



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES**

**“Memoria inmune en *Rhodnius prolixus* y
Meccus pallidipennis.”**

Tesis.

**Que para obtener el grado de maestra en ciencias
agropecuarias y recursos naturales.**

Presenta

Biol. Sonia Patricia Carmona Peña

COMITÉ DE TUTORES

TUTOR ACADÉMICO: Dr. Juan Carlos Vázquez Chagoyán.

CO-TUTOR: Dr. Jorge Contreras Garduño.

TUTOR ADJUNTO: Dr. Javier Manjarrez Silva.

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca Estado de Méico. Noviembre 2021

Contenido

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	8
Sistema inmunitario de invertebrados.....	8
<i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Trypanosoma rangeli</i>	10
Triatomíneos.....	12
Estudios en chinches.....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
HIPÓTESIS	16
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVOS	17
Objetivos Secundarios.....	17
METODOLOGÍA (MATERIALES Y MÉTODOS)	18
Protocolos para el primer objetivo secundario.....	18
Memoria innata en <i>Meccus pallidipennis</i>	20
Análisis del sistema inmunitario	20
Protocolos para el segundo objetivo	22
Tasa de sobrevivencia y muda.....	24
Análisis estadísticos.....	24
Resultados	26
Anexos	26
Resultados objetivo 1.....	29
Memoria inmunitaria <i>Meccus pallidipennis</i>	29
Discusión General	34
Conclusión General	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

Contenido de Figuras.

Figura 1: Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
Figura 2: Ciclo biológico de <i>Trypanosoma rangeli</i>	11
Figura 3: Diferentes estadios de desarrollo de <i>Rhodnius prolixus</i>	13
Figura 4: Diferentes estadios de desarrollo de <i>Meccus pallidipennis</i>	13
Figura 5: Contenedores para <i>Meccus pallidipennis</i>	18
Figura 6: Proceso de alimentación artificial para <i>Meccus pallidipennis</i>	19
Figura 7: Diseño experimental para evaluar la respuesta de memoria inmunitaria en <i>Meccus pallidipennis</i>	21
Figura 8: Contenedores de <i>Rhodnius prolixus</i>	22
Figura 9: Sistema de alimentación artificial para <i>Rhodnius prolixus</i>	23
Figura 10: Diseño experimental que se llevó acabo para <i>Rhodnius prolixus</i>	25
Figura 11: Número de hemocitos post-primera alimentación.	29
Figura 12: Número de hemocitos post-segunda alimentación con <i>T. cruzi</i>	30
Figura 13: Número de hemocitos post-segunda alimentación con <i>T. rangeli</i>	31
Figura 14: Actividad de proPO a las 24 horas post-primera alimentación.	32
Figura 15: Actividad proPO a las 24 horas post-segunda alimentación.....	32
Figura 16: Comparación de la actividad proPO entre los grupos de la primera y la segunda alimentación.....	33

RESUMEN

El estudio del sistema inmune de los insectos frente a diversos patógenos, ha sido un tema de interés en los últimos años. Este tema es particularmente importante en insectos vectores de algún patógeno para el humano, como en el caso de los insectos triatomínicos que son vectores del parásito *T. cruzi*, agente causal de la Enfermedad de Chagas. Entender la interacción parásito-vector, podría generar nuevas estrategias para disminuir el número de infectados por estos parásitos en los humanos. Este trabajo intenta dilucidar si existe memoria inmunitaria innata en los triatomínicos *Meccus pallidipennis* y *Rhodnius prolixus* frente a los parásitos *T. rangeli* y *T. cruzi*. También permitió conocer si los triatomínicos, ante un reto dual específico contra los parásitos (grupo de Memoria), poseían mejor respuesta inmunitaria y supervivencia que los triatomínicos sin reto dual (grupo Control). El primer objetivo de la tesis fue proponer, después de una revisión exhaustiva, que los triatomínicos podrían tener memoria inmunitaria innata. El segundo objetivo fue determinar la respuesta inmunitaria (número de hemocitos y sistema de proFenoloxidasa –proPO, por sus siglas en inglés) de *Meccus pallidipennis*, después de su activación, alimentando a las chinches con sangre con parásitos muertos fijados con glutaraldehído, y después de una segunda alimentación con parásitos vivos (grupo de Memoria). El grupo Control consistió en triatomínicos que recibieron sangre sin parásitos en la primera alimentación y con parásitos vivos en la segunda alimentación. El tercer objetivo fue saber si *Rhodnius prolixus* del grupo de Memoria, en comparación con el grupo Control, tenía mejor probabilidad de vivir aunque esto implicara un costo en términos de un retardo en el crecimiento. Respecto al primer objetivo, propusimos realizar estudios de memoria inmunitaria en triatomínicos. Los resultados del segundo objetivo no mostraron diferencias significativas en el número de hemocitos ni en la actividad proPO en *Meccus pallidipennis*, sin embargo, es necesario realizar más experimentos porque el tamaño de muestra fue pequeño. Finalmente, en el tercer objetivo, *Rhodnius prolixus*, mostro evidencia de memoria inmunitaria en términos de supervivencia aunque el grupo de Memoria, tuvo un retraso en su crecimiento, respecto al grupo Control. Esto sugiere la existencia de memoria innata en triatomínicos pero con un costo en el crecimiento. En conclusión, de manera empírica y experimental, sugerimos que existe memoria inmunitaria en triatomínicos, pero se requiere analizar los mecanismos fisiológicos y moleculares que están detrás de esta memoria.

INTRODUCCIÓN

Estudios recientes han demostrado que los invertebrados y no solamente los vertebrados poseen memoria inmunitaria (Contreras-Garduño *et al.*, 2016; Milutinovic y Kurtz, 2016). Esta memoria ocurre dentro y a través de las generaciones, y provee resistencia específica contra parásitos y patógenos después de un primer encuentro específico con la misma cepa o especie de parásito o patógeno (Kurtz y Franz, 2003; Contreras-Garduño *et al.*, 2016; Milutinovic y Kurtz, 2016). Actualmente, esta inmunidad en invertebrados se conoce mejor dentro de las generaciones, particularmente en moluscos, crustáceos e insectos (Milutinovic y Kurtz, 2016; Thomas y Rudolf, 2010; Contreras-Garduño *et al.*, 2015).

A pesar de que hay evidencia de una respuesta de memoria inmune en lepidópteros, dípteros, himenópteros y coleópteros (Milutinovic y Kurtz, 2016), no hay estudios en triatomíneos, los insectos que transmiten el *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), el agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. En estos insectos, los estudios se enfocan en describir la respuesta inmune innata (Mello *et al.*, 1995; Azambuja y García, 2005; Vallejo *et al.*, 2015), contra diferentes cepas de los parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* (un parásito genéticamente similar a *T. cruzi*).

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, se encuentra endémicamente distribuida en 21 países de América Latina. Su transmisión a los seres humanos y diversos mamíferos, ocurre principalmente por las heces de insectos triatomíneos conocidos como vinchucas o chinches besuconas (World Health Organization, 2018). La capacidad de una especie de triatomino para alojar y desarrollar al parásito hasta las formas infectantes, depende principalmente de factores fisiológicos, tales como la respuesta inmune del insecto, la identidad genética del parásito y/o el patrón de alimentación del insecto (Azambuja y García, 2005; Arévalo *et al.*, 2007).

Por lo tanto, este trabajo se centró en saber si existía memoria inmune en dos especies de chinches besuconas *Rhodnius prolixus* y *Meccus pallidipennis*, ambas especies de importancia epidemiológica ya que son de los mayores vectores de *T. cruzi* en América Latina. Se usaron dos especies de parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*.

ANTECEDENTES

Sistema inmunitario de invertebrados

El sistema inmunitario de los invertebrados es considerado menos complejo, que el de los vertebrados, porque los vertebrados presentan linfocitos que generan anticuerpos que les permiten generar memoria inmunitaria (memoria adaptativa). Con esta estrategia, los hospederos responden más rápida y eficazmente cuando se vuelven a enfrentar contra el mismo patógeno (Moreno, 2017; Antón y Salazar-Lugo, 2009). A nivel de mecanismos, los invertebrados no presentan respuesta adaptativa como los vertebrados, pero hay evidencia de su capacidad de generar memoria inmunitaria. En invertebrados, este fenómeno se denomina memoria inmunitaria innata (*immune priming*, en inglés) para poder diferenciar sus mecanismos de los mecanismos de la memoria adaptativa de los vertebrados (Little y Kraaijeveld, 2004; Milutinovic y Kurtz, 2016).

De manera general, la defensa de los invertebrados está conformada por hemocitos (defensa celular equivalente a los macrófagos en vertebrados), que llevan a cabo procesos de fagocitosis, nodulación y encapsulación, y por la defensa humoral, representada por lisozimas, lectinas, óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno, la actividad del sistema de fenoloxidasa y los péptidos antimicrobianos (Schmid-Hempel, 2005; Milutinovic y Kurtz, 2016; Little y Kraaijeveld, 2004). Estas moléculas se activan después de que el organismo logra diferenciar lo propio de lo extraño, y esta, es la base de la inmunología.

Tal vez, el sistema de defensa más antiguo que se haya documentado es el sistema CRISPR-Cas9. En bacterias y la mayoría de las arqueas, CRISPR-Cas9 otorga resistencia contra virus y plásmidos. Es un sistema enzimático que reconoce el ADN extraño, memorizando invasiones pasadas y respondiendo de manera específica y eficiente contra estos agentes en posteriores encuentros. Este sistema tiene similitudes con la vía de interferencia del ARN en eucariotas y comparte funciones análogas con el sistema inmunológico adaptativo de los mamíferos (Goren *et al.*, 2012; Barrangou y Marraffini, 2014).

En organismos pluricelulares invertebrados se han observado respuestas en sus mecanismos de defensas que se asemejan a los de los vertebrados. En un estudio de trasplantes de injertos en la esponja *Callyspongia diffusa*, se observó una fusión de tejidos genéticamente idénticos derivados de la misma colonia (isoinjertos), mientras que los tejidos no genéticamente relacionados (aloinjertos) no se fusionaron y provocaron reacciones antagónicas que involucran citotoxicidad y necrosis bilaterales (Hildemann *et al.*, 1979).

Aunque lo anterior sugiere evidencia de memoria, el primer estudio que demuestra de manera contundente una respuesta de memoria inmune en invertebrados, se realizó en crustáceos, al estudiar la respuesta inmunitaria del copépodo

Macrocyclop salbidus contra el céstodo *Schistocephalus solidus*, donde se usaron dos grupos experimentales, ambos grupos fueron inoculados con *S. solidus* y dos días después, se retó a un grupo con un parásito genéticamente similar (reto homólogo) y al segundo grupo se retó con un parásito no genéticamente relacionado (reto heterólogo). Los resultados mostraron que la reinfección fue menos intensa en el grupo homólogo que en el grupo heterólogo (Kurtz y Franz, 2003). Estudios más recientes, con otros modelos biológicos, mostraron que retos homólogos, a nivel de cepa de parásito inducen una mayor supervivencia del hospedero y una mejor respuesta inmunitaria que los retos heterólogos (Contreras-Garduño *et al.*, 2016; Milutinovic y Kurtz, 2016).

En otro estudio con el ctenoforo *Mnemiopsis leidyi*, retado con la bacteria Gram-negativa *Listonella anguillarum* y la bacteria Gram-positiva *Planococcus citreus*, se observó una expresión diferencial de genes inmunes tras un posterior desafío en individuos que previamente habían sido retados con especies bacterianas iguales o diferentes (Bolte *et al.*, 2013). En la anémona de mar *Exaiptasia pallida*, una exposición a una dosis sub-letal con *Vibrio coralliilyticus*, mejoró la supervivencia en un posterior desafío (Brown y Rodriguez-Lanetty, 2015). Por otro lado, en una investigación con el escarabajo *Tribolium confusum* (organismo que sufre metamorfosis, un cambio crítico de estadio donde hay reorganización y pérdida de tejidos) y sus parásitos intestinales *Gregarina minuta*, muestra que los organismos que fueron parasitados en etapa larval, tenían una menor intensidad de infección en etapa de adulto, en comparación con los organismos que no fueron infectados en etapa larval (Thomas y Rudolf, 2010). Estos resultados sugieren una respuesta de memoria inmunitaria en distintos grupos de invertebrados. Cabe destacar que la mayor evidencia de memoria inmunitaria en invertebrados proviene de investigaciones con artrópodos, específicamente con insectos (Milutinovic y Kurtz, 2016). Los insectos son el grupo más diversificado y abundante de la naturaleza, se encuentran en todos los ecosistemas donde también se encuentran organismos con la capacidad de parasitarlos (Vargas-Albores y Ortega-Rubio, 1994). Debido a esto, los insectos han desarrollado efectivos sistemas de defensa tanto celular (Ratcliffe *et al.*, 1985) como humoral, manifestando una protección inmune después de una infección primaria (Dunn, 1986; Ratcliffe *et al.*, 1985).

En insectos vectores de enfermedades hay pocos estudios de memoria, como la realizada por Contreras-Garduño *et al.* (2015), donde infectaron a *Anopheles albimanus* con el parásito *Plasmodium berghei*. En este estudio se demostró que la protección de memoria dura casi toda la vida de los adultos, y que los mosquitos a los que se les induce la memoria controlan mejor una infección posterior y viven más después de la infección (Contreras-Garduño *et al.*, 2015).

Sin embargo, como se mencionó previamente, no hay investigaciones de memoria inmunitaria en los insectos vectores de *Trypanosoma cruzi* y de *Trypanosma rangeli*.

Trypanosoma cruzi y *Trypanosoma rangeli*

Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909), causante de la enfermedad de Chagas, es un parásito que desarrolla un ciclo de vida con diferentes estadios en hospederos vertebrados (mamíferos) e invertebrados (triatomíneos; Zingales y Coli, 1985). Este parásito se transmite principalmente por las heces infectadas de insectos triatomíneos hematófagos en América latina (Teixeira *et al.*, 2001).

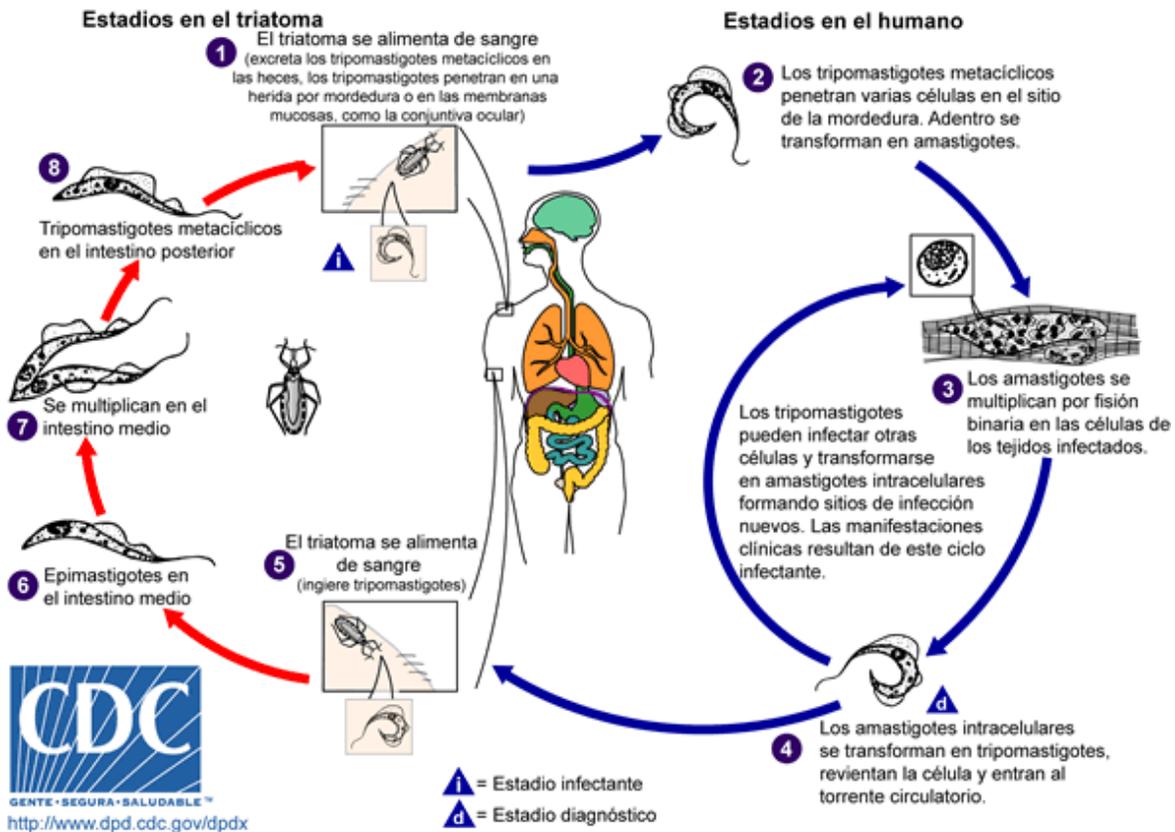


Figura 1: Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.

Con el análisis de isoenzimas, del ADN ribosomal y del gen mini exón en *T. cruzi*, se han identificado 6 DTU' (Discret Taxonomic Units) *T. cruzi* I-VI (Zingales, *et al.*, 2009) y dentro de DTU I se identificaron 4 haplotipos (Herrera *et al.*, 2007; Falla *et al.*, 2009). Sin embargo, en los últimos años, los aislamientos de *T. cruzi* de murciélagos brasileños que mostraban patrones únicos de PCR tradicionales ribosomales, no se agrupaban en ninguna de las seis DTU y se designaron como el genotipo Tcbat (Lima *et al.*, 2015).

Entre las más de 120 especies de estos insectos vectores (todas de la subfamilia Triatominae y familia Reduviidae), cerca de 12 especies, de los géneros Triatoma,

Panstrongylus y Rhodnius, son vectores del parásito *T. cruzi* (Teixeira *et al.*, 2001; Figura 1). No obstante, *Rhodnius* también puede transmitir *Trypanosoma rangeli* (Vallejo *et al.*, 2009^a, un parásito que no resulta patógeno para el hombre (Dias, 2000; Vallejo *et al.*, 2009) pero si para las especies de *Rhodnius* (Figura 2, Guhl y Vallejo, 2003), ya que invade las glándulas salivales del triatomino y hay producción de tripomastigotes metacíclicos que son infectivos para algunos mamíferos (Abad-Franch *et al.*, 2013; da Rosa *et al.*, 2014). A diferencia de *T. cruzi*, que entra a su hospedero vertebrado por medio de las heces del triatomino, *T. rangeli* invade las glándulas salivales del insecto y se transmite por medio de las secreciones salivales de la chinche directamente por la picadura (García *et al.*, 2004).

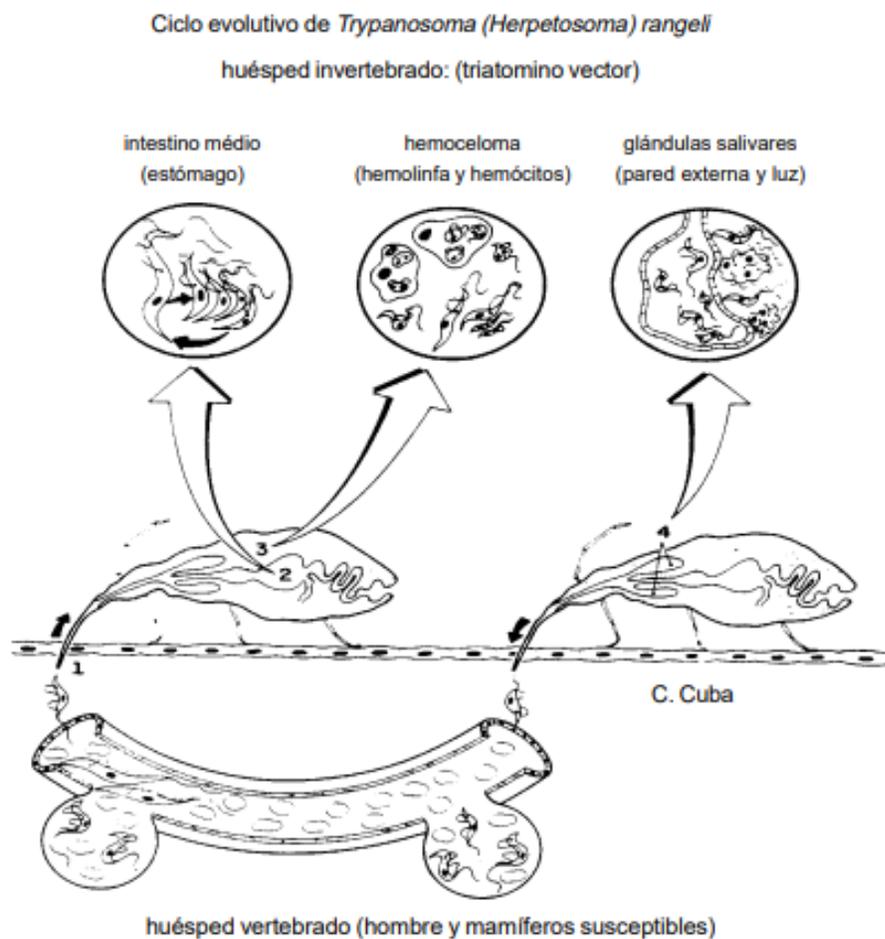


Figura 2: Ciclo biológico de *Trypanosoma rangeli*.

(Cuba, 1998).

Estudios en kinetoplastos del DNA (kDNA) de *T. rangeli*, mostraron que tiene dos grupos filogenéticos. En cepas que presentan tres clases de minicírculos de kDNA llamadas KP1, KP2 y KP3, se denominan KP1 (+), mientras que las cepas que presentan solo dos clases de minicírculos, los KP2 y KP3, se denominan KP1 (-) (Vallejo *et al.*, 2003, 2007). Estos grupos tienen afinidad a dos grupos determinados de Triatomínos, *T. rangeli* KP1(+) se asocia con los vectores que pertenecen al grupo prolixus: *Rhodnius prolixus*, *R. neglectus* y *R. robustus* tipo I, II, III, IV, V (también llamado grupo robustus; Abad-Franch y Monteir; 2007; Abad-Franch *et al.*, 2009), estas especies se ubican principalmente al oriente de la cordillera de los Andes, mientras que *T. rangeli* KP1(-) se asocia con los vectores que pertenecen al grupo pallescens (*Rhodnius pallescens*, *R. colombiensis*, *R. ecuatoriensis* y *R. pictipes*) (Vallejo *et al.*, 2003; Urrea *et al.*, 2005) o también llamado grupo pictipes (Abad-Franch y Monteir; 2007; Abad-Franch *et al.*, 2009) estas especies ubicadas en toda la cordillera de los Andes (Urrea *et al.*, 2005).

T. rangeli y *T. cruzi* en gran parte de América Latina, se encuentran infectando a los mismos hospederos tanto vertebrados como invertebrados y esto dificulta el diagnóstico e identificación del agente causal de la enfermedad de Chagas (Vallejo *et al.*, 1988).

Se ha confirmado la gran cercanía filogenética entre *T. cruzi* y *T. rangeli*, identificando varios elementos transponibles, genes asociados a la expresión mitocondrial y genes específicos de ARN. A pesar de esta cercanía filogenética, se encontraron diferencias en sus genomas. *T. rangeli* posee menos copias de genes de las familias multigénicas, factores de virulencia presentes en *T. cruzi*, como las trans-sialidasas, mucinas y proteínas de superficie asociadas a mucinas (MASP por sus siglas en inglés). También *T. rangeli* posee un reducido repertorio de genes que codifican enzimas de respuesta antioxidante y proteínas de choque térmico y genes ortólogos vestigiales de la maquinaria de ARNi (Vallejo *et al.*, 2015). *T. rangeli*, *T. cruzi* y *T. brucei* (causante de la enfermedad del sueño en África, vector mosca tsetsé, OMS, 2020), son las únicas especies de tripanosomas que infectan al hombre (Vallejo *et al.*, 2015).

Triatomínos

Los triatomínos son una subfamilia de insectos pertenecientes a la familia Reduviidae, del Orden Hemiptera, suborden Heteroptera (Otálora-Luna, 2015). Son aplanados dorsoventralmente, con probóscide articulada, cabeza pequeña (generalmente cilíndrica y alargada), ojos compuestos, antenas divididas en cuatro artejos y lateralmente insertadas, con articulaciones membranosas entre el segundo y tercer artejo de rostro. La diferencia entre adultos y ninfas son la presencia de alas anteriores y posteriores bien desarrolladas (Pérez, 2010).

La mayoría de las especies de los triatomínos están concentradas en América y son conocidas de diferentes maneras de acuerdo a la región, los más comunes son:

chipo (Venezuela), pito (Colombia), barbeiro (Brasil), vinchuca (desde el Ecuador hasta la Patagonia), kissing bug (EUA), chinche (Centro América) y chinche besucona (México). Todos los miembros de la subfamilia Triatominae son potenciales vectores de *Trypanosoma cruzi*, y casi en su totalidad son hematófagos (se alimentan de sangre), de las más de 120 especies que se conocen, solo una veintena de especies se consideran de importancia epidemiológica, entre ellas *Rhodnius prolixus* (Figura 3) considerado uno de los principales vectores en América Latina (Otálora-Luna, 2015). En México, *Meccus pallidipennis* (Figura 4) es considerado uno de los vectores más importantes ya que tiene una amplia distribución en la República Mexicana (Pérez, 2010).

Los triatominos viven en promedio entre uno y dos años, tardando de 3 a 8 meses en llegar de huevo a adulto y durante este crecimiento, ocurren 5 mudas denominadas estadios ninfales (Perez, 2010).

Reino: Animalia

Filo: Artrópodos

Clase: Insecta

Orden: Hemipteros

Familia: Reduviidae

Subfamilia: Triatominae

Género: *Rhodnius*

Especie: *Rhodnius prolixus*

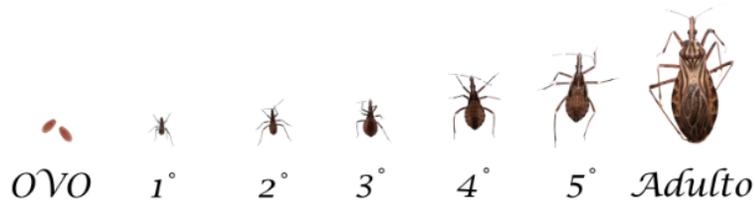


Figura 3: Diferentes estadios de desarrollo de *Rhodnius prolixus*.

Por Maiara do Valle Faria Gama, en

<https://educare.fiocruz.br/resource/show?id=dkMUTVi3>.

Reino: Animalia

Filo: Artrópodos

Clase: Insecta

Orden: Hemipteros

Familia: Reduviidae

Subfamilia: Triatominae

Género: *Meccus*

Especie: *Meccus pallidipennis*

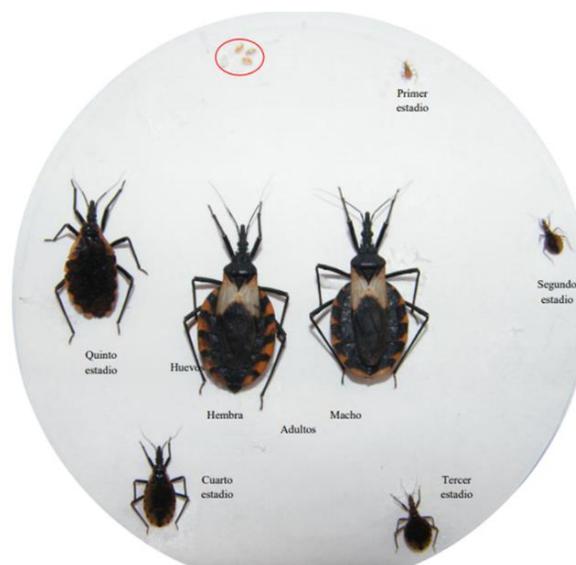


Figura 4: Diferentes estadios de desarrollo de *Meccus pallidipennis*.

(Pérez, 2010).

Estudios en chinches

Algunas investigaciones de infecciones experimentales sobre triatominos se basa en xenodiagnósticos, porque dan mejores resultados que las técnicas de diagnóstico parasitológicos y serológicos y puede realizarse de manera directa (natural) o indirecta (artificial). El xenodiagnóstico natural, consiste en colocar los insectos en un recipiente sobre la piel del paciente sospechosos y se deja el libre consumo de sangre de los insectos, la variante xenodiagnóstico artificial consiste en extraer sangre de individuos sospechosos y se alimenta con esta sangre a triatominos cultivados en laboratorio y libres de infección (Schenone, 1999). Después de un período de incubación (15-30 días post-alimentación) se revisan las heces de los triatominos, para saber si hay parásitos (Pérez, 2010).

Se ha observado que no todos los triatominos son igualmente susceptibles a infectarse por *T. cruzi*. Pérez (2010) evaluó la susceptibilidad del primer y tercer estadio de 8 especies de triatominos (*Dipetalogaster maximus*, *Meccus bassolsae*, *M. pallidipennis*, *M. phyllosomus*, *M. picturatus*, *Triatoma infestans*, *T. lecticularia* y *T. mexicana*) a la infección con *Trypanosoma cruzi* con la cepa NINOA, utilizando una cantidad de 5 000 parásitos por mL como dosis infectante. Los criterios para establecer la susceptibilidad incluyeron el porcentaje de triatominos infectados, densidad de parásitos en heces y cantidad de sangre ingerida. No se encontraron diferencias significativas en la susceptibilidad a la infección entre las ninfas de primer y tercer estadio, pero se sugirió usar el tercer estadio para llevar a cabo el xenodiagnóstico por su mejor manejo debido al tamaño del insecto. En cuanto a la susceptibilidad a la infección se obtuvieron los siguientes datos: *M. bassolsae* > *M. pallidipennis* = *T. mexicana* > *D. maximus* > *M. picturatus* > *T. infestans* = *T. lecticularia* > *M. phyllosomus*, concluyendo que las especies *Meccus bassolsae* y *M. pallidipennis* serían ideales para llevar a cabo esta técnica de diagnóstico (Pérez, 2010).

También, se evaluó la susceptibilidad a la infección con epimastigotes cortos de *T. rangeli* de la cepa KP1 (+) en *Triatoma infestans*, *Triatoma brazilliensis*, *Triatoma sordida*, *Triatoma vitticeps* y *Panstrongylus megistus*, y se observó que los epimastigotes cortos atraviesan la pared intestinal, ingresan al hemocele y se desarrollan dentro de los hemocitos (De Stefani-Márquez *et al.*, 2006).

Algunas investigaciones afirman que existen adaptaciones locales entre las diferentes especies de vectores con *T. cruzi* (Schenone *et al.*, 1974), ya que las especies de vectores locales son más susceptibles a la infección con cepas locales de *T. cruzi*, que a las cepas de *T. cruzi* que no se encuentran en esa área (Barreto *et al.*, 1978; Perlowagora-Szumlewicz y Müller, 1982). Debido a esto se han realizado diversas investigaciones con diferentes triatominos y diferentes cepas de *T. cruzi* o *T. rangeli*.

Sistema inmune en chinches

El *T. cruzi* es un protozoario capaz de infectar a las chinches, pero no es una relación simbiótica, sino que existe una relación de hospedero/parásito en el que el parásito en su lucha por colonizar al hospedero puede dañarlo. En un estudio en el que se utilizó a *Meccus pallidipennis* para hacer xenodiagnóstico en perros que habían recibido una infección experimental con *T. cruzi* cepa *Sylvio*, se observó que *T. cruzi* es de alguna manera patógeno para el triatomino, porque, el 38% de las chinches que fueron alimentadas directamente de perros infectados con *T. cruzi*, murieron durante el período de incubación, posterior a la alimentación (Aparicio *et al.*, 2011).

Entre las pocas investigaciones realizadas para indagar la respuesta inmune de triatominos hacia Trypanosomas se encuentra un estudio con *Rhodnius prolixus* y *T. cruzi* (Mello *et al.*, 1995), quienes usando la cepa Dm28c, encontraron más profenoloxidasas y menos parásitos en la hemolinfa (Mello *et al.*, 1995). Un año más tarde Mello *et al.* (1996), demostraron diferencias en el desarrollo de 3 cepas de *T. cruzi* (Dm28c, CI y la cepa Y) en el intestino de *R. prolixus*, y encontraron que las cepas Dm28c y CI, logran infectar exitosamente el intestino de *R. prolixus*, a diferencia de la cepa Y, que rápidamente es eliminada del intestino.

En otra investigación, Zabala *et al.* (2011), evaluaron la actividad tripanolítica de la hemolinfa de 10 especies de triatominos (*Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. maculata*, *Rhodnius pallescens*, *R. colombiensis*, *R. ecuadoriensis*, *R. stali*, *R. robustus* y *R. prolixus doméstico* y *silvestre*) a la infección de 6 cepas diferentes de *T. cruzi*, R-col 02, 1321, (caracterizadas como *T. cruzi* I), 34E (*T. cruzi* II), 845 (*T. cruzi* III), 967 y la cepa 167 (*T. cruzi* V). Los resultados mostraron que ninguna de las muestras de hemolinfa de las 10 especies de triatomino, presentaron actividad tripanolítica contra las cepas R-col 02 y 1321. *R. prolixus* (silvestre y doméstico), presentó actividad tripanolítica contra las cepas 34E, 967 y 167. *R. robustus* y *R. stali*, solo presentaron actividad tripanolítica contra las cepas 34E y en *R. colombiensis* se observó aglutinación de hemocitos contra la cepa 845.

Pulido *et al.* (2008) aislaron dos cepas de *T. rangeli*, KP1 (-) I/COL/CO/98/P53 y KP1 (+) I/PRX/CO/84/P19 de las glándulas salivales de *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius prolixus*, y fueron incubadas en la hemolinfa de *Rhodnius prolixus*, revelando presencia de un factor tripanolítico en la fracción de GF-1. Esta proteína se comporta como una barrera biológica ya que es responsable de inhibir el desarrollo de las cepas de *T. rangeli* KP1 (-) pero cuando se infecta con *T. rangeli* KP (+), la proteína no reconoce esta subpoblación de parásitos, permitiendo su desarrollo dentro del triatomino y entonces se podrá transmitir al hospedero vertebrado.

Una de las interacciones más estudiada de hospedero-parásito es *Rhodnius prolixus* con *Trypanosoma rangeli*. Una variedad de mecanismos celulares y humorales en el vector, actúan como factores limitantes para el desarrollo del

parásito (Vallejo *et al.*, 2009). Lo más significativo de estos mecanismos son las lizoenzimas, lectinas, factores tripanolíticos (Mello *et al.*, 1995, 1999; Gomes *et al.*, 1999; Gregorio y Ratcliffe, 1991), activación del sistema profenoloxidasa (Mello *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 1999, 2003; Garcia *et al.*, 2004a), fagocitosis, microaglutinación de hemocitos (Mello *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 2004a), producción de óxido nítrico y superóxido (Whitten *et al.*, 2001, 2007), las vías de eicosanoides (García *et al.*, 2004b) y la melanización en la microagregación de hemocitos (Alvarenga *et al.*, 1990).

La infección exitosa de *T. rangeli* para generar tripomastigotes metacíclicos dentro del hospedero invertebrado está asociada con la producción de ectofosfatasa en el parásito (Gomes *et al.*, 2008; Dos-Santos *et al.*, 2012,2013; Freitas-Mesquita y Meyer Fernández, 2014). Algunos estudios demuestran que si *T. rangeli* KPI (+) infecta a triatominos de las especies *R. prolixus*, *R. robustus* o *R. neglectus*, los epimastigotes cortos atraviesan la pared intestinal del insecto, ingresando al hemocele e invadiendo los hemocitos, donde se multiplican, posteriormente los epimastigotes cortos son reemplazados por los epimastigotes largos, los cuales salen de los hemocitos y se adhieren a las glándulas salivales, donde producen tripomastigotes metacíclicos, a diferencia que cuando *T. rangeli* KPI (-) infecta a *R. prolixus* y *R. robustus*, los epimastigotes cortos atraviesan la pared intestinal, ingresan al hemocele y son inmediatamente lisados por factores tripanolíticos presentes en la hemolinfa (Vallejo *et al.*, 2015).

De acuerdo a estas investigaciones, cuatro componentes son determinantes en la infección de los triatominos por tripanosomas: la especie de triatomino, la cepa y el genotipo del parásito, la respuesta inmune del insecto y la microbiota intestinal del triatomino (Schaub, 2009; Garcia *et al.*, 2010, 2012).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de toda la información que se ha acumulado respecto a la interacción entre triatominos y parásitos, se desconoce si los triatominos poseen memoria inmunitaria contra *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*.

HIPÓTESIS

La memoria inmunitaria de los Triatominos los protege de la infección por *T. cruzi* y *T. rangeli*.

PREDICCIÓN

Los triatominos con previo reconocimiento de un parásito (atenuado o inactivado) vivirán más y tendrán mejor respuesta inmunitaria después de un posterior encuentro con el mismo parásito, pero virulento, en comparación con un grupo Control tendrán una mayor respuesta inmunitaria (Memoria), y vivirán más que los grupos Control (que solamente tenga el contacto con el parásito virulento, sin reconocimiento previo).

JUSTIFICACIÓN

No existen reportes acerca de la capacidad de los triatominos de montar una respuesta inmune de memoria ante un patógeno. *T. cruzi*, es un parásito de humanos cuyo vector son triatomos hematófagos, para quienes se ha observado que ciertas cepas del parásito también le resultan patógenas. Estudiar la relación del sistema inmune del vector con el parásito, podría generar conocimiento que permitiera desarrollar nuevas estrategias de control de la tripanosomiasis americana. De ahí que resulta interesante estudiar la capacidad de la chinche besucona de controlar una infección, a través de una respuesta inmune de memoria para saber si existe la posibilidad de bloquear el ciclo parasitario de *T. cruzi* en el mismo vector.

OBJETIVOS

Evaluar si existe memoria inmunitaria innata en *Rhodnius prolixus* y *Meccus pallidipennis*.

Objetivos Secundarios

1. Evaluar si *Meccus pallidipennis* posee memoria inmunitaria en términos de número de hemocitos (respuesta celular) y proPO (respuesta humoral).
2. Determinar si *Rhodnius prolixus* posee memoria inmunitaria en términos de supervivencia y si existe una reducción en su crecimiento, derivado del costo de la memoria.

METODOLOGÍA (MATERIALES Y MÉTODOS)

Para cumplir con los objetivos, primero se realizó una búsqueda de información en diferentes bases de datos, como PubMed, ScienceDirect, ScienceResearch, SciELO, Redalyc y Springer. Se recopiló la información obtenida y se escribió un artículo de revisión. No se encontró información sobre investigaciones realizadas de memoria inmunitaria en chinches. En cada buscador se usaron las siguientes palabras claves: Triatominos, *T. cruzi*, *T. rangeli*, sistema inmunitario, memoria inmunitaria, *Rhodnius prolixus*, *Meccus pallidipennis*.

Protocolos para el primer objetivo secundario

Obtención y mantenimiento de triatominos

El primer objetivo, se realizó en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la UAEMex, en el Estado de México. Para este experimento se obtuvieron chinches de la especie *Meccus pallidipennis* provenientes del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE) y se cuidaron en el laboratorio, de acuerdo a las condiciones adecuadas para su mantenimiento y reproducción, a 28°C y una humedad relativa (HR) de 70 – 80% (Arévalo *et al.*, 2007; Tay *et al.*, 2008; Rabinovich, 1972; Pérez, 2010). Las colonias se mantuvieron en forma semejante a lo propuesto por Ryckman, 1951, en contenedores de plástico que se les retiró parte de la tapa y se les cubrió con una tela delgada que permite la ventilación (Figura 5).



Figura 5: Contenedores para *Meccus pallidipennis*.

Preparación de parásitos fijados para la primera exposición de los triatominos al patógeno

Se determinó la eficacia de la aplicación de parásitos muertos fijados con glutaraldehído. Para este procedimiento, los parásitos se cosecharon en fase de crecimiento exponencial y fueron lavados 3 veces por centrifugación en PBS a 1000g por 20 minutos a 4°C. Posteriormente se mezclaron con glutaraldehído al 0.1% durante 15 minutos a temperatura ambiente y 15 minutos a 4°C y se volvieron a lavar con PBS (Basso *et al.*, 2007). Una vez fijados los parásitos con Glutaraldehído, se agregaron en sangre de ovino o conejo y por medio del sistema de alimentación artificial se les dio de comer a las chinchas.

Alimentación de *Meccus pallidipennis*

La alimentación de los triatominos se realizó de manera artificial, método que consiste en colocar sangre de ovino (Gomes *et al.*, 2003) sobre un recipiente cilíndrico de vidrio cubierto con una membrana de látex boca abajo, posteriormente se calienta el recipiente con la ayuda de un baño maría a 37°C permitiendo la libre alimentación durante una hora (Figura 6; Silva, 1991; Franco *et al.*, 2002).



Figura 6: Proceso de alimentación artificial para *Meccus pallidipennis*.

Cultivo de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*

De *T. cruzi*, se utilizó la cepa “NINOA” que se mantuvo en monocapas de células HeLa, en medio de cultivo DMEM con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina-estreptomicina (Aparicio *et al.*, 2011) y de *T. rangeli* se utilizó la cepa “Guatemala”, que se mantuvo en medio LIT, a un pH de 6.8 a 28°C (Manning-Cela *et al.*, 2001) en tubos falcon de 15 mL.

Se llevó a cabo un bioensayo en adultos de *Meccus pallidipennis* siguiendo el protocolo de Bacca y Lagos (2014) para obtener los porcentajes de mortalidad a dosis letales (DL) 100% para *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* (NOTA: no se encontró una dosis letal para las chinches, por lo tanto se usó una dosis de 1×10^6 parásitos por 1 mL de sangre para las alimentaciones).

Memoria innata en *Meccus pallidipennis*

Para determinar la respuesta de la memoria inmunitaria se hicieron dos alimentaciones: La primera alimentación se llevó a cabo en el 5to estadio (“1” en Figura 7) con 3 grupos experimentales. El primer grupo con 45 chinches fue alimentado con sangre sin parásitos (grupo denominado SNP), el segundo grupo conformado por 30 chinches fue alimentado con sangre que contenía parásitos muertos de *T. rangeli* fijados con glutaraldehído (grupo denominado *T. rangeli*; Basso *et al.*, 2007), y el tercer grupo también con 30 chinches fue alimentado con sangre que tenía parásitos muertos de *T. cruzi* fijados con glutaraldehído (grupo denominado *T. cruzi*; Basso *et al.*, 2007).

Una vez que las chinches mudaron a adultos, se les alimentó nuevamente con sangre que contenía parásitos vivos, a excepción de 15 chinches del grupo “SNP”, que se les alimentó con sangre que no tenía parásitos. Del grupo “SNP”, 15 chinches fueron alimentadas con *T. cruzi* (grupo SNP- *T. cruzi*) y a 15 chinches con *T. rangeli* (SNP-*T. rangeli*). Del grupo “*T. cruzi*” a 15 chinches con *T. cruzi* (reto homólogo, *T. cruzi*-*T. cruzi*), y a 15 chinches con *T. rangeli* (reto heterólogo, *T. cruzi*-*T. rangeli*). Y del grupo “*T. rangeli*”, a 15 chinches con *T. rangeli* (*T. rangeli*-*T. rangeli*) y a 15 chinches con *T. cruzi* (*T. rangeli*-*T. cruzi*).

De tal manera que se tuvieron 7 grupos experimentales cada uno conformado con 15 chinches, la dosis que se usó en ambas alimentaciones fue del 1×10^6 parásitos por 1 mL de sangre, a todas las chinches se les extrajo hemolinfa a las 24 horas y al 5to día post-alimentación, para hacer conteo de hemocitos y análisis de actividad de ProPO (solo se realizó con muestras de hemolinfa de 24 horas post-alimentaciones).

Análisis del sistema inmunitario

La hemolinfa fue recolectada con micropipetas de 5 μ L, a las 24 horas y al 5to día post-alimentación, cortando una extremidad del triatomino y presionando suavemente el abdomen de los organismos (Mello *et al.*, 1995).

Conteo de Hemocitos

Para el conteo total de hemocitos (24 horas y 5to día post-alimentaciones), se tomó una muestra de la hemolinfa y se diluyó en PBS (5µL de hemolinfa y 25µL de PBS), posteriormente se tomaron 10µL de la solución y se colocaron en un hemocitómetro para el conteo de hemocitos.

Actividad de ProPO

Se extrajeron 30µL de hemolinfa a las 24 horas post-alimentaciones (Mello *et al.*, 1995) y se diluyó con 470µL de PBS. Posteriormente se llenaron placas de 96 pozos, de la siguiente manera: Se tomaron 50µL de la muestra (hemolinfa con PBS), se colocaron 40µL de PBS y se agregaron 10µL de L-DOPA. Se incubó la placa de 15-20 minutos. Posteriormente se leyó la placa en el espectrofotómetro a 490nm.

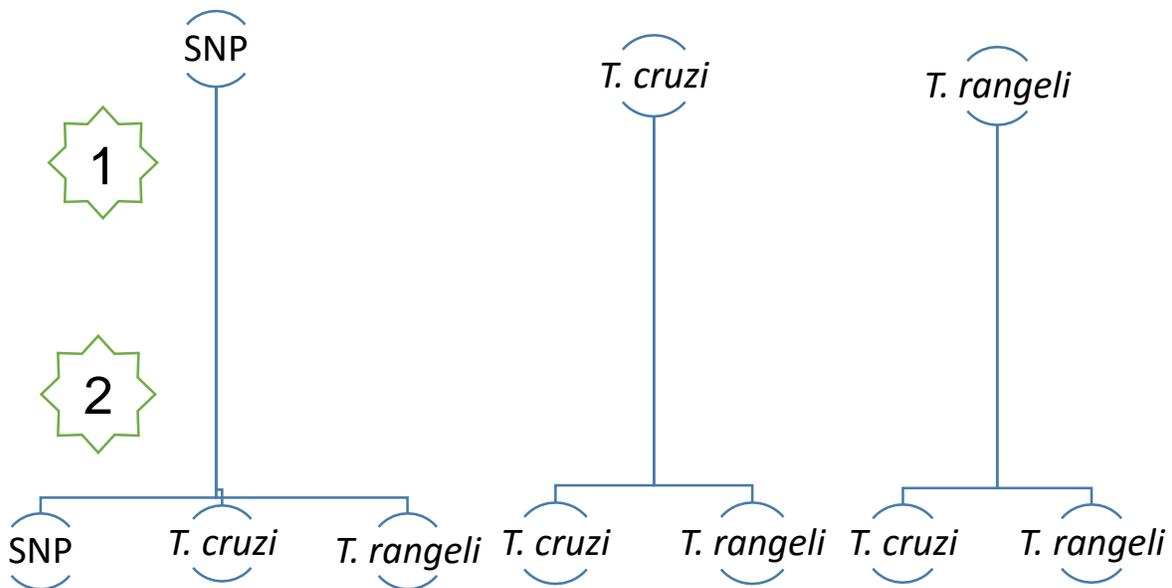


Figura 7: Diseño experimental para evaluar la respuesta de memoria inmunitaria en *Meccus pallidipennis*.

1, representa la primera alimentación que se llevó a cabo en el 5to estadio con parásitos fijados con glutaraldehído; 2, representa la segunda alimentación que se llevó a cabo en adultos, con sangre que contenía parásitos vivos; "SNP", representa los grupos alimentados con sangre SIN PARÁSITOS; "T. cruzi", los grupos alimentados con parásitos de la especie *T. cruzi*; "T. rangeli", los grupos alimentados con parásitos de la especie de *T. rangeli*.

NOTA: A partir de los ensayos previamente explicados, se estableció la dosis de parásitos que se usaría en los siguientes experimentos, así como el número de chinches que conformarían los grupos experimentales, considerando las muestras que se tomarían para realizar los ensayos de conteo de hemocitos y actividad de proPO.

Se estandarizaron los procedimientos de fijación de parásitos, la alimentación con el sistema artificial y la extracción de hemolinfa.

Además, durante el tiempo que duraron los experimentos se obtuvo experiencia para la manipulación de las chinches y los cultivos tanto celulares como de parásitos para obtener el número necesario de parásitos para los posteriores experimentos.

A partir de los datos obtenidos con los experimentos de *Meccus pallidipennis*, se establecieron los procedimientos, el tamaño de muestra y los ensayos del sistema inmune que se analizarían, para los experimentos con la especie *Rhodnius prolixus*, para el segundo objetivo de la investigación.

Protocolos para el segundo objetivo

El objetivo 2, se llevó a cabo en el Instituto Fundación Oswaldo Cruz Fio-Cruz, en Río de Janeiro, Brasil.

Obtención y mantenimiento de *Rhodnius prolixus*

Para este experimento se usaron chinches de la especie *Rhodnius prolixus* y se mantuvieron en el laboratorio de acuerdo a las siguientes condiciones para su mantenimiento y reproducción, a 28°C, con una humedad relativa (HR) de 70-80% (Arévalo *et al.*, 2007; Tay *et al.*, 2008; Rabinovich, 1972; Pérez, 2010). Las colonias se mantuvieron en forma semejante a lo propuesto por Ryckman (1951), en contenedores de vidrio. La tapa del contenedor fue sustituida por una tela delgada que permite su ventilación (Figura 8).



Figura 8: Contenedores de *Rhodnius prolixus*.

Determinación de la eficacia de la aplicación de parásitos muertos fijados con glutaraldehido

Para este procedimiento, los parásitos se cosecharon en fase de crecimiento exponencial y fueron lavados 3 veces por centrifugación en PBS a 1000g por 20 minutos a 4°C. Posteriormente se mezclaron con glutaraldehido al 0.1% durante 15 minutos a temperatura ambiente y 15 minutos a 4°C y se volvieron a lavar con PBS (Basso *et al.*, 2007). Una vez fijados los parásitos con Glutaraldehido, se agregaron en sangre y por medio del sistema de alimentación artificial se les dio de comer a las chinches.

Alimentación de los triatominos

Los triatominos se alimentaron de manera artificial con sangre de conejo inactivada (Figura 9; Gomes *et al.*, 2003) y se utilizaron las cepas “Dm28c” y “Y” de *T. cruzi* y la cepa “Macías” de *T. rangeli* (sin embargo, por problemas de mantenimiento y contaminación, ésta última cepa se descartó para los experimentos), las cepas “Dm28c” y “Y” se mantuvieron con medio BHI (Brian heart infusión) complementado con 10% suero fetal bovino, hemina y ácido fólico (Mello *et al.*, 1995).

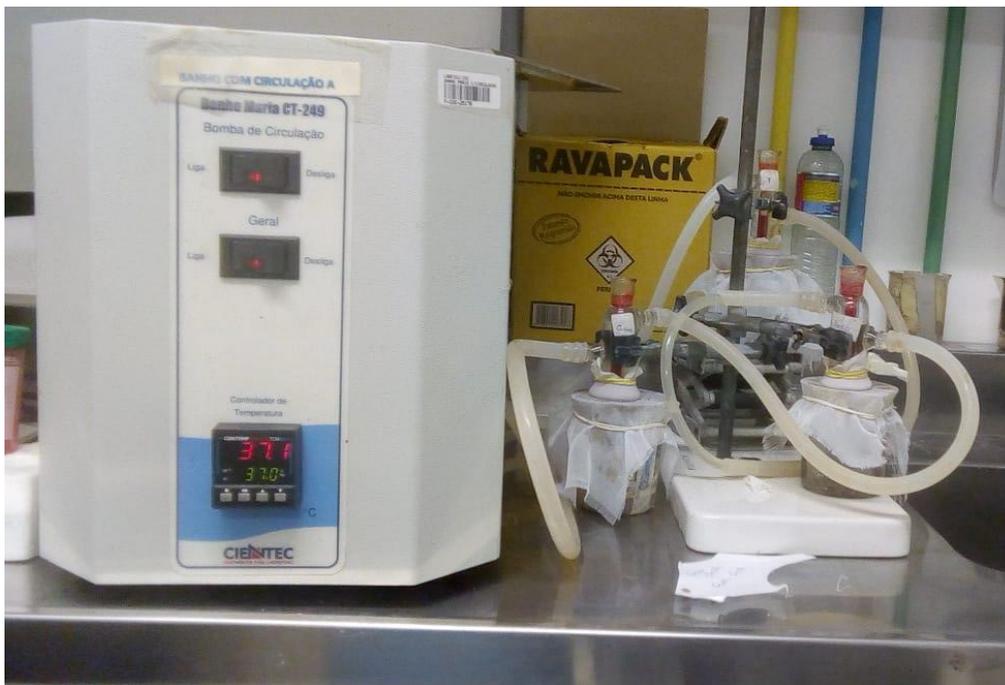


Figura 9: Sistema de alimentación artificial para *Rhodnius prolixus*.

Tasa de supervivencia y muda

Para evaluar la tasa de supervivencia y muda, se realizó una primera alimentación en el 4to estadio y consistió en 3 grupos experimentales, el primer grupo, que terminó conformado por 176 chinches fue alimentado con sangre sin parásitos (Grupo "Control"), el segundo grupo con 109 chinches, fue alimentado con sangre que contenía parásitos muertos fijados con glutaraldehído de *T. cruzi* de la cepa "Dm28c" (Grupo "Dm28c") y el tercer grupo con 93 chinches con sangre que contenía parásitos muertos fijados con glutaraldehído de *T. cruzi* de la cepa "Y" (Grupo "Y"). Posteriormente a la alimentación, se registró la tasa de supervivencia y muda, hasta que las chinches mudaron a 5to estadio.

Una vez que las chinches mudaron a 5to estadio, fueron alimentadas con parásitos vivos, a excepción de 70 chinches del grupo "Control" que fueron alimentadas con sangre sin parásitos (Grupo Control-Control). Del grupo "Control" a 51 chinches se les alimento con sangre con parásitos vivos de *T. cruzi* cepa "Dm28c" (Grupo Control-Dm28c), y 47 chinches con la cepa "Y" (Grupo Control-Y). Del grupo "Dm28c" a 46 chinches con cepa "Dm28c" (Grupo Dm28c-Dm28c), y 55 chinches con la cepa "Y" (Grupo Dm28c-Y). Y del grupo "Y" a 45 con la cepa "Dm28c" (Grupo Y-Dm28c) y 44 chinches con parásitos de la cepa "Y" (Grupo Y-Y). La dosis usada para ambas alimentaciones fue de 1×10^6 parásitos por 1mL de sangre. Y posteriormente a esta segunda alimentación se registró la supervivencia y la muda de las chinches hasta llegar a Adulto (Figura 10).

Análisis estadísticos

Después del segundo desafío, se usó la prueba Log-rank χ^2 para detectar diferencias en las curvas de supervivencia y muda entre los grupos experimentales y los grupos control (Vargas *et al.*, 2016)

Se compararon los resultados del número de hemocitos, la actividad del sistema de fenoloxidasa y actividad lítica entre grupos por medio de una prueba de Kruskal-Wallis y ANOVA

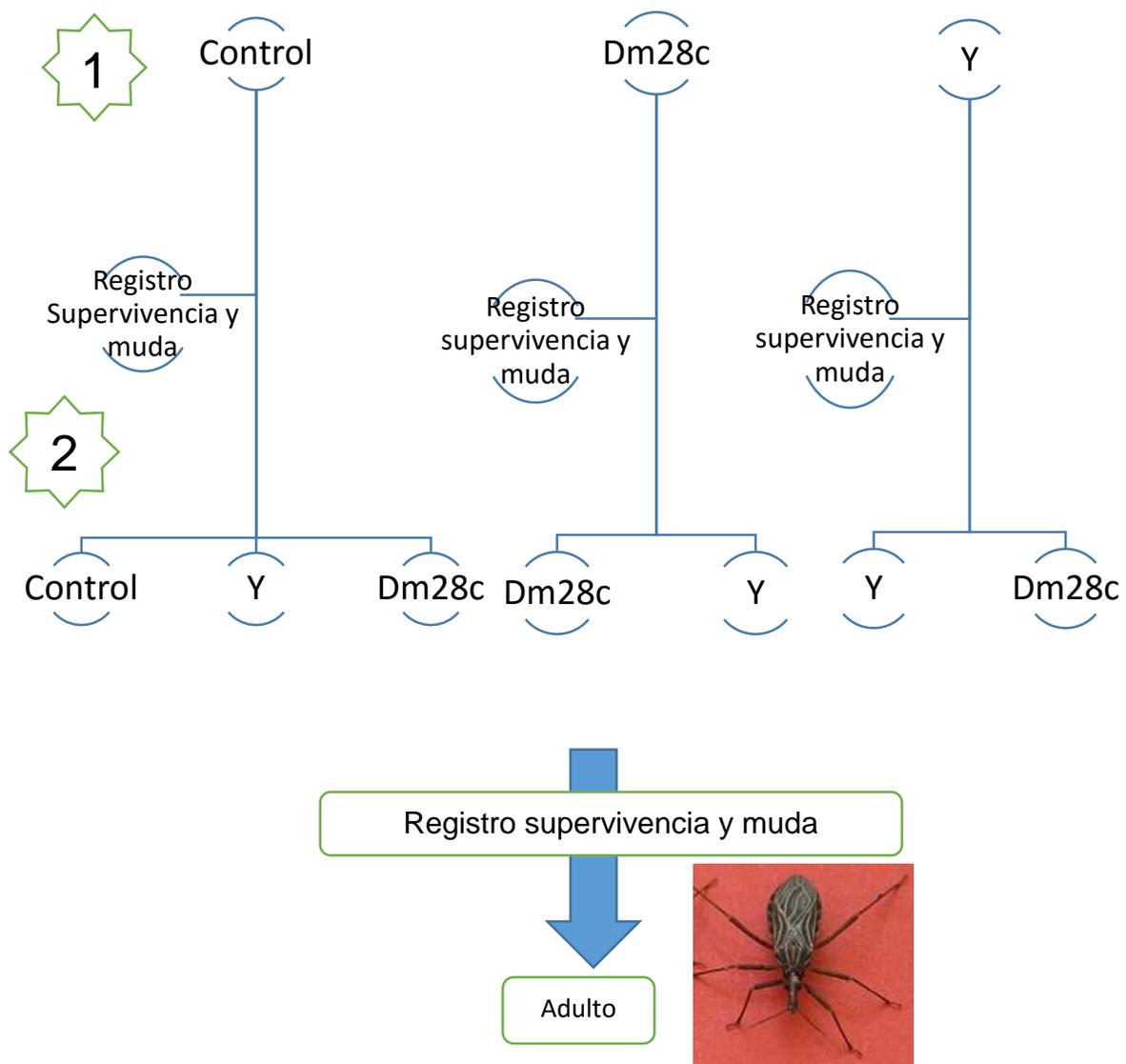


Figura 10: Diseño experimental que se llevó acabo para *Rhodnius prolixus*.

1, primera alimentación que se llevó acabo en el 4to estadio con parásitos fijados con glutaraldehido; 2, segunda alimentación que se llevó acabo en 5to estadio, con sangre que contenía parásitos vivos; “control”, representa los grupos alimentados con sangre SIN PARÁSITOS; “Y”, los grupos alimentados con parásitos de la cepa Y; “Dm28c”, los grupos alimentados con parásitos de la cepa “Dm28c”.

Resultados

Los resultados de esta investigación fueron:

1. Se publicó un artículo de revisión a la revista Acta tropica "The innate immune response of triatomines against *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* with an unresolved question: do triatomines have immune memory?" (Se adjunta el artículo en la sección Anexos)
2. Para el primer objetivo: Se muestran los resultados del experimento de Memoria inmunitaria de *Meccus pallidipennis*.
3. Para el segundo objetivo: Se enviará un artículo a Microbial Pathogenesis "Benefits and costs of immune memory in *Rhodnius prolixus* due to *Trypanosoma cruzi* Infection"
(Se adjunta el artículo ESTATUS: en revisión por los autores)

Anexos

Se anexan los artículos y los datos del objetivo 1.



The innate immune response of triatomines against *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* with an unresolved question: Do triatomines have immune memory?

S.P. Carmona-Peña^{a,c}, J. Contreras-Garduño^b, D.P. Castro^c, J. Manjarrez^d, J. C. Vázquez-Chagoyán^{e,*}

^a Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, México

^b ENES UNAM, Unidad Morelia, Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda San José de la Huerta, C.P. 58190 Morelia, Michoacán, México

^c Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^d Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario 100, Col. Centro, CP 5000 Toluca, Estado de México, México

^e Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CESA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Km 15.5 autopista de cuota Toluca-Atlaconulco. C.P. 50200 Estado de México, México

ARTICLE INFO

Keywords

Host-parasite interaction
eco-immunology
Chagas disease
Immune priming
Innate immunity
Vectors

ABSTRACT

The present work aimed to review the immune response from different triatomines against *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* and propose the study of immune memory in such insects. *Trypanosoma* use triatomines as vectors to reach and infect mammals. A key question to be answered about vector-parasite interaction is why the immune defense and resistance of the insect against the parasites vary. Up to date data shows that the defense of triatomines against parasites includes cellular (phagocytosis, nodulation and encapsulation) and humoral (antimicrobial peptides, phenoloxidase and reactive oxygen and nitrogen species) responses. The immune response varies depending on the triatomine species, the trypanosome strain and species, and the insect intestinal microbiota. Despite significant advances to understand parasite-insect interaction, it is still unknown if triatomines have immune memory against parasites and if this memory may derive from tolerance to parasites attack. Therefore, a closer study of such interaction could contribute and establish new proposals to control the parasite at the vector level to reduce parasite transmission to mammals, including men. For instance, if immune memory exists in the triatomines, it would be interesting to induce weak infections in insects to find out if subsequent infections are less intense and if the insects succeed in eliminating the parasites.

1. Introduction

Chagas disease, also called American Trypanosomiasis, is potentially lethal to humans and can be found in 21 Latin American countries. The disease has two completely different phases in humans. In the first instance, there is an acute infection, which extends for about two months, where the parasites circulate in the blood and infect some tissues such as the heart and skeletal and smooth muscle. At this point, in most cases, signs are mild and non-specific such as fever, headache, lymphadenopathy, paleness, muscle pain, breathing difficulty, and abdominal and/or thoracic pain. In the second phase of the disease, the chronic infection, the parasites are also infecting heart tissue, skeletal muscle and smooth muscle from the digestive tract. Despite no evident

parasitemia, after several years, the infection may induce death due to cardiac arrhythmia and insufficiency caused by tissue destruction (World Health Organization, 2018). The etiological agent of such disease is the protozoa *Trypanosoma cruzi*, endemic from the South of the USA down to Argentina. It is mainly transmitted to humans through feces of the insect known as kissing bug (World Health Organization, 2018). Currently, many cases of Chagas disease reported are of oral transmission (Guarner, 2019). However, the capacity of a determined triatomine species to carry and support development up to the infecting stages of the parasite mainly depends on factors such as the immune response of the insect, the parasites' genetic identity, and feeding and defecating patterns (Azambuja and García, 2005).

All hematophagous species from the Triatominae and several from

* Corresponding author.

E-mail addresses: jcg@enesmorelia.unam.mx (J. Contreras-Garduño), jcvch@yahoo.com (J.C. Vázquez-Chagoyán).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106108>

Received 10 November 2020; Received in revised form 17 August 2021; Accepted 18 August 2021

Available online 25 August 2021

0001-706X/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

Benefits and costs of immune memory in *Rhodnius prolixus* due to *Trypanosoma cruzi* Infection

Carmona-Peña S.P.¹, Vázquez-Chagoyán J.C.^{1*}, Genta F. A.², Castro D. P.² &
Contreras-Garduño J.^{3*}.

¹ Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.

² Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³ ENES, UNAM, Unidad Morelia, Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda San José de la Huerta, C.P. 58190, Morelia, Michoacán, México.

*Correspondence: jcg@enesmorelia.unam.mx; jcvch@yahoo.com

Resultados objetivo 1

Memoria inmunitaria *Meccus pallidipennis*.

No se encontraron diferencias significativas en el número de hemocitos con la prueba de Kruskal-Wallis 10.81, g.l = 5, $p = 0.055$, a las 24 horas ni al 5to día post-alimentación entre los grupos. Los grupos registraron a las 24 horas post-alimentación los siguientes datos de hemocitos: el grupo SNP registro $195,652 \pm 83,819$ ($n = 23$), el grupo *T. cruzi* con $264,286 \pm 335,369$ ($n = 14$) y el grupo *T. rangeli* con $300,000 \pm 166,771$ ($n = 17$). Al 5to día post-alimentación el grupo SNP registró $241,304 \pm 233,380$ hemocitos ($n = 23$), *T. cruzi* $369,231 \pm 231,425$ ($n = 13$) y *T. rangeli* $461,765 \pm 377,711$ ($n = 17$; Figura 11).

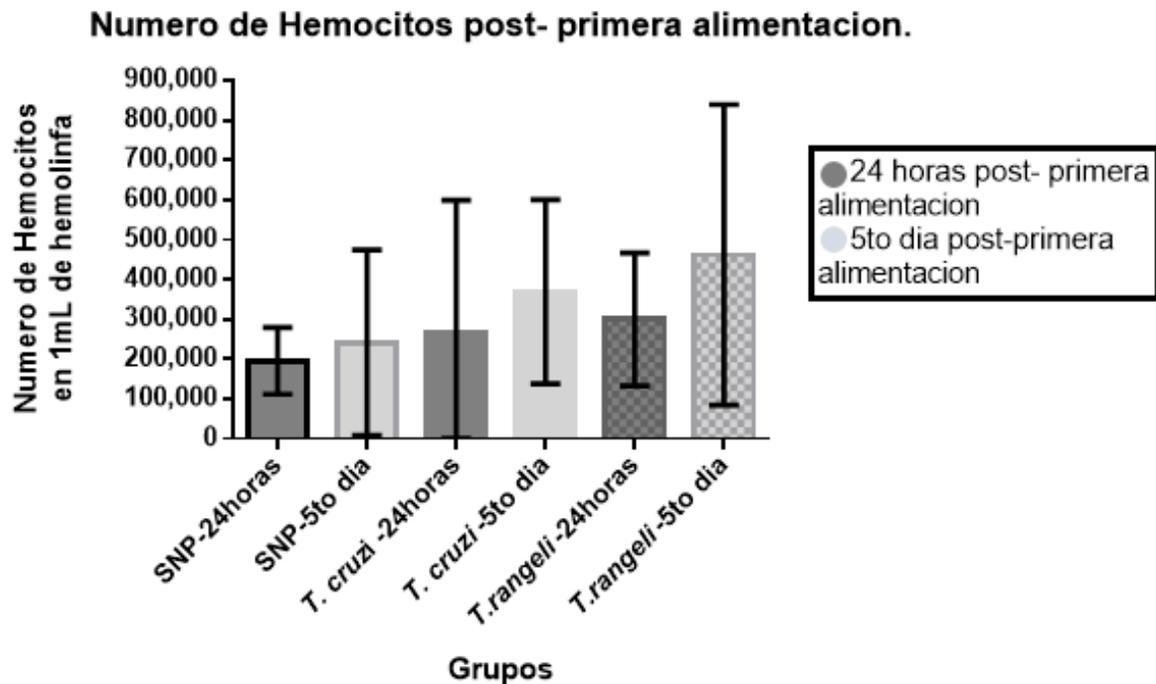


Figura 11: Número de hemocitos post-primera alimentación.

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en el número de hemocitos post-segunda alimentación (con parásitos de *T. cruzi*) con la prueba Kruskal-Wallis 5.789, g.l = 7, $p = 0.565$, a las 24 horas y 5to día post- segunda alimentación (Figura 12).

El grupo SNP-SNP registró a las 24 horas post-segunda alimentación $120,000 \pm 57,009$ hemocitos ($n = 5$), el grupo SNP-*T.cruzi* $310,000 \pm 245,967$ ($n = 5$), *T. cruzi*-*T. cruzi* $225,000 \pm 103,682$ ($n = 6$) y el grupo *T. rangeli*-*T. cruzi* $220,000 \pm 152,480$ ($n = 5$). Al 5to día post-segunda alimentación registraron, SNP-SNP $280,000 \pm$

144,049 hemocitos (n = 5), SNP-*T. cruzi* 375,000 ± 388,909 (n = 5), *T. cruzi*-*T. cruzi* 220,000 ± 115,109 (n = 5), y el grupo *T. rangeli*-*T. cruzi* 162,500 ± 143,614 (n = 5; Figura 12).

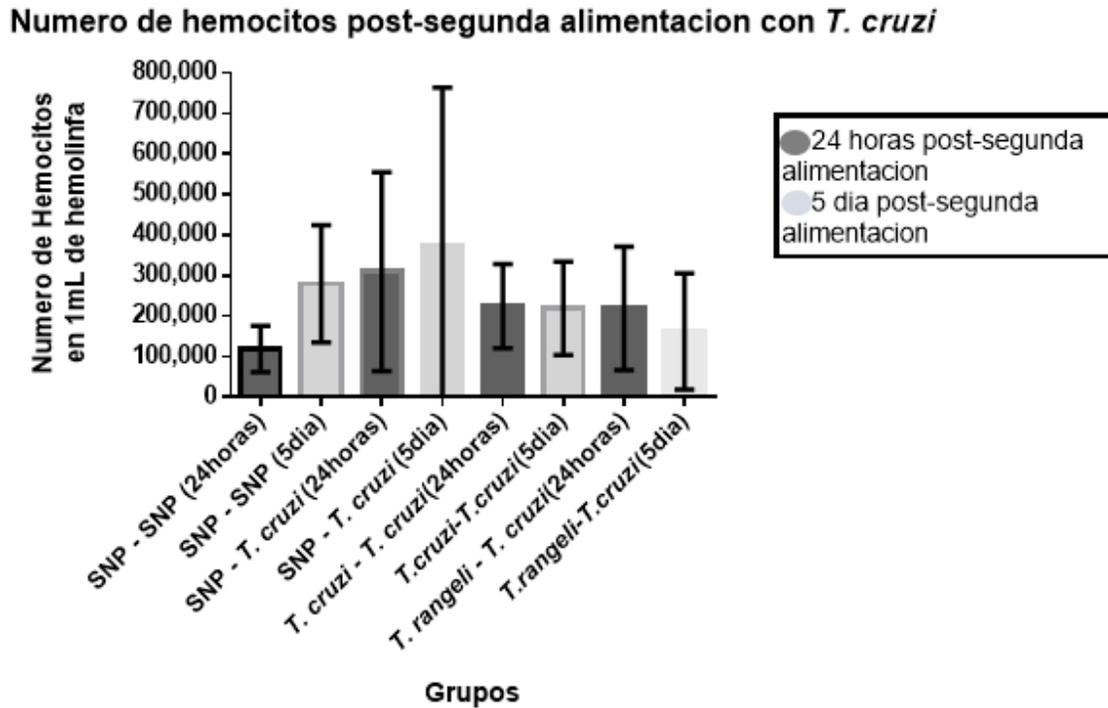


Figura 12: Número de hemocitos post-segunda alimentación con *T. cruzi*.

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en el número de hemocitos post-segunda alimentación (con parásitos de *T. rangeli*) con la prueba Kruskal-Wallis 8.193, g.l = 7, p = 0.3159, a las 24 horas y al 5to día post-alimentación. El número de hemocitos a las 24 horas post-segunda alimentación en el grupo SNP- SNP fue de 120,000 ± 57,009 (n = 5), el grupo SNP-*T. rangeli* registro 320,000 ± 195,576 (n = 5), *T. cruzi*-*T. rangeli* 183,333 ± 152, 753 (n = 3) y el grupo *T. rangeli*-*T. rangeli* 220,000 ± 115,109 (n = 5). Al 5to día post- alimentación e l número de hemocitos fueron los siguientes: en el grupo SNP-SNP 280,000 ± 144,049 (n = 5), el grupo SNP-*T. rangeli* con 450,000 ± 282,843 (n = 2), *T. cruzi*-*T. rangeli* con 583,333 ± 794,250 (n = 3) y el grupo *T. rangeli*-*T. rangeli* con 475,000 ± 388,909 hemocitos (n = 2; Figura 13).

Numero de hemocitos post- segunda alimentacion con *T. rangeli*

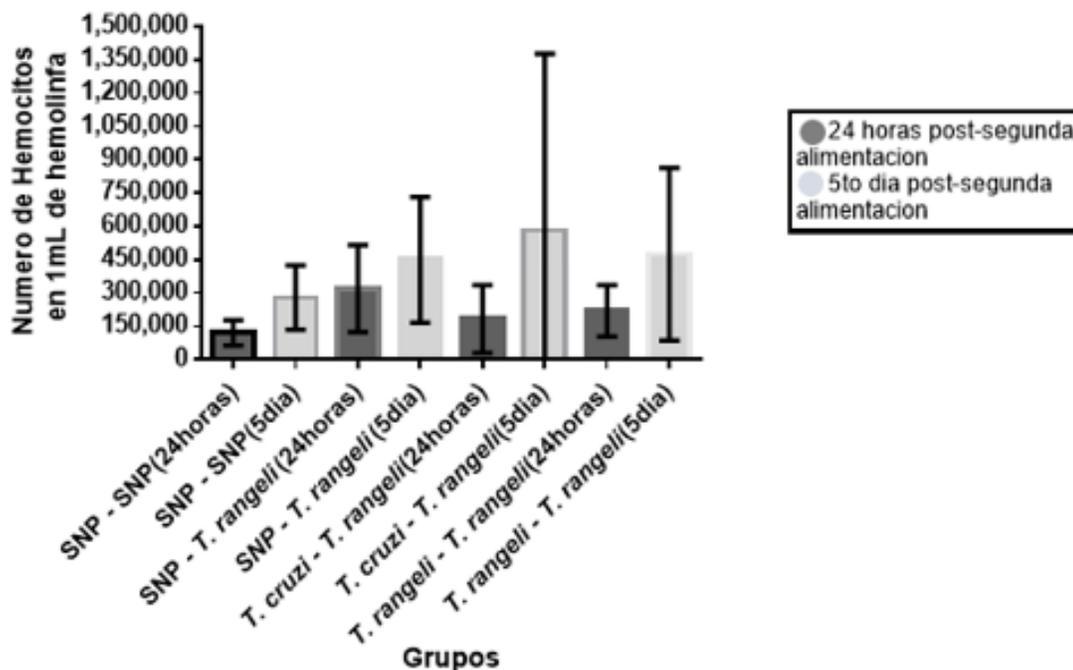


Figura 13: Número de hemocitos post-segunda alimentación con *T. rangeli*.

Actividad proPO.

No se encontraron diferencias significativas en la actividad de proPO a las 24 horas post-primera alimentación, con la prueba de Kruskal-Walis 3.573, g.l. = 2 , p = 0.167, entre los grupos SNP, con una actividad de proPo de 0.00180 ± 0.0024 (n = 23), en el grupo *T. cruzi* la actividad de proPO fue de 0.00162 ± 0.00255 (n = 14) y en el grupo *T. rangeli* 0.00059 ± 0.0004 (n = 16, Figura 14).

No se encontraron diferencia significativas en la actividad de proPO a las 24 horas post-segunda alimentación, con la prueba de Kruskal-Walis 5.105 g.l = 6 y una p = 0.53. El grupo SNP-SNP registro una actividad de proPo de 0.00242 ± 0.0023 (n=5), SNP-*T. cruzi* registro 0.00202 ± 0.0024 (n = 5), SNP-*T. rangeli* con una actividad de 0.0008 ± 0.0016 (n = 4), el grupo *T. cruzi* - *T. cruzi* con 0.0002 ± 0.0003 (n = 6), el grupo *T. cruzi*-*T. rangeli* con 0.0028 ± 0.0047 (n = 3), el grupo *T. rangeli*-*T. rangeli* 0.0008 ± 0.0019 (n = 5) y el grupo *T. rangeli*-*T. cruzi* 0.0022 ± 0.0029 (n = 4; Figura 15).

Actividad de proPO 24 horas post - primera alimentacion.

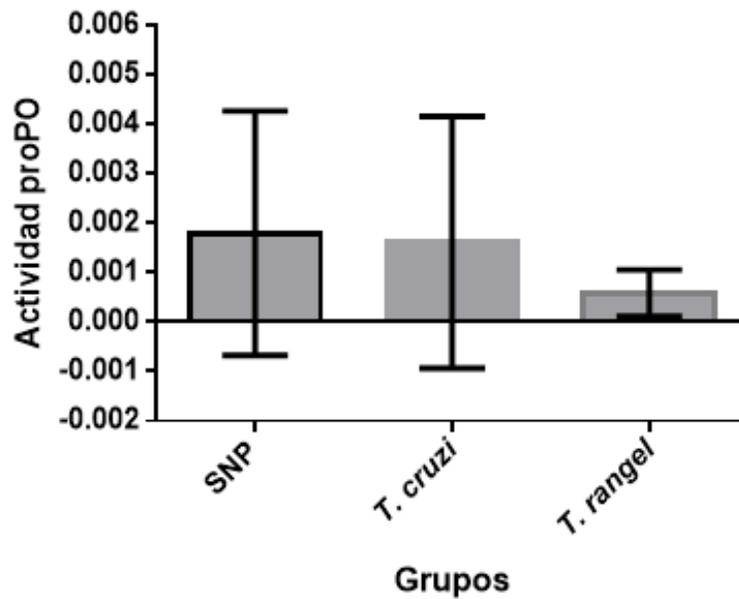


Figura 14: Actividad de proPO a las 24 horas post-primera alimentación.

Actividad proPo 24 horas post-segunda alimentacion.

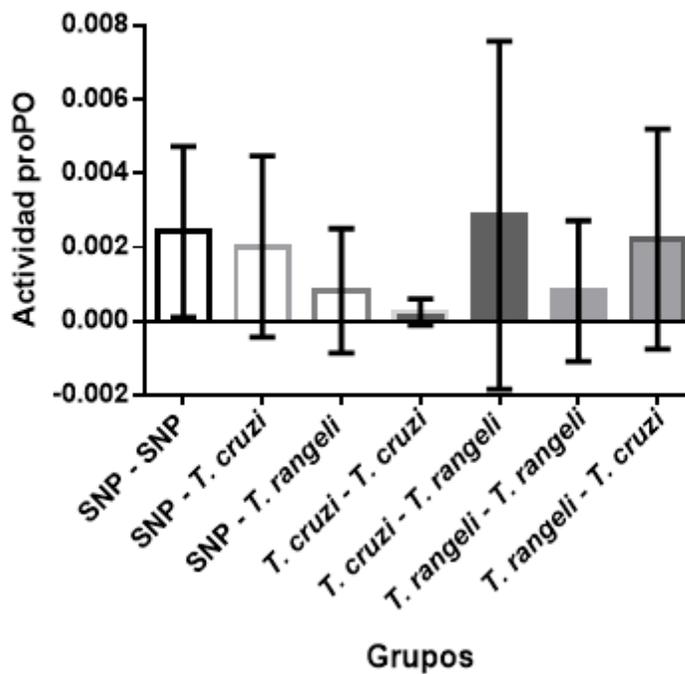


Figura 15: Actividad proPO a las 24 horas post-segunda alimentación.

Actividad proPO comparacion ambas alimentaciones.

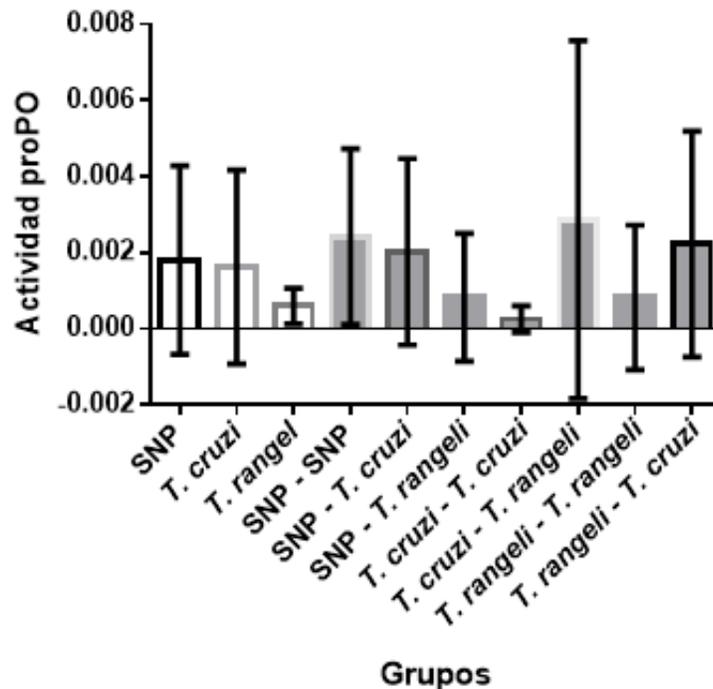


Figura 16: Comparación de la actividad proPO entre los grupos de la primera y la segunda alimentación.

No hay diferencias significativas entre los grupos en la actividad proPO a las 24 horas post-primera y segunda alimentación, con la prueba Kruskal-Wallis 9.582, g.l = 9 y una $p = 0.385$. SNP, registro una actividad de proPO de 0.00180 ± 0.0024 ($n = 23$) post-primera alimentación, en el grupo *T. cruzi* se observó una actividad de 0.00162 ± 0.00255 ($n = 14$) y en el grupo *T. rangeli* fue de 0.00059 ± 0.0004 ($n = 16$). En la actividad de proPO a las 24 horas post- segunda alimentación, el grupo SNP-SNP obtuvo 0.00242 ± 0.0023 ($n = 5$), el grupo SNP-*T. cruzi* 0.00202 ± 0.0024 ($n = 5$), SNP-*T. rangeli* 0.0008 ± 0.0016 ($n = 4$), el grupo *T. cruzi*-*T. cruzi* 0.0002 ± 0.0003 ($n = 6$), el grupo *T. cruzi*-*T. rangeli* con 0.0028 ± 0.0047 ($n = 3$), el grupo *T. rangeli*-*T. rangeli* 0.0008 ± 0.0019 ($n = 5$) y el grupo *T. rangeli*-*T. cruzi* registró 0.0022 ± 0.0029 ($n = 4$; Figura 16).

Discusión General

A pesar de que hay evidencia de una respuesta de memoria inmune en insectos como en lepidópteros, dípteros, himenópteros y coleópteros (Mulinovic y Kurtz, 2016; Lanz-Mendoza y Contreras-Garduño 2018, 2021), hasta ahora no se habían reportado estudios en triatomíneos. Los estudios en triatomíneos se enfocan en describir la respuesta inmunitaria contra diferentes cepas de los parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* (Mello *et al.*, 1995; Azambuja y García, 2005; Vallejo *et al.*, 2015). La interacción entre *Rhodnius prolixus* y *T. rangeli* es la más estudiada, y se han encontrado diversos mecanismos del sistema inmunitario como lizoenzimas, lectinas, factores tripanolíticos (Mello *et al.*, 1995, 1999; Gomes *et al.*, 1999; Gregorio y Ratcliffe, 1991), activación del sistema profenoloxidasa (Mello *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 1999, 2003; Garcia *et al.*, 2004a), fagocitosis, microaglutinación de hemocitos (Mello *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 2004a), producción de óxido nítrico y superóxido (Whitten *et al.*, 2001, 2007), las vías de eicosanoides (García *et al.*, 2004b) y la melanización en la microagregación de hemocitos (Alvarenga *et al.*, 1990). Gomes *et al.*, 2003, reportó una inhibición de proPO en los grupos que tuvieron un desafío con parásitos de *T. rangeli* de forma oral y posteriormente de forma inoculada, en comparación a los grupos que no tuvieron un desafío oral y solo se les inoculó el parásito, teniendo una mayor actividad con diferencias significativa de proPO.

A pesar de que los resultados de esta investigación con *Meccus pellidipennis* y los parásitos de la cepa “NINOA” (*T. cruzi*) y la cepa “Guatemala” (*T. rangeli*) no muestran diferencias significativas en el número de hemocitos a las 24 horas y al 5to día post primera alimentación, se observa una tendencia a aumentar la cantidad de hemocitos en el grupo que fue alimentado con parásitos muertos fijados con glutaraldehído de la cepa de *T. rangeli*, esto es interesante ya que se sabe que los parásitos de *T. rangeli* pueden salir del intestino, ingresar al hemocele e invadir los hemocitos, donde se multiplican. En ciertas especies como en *Rhodnius prolixus* los epimastigotes cortos son reemplazados por los epimastigotes largos, los cuales salen de los hemocitos y se adhieren a las glándulas salivales, donde producen tripomastigotes metacíclicos y así son transferidos directamente al mamífero por la picadura del insecto (Vallejo *et al.*, 2015). Este resultado sugeriría que el insecto está montando una respuesta celular esperando que el parásito llegue al hemocele, sin embargo, es necesario realizar otro experimento ampliando el tamaño de muestra, usando parásitos vivos en la primera alimentación para confirmar esto y saber cómo se comporta la respuesta celular con parásitos vivos. Además, la activación del sistema inmunitario en alimentaciones con sangre que contiene parásitos muertos no es suficiente para activar el sistema inmunitario, ya que se sabe que el uso de parásitos vivos en lugar de parásitos muertos, genera una respuesta mayor del sistema inmune (Mulinovic y Kurtz, 2016). Aunque esta mayor activación del sistema inmunitario con parásitos vivos no se observa en los

resultados, en la Figura 11, el grupo alimentado con parásitos muertos de *T. cruzi* a las 24 horas y al 5to día, registran aproximadamente el mismo número de hemocitos que los grupos que en la segunda alimentación se usaron parásitos vivos de *T. cruzi* (SNP- *T. cruzi*). Esto mismo se observa con los grupos alimentados con *T. rangeli*, es necesario ampliar la muestra para confirmar esta observación.

En cuanto a la segunda alimentación, tampoco se encontraron diferencias significativas en el número de hemocitos a las 24 horas y al 5to día post-alimentación. Sin embargo, se observa que el grupo que no tuvo una previa activación del sistema inmunitario y fue desafiado con parásitos vivos de *T. cruzi*, muestra una tendencia a tener mayor cantidad de hemocitos. Esto sugiere que el insecto activa la respuesta celular, aunque *T. cruzi*, cumple parte de su ciclo de vida en el intestino del insecto (Teixeira *et al.*, 2001), tal vez sale del intestino e ingresa al hemocele, donde serían eliminados por los hemocitos, por lo tanto *T. cruzi* solo se puede transmitir por medio de las heces de los insectos (Teixeira *et al.*, 2001). Es necesario realizar más investigaciones ampliando el número de muestra y observar el comportamiento de *T. cruzi* dentro del insecto, para poder confirmar esto. Esto pasa en *Rhodnius prolixus* y *R. robustus*, los cuales se sabe que pueden transmitir los parásitos de *T. rangeli* (KPI +), ya que si logran invadir los hemocitos, donde se reproducen y posteriormente salen de los hemocitos y se adhieren a las glándulas salivales, pero no logran transmitir a *T. rangeli* (KPI-), ya que una vez que los parásitos salen del intestino e ingresan al hemocele son lisados por factores tripanolíticos presentes en la hemolinfa (Vallejo *et al.*, 2015).

Los resultados de proPO en *Meccus pallidipennis* y *T. cruzi*, no mostraron diferencias significativas a las 24 horas post primera alimentación. Hay pocos reportes sobre la respuesta inmunitaria de esta especie de chinche con los parásitos *T. cruzi*, uno de ellos evaluó el efecto de la actividad de proPO y se encontraron que no hay diferencia significativa a las 24 horas entre el grupo control y el grupo infectado. Sin embargo, a los días 9, 16 y 29, si se encontraron diferencias significativas, y los grupos infectados mostraron siempre menor actividad de proPO que los grupos controles (Favila-Ruíz *et al.*, 2018). En este experimento, los insectos se alimentaron directamente de ratones previamente infectados, por lo tanto, es necesario repetir los experimentos de esta investigación ampliando el tamaño de muestra y con parásitos vivos.

De igual manera, no se encontraron diferencias significativas en la actividad de proPO de *Meccus pallidipennis* y los parásitos *T. rangeli*. No hay reportes sobre la respuesta de proPO en esta especie de chinche contra los parásitos de *T. rangeli*, el único trabajo encontrado evalúa péptidos antimicrobianos en la hemolinfa (Días-Garrido *et al.*, 2019). No obstante, los grupos homólogos (*T. cruzi-T. cruzi*, *T. rangeli-T. rangeli*) mostraron menor actividad de proPO que los grupos heterólogos (*T. cruzi-T. rangeli*, *T. rangeli-T. cruzi*). Esto sugiere una inhibición de proPO cuando los insectos son dos veces alimentados con la misma cepa de parásitos, y concuerda con lo dicho por Gomes *et al.*, 2003, donde reporta una supresión del

sistema de proPO en chinches de la especie *Rhodnius prolixus* con los parásitos de *T. rangeli*. Pero es necesario realizar experimentos ampliando el tamaño de muestra y usando parásitos vivos en ambas alimentaciones, para confirmar esta inhibición de proPO en esta especie de chinche y con estos parásitos.

Aunque no hubo diferencia significativa entre la primera y segunda alimentación (Figura 6), el tamaño de muestra en los grupos pertenecientes a la segunda alimentación, es muy pequeña, por lo tanto, no son suficientes para descartar posibles diferencias en los triatominos frente a estos parásitos. Sería interesante realizar otro experimento aumentando el tamaño de muestra ya que se sabe que los parásitos podrían inhibir la actividad de proPO en un segundo encuentro con *T. rangeli* (Vallejo *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2009).

En los resultados de *Rhodnius prolixus* el grupo Dm28c-Dm28c, fue el grupo que mostró una mayor tasa de muda y una menor tasa de supervivencia, aparentemente debido a la virulencia de esta cepa. Se sabe que la cepa Dm28c es virulenta en *Rhodnius prolixus* ya que logra hacer una infección exitosa en el intestino de la chinche (Mello *et al.*, 1996). El montar una respuesta inmunitaria frente a esta cepa, implica un costo muy alto para la chinche, por lo tanto, no se producirá una inversión en la defensa (se aceptará un riesgo de daño; Rolff y Siva-Jothy, 2003; Schmid-Hempel, 2005), y se invertirá en acelerar el crecimiento y así la reproducción (Thomas y Rudolf, 2010). Nuestros datos sugieren que esto estaría pasando en *Rhodnius prolixus* cuando es desafiado con la cepa Dm28c. En cuanto a la supervivencia, los grupos Dm28c-Dm28c y el grupo Y-Y, muestran diferencias significativas siendo el grupo Dm28c-Dm28c el grupo con menor tasa de supervivencia y el grupo Y-Y el grupo con mayor tasa de supervivencia. Esto concuerda con lo observado por Medina-Gómez *et al.*, 2019, ya que la memoria innata esta estrechamente relacionada con la virulencia del patógeno.

Finalmente, la supervivencia de los grupos desafiados con la cepa Y, con previa activación del sistema inmunitario, registraron una tasa de supervivencia mayor que el grupo que no tuvo una activación previa (Grupo Control-Y). Esto sugiere una respuesta de memoria inmunitaria, aunque no es específica a nivel de cepa, ya que los grupos heterólogos y homólogos (Grupo Dm28c-Y y grupo Y-Y, respectivamente) no muestran diferencias significativas entre ellos (Kurtz y Milutinovic, 2016; Contreras-Garduño *et al.*, 2016). En cuanto a la supervivencia del grupo Dm28c-Dm28c, la supervivencia no se vio afectada de manera positiva y esto sugiere que no hay una respuesta de memoria inmunitaria contra esta cepa, esto concuerda con lo dicho por Contreras-Garduño *et al.*, 2016, ya que la memoria innata no ocurre contra algunos patógenos. Estos datos sugieren una respuesta de memoria inmunitaria de *Rhodnius prolixus* contra la cepa Y, y sería interesante observar cómo se comportan los componentes inmunitarios.

Conclusión General

Objetivo 1

Es necesario realizar otro experimento para *Meccus pallidipennis* ampliando el número de muestra entre los grupos, además de realizar otros experimentos analizando diversos componentes del sistema inmune de los triatomíneos, como analizar la expresión de péptidos antimicrobianos, catalasa, actividad lítica, citosinas, y fenoloxidasa (en intestino), para poder saber si existe una respuesta de memoria inmune frente a los parásitos *T. rangeli* y *T. cruzi*.

Objetivo 2

Los datos de supervivencia post-segunda alimentación con la cepa “Y” sugieren una respuesta de memoria innata a nivel de cepa en *Rhodnius prolixus*.

La virulencia de la cepa Dm28c, juega un papel importante en la tasa de supervivencia y muda de las chinches de *Rhodnius prolixus*.

El desafío con parásitos muertos, no estimula lo suficiente al sistema inmunitario, por lo tanto, se propone realizar estudios con parásitos vivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abad-Franch, F., Monteiro, F.A., Jaramillo, O.N., Gurgel-Gonçalves, R., Dias, F.B., & Diotaiuti, L. (2009). **Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae)**. *Acta Tropica*, 110(2-3),159-177. doi:10.1016/j.actatropica.2008.06.005
- Abad-Franch, F., & Monteiro, F.A. (2007). **Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): Implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(suppl 1),57-70. doi:10.1590/S0074-02762007005000108
- Abad-Franch, F., Pavan, M.G., Jaramillo-O, N., Palomeque, F.S., Dale, C., Chaverra, D., & Monteiro, F. A. (2013). ***Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(suppl 1), 92-99. doi: 10.1590/0074-0276130434
- Alvarenga N.J., Bronfen, E., Alvarenga, R. J., & Barraco, M.A. (1990). **Triatomine´s hemocytes and granuloma formation and biological and non-biological materials**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85(3), 377–379. doi:10.1590/S0074-02761990000300019
- Antón Marín, Y., & Salazar-Lugo, R. (2009). **El sistema inmune de los invertebrados**. REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*.10, 467-481. [fecha de Consulta 2 de Febrero de 2021]. ISSN: Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=636/63617144012>
- Aparicio-Burgos, J.E., Ochoa-García, L., Zepeda-Escobar, J.A., Gupta, S., Dhiman, M., Martínez, J.S., de Oca-Jiménez, R.M., Arreola, M.V., Barbabosa-Pliego, A., Vázquez-Chagoyán, J.C., & Garg, N.J. (2011). **Testing the Efficacy of a Multi-Component DNA-Prime/DNA-Boost Vaccine against *Trypanosoma cruzi* Infection in Dogs**. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(5),e1050. doi:10.1371/journal.pntd.0001050.
- Arévalo, A., Carranza, J.C., Guhl, F., Clavijo, J.A., & Vallejo, G.A. (2007). **Comparación del ciclo de vida de *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius prolixus* en condiciones de laboratorio**. *Biomédica*. 27(Suppl 1), 119-129. doi: 10.7705/biomedica.v27i1.255
- Azambuja, P., & Garcia, E. (2005). ***Trypanosoma rangeli* interactions within the vector *Rhodnius prolixus* – A mini review**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(5), 567-572. doi: 10.1590/s0074-02762005000500019

- Bacca, T., & Lagos, B.T.C. (2014). **Effect of *Beauveria bassiana* and entomopathogenic nematode *Steinernema* sp. on *Galleria mellonella* larvae.** Boletín Científico del Centro de Museos, 18(1), 247-258.
- Barrangou, R., & Marraffini, L.A. (2014). **CRISPR–Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity.** Molecular Cell, 54(2), 234–244. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.011
- Barreto, A.C., Marsden, P.D., Cuba, C.C., & Alvarenga, N.J. (1978). **Preliminary Study on the Use of *Dipetalogaster maximus* (Uhler, 1984) (triatominae) in the Xenodiagnostic Technic in the Chronic Form of Chagas' Disease.** Revista Instituto Medical Tropical Sao Paulo. 20(4): 183-189.
- Basso, B., Castro, I., Introini, V., Gil, P., Truyens, C., & Moretti, E. (2007). **Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*.** Vaccine, 25(19), 3855-3858 doi: 10.1016/j.vaccine.2007.01.114
- Bolte, S., Roth, O., Philipp, E.E.R., Saphörster, J., Rosenstiel, P., & Reusch, T.B.H (2013). **Specific immune priming in the invasive ctenophore *Mnemiopsis leidyi*.** Biology Letter, 9(6), 20130864-20130864. doi:10.1098/rsbl.2013.0864
- Brown, T., & Rodriguez-Lanetty, M. (2015). **Defending against pathogens – immunological priming and its molecular basis in a sea anemone, cnidarian.** Scientific Reports, 5(1). doi: 10.1038/srep17425
- Contreras, J., Lanz-Mendoza, H., Franco, B., Nava, A., Pedraza, M., & Canales, J. (2016). **Insect immune priming: ecology and experimental evidences.** Ecological Entomology, 41(4), 351-366. doi:10.1111/een.12300
- Contreras-Garduño, J., Rodríguez, M.C., Hernández-Martínez, S., Martínez-Barnette, J., Alvarado-Delgado, A., Izquierdo, L., & Argotte-Ramos, R. (2015). ***Plasmodium berghei* induced priming in *Anopheles albimanus* independently of bacterial co-infection.** Developmental and Comparative Immunology, 52(2), 172-181. doi: https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.05.004
- Cuba Cuba, C.A. (1972) **Development of *T. rangeli* metacyclic forms from triatomid bugs' salivary glands ingested by *Rhodnius ecuadoriensis*.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 66(6), 944-945. doi:10.1016/0035-9203(72)90134-4
- da Rosa, J.A., Mendonça, V.J., Gardim, S., de Carvalho, D.B., de Oliveira, J., Nascimento, J.D., Pinotti, H., Pinto, M.C., Cilense, M., Galvão, C., & Barata, J.M. (2014). **Study of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy.** Parasites and Vectors, 7(1), 17. doi: 10.1186/1756-3305-7-17

- De Stefani-Márquez, M.D., Rodrigues-Ottaiano, C., Mônica Oliveira, R., Pedrosa, A.L., Cabrine-Santos, M., Lages Silva, E., & Ramírez, L.E. (2006). **Susceptibility of different triatomine species to *Trypanosoma rangeli* experimental infection.** Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 6(1), 50-56. doi:10.1089/vbz.2006.6.50
- Dias, J., C.P. (2000). **Carlos Chagas Filho ea doença de Chagas. Alguns tracos á luz de confidências e inconfidências.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 33(3), 325-332 doi: 10.1590/S0037-86822000000300014
- Díaz-Garrido, P., Martínez-Martínez, I., Espinoza Guitierrez, B. (2019). **Presencia de péptidos en la hemolinfa de triatoma (*Meccus pallidipennis*, Hemíptera: Reduviidae) infectado con *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* y bacterias.** Entomología mexicana, 6:543-547
- Dos-Santos, A.L.A., Dick, C.F., Alves-Bezerra, M., Silveira, T.S., Paes, L.S., Gondim, K.C., & Meyer-Fernandes, J.R. (2012). **Interaction between *Trypanosoma rangeli* and the *Rhodnius prolixus* salivary gland depends on the phosphotyrosine ecto-phosphatase activity of the parasite.** International Journal for Parasitology. 42(9), 819-827. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.05.011
- Dos-Santos, A. L. A., Dick, C. F., Silveira, T.S., Fonseca-de- Souza, A.L., & Meyer-Fernandes, J.R. (2013). ***Trypanosoma rangeli*: An alkaline ecto-phosphatase activity is involved with survival and growth of the parasite.** Experimental Parasitology. 135(2), 459-465. doi: 10.1016/j.exppara.2013.08.014
- Dunn, P. (1986). **Biochemical aspects of insect immunology.** Annual Review of Entomology, 31(1), 321-339. doi: 10.1146/annurev.en.31.010186.001541
- Genta, F.A., Souza, R. S., Garcia, E.S., & Azambuja, P. (2010). **Phenol oxidase from *Rhodnius prolixus*: Temporal and tissue expression pattern and regulation by ecdysone.** Journal of Insect Physiology, 56(9), 1253-1259. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.03.027
- Falla, A., Herrera, C., Fajardo, A., Montilla, M., Vallejo, G., & Guhl, F. (2009). **Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans.** Acta Tropica, 110(1), 15-21. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.12.003
- Favila-Ruíz, G., Jiménez-Cortés, G., Córdoba-Aguilar, A., Salazar-Schettino, M., Gutiérrez-Cabrera, A.E., Pérez-Torres, A., De Fuentes-Vicente, J.A., Vences-Blanco, M.O., Bucio-Torres. M.I., Flores-Villegas, L., Cabrera-Bravo, M. (2018). **Effects of *Trypanosoma cruzi* on the phenoloxidase and prophenoloxidase activity in the vector *Meccus pallidipennis***

(Hemiptera: Reduviidae). Parasit. Vectors, 11:434. doi. 10.1186/s13071-018-3016-0

- Franco, Y.B.A., Silva, I. G. da., Rassi, A., Rocha, A.C.R.G., Silva, H.H.G. da., & Rassi, G.G. (2002). **Correlação entre a positividade do xenodiagnóstico artificial e a quantidade de sangue e triatomíneos utilizados no exame, em pacientes chagásicos crônicos.** Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical, 35(1): 29-33. doi:10.1590/s0037-86822002000100006
- Freitas-Mesquita, A.L., & Meyer-Fernandes, J.R. (2014). **Ectonucleotidases and ecto-phosphatases from *Leishmania* and *Trypanosoma* Parasites. Proteins and proteomics of *Leishmania* and *Trypanosoma*.** Subcellular Biochemistry. 217-252. doi:10.1007/978-94-007-7305-9_10
- Garcia, E.S., Machado, E.M.M., & Azambuja, P. (2004b). **Inhibition of hemocyte microaggregation reactions in *Rhodnius prolixus* larvae orally infected with *Trypanosoma rangeli*.** Experimental Parasitology, 107(1-2), 31-38. doi: 10.1016/j.exppara.2004.03.015
- Garcia, E.S., Castro, D.P., Figueiredo, M.B., & Azambuja, P. (2012). **Parasite-mediated interactions within the insect vector: *Trypanosoma rangeli* strategies.** Parasites and Vectors. 5(1), 105. doi: 10.1186/1756-3305-5-105
- Garcia, E., Machado, E., & Azambuja, P. (2004). **Effects of eicosonoid biosynthesis inhibitors on the prophenoloxidase-activating system and microaggregation reactions in the hemolymph of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*.** Journal Insect Physiology, 50(2-3), 157-165. doi:10.1016/j.jinsphys.2003.11.002
- Garcia, E.S., Genta, F.A., de Azambuja, P., & Schaub, G.A. (2010). **Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*.** Trends in Parasitology. 26(10), 499-505. doi: 10.1016/j.pt.2010.07.003
- Garcia, E.S., Castro, D.P., Figueiredo, M. B., Genta, F.A. & Azambuja, P. (2009). ***Trypanosoma rangeli*: a new perspective for studying the modulation of immune reactions of *Rhodnius prolixus*.** Parasites and Vectors. 2:33. doi: 10.1186/1756-3305-2-33
- Gomes, S., Feder, D., Thomas, N., Garcia, E., & Azambuja, P. (1999). ***Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli* in vivo and in vitro experiments.** Journal of invertebrate Pathology, 73(3), 289-293. doi: 10.1006/jipa.1998.4836
- Gomes, S.A.O., Feder, D., Garcia, E.S., & Azambuja, P. (2003). **Suppression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*.** Journal of Insect Physiology, 49(9), 829–837. doi: 10.1016/s0022-1910(03)00133-1

- Gomes, S.A.O., Fonseca de Souza, A.L., Kiffer-Moreira, T., Dick, C.F., dos Santos, A. L. A., & Meyer-Fernandes, J.R. (2008). **Ecto-phosphatase activity on the external surface of *Rhodnius prolixus* salivary glands: Modulation by carbohydrates and *Trypanosoma rangeli***. *Acta Tropica*, 106(2), 137-142. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.02.008
- Goren, M., Yosef, I., Edgar, R. & Qimron, U. (2012). **The bacterial CRISPR/Cas system as analog of the mammalian adaptive immune system**. *RNA Biology*, 9(5), 549–554. doi: 10.4161/rna.20177
- Gregorio, E.A., & Ratcliffe, N.A. (1991). **The distribution of agglutinins and lytic activity against *Trypanosoma rangeli* and erythrocytes in *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* tissue extracts and haemolymph**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86(2), 181-186. doi: 10.1590/s0074-02761991000200007
- Guhl, F., & Vallejo, G.A. (2003). ***Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: An updated review**. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98(4), 435-442. doi:10.1590/S0074-02762003000400001
- Herrera, C., BARGUES, M.D., Fajardo, A., Montilla, M., Triana, O., Vallejo, G.A., & Guhl, F. (2007). **Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia**. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(4), 535-539. doi: 10.1016/j.meegid.2006.12.003
- Hildemann, W.H., Johnson, I.S., & Jokiel, P.L. (1979). **Immunocompetence in the lowest metazoan phylum: transplantation immunity in sponges**. *Science*, 204(4391),420-422. doi: 10.1126/science.441730
- Kurtz, J., & Franz, K. (2003). **Innate defense: evidence for memory in invertebrate immunity**. *Nature*, 425(6953), 37–38. doi:10.1038/425037a
- Lanz-Mendoza, H., & Contreras-Garduño, J.C. (2018). **Insect Innate Immune Memory**. *Adv. Comparative Immunol.* 193-211. doi:10.1007/978-3-319-76768-0_9
- Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Ortiz, P.A., Trejo-Varón, J. A., Carranza, J.C., Pinto C.M., Serrano, M.G., Buck, G.A., Camargo, E.P., & Teixeira, M.M. (2015). **Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit)**. *Acta Tropica*, 151, 166-77. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.07.015
- Little, T.J., & Kraaijeveld, A.R. (2004). **Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates**. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(2), 58–60. doi: 10.1016/j.tree.2003.11.011.

- Manning-Cela, R., Cortes, A., Gonzalez-Rey, E., Van Voorhis, W.C., Swindle, J., & Gonzalez, A. (2001). **LYT1 protein is required for efficient In Vitro infection by *Trypanosoma cruzi***. *Infection and Immunity*, 69(6), 3916-3923. doi: 10.1128/iai.69.6.3916-3923.2001
- Mello, C.B., Azambuja, P., Garcia, E.S., & Ratcliffe, N.A. (1996). **Differential in vitro and in vivo behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus***. *Experimental Parasitology*, 82(2), 112-118. doi: 10.1006/expr.1996.0015
- Mello, C., García, E., Ratcliffe, N., & Azambuja, P. (1995). ***Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus***. *Journal Invertebrate Pathology*, 65(3), 261-268. doi: 10.1006/jipa.1995.1040
- Mello, C., Nigam, Y., García, E., Azambuja, P., Newton, R., & Ratcliffe, N. (1999). **Studies on a hemolymph lectin isolated from *Rhodnius prolixus* and its interaction with *Trypanosoma rangeli***. *Experimental Parasitology*, 91(4), 289-296. doi: 10.1006/expr.1998.4385
- Milutinovic, B., & Kurtz, J. (2016). **Immune memory in invertebrates**. *Seminars in Immunology*, 28(4), 328-342. doi: 10.1016/j.smim.2016.05.004
- Moreno, M. (2017). **El eficaz sistema inmune de los insectos**. *Ciencia y Desarrollo*. Doi: 10.13140/RG.2.2.20977.89446
- Pérez, R. J. (2010). **Estudio de la susceptibilidad de triatominos (Hemiptera:Reduvidae) mexicanos a *Trypanosoma cruzi* cepa NINOA**. (Maestría). Instituto Politécnico Nacional.
- Perlowagora-Szumlewicz, A., & Müller, C.A. (1982). **Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of host with Chagas' disease 1- Comparative xenodiagnosis with nine triatomine species of animal with acute infections by *Trypanosoma cruzi***. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 77(1): 37-53. doi: 10.1590/s0074-02761982000100005
- Pulido, X.C., Pérez, G., & Vallejo, G.A. (2008). **Preliminary characterization of a *Rhodnius prolixus* hemolymph trypanolytic protein, this being a determinant of *Trypanosoma rangeli* KP1(+) and KP1(-) subpopulations vectorial ability**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(2), 172-179. doi: 10.1590/s0074-02762008000200008
- Rabinovich, J. E. (1972). **Vital statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions**. *Journal of medical Entomology*, 9(4), 351-370. doi: 10.1093/jmedent/9.4.351

- Ratcliffe, N. A, Rowley, A. F., Fitzgerald, S. W., & Rhodes, C. P. (1985). **Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances**. International Review of Cytology, 183-350. doi: 10.1016/S0074-7696(08)62351-7
- Ryckman, E.R. (1951). **Laboratory culture of triatominae with observations on behavior and new feeding device**. Journal of Parasitology, 38(3), 210-214. doi: <https://doi.org/10.2307/3274034>
- Otálora-Luna, F., Pérez-Sanches, A.J., Sandoval, C., & Aldana, E. (2015). **La evolución del hábito hematofágico en los triatominos (Heteroptera: Reduviidae)**. Revista Chilena de Historia Natural. 88(1). doi: 10.1186/s40693-014-0032-0
- Schaub, G.A. (2009). **Interactions of Trypanosomatids and Triatomines. In Stephen J. Simpson and Jerome Casas: Advances in Insect Physiology**, 37, Burlington: Academic Press. 177-242. ISBN: 978-0-12-374829-4.
- Schenone, H. (1999). **Xenodiagnosis**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 94(Suppl 1), 289-284. doi: 10.1590/s0074-02761999000700052
- Schenone, H., Alfaro, H., & Rojas, A. (1974). **Basis and Yield of the Xenodiagnosis in Acute and Congenital Chagas' Disease**. Bol. Chil. Parasit. 29(1-2), 24-26.
- Schmid-Hempel, P. (2005). **Evolutionary ecology of insect immune defense**. Annual Review Entomology, 50, 529-51. doi: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130420
- Silva, I.G.D. (1991). **Dispositivo para realização de xenodiagnóstico artificial**. Rev. Patol. Trop. 20(1), 35-38.
- Tay, J., Sánchez, J., Calderón, L., Romero, R., Ruiz, D., & García, J. (2008). **Estudios del ciclo biológico de *Triatoma pallidipennis* y otros aspectos sobre su biología**. Facultad de Medicina UNAM, vol 51 No. 2.
- Teixeira, A.R., Monteiro, P.S., Rebelo, J.M., Argañaraz, E.R., Vieira, D., Lauria-Pires, L., Nascimento, R., Vexenat, C.A., Silva, A.R., & Ault, S.K. (2001). **Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon**. Emerging infectious diseases, 7(1) 100. PMID: 11266300
- Thomas, A.M., & Rudolf, V.H. (2010). **Challenges of metamorphosis in invertebrate hosts: maintaining parasite resistance across life-history stages**. Ecological Entomology, 35(2), 200-205. doi: /10.1111/j.1365-2311.2009.01169.x
- Urrea, D.A., Carranza, J.C., Cuba, C.A., Gurgel-Gonçalves, R., Gulh, F., Schofield, C.J., Triana, O., & Vallejo, G.A. (2005). **Molecular characterization of**

***Trypanosoma rangeli* strains isolated from *R. ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panama supports a co-evolutionary association between parasites and vectors.** Infect Genet Evol 5(2),123-129. doi: 10.1016/j.meegid.2004.07.005

- Vallejo, G.A., Suárez, Y., Olaya, J., Gutiérrez, S., & Carranza, J. (2015). ***Trypanosoma rangeli*: un protozoo infectivo y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas.** Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 39(150), 111-122. doi: 10.18257/raccefyn.143
- Vallejo, G.A., Guhl, F., & Schaub, G.A. (2009). ***Triatominae- Trypanosoma cruzi/T. rangeli*: Vector-parasite interactions.** Acta Tropica, 110(2-3), 137-147. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.10.001
- Vallejo, G.A., Marinkelle, C.J., Guhl, F., & de Sánchez, N. (1988). **Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus*.** Revista Brasileira de Biología. 48 (3), 577-587.
- Vallejo, G.A., Guhl, F., Carranza, J. C., Triana, .O., Pérez, G., Ortiz, P.A., Marín D. H., Villa, L.M., Suárez, J., Sánchez, I.P., Pulido, X., Rodríguez, I.B., Lozano, L.E., Urrea, D.A., Rivera, F.A., Cuba Cuba, C., & Clavijo, J.A. (2007). **Interacción trypanosoma-vector-vertebrado y su relación con la sistemática y la epidemiología de la tripanosomiasis Americana.** Biomédica. 27(1), 110-118. doi: 10.7705/biomedica.v27i1.254
- Vallejo, G.A., Guhl, R., Carranza, J.C., Moreno, J., Triana, O., & Grisard, C.E. (2003). **Parity between kinetoplast DNA and miniexon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia.** Infection Genetics Evolution, 3(1), 39-45. doi: 10.1016/s1567-1348(02)00150-8
- Vargas, F., & Ortega, A. (1994) **El sistema inmune humoral de los insectos.** Tópicos de Investigación y Posgrado, IV(1):21-28.
- Vargas, V., Moreno-García, M., Duarte-Elguea, E., & Lanz-Mendoza, H. (2016) **Limited specificity in the injury and infection priming against bacteria in *Aedes aegypti* mosquitoes.** Frontiers in Microbiology, 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00975
- Whitten, M., Mello, C., Gomes, S., Nigam, Y., Azambuja, P., Garcia, E., & Ratcliffe, N. (2001). **Role of superoxide and reactive nitrogen intermediates in *Rhodnius prolixus* (*Reduviidae*)/*Trypanosoma rangeli* interactions.** Experimental Parasitology, 98(1), 44-57. doi: 10.1006/expr.2001.4615

- Whitten, M., Sun, F., Tew, I., Schaub, G., Soutou, C., Nappi, A., & Ratcliffe, N. (2007). **Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components.** *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 37(5), 440-452. doi: 10.1016/j.ibmb.2007.02.001
- WHO. World Health Organization. (2018). **Enfermedad de Chagas.** Viable en: http://www.who.int/topics/chagas_disease/es/ . Revisado. Octubre 4 de 2018.
- Zabala, D., Carranza, J., Urrea, D., Guhl, F., Jaramillo, N., Teixeira, M., & Vallejo, G. (2011). **Respuesta inmune diferencial de triatomíneos contra *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli*.** *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 1(23), 134-143. Recuperado a partir de <https://www.revistaaccb.org/r/index.php/accb/article/view/40>
- Zingales B., & Colli W. (1985) ***Trypanosoma cruzi*: Interaction with Host Cells.** In: Hudson L. (eds) *The Biology of Trypanosomes. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 117. Springer, Berlin, Heidelberg. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-642-70538-0_7
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., & Schijman, A.G. (2009). **A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 104(7), 1051-1054. doi: 10.1590/s0074-02762009000700021