



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Escuela de Ciencias Veterinarias



RESPUESTA INMUNE DEL CONEJO EUROPEO (*Oryctolagus cuniculus*) A LA PICADURA DE *Mepraia spinolai*, VECTOR SILVESTRE DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Maria Leonor Andrade Steil

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas Animales

Profesor Guía: Dr. Pedro Cattán A.

Financiamiento: FONDECYT N° 1040711

SANTIAGO, CHILE

2009



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

Escuela de Ciencias Veterinarias



RESPUESTA INMUNE DEL CONEJO EUROPEO (*Oryctolagus cuniculus*) A LA PICADURA DE *Mepraia spinolai*, VECTOR SILVESTRE DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Maria Leonor Andrade Steil

	Calificación	Firma
Profesor Guía: Dr. Pedro Cattán
Profesor Consejero: Dr. Fernando Fredes
Profesor Consejero: Dr. Claudio Zuñiga

SANTIAGO, CHILE

2009

AGRADECIMIENTOS

Para comenzar agradezco el apoyo incondicional de mi madre, Delia Steil, durante toda esta larga etapa, que con su cariño supo guiarme correctamente. A mi padre, Alejandro Andrade, que me ha ayudado en el acceso a diversas oportunidades, con el cariño especial que lo caracteriza. Al apoyo particular de mis hermanos, Chevi, Lili, Cris y Marisol, propio de cada uno de ellos. A la constante preocupación de mis abuelos, María Velozo y Walter Steil, que me transmitieron y entregaron mucho de lo necesario en el camino. A Helmuth Steil, quien sabe bien como se hacen estas cosas y tuvo siempre la disposición de ayudar. Y a mi Margarita, que bien sabe cuanto ayudo y es querida.

Le doy las gracias a Nicolás, quien me acompañó y entendió fuertemente en las distintas etapas, y que supo entregar abrazos en los momentos necesarios.

También le doy las gracias a toda las personas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, que logran hacer andar esta gran maquina, en la cual muchos y muchas de nosotras tenemos la oportunidad de obtener experiencia y conocimiento, tanto en el ámbito académico como en el humano. En especial quisiera agradecer a don Roberto, auxiliar de la Facultad y del Departamento de Ciencias Biológicas, por su incansable voluntad de ayuda en muchos de los requerimientos de mi trabajo, y por el cariñoso desayuno que nunca faltó en los días de trabajo temprano por la mañana.

Agradezco a mi profesor guía, Pedro Cattán, por ser parte de mi formación como estudiante tesista, y a mi profesor colaborador Arturo Ferreira. A Margarita Rodríguez por su gran ayuda brindada en el trabajo de laboratorio, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Es una gran oportunidad para reconocer el interés y preocupación de amigas y compañeras, que me acompañaron a lo largo de mi carrera, y que por distintas razones no he podido hacerles saber lo importante que fueron en distintos momentos. A Priscila, Alicia, Cristina, Dominique, Paulina y Vairoa, quienes estuvieron presentes de distintas maneras desde un principio.

A quienes he conocido en una segunda etapa, enriqueciendo mi vida universitaria y humana, les agradezco siempre a Claire y a Carolina.

A mi entrenador de basquetbol, Nelson Rojas, quien me entregó muchas veces palabras de apoyo, y fue responsable de que uno de los pilares de mi vida fuera desarrollado con gusto y dedicación.

Por último a todo lo que se manifiesta a través de estas personas y de tantas otras formas, y que estuvo presente cálidamente junto a mí en cada momento.

ÍNDICE

RESUMEN	2
SUMMARY	2
I. INTRODUCCIÓN	4
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
1. ANTECEDENTES GENERALES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	6
2. SITUACIÓN EN CHILE.....	10
2.1 Importancia epidemiológica de <i>M. spinolai</i>	12
2.2 Importancia epidemiológica del conejo europeo (<i>O. cuniculus</i>) como hospedero de <i>M. spinolai</i>	14
3. ANTECEDENTES SOBRE ALGUNOS FACTORES INVOLUCRADOS EN LA PICADA DE INSECTOS HEMATÓFAGOS (HEMIPTERA: REDUVIDAE).....	16
3.1 Componentes básicos de la saliva de los Triatominos	16
3.2 Respuesta inmune humoral a la picada de insectos hematófagos (Hemiptera: Reduviidae).....	17
III. OBJETIVOS	19
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	20
V. RESULTADOS	25
VI. DISCUSIÓN.....	34
VII. CONCLUSIONES	388
VII. BIBLIOGRAFÍA	389

RESUMEN

Mepraia spinolai es el vector silvestre de la enfermedad de Chagas en Chile. Estudios recientes demuestran que este insecto es epidemiológicamente importante en la transmisión de dicha enfermedad. El conejo europeo forma parte importante en la dieta de estos insectos por lo cual puede llegar a jugar un rol significativo en la transmisión del *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad. Por otra parte, se ha demostrado que los triatomíneos introducen a través de la picada proteínas presentes en su saliva que pueden inducir respuestas inmunes de tipo local y sistémico en sus hospederos, lo cual podría modular la adaptación de diferentes reservorios a la picada del insecto, y así modificar la incorporación del parásito a los mismos. Dado lo anterior, se consideró de importancia evaluar la respuesta inmune del conejo europeo frente a la picada e inoculación de proteínas de la saliva de *M. spinolai*, como herramienta útil para evaluar la exposición a la enfermedad de Chagas.

En el estudio se evaluó la respuesta del conejo europeo, en la producción de anticuerpos IgG frente a las proteínas presentes en la saliva de *M. spinolai*, en dos grupos de tratamiento. El primer grupo fue sometido a tres sesiones de picaduras de insecto, mientras que el segundo fue sometido previamente a la inoculación de un extracto torácico del triatómino (que contenía las glándulas salivales) antes de seguir la misma serie de picaduras. Sólo en el segundo grupo se evidenció una respuesta significativa de anticuerpos IgG. En conclusión, el conejo europeo genera una respuesta inmune humoral frente al extracto torácico y eventualmente esta respuesta podría incluir anticuerpos IgG contra las proteínas de la saliva de *M. spinolai*.

SUMMARY

Mepraia spinolai is the wild vector of the Chagas disease in Chile. Recent studies show that this insect is epidemiologically important in the disease transmission. The European rabbit is an important part of the diet insects, and to it could play a significant role in the transmission of *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of the disease. It has been shown that triatomines through the bite introduce proteins present in their saliva, that can induce immune responses of local and systemic type in their hosts, which could modulate the adaptation of different reservoirs to the bite of the insect, and thus alter the incorporation of the parasite to them. Because of the above issue, it was considered important to assess the immune response of the European rabbit to the bite and inoculation of saliva proteins of *M. spinolai*, as a useful tool for assessing exposure to Chagas disease.

The present study evaluated the response of the European rabbit, in the production of IgG antibodies against the proteins present in the saliva of *M. spinolai*, in two treatment groups. The first one was subjected to three bite sessions of insect, while the second one was submitted prior to the inoculation of an insect's thorax extract (containing the salivary glands) before the same series of bites. Only the second group showed a significant response of IgG antibodies. In conclusion, the rabbit is capable of generating a humoral immune response against the thorax extract and eventually this response might include antibodies IgG against the proteins of the saliva of *M. spinolai*.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una zoonosis parasitaria, producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, que constituye un importante problema de salud pública, de gran impacto social y económico, en la mayoría de los países latinoamericanos (Schofield, 1994). Esta parasitosis es propia de sectores rurales y suburbanos, y su proliferación se ve favorecida por la mala calidad de la vivienda, encontrándose de manera frecuente en condiciones de pobreza (Apt y Reyes, 1990).

La vía de transmisión más común y de mayor importancia epidemiológica es la que se produce mediante los insectos hematófagos y oportunistas pertenecientes al orden Hemiptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae. En más de la mitad de las cientos de especies reconocidas mundialmente de estos insectos, se ha señalado la infección natural por *T. cruzi*. Debido a lo anterior y a su similar comportamiento y fisiología, todas las especies de esta subfamilia deben considerarse como vectores potenciales de la enfermedad de Chagas (Schofield, 1994).

En Chile se pueden reconocer tres especies: *Triatoma infestans*, Klug (1834), insecto de mayor importancia epidemiológica, ya que es el principal vector de *T. cruzi*. Este se alimenta principalmente del hombre y de animales en ambientes domésticos, y coloniza el interior y el peridomicilio de las viviendas humanas (Canals *et al.*, 1998); *Mepraia gajardoi* (Frías *et al.*, 1998), descrita recientemente en el norte del país. Y por último *Mepraia spinolai*, Porter (1934), vector del parásito principalmente a nivel de los vertebrados silvestres (Apt y Reyes, 1986), y la cual recientemente ha sido encontrada con mayor frecuencia en ambientes peridomiciliarios (Canals *et al.*, 1998), lo que ha generado un mayor interés por el estudio de esta especie.

Se ha observado que el ciclo vital de *M. spinolai* se ve afectado por la presencia o ausencia de una determinada fuente alimentaria y más aún, por la naturaleza de la misma (Acuña, 2002). En la zona endémica de la enfermedad de Chagas en Chile, el conejo europeo (*O. cuniculus*) muestra una alta participación en la dieta de *M. spinolai* (Canals *et al.*, 1998). Se ha demostrado que entre los mamíferos de los cuales se alimenta *M. spinolai*, el conejo europeo afecta positivamente los parámetros poblacionales al compararlo con

ejemplares alimentados con otros mamíferos. Lo anterior indica que ecológicamente, el conejo sería una presa energéticamente más conveniente para *M. spinolai*. Si se considera por una parte, que existen grandes poblaciones del lagomorfo en la zona de distribución de *M. spinolai*, y por otra la alta frecuencia de crianzas de conejos domésticos o silvestres en las viviendas rurales, podría considerarse a este mamífero como el mejor nexo para la domiciliación de *M. spinolai* (Acuña, 2002).

Mepraia spinolai, así como otros triatomíneos, introduce su estilete inyectando proteínas de la saliva durante la adquisición de sangre como alimento, sensibilizando al sistema inmune del hospedero y pudiendo generar, entre otras, una respuesta humoral específica contra ciertos antígenos (Nascimento *et al.*, 2001). En este estudio se pretende determinar la respuesta productiva de anticuerpos específicos IgG en algunos ejemplares de conejo europeo frente a la picadura de *M. spinolai*, a través de dos ensayos en los cuales se somete a este mamífero a los componentes de la saliva de *M. spinolai*.

II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

1. ANTECEDENTES GENERALES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad que deriva su nombre del clínico brasileño Dr. Carlos Riveiros Justiniano das Chagas quien la describió en 1909 (Schofield, 1994). Esta enfermedad es causada por el *T. cruzi*, protozoo flagelado que infecta tanto a mamíferos silvestres como domésticos, incluyendo al hombre (Molina *et al.*, 2004) (Figura 1).

La enfermedad se extiende desde el paralelo 35 Lat. Norte, Sur de EE.UU., hasta el paralelo 34,5 Lat. Sur en Chile y el paralelo 45 Lat. Sur en Argentina. Si bien todos los países presentes entre estos límites presentan la infección, ésta es más importante en América del Sur por su mayor prevalencia y repercusión clínica (Apt y Reyes, 1990). En el continente americano la enfermedad de Chagas existe desde tiempos muy remotos, y ya afectaba a comunidades humanas prehistóricas que poblaron el extremo norte de Chile hace alrededor de 2.000 años. Es posible suponer que el parásito, *T. cruzi*, circulaba primero entre mamíferos y vectores silvestres, para luego adaptarse al ciclo doméstico de transmisión con el desarrollo de las vidas sedentarias de las tribus precolombinas, dándole a la enfermedad el carácter de endémica (Apt y Reyes, 1990).

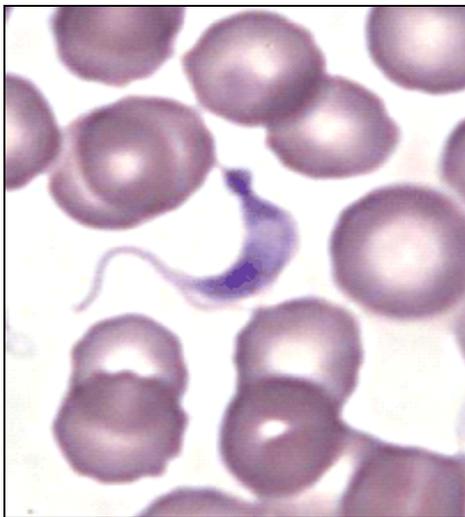


Figura 1. *Trypanosoma cruzi* en frotis de sangre

Fuente: Fernando P. Monroy.

En términos de salud pública e impacto económico la enfermedad de Chagas es la infección parasitaria más importante en América Latina (Miles *et al.*, 2003). Su impacto social y económico es lejos mucho mayor a otras enfermedades parasitarias tales como la Malaria, la Leishmaniosis y la Schistomatososis (Cruz-Lopez *et al.*, 2001). La infección con *T. cruzi* es una zoonosis compleja, que puede llegar a ser mortal y a menudo conduce a lesiones muy debilitantes de los órganos vitales, tales como el corazón y el tracto intestinal principalmente (Schofield, 1994). Estimaciones de la organización mundial de la salud indican que 16 a 18 millones de personas estaban infectadas en 1990. Sin embargo, las iniciativas regionales en América Latina han resultado en una reducción notable del número de casos solo estimándose para el 2006, 9 millones de personas infectadas (OMS, 2007).

La transmisión por vectores representa más del 80% de la transmisión total de *T. cruzi*, existiendo en menor medida otras vías de transmisión, tales como las transfusiones de sangre o trasplantes de órganos de donantes infectados, la transmisión congénita desde madres infectadas, la ingestión de sustancias contaminadas, y las infecciones accidentales en el laboratorio (Schofield, 1994). Es así, como la vía de transmisión más común y de mayor importancia epidemiológica recae en los insectos pertenecientes al orden Hemiptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae (Schofield, 1994). Según antecedentes aportados por Galvao *et al* (2002), se han reconocido 18 géneros y 134 especies, siendo las principales especies vectoras pertenecientes a los géneros: *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius* (Apt y Reyes, 1990) (Figura 2). En Sudamérica estos insectos son comúnmente conocidos como “vinchucas”, “barbeiros”, “chinche hocicona”, “chinche de compostela”, “chinche picuda”, entre otras (Magallón, *et al.*, 1998).

La subfamilia Triatominae está constituida por insectos hematófagos estrictos, hemimetábolos, cuyo ciclo vital consta de huevo, cinco estadíos ninfales y el estado adulto (Cabello *et al.*, 1987). Los triatominos contraen la infección alimentándose de un mamífero infectado, y conservan la infección durante toda la vida. Es importante mencionar que no existe la transmisión transovárica de *T. cruzi* en estos insectos (Schofield, 1994).



Figura 2. Distribución de la enfermedad de Chagas y sus principales vectores.

Fuente: <http://www.olavarria.com/ciudad/informacion/opiniones/index.php>

La epidemiología de la enfermedad de Chagas es compleja y multifactorial y comprende aspectos del agente causal, de los vectores transmisores, de su hábitat, de los mamíferos reservorios, ya sea animal u hombre, y los diferentes aspectos de la interacción parásito - vector y parásito - hospedero mamífero (Mackelt, 1983)

La mayoría de las especies de triatomos ocupan hábitats principalmente selváticos en asociación estrecha con sus hospederos vertebrados. Dichos hábitats incluyen diferentes tipos de nidos de aves, madrigueras, agrupaciones de rocas, árboles huecos, nidos de pequeños roedores y cuevas de murciélagos, casi todo sitio capaz de dar abrigo de los extremos climáticos y permitir el acceso fácil a una fuente de sangre o a un vertebrado. Ciertas especies también invaden y colonizan los hábitats peridomiciliarios, tales como los gallineros y los corrales de cabras, y algunas han realizado la transición para colonizar las viviendas humanas. La dirección evolutiva de los triatomos parece involucrar la adaptación progresiva a los hábitats más estables a su alcance, especialmente el hábitat ofrecido por las casas rurales típicas de las partes más pobres de Latinoamérica (Schofield, 1994).

Tal vez esta enfermedad, más que ninguna otra, muestra el problema ecológico de comunidades que constituyen las enfermedades transmitidas por vectores. Los triatominos distribuyen al parásito dentro de las comunidades de mamíferos silvestres que constituyen sus reservorios en el ciclo silvestre, y entre los animales domésticos, sinantrópicos y el hombre, que constituyen el reservorio del ciclo doméstico (Canals *et al.*, 1998) (Figura 3). El parásito se transmite principalmente como una infección adquirida a través de las deyecciones de sus vectores (transmisión posterior), y no por la picadura de éstos.

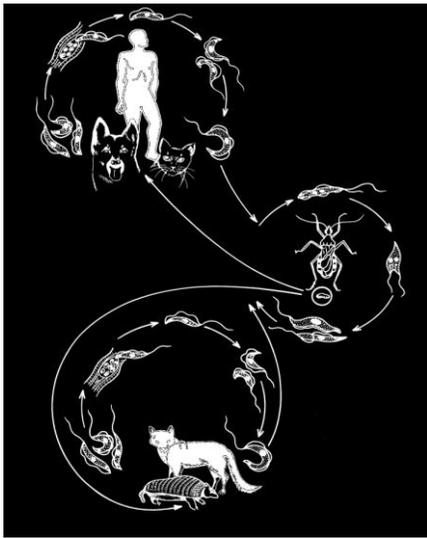


Figura 3. Enfermedad de Chagas y su ciclo doméstico- silvestre.

Fuente: Atias, 1991. Parasitología clínica, 3ª edición.

Las especies consideradas domésticas, tales como *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, se encuentran progresivamente controladas a través de iniciativas regionales y nacionales diseñadas para eliminar poblaciones domésticas, a través de la aplicación de insecticidas de acción residual. Sin embargo, en los últimos años, han aumentado los reportes de otras especies que han establecido colonias domésticas, y algunas, como *T. dimidiata*, han invadido residencias urbanas y periurbanas. En muchos casos, la nueva infestación involucra especies poco conocidas, que se han considerado como de hábito selvático exclusivo, tales como *P. rufotuberculatus*, *R. stali* y *Eratyrus mucronatus* en Bolivia, y *P. geniculatus* en la región del amazonas (Noireau *et al.* 1995, Dujardin *et al.* 1998, Valente *et al.* 1998, citados por Schofield *et al.*, 1999).

La transmisión del parásito a través de estos vectores posee un alto impacto y no existe vacuna ni tratamiento específico disponible. La principal estrategia de control depende de la prevención de la transmisión, principalmente eliminando los vectores domésticos (Dias *et al.*, 2002).

2. SITUACIÓN EN CHILE

En Chile la enfermedad de Chagas se extiende desde la frontera con el Perú, por el norte, hasta la zona central del país, por el sur, entre los paralelos 18° a 34°.5 Lat. Sur (Apt y Reyes, 1986) (Figura 4), predominando en sectores rurales y periurbanos. Su localización corresponde a las tres primeras zonas biogeográficas (desierto, estepas, matorrales) en las cuales se dan las condiciones ecológicas que favorecen la instalación y multiplicación de los vectores en Chile (Schenone *et al.*, 1995).

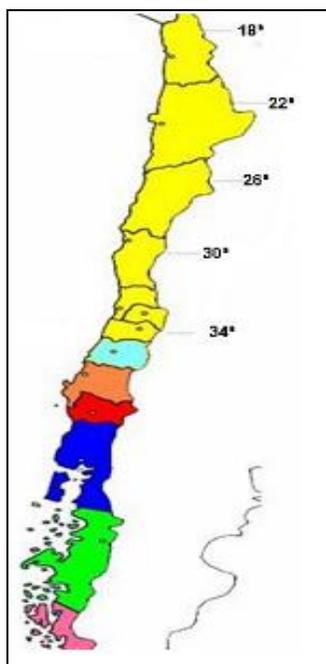


Figura 4. Mapa distribución de los triatominos en Chile. Paralelos 18° al 34.5° Latitud Sur.

Fuente: Memoria Med. Vet. A. M. Alzamora, 2006.

En Chile los triatominos, vectores de la enfermedad de Chagas, son comúnmente conocidos como “vinchucas” y se reconocen tradicionalmente dos especies: *Triatoma*

infestans, el vector domestico (Figura 5a) y *Mepraia spinolai*, el vector silvestre (Lent *et al.*, 1994) (Figura 5b).

En 1998, Frias *et al.* describieron una nueva especie silvestre en el norte del país, denominada *M. gajardoi*. Estudios realizados por Carvajal *et al* (2007), muestran que ésta especie se encuentra infectada con *T. cruzi*, presentando un índice tripano triatomineo de 19,2%.



Figura 5a. *T. infestans*

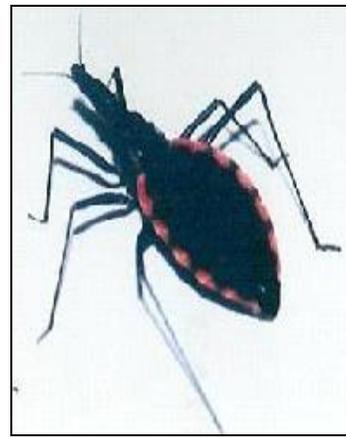


Figura 5b. *M. spinolai*

Triatoma infestans es el vector más importante de la enfermedad de Chagas debido a su amplia distribución en América y a sus hábitos casi exclusivamente domésticos. Se la puede encontrar en grietas de las paredes de adobe o de "quincha" (ramas entramadas revestidas con barro), techos de ramas y habitáculos, y gallineros de la zona peridoméstica (Apt y Reyes, 1990). Es una especie nocturna que se alimenta de sangre de animales endotérmicos con una preferencia significativa por la sangre humana. Existe una elevada proporción de estos insectos infectados por *T. cruzi*, la que se estima es de un 32,5% (Canals *et al.*, 1998).

Mepraia spinolai es una especie diurna, cuya existencia ha sido comprobada sólo en Chile. Se distribuye entre los paralelos 18° y 34° de latitud sur, desde el nivel del mar hasta los 3.000 metros sobre el nivel del mar (Canals *et al.*, 1998). Su hábitat lo constituyen zonas pedregosas en especial canteras, grietas, guaneras de aves y cuevas de animales, de ahí su denominación como vinchuca silvestre (Acuña, 2002; Canals *et al.*, 1998).

Ocasionalmente se le puede encontrar también en corrales, pircas periantrópicas y en la vivienda humana (Canals *et al.*, 1998; Cattán *et al.*, 2002), ya sea sola o coexistiendo con *T. infestans* (Frias y Atria, 1998; Schofield *et al.*, 1998).

Si bien el área chagásica se ubica en la zona más poblada del país, el hecho que las viviendas positivas se encuentren en áreas rurales determina que la población expuesta sea de alrededor de 500.000 habitantes con un 18,7% de afectados por el *T. cruzi*. Si bien las tasas de morbilidad han descendido en este último tiempo, ha habido períodos de ascenso de ella, desde una tasa de 3,22 (x100.000 habitantes) para el año 1994 a 5,21 (x100.000 habitantes) para el año 2000, evidenciándose posteriormente un descenso sostenido de esta (Apt *et al.*, 2006).

En los últimos años se han realizado programas de control y vigilancia enfocados principalmente en el vector doméstico obteniéndose buenos resultados, tales como la disminución en el número de viviendas positivas y el hecho de que Chile pasara a ser considerado como uno de los países libres de la transmisión vectorial del *T. Cruzii* (OPS, 2003).

2.1 Importancia epidemiológica de *M. spinolai*

Desde el punto de vista epidemiológico, esta especie actúa como vector del ciclo silvestre de la enfermedad de Chagas, (Apt y Reyes, 1986; Canals *et al.*, 1998) y al igual que otros triatomíneos, adquiere el protozoo a través de la ingesta de sangre de los hospederos ya infectados con *T. cruzi*, quedando con el parásito en el tubo digestivo a lo largo de toda su vida. Los hospederos se infectan con las deyecciones del insecto depositadas durante o después de la ingesta en el sitio de picada (Schofield, 1994).

Mepraia spinolai presenta una distribución en parches e índices de infección tripano-triatomino diferentes. Probablemente debido a diferencias estructurales en las comunidades de mamíferos de las cuales dependen sus poblaciones (roedores, cánidos, caprinos, humanos, etc.). Se ha observado que puede llegar a tener un índice de infección por *T. cruzi* elevado (Ordenes *et al.*, 1996). En un estudio reciente, realizado por Botto-Mahan *et al.* (2005), se encontró que *M. spinolai* posee potencialmente un importante rol en la transmisión de *T. Cruzii* en áreas silvestres, debido al elevado nivel de infección detectado a través de un análisis molecular; dicha evidencia molecular mostró una tasa de infección de

46,2 %, siendo este valor mucho mayor al detectado en estudios anteriores a través de la observación microscópica. Se ha visto que la proporción de infectados aumenta con la madurez de los individuos, llegando a un 58,33% en los adultos (Canals *et al.*, 1998). Por otro lado, se ha visto que *M. spinolai* posee una mayor capacidad para hospedar y reproducir las diversas cepas de *T. cruzi*, si se compara con *T. infestans*.

La presencia ocasional de esta especie en las casas y la habitual presencia en zonas periurbanas, donde parte de la población realiza su trabajo, hacen de este insecto un riesgo potencial de transmisión de la enfermedad de Chagas (Ordenes *et al.*, 1996). Cattán *et al.* (2002) indican que la importancia de *M. spinolai* como vector de la enfermedad de Chagas dependerá del contacto que mantenga este insecto con humanos. Considerando que la participación del hombre en su dieta puede llegar a un 7,4%, ésta es una especie potencialmente peligrosa, especialmente en las zonas en que se produce el contacto habitual con el hombre, como es en las zonas de canteras y en algunas áreas de los alrededores de Santiago donde actualmente se está urbanizando, como Colina, Lampa y Til-Til (Canals *et al.*, 2000).

Se ha señalado que los vectores silvestres representan un riesgo epidemiológico debido a la capacidad potencial que tienen para reemplazar a los vectores domiciliarios, ya que ocupan el nicho ecológico dejado por éstos después de su eliminación (Salvatella, 1986; Salvatella, *et al.*, 1991; Wisnivesky- Colli *et al.*, 1993). Acuña (2002), indica tres factores principales que influyen en este proceso de domiciliación: el primer factor sería la invasión del hombre a ambientes colonizados por vinchucas, el segundo, el proceso de erradicación de las vinchucas domésticas, y por último, la posibilidad que vinchucas silvestres se adapten progresivamente al hombre o a otros mamíferos domésticos.

En relación al ciclo silvestre, cuando aumenta el número de *M. spinolai* en los meses de verano, y el porcentaje de infección por *T. cruzi* es elevado, la posibilidad que se infecten los animales domésticos y sinantrópicos es alta (Botto-Mahan *et al.*, 2005). La mayor densidad del insecto también puede impulsar la invasión de viviendas. Estos hechos afianzarían la interrelación de los ciclos domésticos y silvestres, que se produce por el ingreso del hombre y/o animales domésticos al ámbito silvestre (donde pueden ser infectados por *M. spinolai*), o por entrada de vertebrados silvestres al ambiente doméstico

(donde podrían ser infectados por *T. infestans*) (Acuña, 2002).

2.2 Importancia epidemiológica del conejo europeo (*O. cuniculus*) como hospedero de *M. spinolai*.

La mayoría de las especies de triatomíneos son oportunistas, capaces de alimentarse de una gran variedad de hospederos (Shofield, 1994). Sin embargo, su fuente de alimentación está determinada por el ambiente donde habitan. Así *M. spinolai* se encuentra asociada a lugares donde habitan zorros, roedores silvestres, conejos, cabras, marsupiales, entre otras especies de las cuales se alimentaría (Frias y Martinez, 1987).

La dieta de *M. spinolai* ha sido estudiada en áreas silvestres protegidas y en áreas antrópicas y periantrópicas de la zona endémica de la tripanosomiasis (Canals *et al.*, 1998). En estos estudios, se ha establecido una fuerte asociación de estos insectos con el conejo europeo o silvestre (figura.6) y en menor grado con algunos roedores autóctonos como el lechón orejudo (*Phyllotis darwini*) (Rengifo, 2000). El conejo europeo, con una data de introducción en Chile reciente de no más de 150 años (Jaksic, 1998), presenta una alta frecuencia en la dieta de la vinchuca silvestre (Canals *et al.*, 1998). En un estudio se determinó que este lepórido presentaba un 76,8% de participación en la dieta de *M. spinolai*, mientras que roedores silvestres sólo constituían un 14,3% de su dieta (Canals *et al.*, 2001). Por otro lado, Acuña (2001) demostró que el conejo mejoraba los indicadores poblacionales (peso, sobrevivencia y fecundidad) de colonias de vinchucas alimentadas con su sangre, en comparación a colonias alimentadas con roedores silvestres (*Octodon degus*). Lo anterior indicaría que ecológicamente el conejo sería una presa energéticamente más conveniente para *M. spinolai*.



Figura 6. *O. cuniculus*

Fuente: Memoria Med. Vet. A. M. Alzamora, 2006.

El conejo europeo presenta una alta capacidad de dispersión, hecho que explica porque este lepórido ha sido capaz de colonizar una amplia variedad de hábitats en Chile central (Canals *et al.*, 2001) y se ha transformado en un elemento faunístico propio de diversos ecosistemas (Zunino, 1989). Dada la aclimatación del conejo a distintos ambientes, que incluyen lugares dentro de la dispersión de *M. spinolai*, se puede plantear como hipótesis que este hecho aumenta la importancia epidemiológica del conejo en la enfermedad de Chagas en Chile (Acuña, 2002).

La conducta de alimentación de *M. spinolai* depende de la disponibilidad de presa. A causa de esto es posible considerar la abundancia relativa de un hospedero como un indicador de importancia epidemiológica (Canals *et al.*, 2001). Debido a esto el conejo europeo cobra también relevancia, ya que existen grandes poblaciones de estos lagomorfos en la zona de distribución de *M. spinolai* y a la alta frecuencia de crianzas de estos en las viviendas rurales. Por consiguiente, podría considerarse a este mamífero como el mejor nexa para la domiciliación de *M. spinolai* (Acuña, 2002).

3. ANTECEDENTES SOBRE ALGUNOS FACTORES INVOLUCRADOS EN LA PICADA DE INSECTOS HEMATOFAGOS (HEMIPTERA: REDUVIDAE)

Los triatominos poseen un aparato bucal que está diseñado para succionar la sangre necesaria para cumplir con sus funciones vitales. Cuando encuentran un hospedero colocan su rostro en él y proyectan su estilete para penetrar la piel (Zeledón, 1983) (Figura 7). En general la picada se considera indolora, independiente del tiempo que demore el proceso de alimentación, existiendo individuos o especies de hospederos más sensibles que otros a elementos de la saliva de la vinchuca (Wood, 1951). Se ha visto que la saliva en los triatominos es liberada poco después de la picada y es producida durante todo el proceso de alimentación en forma continua, siendo gran parte de esta succionada por el insecto (Coelho *et al.*, 2006).



Figura 7. Vinchuca introduciendo su estilete.

Fuente: <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/images/triatoma.JPG>

3.1 Componentes básicos de la saliva de los Triatominos

La respuesta inflamatoria y hemostática de los hospederos representa un obstáculo clave para la adquisición de sangre por parte de los insectos hematófagos. Para la obtención exitosa de la sangre, las glándulas salivales de los insectos hematófagos producen una gran variedad de moléculas capaces de antagonizar los principales efectos de la respuesta del hospedero (Ribeiro, 1995; Faudry *et al.*, 2004). En la saliva de los insectos hematófagos se pueden encontrar una serie de sustancias farmacológicas, que comprenden biomoléculas capaces de interferir en la agregación plaquetaria (Ribeiro *et al.*, 1986; Sant Anna *et al.*, 2002), la coagulación (Charlab *et al.*, 1999; Sant Anna *et al.*, 2002) y la vasodilatación,

(Ribeiro *et al.*, 1989; Sant Anna *et al.*, 2002); responsables de los mecanismos de ingestión y digestión de la sangre (Lacombe, 1999; Ribeiro *et al.*, 1998). Recientemente se ha demostrado que en algunos triatomíneos, los componentes de su saliva varían durante el desarrollo de éstos (Guarneri *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2003).

3.2 Respuesta inmune humoral a la picada de insectos hematofagos (Hemiptera: Reduviidae).

Aparte del trauma infligido por partes de la boca del insecto durante la alimentación, las reacciones del hospedero a la mordedura pueden ser atribuidas a los factores presentes en la saliva (Feingold *et al.*, 1968), ya que estos actúan como antígenos que sensibilizan el sistema inmune del hospedero. Dado lo anterior, es posible reconocer factores humorales y celulares específicos de respuesta, en asociación con hipersensibilidades de tipo local o sistémica (Nascimento *et al.*, 2001). La reacción del hospedero a la picadura de los triatomíneos varía mucho y parece depender del mismo, además de la especie de vinchuca involucrada (Schofield, 1994).

Algunas de las proteínas y péptidos inyectados al hospedero a través de la saliva de insectos hematófagos, son inmunogénicas y pueden suscitar una respuesta inmunológica de memoria por parte de éste (Champagne *et al.*, 2004). La primera exposición a la picadura, constituye el estímulo que inicia la síntesis de anticuerpos contra el material antigénico contenido en la secreción oral del insecto. Durante el periodo de inducción, tiempo que demora en ser provocado el mecanismo inmune específico, ningún anticuerpo es demostrable (Feingold *et al.*, 1968). Los primeros anticuerpos producidos en una respuesta inmunitaria son inmunoglobulinas M (IgM), así un nivel elevado de este anticuerpo en individuos normales, generalmente indica una infección o exposición a un antígeno reciente (Janeway *et al.*, 2000). La respuesta inmune ante mordeduras de insectos se ha asociado con la producción de Inmunoglobulina E (IgE) mediada por hipersensibilidad inmediata (Nascimento *et al.*, 2001). La continuidad a la exposición del antígeno en los vertebrados conduce a la maduración de la respuesta inmune, y se ve reflejada en la producción de los diferentes subtipos de inmunoglobulina G (IgG) (Ribeiro y Francischetti, 2003). Por otro lado los niveles de IgG sérica pueden servir como un indicador de intensidad de exposición a la mordeduras de insectos (Nascimento *et al.*, 2001).

Las respuestas mediadas por anticuerpos contra los antígenos salivales se han descrito en muchos artrópodos hematófagos. En un estudio en que se sometieron 2 conejos a la picadura de 21 vinchucas domésticas (*T. infestans*), una vez al mes durante 6 meses, se detectó una producción significativa de anticuerpos circulatorios específicos a partir del día 45 de exposición (Barriga *et al.*,2005¹). En otro estudio, en el cual se sometió un conejo adulto a la picadura de 10 ejemplares adultos de *P. megistus* en 6 ocasiones, con intervalos de 7 días, se observó un incremento en el nivel de producción de anticuerpos desde la tercera sensibilización (picaduras) en adelante. Sin embargo se detectó una baja producción de anticuerpos específicos contra la saliva de dicho insecto (Barbosa *et al.*, 2004).

Los resultados en general demuestran una clara respuesta inmunomediada inducida por la alimentación de estos insectos (Barriga *et al.*,2005²). Sin embargo, en ocasiones la picadura de una o pocas vinchucas puede no ser suficiente para provocar una respuesta inmune detectable. Por ello es recomendable realizar una inmunización previa por medio de la inoculación de extracto que contenga glándulas salivales de estos individuos, con el fin de activar la respuesta inmunogénica y facilitar así la detección posterior de anticuerpos frente a la picadura (Ferreira, 2007³).

En base a los antecedentes anteriormente expuestos, se plantea determinar la presencia de respuesta inmune humoral IgG, en ejemplares de *O. cuniculus* que han sido expuestos a las proteínas presentes en la saliva de *M. spinolai*.

¹ Barriga *et al.*, O. 2005.[Correspondencia personal].Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

² Barriga, O. 2005.[Correspondencia personal]. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

³ Ferreira, A. 2007.[Comunicación Personal].Programa disciplinario de inmunología, laboratorio de inmunología de la agresión microbiana. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la respuesta inmune del conejo europeo (*O. cuniculus*) frente a la picadura *M. spinolai*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la producción de anticuerpos específicos (IgG) en *O. cuniculus* frente a la picadura repetida de *M. spinolai*.
- Determinar la producción de anticuerpos específicos (IgG) de *O. cuniculus* frente a la inoculación de extracto torácico y picadura repetida de *M. spinolai*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Para desarrollar el experimento se contó con 6 ejemplares adultos de conejos europeos, los cuales no habían sido expuestos anteriormente al contacto con triatominos. Estos individuos fueron mantenidos en una construcción especial del Laboratorio de Ecología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, donde se les alimentó y proporcionó agua fresca diariamente.

Para realizar las picadas se utilizaron 35 ejemplares de *M. spinolai*, de V estado ninfal y adultos, libres de la infección con *T. cruzi*. Estos se mantuvieron en recipientes de plástico dentro una cámara de crianza a $27^{\circ}\text{C} \pm 0.5$, con una humedad relativa del $70\% \pm 5\%$ y un ciclo de luz – oscuridad de 12/ 12 horas. Diariamente se realizó una verificación de la temperatura y humedad de la cámara en donde se encontraban las vinchucas, para asegurar que no hubieran problemas con las condiciones requeridas.

Extracto torácico con glándulas salivales de *M. spinolai*

Para la obtención de las glándulas salivales se utilizaron 10 ejemplares de vinchucas silvestres (*M. spinolai*). Estas fueron inmovilizadas con eter, y con la ayuda de una lupa, bisturí y una aguja pequeña, se procedió a abrir el torác de los insectos por dorsal para luego extraer las glándulas salivales principales y suplementarias ubicadas en este sector (Lacombe, 1999). Es preciso señalar que al sacar las glándulas salivales se arrastraron restos de material torácico, por lo cual se trabajó con un extracto torácico. El extracto que contenía las glándulas salivales de *M. spinolai*, fue guardado a -80°C y posteriormente fue suspendido en PBS, al que se le agregó un inhibidor de proteasa (Cablochem n° 539137) para evitar la degradación de las proteínas presentes en el extracto. Posteriormente este fue homogeneizado (vortex) y sonicado con 7 pulsos de 15 a 30 segundos por 30 minutos. Luego el extracto fue centrifugado a 4°C , por 15 minutos a 9.000 g. La concentración proteica del sobrenadante fue determinada a través del método de Bradford (Bradford, 1976). Una vez finalizado este proceso, el extracto torácico se mantuvo a una temperatura de -20°C .

Protocolo de inmunización

Los 6 conejos fueron divididos al azar en dos grupos de tratamiento, de 3 individuos cada uno: Grupo A (conejos 1, 5 ,6) y Grupo B (conejos 2, 3 y 4).

Como procedimiento inicial, a ambos grupos se les realizó una sangría preinmune. Posteriormente, el grupo A, fue sometido a 3 sesiones de picaduras de *M. spinolai* y luego a 3 sangrías inmunes. El grupo B, fue sometido a la inoculación subcutánea dorsal de 100 ug de extracto torácico junto con adyuvante de Freund's completo, y posteriormente a 3 sesiones de picaduras de *M. spinolai* y a 3 sangrías inmunes. Las sangrías inmunes de ambos grupos, fueron realizadas con intervalos de 7 días, comenzando la primera luego de los 45 días de la primera sesión de picadas (Cuadro 1). Como testigos del grupo A y B se asumieron las sangrías preinmunes respectivas a cada grupo y cada conejo.

Las picadas de vinchuca fueron realizadas en las orejas de los conejos, ocupando una oreja y en forma alternada para cada sesión. Para esto se utilizaron envases de plástico (11 cm de alto y 9 cm de diámetro) en donde se introducían las vinchucas. Los envases contaban con una malla en el extremo de la tapa, que permitía introducir la oreja del conejo a través de una abertura y efectuar las picadas. Las picadas fueron efectuadas utilizando 5 ejemplares de *M. spinolai* por vez, durante 20 minutos.

Cuadro 1. Esquema de inmunización

Día	Grupo A: Picaduras <i>M. spinolai</i>.	Grupo B: Inoculación de extracto torácico y picaduras de <i>M. spinolai</i>.
0	Sangría preinmune	Sangría preinmune
8		Inoculación de extracto torácico (con gls. salivales)
12	Picada 1	Picada 1
19	Picada 2	Picada 2
26	Picada 3	Picada 3
57	Primera sangría inmune	Primera sangría inmune
64	Segunda sangría inmune	Segunda sangría inmune
71	Tercera sangría inmune	Tercera sangría inmune

Extracción de sangre y obtención de sueros

Para realizar las sangrías preinmunes e inmunes de los conejos se ocupó un protocolo de extracción de sangre por punción cardíaca, utilizado en el ISP⁴ (Instituto de Salud Pública). En cada ocasión los conejos fueron sometidos con anterioridad a un protocolo de preanestesia y anestesia de Xilacina y Ketamina respectivamente, para luego proceder a depilar y desinfectar con alcohol yodado el costado izquierdo del tórax del conejo, por donde se realizaba la punción. En cada sesión se extraían aproximadamente 7 ml de sangre (con una jeringa de 10 ml) por conejo. Es importante mencionar, que la extracción de sangre a través de la arteria central de la oreja del conejo fue descartada, debido a que los conejos utilizados poseían orejas pequeñas que dificultaban este procedimiento.

Para una adecuada retracción del coágulo, la sangre obtenida en cada sangría se mantuvo bajo las siguientes temperaturas por periodos consecutivos de 30 minutos: 27° C, 37° C y 4° C. Posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 500 g. El sobrenadante obtenido se centrifugó una vez más utilizando el mismo protocolo y el suero obtenido se almacenó en tubos Eppendorf a una temperatura de -20°C. Mediante este procedimiento, de cada conejo se obtuvo el suero preinmune (SPI), inmune 1 (SI1), inmune 2 (SI2) e inmune 3 (SI3), proveniente de las respectivas sangrías.

Es preciso señalar, que los 6 conejos sobrevivieron a las sesiones de extracción sanguínea, y que una vez procesadas las muestras de sangre necesarias para realizar el estudio, los conejos fueron ubicados en las inmediaciones de Mundo Granja (granja educativa de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile).

Ensayo serológico

En el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, se realizaron los ensayos serológicos para medir los anticuerpos presentes en el suero de los conejos. El tipo de ensayo serológico utilizado fue el Test de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay o Ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas) en el cual la unión del antígeno o del anticuerpo se detecta porque éstos se hallan conjugados a una enzima que, al actuar sobre un sustrato, da origen a una reacción coloreada, que puede ser leída en un espectrofotómetro (Janeway *et al.*, 2000).

⁴ Mezano, M. 2008. [Comunicación personal]. Instituto de Salud Pública.

En un comienzo se realizó un primer test ELISA, utilizando extracto torácico como antígeno, con los sueros obtenidos de los 6 conejos (grupos A y B), para determinar la presencia o ausencia de anticuerpos IgG generados bajo los dos protocolos de inmunización. Posteriormente a los sueros de los conejos que presentaron respuesta inmune IgG, se les realizó un segundo test ELISA en placas de PVC individuales de 96 pocillos (fondo plano marca NUNC), utilizando diluciones seriadas para detectar el título de anticuerpos presente en cada dilución. Todos los análisis se realizaron en triplicado.

El procedimiento del test ELISA fue el siguiente: cada pocillo de la placa fue sensibilizado con 0,25 µg de extracto torácico que contenía glándulas salivales de *M. spinolai* en 50 µl de buffer carbonato 0.1 M, pH 9.0, para luego ser incubados durante 2 horas a 37 °C (Dinamic Incubator). Luego se lavó con un lavador de placa ELISA (Nunc – Immuno Wash), 4 veces con una preparación de PBS Tween (1x), para luego bloquear cada pocillo con 100 µl de PBS-soya 0,05 %, durante 24 horas a 4° C. Después de un nuevo lavado, en los pocillos correspondientes, se agregaron 50 µl de el SPI, SI1, SI2 y SI3 de cada conejo, en distintas diluciones (1/1.000, 1/2.000, 1/4.000, 1/8.000, 1/16.000, 1/32.000, 1/64.000), lo cual fue incubado por 1 ½ hora a 37°C (Dinamic Incubator). Posteriormente se lavó y se agregó 50 µl de inmunoglobulina G (Ig G) de cabra anti IgG de conejo unida a peroxidasa (laboratorio Dakocytomation, Dinamarca) y se incubó nuevamente por 1 ½ horas a 37° C (Dinamic Incubator). Terminada la incubación se lavó y luego se agregó 50 µl de peróxido de hidrógeno al 30% en agua oxigenada, diluido 1/1.000 en ABTS (2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), para realizar la lectura en un espectrofotómetro (marca JENWAY modelo GENOVA MK2) con una longitud de onda 450nm, de la densidad óptica obtenida para cada título de anticuerpos.

Se realizó un control negativo (C-) en el cual se sensibilizó con extracto torácico y se reveló con suero de cabra anti IgG de conejo unida a peroxidasa. El control positivo (C+) no se pudo realizar, ya que no se contaba con inmunoglobulinas específicas contra la saliva de *M. spinolai*. Se realizaron dos controles de calidad, uno de ellos fue sensibilizado con PBS-soya 0,5%, y el otro con suero normal de conejo (no inmunizado) en dilución 1/1.000 (en buffer carbonato 0.1 M, pH 9.0), ambos controles fueron revelados con suero de cabra anti IgG de conejo unida a peroxidasa.

Análisis Estadístico:

Se utilizó la prueba de Mann – Whitney (Spiegel y Stephens, 2002) para determinar diferencias estadísticas entre el suero preinmune y los sueros inmunes obtenidos de cada ejemplar de *O. cuniculus*.

V. RESULTADOS

Al realizar la prueba de ELISA y analizar la densidad óptica dada con los sueros preinmunes e inmunes, se observó que las muestras provenientes del grupo A (conejos 1, 5 y 6) no presentaron respuesta inmune humoral estadísticamente significativa ($p > 0,05$) al compararlas con los sueros preinmunes (figuras 8, 9, 10). En tanto, los animales 3 y 4 del grupo B (conejos 2, 3 y 4) presentaron respuesta inmune humoral estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en los 3 sueros inmunes, mientras que el conejo 2 fue positivo sólo en el SI1 (figuras 11, 12, 13).

Mediante el análisis del control negativo (C-), se observó que el preparado comercial de inmunoglobulinas IgG de cabra anti IgG de conejo unida a peroxidasa, reaccionaba uniéndose al extracto torácico. Por lo anterior la densidad óptica promedio obtenida del C- fue restada a los resultados obtenidos en cada muestra, para así obtener los datos reales de la respuesta inmune humoral del conejo (cuadro 2).

Cuadro 2. Promedio y desviación estándar para valores de densidad óptica obtenidos al realizar test ELISA y restar el C- a los 2 grupos.

Grupo	Conejo	SPI	SI1	SI2	SI3
A	1	0,094±0,008	0,093 ±0,098	0,065± 0,029	0,077± 0,033
	5	0,161± 0,017	0,142± 0,013	0,127± 0,035	0,093± 0,060
	6	0,104± 0,001	0,112± 0,021	0,100± 0,027	0,084± 0,085
B	2	0,149±0,056	0,359±0,018	0,232±0,064	0,219±0,027
	3	0,130± 0,021	0,582± 0,060	0,358± 0,045	0,267± 0,036
	4	0,115± 0,039	0,531± 0,010	0,521± 0,057	0,534± 0,062

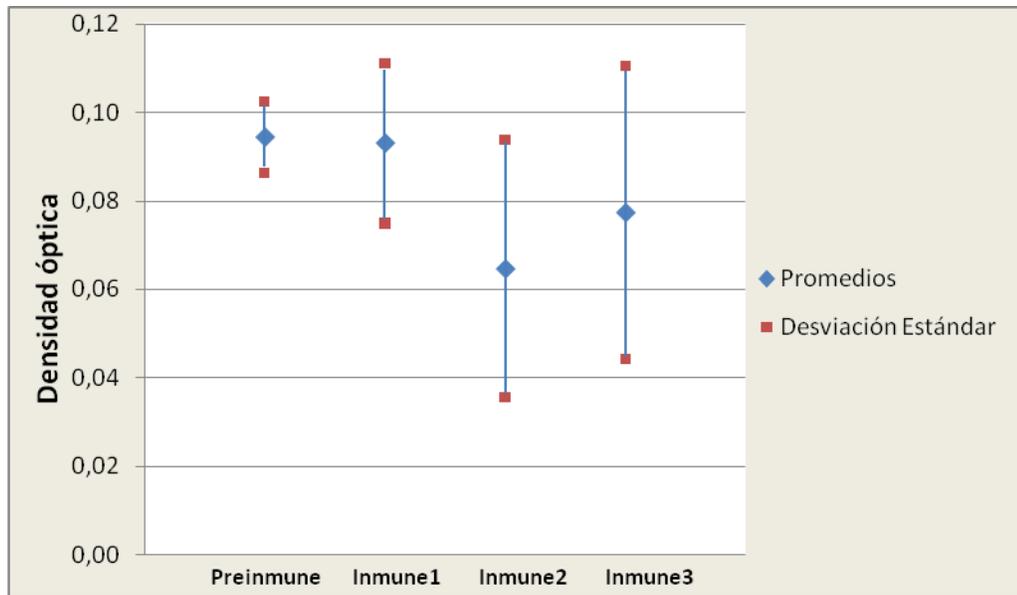


Figura 8. Promedio y desviación estándar para la densidad óptica al efectuar test ELISA del SPI, SI1, SI2 y SI3 del Conejo 1(grupo A).

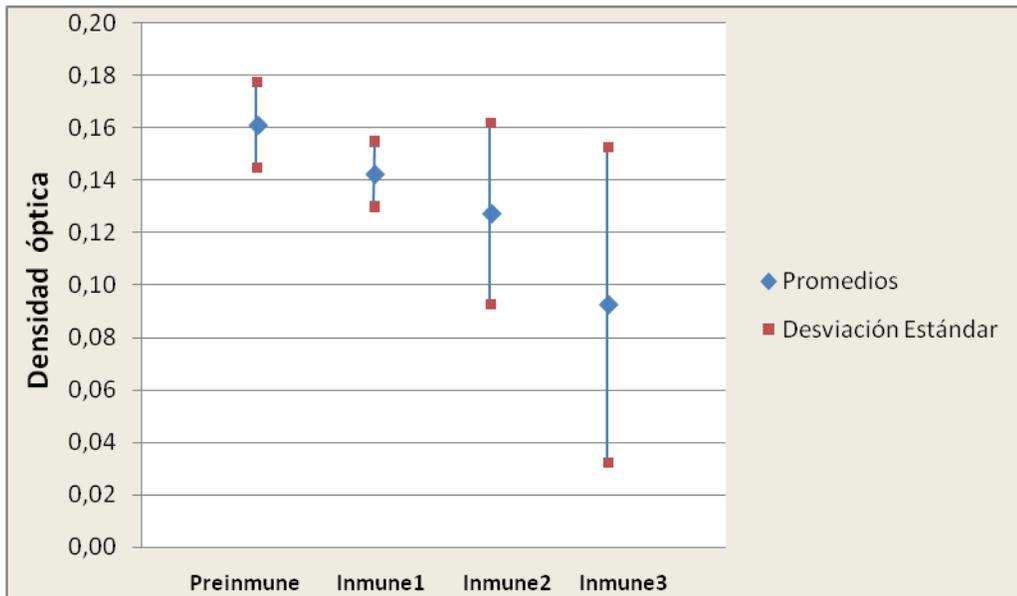


Figura 9. Promedio y desviación estándar para la densidad óptica al efectuar test ELISA del SPI, SI1, SI2 y SI3 del conejo 5 (grupo A).

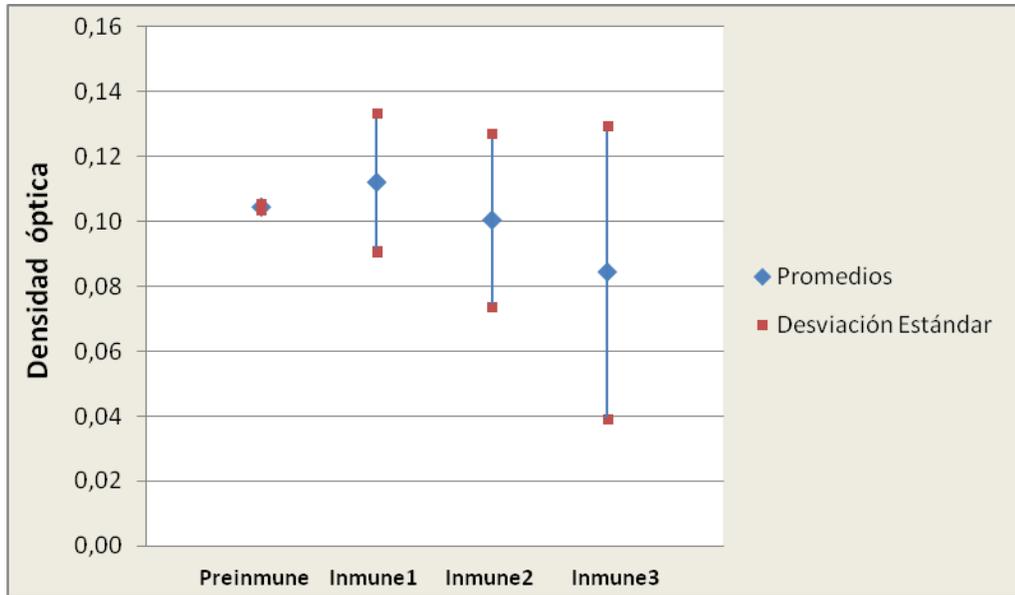


Figura 10. Promedio y desviación estándar para la densidad óptica al efectuar test ELISA del SPI, SI1, SI2 y SI3 del conejo 6 (grupo A).

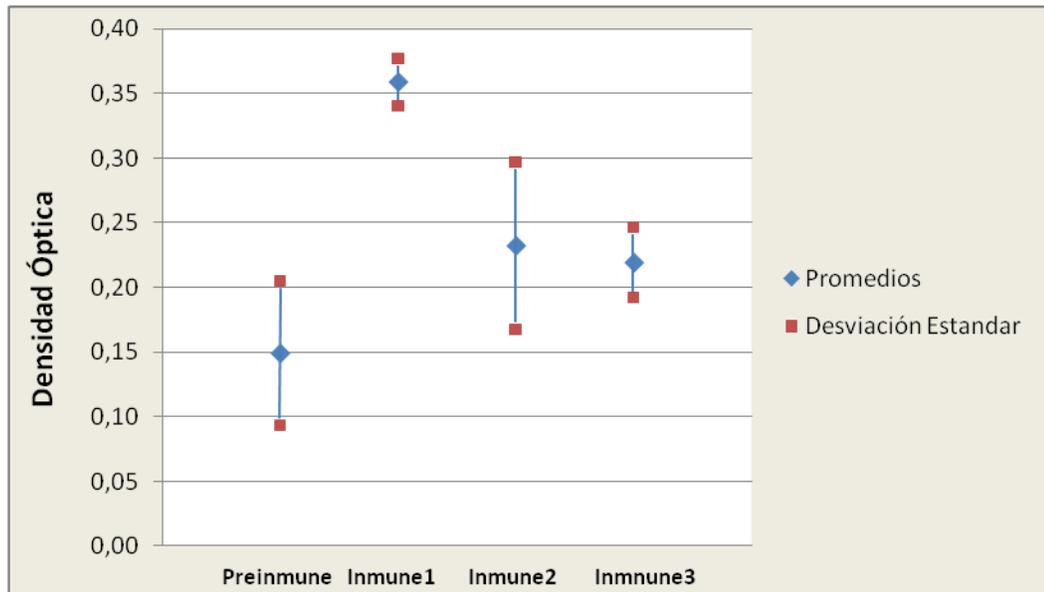


Figura 11. Promedio y desviación estándar para la densidad óptica al efectuar test ELISA del SPI, SI1, SI2 y SI3 del conejo 2 (grupo B).

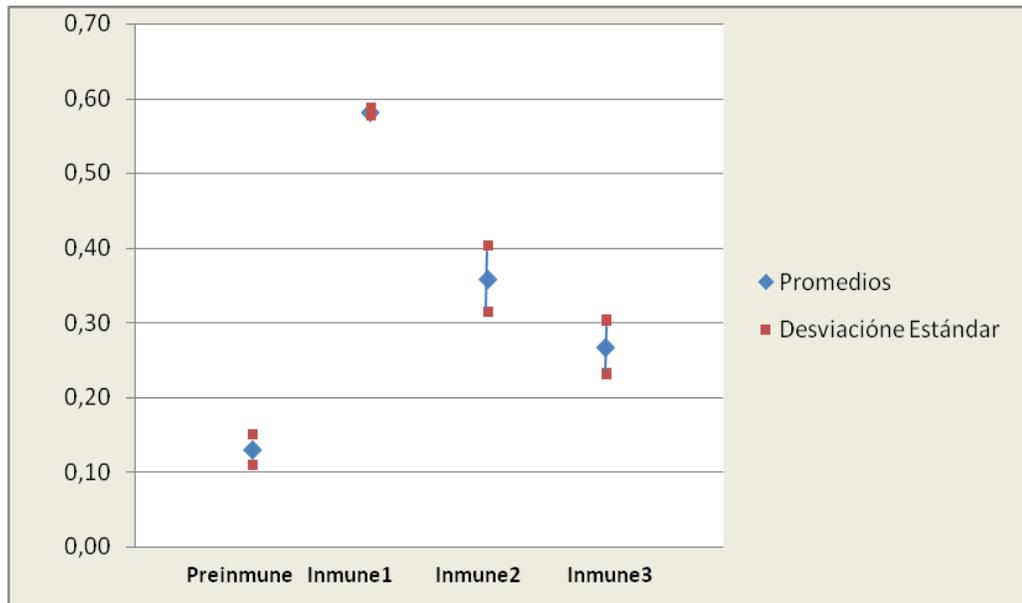


Figura 12. Promedio y desviación estándar para la densidad óptica al efectuar test ELISA del SPI, SI1, SI2 y SI3 del conejo 3 (grupo B).

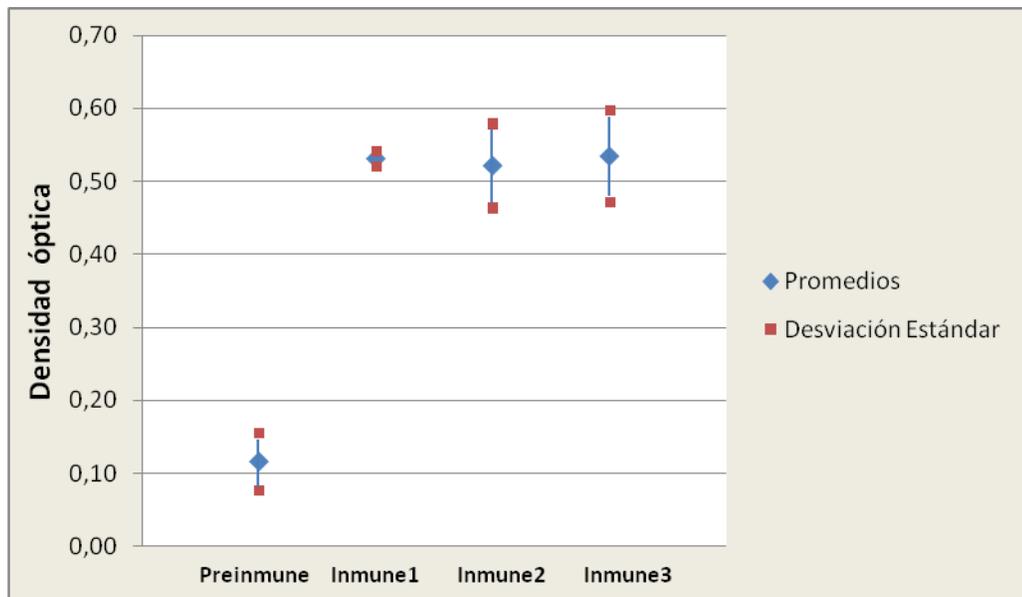


Figura 13. Promedio y desviación estándar para la densidad óptica al efectuar test ELISA del SPI, SI1, SI2 y SI3 del conejo 4 (grupo B).

Al realizar el segundo test de ELISA con diluciones seriadas, en los animales positivos pertenecientes al grupo B (2, 3 y 4) se obtuvieron los siguientes resultados:

Conejo 2

El Conejo 2 evidenció anticuerpos solo en el SI1, y solo a una dilución de 1/1.000 (Figuras 14a, 14b y 14c).

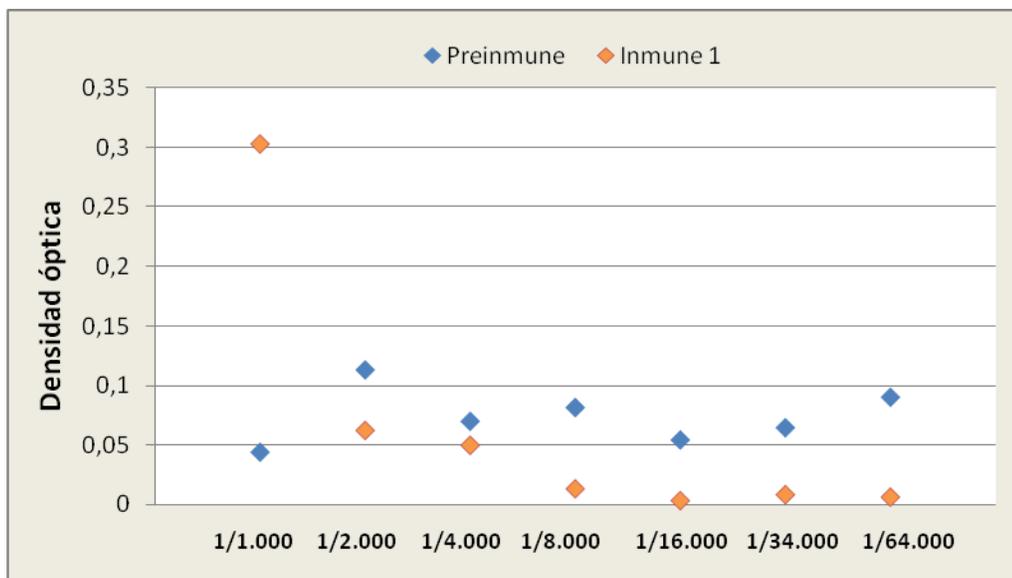


Figura 14a. Densidad óptica obtenida al someter a test ELISA diluciones seriadas del SPI y SI1 del conejo 2 (grupo B).

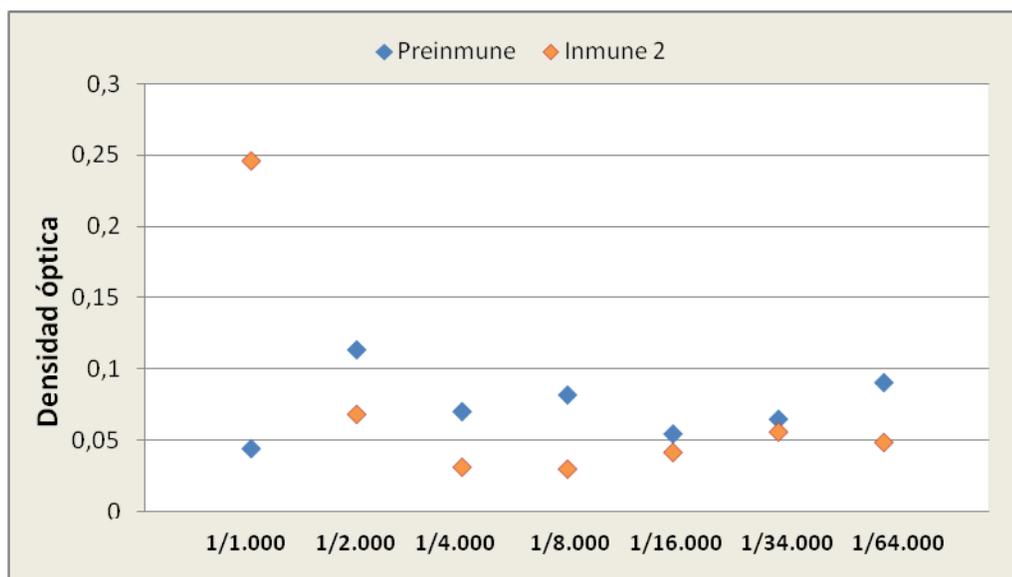


Figura 14b. Densidad óptica obtenida al someter a test ELISA diluciones seriadas del SPI y SI2 del conejo 2 (grupo B).

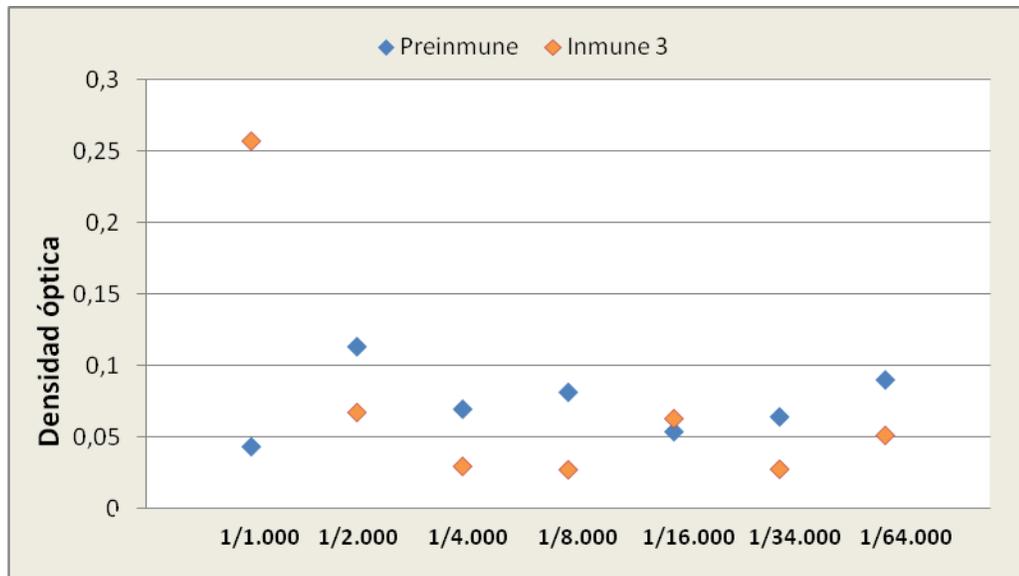


Figura 14c. Densidad óptica obtenida al someter a test ELISA diluciones seriadas del SPI y SI3 del conejo 2 (grupo B).

Conejo 3

El conejo 3 presentó anticuerpos en los tres sueros inmunes. En el SI1 y SI2 se encontraron anticuerpos sólo en una dilución de 1/1.000, mientras que en el SI3 se encontraron anticuerpos en diluciones de 1/1.000, 1/2.000 y 1/4.000 (Figuras 15a, 15b y 15c).

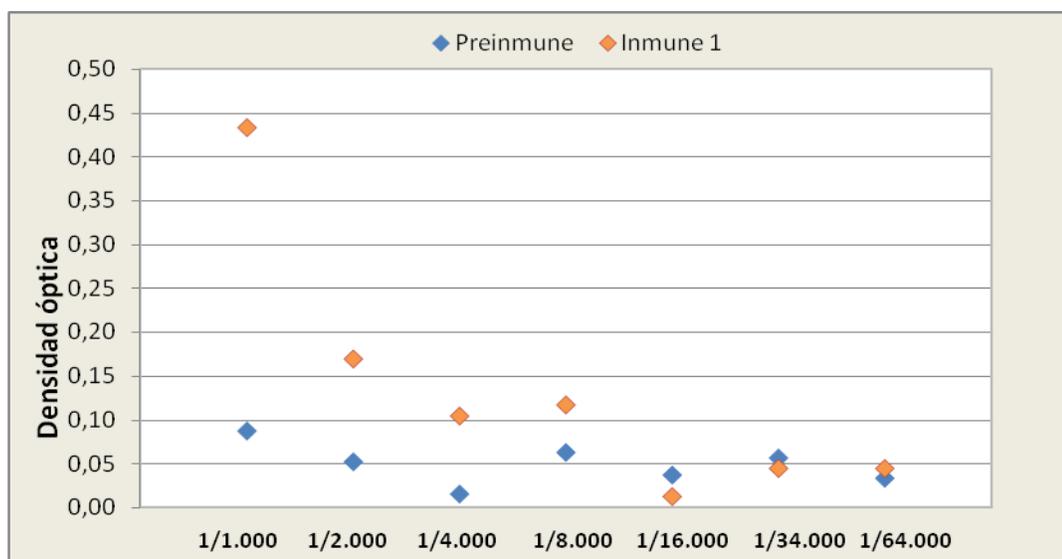


Figura 15a. Densidad óptica obtenida al someter a test ELISA diluciones seriadas del SPI y SI1 del conejo 3 (grupo B).

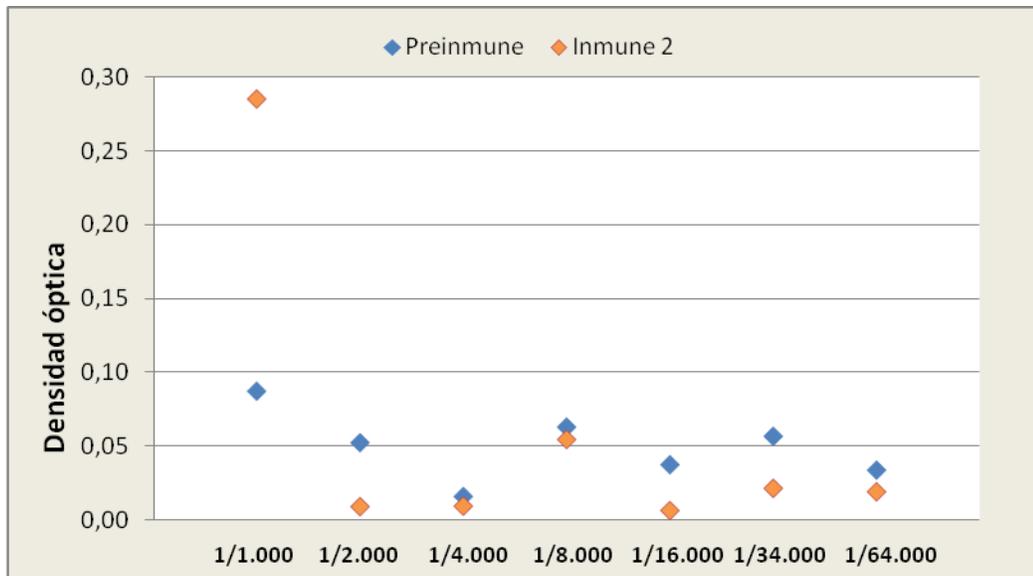


Figura 15b. Densidad óptica obtenida al someter a test ELISA diluciones seriadas del SPI y SI2 del conejo 3 (grupo B).

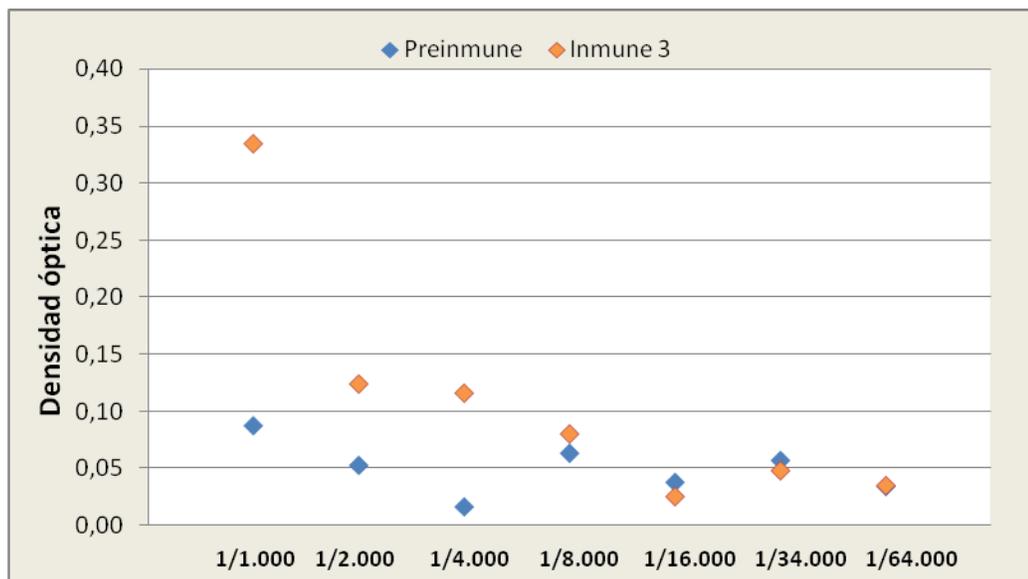


Figura 15c. Densidad óptica obtenida al someter a test ELISA diluciones seriadas del SPI y SI3 del conejo 3 (grupo B).

Conejo 4

El conejo 4 presentó anticuerpos en los tres sueros inmunes. En el SI1 se encontraron anticuerpos sólo en una dilución de 1/1.000, mientras que en el SI2 en las diluciones 1/1.000

y 1/2.000. En el SI3 se evidenciaron anticuerpos en diluciones de 1/1.000, 1/2.000 y 1/4.000 (Figuras 16a, 16b y 16c).

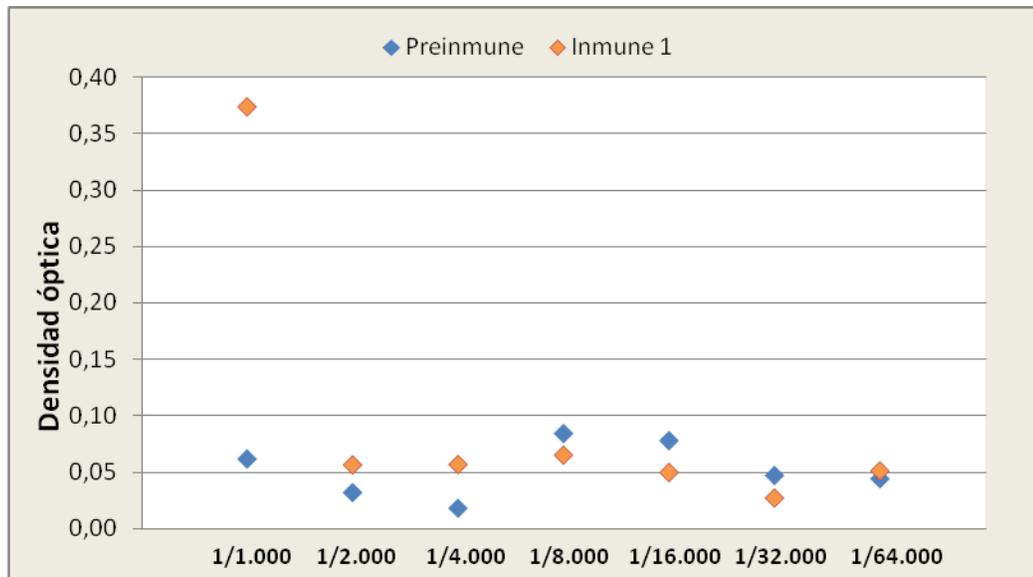


Figura 16a. Densidad óptica obtenida al someter a test ELISA diluciones seriadas del SPI y SI1 del conejo 4 (grupo B).

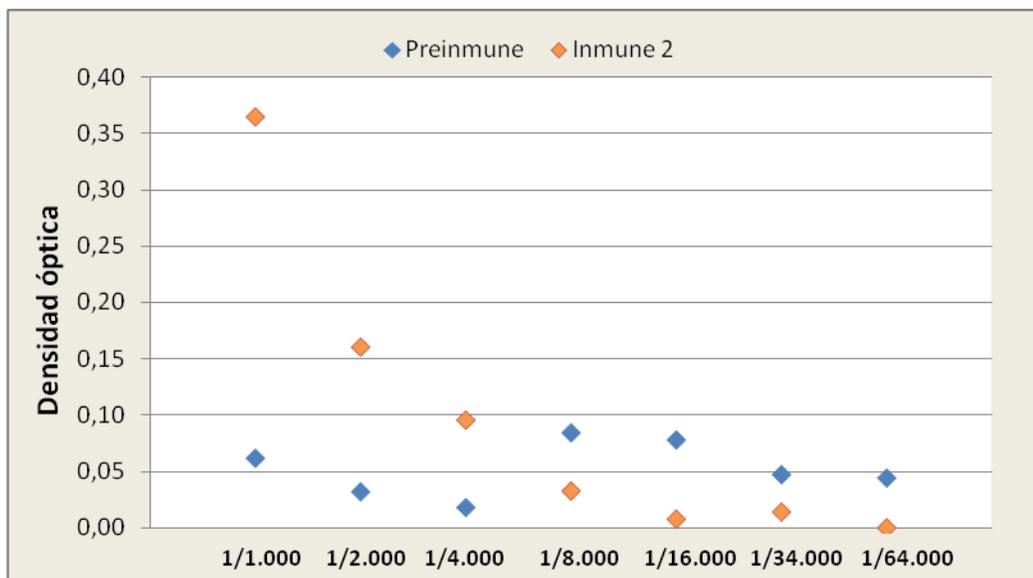


Figura 16b. Densidad óptica obtenida al someter a test ELISA diluciones seriadas del SPI y SI2 del conejo 4 (grupo B).

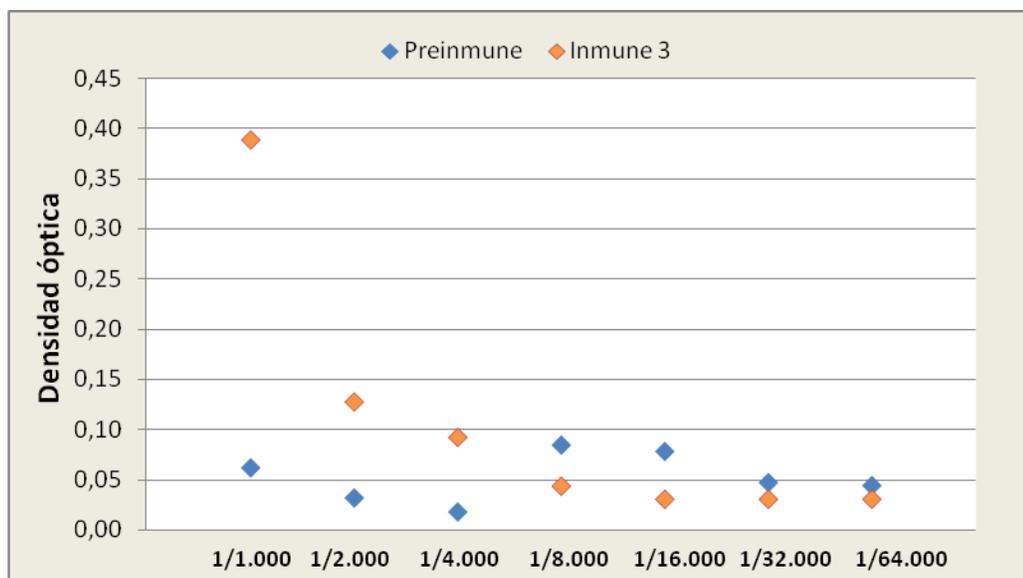


Figura 16c. Densidad óptica obtenida al someter a test ELISA diluciones seriadas del SPI y SI3 del conejo 4 (grupo B).

A continuación, en el cuadro 3 se muestra un resumen de los sueros inmunes y las diluciones en las cuales los conejos 2, 3 y 4 (grupo B) presentaron respuesta inmune humoral significativa ($p < 0,05$).

Cuadro 3. Sueros inmunes y diluciones en las cuales tuvieron respuesta inmune los conejos 2, 3, y 4.

	Conejo2			Conejo 3			Conejo 4		
Sueros / Diluciones	SI1	SI2	SI3	SI1	SI2	SI3	SI1	SI2	SI3
1/1.000	x			x	x	x	x	x	x
1/2.000						x		x	x
1/4.000						x			x
1/8.000									
1/16.000									
1/34.000									
1/64.000									

VI. DISCUSIÓN

La picada puede provocar variadas respuestas fisiológicas en el hospedero, para limitar los efectos de estas respuestas, se puede esperar que la saliva del insecto contenga una gama de diferentes compuestos funcionales. De la misma manera, es probable que la composición de la saliva puede reflejar la gama de hospederos vertebrados diferentes con las que cada especie es típicamente asociado (Reis *et al.*, 2003).

Los insectos hematófagos poseen un amplio grupo de moléculas farmacológicamente activas para contrarrestar los procesos de hemostasia en el hospedero, tales como la coagulación de la sangre, la agregación plaquetaria y la vasoconstricción, los tres principales mecanismos de defensa contra la pérdida de sangre (Ribeiro, 1995). Las sustancias encontradas en la saliva de estos insectos incluyen anticoagulantes, vasodilatadores, inhibidores de la agregación plaquetaria inducida por colágeno, ADP y ácido araquidónico. Además de estos agentes se han descrito, otras moléculas en su saliva, que probablemente también participan en el proceso de alimentación, tales como antihistamínico, una sialidasa y serin proteasa, un bloqueador de los canales de sodio, entre otros (Sant Anna *et al.*, 2002). Varios de los componentes anteriormente mencionados son capaces de inducir una respuesta inmune cuando se inoculan en el hospedero (Bautista, 1987).

En el ensayo realizado, los animales que solamente recibieron tratamiento de picadas (grupo A), no evidenciaron anticuerpos contra las proteínas del extracto torácico de *M. spinolai* en el test ELISA. Este resultado contrasta con los experimentos hechos por Barbosa *et al* (2004) y Barriga *et al* (2005⁷), en los cuales se encontró respuesta de anticuerpos contra la saliva de vinchuca en conejos sometidos sólo a picadas, utilizando 10 *P. megistus* y 21 *T. infestans* (por sesión de picada) respectivamente. Si se comparan los protocolos de inmunización de los experimentos realizados por estos autores, con el protocolo de inmunización del grupo A es posible evidenciar ciertas diferencias, ya que en estos se utilizó un mayor número de vinchucas y un mayor número de sesiones de picada, lo cual podría estar determinando una mayor cantidad de antígenos en la sangre, y posiblemente

⁷ Barriga, O. 2005.[Correspondencia personal].Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

una mayor respuesta inmune medible en un test de ELISA. De acuerdo a Ferreira⁶ cuando existen cantidades bajas de antígeno, la respuesta inmune humoral, si bien, puede ser biológicamente efectiva, puede no ser detectable al realizar los test convencionales, lo que podría estar ocurriendo con la utilización de 5 vinchucas para cada sesión de picada, en tres ocasiones.

Por otro lado, es probable que el protocolo utilizado en el grupo A si pueda inducir una respuesta inmune humoral contra las proteínas de la saliva. Sin embargo, es posible que esta respuesta no pueda ser detectada en el test de ELISA, debido a que este fue sensibilizado con un extracto torácico en donde las proteínas salivales podrían ser sólo una fracción menor, por cuanto se dificultaría la probabilidad de unión de anticuerpos contra la saliva a proteínas de la saliva.

Los animales que fueron sometidos al tratamiento de picadas e inoculación de un extracto torácico (que contenía glándulas salivales de *M. spinolai*), junto con coadyuvante de Freund's completo (grupo B), mostraron una respuesta inmune humoral isotipo IgG en el test de ELISA. Estos datos se ven corroborados por antecedentes obtenidos en un ensayo semejante realizado en *O. degus* por Escobar 2008⁵ en el que también se utilizó extracto torácico como antígeno.

Considerando que el extracto torácico se incorpora al inicio en una única inoculación, y al hecho de que este desencadenaría inicialmente sólo una respuesta inmune primaria, estimulando la producción de anticuerpos IgM. Se podría suponer que la respuesta observada en el grupo B, corresponde a una respuesta inmune secundaria que estarían generando anticuerpos IgG contra las proteínas de la saliva de *M. spinolai*. Lo anterior, debido a las 3 sesiones de picada realizadas posteriormente a la inoculación del extracto que estarían estimulando este tipo de respuesta únicamente contra las proteínas de la saliva del insecto.

Sin embargo, dado que el extracto torácico se inoculó subcutáneo con coadyuvante Freund's completo, esta única inoculación igualmente podría inducir una lenta liberación del

⁶ Ferreira, A. 2008.[Correspondencia personal]. Departamento de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

⁵ Escobar, C. 2008.[Comunicación personal]. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.

antígeno desde el sitio de inoculación, y por lo tanto se podría desencadenar una respuesta inmune secundaria frente a todas las proteínas presentes en el extracto. Esto sugiere la posibilidad de que el extracto genere también una respuesta secundaria, y que los anticuerpos IgG encontrados en el grupo B representen una respuesta contra el extracto torácico en su conjunto y no específicamente contra las proteínas de la saliva.

Por otro lado, se da la misma situación que para el grupo A, en cuanto a la utilización del extracto torácico para sensibilizar el ELISA, ya que este representa una mezcla heterogénea de proteínas en donde probablemente las proteínas de la saliva pueden ser una fracción insignificante, dificultándose la detección de una respuesta inmune específica contra ellas. Lo anterior, a pesar de haberse extraído principalmente las glándulas salivales, ya que estas incluyen proteínas de la saliva y tejido de la glándula que la vinchuca no inocular al momento de picar.

Hubiese sido de gran utilidad, contar con un extracto de saliva purificado, para la inoculación subcutánea y/o para la sensibilización del ELISA, esto podría haber ayudado a despejar las dudas con respecto a lo anterior y por lo tanto se podrían haber obtenido resultados más concluyentes. Asimismo, hubiese sido de gran utilidad, contar con un tercer grupo de conejos, a los cuales se les sometiera únicamente a la inoculación del extracto torácico sin coadyuvante, de manera que permitiese comparar los resultados entre los distintos grupos experimentales, especialmente en aquél en el que luego de la inoculación con extracto torácico (grupo B), los animales fueron sometidos a 3 sesiones de picaduras de *M..spinolai*

En el grupo B, los individuos mostraron variadas respuestas humorales, en cuanto al análisis de las diversas densidades ópticas en los títulos de anticuerpos. Esto reafirma el hecho de que los individuos presentan distintas sensibilidades y por tanto respuestas individuales (Wood, 1951; Janeway *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos mostraron, en todos los ensayos, valores elevados para densidad óptica, esto se debió a que el preparado comercial de inmunoglobulina de cabra anti conejo proporcionado por laboratorios Dako, evidenció una respuesta inmune cruzada

con el extracto torácico de *M. spinolai*. Según información aportada por Meerder⁸ (2008), dichas inmunoglobulinas fueron obtenidas a partir de cabras que se encontraban en Dinamarca, estabuladas en invierno y en pradera en verano, cuyo único antecedente epidemiológico de importancia es la presencia de roedores, lo cual podría asociarse con la presencia de pulgas. Respecto a este tema, Bautista (1987), señala que se han observado reacciones cruzadas entre antígenos de grupos de artrópodos de la misma clase y orden; por ejemplo, entre ácaros o entre garrapatas, e inclusive, entre clases y órdenes diferentes, lo cual indica que algunos antígenos son comunes entre artrópodos. Esto también se ha descrito entre grupos de protozoarios y helmintos. Nascimento *et al*, 2001, encontraron que existe reacción cruzada entre los antígenos aportados por el protozoo *T. cruzi* y los antígenos que son inyectados a través de la picadura del insecto *T. infestans*, mostrando que ambos, dada su evolución en conjunto, comparten proteínas. Dado lo anterior, en caso de realizar parte de este estudio en terreno y según las características epidemiológicas de la zona dónde éste se efectúe, los resultados obtenidos podrían presentar algún grado importante de individuos falsos positivos, producto de reacción cruzada.

⁸ Meeder, K. 2008. [Correspondencia personal] Laboratorios Dako. USA.

VII. CONCLUSIONES

- El antígeno salival inoculado por la picada de 5 vinchucas (durante 20 min, en 3 ocasiones , cada 7 días), no es capaz de generar una respuesta inmune humoral (IgG) contra las proteínas de la saliva de *M. spinolai*, que sea detectable por el Test de ELISA aplicado en este estudio.
- La inoculación de extracto torácico (con glándulas salivales de *M. spinolai*) asociado a la picadura de 5 vinchucas (durante 20 min, en 3 ocasiones, cada 7 días) logra una respuesta inmune humoral (IgG) contra proteínas presentes en el extracto torácico.
- El test de ELISA no presentó una elevada especificidad, debido a una posible reacción cruzada entre las proteínas del extracto torácico y el suero de cabra que contenía las inmunoglobulinas de cabra anti IgG de conejo unida a peroxidasa.

VII. BIBLIOGRAFÍA

ACUÑA, M. 2001. Efecto del hospedero sobre el crecimiento poblacional de *Mepraia spinolai*, vector del mal de Chagas en Chile. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Chile, Chile. 67 p.

ACUÑA, M. 2002. La vinchuca silvestre: ¿una amenaza latente?. Tecno Vet. 8 (2),[enlínea]<http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9633%2526ISID%253D471,00.html>. [consulta: 26-06-2008]

APT, W.; REYES, H. 1986. Aspectos epidemiológicos de la Enfermedad de Chagas en Chile. Distribución geográfica, índices de infección en vectores y humanos. Parasitología al Día. 10: 94 - 101

APT, W.; REYES, H. 1990. Algunos aspectos de la Enfermedad de Chagas en Latinoamérica. Parasitología al Día. 18: 82 - 87.

APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; HAUCK, I.; SAN MARTÍN, A.; SAPUNAR, J.; TORRES, N.; ZULANTAY, I. 2006. Prevención y control de la enfermedad de Chagas. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. 48p.[enlínea]<www.minsal.cl/ici/enfermedades_transmisibles/GUIACLINICACHAGAS.doc>. [consulta: 23-07-2008]

BAUTISTA, C. 1987. Interacciones artrópodo-respuesta inmune del huésped. Ciencia Veterinaria. 4:87.130.[enlínea].<<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol4/CVv4c4.pdf>>. [consulta: 11-10-2008].

BARBOSA, S. E.; DIOTAIUTI, L.; BRAGA E.M.; PEREIRA, M. H. 2004. Variability of the salivary proteins of 20 Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemíptera: Reduviidae: Triatominae) Acta Tropical. 92 (1): 25 - 33.

BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ROZAS, M.; CATTAN, P.; SOLARI, A. 2005. DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in the Chilean wild vector *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz Río de Janeiro. 100 (3): 237 - 239.

BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248 - 54.

CABELLO, D.; LIZANO, E.; VALDERRAMA, A. 1987. Estadísticas vitales de *Rhodnius neivai* Lent, 1953 (Hemiptera: Reduviidae) en condiciones experimentales. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 57: 511 - 524.

CANALS, M.; EHRENFELD, M.; SOLIS, R.; CRUZAT, L.; PINOCHET, A.; TAPIA, C.; CATTAN, P.E. 1998. Biología comparada de *M. spinolai* en condiciones de laboratorio y terreno: cinco años de estudio. Parasitología al Día. 22:72 - 78.

CANALS, M.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.E. 2000. Situación de *Mepraia spinolai*, vector silvestre de la enfermedad de Chagas en Chile, en relación con otros vectores desde la perspectiva de sus fuentes de alimentación. Revista Médica de Chile. 128(10):1108 - 1112.

CANALS, M. CRUZAT, L. MOLINA, M. FERREIRA, A. CATTAN, P. 2001. Blood host sources of *Mepraia spinolai* (Heteroptera: Reduviidae). Journal of Medical Entomology. 38 (2): 303 - 307.

CARVAJAL, A.; ORELLANA, J.; WIGANT, W.; BÓRQUEZ, C.; LOBATO, I. 2007. Prevalencia de triatomíneos infectados con *Trypanosoma cruzi* en el litoral de la ciudad de Arica. Parasitología Latinoamericana. 62 (3-4): 118 - 121.

CATTAN, P.; PINOCHET A.; BOTTO-MAHAN, C.; ACUÑA, M.; CANALS, M. 2002. Abundance of *Mepraia spinolai* in a periurban zone of Chile. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 97 (3): 285 - 287.

CHAMPAGNE, D.; WASSERMAN, H.; KUMAR, S.; SINGH, S. 2004. Pharmacological and immunological properties of saliva of the blood-feeding insects *Rhodnius prolixus* and *Aedes aegypti*. *Physiological Entomology.* 29: 269 - 277.

CHARLAB, R.; VALENZUELA, J. G.; ROWTON, E. D.; RIBEIRO, J. M. C. 1999. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a haematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 96: 15155 - 15160

COELHO, A.; CARVALHO-TAVARES, J.; DE FIGUEIREDO, N.; DOS SANTOS, V.; MARTINS, M.; PEREIRA, M. 2006. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae) in mouse skin. *Journal of Insect Physiology.* 52 (5):468 - 472.

CRUZ-LOPEZ, L.; MALO, E.A.; ROJAS, J.C.;MORGAN, E.D.2001.Chemical ecology of triatomine bugs vectors of Chagas disease. *Medical and Veterinary Entomology.* 15: 351 - 357.

DIAS, JCP.; SILVEIRA, AC.; SCHOFIELD, CJ. 2002. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America – A Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 97 (5): 603 - 612.

FAUDRY, E. ROCHA, P. VERNET, T. LOZZI, S. TEIXEIRA, A. 2004. Kinetics of expression of the salivary apyrases in *Triatoma infestans*. *Insect biochemistry and molecular biology.* 34 (10): 1051 - 1058.

FEINGOLD, B.; BENJAMÍN, E.; MICHAELI, D.1968. The allergic responses to insect bites. Annual Reviews of Entomology. 13: 137 - 158.

FRIAS, D.; MARTINEZ, H. 1987. Algunos aspectos taxonómicos de *Triatoma spinolai* (Porter) (Hemiptera: Triatominae). Acta Entomológica Chilena. 14: 155 - 170.

FRIAS, D.; ATRIA, J. 1998. Chromosomal variation, macroevolution and possible parapatric speciation in *Mepraia spinolai* (Porter) (Hemiptera: Reduviidae). General Molecular Biology. 21 (2): 179 - 184.

FRIAS, D.; HENRY, A.; GONZALES, C.R. 1998. *Mepraia gajardoi*: a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from Chile and its comparison with *Mepraia spinolai*. Revista Chilena de Historia Natural. 71: 177-88.

GALVAO, C.; PATTERSON, J.; DA SILVA ROCHA, D.; JURBERG, J.; CARCAVALLO, R.; RAJEN, K.; AMBROSE, D.; MILES, M. 2002. A new species of Triatominae from Tamil Nadu, India. Medical and Veterinary Entomology. 16 : 75 - 82.

GUARNERI, A. A.; DIOTAIUTI, L.; GONTIJO, N. F.; GONTIJO, A. F.; PEREIRA, M. H. 2003. Blood – feeding performance of nymphs and adults of *Triatoma brasiliensis* on human host. Acta tropical. 87 (3):361 - 370.

JAKSIC, F.1998. Ecología de los vertebrados de Chile. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 262 p.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; DONALD, C. 2000. Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. Barcelona. Masson. 644p.

LACOMBE, D.; 1999. Anatomia e histologia das glandulas salivares nos triatomíneos. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Río de Janeiro. 94 (4): 557 - 564.

LENT, H.; JURBER, J.; GALVAO, C. 1994. Revalidacao do genero *Mepraia*, Mazza, Gajardo y Jorg, 1940 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 89: 347- 52.

MAEKELT, G.A. 1983. La epidemiología de la Enfermedad de Chagas en relación con el ecosistema domiciliario. Interciencia. 1(6):353-36.

MAGALLÓN, E.; MAGDALENO, N.C.; KATTHAIN, G.; TRUJILLO, F.; LOZANO, F.J.; HERNÁNDEZ, R.J. 1998. Distribución de los vectores de la enfermedad de Chagas (HEMIPTERA: REDUVIIDAE: TRIATOMINAE) en el estado de Jalisco, México. Revista Biomédica. 9: 151 - 157.

MILES, M.M; FELICIANGELI, M.D; ARIAS, A.R. 2003. American tripanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. British Medical Journal. 326: 1444 - 1448.

MOLINA, M.C.; CATTAN, P.E.; CANALS, M.; CRUZAT, L.; AGUILLON, J.C.; FERREIRA, A. 2004. A simple immunometric assay to assess the feeding habits of *Meprai spinolai*, a *Trypanosoma cruzi* vector. Parasitology Research. 92: 375 - 379.

MOREIRA, M. F.; COELHO, H. S. L.; ZINGALI, R. B.; OLIVEIRA, P. L.; MASUDA, H. 2003. Changes in salivary nitrophorin profile during the life cycle of the blood – sucking bug *Rhodnius prolixus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 33: 23 - 28.

NASCIMENTO, R.J.; SANTANA, J.M.; LOZZI, S.P.; ARAUJO, C.N.; TEIXEIRA, A.R.L. 2001. The main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 65: 219 - 226.

NOIREAU, F.; BOSSENO, M.; CARRASCO, R.; TALLERIA, J.; VARGAS, F.; CAMACHO, C.; YAKSIC, N.; BRENIERE, B. 1995. Sylvatic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) and possible infection with *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Journal of Medical Entomology* 32:(5) 594 - 598.

OMS. 2007. Enfermedad de Chagas. OMS amplía la lucha contra la enfermedad de Chagas con apoyo de Bayer. [en línea] <<http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/dch-oms-bayer.htm>>[consulta:26-06-2008].

OPS. 2003. Informe Final: XII^a Reunión de la Comisión Intergubernamental del Cono Sur para la Eliminación de *Triatoma infestans* y la Interrupción de la Trasmisión Trasmisión Trasmisión de la Tripanosomiasis Americana (INCOSUR/Chagas). [en línea] <<http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/dch-XII-INCOSUR-inf-final-chi.pdf>> [consulta: 10/12/07].

ORDENES, H.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.E. 1996. Infección tripano-triatomina de *Triatoma spinolai* en una zona de riesgo epidemiológico. *Revista Médica de Chile*. 124: 1053 - 7.

REIS, M.; MEIRELLES, R.; SOARES, M.; 2003. Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera; Reduviidae). *Tissue & Cell*. 393 - 400.

RENGIFO, A. 2000. Preferencias Alimentarias Específicas de *Mepraia spinolai* por Vertebrados Frecuentes en su Hábitat. Tesis de grado. Universidad de Chile. Santiago. 69 pp.

RIBEIRO, J. M.; ROSSIGNOL, P. A.; SPIELMAN, A. 1986. Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. Comparative Biochemistry and Physiology. A83: 683 - 686.

RIBEIRO, J. M.; VACHEREAU, A.; MODI, G. B.; TESH, R. B. 1989. A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Science. 243: 212 - 214.

RIBEIRO, J.M.C.1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists?. Infections Agents and Disease. 4: 143 - 152.

RIBEIRO, J. M.; SHNEIDER, M.; ISAIAS, T.; JURBERG, J.; GALVAO, C.; GUIMARAES, J. A. 1998. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). Journal of Medical Entomology. 35: 599 - 610

RIBEIRO, J.M.; FRANCISCHETTI, M.B. 2003. Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. Annual Review of Entomology 48:73 - 88.

SALVATELLA, R. 1986. Triatominos del Uruguay. Revista Médica Uruguay. 2: 106 - 113.

SALVATELLA, R.; CALEGARI, L.; LOWINGER, M.; BASMADJAM, Y.; ROSA, R.; MENDARO, G.; CIVILA, E. 1991. *Triatoma rubrobaria* (Hemíptera Triatominae) y su papel como vector secundario del ciclo domiciliario de *Tripanosoma cruzi* en Uruguay. Revista Médica Uruguay. 7: 45 - 50.

SANT ANNA, M.; ARAÚJO, J.; PEREIRA, M.; PESQUERO, J.; DIOTAIUTI, L.; LEHANE, S.; LEHANE, M. 2002. Molecular cloning and sequencing of salivary gland-specific DNAs of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: reduviidae). Insect molecular biology. 11 (6): 585 - 596.

SCHENONE, H.; CONTRERAS, M.; SALINAS, P.; SANDIVAL, L.; ROJAS, A.; VILLARROEL, E. 1995. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile. Frecuencia de infección humana por *Trypanosoma cruzi* por grupos de edad y regiones. Boletín Chileno de Parasitología 50: 84 - 86.

SCHOFIELD, J.C. 1994. Triatominae, biología y control. Eurocomunica Publications. Oeste, Inglaterra. 80 p.

SCHOFIELD, C.; APT, W.; SAGUA, H.; PANZERA, F.; DUJARDIN, J. 1998. Alary polymorphism in *Triatoma spinolai* and its possible relationship with demographic strategy. Medical and Veterinary Entomology. 12 (1): 30 - 38.

SCHOFIELD, C.; DIOTAIUTI, L.; DUJARDIN, J. 1999. The process of domestication in Triatominae. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 94 (1): 375 - 378.

SPIEGEL, M.; STEPHENS, L. 2002. Estadística. México. Mc Graw Hill. Tercera edición.

WINISVESKY-COLLI, C.; GURTLER, R.; SOLARZ, N.; SCHWEIGHMANN, N.; PIETROKOVSKY, S.; ALBERTY, A.; FLO, J. 1993. Dispersive flight and house invasion by *T. guasayana* and *T. sordida* in Argentina. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 88 (1): 27- 32.

WOOD, S.F. 1951. Importance of feeding and defecation times in insect vectors in transmission of Chagas disease. Journal of Economic Entomology. 44: 52 - 54.

ZELEDÓN, R. 1983. Vectores de la enfermedad de Chagas y sus características fisiológicas. Interciencia. 8: 384 - 393.

ZUNINO, S. 1989. Origen y distribución de los conejos en Chile. Noticiario Mensual del Museo Nacional de Historia Natural (Chile). 316: 8 - 10.