



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

RESPUESTA INMUNE HUMORAL DEL ROEDOR DEGUS
(*Octodon degus*) FRENTE A LA PICADA DE *Mepraia spinolai*,
VECTOR SILVESTRE DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

CRISTINA LEONORA ESCOBAR LUCERO

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

PROFESOR GUÍA : PEDRO CATTAN AYALA

FINANCIAMIENTO: PROYECTO FONDECYT N° 1040711

SANTIAGO, CHILE

2009

A NIÑO PERRO

QUE EN PAZ DESCANSES

ÍNDICE	Pag.
Resumen	1
Summary	2
Introducción	3
Revisión de Literatura	
Antecedentes generales de la enfermedad de Chagas	5
1.1 Situación en Chile	8
1.2 Iniciativas tendientes a eliminar la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas	9
1.3 Importancia epidemiológica de triatomíneos silvestres en la enfermedad de Chagas	10
a. Invasión antrópica	11
b. Eliminación de vectores domésticos	12
c. Adaptación a un hospedero doméstico	12
2. <i>Mepraia spinolai</i>	14
2.1 Importancia epidemiológica de <i>M. spinolai</i> en la transmisión de la enfermedad de Chagas	16
3. Antecedentes sobre algunos factores involucrados en la picada de insectos hematófagos (HEMIPTERA :REDUVIDAE)	17
3.1 Componentes básicos de la saliva de los triatominos	18
3.2 Respuesta inmune humoral a la picada de insectos hematófagos (Hemiptera: Reduviidae)	19
Objetivo General	22
Objetivo Específico	22
Materiales y Método	23
Resultados	30
Discusión	37
Conclusiones	41
Bibliografía	42
Apéndice	51

RESUMEN

Mepraia spinolai es una especie silvestre de triatomíneo, el cual es vector de la enfermedad de Chagas. Estudios recientes demuestran que este insecto es epidemiológicamente importante en la transmisión de dicha enfermedad, debido a su capacidad potencial para reemplazar a los vectores domiciliarios ocupando el nicho ecológico dejado por éstos después de su eliminación. Se ha observado que el roedor *Octodon degus* puede llegar a jugar un rol significativo en la transmisión de esta enfermedad, ya que, por su alta tasa de infección, es considerado un reservorio de la misma. La evaluación de la respuesta inmune del roedor *O. degus* a la picada de *M. spinolai* puede ser una útil herramienta inmuno epidemiológica para evaluar la exposición de estos animales a la enfermedad de Chagas.

Las proteínas provenientes de las glándulas salivales de insectos triatomíneos pueden inducir reacciones de hipersensibilidad, tanto locales como sistémicas en sus hospederos. En este estudio, se evaluó la respuesta de anticuerpos isotipo IgG contra la saliva de *M. spinolai* en *O. degus*. Para ello se establecieron dos grupos de estudio: uno de ellos sólo fue picado de manera reiterada por especímenes de *M. spinolai* (grupo A) y el otro, además de ser picado reiteradamente, se inoculó de manera previa con extracto torácico que contenía glándula salival de *M. spinolai* (grupo B).

Se realizó test ELISA al suero preinmune y postinmune para detectar la presencia de anticuerpos IgG contra proteínas de la glándula salival de *M. spinolai*. Sólo se detectaron anticuerpos IgG en el suero postinmune de animales del grupo B. En este estudio se concluye que *O. degus* puede generar respuesta inmune humoral contra los antígenos contenidos en el extracto torácico y eventualmente esta respuesta podría incluir anticuerpos IgG contra las proteínas de la saliva de *M. spinolai*.

SUMMARY

Mepraia spinolai is a sylvatic specie of Triatominae, which is vector of Chagas disease. In recent studies it was demonstrated that this bug has epidemiological importance in the transmission of Chagas disease, because they have a potencial capacity to replace domiciliary vectors, using the ecological niche left by this bugs after them elimination. On the other hand, it has been observed that the rodent *Octodon degus* can play a significant role in transmission of this disease; because they have a high infection rate, they are considered a reservoir of this disease. Immune response evaluation of *O. degus* to the bite of *M. spinolai* could be a useful immuno epidemiological tool for the evaluation of exposition to Chagas disease.

Proteins from Triatominae salivary glands can induce, local and systemic hypersensitivity reactions or both at the same time, in their hosts. In this study, the IgG antibody response against *M. spinolai* saliva was evaluated in *O. degus*. For this, two groups of study were stablished: the first one was bitten repeatedly by *M. spinolai* bugs (group A), the second one was inoculated with a thorax extract of *M. spinolai*, which includes salivary glands and then was bitten repeatedly by *M. spinolai* bugs (group B).

Test ELISA was made to evaluate the pre immune and the post immune sera to detect IgG antibodies against protein from *M. spinolai* salivary glands. IgG antibodies only were detected in the postimmune sera of animals from group B. In this study it was concluded that *O. degus* can generate immune response against the thorax extract and eventually this response might include antibodies IgG against the proteins of the saliva of *M. spinolai*.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis parasitaria que constituye un importante problema de salud pública en la mayoría de los países latinoamericanos, con un gran impacto en el ámbito social y económico. Según cifras de la Organización Mundial de la Salud, entre 16 y 18 millones de personas en América Latina estaban infectadas en 1990, a las que se suman unos 90 millones más que se encontrarían en riesgo epidemiológico, lo que corresponde aproximadamente a una prevalencia media del 4% (Acuña, 2002).

La vía más común de transmisión del parásito al hombre y, por lo tanto, de mayor importancia epidemiológica, es a través de insectos hematófagos estrictos y oportunistas que participan como vectores. En Chile existen dos vectores conocidos de *Trypanosoma cruzi*, protozoo causante de la enfermedad de Chagas: *Triatoma infestans* Klug, 1834 y *Mepraia spinolai* Porter, 1934 (Hemiptera: Reduviidae), comúnmente llamados vinchucas. El primero corresponde al vector biológico del ciclo doméstico de la enfermedad y ha sido ampliamente estudiado. Por su parte, *M. spinolai* tiene un importante rol en el ciclo silvestre, el cual mantiene al agente de la enfermedad en reservorios tales como micromamíferos silvestres y algunos animales domésticos (Silveira, 2002).

Entre las más frecuentes reacciones anafilácticas reportadas a las picaduras de insectos, se encuentran aquellas atribuidas a este importante grupo de insectos hematófagos. Los que inyectan proteínas de la saliva durante la adquisición de sangre como alimento, lo que puede ocasionar una variedad de respuestas alérgicas, siendo una de ellas fatal, severa y ocasional en individuos sensibles. La reacción sistémica incluye prurito generalizado, desórdenes gastrointestinales, fiebre, disnea, síncope, hipotensión, edema laríngeo y de la glotis, y convulsiones (Paddock *et al.*, 2001).

Basándonos en el hecho que estos insectos inoculan proteínas inmunogénicas a sus hospederos, quisimos determinar la presencia de respuesta inmune humoral de un roedor, el *Octodon degus*, especie nativa de Chile, ante la picada de vinchucas silvestres (*M. spinola*).

REVISIÓN DE LITERATURA

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 protozoo flagelado *T. cruzi*, y es transmitida a través de insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) (Panzera *et al.*, 2004) (fig. 1).

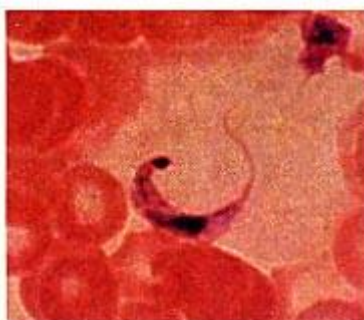


Figura 1. *T. cruzi* en frotis de sangre

Fuente: Acuña, M. (2002) TECNOVET.

A más de 90 años de la descripción que hiciera Carlos Chagas en 1909 de la enfermedad que lleva su nombre, el vector que la transmite y el protozoario que la origina, la enfermedad sigue siendo un problema de salud pública en gran parte de los países latinos de la América continental (Silveira, 2002). Durante la década de los 80s, la prevalencia estimada de la infección por *T. cruzi* en los países endémicos, alcanzó los 17 millones de casos, y cerca de 100 millones de personas (25% de los habitantes de Latinoamérica) se encontraban en riesgo de adquirir la infección por dicho protozoo (Moncayo, 2003).

La incidencia se estimó como 700.000 a 800.000 casos por año, con una mortalidad anual de 45.000 debido a la presentación cardiaca de la enfermedad (UNDP/WORLD BANK/WHO, 1991).

La enfermedad de Chagas se extiende desde el paralelo 35 Lat. Norte, Sur de USA, hasta el paralelo 34,5 Lat. Sur en Chile y el paralelo 45 Lat. Sur en Argentina. Si bien todos los países que existen entre esos límites presentan la infección, ésta es más importante en América del Sur por su mayor prevalencia y repercusión clínica (Apt y Reyes, 1990).

Esta enfermedad existe desde tiempos remotos en el continente americano, así lo demuestra un estudio realizado por Ghul *et al.*, (1999) quienes encontraron evidencias en comunidades que poblaron el extremo norte de Chile hace más de 4.000 años. El ciclo silvático de la enfermedad de Chagas estaba probablemente bien establecido al momento en que los primeros humanos colonizaron el segmento costero de los Andes y, de manera inadvertida, éstos pasaron a ser hospederos del parásito (Aufderheide *et al.*, 2004).

El agente causal de la enfermedad de Chagas, *T. cruzi*, es comúnmente transmitido a través de insectos triatomíneos hematófagos (Hemiptera: Reduviidae) (Ramsey *et al.*, 2000). En Chile, estos insectos son conocidos popularmente como "vinchucas". 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 transfusiones de sangre o trasplantes de órganos de donantes infectados, transmisión congénita desde madres infectadas, ingestión de sustancias infectadas y las infecciones accidentales en el laboratorio (Schofield, 1994). Es así que las vinchucas contraen al parásito alimentándose de un mamífero previamente infectado y conservan la infección durante toda su vida (Fig. 2). Estos insectos transportan al parásito en su intestino infectando a sus hospederos a través de sus deyecciones (Acuña, 2002).

Los vectores distribuyen al parásito dentro de las comunidades de mamíferos silvestres que constituyen sus reservorios (ciclo silvestre) y entre los animales domésticos sinantrópicos y el hombre, que constituyen el reservorio doméstico (ciclo doméstico) (Acuña, 2002). Los insectos de la subfamilia triatominae se encuentran organizados dentro de 18 géneros, con 134 especies, todas caracterizadas por su hematofagia obligatoria (Galvao *et al.*, 2002).



Figura 2. Ejemplar alimentado de *M. spinolai*

Fuente: Acuña, M. (2002) TECNOVET.

La epidemiología de la enfermedad de Chagas es compleja y multidisciplinaria 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 (Maekelt, 1983).

La mayoría de las especies de triatominos ocupan hábitats principalmente selváticos en asociación estrecha con sus hospederos vertebrados. Dichos hábitats incluyen diferentes tipos de nidos de aves, madrigueras, montones 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 de vertebrado. Algunas 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 triatominos 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). Así, algunos de estos triatomíneos invadieron y colonizaron viviendas humanas y su periferia. Estas especies son calificadas como de mayor importancia epidemiológica (Acuña, 2002).

Las especies consideradas domésticas, tales como *T. infestans* y *Rhodnius prolixus* se encuentran progresivamente controladas a través de iniciativas regionales y nacionales diseñadas para eliminar dichas poblaciones a través de la aplicación de insecticidas de acción residual. Sin embargo, en los últimos años, ha habido un aumento de 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 silvático exclusivo, tales como *Panstrongylus rufotuberculatus*, *Rhodnius stali* y *Eratyrus mucronatus* en Bolivia y *P. geniculatus* en la región del amazonas (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).

1.1. Situación en Chile

En Chile la enfermedad de Chagas tiene una distribución rural y peri-urbana en las seis primeras regiones del país (Acuña, 2002). En 1960 se estableció el límite sur del triatomismo domiciliario y de la infección humana por *T. cruzi*, el cual está ubicado a 34° 36' latitud Sur (Silveira, 2002). Esta enfermedad predomina 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).

Existen dos vectores de la enfermedad de Chagas en Chile: *T. infestans* Klug (1834) (Figura 3a), el vector doméstico y *M. spinolai* Porter (1934) (Figura 3b), el vector silvestre (Canals *et al.*, 2001). Esta última se encuentra desde la III región hasta la Región Metropolitana (26° a 33° Lat. Sur) (Frias *et al.*, 1998).

Recientemente se ha descrito *M. gajardoi*, cuya distribución geográfica se extiende desde los 18° a los 26° Lat. Sur. (Frías *et al.*, 1998). Estudios recientes realizados por Carvajal *et al.*, (2007), muestran que esta última especie se encuentra infectada por *T. cruzi*, presentando un índice tripano triatomineo de 19,2%; detectado con la técnica de PCR.



(Fig. 3a)

T. infestans



(Fig. 3b)

M. spinolai

Fuente: Acuña, M. (2002) TECNOVET.

1.2. Iniciativas tendientes a eliminar la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas

En 1991, los Ministros de Salud de los países afectados en América del Sur, es decir, Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Paraguay y Uruguay, lanzaron un gran proyecto multinacional que se conoce como la Iniciativa del Cono Sur para eliminar la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en sus respectivos países (Moncayo, 2003). Así, la tasa de infestación domiciliaria promedio para Chile, ha sido reducida en un 96%, de 29% en 1982 a 1.1% en 1997. La incidencia de infecciones en el grupo de edad de menores de quince años ha caído de 15,4%

en 1990 a 0,9% en 1997, es decir, se ha observado una disminución de un 81% (Moncayo, 1999).

De acuerdo a los antecedentes serológicos y a los índices entomológicos detectados en la zona de endemia chagásica, la Comisión Internacional de Certificación de la Interrupción de la Transmisión Vectorial de la enfermedad de Chagas, informó al Ministerio de Salud Chileno y a INCOSUR, que en Chile el mecanismo de transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas estaría interrumpido, haciéndose indispensable continuar con las medidas de vigilancia para mantener este logro de la Salud Pública chilena, hecho alcanzado fundamentalmente con el trabajo de los Programas sobre el Ambiente del Ministerio de Salud (Lorca *et al.*, 2001).

Los datos epidemiológicos y entomológicos sobre desinfestación de habitaciones rurales, infección por *T. cruzi* en grupos etáreos jóvenes y cobertura de tamizaje en bancos de sangre de que disponen los Ministerios de Salud de estos países, indican que la interrupción de la transmisión de la Enfermedad de Chagas se ha logrado en Uruguay (1997) y Chile (1999) y se alcanzará en Brasil (2000), Argentina (2003), Paraguay y Bolivia (2005) (Moncayo, 2000).

Actualmente en Chile existe vigilancia pasiva de la enfermedad de Chagas y se asume que hay una sub-notificación. 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 para el año 1994 a 5,21 para el año 2000, posteriormente se evidencia un descenso sostenido (Apt *et al.*, 2006).

1.3. Importancia epidemiológica de triatomíneos silvestres en la enfermedad de Chagas

Los triatomíneos extradomésticos representan un riesgo epidemiológico debido a la capacidad potencial que tienen para reemplazar a los vectores

domiciliarios ocupando el nicho ecológico dejado por éstos después de su eliminación (Wisnivesky- Colli *et al.*, 1993). Acuña (2002), señala que son tres los factores principales que influyen en el proceso de domesticación: el primer factor corresponde a la invasión del hombre a ambientes colonizados por triatominos, 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.

a. Invasión antrópica:

La actividad agropecuaria es sin duda la mayor intromisión del hombre en el hábitat natural de los vectores silvestres. El manejo extensivo de los cultivos agrícolas, la deforestación y el pastoreo, producen múltiples cambios topográficos y el desplazamiento de animales silvestres, lo que implica entre otras consecuencias, el aumento de la concentración de triatominos silvestres y probablemente, de sus hospederos, (generalmente mamíferos sinantrópicos) en parches cercanos al peridomicilio (Ramsey y Schofield, 2003).

Ante eventos ecológicos que pueden provocar la mortalidad de los hospederos vertebrados, dando paso a un pobre estado nutricional de los insectos triatomíneos, los adultos tienden a migrar hacia nuevos hábitats, tales como domicilios, en los cuales establecerse (Schofield *et al.*, 1999). Sherlock (1999) señala que cuando los animales salvajes son forzados a dirigirse a otras áreas, los triatomíneos buscan otra fuente de sangre alternativa. Luego, este nuevo ecosistema artificial que comprende el sector peri e intradomiciliario, se transforma en un ecotopo en el cual es fácil obtener abundante sangre como alimento.

Estas situaciones podrían fomentar ciclos de transmisión restringidos a áreas perimetrales de las viviendas rurales, lo que le permitiría a la vinchuca entrar en contacto con el ciclo doméstico y facilitar la circulación de *T. cruzi* entre ambos ciclos (Acuña, 2002).

Considerando estos antecedentes, 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, lo cual, puede suceder si los hábitats de esta especie son utilizados en la construcción de áreas urbanas, como sucede actualmente en el sector de Colina, Región Metropolitana.

b. Eliminación de vectores domésticos:

En la medida que se erradica el vector doméstico, cobran cada día más importancia los estudios en los vectores silvestres, sobre todo en áreas donde se establece el contacto con el hombre, como las zonas periurbanas de Santiago (Canals *et al.*, 2000). Cuando ello ocurre, queda un hábitat disponible para las especies silvestres. Así lo indican Botto-Mahan *et al.*, (2005 a) quienes señalan que el control reciente de *T. infestans*, vector domiciliario en Chile, hace emerger con fuerza la posibilidad que *M. spinolai* pueda invadir viviendas rurales ubicadas en sectores de riesgo. La mayoría de los estudios que validan esta hipótesis se han realizado en otros países. En Brasil, el vector silvestre *T. sordida*, es muy abundante en el sector peridomiciliar debido a la gran intervención humana del ambiente natural. Esta vinchuca se encuentra ocasionalmente dentro de las casas, pero sólo donde ha sido eliminado el vector doméstico (Noireau *et al.*, 1998).

c. Adaptación a un hospedero doméstico:

La identificación de los hospederos de insectos hematófagos permite aproximarse al conocimiento de su comportamiento respecto al hombre y a su hábitat (Farfan *et al.*, 2007). Para cada especie de triatmino existe una fuente de alimentación óptima que asegura una frecuencia de alimentación también óptima y por esto, la oferta alimentaria no limita las variables vitales. Por otra parte, puede haber también, una fuente de alimentación no óptima, con la cual los parámetros vitales comienzan a ser afectados (Cabello *et al.*, 1988).

El ciclo vital de los insectos triatomíneos está relacionado con la cantidad de sangre ingerida y con la fuente de alimentación y sus características, lo que influye en forma diversa en el rendimiento reproductivo y por tanto en su dinámica poblacional (Cabello *et al.*, 1987). Así, hospederos que presenten un menor hematocrito implican una menor viscosidad de la sangre, lo que determina una disminución en el tiempo necesario para alimentarse. Este hecho podría explicar parcialmente una eventual preferencia de *M. spinolai* por el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), ya que, entre otras variables, el tamaño de sus glóbulos rojos y su hematocrito son menores que los de algunos roedores como *O. degus* (Acuña, 2001).

Según un estudio realizado por Acuña, (2001) al alimentar ejemplares de *M. spinolai* exclusiva y constantemente con sangre de conejo (Figura 4), se obtiene un mayor número de vinchucas vivas durante un período, lo que implica una mayor sobrevivencia poblacional al compararlo con ejemplares alimentados con otros mamíferos de los cuales *M. spinolai* hace presa frecuentemente, como por ejemplo el roedor *O. degus* (Figura 5) y el marsupial *Thylamys elegans* (yaca). Por otra parte, tanto el peso promedio de los insectos, como la fecundidad, se favorecen al alimentar las vinchucas con sangre de conejo. Lo anterior indica que ecológicamente, el conejo sería una presa energéticamente más conveniente para *M. spinolai*.



Figura 4. *O. cuniculus*, hospedero de *M. spinolai*

Fuente: Acuña, M. (2002) TECNOVET.



Figura 5. *O. degus*, hospedero de *M. spinolai*

Fuente: Acuña, M. 2002. TECNOVET.

La necesidad de implementar estrategias de control y vigilancia efectivos en especies que ocupan hábitats intradomiciliarios y de especies que incursionan a éstos desde ecotopos silvestres próximos, obliga a conocer aspectos de su biología y eco-epidemiología (Farfán *et al.*, 2007). Así, la identificación en vectores, tanto de las fuentes alimenticias como de las variantes de *T. cruzi*, constituyen valiosas herramientas epidemiológicas para establecer los ciclos de transmisión de diferentes poblaciones de parásitos entre vectores y mamíferos (Bosseno *et al.*, 2006).

2. *Mepraia spinolai*

Mepraia spinolai es una especie endémica de Chile y se ha encontrado a lo largo de toda el área endemoenzoótica de la enfermedad, desde el borde marítimo hasta los 3.000 m. de altitud (Galvao *et al.*, 1998). Es una especie que presenta un acentuado polimorfismo, con hembras sin alas (ápteras) y machos ápteros o alados (Schofield *et al.*, 1998). *M. spinolai* es una especie silvestre de triatomineo, que prefiere los microhábitats cercanos a las zonas pedregosas, aunque también pueden mantener poblaciones de similar o mayor tamaño cerca de los lugares habitados (Cattan *et al.*, 2002). Su hábitat lo constituyen zonas pedregosas de los cerros, grietas de rocas, canteras, pircas, guaneras, nidos de aves y cuevas de diversos animales, de ahí la denominación de vinchuca silvestre (Acuña, 2002;

Canals *et al.*, 1998) (Figura 6). Ocasionalmente se ha encontrado en corrales y pircas y en viviendas humanas o en sus vecindades inmediatas, ya sea sola o coexistiendo con *T. infestans* (Frias y Atria,1998; Schofield *et al.*, 1998).

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.). Esta especie puede llegar a tener un índice de infección por *T. cruzi* elevado (Ordenes *et al.*, 1996).

Desde el punto de vista epidemiológico, esta especie actúa como vector del ciclo silvestre de la enfermedad de Chagas en nuestro país (Canals *et al.*, 1998). Siendo históricamente considerada como de bajo riesgo para la salud humana (Oliveira *et al.*, 1997), lo cual podría en parte explicarse por un estudio realizado por Canals *et al.*, (1999) quienes reportan que esta especie, si bien, tiene un comportamiento agresivo, sería poco eficiente al transmitir *T. cruzi*, dado que este insecto no acostumbra a defecar sobre el hospedero.



Figura 6. Hábitat de *M. spinolai*.

Fuente: Acuña, M. 2002. TECNOVET.

Con 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 a). 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 la entrada de vertebrados silvestres al ambiente doméstico (donde podrían ser infectados por *T. infestans*) (Acuña, 2002).

2.1.Importancia epidemiológica de *M. spinolai* en la transmisión de la enfermedad de Chagas

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).

Molina *et al.*, (2004) informan que la participación humana en la dieta de esta especie puede llegar al 5,4 %, dato que corresponde a un estudio realizado en el sector de Colina.

Si bien, se han descrito bajos niveles de infección por *T. Cruzi* en la especie *M. spinolai* (Schenone *et al.*, 1980, Ordenes *et al.*, 1996), en un estudio reciente, realizado por Botto-Mahan *et al.*, (2005 b) encontraron que *M. spinolai* posee un importante rol potencial en la transmisión de *T. cruzi* en áreas silvestres, ya que esta especie posee un elevado nivel de infección (46,2%). Este valor, es mucho mayor al detectado en estudios anteriores, debido a que este estudio se realizó a través de análisis molecular, método mucho más sensible que el de observación microscópica, utilizado por otros investigadores.

Si bien, los roedores constituyen una pequeña proporción de la dieta de *M. spinolai*, (Canals *et al.*, 2001), Rozas *et al.*, (2005), reportaron que el nivel de infección por *T. cruzi* en roedores fue de un 51% para *O. degus* y de 59% para *Abrotrix olivaceus*, por lo cual, estas especies juegan un rol importante como reservorios de la enfermedad de Chagas.

Un último antecedente que fortalece el estudio de *M. spinolai* en los programas de control de la enfermedad de Chagas, se relaciona con las características bioquímicas de *T. cruzi* encontradas en el triatomino silvestre (Acuña, 2002). Apt *et al.*, (1988) describen que en Chile existen básicamente tres perfiles enzimáticos para este parásito: Z1, Z2a y Z2b. Los enfermos de Chagas en nuestro país generalmente presentan infección por *T. cruzi* de cepa Z2a (similar a los zimodemas de Brasil) y Z2b (símil a los zimodemas bolivianos). *T. cruzi* zimodema Z1 se encuentra en *M. spinolai*, sin embargo, es raro encontrarlo en nuestros pacientes. La identificación de la cepa Z1 indica que el hombre puede ser infectado por esta cepa silvestre transmitida por *M. spinolai* y dicha infección puede producir cardiopatías importantes. Respecto a este tema, Campos *et al.*, (2007) observaron que *M. spinolai* posee una mayor capacidad para hospedar y reproducir las diversas cepas de *T. cruzi*, si se compara con *T. infestans*. Este importante aspecto epidemiológico se encuentra atenuado, ya que la infección por *T. cruzi* disminuye el tiempo de defecación en los triatomíneos que lo poseen.

3. Antecedentes sobre algunos factores involucrados en la picada de insectos hematófagos (HEMIPTERA :REDUVIDAE)

Coelho *et al.*, 2006, estudiaron el patrón de emisión de saliva en una especie de triatomíneo, encontrando que la saliva es eyectada inmediatamente luego de la picadura que es realizada por este insecto. En la fase inicial, la saliva es eyectada continuamente en la piel del hospedero, incluyendo la zona cercana a los vasos sanguíneos. Durante la fase de alimentación, la saliva es eyectada en forma de bolo dentro de los vasos sanguíneos y una parte de ésta es succionada

por el insecto, junto con la sangre. La frecuencia de la emisión de saliva dentro de los vasos es baja y continua, sin embargo, el insecto succiona la mayor parte de ésta. A través de éste mecanismo, la pequeña cantidad de saliva que es finalmente depositada en la microcirculación del hospedero, minimiza la respuesta inmune a los antígenos salivales.

3.1. Componentes básicos de la saliva de los triatomíneos

Los insectos hematófagos, vectores de patógenos, que afectan tanto humanos como animales, tienen un amplio repertorio de agentes salivales (Faudry *et al.*, 2004), entre los cuales se cuentan sustancias que interfieren en la hemostasis del hospedero, en eventos tales como coagulación, vasoconstricción y agregación plaquetaria (Sant Anna *et al.*, 2002). Amino *et al.*, (2002) describieron actividad citolítica en la saliva de *T. infestans*, asociada a la trialisina, una proteína formadora de poros, la cual, puede destruir microorganismos actuando como un péptido lítico, y también es capaz de permeabilizar las células de los hospederos mamíferos actuando como una toxina bacteriana. Otros autores tales como Cavalcante *et al.*, (2003) encontraron que la saliva de los triatomíneos *Panstrongylus megistus*, *T. brasiliensis* y *R. prolixus* presentan actividad anticomplemento en su saliva.

Champagne *et al.*, (2004) señalan que algunas de las proteínas y péptidos inyectados al hospedero a través de la saliva de insectos hematófagos, son inmunogénicos y pueden suscitar una respuesta inmunológica de memoria de parte de éste. Al respecto, Paddock *et al.*, (2001) señalan que los insectos pertenecientes a la subfamilia triatominae inyectan proteínas de la saliva durante la picadura, lo que puede ocasionar una variedad de respuestas alérgicas, siendo una de ellas fatal, severa y ocasional en individuos sensibles. La reacción sistémica incluye prurito generalizado, desórdenes gastrointestinales, fiebre, disnea, síncope, hipotensión, edema laríngeo y de la glotis, y convulsiones.

En general, la picada de vinchuca 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). Pereira y Diotaiuti, (2002) señalan que existen diferencias entre especies, existiendo algunos triatomíneos más irritantes que otros, lo cual afecta su capacidad para alimentarse; este aspecto tiene relación directa con las tasas de mortalidad de dichos insectos.

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

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 (Feingold *et al.*, 1968). Los vertebrados al estar expuestos a antígenos externos en un contexto inflamatorio, permiten a su sistema inmune reconocer estas moléculas y reaccionar de manera adecuada (Ribeiro y Francischetti, 2003). Las proteínas en la saliva de estos insectos son reconocidas por el sistema inmune del hospedero (Nascimento *et al.*, 2001). Paddock *et al.*, (2001) reportaron la purificación e identificación del mayor alérgeno salival de los insectos reduvídeos, la procalina. Esta proteína de 20 KDa pertenece a la familia de las lipocalinas, la cual incluye alérgenos salivales de otros invertebrados y mamíferos. Por inmunolocalización, la fuente del antígeno salival resultó ser el epitelio de la glándula salival de *T. protracta*. A través de inmunotinción se localizó dicha proteína en el epitelio cuboidal simple del citoplasma de las glándulas salivales principales y accesorias y en el contenido luminal de la glándula. Esta tinción positiva se encontró confinada a los tejidos de la glándula salival, a sus secreciones y no fue identificada en otros tejidos del insecto.

Las picaduras repetidas de insectos hematófagos estimulan la respuesta inmune contra antígenos salivales en hospederos vertebrados, la cual es principalmente mediada por reacciones de tipo retardado, del tipo CD4+ Th1, sin

embargo, también existe producción de anticuerpos (Volf y Rohousova, 2001). Respecto a este último punto, se ha visto que la respuesta inmune ante picaduras de insectos se ha asociado con producción de IgE mediada por hipersensibilidad inmediata. Mientras que los niveles de IgG sérico pueden servir como un indicador de intensidad de exposición a picaduras de los insectos (Nascimento *et al.*, 2001).

La respuesta inmune a la picada de mosquitos fue descrita por Mellanby (citado por Ribeiro y Francischetti, 2003), como una serie de eventos, que en el tiempo se pueden presentar como ausencia de reacción, hipersensibilidad de tipo retardada o bien hipersensibilidad de tipo inmediata, pudiendo llegar incluso a la desensibilización del individuo.

En realidad, estos estados de la respuesta inmune no pueden ser distinguidos en una vía clara. Es común que se produzcan ambos, una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada y una respuesta inmediata, y tener una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada y anticuerpos específicos IgG de manera simultánea. Aún en la presencia de una respuesta madura, puede ocurrir una respuesta inmediata menos intensa, pero perceptible debida a IgG4 (en humanos) o IgG1 (en conejillos de india) las cuales se unen a mastocitos (Ribeiro y Francischetti, 2003).

Barbosa *et al.*, (2004) encontraron que la exposición repetida de conejos a la picada del insecto *P. megistus* (Hemiptera: Reduviidae), determinó una baja producción de anticuerpos específicos contra la saliva de dicho insecto, estos niveles se fueron elevando en el tiempo, para mantenerse estables a partir del día 36 desde la primera sensibilización.

Barriga¹ observó que al someter a dos conejos a picaduras sucesivas de *T. infestans*, ambos individuos respondieron claramente a la picadura de estos

¹ Barriga, O. 2005. [Correspondencia personal: Respuesta productiva de anticuerpos circulatorios y cutáneos en conejos luego de una exposición repetida a mordeduras de *Triatoma infestans*.] Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago. Chile.

insectos produciendo anticuerpos circulatorios específicos, detectándose una producción significativa de anticuerpos IgG a partir del día 45.

Es, en base a los antecedentes anteriormente expuestos, que nos planteamos determinar la presencia de respuesta inmune humoral en roedores pertenecientes a la especie *O. degus* que han sido picados por *M. spinolai*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la respuesta inmune humoral del roedor *O. degus*, a la picada reiterada de *M. spinolai*.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Determinar la aparición de anticuerpos isotipo IgG anti-extracto torácico en el suero de *O. degus* sometidos a picadas repetidas por vinchucas silvestres, y en ejemplares previamente inoculados con extracto torácico que incluye glándulas salivales de estos insectos.

MATERIALES Y MÉTODO

Animales:

Se utilizaron seis ejemplares adultos de *O. degus*, que no fueron expuestos anteriormente al contacto con hemípteros.

Los degus utilizados en este estudio fueron ejemplares adultos nacidos en cautiverio, mantenidos durante este periodo, en el laboratorio dependiente del Departamento de Ciencias Biológicas Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile; las vinchucas fueron criadas en el mismo laboratorio. Estas últimas, se mantuvieron en recipientes de plástico dentro de una cámara a una temperatura constante de 27°C y con una humedad relativa de 70 a 75%.

A todos los ejemplares, previo a la picadura de *M. spinolai*, se les realizó una sangría preinmune que se utilizó como control. La sangre se extrajo por punción intracardiaca con una aguja 23G, obteniéndose hasta 1,5 ml por ejemplar; para esto, los roedores se anestesiaron con 2 a 3 ml de isoflurano, según respuesta de cada individuo, dicha anestesia fue aplicada en una cámara cerrada.

Grupos:

Se formaron dos grupos de *O. degus*, de tres ejemplares cada uno, que fueron sometidos a la picadura de ninfas de quinto estado y adultos de *M. spinolai*, para posteriormente medir la respuesta inmune que se generó. A uno de los grupos se le sensibilizó previamente con extracto de la región torácica dorsal de *M. spinolai*, la cual, según Lacombe (1999) contiene las glándulas salivales principales y suplementarias de estos insectos. No se consideró la extracción de glándulas salivales accesorias, puesto que, según fue descrito por Reis *et al.*,

(2003) estas sólo aportan agua a la secreción salival, sin entregar ningún componente inmunogénico.

Los ejemplares adultos de *M. spinolai*, utilizados tanto para obtener el extracto torácico, como para realizar las sesiones de picadura, fueron sólo hembras.

Los animales fueron expuestos a cinco vinchucas cada vez, por un periodo de veinte minutos aproximadamente, la elección de los integrantes de cada grupo se realizó al azar. Los animales fueron expuestos a picadura una vez a la semana, durante tres semanas.

Los grupos se organizaron de la manera siguiente:

Grupo A: Tres animales fueron picados durante 20 minutos diarios, con un intervalo de siete días entre cada sesión de picadura. Se realizó un total de tres sesiones.

Grupo B: Igual que grupo A, pero previamente inoculados con extracto torácico de *M. spinolai* al inicio del experimento. La inyección del inóculo se efectuó una semana antes de la primera picada de dichos insectos, para esto los animales se anestesiaron de la manera anteriormente descrita.

Extracto torácico con glándulas salivales de *M. spinolai*:

Se utilizó extracto torácico con glándulas salivales, tanto para inocular a los animales del grupo B, como también para sensibilizar las placas de PVC que se usaron para efectuar los test ELISA.

Para la obtención de las glándulas salivales, contenidas en tórax, se utilizaron 7 ejemplares de hembras adultas de *M. spinolai*. Estas fueron

inmovilizadas con éter, y con la ayuda de una lupa, bisturí y una aguja pequeña, se procedió a abrir el tórax por dorsal, para luego extraer las glándulas salivales, que al sacarlas arrastran consigo otros restos de material torácico. El extracto que contenía las glándulas salivales de *M. spinolai*, fue conservado a una temperatura de -80°C , para posteriormente ser procesado de la siguiente manera: fue suspendido en PBS (buffer fosfato salino) 1X y se le agregó un inhibidor de proteasa (Cabiochem, N°539137) para evitar la degradación de las proteínas presentes en el extracto. Posteriormente, fue homogeneizado (vortex) y sonificado con 7 pulsos de 15 a 30 segundos. Finalmente, el extracto fue centrifugado a 4°C , por 10 minutos, con un RCF (relative centrifugal force) de 9335.3g. La concentración proteica del sobrenadante se determinó a través del método desarrollado por Bradford (1976). El resultado obtenido fue de 5,6 mg de proteína por ml. Una vez terminado este proceso, el extracto torácico se mantuvo a una temperatura de -20°C .

Cada *O. degus* del grupo B se inoculó con 0,2 ml de extracto torácico, conteniendo éste, 100 μg de proteína total; este preparado se administró vía subcutánea, en la región torácica dorsal de cada animal, en dos punciones de 0,1 ml cada una. Este inóculo se preparó mezclando coadyuvante completo de Freund con extracto torácico diluido en PBS 1X, en partes iguales.

Mediciones:

A cada grupo se le realizó una sangría preinmune una semana antes de la primera picadura de *M. spinolai*, para el grupo A y una semana antes de la inoculación con extracto torácico, para el grupo B.

Grupo A: 45 días después de la primera sesión de picadura, se realizó una sangría para medir IgG.

Grupo B: se inoculó y 7 días después se efectuó la primera picadura; al igual que el grupo A, 45 días después de la primera sesión de picadura, se realizó una sangría para medir IgG.

Para realizar la picadura con los insectos, los roedores se inmovilizaron en una caja de bordes rígidos y techo de género de malla que permitió el paso del estilete para la succión de sangre.

Los roedores no presentan facilidad para extraer sangre y por tanto se hace por punción intracardiaca. Esto implica que sólo se pueden practicar dos sangrías: la preinmune y la postinmune.

Resumen del procedimiento:

Grupo A:

Día 0:	Sangría preinmune
Día 7:	Picadura 1
Día 14:	Picadura 2
Día 21:	Picadura 3
Día 52:	Sangría inmune

Grupo B:

Día 0:	Sangría preinmune
Día 7:	Inoculación con extracto torácico (con glándulas salivales)
Día 14:	Picadura 1
Día 21:	Picadura 2
Día 28:	Picadura 3
Día 59:	Sangría inmune

La sangre se procesó por procedimientos estándares:

Para obtener una adecuada retracción del coágulo, la sangre obtenida se mantuvo bajo las siguientes temperaturas por periodos consecutivos de 30 minutos cada uno: a 27° C, luego a 37° C y finalmente a 4° C. Posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a una velocidad de 3000 rpm, por 15 min, con un RCF de 503,1g, el sobrenadante obtenido se centrifugó una vez más utilizando el mismo protocolo y el suero obtenido se dividió en alícuotas y almacenó a temperatura de -20°C.

A las muestras de sangre obtenidas se les realizó test de ELISA para determinar respuesta inmune humoral y título de anticuerpos de tipo IgG.

Ensayos inmunométricos:

Se realizaron ensayos serológicos, mediante test ELISA, para detectar la presencia de anticuerpos en cada suero postinmune obtenido. A las muestras que presentaron respuesta inmune IgG, se les realizó un posterior test ELISA utilizando diluciones seriadas para determinar el título de anticuerpos, el cual se definió como la densidad óptica a la dilución más elevada que tuvo anticuerpos presentes.

El procedimiento a seguir fue el siguiente: se detectaron anticuerpos séricos en placas de PVC, de 96 pocillos, fondo plano, marca NUNC; cada pocillo se sensibilizó con 0,25 µg de proteína obtenida de extracto torácico de *M. spinolai* en 50 µl de buffer carbonato 0,1 M, pH 9,0 por 24 horas a 4°C. y luego se lavó cuatro veces con PBS Tween 1X, este último procedimiento se efectuó previo a cada llenado de placa con los diversos reactivos.

En todos los procedimientos posteriores a la sensibilización, la incubación fue a 37°C, mientras que todas las diluciones se realizaron con soya 0,5% en PBS Tween 0,05%.

Se bloqueó cada placa con 100 µl de soya 0,5% en PBS Tween 0,05 %, por dos horas. Se lavó, se aplicó suero de *O. degus*: preinmune e inmune en una dilución inicial de 1/1000, aplicando 50 µl por pocillo incubado por un periodo de 1,5 horas; se lavó y se aplicó 50 µl de suero de conejo con anticuerpos contra degus (obtenido de conejos provenientes del Instituto de Salud Pública, según el método utilizado por Molina *et al.*, 2004²) en dilución 1/10000, se incubó la placa por un periodo de 1,5 horas. Luego se lavó la placa y se agregaron inmunoglobulinas policlonales de cabra contra conejo, peroxidasa (laboratorio Dakocytomation, Dinamarca), en dilución 1/1500, por un periodo de incubación de 1 hora.

Luego de esto, se aplicó ABTS (2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), diluido 1/1000 en peróxido de hidrógeno al 30% en agua deionizada, se agregaron 50 µl por pocillo y se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro marca JENWAY modelo GENOVA MK2.

Todos los análisis se realizaron en triplicado.

Se realizó un control negativo (C-), 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

² El método utilizado para obtener este suero y determinar la concentración a utilizar, se detalla en apéndice, pag. 51.

carbonato 0.1M, pH 9.0), ambos controles fueron revelados con suero de cabra anti IgG de conejo unida a peroxidasa.

Análisis Estadístico:

Se utilizó prueba de Mann-Whitney para determinar diferencias estadísticas entre el suero preinmune e inmune obtenido de cada *O. degus*.

RESULTADOS

Al analizar los sueros inmunes y preinmunes, se observó que sólo las muestras provenientes del grupo B (animales 1, 2 y 3) presentaron respuesta inmune humoral significativa ($p \leq 0,05$) (figura 7), en cambio, los animales que sólo fueron picados (grupo A: animales 4, 5 y 6), no presentaron diferencias significativas respecto al suero preinmune ($p \leq 0,05$) (figura 8). En el cuadro 1 se presenta un resumen de esta información.

Cuadro 1: Promedios y desviaciones estándar para valores de densidad óptica obtenidos al realizar test ELISA a sueros inmunes y preinmunes

GRUPOS	Animales	Preinmune	Inmune
A	4	0,113 \pm 0,015	0,093 \pm 0,008
	5	0,136 \pm 0,021	0,139 \pm 0,009
	6	0,134 \pm 0,035	0,142 \pm 0,013
B (inoculados)	1	0,127 \pm 0,031	0,296 \pm 0,032
	2	0,152 \pm 0,018	0,373 \pm 0,016
	3	0,120 \pm 0,005	0,217 \pm 0,012

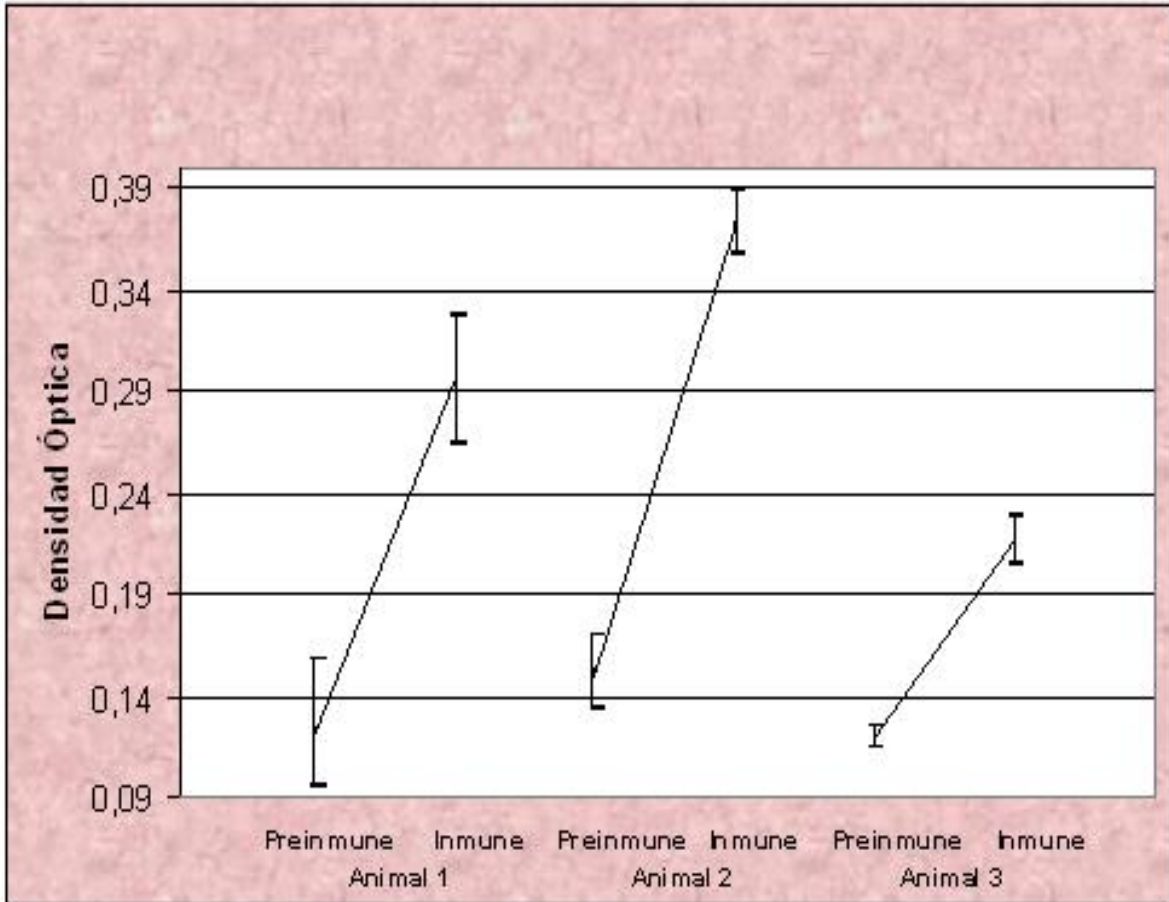


Figura 7. Promedios y desviación estándar para densidad óptica al efectuar test ELISA para sueros inmunes y preinmunes. Animales 1, 2 y 3.

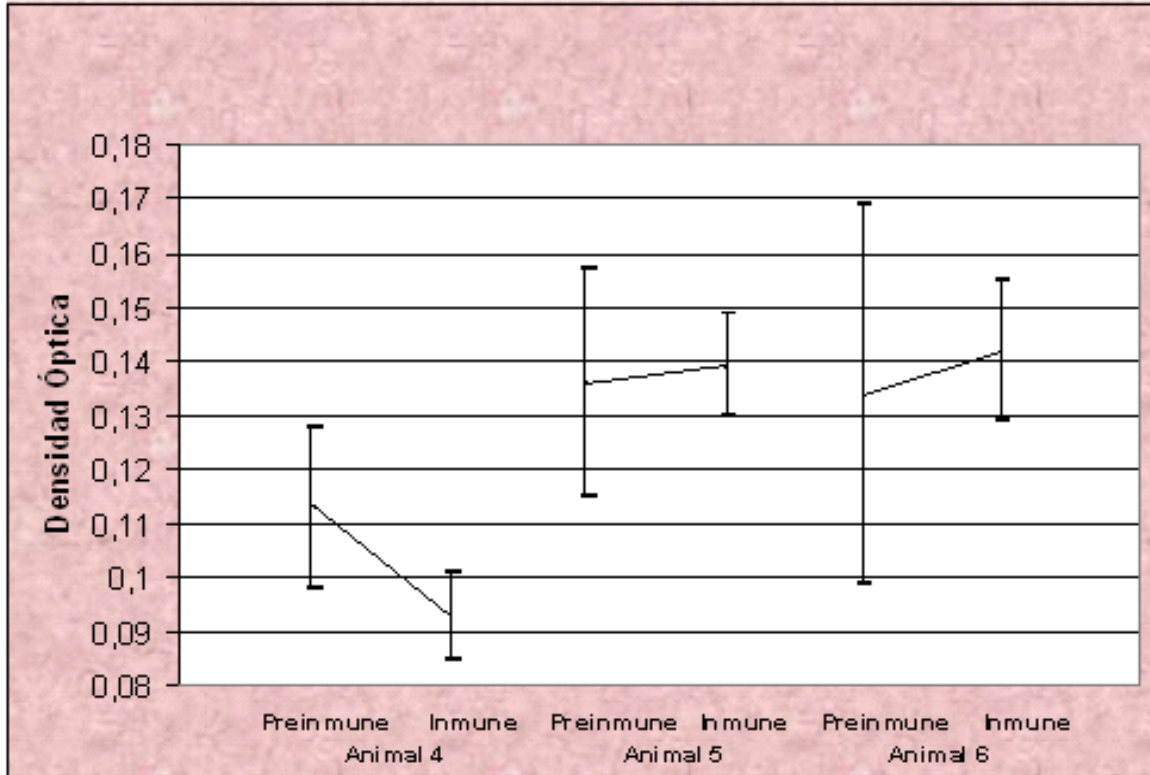


Figura 8. Promedios y desviación estándar para densidad óptica al efectuar test ELISA para sueros inmunes y preinmunes. Animales 1, 2 y 3.

Al realizar éste análisis, se verificó que el preparado comercial de inmunoglobulinas de cabra anti conejo, reaccionó uniéndose al extracto torácico.

A los animales 1, 2 y 3 se les realizó un test ELISA en el cual se utilizaron diluciones seriadas de los sueros preimmune e inmune, para obtener el título de anticuerpos.

Los valores obtenidos, para densidad óptica, fueron bajos y bastante variables entre un animal y otro, obteniéndose valores de título de anticuerpos entre 1/2.000 y 1/16.000.

Animal 1:

Este animal presentó el nivel más bajo de anticuerpos: el título detectado fue de 1/2.000. (Fig. 7a).

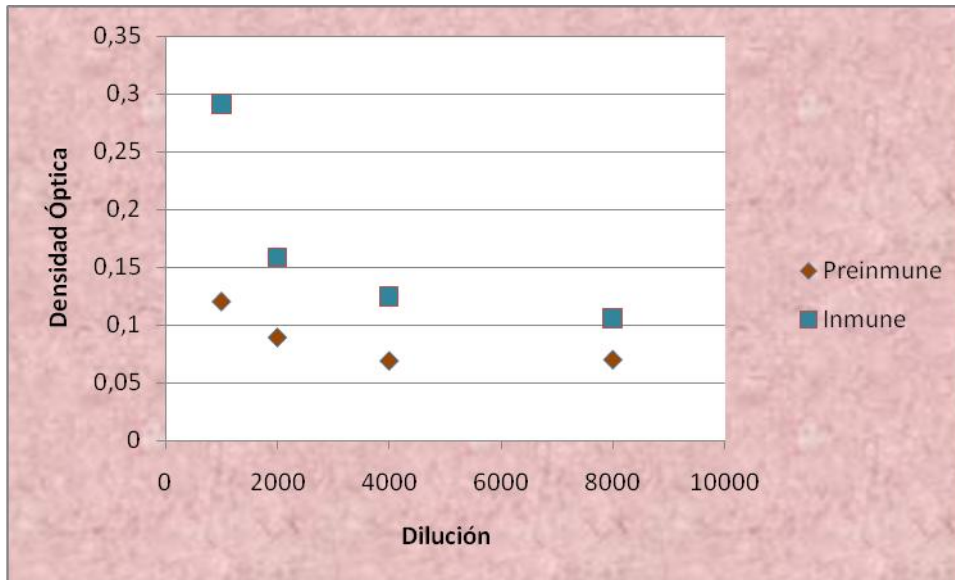


Figura 7a. Densidad óptica obtenida al someter a test ELISA diluciones seriadas de los sueros, tanto preinmune como inmune. Animal 1

Animal 2:

El suero inmune proveniente de este animal presentó el título mayor de anticuerpos, obteniéndose un valor de 1/16.000 (Fig. 7b).

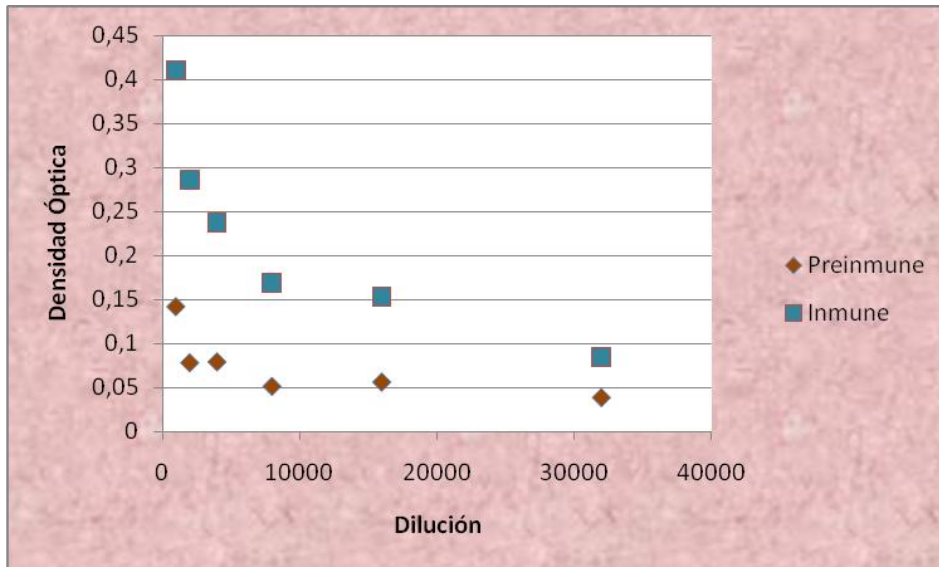


Figura 7b. Densidad óptica obtenida al someter a test ELISA diluciones seriadas de los sueros, tanto preinmune como inmune. Animal 2.

Animal 3:

Para este animal se detectó un título de anticuerpos bajo, el cual, tiene por valor 1/4.000 (Fig. 7c).

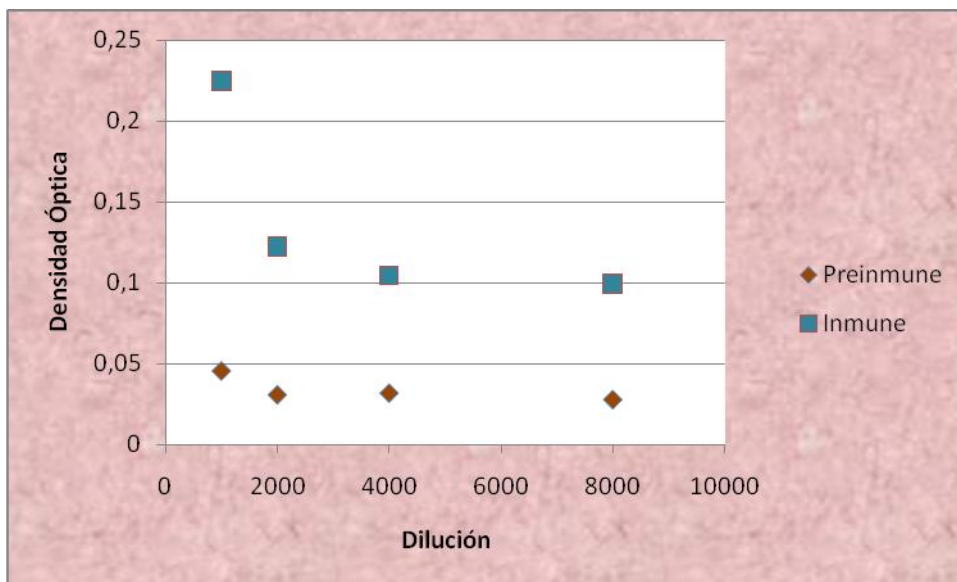


Figura 7c. Densidad óptica obtenida al someter a test ELISA diluciones seriadas de los sueros, tanto preinmune como inmune. Animal 3.

DISCUSIÓN

Ribeiro y Francischetti, (2003) caracterizan la compleja composición de la saliva de artrópodos hematófagos, la cual les permite obtener el éxito en la alimentación a pesar de todas las complejas barreras impuestas por los hospederos. Como regla, la saliva de estos animales contiene al menos tres componentes siempre presentes: una sustancia vasodilatadora, una inhibidora de la agregación plaquetaria y un compuesto anticoagulante. En muchos casos, existe más de una molécula en cada categoría, y en otros, existen compuestos tales como adenosina y óxido nítrico, que tienen de manera simultánea dos funciones: vasodilatación y anti agregante plaquetario.

También se han detectado numerosas sustancias que inhiben la presentación de dolor. Se han descrito sustancias tanto anestésicas, como analgésicas. En el caso de *T. infestans*, Dan *et al.*, (1999) reportan la existencia de una molécula no identificada, que inhibe la actividad de canales de sodio a nivel nervioso.

Animales que se mantienen adheridos a sus hospederos durante periodos prolongados de alimentación, poseen potentes compuestos de tipo antiinflamatorios e inmunomoduladores, tal como sucede con el género *Ixodes*. Estas sustancias poseen diversas actividades: anticomplemento, anti-IL-2, inhibidores de proteasas, antineutrófilos, y otras moléculas inmunomoduladoras con mecanismos de acción poco claros.

Varios de los componentes anteriormente mencionados son capaces de inducir respuestas inmunes cuando son inoculados en el hospedero (Bautista, 1987). Esta información es validada por Marshall, (1982) quien realizó pruebas intradérmicas y de radioinmunoensayo, usando extractos de glándulas salivales de *T. protracta*, encontrando anticuerpos IgE anti triatoma en humanos sensibilizados a sus picaduras. Esta respuesta, posee una secuencia de reactividad que ha sido descrita por Feingold *et al.*, (1968):

1. Para que ocurra reacción, es necesario que exista un historial de picaduras previas, indicando la necesidad de una dosis de sensibilización.
2. El periodo latente, no reactivo, que precede a la manifestación de la lesión inicial sugiere que existe un periodo de desarrollo de hipersensibilidad.
3. El tipo de reacción, ya sea inmediata, retardada, o ambas, depende tanto del tiempo transcurrido desde la primera exposición, como también del número de picaduras.
4. La falta de reacción, luego de una exposición repetida, sugiere desensibilización del individuo.

En el ensayo realizado, se observó que los animales que solamente recibieron tratamiento de picada, sin inyección de inóculo, no evidenciaron anticuerpos contra la saliva de *M. spinolai* en el test ELISA. Sin embargo los animales que fueron picados e inoculados mostraron una respuesta inmune humoral isotipo IgG ante la saliva de *M. spinolai* en dicho test. Estos datos se ven corroborados por antecedentes obtenidos en un ensayo semejante, realizado en conejo, por Andrade³, (2008). De acuerdo a Ferreira,⁴ (2008) 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.

³ Andrade, L. 2008 [Correspondencia personal: “RESPUESTA INMUNE DEL CONEJO EUROPEO (*Oryctolagus cuniculus*) A LA PICADURA DE *Mepraia spinolai*, VECTOR SILVESTRE DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS”] Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Santiago. Chile.

⁴ Ferreira, A. 2008. [Correspondencia persona] Departamento de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago. Chile.

Al realizar este ensayo, se buscó repetir lo que sucede en la naturaleza, por tanto, se estimó que usar cinco vinchucas una vez por semana durante tres semanas, podría ser suficiente. Al no tener respuesta en el grupo A, podemos inferir, de acuerdo a lo expuesto anteriormente, que esta cantidad de picadas, no inyecta la dosis necesaria de saliva para que exista respuesta inmune, o bien, que la respuesta inmune que se presenta sea tan pequeña que no hayamos podido detectarla mediante el test ELISA. Respecto a esto último, se puede inferir que es probable que el protocolo utilizado en este grupo, sí 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 solo una fracción menor, por cuanto se dificultaría la probabilidad de unión de anticuerpos contra la saliva a proteínas de la saliva.

Al inyectar el extracto torácico, junto con coadyuvante de Freund's, los antígenos son inoculados de manera tal que se presentan como fase discontinua dentro de una fase continua. Para realizar la inoculación, nos basamos en el estudio realizado por Molina *et al.*, (2004) quienes reportan el uso de coadyuvante de Freund's, obteniendo respuesta inmune humoral isotipo IgG en los individuos inoculados. Esta información es consistente con el resultado obtenido en los animales del grupo B, quienes sí evidenciaron respuesta inmune, lo cual se puede explicar tanto por el hecho que a estos animales se les inyectó una dosis previa de extracto torácico con contenido de glándula salival, como también, por el hecho que esta aplicación se vio reforzada al ir en conjunto con el coadyuvante.

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, mediante la cual se generan anticuerpos IgG contra

las proteínas de la saliva de *M. spinolai*. Lo anterior, debido a las 3 sesiones de picada realizadas posteriores 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 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, que implicaría que los anticuerpos IgG encontrados en el grupo B podrían representar una respuesta contra el extracto torácico en su conjunto y no específicamente contra las proteínas de la saliva.

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 degus, 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 el grupo B.

Los resultados obtenidos mostraron, en todos los ensayos, valores elevados para densidad óptica, esto se debió a que las inmunoglobulinas de cabra anti conejo proporcionadas por laboratorios Dako presentaron respuesta cruzada contra el extracto torácico de *M. spinolai*. Según información aportada por Meeder⁵, (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

⁵ Meeder, K. 2008. [Correspondencia personal] Laboratorios Dako. USA.

roedores. 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, ya sea por que dichos individuos pueden encontrarse afectados por la enfermedad de Chagas, o bien, porque pueden haber sido inoculados recientemente con proteínas provenientes de otros artrópodos.

CONCLUSIONES

- En este estudio, los *O. degus* son capaces de generar una respuesta inmune frente a los antígenos contenidos en el extracto torácico de *M. spinolai* y eventualmente dicha respuesta podría incluir anticuerpos IgG contra las proteínas salivales de *M. spinolai*. Lo anterior, sólo podría demostrarse mediante un ensayo inmunológico que utilizara proteínas salivales purificadas de este insecto, como antígeno.
- Es probable que las proteínas de la saliva sean un componente menor del extracto torácico (debido a que incluye otros tipos de componentes) y ello explique que la respuesta inmune inducida por la picada no pueda ser puesta en evidencia en el ensayo de ELISA realizado, lo que sí podría ocurrir en un ensayo de ELISA con proteínas salivales purificadas.
- Si bien, el protocolo utilizado para determinar respuesta inmune humoral, resultó ser altamente sensible, no presenta una elevada especificidad, por tanto, en caso de realizar este estudio en terreno y según las características epidemiológicas de la zona dónde éste se efectúe, podrían los resultados obtenidos presentar algún grado importante de individuos falsos positivos, producto de reacción cruzada.

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), [en línea]
<http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9633%2526ISID%253D471,00.html>. [consulta: 26-06-2008].

AMINO, R.; MIYAZAWA, R.; PROCOPIO, J.; YOSHICO, I.; APARECIDA, M.; SCHENKMAN, S. 2002. Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. J. Biol. Chem. 277 (8): 6207 – 6213.

APT, W.; ARRIBADA, A.; AGUILERA, X.; SANDOVAL, J. 1988. Cardiopatía chagásica y zimodemos de *Trypanosoma cruzi* en Chile. Bol. Oficina Sanit. Panam. 104 (5): 450 – 461.

APT, W.; REYES, H. 1990. Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica. Parasitol. Día. 14: 23 – 40.

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. 48 p. [en línea]
<www.minsal.cl/ici/enfermedades_transmisibles/GUIACLINICACHAGAS.doc>. [consulta: 23-07-2008].

AUFDERHEIDE, A.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L. Jr.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. 2004. A 9,000-year record of Chagas' disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101 (7): 2034 – 2039.

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

BAUTISTA, C. 1987. Interacciones artrópodo – respuesta inmune del huésped. Ciencia Veterinaria. 4: 87 – 130. [en línea]. <<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol4/CVv4c4.pdf>>. [consulta: 11-10-2008].

BOSENSO, M.; SANTOS, L.; BAUNAURE, F.; MAGALLÓN E.; SOTO, M.; LOZANO, F.; DUMONTEIL, E.; FREDERIQUE, S. 2006. Identification in triatomine vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and a multiplex miniexon polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 74(2): 303-305.

BOTTO-MAHAN, C.; CATTAN, P.; CANALS, M.; ACUÑA, M. 2005 a. Seasonal variation in the home range and host availability of the blood-sucking insect *Mepraia spinolai* in wild environment. Acta Trop. 95 (2): 160-163.

BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ROZAS, M.; CATTAN, P.; SOLARI, A. 2005 b. DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in the Chilean wild vector *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 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. Anal Biochem. 72: 248-54.

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

CABELLO, D.; LIZANO, E.; VALDERRAMA, A. 1988. Efecto de la frecuencia alimentaria sobre algunos parámetros poblacionales de *Rhodnius neivai*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 83: 441-446.

CAMPOS, R.; ACUÑA, M.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.; SOLARI, A. 2007. Susceptibility of *Mepraia spinolai* and *Triatoma infestans* to different *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected rodent hosts. Acta Trop. 104: 25 – 29.

CANALS, M.; EHRENFELD, M.; SOLIS, R.; CRUZAT, L.; PINOCHET, A.; TAPIA, C.; CATTAN, P. 1998. Biología comparada de *Mepraia spinolai* en condiciones de laboratorio y terreno: cinco años de estudio. Parasitol. Día. 22 (3 -4): 72 – 78.

CANALS, M.; SOLIS, R.; TAPIA, C.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P. 1999. Comparison of Some Behavioral and Physiological Feeding Parameters of *Triatoma infestans* Klug, 1834 and *Mepraia spinolai* Porter, 1934, Vectors of Chagas Disease in Chile. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94 (5): 687 – 692.

CANALS, M.; HERENFELD, M.; CATTAN, P. 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. Rev. Med. Chile Vol.128 (10): 1108 – 1112.

CANALS, M.; CRUZAT, L.; MOLINA, M.; FERREIRA, A.; CATTAN, P. 2001. Blood host sources of *Mepraia spinolai* (Heteroptera: Reduviidae). J. Med. Entomol. 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 Latinoam.* 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. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97 (3): 285 – 287.

CAVALCANTE, R.; PEREIRA, M.; GONTIJO, N. 2003. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology* 127 (1): 87 – 93.

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*. *Physiol. Entomol.* 29: 269 – 277.

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. *J. Insect. Physiol.* [52 \(5\)](#): 468-472.

DAN, A.; PEREIRA, M.; PESQUERO, J.; DIOTAIUTI, L.; BEIRAO, P. 1999. Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: reduviidae) on sodium channels. *J. Med. Entomol.* 36: 875 – 879.

DIAS, J.; SILVEIRA, A.; SCHOFIELD, C. 2002. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America – A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97 (5): 603-612.

FARFÁN, A.; GUTIERREZ, R.; ANGULO, V. 2007. ELISA para la Identificación de los Patrones Alimentarios de Triatominae en Colombia. *Rev. Salud Pública.* 9 (4): 602 – 608.

FAUDRY, E.; ROCHA, P.; VERNET, T.; LOZZI, S.; TEIXEIRA, A. 2004. Kinetics of expression of the salivary apyrases in *Triatoma infestans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34 (10): 1051 – 1058.

FEINGOLD, B.; BENJAMÍN, E.; MICHAELI, D. 1968. The allergic responses to insect bites. *Annu. Rev. Entomol.* 13: 137-158.

FRIAS, D.; ATRIA, J. 1998. Chromosomal variation, macroevolution and possible parapatric speciation in *Mepraia spinolai* (Porter) (Hemiptera: Reduviidae). *Gen. Mol. Biol.* 21 (2): 179 – 184.

FRIAS, D.; HEMRY, A.; GONZALEZ, C. 1998. *Mepraia gajardo*: una nueva especie de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) de Chile y su comparación con *Mepraia spinolai*. *Revista Chil. Hist. Nat.* 71 (2): 177 – 188.

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. *Med. Vet. Entomol.* 16: 75 – 82.

GALVAO, C.; JURBERG, J.; CARCAVALLO, R.; MENA, C.; GALÍNDEZ, I.; CURTO DE CASAS, S. 1998. Distribuição Geográfica e Dispersão Alti-latitudinal de Alguns Gêneros e Espécies da Tribo Triatomini Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 93 (1): 33 – 38.

GUHL, F.; JARAMILLO, C.; VALLEJO, G.; YOCKTENG, R.; CÁRDENAS-ARROYO, F.; FORNACIARI, G.; ARRIAZA, B.; AUFDERHEYDE, A. 1999. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am. J. Phys. Anthr.* 108: 401 - 407.

LACOMBE, D. 1999. Anatomia e histologia das glandulas salivares nos triatomíneos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94 (4): 557 – 564.

LORCA, M.; GARCIA, A.; BAHAMONDE, M . 2001. Certificación serológica de la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Chile. Rev. Méd. Chile. 129 (3): 264 - 269.

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

MARSHALL, N. 1982. Allergy to *Triatoma protracta* (Heteroptera:Reduviidae). I. Etiology, antigen preparation, diagnosis and immunotherapy. J. Med. Entomol. 19:248:252.

MOLINA, M.; CATTAN, P.; CANALS, M.; CRUZAT, L.; AGUILLON, J.; FERREIRA, A. 2004. A simple immunometric assay to asses de feeding habits of *Meprai spinolai*, a *Trypanosoma cruzi* vector. Parasitol Res. 92: 375 - 379.

MONCAYO, A. 1999. Progreso en la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur. Medicina. 59 (II): 120 - 124.

MONCAYO, A. 2000. Progreso en la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas en América Latina. Medicina. 22 (53): 84 – 88. [en línea] <<http://www.encolombia.com/medicina/academedicina/ag-03amoncayo.htm>>. [consulta: 23-07-2008].

MONCAYO, A. 2003. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98 (5): 577 – 591.

NASCIMENTO, R.; SANTANA, J.; LOZZI, S.; ARAÚJO, C.; TEIXEIRA, A. 2001. Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: reduviidae) salivary glands proteins. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 65: 219–226.

NOIREAU, G.; ZEGARRA, F.; BRENIERE, CARDOZO & DUJARDIN. 1998. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the Bolivian Chaco. *Trop. Med. Int. Health.* 3 (5): 364 – 372.

OLIVEIRA, F.; ALFREDO, M. 1997. Uso de nuevas herramientas para el control de triatominos en diferentes situaciones entomológicas en el continente americano. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30 (1): 41–46.

ORDENES, HV.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.; CANALS, M. 1996. Infección Tripanotriatomino de *Triatoma spinolai* en una zona de riesgo epidemiológico. *Rev. Med. Chile.* 124: 1053-1057.

PADDOCK, C.; MCKERROW, J.; HANSELL, E.; FOREMAN, K.; HSICH, I.; MARSHALL, N. 2001. Identification, cloning, and recombinant expression of procalin a major triatomine allergen. *J. Immunol.* 167: 2694–2699.

PANZERA, F.; DUJARDIN, JP.; NICOLINI, P.; CARACCIO, MN.; ROSE, V.; TELLEZ, T.; BERMUDEZ, H.; BARGUES, MD.; MAS-COMA, S.; O'CONNOR, JE.; PÉREZ, R. 2004. Genomic changes of Chagas disease vector, South America. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 438-446.

PEREIRA, M.; DIOTAIUTI, L. 2002. Comparative kinetics of bloodmeal intake by *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*, the two principal vectors of Chagas disease. *Med. Vet. Entomol.* 12 (1): 84–88.

RAMSEY, J.; ORDOÑEZ, R.; CRUZ-CELIZ, A.; ALVEAR, A.; CHAVEZ, V.; LOPEZ, R.; PINTOR, J.; GAMA, F.; CARRILLO, S. 2000. Distribution of domestic Triatominae and stratification of Chagas disease transmission in Oaxaca, Mexico. *Med. Vet. Entomol.* 14: 19 – 30.

RAMSEY, J.; SCHOFIELD, C. 2003. Control of Chagas disease vectors. *Salud Pública Mex.* 45 (2) : 123 – 128.

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

RIBEIRO, J.; FRANCISCHETTI, I. 2003. Role of saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 73 – 88.

ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, C.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.; SOLARI, A. 2005. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals from a chagasic area of Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73 (3): 517 – 519.

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

SCHENONE, H.; VILLARROEL, F.; ROJAS, A.; ALFARO, E.1980. Factores biológicos y ecológicos en la epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile. *Bol. Chil. Parasitol.* 40: 42-54.

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. *Bol. Chil. Parasitol.* 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. *Med. Vet. Entomol.* 12 (1): 30 – 38.

SCHOFIELD, C.; DIOTAIUTI, L.; DUJARDIN, J. 1999. The process of domestication in Triatominae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94 (1): 375 – 378.

SHERLOCK, I. 1999. Epidemiology and dynamics of the vectorial transmission of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94 (1): 385 - 386

SILVEIRA, A. C. Ed. 2002. El control de la enfermedad de Chagas en los países del cono sur de América. Historia de una iniciativa internacional 1991/2001. 314 p. [en línea] <<http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/dch-historia-incosur.PDF>> [consulta: 26-06-2008].

UNDP/WORLD BANK/WHO. 1991. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Eleventh Programme Report, Geneva, p. 67.

VOLF, P.; ROHOUSOVA, I. 2001. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology.* 122: 37 – 41.

WINIVESKY-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. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 88 (1): 27–32.

WOOD, S.F. 1951. Importance of feeding and defecation times in insect vectors in transmission of Chagas disease. *J. Econ. Entomol.* 44: 52-54.

APÉNDICE

Elaboración de suero de conejo con anticuerpos contra *O. degus*

Se utilizaron dos conejos provenientes del Instituto de Salud Pública, los cuales, luego de haber sido mantenidos en cautiverio en un ambiente estable por un periodo de 30 días, fueron inoculados con suero normal de *O. degus* en repetidas ocasiones y de la siguiente manera:

Los animales fueron inmunizados tres veces, a intervalos de una semana, cada vez con una cantidad aproximada de 50, 300 y 400 µg de proteínas totales. La primera inmunización se administró subcutánea, con coadyuvante completo de Freund's, mientras que para las dos últimas inmunizaciones, se usó coadyuvante incompleto, más proteínas del suero de *O. degus* depletadas parcialmente con BSA, por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 50% de saturación. La segunda inmunización se realizó vía subcutánea y la tercera intraperitoneal. El suero de *O. degus* se incluyó de manera tal, que quedara como una fase discontinua, dentro de la fase continua constituida por el coadyuvante.

Una semana posterior a la última inmunización, se procedió a realizar las sangrías, por punción cardíaca, repitiendo este procedimiento una vez por semana, durante cuatro semanas. Se realizó bajo anestesia general. La sangre obtenida se procesó, por los métodos anteriormente descritos, para obtener suero, y éste se almacenó a una temperatura de -20° C.

Ensayos inmunométricos:

Se realizaron ensayos serológicos, mediante test ELISA, para detectar la presencia de anticuerpos contra *O. degus*.

Para efectuar estos test ELISAs, se utilizó el procedimiento citado anteriormente, usándose los siguientes sueros:

Se sensibilizó con suero normal de *O. degus*, en una dilución de 1/1.000, luego de efectuado el bloqueo, se incubó con el suero conejos a estudiar, en una dilución 1/1.000 y finalmente se agregaron inmunoglobulinas policlonales de cabra contra conejo, peroxidasa (laboratorio Dakocytomation, Dinamarca), en dilución 1/1.500.

Se realizaron dos controles de calidad, uno de ellos fue sensibilizado con PBS soya 0,5% Tween 0,05%, 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.

Todos los sueros obtenidos presentaron una marcada presencia de anticuerpos contra el suero de *O. degus*.

Los sueros provenientes de ambos conejos presentaron una notable homogeneidad, no sólo entre ellos, si no que también entre sangrías, razón por la cual se trabajó con una mezcla homogénea del suero de uno de los individuos, elegida al azar.

A la muestra elegida, se le realizó un posterior test ELISA, se utilizaron diluciones seriadas para determinar la dilución óptima para este estudio (Figura 8). Ésta se definió como la dilución a la cual se obtuvo aproximadamente el 70% de la densidad óptica más elevada (cuadro 2). Estas diluciones también se repitieron utilizando suero normal de conejo, a modo de control.

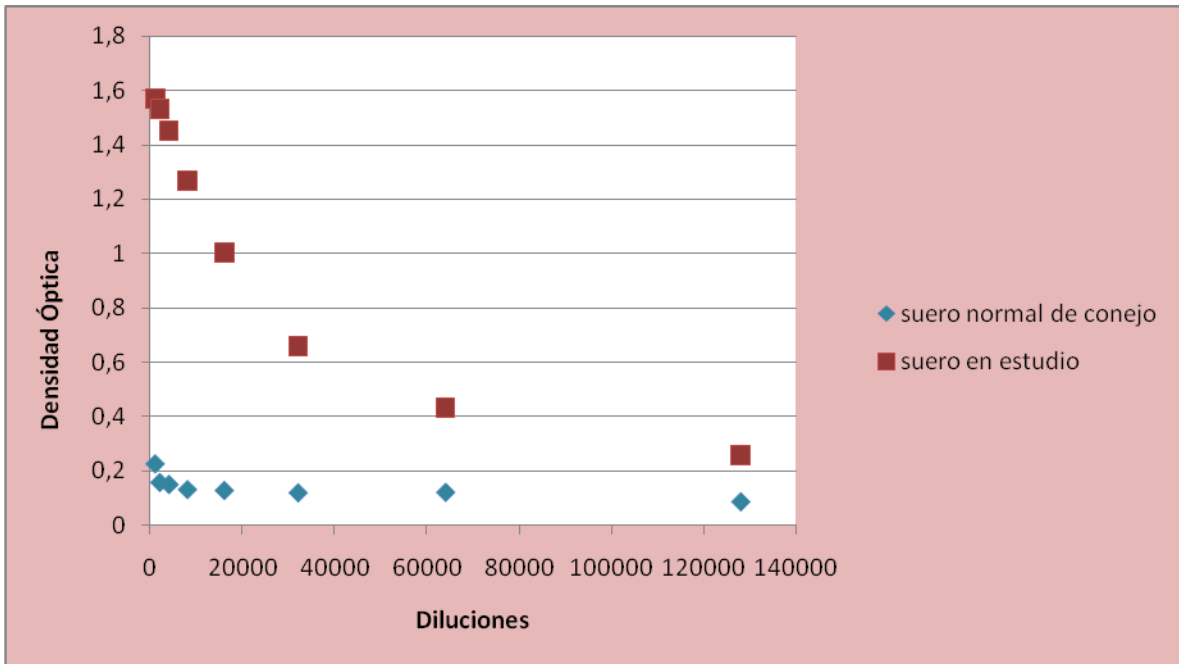


Figura 8. Densidad óptica obtenida al someter suero normal de conejo y el suero en estudio, a test ELISA, utilizando diluciones seriadas.

Cuadro 2: Densidades ópticas asociadas a sus respectivas diluciones

Dilución	Densidad Óptica suero normal de conejo	Densidad Óptica suero en estudio
1/1.000	0,23	1,57
1/2.000	0,16	1,53
1/4.000	0,15	1,45
1/8.000	0,13	1,27
1/16.000	0,13	1,00
1/32.000	0,12	0,66
1/64.000	0,12	0,43
1/128.000	0,09	0,26
1/256.000	0,13	0,34
1/512.000	0,12	0,25
1/1.024.000	0,13	0,21
1/2.048.000	0,11	0,18
1/4.096.000	0,10	0,16