm ES) en IMA de ninfas de *M. pallidipennis*, *T. dimidiata* y adultos de *M. pallidipennis* infectados con *T. cruzi* en el día 9 p.a.

Estadio/ especie de Triatomino	Actividad de PO natural (U)		Actividad de PO total (U)	
	Testigo \pm ES	Infectado \pm ES	Testigo \pm ES	Infectado \pm ES
	<i>M. pallidipennis</i> n5	1.1 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2	2.0 \pm 0.2
<i>T. dimidiata</i> n5	1.2 \pm 0.3	1.5 \pm 0.5	2.4 \pm 0.2	1.9 \pm 0.1
<i>M. pallidipennis</i> Hembras	0.3 \pm 0.1	0.8 \pm 0.2	2.1 \pm 0.2	1.9 \pm 0.1
<i>M. pallidipennis</i> Machos	0.4 \pm 0.1	0.6 \pm 0.3	2.3 \pm 0.1	2.4 \pm 0.3

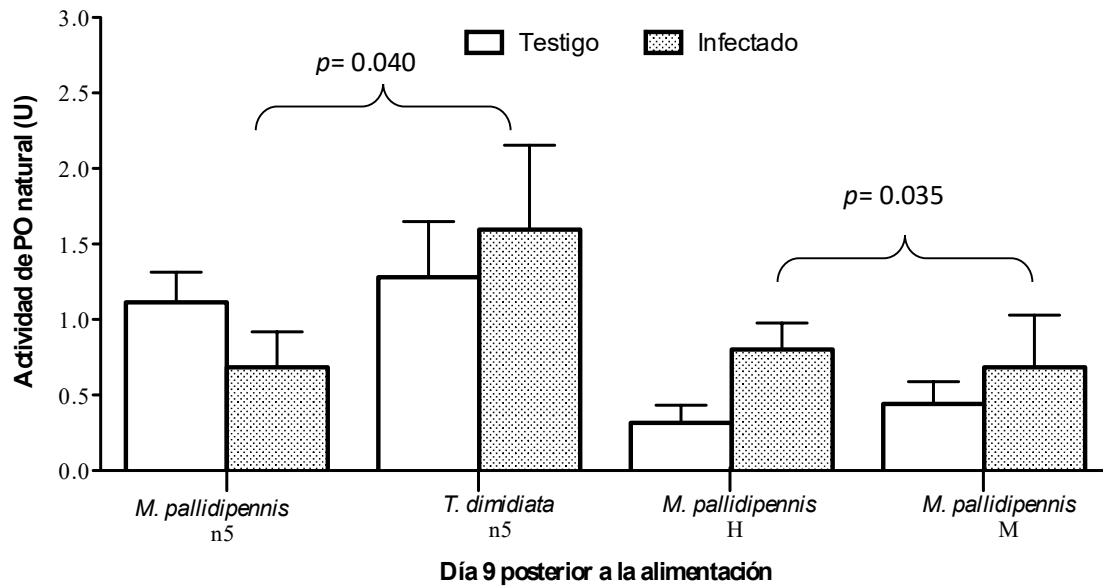


Figura 35. Actividad de PO natural en intestino medio anterior (IMA) de ninfas de *Meccus pallidipennis*, *T. dimidiata* y adultos de *M. pallidipennis*. H= hembras, M= machos.

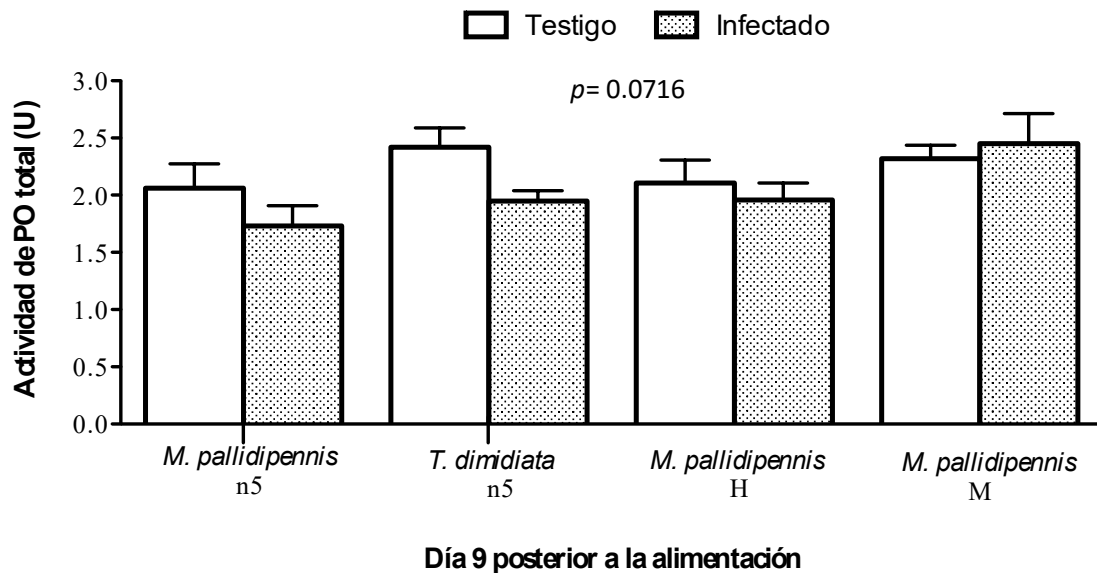


Figura 36. Actividad de PO total en intestino medio anterior (IMA) de ninfas de *Meccus pallidipennis*, *T. dimidiata* y adultos de *M. pallidipennis*. H= hembras, M= machos.

9.5 Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-eosina y PAS

En los cortes de intestino medio anterior (IMA) en el día 9 p. a. de ninfas no infectadas de *Meccus pallidipennis*, teñidos con hematoxilina-eosina se observaron las tres principales regiones de las células del epitelio del intestino: apical, media y basal. En la región apical se pudieron observar bordes en peine (BP) y células epiteliales adheridas entre ellas. La región media muestra núcleos redondos (N) y la presencia de algunos gránulos teñidos (Figura 37a).

En ninfas infectadas en el día 9 p. a. se observó en la región apical zonas de mayor engrosamiento y desprendimiento de células de epitelio intestinal hacia el lumen intestinal (L) (Figura 37b). La zona media muestra la presencia de núcleos redondos y teñidos, la zona basal está bien delimitada. También se observó en la zona apical cúmulos adheridos (flechas), que sugieren la presencia de parásitos (Figura 37c y 37d) y bordes en peine (BP) (Figura 37d).

En los cortes de intestino medio anterior (IMA) de ninfas de *Meccus pallidipennis* teñidos con PAS, se observaron regiones con presencia de zonas PAS positivas (gliconjugados) principalmente en la zona apical donde se encuentran los bordes en peine (Figura 38a) en ninfas libres de infección e infectadas. La presencia de la membrana perimicrovellosa se hizo más evidente en ninfas alimentadas con ratón infectado (Figura 38b), así mismo se observaron en este grupo regiones positivas con gránulos citoplásmicos de las células del epitelio intestinal y la presencia del parásito adherido a la membrana perimicrovellosa y libres en el lumen intestinal (Figura 38c y 38d); a diferencia de las ninfas libres de infección (Figura 38a).

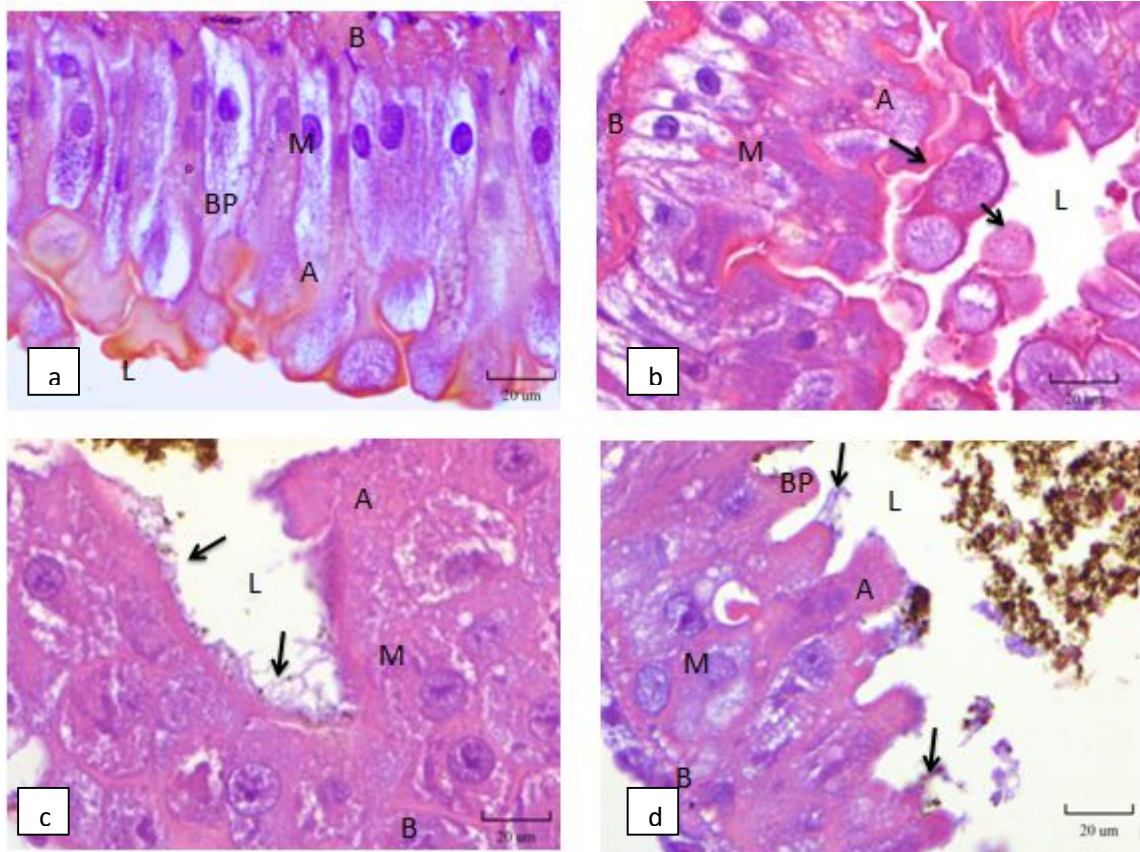


Figura 37. Cortes de IMA teñidos con hematoxilina-eosina de ninfas de *M. pallidipennis*. a) ninfa no infectada en el día 9 posterior a la alimentación, se observa la presencia de epitelio uniforme, zona apical (A) con bordes en peine (BP), zona media (M) y basal (B), b) ninfa infectada en el día 9 p.a. Se observa la región apical con mayor engrosamiento y desprendimiento de células del epitelio (flechas) hacia el lumen intestinal (L), la zona media y basal se observan bien delimitadas, c) y d) ninfa infectada en el día 9 p.a., se observa un mayor engrosamiento de la zona apical, en esta zona se observan adherencias (flechas) que sugieren presencia de parásitos. En la zona media se observan núcleos redondos y teñidos. En el lumen intestinal se observa sangre no digerida y algunos restos que sugieren ser parásitos. 400X.

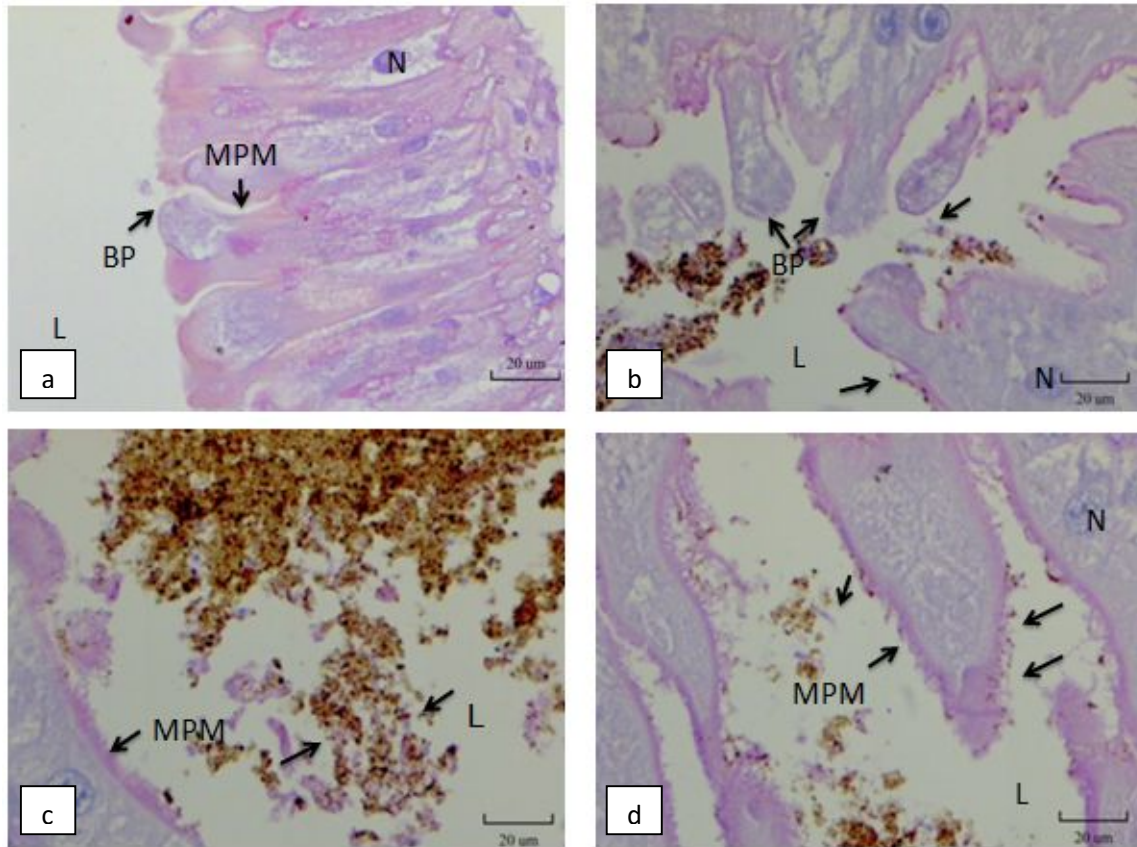


Figura 38. Cortes teñidos con PAS de IMA de ninfas de *M. pallidipennis* en el día 9 p. a.

a) Ninfa alimentada con ratón libre de infección, se observa la presencia de bordes en peine (BP) con ligeras zonas PAS positivas sin presencia de parásitos adheridos o libres en el lumen intestinal. La membrana perimicrovellosa (MPM) se observa con ligero engrosamiento, células epiteliales uniformes y no se observa desprendimiento de epitelio, b) Ninfa alimentada con ratón infectado con *T. cruzi*, presencia de bordes en peine (BP) con zonas PAS positivas con presencia de la membrana perimicrovellosa, se observa sangre no digerida en el lumen con presencia de posibles restos de parásitos (flechas), c) Ninfa alimentada con ratón infectado con *T. cruzi*. Zona PAS positiva indicando presencia de la membrana perimicrovellosa, se observa sangre no digerida en el lumen con presencia de posibles restos de parásitos (flechas), d) Ninfa alimentada con ratón infectado con *T. cruzi*. Zonas PAS positivas que indican la presencia de la membrana perimicrovellosa y parásitos adheridos y libres (flechas).400X.

9.6 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Después de analizar por MEB el IMA de ninfa de *M. pallidipennis* en el día 9 p.a. con *T. cruzi*, se observaron domos de células epiteliales (prolongaciones citoplasmáticas), gran cantidad de bacterias y tripomastigote metacíclico (Figura 39 - 41).

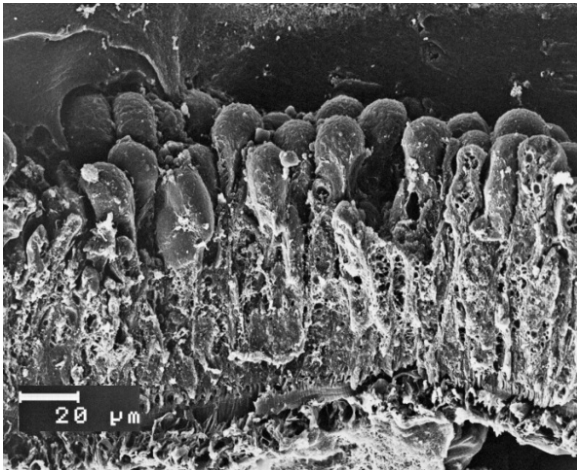


Figura 39. Domos de células epiteliales (prolongaciones citoplasmáticas) de IMA de ninfa de *M. pallidipennis* en el día 9 p.a con ratones infectados con *T. cruzi*.

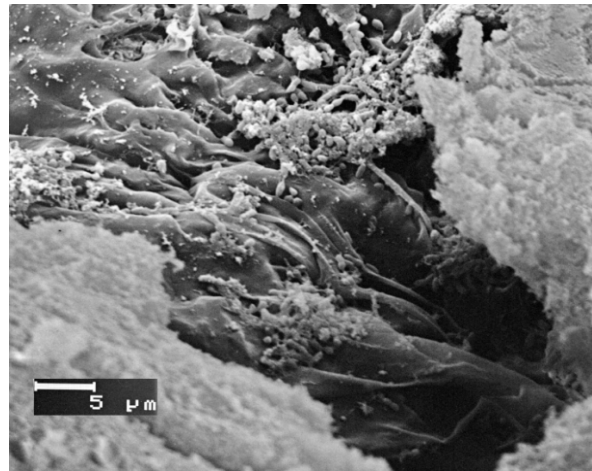


Figura 40. Presencia de cúmulos de bacterias en IMA de ninfa de *M. pallidipennis* en el día 9 p.a con ratones infectados con *T. cruzi*.

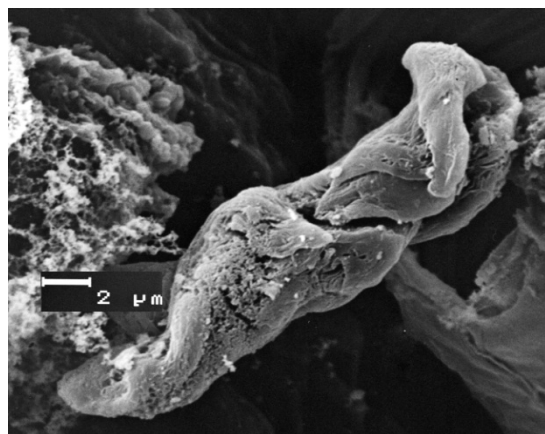


Figura 41. Presencia de tripomastigote metacíclico en IMA de ninfa de *M. pallidipennis* en el día 9 p.a con ratones infectados con *T. cruzi*.

10. Discusión

En estudios previos se han señalado los tiempos en que un triatomino puede infectarse con *Trypanosoma cruzi*, en el transmisor *Panstrongylus megistus*, las formas metacíclicas aparecen en las heces de las ninfas entre 6 y 15 días posteriores a la alimentación, de igual forma se hace énfasis sobre las diferentes formas del parásito a lo largo del tracto digestivo, se han observado epimastigotes en cortes histológicos del intestino y adheridos en el recto formas metacíclicas (Zeledón, 1997). En los triatominos infectados para el estudio de PO natural y total en la hemolinfa, los parásitos fueron localizados en las heces el día 7 p.a. y en los triatominos para el experimento con IMA, los parásitos se localizaron a partir del día 4 p.a., tales diferencias pueden deberse a la cantidad de muestra obtenida, ya que en los primeros se usó compresión abdominal del insecto y en el segundo se obtuvieron las heces directamente de la disección del recto. El número de parásitos en ambos casos se encuentran en el mismo rango reportado; aunque en otro estudio en el que se utiliza *M. pallidipennis* para xenodiagnóstico, se observaron 5 parásitos en el día 30 posterior a la alimentación en ninfas de tercer estadio y 8 parásitos en ninfas de cuarto estadio (Alejandre-Aguilar *et al.*, 1993).

Son pocos los estudios que determinan el día postinfección en que aparece el parásito en heces, así como la cuantificación de éstos en las heces obtenidas del contenido rectal. Monteón *et al.*, 2009, demostraron en ninfas de *T. dimidiata* infectadas con aislados provenientes de Campeche, Oaxaca, Veracruz, Guerrero y Nayarit que los primeros tripomastigotes se observaron en heces obtenidas por compresión abdominal en el día 7 posterior a la alimentación. En ninfas de quinto estadio de *Triatoma infestans*, se ha reportado que la densidad de población en el vector alcanza su mayor pico después de 3 meses, mientras que en el estómago se presentan 500, 000 parásitos, en el recto, se alcanza una población de 1, 500, 000 (Schaub *et al.*, 2011). En este estudio de PO natural y total en ninfas de *T. dimidiata* sólo se cuantificaron los parásitos en heces el día 9, debido a la limitada cantidad de ejemplares de esta especie y la cantidad de parásitos fue de 275,000, se estima que la diferencia en este estudio es debido al periodo en días en que se realizó la cuantificación.

La cuantificación de parásitos en triatominos es una herramienta útil en programas donde se considere la reducción de la tasa de infección en humanos. En los laboratorios se hace de manera habitual la detección del parásito en las heces obtenidas por compresión abdominal o disección intestinal por microscopía óptica. Aunque esta técnica es útil, la sensibilidad puede ser afectada cuando se requiere revisar gran número de insectos o ejemplares muertos, en

donde la detección mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una alternativa como lo reportan en ejemplares colectados en campo de *T. infestans* en la región Chiquisaca, Bolivia cuyo resultado fue más eficaz, que la microscopía óptica. La técnica de PCR deberá ser valorada en ejemplares utilizados en experimentos en laboratorio (Pizarro *et al.*, 2007).

En la revisión de heces de los triatominos infectados con *T. cruzi* de ninfas y adultos, se pudo observar la presencia de diferentes morfologías del parásito además de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos, lo que coincide con lo reportado en el tracto digestivo de los triatominos (Garcia *et al.*, 2010a).

La infección de *R. prolixus* con parásitos como *T. rangeli* y *T. cruzi*, induce una respuesta en cuanto a la producción de proPO y actividad de la enzima PO en tejidos como hemolinfa e IMA (Gregorio y Ratcliffe, 1991; Mello *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2015). Debido a las diferencias que existen en los ciclos de desarrollo de estos parásitos en los triatominos, se han podido observar respuestas diferentes en el sistema proPO. *T. rangeli* provoca una inhibición de la actividad de la PO en hemolinfa (Gomes *et al.*, 2003, Gregorio *et al.*, 2012, Mello *et al.*, 1995,) e IMA (Vieira *et al.*, 2015), mientras que *T. cruzi* provoca un aumento de esta actividad en IMA (Castro *et al.*, 2012).

Mello *et al.*, 1995, después de inocular a *T. cruzi* y *T. rangeli* en el tórax de *R. prolixus* y medir la actividad de PO en hemolinfa, observaron primero un aumento y después una disminución para ambos parásitos; solo *T. rangeli* sobrevivió en la hemolinfa debido a la capacidad inhibitoria de éste sobre la respuesta inmune celular y humoral.

En nuestros resultados de la actividad enzimática de la PO natural en hemolinfa de ninfas de *M. pallidipennis* infectadas con *T. cruzi*, observamos una disminución en la actividad de la PO natural en comparación con el grupo testigo, lo cual fue similar a lo observado por Mello *et al.*, 1995, aun con las diferencias acerca de la vía de inoculación del parásito; ellos ocuparon inoculación torácica, mientras que nosotros utilizamos inoculación oral. *T. cruzi*, no estuvo en contacto con la hemolinfa y aun así se presentó una disminución en la actividad de PO natural, lo que podría explicarse por la participación de una respuesta sistémica. Se ha reportado en *R. prolixus* que cuerpo graso e IMA aún sin ser estimulados directamente con algún patógeno, son capaces de mostrar una respuesta inmune (Lopez *et al.*, 2003).

En los resultados de la PO total en hemolinfa de ninfas de *M. pallidipennis* (grupo infectado), se observó aumento de ésta a partir del día 7 p.a. con 15.9 U hasta 24.3 U en el día 28, lo que podría relacionarse con la presencia tripomastigotes metacíclicos en heces a partir del día 7 p.a. y que la cantidad de parásitos en el triatomino fuese importante como para inducir este tipo de respuesta inmune. Si comparamos la actividad de la PO natural con la de la actividad de PO total se observa un fenómeno inverso, ya que se incrementa la actividad enzimática (PO total), lo cual indica que existe una cantidad considerable de proPO que no es activada durante la infección con *T. cruzi*, éste no se considera patógeno en triatominos, hasta el momento se ha visto que no lo afecta y tampoco causa su muerte; sin embargo, algunos autores proponen que lo afecta disminuyendo su fecundidad, longevidad y absorción de nutrientes (Schaub, 1989). La PO juega un papel importante en la inmunidad del insecto y también participa en varias de sus funciones fisiológicas, por lo que su utilización debe de estar bien regulada, no debe existir una activación descontrolada de la proPO; ya que durante el proceso de melanogénesis, que es donde participa la PO, se producen muchas moléculas tóxicas, lo cual, podría ser letal para el mismo triatomino (Lu *et al.*, 2014).

Castro *et al.*, 2012, después de infectar a *R. prolixus* oralmente con la cepa Dm28c de *T. cruzi* y medir la actividad de la PO en el día 9 p.a. en el IMA, observaron un aumento de ésta en comparación con el grupo testigo y encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

En nuestro estudio, al medir la actividad de la PO en IMA de ninfas de *M. pallidipennis* en diferentes días p.a. se obtuvieron diferencias significativas únicamente en el día 9, en donde el valor de la actividad del grupo infectado fue de 0.6 U y el del grupo testigo fue de 1.1 U.; Castro *et al.*, 2012, reportan diferencias significativas también en el día 9, sin embargo, la actividad de la PO fue mayor en el grupo infectado que en el testigo, debido quizá a la cepa de *T. cruzi* que utilizaron o a la especie del triatomino, ya que se ha visto en diferentes investigaciones que los triatominos responden de forma diferente ante la infección con *T. cruzi*, la cual dependerá de la cepa del parásito y la especie del insecto vector (García *et al.*, 2010a).

En relación a la PO total en IMA de ninfas de *M. pallidipennis*, se observó que los valores fueron semejantes en la medición realizada en los 7 días, pero con diferencias significativas. Esto podría deberse a que en este sitio haya una mejor regulación de la proPO al ser menor la cantidad que existe en comparación con la que existe en hemolinfa, donde es mayor. También

se observó que la actividad de la PO total fue mayor que la de la PO natural; esto indica que hay una gran cantidad de proPO que no se está activando, y que quizá podría deberse a la inhibición de la activación de la proPO por parte del parásito para no ser eliminado.

Al comparar la actividad de la PO natural en IMA en el día 9 p. a. en ninfas de *M. pallidipennis* infectadas con *T. cruzi* (0.6 U) con ninfas de *T. dimidiata* infectadas (1.5 U), se encontraron diferencias significativas ($p = 0.040$), debido a que son diferentes especies de transmisores y los aislados obtenidos de estos triatomíneos son diferentes en cuanto a su virulencia (Koyoc-Cardena *et al.*, 2015); en *T. dimidiata* se han obtenido aislados más virulentos que los obtenidos de *M. pallidipennis* (Mendoza-Rodríguez, 2015). Tal virulencia puede deberse a que se han encontrado altos índices de metaciclojenia en *T. dimidiata*, es decir, mayores formas de tripomastigotes metacíclicos (26%) en comparación con *M. pallidipennis* (15%) (Monteón *et al.*, 2009) Al comparar los valores de PO natural en IMA de ninfas de *T. dimidiata* del grupo testigo (1.2 U) y el infectado (1.5 U), se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$), lo que podría deberse a la alta cantidad de parásitos en la cepa ITRI/MX/15/TC700

Cuando se compararon los niveles de actividad de la PO natural entre machos y hembras, se observaron diferencias significativas ($p = 0.035$) ya que el grupo infectado de las hembras fue más alto (0.8 U) que el de los machos (0.6 U); lo que podría deberse a que las hembras durante el proceso de infección oral con *T. cruzi*, hayan ingerido más sangre en promedio posterior a la alimentación (0.625 g) que los machos (0.414 g) y por ende las hembras ingieran una mayor cantidad de tripomastigotes sanguíneos y la respuesta inducida de componentes como PO natural, este directamente relacionada con la carga parasitaria. La cuantificación de parásitos final para hembras fue de 1666, 666 parásitos/ml y en machos fue de 1333, 333 parásitos/ml.

Al comparar los resultados obtenidos de la actividad de PO natural y PO total que se obtuvieron en hemolinfa e IMA, se observa que los valores en hemolinfa fueron más elevados que los obtenidos en IMA; esto debido a que la proPO es producida principalmente por hemocitos, presentes en la hemolinfa y que la proPO en el epitelio del IMA se produce en cantidades más pequeñas (Moreno-García *et al.*, 2013). Las diferencias de los valores, también podrían estar relacionadas a una coevolución en la relación hospedero-parásito, ya que *T. cruzi* esta presente solo en el intestino del triatomíneo durante todo su ciclo de vida; por lo que, es en este órgano

donde debe evadir la respuesta inmune del huésped, más que en la hemolinfa, donde aún no hay reportes de la presencia de *T. cruzi*.

Para llevar a cabo su ciclo de vida *T. rangeli*, pasa por varios sitios (intestino, hemolinfa y glándulas salivares), en contraste, *T. cruzi* se multiplica y diferencia exclusivamente en el intestino de los triatominos (Kollien *et al.*, 2000) y tiene la capacidad de fijarse a las diferentes partes del intestino de los triatominos para multiplicarse y dividirse. La interacción de *T. cruzi* con la membrana perimicrovellosa de los triatominos es muy importante, actúa como un sitio de adhesión para los epimastigotes, el cual es un proceso esencial para el establecimiento en el insecto vector y de esto dependerá que el parásito logre con éxito la diferenciación a tripomastigotes metacíclicos (Gutiérrez-Cabrera *et al.*, 2015).

Los estudios que se han realizado sobre la membrana perimicrovellosa de los triatominos y el efecto que provoca *T. cruzi* en ésta, son escasos. Gutiérrez- Cabrera *et al.*, 2015, estudiaron los cambios de las células epiteliales del IMA en respuesta a la inanición en los días 10,15 y 20 después de alimentarlos con sangre de ratones sin infección. En los insectos sin alimentar se observaron células epiteliales conectadas entre sí, y libres de una membrana perimicrovellosa, en los insectos que tenían 15 o 20 días de haber sido alimentados se podía observar la membrana perimicrovellosa completamente desarrollada hasta el lumen intestinal del IMA; de lo anterior concluyen que la alimentación de los triatominos es muy importante para el desarrollo adecuado de la membrana perimicrovellosa y que junto con sus componentes contribuyen al establecimiento y replicación de *T. cruzi*.

En este estudio, encontramos en el IMA al igual que Gutiérrez-Cabrera *et al.*, 2015, un engrosamiento de la membrana perimicrovellosa al transcurrir los días p.a.; sin embargo, la alimentación de los triatominos fue diferente, ya que se realizó con ratones infectados con *T. cruzi*. Otras observaciones diferentes en el IMA fueron que en el día 9 p.a. se observó el desprendimiento de células epiteliales hacia el lumen intestinal y mayor engrosamiento de la membrana perimicrovellosa. También se observaron múltiples adherencias en la zona apical de la membrana perimicrovellosa, lo cual sugiere, la presencia de *T. cruzi* adherido a ésta.

La importancia de las condiciones de alimentación en triatominos para el desarrollo de la membrana perimicrovellosa ha sido señalada en estudios previos. Rivas-Medina, 2014 reportó

los cambios en tejido epitelial de triatominos en ayuno y 10 días posteriores a la alimentación de *M. pallidipennis* y *Triatoma barberi*, donde predomina la presencia de zonas PAS positiva y gránulos en el epitelio pseudoestratificado. Nuestro estudio considera la alimentación de *M. pallidipennis* con sangre de ratones infectados a los 9 días p.a. y las principales diferencias son las zonas PAS positiva en la región de la membrana perimicrovellosa y la observación de parásitos adheridos a ésta.

En el estudio de Gutiérrez-Cabrera *et al.*, 2014, se muestran zonas PAS positivas en insectos libres de infección a los 10, 15 y 20 días posterior a la alimentación, en nuestro estudio se observan en el día 9 p.a., zonas PAS positivas principalmente en insectos infectados, lo que sugiere la importancia del desarrollo de la membrana perimicrovellosa como un sitio de adhesión para el establecimiento de *T. cruzi*. Lo anterior se correlaciona con la baja actividad que se observó en los experimentos de PO natural en IMA, lo que también puede influir en el establecimiento del parásito.

11. Conclusiones

- La actividad de PO natural y total en la hemolinfa de ninfas de *M. pallidipennis* indicó una respuesta sistémica en el triatomino, ya que es un órgano donde no se desarrolla *Trypanosoma cruzi*.
- Existe proPO que no es activada durante la infección con *T. cruzi*.
- Se encuentra correlación entre la actividad disminuída de PO natural en IMA de ninfas de *M. pallidipennis* infectadas con el día p. a. y una elevada cantidad de parásitos.
- La actividad de PO natural en IMA en ninfas infectadas podría estar asociada a la especie del triatomino, la cepa de *T. cruzi* y cantidad de parásitos.
- La actividad de PO natural en IMA en ninfas y adultos de *M. pallidipennis* es similar cuando están infectados con *T. cruzi*.
- Se confirmó el desarrollo de la MPM y adherencia de *T. cruzi* en el día 9 p. a.

12. Perspectivas

- Continuar los estudios de PO en hemolinfa e IMA en otros estadios de desarrollo, otras especies de triatominos y diferentes cepas del parásito, para identificar la actividad de esta enzima regulada por *Trypanosoma cruzi*.
- Considerar en futuras investigaciones el estudio del desarrollo de la membrana perimicrovellosa en insectos infectados y su correlación con la adhesión y establecimiento de *T. cruzi*.

13. Referencias bibliográficas

- Alejandro-Aguilar R, Noguera-Torres B, Calvo-Méndez ML, Cortés-Jiménez M. 1993. **Estudio comparativo de la susceptibilidad de cinco especies de triatominos (Insecta: Reduviidae) a la infección con *Trypanosoma cruzi***. Revista latinoamericana de microbiología 35: 201-206.
- Audesirk T, Audesirk G, Byers B.E. 2003. **Circulación**. En: Audesirk T, Audesirk G, Byers B.E. Biología: la vida en la tierra. Pearson Educación, México, pp 550.
- Apt-B W, Heitmann-G I, Jercic-L MA, Jofré-M L, Muñoz-C del V P, Noemi-H I, San Martín-V AM, Sapunar-P J, Torres-H M, Zulantay-A I. 2008. **Parte VI. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas**. Revista chilena de infectología 25: 384-389.
- 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**. Revista Biología, Ciencia y Tecnología 5: 327-340.
- Bern C. 2011. **Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease**. The New England journal of Medicine 364: 2527-2534.
- Bern C. 2015. **Chagas' Disease**. The New England journal of Medicine 373: 456-466.
- Carrada-Bravo T. 2004. ***Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas**. Revista Mexicana de Patología Clínica 51: 205-219.
- Carcavallo RU, Franca-Rodríguez ME, Salvatella R, Curto de Casas SI, Sherlock IS, Galvao C, da Silva-Rocha D, Galíndez-Girón I, Otero-Arocha MA, Martínez A, Aristeu-Da Rosa J, Canale DM, Farr TH, Barata JMS. 1997. **Habitats and related fauna**. En: Carcavallo RU, Galíndez-Giron I, Jurberg J, Lent H. Atlas of Chagas disease vectors in the americas. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 561-578.
- Castro DP, Moraes CS, Gonzalez MS, Ratcliffe NA, Azambuja P, Garcia ES, 2012. ***Trypanosoma cruzi* Immune Response Modulation Decreases Microbiota in *Rhodnius prolixus* Gut and Is Crucial for Parasite Survival and Development**. PLoS ONE 7: e36591.
- Castellanos-Moguel J, Mier T, Reyes-Montes MR, Navarro-Barranco H, Zepeda- Rodríguez A, Pérez-Torres A, Toriello C. 2013. **Fungal growth development index and**

ultrastructural study of whiteflies infected by three *Isaria fumosorosea* isolates of different pathogenicity. Revista Mexicana de Micología 38: 23-33.

Centers for Disease Control and Prevention. 2013. **American Trypanosomiasis.** Disponible en : www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/

Cerenius L, Luel-Lee B, Söderhäll K. 2008. **The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity.** Trends in Immunology 29: 263-271.

Christensen BM, Lafond MM, Christensen LA. 1986. **Defense reactions of mosquitoes to filarial worms: effect of host age on the immune response to *Dirofilaria immitis* microfilariae.** Journal of Parasitology 72: 212-215.

Córdoba-Aguilar A, Ruiz-Silva D, Munguía-Steyer R, Lanz-Mendoza H. 2011. **Do reproductive activities compromise immunological competence as measured by phenoloxidase activity? Field and experimental manipulation in females of two damselfly species.** Physiological Entomology 36: 335-342.

Cornet S, Gandon S, Rivero A. 2013. **Patterns of phenoloxidase activity in insecticide resistant and susceptible mosquitoes differ between laboratory-selected and wild-caught individuals.** Parasites & Vectors 6: 315.

Crocco L, Catalá S, Martínez M. 2002. **Refugios y lugares donde se encuentra la vinchuca.** En: Crocco L, Catalá S, Martínez M. Enfermedad de Chagas: Módulo de actualización. Científica Universitaria, Argentina, pp. 16-17.

Cuba-Cuba A. 1998. **Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 31: 207-220.

Daquinag AC, Nakamura S, Takao T, Shimonishi Y. 1995. **Primary structure of a potent endogenous dopa-containing inhibitor of phenol oxidase from *Musca domestica*.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 2964-2968.

De la Cruz-Lozano J. 2006. **Sistema circulatorio.** En: De la Cruz-Lozano J. Entomología: morfología y fisiología de los insectos. Palmira Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, pp.151.

Dorn P., Monroy C, Curtis A. 2006. ***Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): A review of its diversity across its geographic range and the relationship among populations.** Infection, Genetics and Evolution 7: 343-352.

- Dorn PL, Calderon C, Melgar S, Moguel B, Solorzano E, Dumontiel E, Rodas A, de la Rúa N, Garnica R, Monroy C. 2009. **Two distinct *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) Taxa Are Found in Sympatry in Guatemala and Mexico.** PLoS Neglected Tropical Diseases 3: e393.
- Eichler S, Schaub GA. 2002. **Development of Symbionts in Triatomine Bugs and the Effects of Infections with Trypanosomatids.** Experimental Parasitology 100: 17-27.
- Eleftherianos I, Revenis C. 2011. **Role and Importance of Phenoloxidase in Insect Hemostasis.** Journal of Innate Immunity 3: 28-33.
- Enríquez-Vara JN, Córdoba-Aguilar A, Guzmán-Franco W, Alatorre-Rosas R, Contreras-Garduño J. 2012. **Is survival after pathogen exposure explained by host's immune strength? A test with two species of white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) exposed to fungal infection.** Environmental Entomology 41: 959-965.
- Espinosa de Aquino W. 2012. **Estudio de moléculas del sistema inmune de *Triatoma pallidipennis* infectado con *Trypanosoma cruzi*.** Tesis de Maestría en Ciencias, UNAM.
- Flores-Villegas AL, Salazar Schettino PM, Córdoba-Aguilar A, Gutiérrez-Cabrera AE, Rojas-Wastavino GE, Bucio-Torres MI, Cabrera-Bravo M. 2015. **Immune defence mechanisms of triatomines against bacteria, viruses, fungi and parasites.** Bulletin of Entomological Research 105: 523-532.
- Galíndez-Girón I, Carcavallo RU, Jurberg J, Galvao C, Lent H, Barata JMS, Pinto-Serra O, Valderrama A. 1997. **External morphology and anatomy.** En: Carcavallo RU, Galíndez-Girón I, Jurberg J, Lent H. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp.53-61
- García ES, Azambuja P. 1991. **Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector.** Parasitology Today 7: 240-244.
- García ES, Azambuja P. 2004. **Lignoids in insects: chemical probes for the study of ecdysis, excretion and *Trypanosoma cruzi* triatomine interactions.** Toxicon 44: 431-440.
- García ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, González MS, Azambuja P. 2007. **Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions.** Journal of Insect Physiology 53: 11-21.

- Garcia ES, Genta FA, Azambuja P, Schaub GA. 2010a. **Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi***. Trends in Parasitology 26: 499-505.
- Garcia ES, Castro DP, Figueiredo MB, Azambuja P. 2010b. **Immune homeostasis to microorganisms in the guts of triatomines (Reduviidae)-A Review**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 105: 605-610.
- Genta FA, Souza RS, Garcia ES, Azambuja P. 2010. **Phenol oxidases from *Rhodnius prolixus*: Temporal and tissue expression pattern and regulation by ecdysone**. Journal of Insect Physiology 56: 1253-1259.
- Germano MD, Roca-Acevedo G, Mougabure-Cueto GA, Toloza AC, Vassena CV, Picollo MI. 2010. **New Findings of insecticide resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from the Gran Chaco**. Journal of Medical Entomology 47: 1077-1081.
- Gillespie JP, Burnett C, Chamley AK. 2000. **The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum***. Journal of Insect Physiology 46: 429-437.
- Gomes SAO, Feder D, Garcia ES, Azambuja P. 2003. **Suppression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli***. Journal of Insect Physiology 49: 829-837.
- González M, Cerecetto H. 2014. **Investigación traslacional en el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas**. Salud Militar 33: 24-31.
- González-Santoyo I, Córdoba-Aguilar A. 2012. **Phenoloxidase: a key component of the insect immune system**. Entomologia Experimentalis et Applicata 142: 1-16.
- Gourbière S, Dorn P, Tripet F, Dumonteil E. 2012. **Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control**. Heredity 108: 190-202.
- Gregório EA, Ratcliffe NA. 1991. **The prophenoloxidase system and in vitro interactions of *Trypanosoma rangeli* with *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* haemolymph**. Parasite Immunology 13: 551-564.
- Gullan PJ, Cranston PS. 2005. **Internal anatomy and physiology**. En: Gullan PJ, Cranston PS. The Insects an outline of entomology. Blackwell Publishing, Reino Unido, pp. 61-65.
- Guevara- Gómez Y. 2015. **Colecta, conservación y tinción de *Trypanosoma cruzi***. En: Velazco-Perales D, Rufino-González Y, Guevara-Gómez Y, Vences-Blanco M.O, De la Rosa-Arana J.L, Otero-Negrete J, Ramírez-Guadarrama A. y Romero-Callejas E.

Manual de práctica “Curso teórico-práctico de Técnicas de Colecta, conservación y tinción para diagnóstico de protozoarios de importancia médica y veterinaria”. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Depto. de Parasitología, UNAM, pp. 55-56.

Gutiérrez-Cabrera AE, Alejandre-Aguilar R, Hernández-Martínez S. 2014. **Development and glycoprotein composition of the perimicrovillar membrane in *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae).** Arthropod Structure & Development 43: 571-578.

Gutiérrez-Cabrera AE, Córdoba-Aguilar A, Zenteno E, Lowenberg C, Espinoza B. 2015. **Origin, evolution and function of the hemipteran perimicrovillar membrane with emphasis on Reduviidae that transmit Chagas disease.** Bulletin of Entomological Research 7: 1-13.

Guzmán-Marín ES, Zavala-Castro JE, Acosta-Viana KY, Rosado-Barrera ME. 1999. **Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*.** Revista Biomédica 10: 177-184.

Hernández JL, Rebollar-Téllez EA, Infante F, Morón A, Castillo A. 2010. **Indicadores de infestación, colonización e infección de *Triatoma dimidiata* (Latreille) (Hemiptera: Reduviidae) en Campeche, México.** Neotropical Entomology 39: 1024-1031.

Hillyer JF, Schmidt SL, Fuchs JF, Boyle JP, Christensen BM. 2005. **Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers.** Cellular Microbiology 7: 39-51.

Jiménez-Cortés JG, Córdoba-Aguilar A. 2013. **Condition dependence and trade-offs of sexual versus non-sexual traits in an insect.** Journal of Ethology 31: 275-284.

Kollien AH, Schaub GA. 2000. **The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae.** Parasitology Today 16: 381-387.

Koyoc-Cardena E, Medina-Barreiro A, Escobedo-Ortegón FJ, Rodríguez-Buenfil JC, Barrera-Pérez M, Reyes-Novelo E, Chablé-Santos J, Selem-Salas C, Vazquez-Prokopec G, Manrique-Saide P. 2015. **Chicken coops, *Triatoma dimidiata* infestation and its infection with *Trypanosoma cruzi* in a rural village of Yucatan, Mexico.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 57: 269-272.

Laughton AM, Siva-Jothy MT. 2010. **A standardised protocol for measuring phenoloxidase and prophenoloxidase in the honey bee, *Apis mellifera*.** Apidologie 42: 140-149.

- Lavine MD, Strand MR. 2002. **Insect hemocytes and their role in immunity.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1259-1309.
- Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V. 1988. **Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells.** *The Journal of Experimental Medicine* 168: 649-659.
- Lopez L, Morales G, Ursic R, Wolff M, Lowenberger C. 2003. **Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 439-447.
- Lu A, Zhang Q, Zhang J, Yang B, Wu K, Xie W, Luan YX, Ling E. 2014. **Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity.** *Frontiers in Physiology* 5: 252.
- Martínez-Ibarra JA, Novelo-López M. 2004. **Blood meals to molt, feeding time and postfeeding defecation delay of *Meccus Pallidipennis* (STAL,1872) (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions.** *Folia Entomológica Mexicana* 43: 313-319.
- Mello CB, Garcia ES, Ratcliffe NA, Azambuja P. 1995. ***Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*.** *Journal of invertebrate pathology* 65: 261-268.
- Mendoza-Rodriguez MI. 2015. **Caracterización biológica y bioquímica de cuatro aislados de *Trypanosoma cruzi*.** Tesis de Licenciatura, UNAM.
- Monroy MC, Rodas-Retana AG. 2015. **Especies de triatominos y su distribución en Centro América.** En: Memorias del 1er congreso internacional de vectores (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) y del *Trypanosoma cruzi*: Panorama actual y expectativas. México, León Guanajuato. Agosto 5-7.
- Monteón V, Godinez S, Cruz-Zetina G, Balmes J, López R, Hernández O. 2009. **Caracterización biológica de aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*: metaciclologénesis, parasitemia y resistencia contra benznidazol.** *Revista Biomédica* 20: 206-214.
- Moreno-García M, Córdoba-Aguilar A, Condé R, Lanz-Mendoza H. 2013. **Current immunity markers in insect ecological immunology: assumed trade-offs and methodological issues.** *Bulletin of Entomological Research* 103: 127-139.
- Nappi AJ, Vass E, Frey F, Carton Y. Carton Y. 2000. **Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity.** *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry* 4: 423-430.

- Nappi AJ, Christensen BM. 2005. **Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 443-459.
- OMS. 2013. **La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana)**
- Pereira-Marques PC, Cristina-Navarro E. 2013. **Challenges and perspectives of Chagas disease: a review.** *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 19: 34.
- Pizarro JC, Lucero DE, Stevens L. 2007. **PCR reveals significantly higher rates of *Trypanosoma cruzi* infection than microscopy in the Chagas vector, *Triatoma infestans*: high rates found in Chiquisaca, Bolivia.** *BMS Infectious Diseases* 7: 66.
- Prishnee-Baishya B, Bardoloi S, Bharali R. 2015. **Investigation into the effect of altitude on the differential hemocyte count of circulating plasmatocytes and granulocytes of larval stage of *Antheraea assama* (Lepidoptera: Saturniidae).** *Journal of insect Science* 15: 64.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. 2010. **Chagas disease.** *The Lancet* 375: 1388-1402.
- Rivas-Medina JE. 2014. **Comparación del perfil de glicoproteínas presentes en el intestino medio y posterior de *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi*.** Tesis de Licenciatura, UNAM.
- Rodríguez J, Pavia P, Calderon C, Montilla M, Nicholls RS, Puerta CJ. 2007. **Estandarización de una prueba de PCR-RFLP para la identificación de *Rhodococcus rhodnii* en insectos triatominos.** *Universitas Scientiarum* 12: 11-22.
- Ross M, Wojciech P. 2008. **Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular.** 5ª edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, p. 952.
- Salazar-Schettino PM, Bucio-Torres M, Guevara-Gómez Y, Ruiz-Hernández A. 1999. **Diagnóstico de laboratorio para la enfermedad de Chagas.** En: Memorias Primer Encuentro Internacional sobre Enfermedad de Chagas en México. México Distrito Federal. Noviembre 25-26. pp. 105.
- Salazar-Schettino PM, Rojas-Wastavino GE, Cabrera-Bravo M, Bucio-Torres MI, Martínez-Ibarra JA, Monroy-Escobar MC, Rodas-Retana A, Guevara-Gómez Y, Vences-Blanco MO, Ruiz-Hernández AL, Torres-Gutiérrez E. 2010. **Revisión de 13 especies de la familia *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas, en México.** *Journal of the Selva Andina Research Society* 1: 57-80.

- Schaub GA. 1989. **Does *Trypanosoma cruzi* stress its vectors?**. Parasitology Today 5: 185-188.
- Schaub GA, Meiser CK, Balczun C. 2011. **Interactions of *Trypanosoma cruzi* and Triatomines**. En: Mehlhorn H. Progress in Parasitology. Springer, Germany, pp. 155-178.
- Schofield CJ. 1994. **Triatominae Biología y Control**. Eurocommunica Publications. pp. 77.
- Schofield CJ, Galvão C. 2009. **Classification, evolution, and species groups within the Triatominae**. Acta Tropica 110: 88-100.
- Schmunis GA, Yadon ZE. 2010. **Chagas disease: a Latin America health problem becoming a world health problem**. Acta Tropica 115: 14-21.
- Steverding D. 2014. **The history of Chagas disease**. Parasites & Vectors 7: 317.
- Strand MR. 2008. **Insect hemocytes and their role in immunity**. En: Beckage NE (Ed.). Insect Immunity. Academic Press, San Diego, California (USA), pp. 25-47.
- Tay J, Salaza-Schettino PM, Ontiveros D. 1969 **El comportamiento en el ratón blanco de una cepa de *Trypanosoma cruzi* mediante pases sucesivos en diferentes especies de triatoma**. Revista Latinoamericana de Microbiología y Parasitología 11: 79-89.
- Uribarren-Berrueta T. 2011. **Enfermedad de Chagas**. Disponible en : www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html
- Vargas-Albores F, Ortega-Rubio A. 1994. **El sistema inmune humoral de los insectos**. Tópicos de Investigación y Posgrado. IV. 21-28.
- Vidal-Acosta V, Ibáñez-Bernal S, Martínez-Campo C. 2000. **Infeción natural de chinches *Triatominae* con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México**. Salud pública de México 42: 496-503.
- Vieira CS, Mattos DP, Waniek PJ, Santangelo JM, Figueiredo MB, Gumiel M, da Mota FF, Castro DP, Garcia ES, Azambuja P. 2015. ***Rhodnius prolixus* interaction with *Trypanosoma rangeli*: modulation of the immune system and microbiota population**. Parasites & Vectors 8: 135.
- Villa-Villanueva L, Escibá JM, Parreño-Rodríguez F. 2005. **Resultados del tratamiento de la enfermedad de Chagas en menores de 15 años en el proyecto de Médicos Sin Fronteras en Tarija (Bolivia)**. Revista Pediatría de Atención Primaria 7: 61-76

- World Health Organization. 2002. **Control of chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee.** Geneva.
- World Health Organization. 2005. **Reporte sobre la enfermedad de Chagas. TDR/SWG/09.WHO/TDR/09/05,2007.** Disponible en: www.cenaprece.salud.gob.mx/.../nom_032_ssa2_2010_norma_petv.pdf.
- World Health Organization. 2014. **Chagas disease (American trypanosomiasis).** Disponible en: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/.
- Yassine H, Kamareddine L, Osta MA. 2012. **The mosquito melanization response is implicated in defense against the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*.** PLoS Pathogens 8: e1003029.
- Zeledón R. 1997. **Infection of the insect host by *Trypanosoma cruzi*.** En: Carcavallo RU, Galíndez-Giron I, Jurberg J, Lent H. Atlas of Chagas disease vectors in the americas. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 271.

14. Anexo

Preparación de soluciones

L-Dopa (L-dihidroxifenilalanina)

Pesar 0.006 g de L- dihidroxifenilalanina y adicionarle 1.5 ml de agua destilada. Envolver el recipiente donde esta solución con papel aluminio para mantenerla alejada de la luz.

Por último se mantiene la solución en agitación durante 1 hora. Una vez terminado el tiempo, conservar la solución a 4° C hasta su uso.

α- Quimiotripsina

Pesar 1 mg de α- Quimiotripsina y disolver en 1 ml de agua destilada. Mezclar solución hasta lograr una mezcla homogénea. Tapar el recipiente donde esta la solución con papel aluminio para mantenerla alejada de la luz y conservar a 4° C hasta su uso.

Proporciones de los reactivos A y B del Kit de BCA. Cuantificación de proteínas para hemolinfa

Para 1 ml	Para 2 ml	Para 4 ml	Para 6 ml	Para 8 ml	Para 10 ml	Para 12 ml
980 µl de A 20 µl de B	1960 µl de A 40 µl de B	3920 µl de A 80 µl de B	5880 µl de A 120 µl de B	7840 µl de A 160 µl de B	9800 µl de A 200 µl de B	11760 µl de A 240 µl de B

Formol amortiguado al 10%

Pesar 4 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado y 6.5 g de fosfato de sodio dibasico anhidro. Adicionar lo anterior a 900 ml de agua destilada y 100 ml de formol al 40%, mezclar perfectamente.