



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DEL INTESTINO MEDIO DE
TRIATOMINOS VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS:**
Panstrongylus geniculatus, Rhodnius prolixus y Triatoma maculata

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller **Vanessa Elena Forero Useche**, como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor: Dra. María Lorena Márquez

CARACAS, VENEZUELA
Agosto, 2011

“Cuando se es muy joven y se sabe un poco, las montañas son montañas, el agua es agua, y los árboles son árboles. Cuando se ha estudiado y se es leído, las montañas ya no son montañas, el agua ya no es agua, y los árboles ya no son árboles. Cuando se es sabio, nuevamente las montañas son montañas, el agua es agua y los árboles son árboles”

Antiguo refrán del Budismo Zen

AGRADECIMIENTOS

- A mi familia, que ha estado conmigo en todo momento y que siempre mantuvo la esperanza, y creyó que este momento, más tarde que temprano, llegaría.
- A mi tutora, la Dra. María Lorena Márquez, que fue mi guía en este proyecto y que me ayudó a llevarlo a buen término. Gracias por las horas que pasamos sentadas dilucidando cómo presentar este trabajo.
- Al Dr. Matías Reyes, quien me abrió las puertas de su laboratorio desde hace un tiempo y me hizo parte de su equipo. Gracias por ser la primera persona que vio la importancia que este trabajo tiene y por ser el primero en animarme a iniciar este proyecto.
- A la Dra. Elizabeth Merentes por lo mucho que me enseñó. Fue mi primer contacto con el laboratorio y quien me mostró el trabajo que allí se realiza. Gracias a eso descubrí lo que luego me planteé hacer.
- A mis amigos Wilmer, Arnel, Jesús, Jamileth, Olga, Denis, Carolina y Sosirée, con quienes compartí toda la carrera, y con quienes compartí todos los triunfos y dificultades que trajo cumplir con la meta de licenciarnos en esta Facultad.
- A la Facultad por tener profesores de excelencia que hacen del individuo que en ella se forma un profesional con un conocimiento integral y preparado para afrontar con confianza el campo laboral.

RESUMEN

Los triatomíneos *R. prolixus*, *P. geniculatus* y *T. maculata*, son organismos hematófagos pertenecientes a la familia [Reduviidae](#) y al orden Hemiptera. En Venezuela tienen una amplia distribución en todo el territorio nacional, y son reconocidos como los principales vectores del *Trypanosoma cruzi* (el agente etiológico de la enfermedad de Chagas) ya que éstos tienen gran adaptabilidad para colonizar la vivienda humana típica de nuestras áreas rurales, manteniendo el ciclo de transmisión doméstica. Parte del ciclo de vida de este parásito se da en el interior del triatomíneo, específicamente el aparato digestivo.

En general, el aparato digestivo de los insectos, es un tubo de células epiteliales continuas, que se extiende desde la boca hasta el ano, y está dividido en tres secciones (de acuerdo al origen ontogénico): Intestino anterior o estomodeo, donde hay una predigestión del alimento, intestino medio o mesenterón, donde se da el proceso como tal de digestión y el intestino posterior o proctodeo, donde se produce la excreción de desechos; en los vectores de parásitos, por lo general la región media del intestino es el lugar en donde agentes patógenos desarrollan una parte importante de su ciclo de vida.

El intestino medio, consiste en un epitelio simple en el cual se distribuyen 4 tipos celulares: Las células columnares, que tienen funciones absorptivas; las células globulares que están dispersas a lo largo del intestino medio, transportan potasio desde hemolinfa hasta el lumen intestinal; las células regenerativas, que van a dar origen a los diferentes tipos celulares y por último las células endocrinas que pueden tener funciones secretoras de enzimas digestivas.

En este trabajo se realizó una caracterización histológica del intestino medio de tres especies de triatomíneos, vectores de la enfermedad de Chagas, mediante el uso de técnicas histoquímicas.

Nuestros resultados nos indican que el epitelio del intestino de las tres especies es un epitelio simple pseudoestratificado, el cual descansa sobre una capa de músculo estriado. En el mismo se describen tres tipos celulares: células regenerativas, columnares y células denominadas por nosotros células redondeadas, éstas últimas podrían corresponder a las células globulares o endocrinas. Se observó una gran cantidad de vacuolas en el citoplasma a nivel apical y la presencia de gránulos de carbohidratos; habiendo identificado residuos de carbohidratos α - N-acetil-D-galactosamina en el epitelio del intestino medio de las tres especies, mientras que *R. prolixus* también se determinó la presencia de residuos α -D-Manosa y/o α -D-Glucosa. La distribución de los carbohidratos en las células epiteliales varió en cada especie, así como, la morfología del epitelio de cada especie es única. Se sugieren que estas podrían estar relacionadas con el tipo de alimentación, el procesamiento de nutrientes y la forma en la que cada especie interacciona con el medio que les rodea, también, podrían estar influyendo en la relación parasito- hospedador.

I. INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
I. INDICE DE CONTENIDO	I
II. INDICE DE FIGURAS	IV
III. ABREVIATURAS	VI
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Morfología externa de los triatominos	2
1.2.- Clasificación taxonómica de los triatominos en estudio	3
1.2.1.- <i>Panstrongylus geniculatus</i>	4
1.2.2.- <i>Rhodnius prolixus</i>	4
1.2.3.- <i>Triatoma maculata</i>	5
1.3.- Sistema digestivo de los triatominos	6
1.3.1.- Estomodeo	8
1.3.2.- Mesenterón o intestino medio	9
1.3.3.- Proctodeo	13
1.4.- Fisiología del Sistema digestivo de insectos	14
1.5.- Cadherinas y Lectinas	15
2.- ANTECEDENTES	17
3.- OBJETIVOS	24
3.1.- Objetivo general	24
3.2.- Objetivos específicos	24
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1- Material biológico	25
4.2.- Disección de triatominos	25

4.3.- Procesamiento histológico	25
4.4.- Tinciones histológicas	26
4.4.1.- Hematoxillina – Eosina (H/E) de Mayer	26
4.4.2.- Hematoxila Fosfotúngstica de Mallory (PATH)	26
4.4.3.- Ácido Peryódico de Schiff	27
4.4. 4.- Histoquímica de Lectinas	27
4.4.5.- Marcaje Inmunohistoquímico	28
5.- RESULTADOS	30
5.1.-Evaluación histológica mediante la técnica de coloración H/E	30
5.1.1.- <i>Rhodnius prolixus</i>	30
5.1.2.- <i>Panstrongylus geniculatus</i>	32
5.1.3.- <i>Triatoma maculata</i>	33
5.2.- Evaluación histológica mediante la técnica de coloración PATH	35
5.2.1.- <i>Rhodnius prolixus</i>	35
5.2.2.- <i>Panstrongylus geniculatus</i>	36
5.2.3.- <i>Triatoma maculata</i>	37
5.3.- Evaluación histológica mediante la técnica de coloración PAS	39
5.3.1- <i>Rhodnius prolixus</i>	39
5.3.2.- <i>Panstrongylus geniculatus</i>	40
5.3.3.- <i>Triatoma maculata</i>	41
5.4- Identificación de carbohidratos en el intestino medio de los triatomos	42
5.4.1.- Expresión de α -N-acteil-D-galactosamina con lectina DBA	43
5.4.1.1 <i>Rhodnius prolixus</i>	43
5.4.1.2 <i>Panstrongylus geniculatus</i>	44

5.4.1.3.- <i>Triatoma maculata</i>	45
5.4.2.- Expresión de residuos de α -D-manosa y/ó α -D-glucosa con lectina Con-A	46
5.4.2.1.- <i>Rhodnius prolixus</i>	46
5.5.- Expresión y localización de la E-cadherina en el intestino medio de las tres especies	48
5.5.1.- Inmunomarcaje del intestino medio de <i>Rhodnius prolixus</i> con E-cadherina	48
5.5.2.- Inmunomarcaje del intestino medio <i>Panstrongylus geniculatus</i> con E-cadherina	50
5.5.3.- Inmunomarcaje del intestino medio <i>Triatoma maculata</i> marcado con E-cadherina	52
6.- DISCUSIÓN	53
7.- CONCLUSIONES	60
8.- RECOMENDACIONES	61
9.- BIBLIOGRAFÍA	62

II. INDICE DE FIGURAS

Fig. 1.- Esquema general del sistema digestivo en insectos	3
Fig. 2.- <i>Panstrongylus geniculatus</i>	4
Fig.3.- <i>Rhodnius prolixus</i>	4
Fig. 4.- <i>Triatoma maculata</i>	5
Fig.5.- Esquema general del origen embrionario del sistema digestivo en insectos	7
Fig. 6.- Esquema mostrando el estomodeo (esófago), seguido del intestino medio en <i>Triatoma infestans</i>	9
Fig. 7.- Esquema mostrando las dos porciones del intestino medio de <i>Triatoma infestans</i> , promesenterón y postmesenterón, y el intestino posterior	10
Fig. 8.- Célula columnar típica	11
Fig. 9.- Célula globular	11
Fig. 10.- Grupo de células regenerativas del intestino medio	12
Fig. 11.- Esquema mostrando porción final del intestino de <i>Triatoma infestans</i> , proctodeo y la inserción de los túbulos de Malphigi	14
Fig. 12.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>R. prolixus</i> a distintos aumentos H/E	31
Fig. 13.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>P. geniculatus</i> a distintos aumentos H/E	33
Fig. 14.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>T. maculata</i> a distintos aumentos H/E	35
Fig. 15.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>R. prolixus</i> PATH, 400X	36
Fig. 16.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>P. geniculatus</i> PATH, 200X	37
Fig. 17.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>T. maculata</i> PATH, 400X	38
Fig. 18.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>R. prolixus</i> a distintos aumentos PAS	40
Fig. 19.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>P. geniculatus</i> PAS, 400X	41

Fig. 20.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>T. maculata</i> PAS, 400X	42
Fig. 21.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>R. prolixus</i> con lectina DBA, 400X	43
Fig. 22.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>P. geniculatus</i> con lectina DBA, 400X	45
Fig. 23.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>T. maculata</i> con lectina DBA, 400X	46
Fig. 24.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>R. prolixus</i> distintos aumentos con lectina Con-A	48
Fig. 25.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>R. prolixus</i> marcado con E-cadherina, 400X	50
Fig. 26.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>P. geniculatus</i> marcado con E-cadherina, 400X	51
Fig. 27.- Fotomicrografía del intestino medio de <i>T. maculata</i> marcado con E-cadherina, 400X	52

III. ABREVIATURAS

Con-A	Concanavalina A
DBA	Dolichos biflorus
DAB	Diaminobencidina
H/E	Hematoxilina-Eosina de Mayers
I. M.	Intestino medio
PAS	Ácido Peryódico de Schiff
PATH	Hematoxilina Fosfotúngstica de Mallory
PBS	Búfer Fosfato Salino
TBS	Tris Buffer Salino
UEA I	Ulex Europaeus-I

1.- INTRODUCCIÓN

Los insectos son el grupo animal más numeroso y diverso en cuanto al número de especies en la Tierra. Con 950.000 especies descritas hasta el momento (Chapman, 2005), los mismos representan aproximadamente el 90% de las formas de vida (Erwin, 1987).

Estos organismos han sido ampliamente estudiados, encontrando que algunos pueden ser benéficos, mientras que otros pueden ocasionar problemas económicos ya que son plagas de cultivos o de granos almacenados (Velásquez y col., 1983). Otros, pueden generar problemas de salud ya que, por ejemplo, los insectos hematófagos son vectores de enfermedades infecciosas para el ser humano y otros organismos (May, 1995).

El estudio del sistema digestivo de los insectos ha sido de particular importancia, en estos organismos, representa la mayor superficie de contacto con el medio ambiente (Terra, 2003). En general, el canal de alimentación de los insectos es un tubo, que se extiende desde la boca hasta el ano y está dividido en tres secciones (Fig. 1): estomodeo, donde hay una predigestión del alimento; mesenterón, donde tenemos la digestión propiamente dicha; y proctodeo, donde se produce la excreción de desechos. Estas secciones tienen diferentes orígenes embrionarios.

En insectos hematófagos, el intestino medio o mesenterón es el sitio de digestión del alimento (sangre); y en él se inician los procesos metabólicos para la absorción de nutrientes y eliminación de los desechos (Lehane y Billingsley, 1996). En el caso particular de los vectores, es el lugar donde agentes patógenos desarrollan una parte importante de su ciclo de vida.

Los estudios sobre el intestino medio de los insectos, así como la interacción con los parásitos, nos ayudan a entender tanto la fisiología del insecto como la evolución de los organismos patógenos que éstos transmiten. El orden Hemiptera constituye uno de los

órdenes de la clase insecta con mayor número de especies. Además, posee una amplia distribución en todos los continentes y presenta adaptaciones particulares a distintos ambientes y formas de vida que se reflejan en su diversidad taxonómica (Toro y col., 2003). Su nombre alude a que en una parte de ellos, sus alas anteriores (o hemiélitros) están divididas en una mitad basal dura y una mitad distal membranosa. Este orden se caracteriza por poseer un aparato bucal chupador el cual, según la especie, es utilizado para succionar savia o sangre. (Nieto, 1999).

1.1.- Morfología externa de los triatominos

Los triatóminos (Triatominae) son una subfamilia de insectos perteneciente a la familia Reduviidae del orden Hemiptera. Desde el punto de vista morfológico, éstos poseen antenas de cuatro segmentos a ambos lados de la cabeza y frente a los ojos. La distancia relativa entre las antenas y los ojos permite diagnosticar someramente los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*. En este sentido, en *Panstrongylus* (Figura 2) las antenas están muy cerca de los ojos; mientras que en *Rhodnius* (Figura 3) están muy lejos (cerca del ápice de la cabeza); y en *Triatoma* (Figura 4) entre los ojos y el ápice de la cabeza.

El aparato bucal, también llamado probóscide, perfora la epidermis y facilita la tarea de chupar sangre. En los triatominos posee tres segmentos y en el momento de picar se dobla especialmente a la altura de la articulación de los segmentos 2 y 3. Vale la pena destacar que el pronoto (torax) está dividido en un lóbulo anterior y otro posterior, y puede exhibir ornamentaciones tales como espinas y/o tubérculos de interés taxonómico. El mesonoto está reducido a un escutelo, mientras que el abdomen está compuesto de 11 segmentos, siendo los últimos segmentos asiento de las genitales. El conectivo, es decir, la parte que bordea el abdomen, muestra un patrón de manchas que varía en color y formas

según la especie. Las formas ninfales o inmaduras de los triatominos, son ápteras, no así los adultos. Las alas anteriores son hemélitros con una porción dura (corio) y otra membranosa (membrana). En algunas especies las características de la genitalia permiten fácilmente diferenciar machos de hembras, siendo en los primeros redondeados y en las segundas triangulares. Además, sobresale del abdomen (Schofield, 1994).

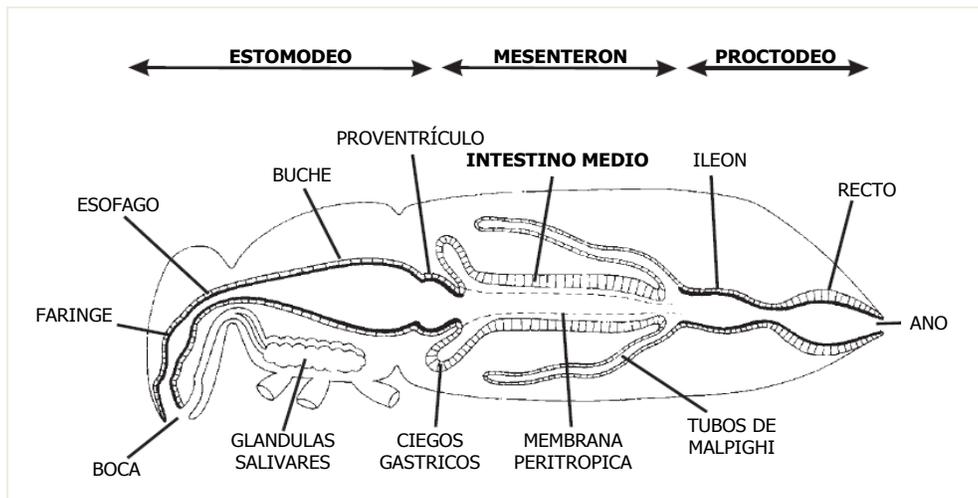


Fig. 1. Esquema general del sistema digestivo en insectos. Tomado y modificado de Klowliden, 2007

1.2.- Clasificación taxonómica de los triatominos en estudio

Epidemiológicamente los géneros *R. prolixus*, *P. geniculatus* y *T. maculata* comprenden las especies más importantes para la enfermedad de Chagas (Castillo y Wolff, 2000). En este trabajo, se estudió a estas especies, cuya clasificación es la siguiente:

1.2.1.- *Panstrongylus geniculatus* (Latreille 1811)

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Suborden: Heteroptera

Familia: Reduviidae

Subfamilia: Triatominae

Género: *Panstrongylus*

Especie: *P. geniculatus*



Fig. 2. *Panstrongylus geniculatus*, tomado de

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cf/Pgeniculatus2.jpg>

1.2.2.- *Rhodnius prolixus*

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Suborden: Heteroptera

Familia: Reduviidae

Subfamilia: Triatominae

Género: *Rhodnius*

Especie: *R. prolixus*



Fig. 3. *Rhodnius prolixus*, tomado de

http://genomeold.wustl.edu/ancillary/genome_images/Rhodnius_prolixus.png

1.2.3.- *Triatoma maculata*

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Suborden: Heteroptera

Familia: Reduviidae

Subfamilia: Triatominae

Género: *Triatoma*

Especie: *T. maculata*



Fig. 4. *Triatoma maculata*. Foto D. Llavaneras

(Colonia Charallave SEMPA IMT UCV)

En general, los triatominos se ubican principalmente en Latinoamérica y el sur de Estados Unidos. Algunas especies se han adaptado al domicilio humano donde se alimentan de ellos y de animales domésticos, y son importantes epidemiológicamente en la transmisión a los humanos del *Tripanosoma cruzi*, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. El insecto, al chupar sangre de los animales reservorios o del hombre enfermo, ingieren las formas tripomastigotes. En el interior y a todo lo largo del aparato digestivo del triatomino, el parásito pasa de la forma triponomastigote a la de epimastigote, se multiplica bajo esta forma y posteriormente se transforma en tripomastigote. Esta nueva forma predomina en la ampolla rectal del insecto y es llamada tripomastigote metacíclico, la cual es la infectante para el hombre y otros mamíferos (Cova y Suarez, 1959).

En Venezuela, los principales vectores de esta enfermedad son las especies *R. prolixus*, *P. geniculatus* y *T. maculata*. *R. prolixus* se distribuye por todo el territorio

nacional y es reconocido como el principal vector de la enfermedad, ya que tiene gran adaptabilidad para colonizar la vivienda humana típica de nuestras áreas rurales, por lo que mantiene el ciclo de transmisión doméstica. Mientras que *P. geniculatus* se encuentra distribuido en los estados Anzoátegui, Aragua, Bolívar, Carabobo, Falcón, Guárico, Lara, Mérida, Miranda, Monagas, Táchira, Yaracuy, Zulia, Trujillo, Delta Amacuro y Distrito Capital (Carzola, 2007). Este vector es considerado un vector secundario puesto que su hábitat principal son las cuevas de roedores y otros animales silvestres (Torres, 2008). No obstante, Pifano (1986) encontró un espécimen infectado dentro de una habitación humana en Caracas. En años recientes, en el centro norte de Venezuela, Reyes y Acosta (2000) y Reyes-Lugo (2009) han reportado la domiciliación de *P. geniculatus* con varios estadios ninfales e igualmente infectado por *T. cruzi*, e inclusive sustituyendo a *R. prolixus*.

Al igual que *P. geniculatus*, *T. maculata* es considerado un vector secundario. El mismo se ha encontrado infectado con *Tripanosoma cruzi* en estado natural. Según Zeledón (1983), se encuentran en un estado de transición ecológica al estar en proceso de adaptación al domicilio humano, pues está adaptado a hábitats peridomiciliarios y silvestres. Principalmente omitófago, asociado con gallinas y palomas, aun cuando también puede alimentarse del hombre. (Torres y col., 2010). Tiene una distribución en casi toda la totalidad de las entidades político-territoriales de la República (Cazorla, 2007)

1.3.- Sistema digestivo de los triatominos

El sistema digestivo, está constituido por el canal de alimentación (intestino) y las glándulas salivales; es el responsable de todos los pasos del procesamiento de los alimentos, tales como: digestión, absorción y eliminación de los residuos (Resh y Cardé,

2003). El tracto digestivo consiste en un tubo de células epiteliales continuas que van desde la boca hasta el ano, de acuerdo a su origen embrionario, éste se encuentra dividido en tres regiones bien diferenciadas con funciones fisiológicas específicas. A igual que la mayoría de los insectos, en los triatomíneos también observamos la parte anterior o estomodeo, intestino medio o mesenterón y la parte posterior o proctodeo (Fig. 4).

Las células que conforman el epitelio del intestino anterior y posterior, están endurecidas, a diferencia de las que conforman el intestino medio, lugar en el cual ocurre la absorción de los nutrientes (Ramírez, 1987).

En general, en los insectos, la parte anterior y posterior del tubo digestivo se originan por invaginación del ectodermo embrionario, generando el estomodeo y proctodeo, mientras que el intestino medio o mesenterón es de origen endodérmico, y está asociado con el desarrollo de la parte anterior y posterior del intestino (Fig. 5) (Klowden, 2007)

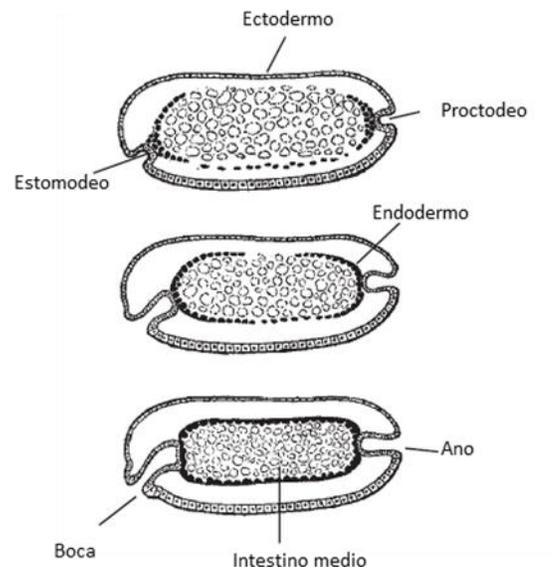


Fig. 5. Esquema general del origen embrionario del sistema digestivo en insectos. Tomado y modificado de Klowden, 2007

1.3.1.- Estomodeo

En triatominos, debido a su origen ectodérmico, el estomodeo presenta una estructura semejante a la pared del cuerpo, y consiste de una íntima cuticular interna, un epitelio entérico, el cual descansa sobre la membrana basal, y de un tejido muscular estriado (Ramírez, 1987). Está precedido por la probóscide, que, en reposo, descansa en la parte inferior de la cabeza y mantiene en su interior los estiletes usados para la succión de la sangre (Figura 6). A su vez está conectada con los ductos salivares pertenecientes a la glándula salival, la cual, además de lubricar las partes bucales, secreta enzimas para la predigestión del alimento, como son: lipasas, proteasas y carbohidrasas. Esta secreción también posee anticoagulantes y analgésicos en los insectos hematófagos (Ribeiro y col., 1995).

La faringe puede estar modificada junto con los músculos dilatadores, para formar, lo que es conocido como la bomba faríngeal o bomba de succión, la cual genera un vacío para la succión del alimento (Méndez, 1999).

El esófago zona que une a la faringe con el buche, es utilizado para la predigestión y como sitio de almacén del alimento. Luego el alimento predigerido es transportado al intestino medio, donde se produce la digestión total y absorción del alimento. (Klowden, 2007)

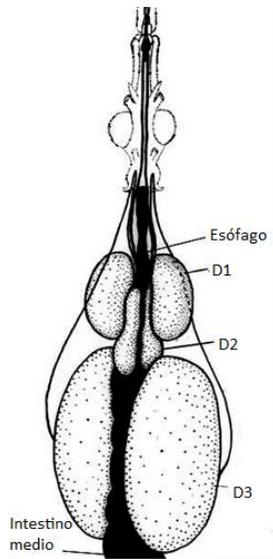


Figura 6. Esquema mostrando el estomodeo (esófago), seguido del intestino medio, en *Triatoma infestans*. Tomado y modificado de http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=88

1.3.2.- Mesenterón o intestino medio (I.M)

Abarca la mayor porción del tubo digestivo del triatómido y está formado por: el promesenterio (estómago), que representa el sitio del transporte de agua, inmediatamente después de la alimentación; es también el sitio de almacenamiento de lípidos y glicógeno; el postmesenterio (intestino) es la segunda región, y se subdivide en: intestino grueso anterior e intestino delgado posterior, la primera es el sitio de mayor síntesis de proteínas y secreción, aunque también existe una limitada absorción y almacenamiento de nutrientes, mientras que la región posterior, es responsable de cierta actividad secretora y es aquí, donde se da la asimilación de nutrientes digestivos, absorción y almacenamiento de carbohidratos (Ramírez, 1987). Cuando está lleno de alimentos, el estómago ocupa gran parte de la cavidad del cuerpo del insecto, empujando los otros órganos lateralmente (Figura 7).

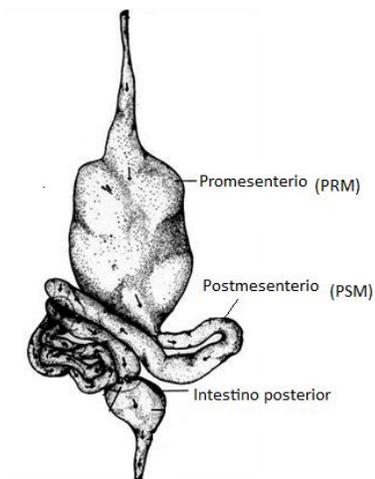


Figura 7. Esquema mostrando las dos porciones del intestino medio de *Triatoma infestans*, el promesenterón (PRM) y postmesenterón (PSM), y el Intestino posterior. Tomado de http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=88.

En general, el intestino medio de los insectos consiste en un epitelio simple, en el cual se distribuyen cuatro tipos de células: columnares, regenerativas, globulares y endocrinas, todas ellas derivadas del tejido endodermal y la ausencia de la línea cuticular que está presente en el intestino anterior, permite que la absorción se genere a este nivel. (Klowden, 2007).

Las células columnares o principales, son las más numerosas, presentan bordes en cepillo que dan hacia el lumen intestinal, estas presentan microvellosidades y abundantes pliegues, que aumenta la superficie de absorción y secreción de enzimas (Fig. 8).

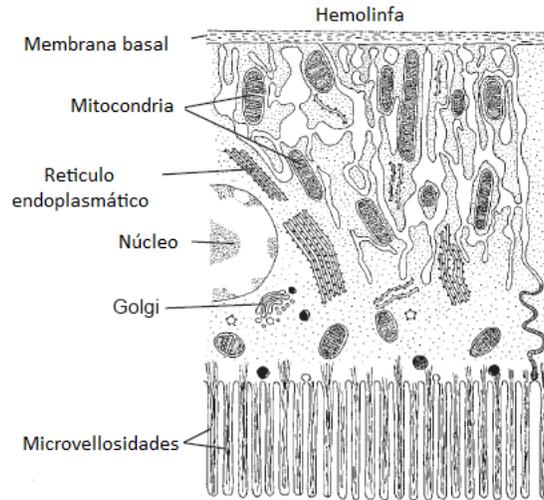


Fig. 8. Célula columnar típica. Tomado y modificado de Klowden, 2007

Las células globulares (Fig. 9) están dispersas a lo largo del intestino medio, transportan potasio desde hemolinfa hasta el lumen intestinal. Este movimiento de iones, es de importancia ya que ayuda al movimiento del agua, y a la absorción de los nutrientes (Klowden, 2007)

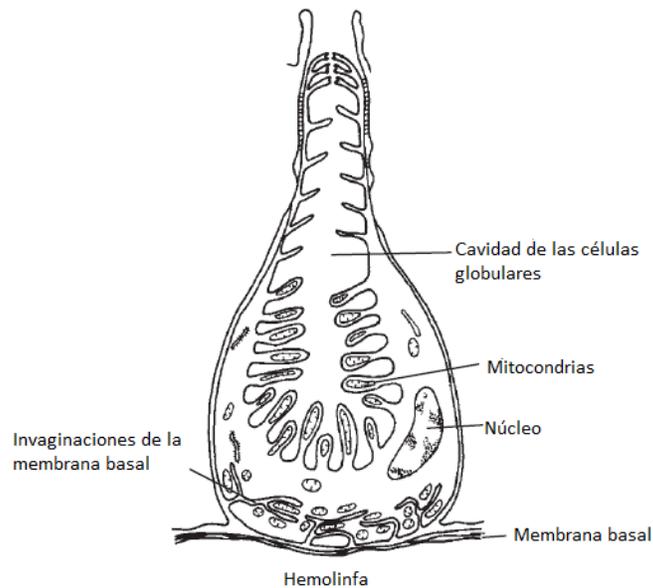


Fig. 9. Célula globular. Tomado y modificado de Klowden, 2007

Las células regenerativas (Fig. 10), tal como su nombre lo indica, son células de regeneración del tejido especializado, de los diferentes tipos de celulares antes mencionadas (Klowden, 2007).

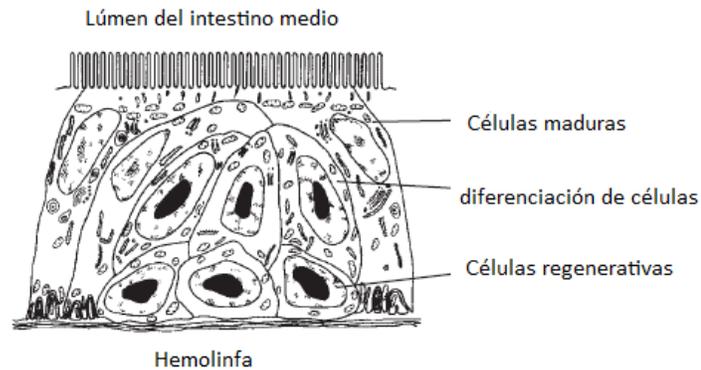


Fig. 10. Grupos de células regenerativas del intestino medio. Tomado y modificado de Klowden, 2007

A las células epiteliales del intestino medio, se le han atribuido diferentes funciones, como: absorción del alimento, secreción de enzimas, funciones de carácter inmunológico, y a la producción de la membrana peritrófica (Fig. 4), (Terra, 2005). La cual es un biopolímero que divide al lumen intestinal en dos áreas, endoperitrófica y ectoperitrófica, además se le han atribuido funciones de protección, ya que, el alimento y/o los microorganismos provenientes del mismo, no tienen contacto directo con el epitelio intestinal, a su vez originan un flujo de enzimas digestivas, que permite la reutilización de las mismas (Klowden, 2007).

No obstante, los hemípteros presentan una delicada membrana pseudo-peritrófica envuelta por las microvellosidades, la cual se extiende al lumen y termina en un fondo ciego. Contiene lipoproteínas pero no quitina, siendo llamada de membrana perimicrovillar. En los triatóminos, en todos los estadios, las membranas pseudoperitróficas son sintetizadas por el epitelio del tracto digestivo total. Estas estructuras son formadas por

glicofosfolípidos, proteínas, carbohidratos y enzimas hidrolíticas. Más allá de eso, esta membrana tiene permeabilidad selectiva lo que permite que enzimas digestivas la atraviesen y lleguen al bolo alimenticio, y también que productos de la digestión sean absorbidos por el epitelio intestinal. (Lacombe, 1957)

Sobre el intestino de los triatomíneos, se encuentra además los denominados cuerpos grasos. Consiste de delgadas columnas con dos células de espesor o pequeños nódulos, suspendidos dentro de la cavidad del cuerpo por tejido conectivo y tráqueas. Deriva del mesodermo de las paredes de las cavidades celómicas durante el crecimiento del embrión. Las células del cuerpo graso están en contacto con la hemolinfa, con la que efectúan un dinámico intercambio de metabolitos.

Éstas se encuentran por debajo del exoesqueleto y sobre el tracto digestivo se pueden distinguir porque forman una capa perivisceral, conformado mayormente por trofocitos o células lipídicas, especializadas para almacenar reservas nutritivas y en la síntesis de nuevas sustancias, capaces de una gran distensión en su membrana para alojar reservas (lípidos, proteínas y glucógeno).

1.3.3.- Proctodeo

El intestino posterior está formado por los túbulos de Malpighi, órgano osmorregulador y de excreción de metabolitos de desechos (Klowden, 2007).

El ileum y el recto conforman una zona continua que conectan al intestino medio con el ano, en esta zona es donde se encuentran simbiosis y donde algunos parásitos realizan parte de su ciclo de vida.

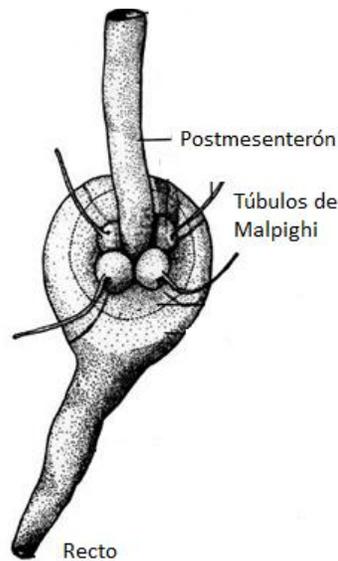


Figura 11: Esquema mostrando la porción final del intestino de *Triatoma infestans*, proctodeo y la inserción de los túbulos de Malpighi. Tomado de http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=88

1.4.- Fisiología del sistema digestivo de insectos

Movimiento del tracto digestivo

El tracto digestivo está innervado por terminaciones nerviosas. Desde que el alimento es ingerido, se generan una serie de movimientos peristálticos por la musculatura que rodea al intestino, que van a inducir el paso del alimento a lo largo del tracto. Estas contracciones son resultado de la estimulación nerviosa.

El paso del alimento a través del intestino no es uniforme, variando de acuerdo al estado fisiológico del insecto. Además, difiere según el sexo y la edad (Lehane y Billingsley, 1996). En el caso de los hematófagos, la distensión del abdomen y por ende la distensión del intestino medio, se debe a que hay una neurosecreción por parte del sistema circulatorio (Lange y Orchard, 1998).

1.5.- Cadherinas y Lectinas

Una propiedad que presentan las células de los organismos multicelulares, es su capacidad para formar asociaciones entre células del mismo tipo, mediante uniones celulares llamadas desmosomas. Esta adhesión es resultado de la expresión de moléculas de adhesión celular, que son glicoproteínas receptoras que se encuentran en la superficie de la célula, y fluctúan entre estados de alta y baja afinidad con sus respectivos ligandos. Esto produce cambios conformacionales en sus estructuras, por ejemplo, cambios intracelulares en el citoesqueleto o en su composición química (Sanguinet y Rodríguez, 1999), afectando así la estructura de la célula.

Las uniones celulares juegan un papel importante en los procesos fisiológicos, por ejemplo, en la morfogénesis, estabilización y diferenciación de los tejidos, y mantenimiento de la integridad de las células.

Las cadherinas son una familia de moléculas de adhesión que unidas entre establecen contacto célula-célula; esta actividad adhesiva es calcio y temperatura dependiente, y está presente en todos los tejidos animales. Conforman puentes moleculares entre las células adyacentes formando estructuras tipo "zipper" o cierre en las regiones de la membrana donde las células hacen contacto. Dentro de esta familia, encontramos la E-cadherina, la cual está presente en el tejido epitelial. En este trabajo la presencia de la E-cadherina se utilizó para establecer los límites celulares y así clasificar el epitelio.

Por otra parte, se determinó la expresión de algunos carbohidratos mediante el uso de lectinas. Éstas permiten localizar, identificar y distinguir carbohidratos presentes en el tejido con gran sensibilidad y especificidad (Leathem y Atkins, 1983). Son proteínas que tienen la capacidad de combinarse del mismo modo que un antígeno se combinaría con un anticuerpo (Aksoy y Uner, 2003). Tienen dominios o secuencias de aminoácidos que son

capaces de reconocer y unirse a glúcidos terminales, que forman parte de cadenas de oligosacáridos, bien sean, libres o formando parte de glicoproteínas. Por ello se dice que las lectinas reconocen glicoconjugados (Basseri, 2002).

La fuente de lectinas en la naturaleza, no sólo se consigue en plantas. También la encontramos en virus, bacterias, hongos, parásitos, invertebrados y vertebrados (Basseri, 2002).

En insectos, las lectinas tienen una variedad de funciones, tales como: fagocitosis, encapsulación, quitinación, muda, y el reconocimiento y protección en la defensa inmune en contra de organismos patógenos (Barreau y col., 1995).

Se han realizado estudios en *R. prolixus* y *T. infestans*, vectores de los agentes causantes de la enfermedad de Chagas, el parásito *T. cruzi* en los cuales se evidencia que la interacción del parásito con el epitelio del intestino de vector está relacionada con la presencia de carbohidratos en la superficie del parásito y las lectinas presentes en el epitelio del vector (Azambuje y García, 2005).

2.- ANTECEDENTES

Los primeros estudios que se han encontrado en insectos a un nivel microscópico, datan del siglo XVII, y se realizaron en insectos que tienen un comportamiento social. Es en esta época, Francisco Stelluti describió la estructura interna de las abejas usando el modelo de microscopio construido por Galileo. Décadas después, Robert Hooke y Jan Swammerdam realizaron otros estudios a nivel microscópico en estos insectos; el excelente trabajo de estos y otros investigadores está basado en la habilidad y precisión con la que realizaron las disecciones (Cit. In Billen y Wilson 2008).

Según Billen y Wilson (2008) a partir del desarrollo de técnicas histológicas, hay una nueva dimensión en el estudio morfológico, y el conocimiento que hoy se tiene de la anatomía interna de insectos sociales, viene de trabajos realizados por Charles Janet en hormigas y abejas a finales del siglo XIX. Este fue uno de los primeros investigadores que realizó estudios a un nivel histológico. Entre sus trabajos, encontramos, el estudio histológico del sistema exocrino de hormigas, específicamente el de *Myrmica rubra*; en el cual incluye, una descripción de las glándulas presentes.

En cuanto a estudios realizados en Triatomíneos a nivel microscópico, tenemos como investigador pionero, y del cual muchos investigadores se apoyan para el estudio anatómico y morfológico de estos insectos, a Wigglesworth (1931); el cual realizó un estudio anatómico e histológico del sistema excretor de *Rhodnius prolixus*. Este autor encontró, que el sistema excretor, está conformado por cuatro tubos de Malpighi que entran al recto, un saco con forma de pera, con una gran capacidad de distensión. El estudio histológico lo hizo a nivel de los túbulos de Malpighi, encontrando dos segmentos a lo largo del tubo, los cuales presentan células de tamaño discreto y bien definidas con un núcleo de gran tamaño;

en la parte basal hay una zona que presenta estriaciones claras y la membrana plasmática de la zona apical está modificada formando microvellosidades con borde de cepillo.

Ramírez en 1969, en un estudio fisiológico, relacionado con la digestión y eliminación de los residuos de alimento en *R. prolixus*, observó que el postmesenterio, desempeña un papel importante en la desintegración, asimilación y eliminación de la hemoglobina.

Burgos y Gutiérrez (1976) realizaron un estudio histológico y citológico, del intestino de *Triatoma infestans*, en el cual describen las características histológicas y ultraestructurales del intestino medio de este triatomino. Dicho estudio demostró, que el tracto digestivo, es un tubo longitudinal con numerosos pliegues, y que, está formado por dos capas: un epitelio columnar simple colocado sobre una lámina basal delgada, rodeada por una doble capa de músculo oblicuo transversal y una capa longitudinal incompleta. Hacia la región luminal, observaron que la membrana plasmática del epitelio esta modificada en microvellosidades formando un borde en cepillo, el cual se encuentra cubierto por la membrana peritrófica, además, el núcleo de este tipo celular tiene forma de ovalo y se ubica en el axis de la célula, en el mismo se observan nucléolos conspicuos. En este caso, todo el epitelio y la capa basal dieron positivas para la coloración PAS.

En el estudio citológico, Burgos y Gutiérrez (1976) demostraron que las uniones intercelulares son del tipo zónula ocludens. La superficie apical presenta microvellosidades que contienen pequeñas partículas y filamentos longitudinales, abundantes mitocondrias con forma elongada y ubicadas perpendicularmente a la superficie basal de la célula, pequeñas vesículas, ribosomas, polisomas y retículo endoplasmático rugoso. La membrana peritrófica está formada por filamentos muy delgados que se extienden a los pliegues de las microvellosidades. La membrana basal tiene numerosas invaginaciones del plasmalema, en

el que se observan cisternas y vesículas del retículo endoplasmático. El núcleo tiene forma irregular y es alargado, con una cromatina electroclara y numerosos nucléolos conspicuos. Por último, el citoplasma, es una matriz densa, con canales y cisternas del retículo endoplasmático, las cuales se encuentran distribuidas alrededor de núcleo. Algunas células contienen un gran número de vesículas, otras tienen lisosomas, fagolisosomas y cuerpos residuales, así como vacuolas contráctiles.

Dos años después, Gutiérrez y Burgos, (1978), realizaron una descripción ultraestructural y citoquímica de la membrana peritrófica que recubre el intestino medio del *T. infestans*. La superficie apical del epitelio del intestino medio de *T. infestans* presenta microvellosidades con forma de borde de cepillo, cubierto por la membrana peritrófica. La microscopía electrónica demostró que esta membrana es trilaminar, se inicia entre los pliegues de las microvellosidades y tienen una estructura tubular plexiforme cuatro veces más larga que las microvellosidades que se expanden y proyecta al lumen del intestino. El estudio citoquímico sugirió que la membrana peritrófica estaba compuesta por glicofosfolípido y fosfatasa ácida.

Mediante un estudio de microscopía electrónica de barrido, Billingsley y Downe (1986), observaron que, la morfología superficial de las células del intestino medio de *R. prolixus*, varía dependiendo del tiempo en que han sido alimentados, sugiriendo que, las capas de la membrana celular además de funcionar como una membrana peritrófica, permite la separación espacial de proceso digestivo.

Posteriormente Billingsley (1988), mediante un análisis morfométrico, cuantificó las modificaciones ultraestructurales de las células del intestino medio de *R. prolixus* antes y después de que el triatomino se alimentó. Fue un estudio específico para región del intestino medio y se correlacionó con previas publicaciones acerca de la actividad

enzimática en el ciclo digestivo. Observó cambios relativos y absolutos del volumen de la superficie y área de toda la célula (núcleo, mitocondria, retículo endoplasmático rugoso, lisosomas, aparato de Golgi, microvellosidades, entre otros.), apoyando así lo descrito por otros investigadores, es decir, el intestino medio de *R. prolixus* está dividido en dos grandes regiones y cada una cumple una función: el promesenterón, es el sitio en donde se da el transporte inmediato de agua y es el lugar de almacenamiento de lípidos y glicógeno, no ocurre una digestión de proteínas; el postmesenterón, el cual se divide en intestino anterior e intestino posterior. La parte anterior, es la zona de mayor secreción y síntesis de proteínas y en la parte posterior se da la absorción y almacenamiento de los nutrientes.

En estudio realizado por Wanderley y col. (2006) se describe histológicamente: el intestino medio de *Tropidacris collaris*, los ciegos gástricos y la válvula pilórica. Para el análisis en el microscopio óptico, emplean diferentes coloraciones, sus resultados demostraron que la pared del intestino medio está compuesta por una capa de células epiteliales y dos capas de músculo estriado: uno interno (circular) y otro externo (longitudinal) unido entre sí por tejido conectivo. El epitelio es simple, con dos tipos de células: regenerativas y columnares. Los ciegos gástricos presentan capas de músculos similares a las del intestino medio y un epitelio columnar simple con vellosidades que se proyectan al lumen. La válvula pilórica está formada por tejido muscular estriado y una capa de tejido epitelial simple.

Recientemente Rosch y col. (2010) hicieron un estudio histológico y ultraestructural del intestino medio de *Triatoma vitticeps* en distintos períodos de ayuno, determinando en general, que las células digestivas que conforman el epitelio del intestino medio de este Triatomino presentan microvellosidades en la zona apical, un núcleo central y la

membrana basal presenta invaginaciones. En las células del mesenterón encontramos gotas lipídicas, gránulos de glucógeno, la presencia de mitocondrias sugiere que estas células juegan un papel en el almacenamiento de nutrientes y en el flujo y transporte de iones. Las células de la región anterior del postmesenterón tienen retículo endoplasmático rugoso, lisosomas, vesículas y gránulos con diferentes electrodensidades mientras que la región posterior del intestino medio las células presentan gránulos de residuos producto de la digestión de sangre y las mitocondrias se ubican en la zona apical del citoplasma, cerca de las microvellosidades, lo que sugiere que esta porción del mesenterón juega un papel importante en la digestión del alimento de éste hematófago y el almacenamiento de nutrientes.

A su vez, asocian las diferencias en la morfología de las células epiteliales durante los distintos períodos de ayuno con la presencia del número de vesículas aumentando a medida que pasa el tiempo de ayuno, sugiriendo que estas vacuolas son sitios de almacenamiento de enzimas, las cuales están listas para ser usadas una vez que se han alimentado. Es importante destacar que los distintos investigadores que han realizado estudios histológicos y ultraestructurales a nivel del intestino de algunas especies de triatomíneos, llegan a las mismas conclusiones.

En el 2006, Terra y colaboradores, realizaron una recopilación de trabajos (realizados por otros investigadores) sobre la membrana plasmática de las células del intestino medio en insectos, definiendo que, está separada en dos dominios, dominio apical y dominio basolateral. El dominio apical generalmente se encuentra modificado en microvellosidades con una estructura molecular parecida a la de otros animales. Sin embargo, dependiendo del proceso de secreción, podemos encontrar algunas variaciones.

Otra modificación de las microvellosidades está asociada con el proceso del transporte de iones o la permeabilidad de la membrana. La membrana peritrófica interviene en el proceso de absorción de aminoácidos proveniente de la dieta diluida. Tanto las microvellosidades, como la membrana peritrófica presentan una densidad y un contenido proteico dependiendo del taxón del insecto.

La mayoría de los estudios sobre lectinas en insectos, se basan en la interacción entre el vector y el parásito, siendo el más estudiado el de la mosca Tsé-Tsé en el que se indica que la especificidad de las lectinas en el tejido juega un papel crucial en el control de la infección de esta mosca con tripanosomas africanos, a su vez, se presentan evidencias que indican que la biosíntesis de la lectina en el insecto se da principalmente en los cuerpos grasos, se ha reportado aglutinación en los órganos sexuales y en algunos casos asociados a membranas celulares (Basseri, 2002).

No obstante, el trabajo pionero sobre la interacción entre lectinas de vectores y parásitos fue el realizado por Pereira y col. (1981) en él se estudia la especificidad de distintas lectinas en el intestino de *R. prolixus* que interactúa selectivamente con los residuos carbohidratados que se encuentran en la membrana celular del *Trypanosoma cruzi*, obteniendo que hay una alta especificidad para N-acetil-D-manosa, α -N-acetil-D-galactosamina y α , β -D-galactosa.

Mello y col. (1998) realizaron un estudio en lectinas aisladas de la hemolinfa de *R. prolixus* y su interacción con *Trypanosoma rangeli*, encontrando que éstas lectinas aisladas pueden intervenir en el ciclo de vida de *T. rangeli*.

Kunst y col. (1996), determinan que las E-cadherinas juegan un papel importante en el establecimiento y funciones morfogénicas de las uniones de anclaje en los embriones de *Drosophila melanogaster*, además demuestran que la integridad del epitelio depende de estas estructuras de adherencia y que los componentes necesarios para la formación de estas estructuras, se encuentran altamente conservadas en vertebrados y en invertebrados.

En general, son pocos los estudios morfológicos del intestino de insectos, principalmente de aquellos involucrados en la transmisión de enfermedades como a enfermedad de Chagas. En Venezuela, existen diversas especies vectores de *T. cruzi* siendo algunos representantes *R. prolixus*, *P. geniculatus* y *T. maculata*.

R. prolixus, el principal vector, ha sido el más estudiado, sin embargo, existen pocos estudios relacionados con *P. geniculatus* y *T. maculata*, y no encontramos estudios histológicos de estos triatomíneos.

Como se mencionó previamente, en el intestino de estos individuos ocurre la interacción con el parásito, por lo cual, es importante conocer a morfología de intestino, de tal manera que posteriormente se pueda relacionar con el comportamiento del parásito en cada uno de estos vectores.

3.- OBJETIVOS

3.1.- Objetivo general

Caracterizar y comparar histológicamente el intestino medio de tres especies de triatominos: *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata*

3.2.- Objetivos específicos

- 1) Procesar histológicamente intestino medio de los tres triatominos.
- 2) Describir el epitelio del intestino medio de *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata* y determinar los tipos celulares presentes.
- 3) Determinar la expresión y localización de la E-cadherinas en el intestino medio de las tres especies.
- 4) Determinar la expresión de algunos carbohidratos en el intestino medio de estas especies.
- 5) Comparar histológicamente el intestino medio de las tres especies de triatominos estudiados.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Material biológico:

Se utilizaron los triatominos *Rhodnius prolixus*, *P. geniculatus*, *T. maculata* los cuales fueron gentilmente suministrados por el Dr. Matías Reyes Lugo, de la Sección de Entomología Médica del Instituto de Medicina Tropical (IMT) de la Universidad Central de Venezuela.

4.2.-Disección de los triatominos:

Los insectos fueron mantenidos en ayuno durante 15 días. Después de ese lapso, fueron disecados, para lo cual fueron inmovilizados en un congelador durante 15 min y, posteriormente, se le retiraron las alas y los últimos segmentos del abdomen fueron cortados, seguidamente se realizó una incisión en la parte lateral desde el ano hasta la unión del tórax con el abdomen y se retiró el exoesqueleto ventral, quedando expuesto el tracto digestivo. Una vez expuesto, se extrajo el intestino medio y el tejido circundante fue retirado de forma mecánica, finalmente, éste fue lavado en solución salina isotónica, para su posterior procesamiento

4.3.- Procesamiento histológico

Una vez extraído el intestino medio de estos, fue sumergido en solución fijadora Bouin acuoso durante al menos 72 horas. Una vez fijado, fue deshidratado en una batería de alcoholes con una gradación creciente (70% al 100%). Seguidamente se procedió a realizar la aclaración del tejido en tolueno (dos cambios de 15 min cada uno a 56°C), se

incluyeron en parafina (dos cambios a 56°C) y finalmente incluidos en bloques de parafina, montados y cortados en un micrótopo.

Se realizaron cortes con un grosor de 5 micras, y se montaron en láminas portaobjeto, los cuales fueron previamente tratados con una solución de albúmina de huevo de Mayer.

Posteriormente, las muestras se desparafinaron (en Xilol) e hidratadas en una batería de alcohol con una gradación decreciente (100% a 50%) lavadas en agua destilada y/o corriente según el caso.

4.4- Tinciones histológicas

4.4.1.- Hematoxilina-Eosina de Mayers

Una vez rehidratadas las muestras se colorean con hematoxilina por 30 seg. , lavadas con agua corriente, embebidas en alcohol al 50% por 30 segundos y luego coloreadas con eosina (1 min). Una vez coloreadas, las muestras fueron deshidratadas en una batería de: acetona-xilol. Finalmente fueron montadas permanentemente utilizando Entellan (Merck) como medio de montaje.

4.4.2.- Hematoxilina fosfotúngstica de Mallory (PATH):

Las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas como se mencionó previamente. Una vez hidratadas, se trataron con ácido Oxálico al 5% por 10 minutos. Luego se lavaron

con agua corriente y agua destilada sucesivamente, y teñidas con solución PATH de Mallory durante 2 horas a 56°C.

Pasado este tiempo, fueron transferidas a etanol al 95% y deshidratadas en acetona-xilol y finalmente se montaron permanentemente, como se explicó previamente.

4.4.3.- Ácido Peryódico de Schiff (PAS)

Las muestras fueron desparafinadas e hidratadas paulatinamente en una batería de alcoholes gradación decreciente hasta llegar a agua destilada. Posteriormente fueron oxidadas en una solución de ácido peryódico al 5% durante 5 min, lavadas con agua destilada, y coloreadas con el reactivo de Schiff de Coleman por 15 min; lavadas con agua corriente tibia durante 10 min. Los núcleos fueron contrastados con Hematoxilina de Hierro por 30 seg. y finalmente, las muestras fueron deshidratadas y montadas en medio resinoso (Entellan).

4.4.4.- Histoquímica de Lectinas:

Para la evaluación mediante histoquímica de lectinas fueron utilizadas las siguientes lectinas: DBA con afinidad a α -N-acetil-D-galactosamina, UEA I, afín a la α -L-fucosa y Con-A, afín a α -D-manosa y a α -D-glucosa (a una dilución 1:50) las cuales estaban unidas a peroxidasa.

Las muestras fueron desparafinadas como se describió previamente, e hidratadas con agua destilada. Una vez hidratadas, se bloqueó la peroxidasa endógena incubando las muestras con peróxido de hidrógeno por 5 min. a temperatura ambiente. Luego fueron

lavadas en TBS + cationes (0.05M Tris-HCl pH 7.8 conteniendo NaCl (150Mm), CaCl₂ (0,10 mM) y MgCl₂ (0.10mM)) durante 2 min (2 veces), posteriormente incubadas con la Lectina durante 3 horas en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Luego lavadas en TBS + cationes (5 min. Tres veces). y reveladas con DAB + H₂O₂ por 20 min. Posteriormente, se lavó con agua y se contrastó con Hematoxilina-Eosina de Meyers por 20 segundos. Se deshidrató en una batería de acetona / xilol y se realizó el montaje permanente.

4.4.5- Marcaje inmunohistoquímico

Se evaluaron las muestras para determinar la presencia de E-cadherina, para lo cual se empleó un anticuerpo α -E cadherina (G-10) (Santa Cruz Biotechnology) y el sistema de revelado sc-2050(Santa Cruz Biotechnology). La determinación inmunohistoquímica fue realizada siguiendo las instrucciones del proveedor, con algunas modificaciones.

En breve: la peroxidasa endógena fue inactivada incubando las muestras por 5 min con peróxido de hidrógeno. Las muestras fueron lavadas 2 veces con PBS por 5 min. Luego incubadas con el suero bloqueador (20 min) y posteriormente incubadas con el anticuerpo primario (dilución 1:50) durante 3 horas en cámara húmeda. Fueron lavadas con PBS (2 veces) e incubadas con el anticuerpo secundario biotilado, por 3 horas. Lavadas dos veces con PBS e incubadas con el complejo Streptavidina-HRP por 20 minutos, lavadas dos veces con PBS por 5 minutos y finalmente los inmunocomplejos fueron revelados con DAB + H₂O₂ durante 10 minutos. Los núcleos fueron contrastados con hematoxilina de Mayer por 20 segundos, seguidamente las muestras fueron lavadas con

agua desionizada, deshidratadas en un batería de acetona/xilol, y montadas de manera permanente.

Las observaciones y registros fotográficos se realizaron en un microscopio óptico invertido (marca: Olympus IX50, acoplado a una computadora, y los registros fueron tomados por el programa TV TUNER).

La intensidad del marcaje se estimó cualitativamente en base a una escala de cruces de la manera siguiente:

Valor de la escala	Intensidad de reacción
-	No hubo
+	Marcaje muy débil
++	Marcaje moderado
+++	Marcaje intenso

5. RESULTADOS

5.1 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE COLORACIÓN H/E

Al colorear las muestras mediante la coloración hematoxilina – eosina se obtuvo los siguientes resultados

5.1.1 *Rhodnius prolixus*

En la Fig. 12, se muestra un corte longitudinal del intestino medio de *R. prolixus*, allí podemos observar que en esta región el epitelio está conformado por al menos dos capas celulares (Fig. 12A) donde podemos diferenciar al menos tres tipos celulares diferentes según su morfología. A mayor aumento (Fig. 12B), podemos ver que uno de los tipos celulares (d) presenta un citoplasma granular y eosinófilo (i), en el cual existen zonas cercanas al núcleo que no se colorean. El núcleo (h) es pequeño, un tanto irregular y muy basófilo, el cual se sugiere, pertenecen a las células regenerativas. El segundo tipo celular, corresponde a las células columnares (b). Formado por células cilíndricas que presentan un citoplasma (g) el cual es basófilo hacia la región apical mientras que en la región supranuclear es levemente eosinófilo y granular; su núcleo (e) es basal y eucromático; presenta un nucléolo excéntrico (f) muy prominente y muy basófilo. Además, se observa que la heterocromatina está distribuida en la periferia. En la zona apical de las células columnares, se pueden ver las microvellosidades (j) formando un borde en cepillo, estas son muy cortas, son eosinófilas y refringentes. El tercer tipo celular (c) lo ubicamos entre las células columnares, se caracteriza por la morfología de la célula y del núcleo, además por la intensidad de la coloración. Las células tienen forma un tanto redondeada, con un núcleo (e) también redondeado que ocupa la mayor parte del citoplasma (g) de la célula. Al igual que el núcleo de las células columnares, la cromatina se colorea poco en la parte central, pero alrededor del nucléolo y en la periferia de la misma, presenta una coloración muy basófila. Se observa un nucléolo excéntrico (f) el cual es pequeño y muy basófilo. El citoplasma (g) granuloso de estas células, a diferencia del de las células columnares, es basófilo.

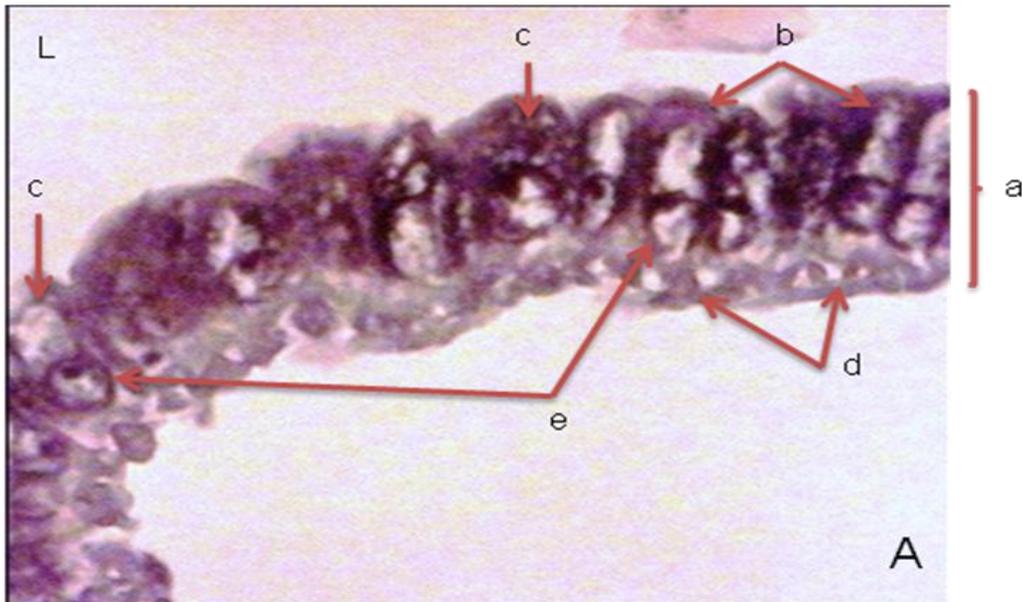


Fig. 12A.- C.L. intestino medio de *R. prolixus*, (a) Epitelio, (b) Células columnares, (c) Células redondeadas, (d) Células regenerativas, (e) Núcleo de células epiteliales, (L) Lumen. Aumento: 400X

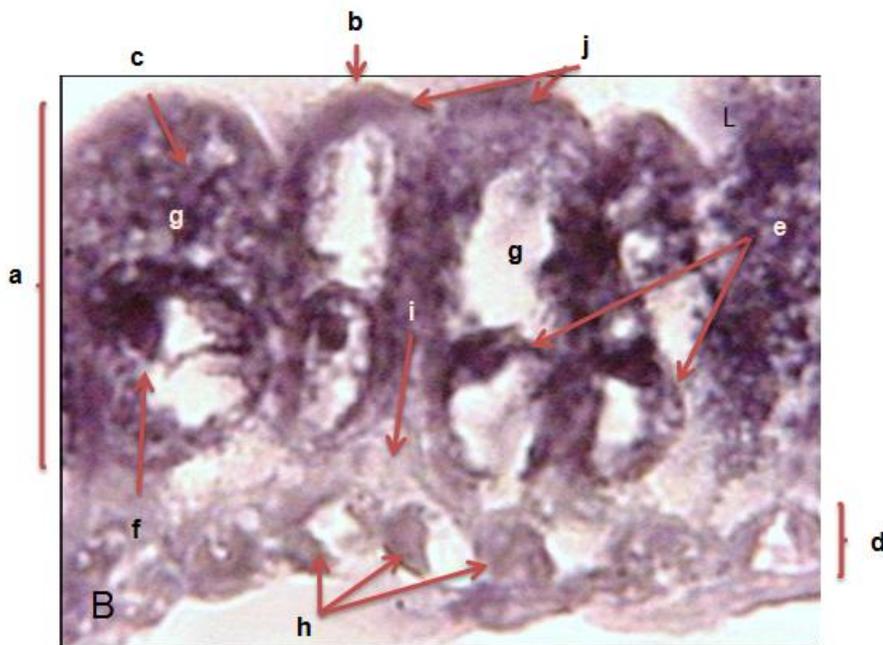


Fig. 12B.- C.L. Intestino medio de *R. prolixus*, (a) Epitelio, (b) Células columnares, (c) Células redondeadas, (d) Células regenerativas, (e) Núcleo, (f) Nucléolo, (g) Citoplasma, (h) Núcleo de células regenerativas, (i) Citoplasma de células regenerativas, (j) Microvellosidades, (L) Lumen. Aumento: 1000X

5.1.2 *Panstrongylus geniculatus*

En la figura 13(A y B) Se muestra un corte longitudinal del intestino medio de *P. geniculatus*. Allí se puede ver que el epitelio esta compuesto por una sola capa de células. En este epitelio se pueden diferenciar al menos dos tipos celulares. Las células columnares (b) con núcleos alargados (e) y heterocromáticos, que ocupan gran parte del citoplasma (g), mientras que el otro tipo celular, las células redondeadas (c) presentan un núcleo irregular y heterocromático (f) ubicado en el centro celular (fig.13B) Con respecto a su citoplasma (g), este es levemente eosinófilo y muy vacuolado. En la región apical se pueden observar las microvellosidades (d) las cuales son muy extensas con un tamaño similar al del cuerpo celular.

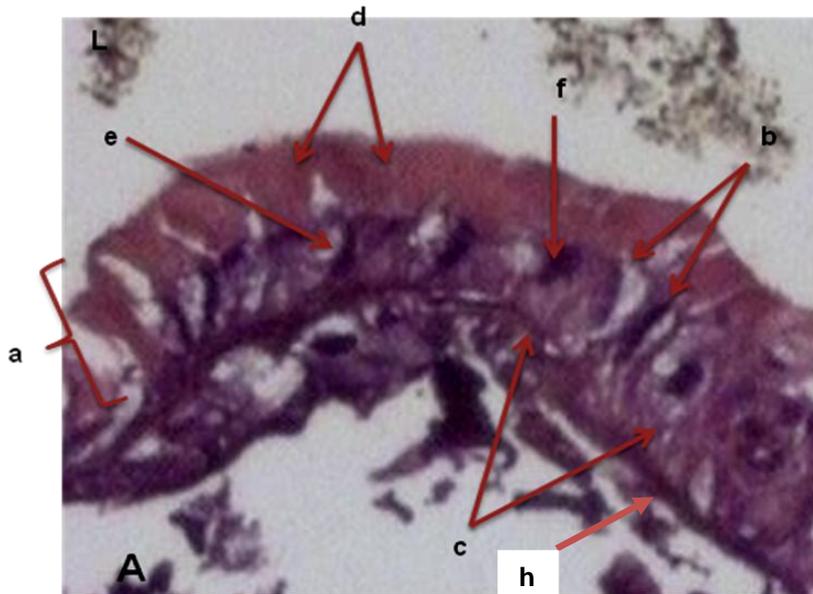


Fig. 13A.- C.L. intestino medio de *P. geniculatus*, (a) Epitelio, (b) Células columnares, (c) Células redondeadas, (d) Microvellosidades, (e) Núcleo de células columnares, (f) Núcleo de células redondeadas, (h) tejido muscular, (L) Lúmen. Aumento: 100X

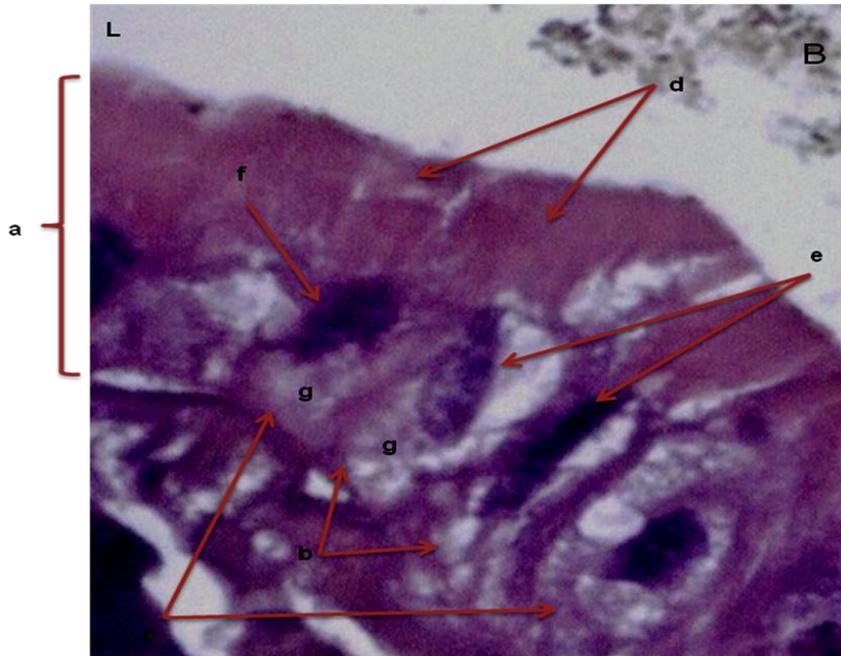


Fig. 13B.- C.L. Intestino medio de *P. geniculatus*, (a) Epitelio, (b) Células columnares, (c) Células redondeadas, (d) Microvellosidades, (e) Núcleo de células columnares, (f) Núcleo de células redondeadas, (g) Citoplasma, (L) Lumen, Aumento: 400X

Fig. 13.- Fotomicrografía del intestino medio de *P. geniculatus*. a distintos aumentos H/E

5.1.3 *Triatoma maculata*

En la figura 14A, tenemos una micrografía del intestino medio de *T. maculata*. Allí se observa que este epitelio (a) está conformado por al menos dos capas celulares, con un predominio de células cilíndricas muy altas. A mayor aumento, (Fig. 14B) se puede ver una primera capa en la zona basal, donde se ubican las denominadas células regenerativas (d). Estas son células muy pequeñas, con poco citoplasma el cual es levemente basófilo, y presenta un núcleo central (f) pequeño, muy heterocromático. En la siguiente capa encontramos al menos dos tipos celulares, que se diferencian por la disposición del núcleo en el axis de la célula y la coloración del citoplasma. El primer tipo, son las denominadas

células columnares (b), cuyo núcleo (e) es relativamente pequeño y está ubicado por debajo, pero cerca de la parte central de la célula. Presenta un citoplasma (g) que es levemente basófilo y muy vacuolado. El otro tipo celular, denominado células globulares (c), presenta un núcleo (h) pequeño y muy basófilo, ubicado en la parte basal de la célula (h); su citoplasma (g) no se colorea en la zona alrededor del núcleo, sin embargo en la zona apical, se observa una leve basofilia, y además se pueden observar gran cantidad de vacuolas. En la región luminal se presenta una gran cantidad de alimento, por lo cual, no se puede determinar la presencia de microvellosidades.

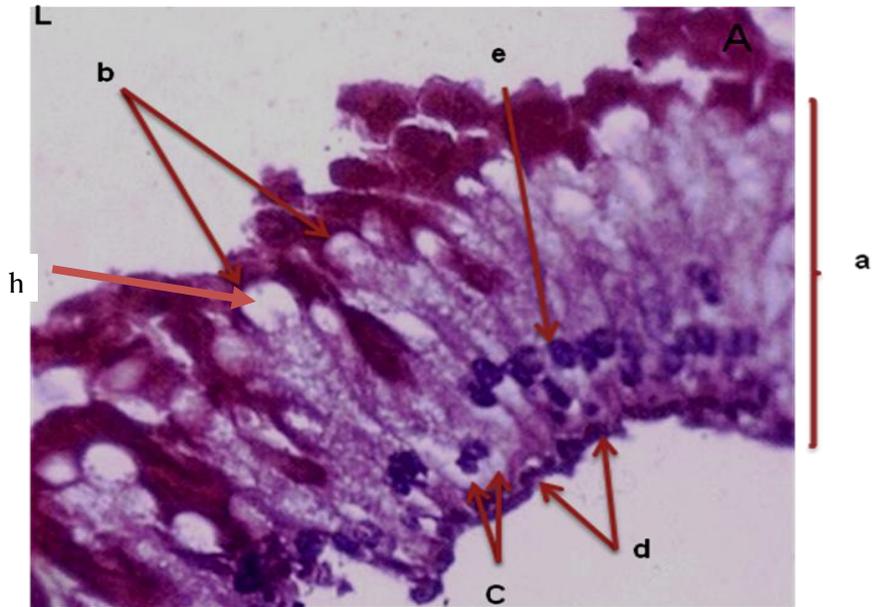


Fig. 14A.- C.L. intestino medio de *T. maculata*, (a) Epitelio, (b) Células columnares, (c) Células redondeadas, (d) Células regenerativas (e) Núcleo de células columnares, Vacuolas, (L) Lumen. Aumento: 100X

Fig. 14B.- C.L. intestino medio de *T. maculata*, (a) Epitelio, (b) Células columnares, (c) Células redondeadas, (d) Células regenerativas (e) Núcleo de células columnares, (f) Núcleo de células regenerativas, (h) Núcleo de células redondeadas, (g) Citoplasma, (L) Lumen. Aumento: 200X

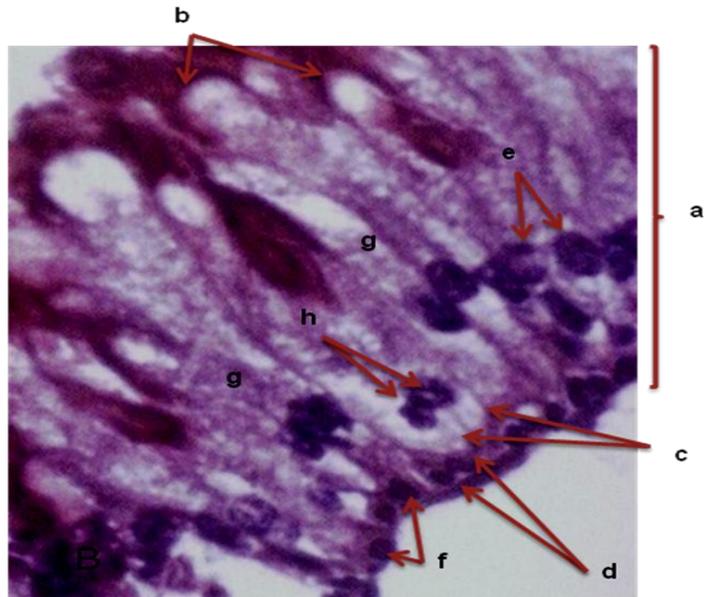


Fig. 14.- Fotomicrografía del intestino medio de *T. maculata* a distintos aumentos. H/E

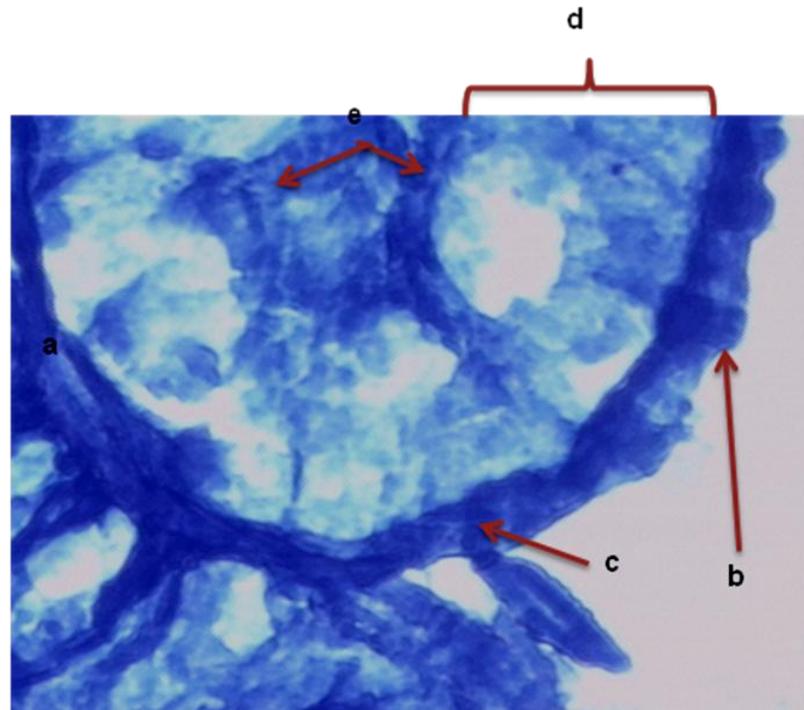
5.2.- EVALUACIÓN HISTOLÓGICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE COLORACIÓN PATH

Además de la coloración de rutina, para la evaluación del intestino medio de los triatomíneos en estudio, se utilizó la coloración hematoxilina fosfotúngstica obteniendo los resultados que se describen a continuación

5.2.1 *Rhodnius prolixus*

Esta coloración evidencia las proteínas que forman parte del músculo, reacciona a su vez con organelos como mitocondrias, retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Lynch, 1972). En la figura 15 se muestra un corte longitudinal del IM de *R prolixus*, Se puede observar una zona muy coloreada por debajo del epitelio (d), que corresponde al tejido muscular (a), el cual en insectos, tiene las fibras dispuestas de forma transversal (b) y oblicua (c), en este caso las fibras forman grupos de tres. La región nuclear que se

observa claramente con H/E, no se colorea, así mismo, aun cuando el citoplasma se colorea, no se pueden ver los límites celulares, ni se evidencian las microvellosidades presentes en las células epiteliales. Este tipo de coloración, no nos da mayor información de la obtenida con H/E



C.L. intestino medio de *R. prolixus*, (a) Tejido muscular, (b) Fibras transversales, (c) Fibras oblicuas, (d) Epitelio (e) Células columnares.

Fig. 15.- Fotomicrografía del intestino medio de *R. prolixus* PATH. 400X

5.2.2 *Panstrongylus geniculatus*

En el epitelio del IM de *P. geniculatus* con este método (figura 16), se evidenció la presencia del núcleo. Y basándonos en su forma y tamaño, y aún cuando no se evidencian los límites celulares, se pueden distinguir dos tipos celulares (como se describió previamente con H/E), las células columnares (b), con un núcleo (e) basal de forma irregular muy coloreado, en donde el citoplasma (g) granuloso se colorea levemente y en

este caso, se observa la presencia de vacuolas apicales de gran tamaño. En el segundo tipo celular, los núcleos (f) se colorean menos y se ubican en la parte basal de la célula, tienen forma redondeada y un gran tamaño, ocupa gran parte de la célula; las características del citoplasma son semejantes a las de las células columnares y en la zona apical de ambos tipos celulares, se observa la presencia de las microvellosidades

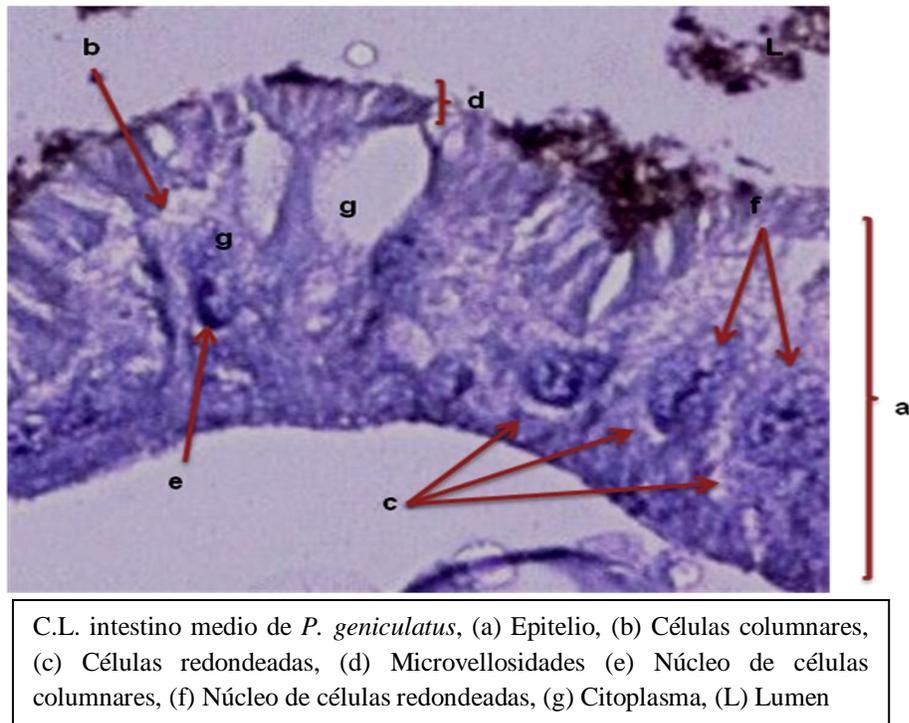
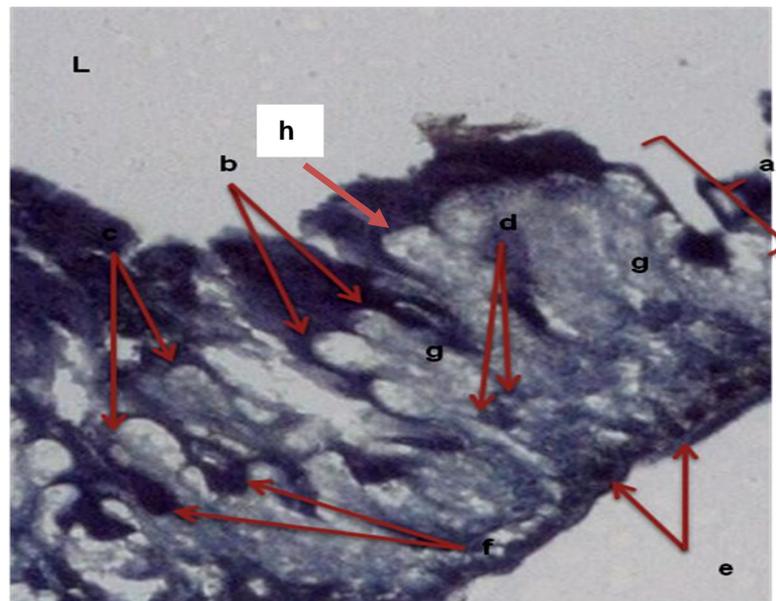


Fig. 16.- Fotomicrografía del intestino medio de *P. geniculatus* PATH. 200X

5.2.3.- *Triatoma maculata*

En el intestino de *T. maculata* (Figura 17), observamos las mismas estructuras y formas celulares descritas previamente (sección 5.1.3). La coloración es muy intensa a nivel del citoplasma como en el núcleo de las células epiteliales. Se observan en la zona basal del epitelio, muy coloreados los núcleos (e) de las células regenerativas (a). Por

encima de esta zona basal donde se ubican las células regenerativas, encontramos los dos tipos celulares previamente descritos, allí podemos ver que los núcleos se ubican a diferentes altitudes. El citoplasma (g) muestra una gran cantidad de gránulos y está muy vacuolado, principalmente en la zona apical. A diferencia de lo observado en la Fig.14 en esta fotomicrografía se evidenció la presencia de las microvellosidades (h) típicas de las células absortivas



C.L. intestino medio de *T. maculata*, (a) Epitelio, (b) Células columnares, (c) Células redondeadas, (d) Núcleo de células columnares, (e) Núcleo de células regenerativas, (f) Núcleo de células redondeadas, (g) Citoplasma, (h) microvellosides, (L) Lumen

Fig. 17.- Fotomicrografía del intestino medio de *T. maculata* PATH. 200X

5.3 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE COLORACIÓN PAS

La coloración PAS, es una coloración que se emplea para evidenciar la presencia de carbohidratos en general. Esta técnica se basa en la reacción que tiene el reactivo de Schiff con los grupos aldehídos de los carbohidratos liberados por la oxidación del ácido peryódico, formando así, compuestos insolubles color púrpura.

5.3.1 *Rhodnius prolixus*

Cuando observamos estas fotomicrografías (figura 18), se evidencia que en la zona apical de las células se produce una mayor coloración, lo cual sugiere que es en esta zona donde hay mayor concentración de carbohidratos. En la fig. 18A, se observa el epitelio (a) bordeado por tejido muscular (b); a este aumento (200X), se aprecia una sola capa de células, sin embargo a mayor aumento (fig. 18B), se distinguen dos capas celulares similar a lo observado con la tinción H/E.

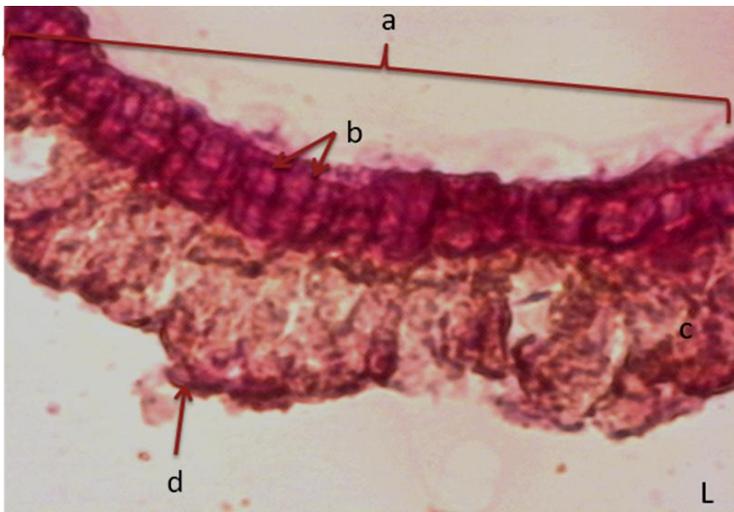


Fig. 18A.- C.L. intestino medio de *R. prolixus*, (a) Tejido muscular, (b) fibras musculares transversales, (c) Epitelio, (d) Microvellosidades, (L) Lumen. Aumento: 200X

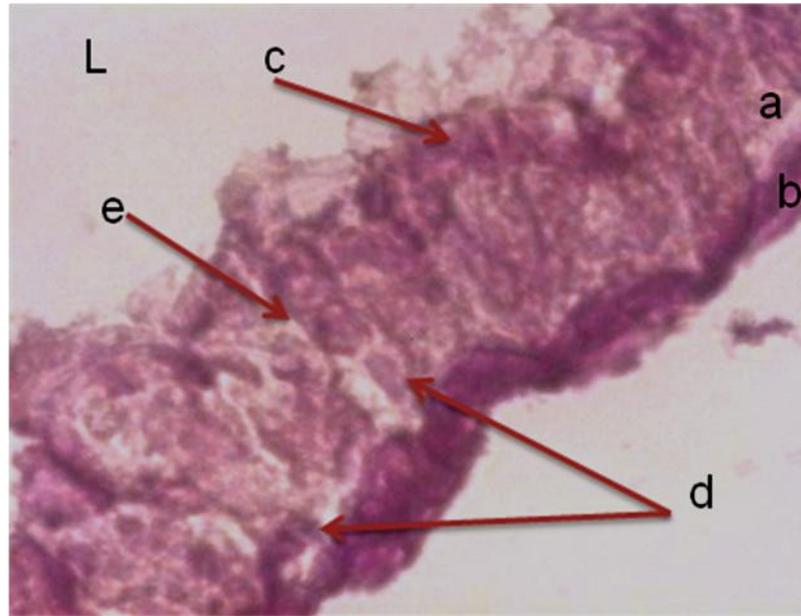


Fig. 18B.- C.L. Intestino medio de *R. prolixus*, (a) Tejido muscular, (b) fibras musculares oblicuas, (c) Epitelio, (d) Núcleo de células regenerativas, (e) Células regenerativas. Aumento: 400X

Fig. 18.- Fotomicrografía del intestino medio de *R. prolixus* a distintos aumentos. PAS

5.3.2 *Panstrongylus geniculatus*

En la Fig. 19, se muestra un corte longitudinal del intestino medio de *P. geniculatus* coloreado con PAS, allí se observa que el músculo es la zona que presenta mayor intensidad en la coloración, lo cual nos indica que dicha zona es rica en carbohidratos. Además del tejido muscular (a), en el epitelio (b) se observó distintas regiones en las cuales se produjo reacción con esta tinción. Siendo más evidente en la zona apical de las células columnares (e) principalmente a nivel de las microvellosidades (c) y en el núcleo de estas células (d). También se puede ver que existe una gran cantidad de gránulos PAS - positivo distribuidos en el citoplasma de los distintos tipos celulares que conforman éste epitelio.

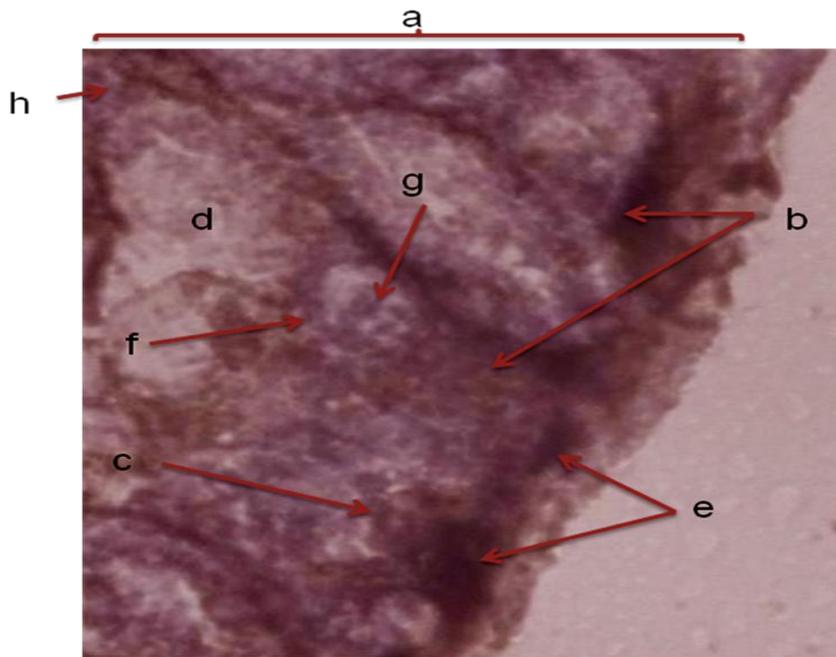


C.L. de intestino medio. (a) Epitelio, (b) Tejido muscular, (c) Microvellosidades, (d) Núcleo de células columnares, (e) Célula columnar, (L) Lumen.

Fig. 19.- Fotomicrografía del Intestino medio de *P. geniculatus* PAS. 400X

5.3.3 *Triatoma maculata*

En la figura 20, tenemos una micrografía de un corte longitudinal del intestino medio de *T. maculata*. En ella se puede evidenciar que en el citoplasma de las células que conforman el epitelio (a) están presentes una gran cantidad de gránulos que son PAS positivo. Sin embargo, esta reacción es muy débil con respecto a la observada en el epitelio de las especies descritas previamente, lo cual indica que la cantidad de carbohidratos en las células epiteliales de éste organismo es muy baja.



C.L de Intestino medio *T. maculata* (a) Epitelio, (b) Células epiteliales, (c) Células regenerativas, (d) Citoplasma, (e) Núcleo de células regenerativas, (f) Núcleo de células columnares, (g) nucléolo, (h) Microvellosidades

Fig. 20.- Fotomicrografía del intestino medio de *T. maculata* PAS. 400X

5.4 IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN EL INTESTINO

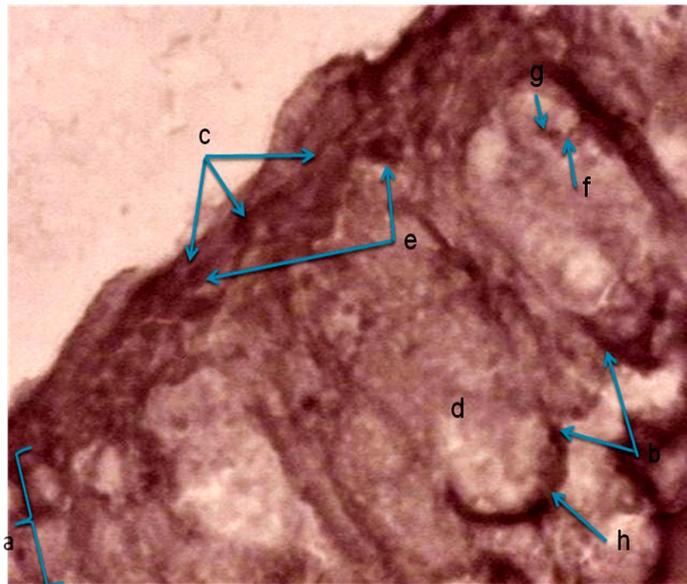
MEDIO DE LOS TRIATOMINOS

Para la identificación de algunos carbohidratos presentes en el intestino medio de los triatominos estudiados se utilizaron tres lectinas con especificidades diferentes, estas fueron: DBA; Con-A y UEAI. Los resultados obtenidos mediante histoquímica de lectinas fueron los siguientes:

5.4.1 Expresión de α -N-acetil-D-galactosamina con lectina DBA

5.4.1.1 *Rhodnius prolixus*

En la fig. 21, se muestra una fotomicrografía del intestino medio de *R. prolixus* marcados con DBA. En ella observamos una reacción positiva en los distintos tipos celulares presentes. Evidenciándose una reacción intensa a nivel de las microvellosidades de las células columnares (h) y en los núcleos de las células regenerativas (e). En el citoplasma de las células regenerativas se observó una reacción moderada mientras que en el citoplasma y en el núcleo de los otros tipos celulares, no hubo reacción.



C.L. de intestino medio de *R. prolixus*, (a) Epitelio, (b) Células columnares, (c) Células regenerativas, (d) Citoplasma, (e) Núcleo de células regenerativas, (f) Núcleo de células columnares, (g) Nucléolo, (h) Microvellosidades.

Fig. 21.- Fotomicrografía del intestino medio de *R. prolixus* con lectina DBA. 400X

5.4.1.2 *Panstrongylus geniculatus*

Cuando se evaluó el intestino medio de *P. geniculatus* (fig. 22) con DBA, se observó en las células columnares (b) una reacción moderada en las microvellosidades (j) y los nucléolos (g) mientras que en los núcleos de las células regenerativas (i), se pudo ver una reacción más intensa. Además se produjo una débil reacción en la cromatina de los núcleos de las células columnares (f) y de las células redondeadas (h). Cuando nos ubicamos en el citoplasma podemos ver que se produjo una intensa reacción con la lectina en el citoplasma (e) de las células regenerativas (d), mientras que en el citoplasma de las células columnares y globulares se observó la presencia de algunos gránulos distribuidos de manera irregular, los cuales mostraron una reacción débil. Este resultado nos indica, que podemos encontrar glicoconjugados con grupos terminales N-acetil-D-galactosamina en las zonas de las células donde hubo reacción positiva. Es importante destacar, que se evidenció la presencia de células regenerativas (d), las cuales no habían sido observadas con las coloraciones previas. Las mismas se ubican por debajo de los otros dos tipos celulares, tienen forma de pirámide y su núcleo (i) es prominente, de forma irregular y está ubicado en la región apical de la célula.

C.L de intestino médio de *P. geniculatus*,
 (a) Epitelio, (b) Células columnares, (c)
 Células redondeadas, (d) Células
 regenerativas, (e) Citoplasma, (f) Núcleo
 de células columnares, (g) Nucléolo, (h)
 Núcleo de células redondeadas, (i) Núcleo
 de células regenerativas, (j)
 Microvellosidades, (k) Músculo

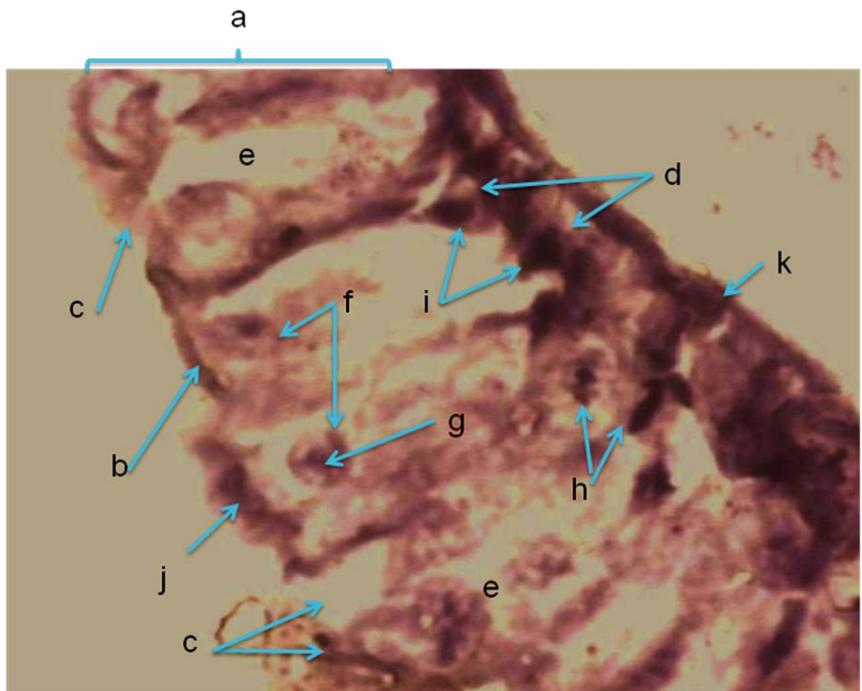
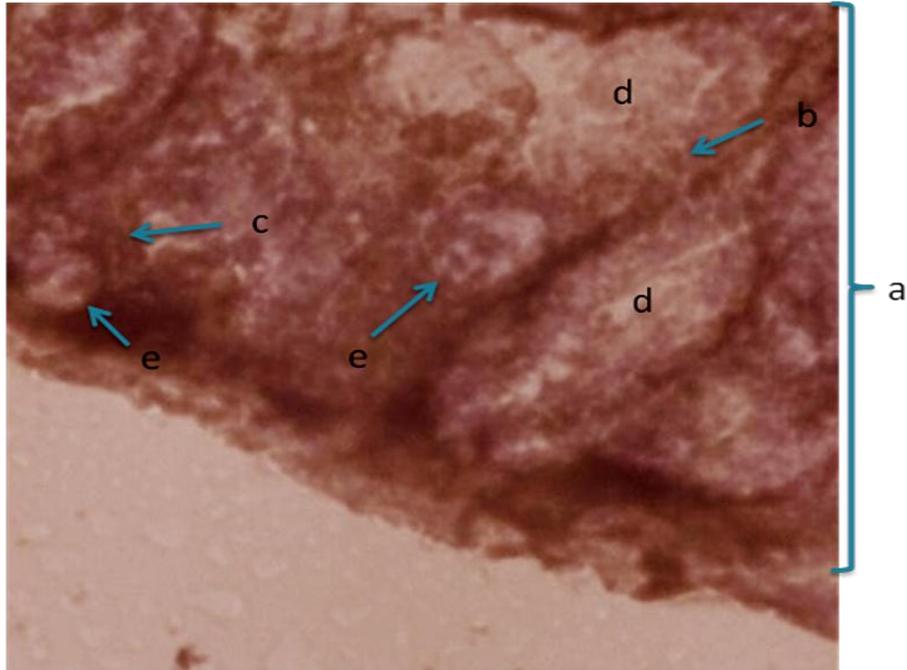


Fig. 22.- Fotomicrografía del intestino medio de *P. geniculatus* con lectina DBA. 400X

5.4.1.3 *Triatoma maculata*

En la fig. 23 se muestra un corte longitudinal del I.M marcado con la lectina DBA, en ella se puede observar que las células presentes en el epitelio tienen una reacción positiva con la lectina; esta reacción es muy evidente en las células regenerativas (c), ubicadas en la región basal de epitelio, son las que muestran una reacción intensa con DBA, lo cual sugiere que hay una mayor proporción de α -N-acetil-D-galactosamina. Además en esta micrografía, se observa una intensa reacción en las uniones laterales entre algunas células. También se puede ver que en el citoplasma de las células globulares y columnares existe una gran cantidad de gránulos muestran una reacción moderada con esta lectina, los cuales se ubican principalmente en la región basal de las células.



C.L de intestino medio de *T. maculata*, (a) Epitelio, (b) Células columnares, (c) Células regenerativas, (d) Citoplasma, (e) Núcleo, (L) Lumen

Fig. 23.- Micrografía del intestino medio de *T. maculata* con lectina DBA. 400X

5.4.2 Expresión de α -D-manosa y/o α -D-glucosa con lectina Con-A

5.4.2.1 *Rhodnius prolixus*

En la fig. 24 se muestra un corte longitudinal del I.M de *R. prolixus* marcado con la lectina Con-A, la cual es específica para aquellos carbohidratos que presentan grupos terminales α -D-manosa y/o α -D-glucosa por lo que una reacción positiva a este tratamiento nos determinará en que estructuras y zonas de la célula encontramos carbohidratos de este tipo. En la fig. 24A, se puede ver que las células regenerativas (c), el músculo (i), y en las

uniones laterales de las células epiteliales, se produjo una reacción intensa con esta lectina además se observó una reacción moderada en el citoplasma (h) de las células tanto columnares (b) como en las redondeadas (d), lo cual es más evidente en la fig. 24B. Se observa en esta última figura que los núcleos de las células redondeadas (d) y columnares (c) no se marcan con estas lectinas a diferencia de los núcleos de las células regenerativas (g).

Al marcar tanto el intestino medio de *P. geniculatus* como el de *Triatoma maculata*, con Con-A, no se observó reacción.

Además se realizó el marcaje del intestino medio de los tres triatominos estudiados con la lectina UEA I, la cual identifica residuos de α -L-Fucosa, sin embargo no se observó reacción, lo cual indica que este tipo de azúcares no están presentes en el intestino medio de estas especies.

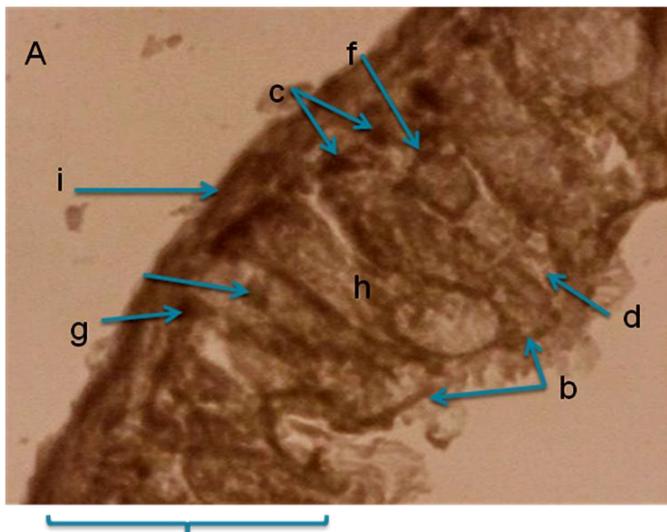


Fig. 24A.- C.L de intestino medio de *R. prolixus*, Con-A, (a) Epitelio, (b) Células columnares, (c) Células regenerativas, (d) Células redondeadas, (e) Núcleo de células columnares (f) Núcleo de células redondeadas, (g) Núcleo de células regenerativas (h) Citoplasma, (i) Músculo. Aumento: 200X

Fig. 24B.- C.L de intestino medio de *R. prolixus*, Con-A, (a) Epitelio, (b) Células columnares, (c) Células regenerativas, (d) Células redondeadas, (e) Nucléolo de células columnares, (g) Núcleo de células regenerativas (h) Citoplasma, (i) Músculo. Aumento: 400x

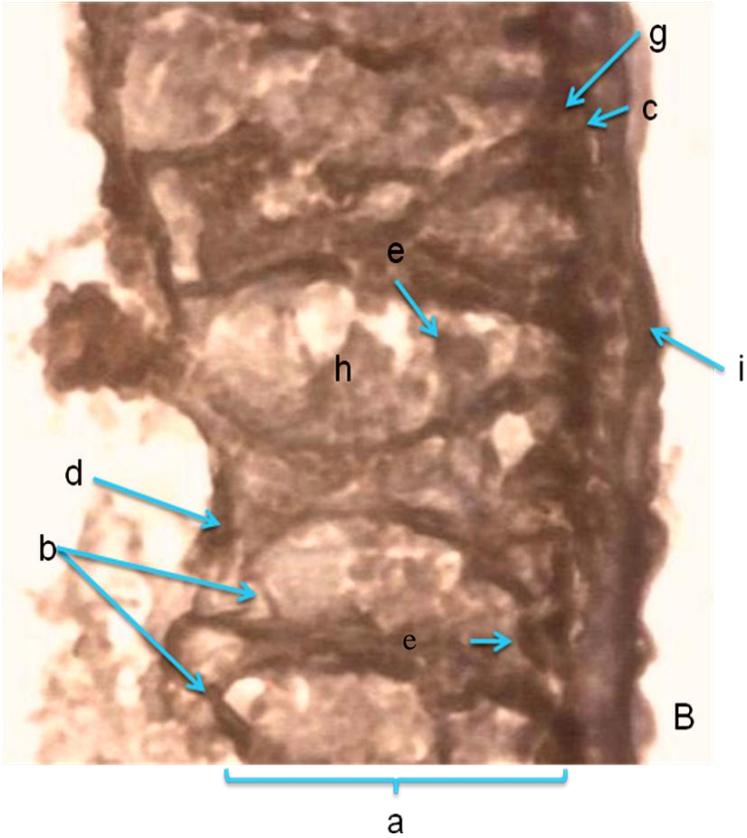


Fig. 24.- Fotomicrografías del intestino medio de *R. prolixus* a distintos aumentos con lectina Con-A.

5.5.- EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA E-CADHERINA EN EL INTESTINO MEDIO DE LAS TRES ESPECIES

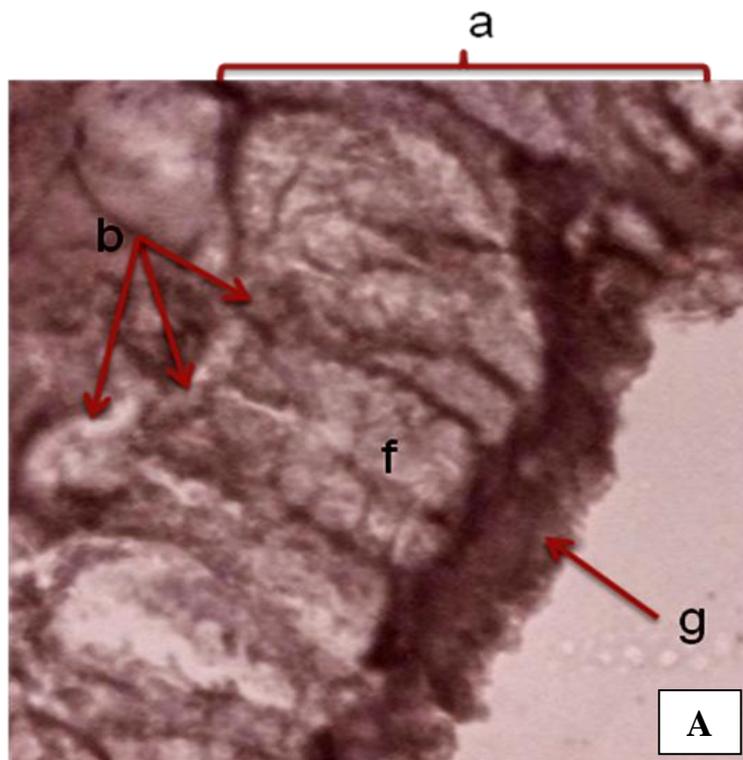
Las muestras de intestino medio de las tres especies estudiadas, fueron marcadas con el anticuerpo E-cadherina, los resultados obtenidos son los siguientes:

5.5.1 Inmunomarcaje del intestino medio de *R. prolixus* con E-cadherina

En la figura 25, se muestra un corte longitudinal del I.M de *R. prolixus*, marcado con E-cadherina. En la fig. 25A se puede ver el marcaje en la región lateral de las células, evidenciándose la forma de las mismas. A mayor aumento (Fig. 25B), se observa que las

células que conforman este epitelio tienen longitudes diferentes, sin embargo hacen contacto con la membrana basal, evidenciándose que es un epitelio simple pseudoestratificado.

En ambas micrografías, se observó una reacción muy intensa a nivel de la periferia de las células del epitelio (a), en la zona lateral adyacente a las células vecinas, lo que nos indica que en este triatomino, hay presencia de estas proteínas de adhesión.



C.L. de intestino medio de *R. prolixus*, (a) Epitelio, (b) Células columnares, (c) Células redondeadas, (d) Células regenerativas, (e) Núcleo de células redondeadas, (f) Citoplasma, (g) Músculo.

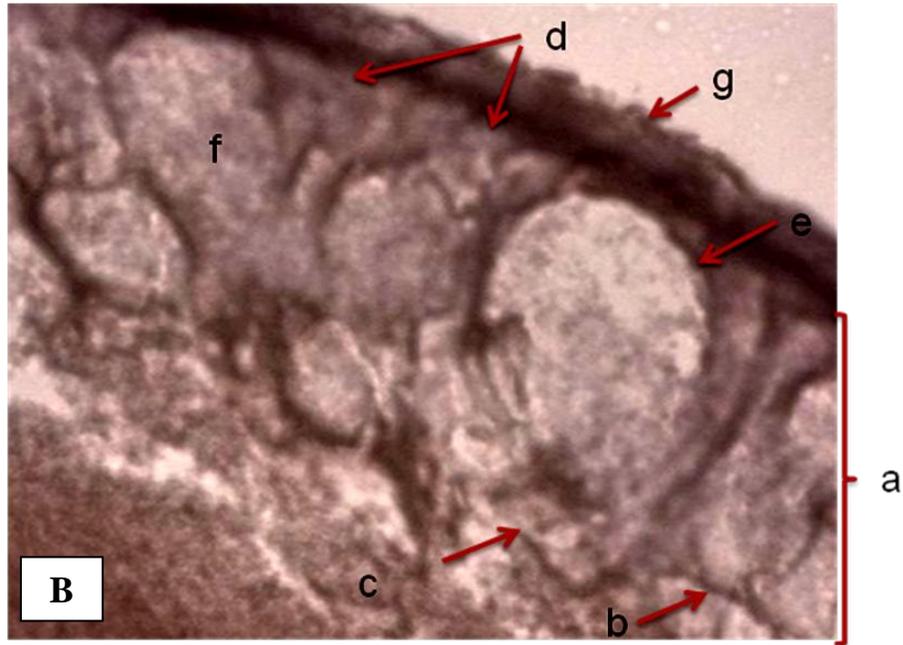
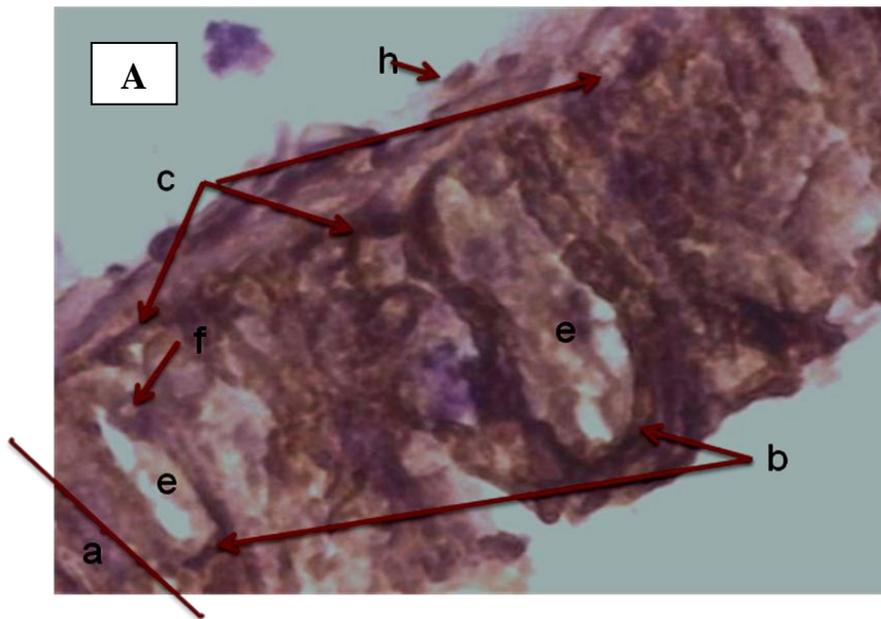


Fig. 25.-Fotomicrografía del intestino medio de *R. prolixus* marcado con E-cadherina. 400X

5.5.2 Inmunomarcaje del intestino medio de *P. geniculatus* con E-cadherina

En la figura 26, tenemos micrografías de cortes longitudinales del intestino medio de *P. geniculatus* a distintos aumentos. En la fig. 26A, tenemos un corte longitudinal de una sección del intestino, pudiendo observarse que el epitelio (a) tiene un marcaje muy intenso alrededor de las células pudiendo observar la morfología cúbica alta de las células columnares (b), las células regenerativas, ubicadas en la parte basal con su forma de gotas. En la fig. 26B, en otra sección del epitelio, encontramos una célula redondeada (d) entre células columnares (b); aquí también tenemos una reacción positiva pero menos intensa que el de las células columnares, a nivel de la región lateral de la células. A su vez, se observan una reacción positiva en la periferia del núcleo (g) de la célula redondeada, mientras que el citoplasma no tiene reacción.

Ese marcaje positivo alrededor de las células, nos indica la presencia de las e-cadherina, y en consecuencia es en esta zona en donde encontramos uniones desmosomas. Sin embargo, podemos observar que la intensidad reacción es distinta, siendo mayor entre células del mismo tipo.



C.L de intestino medio de *P. geniculatus*, (a) Epitelio, (b) Células columnares, (c) Células regenerativas, (d) Células redondeadas, (e) citoplasma, (f) Núcleo, (g) Nucléolo, (h) Músculo

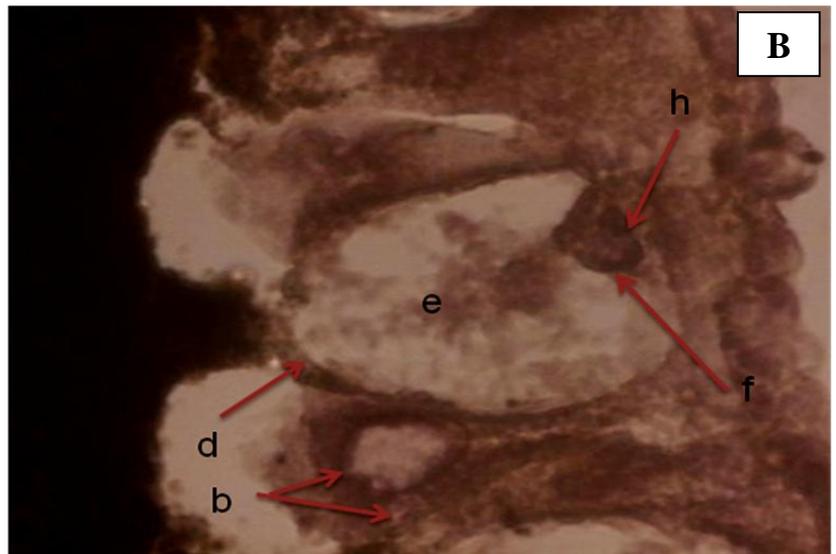
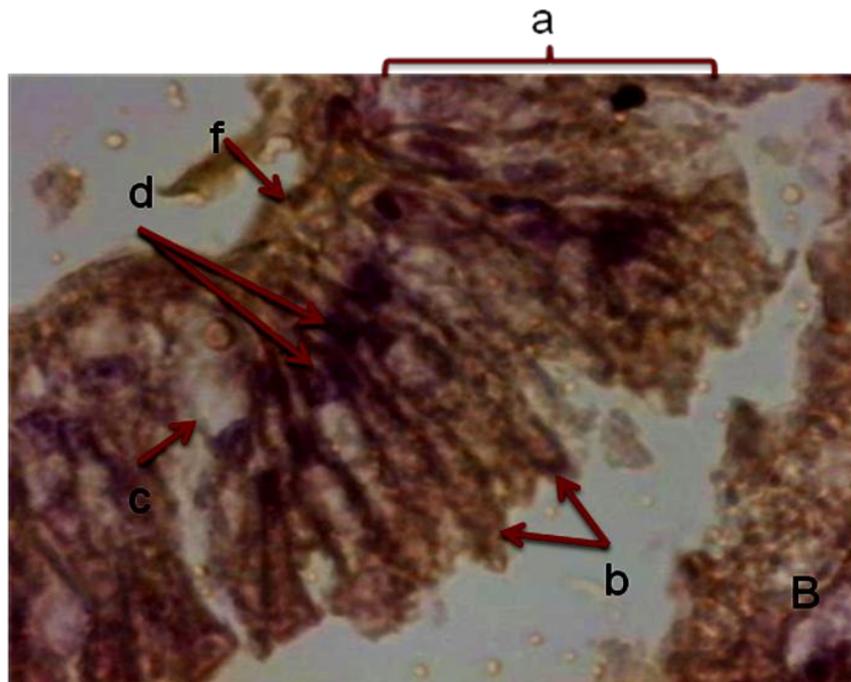


Fig. 26.- Fotomicrografía del intestino de *P. geniculatus* marcado con E-cadherina. 400X

5.5.3 Inmunomarcaje del intestino medio de *T. maculata* con E-cadherina

En la figura 27, se muestra una micrografía con un corte longitudinal del intestino medio de *T. maculata* marcado con el anticuerpo E-cadherina. Allí podemos ver una intensa reacción con este anticuerpo en la región lateral a nivel de la membrana celular de las células, entre célula y célula, podemos observar dos tipos celulares a lo largo del epitelio, las células columnares (b), alargadas y de núcleo (d) excéntrico, y las células redondeadas (c) menos delgadas que las columnares y con el núcleo céntrico. Apreciamos ambos tipos celulares tienen los núcleos a distintos niveles, pero todas las células tocan la membrana basal, por lo que el epitelio que aquí tenemos, y al igual que *R. prolixus* y *P. geniculatus* es un epitelio simple pseudoestratificado.



C. L. del intestino medio de *T. maculata*, (a) Epitelio, (b) Células columnares, (c) Células redondeadas, (d) Núcleo, (f) Músculo

Fig. 27.- Fotomicrografía del intestino medio de *T. maculata* marcado con E-cadherina. 400X

6.- DISCUSIÓN

Desde el punto de vista histológico, son pocos los trabajos realizados en el intestino de triatominos. Sin embargo, en otros grupos taxonómicos de insectos en general, se ha reportado que el epitelio que recubre el I.M de los insectos es un epitelio simple, en el cual se reconocen de tres a cuatro tipos celulares entre los cuales tenemos: células columnares, regenerativas, globulares y endocrinas (Klowden, 2007). En este trabajo encontramos que el epitelio del intestino medio de las especies de triatominos estudiadas está formado por tres tipos celulares: células regenerativas, las cuales están ubicadas en la parte basal del epitelio formando aparentemente una capa; las células columnares y células denominadas por nosotros “células redondeadas”, las cuales se ubican aparentemente sobre la capa de células regenerativas. Las células denominadas redondeadas podrían corresponder a las denominadas células globulares o endocrinas (Klowden, 2007).

Sin embargo, para determinar qué tipo celular es, se debería realizar otras pruebas que podrían ser, por ejemplo, pruebas bioquímicas u otros estudios inmunohistoquímicos. Este tipo de células no es tan abundante en el epitelio, como lo son las células columnares. El tercer tipo celular observado en el epitelio del I.M. de las especies evaluadas. Este tipo celular presenta microvellosidades, formando un borde en cepillo, lo cual es típico de las células absorptivas, resultado similar al obtenido por otros autores (Gutiérrez y Burgos, 1978; Billingsley, 1988; Rosch y col., 2010) en *T. infestans*, *R. prolixus* y *T. vitticeps* respectivamente. La presencia de microvellosidades en las células que conforman este epitelio está relacionada con la función de esta región del intestino, pues es en el mesenterón donde se inician los procesos metabólicos para la absorción de los nutrientes y eliminación de desechos (Lehane y Billingsley, 1996).

Además, se ha reportado que este tipo celular está relacionado con el transporte de agua en el intestino (Billingsley, 1988) en *R. prolixus*.

Aún cuando hemos encontrado que el epitelio del I.M de las tres especies estudiadas está conformado por estos tres tipos celulares, se observaron diferencias en la morfología del epitelio ya que *R. prolixus* presenta un epitelio pseudoestratificado cúbico y las microvellosidades de las células absortivas son relativamente pequeñas (Fig. 12). El epitelio del I.M de *P. geniculatus* también se puede definir como pseudoestratificado cúbico. Sin embargo, en comparación, el tamaño de las microvellosidades es muy largo, puesto que las mismas tienen un tamaño similar al tamaño del cuerpo celular (Fig. 13). Aún cuando en algunos especímenes, estas microvellosidades se ven más cortas (Fig.22).

Es importante destacar que las muestras procesadas son de especímenes distintos y no esperábamos encontrar estas diferencias en la extensión de las microvellosidades, dado que en las otras especies estudiadas no se observó estas diferencias. Teóricamente todos los especímenes tenían el mismo tiempo de ayuno y en trabajos de microscopía electrónica en el intestino medio en *R. prolixus* y *T. vitticeps*, basados en la morfología de las células de este epitelio durante diferentes tiempos de ayuno (Billingsley, 1988; Rosch y col., 2010), reportaron que no existen diferencias en el volumen de los diferentes tipos celulares ni en el tamaño de las microvellosidades. Sin embargo, en *Periplaneta americana* hay una disminución del volumen celular del epitelio del I.M después de 4 semanas de ayuno, lo cual se relaciona con el hábito alimenticio de la misma (Cit. In. Rosch y col, 2010), por lo cual sugerimos que podría existir algunas diferencias en los hábitos alimenticios de *P. geniculatus*, o que en este organismo puedan existir diferencias en el epitelio según el tiempo de ayuno, para lo cual sería necesario hacer un estudio del epitelio a distintos tiempos de ayuno.

En *T. maculata* se observó un epitelio pseudoestratificado cilíndrico alto con microvellosidades, cuya longitud es intermedia (Fig. 14 y 17) con respecto al de las otras dos especies. Estas diferencias morfológicas podrían estar relacionadas con características propias de cada género, esto queda por ser dilucidado.

En general, el intestino medio de los insectos está rodeado por una capa muscular circular interna y una capa muscular longitudinal, en la cual se encuentran las terminaciones nerviosas que generan una serie de movimientos peristálticos permitiendo así, que el alimento pase a lo largo del tracto digestivo Klowden (2007).

A diferencia de lo reportado previamente por otros autores (Wanderley y col., 2006; Rosch y col., 2010) hemos observado la presencia de una sola capa de músculo estriado que rodea el epitelio del I.M. de estos triatomíneos. Esto podría deberse a que durante el procesamiento, al eliminar los restos de tejido conjuntivo, se haya perdido una de las capas del tejido muscular.

Rosch y col., 2010 encontraron una gran cantidad de vacuolas y gránulos de carbohidratos en las células epiteliales de I.M. de *T. vitticeps*, asociándolas con otra de las funciones que tiene esta región del intestino, y que fue descrita por Billingsley (1988) en *R. prolixus*, como es la de almacenamiento de lípidos y carbohidratos. En base a esto y a que hemos observado gran cantidad de vacuolas en las células epiteliales (Fig. 14, 16 y 17), realizamos la coloración PAS para determinar la presencia de residuos de carbohidratos y evidenciar si estas células son similares a las células caliciformes presentes en el epitelio del intestino de vertebrados (Ross y Pawlina, 2005). Nuestros resultados indican que todos los tipos celulares presentes en el I.M. de las tres especies evaluadas, presentan una

reacción positiva diferente en cada especie, por lo que interpretamos como diferencias en la cantidad de carbohidratos presentes en el epitelio de las mismas, siendo, desde un punto de vista cualitativo, menor la cantidad de carbohidratos presentes en las células del epitelio de *T. maculata*. Por lo cual podríamos sugerir que en *R. prolixus* y *P. geniculatus* hay un mayor almacenamiento de nutrientes en forma de carbohidratos y tal vez en *T. maculata* el almacenamiento de nutrientes sea principalmente en forma de lípidos.

En vista de estos resultados se realizó una evaluación mediante histoquímica de lectinas. Éstas se han utilizado frecuentemente para identificar, caracterizar y aislar nuevas subpoblaciones de células, en base a la presentación sobre la superficie celular de grupos carbohidratos específicos. En este sentido y con el ánimo de realizar una mayor caracterización de los tipos celulares presentes en epitelio del I.M. de estas especies, se utilizaron tres lectinas. Una de éstas fue la DBA, la cual reconoce residuos carbohidratos de α -N-acetil-D-galactosamina; este tipo de carbohidrato ha sido relacionado con el proceso de diferenciación celular (Nash y col., 2007). Estos autores determinaron que se produce una disminución en la expresión de este carbohidrato a medida que ocurre la diferenciación celular, por lo cual la proponen como una lectina útil en la caracterización de células madre embrionarias de ratón. Aún cuando el estudio realizado por Nash y col, (2007) fue en un modelo murino, en esta investigación empleamos esta lectina para identificar las células regenerativas, que son consideradas como células madre, las cuales van a diferenciarse en los distintos tipos celulares que conforman el epitelio intestinal (Klowden, 2007). Es importante mencionar que mediante coloraciones de rutina, no fue posible evidenciar este tipo celular en el epitelio del I.M. de *P. geniculatus*, como sí lo fue en *R. prolixus* y *T. maculata*, donde fueron muy evidentes. Sin embargo, al realizar el marcaje con DBA, las

células madres pudieron ser evidenciadas (Fig. 22). Además del marcaje de las células regenerativas, se observó reacción en los otros tipos celulares presentes en el epitelio. No obstante, este marcaje fue diferente según las especies, principalmente a nivel del citoplasma, sugiriendo una diferencia en el almacenamiento de glucoconjugados con residuos α -N-acetil-D-galactosamina.

Es importante mencionar, que las microvellosidades de las células absorptivas del epitelio, mostraron una intensa reacción con dicha lectina indicando la presencia de gran cantidad de residuos tipo α -N-acetil-D-galactosamina.

Otras lectinas empleadas en la caracterización del epitelio del I.M. de estas especies, fueron: UEA I y Con-A, las cuales reconocen residuos tipo α -Fucosa y residuos α -D-manosa y/o α -D-glucosa respectivamente. Nuestros resultados indican que en el epitelio del I.M. de los triatomíneos estudiados no están presentes residuos tipo α -Fuc., ya que no se observó reacción al realizar el marcaje con la lectina UEA I. Además, encontramos que con Con-A, sólo hubo reacción en el epitelio del I.M. de *R. prolixus* y principalmente en las microvellosidades, indicando la presencia de residuos tipo α -D-manosa y/o α -D-Glucosa.

Alves y col., (2007) determinaron que existe una relación entre los carbohidratos presentes en el epimastigote de *T. cruzi* y la adhesión del mismo en el intestino medio de *R. prolixus* y determinaron que los principales azúcares involucrados en dicho proceso son: N-acetilgalactosamina, N-acetilmanosamina, N-acetilglucosamina, D-galactosa y D-manosa. Así mismo, Leal y col., (1999) demostraron que los receptores de manosa localizados sobre la superficie de los cardiomiocitos del hospedador vertebrado están involucrados en la unión e internalización del parásito.

Los resultados obtenidos mediante el marcaje con las lectinas son muy importantes desde el punto de vista de la relación parásito – hospedador. En este sentido, se conoce

que en muchos tipos celulares de los insectos, las lectinas juegan un papel importante en la interacción célula – célula, y muchos estudios han sido dirigidos a determinar el papel de éstas en el proceso de adhesión del parásito a su hospedador. (Basseri, 2002; Aksoy y Uner, 2003). Mello y col. (1999) encontraron algunas lectinas en el intestino medio de *R. prolixus*, y Oliveira y Souza (2010) indican que el epitelio del I.M es la principal barrera a la invasión de parásitos. Sin embargo, *Trypanosoma rangeli* interacciona con las microvellosidades de algunas células epiteliales de *R. prolixus* mediante el flagelo o en las áreas de unión intercelular por la parte final posterior del protozoo, penetrando así al interior de la célula y posteriormente a la hemolinfa.

De igual manera podríamos pensar que la expresión de diferentes tipos de carbohidratos presentes en el intestino de estos insectos, son importantes en la interacción con el parásito

Finalmente se realizó una inmunotinción con E-cadherina, marcaje que nos permite evidenciar las uniones laterales entre las células, así como la forma y tamaño de los distintos tipos celulares, ya que la E-cadherina es una proteína transmembrana de la familia de las cadherinas, muy conservada a nivel de la escala evolutiva (Kunst y col, 1996), que se encuentra en el tejido epitelial en las uniones intercelulares (especializaciones de la membrana plasmática lateral y basal), tipo desmosomas en vertebrados y denominadas uniones septos en insectos. Esto le da al tejido, una mayor integridad celular, lo que es muy importante, pues dentro de las funciones las células epiteliales tenemos la del movimiento de iones y agua, lo que evita que el tejido se deforme (Hakim y Baldwin, 1984).

En nuestros resultados observamos, que en el epitelio del I.M de las tres especies, hubo un marcaje con esta proteína, evidenciándose la forma que tenían las células del

epitelio, y demostrando que todas las células hacen contacto con la lámina basal, aunque no todas alcancen la superficie, por lo que sugerimos, como ya hemos mencionado, que el epitelio del intestino medio de las tres especies, es un epitelio simple pseudoestratificado, en el que las células columnares, redondeadas y regenerativas están dispuestas en una sola capa, pero con sus núcleos a diferentes niveles, dando un falso aspecto de tener varias capas. Este resultado contrasta con las afirmaciones hecha por Burgos y Gutiérrez (1976) en *T. infestans*, y por Rosh y col. (2010) en *T. vitticeps*, que indican que el epitelio que recubre el intestino medio de estas especies es un epitelio simple.

Consideramos que este un trabajo pionero principalmente en lo referente a la descripción del intestino de *Panstrongylus geniculatus* y *Triatoma maculata*. Es importante mencionar que cuando conocemos la morfología de un órgano en particular, podemos inferir sobre su funcionamiento y, además, entender con mayor claridad la interacción parásito - vector.

En Venezuela, *R. prolixus*, *P. geniculatus* y *T. maculata*, son los principales vectores de la enfermedad de Chagas (Torrealba, 2008), y es conocido que parte de ciclo de vida del parásito se da en esta región del intestino, por lo que este estudio sirve como base para futuras investigaciones.

7. - CONCLUSIONES

- Se sugiere que el intestino medio de las tres especies está cubierto por un epitelio simple pseudoestratificado.
- En el epitelio del intestino medio de las tres especies encontramos tres tipos celulares: células absortivas llamadas células columnares y que presentan microvellosidades en la zona apical de la célula, células redondeadas, se sugiere tiene funciones enzimáticas o de transporte de iones, y células regenerativas que son las células que dan origen a los otros tipos celulares.
- El epitelio del intestino medio de las diferentes especies estudiadas tienen características morfológicas particulares, que se basan en la disposición y forma de las células, y la longitud de las microvellosidades.
- Al conocer la morfología del intestino medio de estas especies, podemos inferir sobre su funcionamiento y además entender con mayor claridad la interacción entre el parásito - vector.

8. - RECOMENDACIONES

- Evaluar las posibles diferencia morfológicas del el intestino medio en *P. geniculatus* mantenidos con períodos de ayuno distinto.
- Evaluar la presencia de lípidos con algún colorante específico para estos compuestos.
- Evaluar el contenido vacuolar presente en el epitelio con alguna técnica de inmunomarcaje específica para enzimas digestivas
- Usar lectinas que sean específica para otros residuos de carbohidratos, pudiendo determinarlos.
- Se puede experimentar usando otro tipo de fijación o fijadores para obtener los cortes y quizás limpiar el intestino antes de fijarlo para eliminar los residuos alimenticios que puedan interferir en los resultados.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Aksoy, Ü y Üner, A., 2003, Lectins and their applications to parasitology, *Turkish J. Infect.*, **17**(4): 513-516
- Alberts, B., Bray, D., Roberts, K. y Watson, J., 1989, Cell adhesion, cell junctions and the extracellular matrix. In *Molecular Biology of Cell*, 2ª Ed.
- Aldano, E y Lizano, E., 2004, Índice de defecación y éxito reproductivo de *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae) en condiciones de laboratorio, *Rev. Biol. Trop.*, **52**(4): 927-930.
- Alves, C. R., Albuquerque C., J. M., Mello, C. B., García, E. S., Bourguignon, S. C., Souza, W., Azambuja, P. y González, M.S., 2007, *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*, *Exp. Parasitol.*, **116**(1): 44-52
- Arvelo, A., Carranza, J. C., Guhl, F., Clavijo, J. A. y Valejo, G. A., 2007, Comparación de los patrones de alimentación y defecación de *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) en condiciones de laboratorio, *Biomédica*, **27** (1): 101-109
- Azambuja, P. y García, E., 2005, *Trypanosoma rangeli* interactions within the vector *Rhodnius prolixus* - A mini review, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **100**(5): 567-572.
- Basseri, H. R., 2002, Role of lectins in interaction between parasites and the important insect vectors, *Iranian J. Publ. Health*, **31** (1-2): 69-74.
- Billen, J., Wilson E. O., 2008, Social insect from the nineteenth century: The magnificent pioneer sections of Charles Janet, *Arthropod Struct. Dev.*, **37**: 163-167

- Billingsley, P. F., Downe A. E. R., 1986, The surface morphology of the midgut cells of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion, *Acta Tropica*, **43**: 355-366
- Billingsley, P. F., 1988, Morphometric analysis of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) midgut cells during blood digestion, *Tissue & Cell*, **20 (2)**: 291-301.
- Brooks S.A., Leathem A.J.C y Schumacher U., 1997: Lectin Histochemistry: a concise practical handbook. BIOS Scientific Publishers Limited. Oxford
- Burgos, M. H., Gutierrez, L.S., 1976, The Intestine of *Triatoma infestans*. I. Cytology of the midgut, *J. Ultrastruct. Res*, **57**: 1-9
- Carzola P., D. J., 2007, “*TRIATOMINAE* de Venezuela: distribución geográfica, aspectos taxonómicos, biológicos e importancia médica”. Tesis Doctoral, Tecana American University.
- Castillo, D. y Wolff, M, 2000, Aspectos del comportamiento de los triatominos (Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas, *Biomédica*, **20**: 59-64
- Chapman, R. F., 2005, The insects-structure and functions. Harvard University Press, Tercera Edición, Nueva York, Estados Unidos.
- Córdova T., Alfredo, 2008, Cadherina-Cadherina: mecanismo de adhesión, *Contactos*. **68**: 30-33
- Cova G., P. y Suárez, M., Estudio de los triatominos en Venezuela. Publicaciones de la División de Malariología nº 11. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, Caracas, Venezuela. tip. Vargas, S.A Caracas 1959.

- Erwin, T. L., 1987, Biodiversity at its utmost: Tropical Forest Beetles, 27–40. In: Reaka-Kudla, M. L., D. E. Wilson & E. O. Wilson (Eds.). *Biodiversity II*. Joseph Henry Press, Washington, D.C.
- Geneser, F., 1990, *Histología*, Segunda Edición, Editorial Panamericana
- Gutierrez, L.S., Burgos, M. H., 1978, The Intestine of *Triatoma infestans*. II. The surface coat of the midgut, *J. Ultrastruct. Res.*, **63**: 1-9
- Hakim, R. S., y Baldwin, K. M., 1984, Cell junctions in arthropod ion-transport system, *Amer. Zool*, **24**(1): 169-175
- Klowden, M. J., 2007, *Physiological systems in insects*. Elsevier, Segunda Edición, Idaho, Estados Unidos.
- Knust, E. y Leptin, M., 1996, Adherens junctions in *Drosophila* embryo: The role of E-cadherin in their establishment and morphogenetic function, *BioEssays*, **18** (8): 609-612
- Lacombe, D., 1957, Estudios anatómicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **55**: 69-11
- Lange, A. B., y Orchard, I., 1998, the effects of schistoFLRFamide on contractions of the locust midgut, *Peptides*, **19**:459–467.
- Leal M., M. N., Pereira S., M. C., Singer, R. H., Soeiro, N. C., Garzoni, L. R., Silva, D. T., Barbosa, H. S., Araujo J., T. C., Masuda, M. O., Capella, M. A. M, Lopes, A. G. y Vermelho, A. B., 1999, *Trypanosma cruzi*-cardiomyocytes: New contributions regarding a better understanding of this interaction, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **94**(1): 149-152

- Lehane, M. J., y Billingsley, P. F. (eds.), 1996, *Biology of the Insect Midgut*, Chapman and Hall, London.
- Leathem, A. S. C., Atkins, N. S., 1983, *Lectin binding to paraffin sections*. Immunocytochemistry, Academy Press London
- Lodish, H., Berk, A., Laurens, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2006, *Biología Celular y Molecular*, Quinta Edición, Editorial Panamericana
- Lynch, R., 1972, *Métodos de Laboratorio*, Segunda Edición, Editorial Panamericana.
- May, B. R., 1995, *Bugs in the System. Insects and Their Impact on Human Affairs*. Addison-Wesley Publishing Company, New York, Estados Unidos
- Martínez M., I., 2002, Metodologías: Técnicas básicas de anatomía microscópica y de morfometría para estudiar los insectos, *Aracnet 9 Bol. S.E.A.*, **30**: 187-195.
- Marraco, C., Touray, M., Pimenta, P. F., Miller, L. H., y Vernick, K. D., 1995, *Plasmodium gallinaceum*; sporozoite invasion of *Aedes aegypti* salivary gland is inhibited by anti-glan antibodies and by lectins, *Exp. Parasitol*, **81**: 332-3343
- Mello, C.B, Nigam, Y., y García, E. S., 1998, Studies on a haemolymph lectins isoated from *Rhodnius prolixus* and its interaction with *Trypanosoma rangeli*, *Biosci Rep.*, **18**: 129-142.
- Méndez, E., 1999, *Insectos y otros artrópodos de importancia medica y veterinaria*, Primera Edición, República de Panamá, Panamá.
- Nash, R., Neves, L., Faast, R., Pierce, M. y Dalton, S., 2007, The lectin Dolichos Biflorus agglutinin recognizes glycan epitopes on the surface of murine embryonic

stem cells: A new tool for characterizing pluripotent cells and early differentiation, *Stem Cells*, **25**: 974-982

- Nieto, J. M., 1999, Filogenia y posición taxonómica de los “Homópteros” y de sus principales grupos, *Bol. S. E. A.*, **26**: 421-426.
- Oliveira, M. A. y Souza, W., 2003, Further morphological studies on the behavior of *Trypanosoma rangeli* in the hemocytes of *Rhodnius prolixus*, *Parasitol Int.*, **52**: 299-307
- Pereira M., E. A., Andrade A., F. B. y Ribeiro J., M. C., 1981. Lectins distinct specificity in *Rhodnius prolixus* intract selectively with *Trypanosoma cruzi*, *Science*, **211**: 597-59
- Pifano, F., 1986, El potencial enzoótico silvestre del complejo ecológico *Schizotrypanum cruzi* - *Didelphis marsupialis* - *Panstrongylus geniculatus* y sus incursiones a la vivienda humana del valle de Caracas – Venezuela, *Bol. Acad. de Ciens Fís., Mat. y Nat.*, **46**: 143-144.
- Ramírez P., J., 1987, *Rhodnius prolixus* Vector de la enfermedad de Chagas en Venezuela., Instituto de Biomedicina, Sección Estudio de Vectores, Edo. Aragua, Venezuela.
- Resch, V. H., Cardé, R, (eds)., 2003, Encyclopedia of Insects, Academic Press, Elseiver Science/Academy Press, Segunda Edición, Amsterdam, Boston, Estados Unidos.
- Reyes L., M., 2009, *Panstrongylus geniculatus* Latreille 1811 (Hemiptera: Reduviidae:Triatominae), vector de la enfermedad de Chagas en el ambiente domiciliario del centro-norte de Venezuela, *Rev. Biomed*, **(20)**: 180-205

- Reyes L., M. y Acosta R., A., 2000, Domiciliation of the sylvatic Chagas disease vector *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811 (Triatominae: Reduviidae) in Venezuela, *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **94(5)**: 508.
- Ribeiro, J.M., Schneider, M., Guimarães, JA, Biochem J. (1995). Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochem. J.*, **308(Pt 1)**: 243–249.
- Rosch, V., L. L., Andrades N., C., Cola Z., J y Serrao, J. E., 2010, Digestive cells in the midgut of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) in different starvation periods. *C. R. Biologies*, **33**: 405-415
- Ross, M. y Pawlina, W., 2007, Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. Editorial Medica Panamericana, Quinta Edición, Buenos Aires, Argentina.
- Sanguinet, A. C. y Rodríguez T., J. M., 1999, Moléculas de adhesión y piel, *Dermatología peruana*, **9** (1)
- Schofield, C.J., 1994, Triatominae. Biología y control. Eurocommunica Publications, West Sussex, UK, 80 pp
- Terra, W., F. C., 2003, Digestive System. Encyclopedia of Insects. Academic press. 313-323
- Terra W., F. C., 2005, Biochemistry of digestion. In: Gilbert, L. I., Latrov, K., Gill, S. (Eds), *Comprehensive Mol. Insect Science*, vol. 4. Elsevier, Oxford, Estados Unidos
- Toro, H, Chiappa, E., Tovar, C., 2003, Biología de insectos. Ediciones Universitarias de Valparaíso.

- Torrealba, J.W, 2008, Tripanosomiasis y Triatominos vectores. <http://biosalud.saberula.ve/db/ ssalud/edocs/articulos /triptanosomiasis. pdf>. [Consulta: 14 de Junio 2011]
- Torres, K., Avendaño R., F., Rojas, M., Rodriguez B., C., Bofante C., R., y Aldana, E., 2010, Evaluación de la estructura espacial de *Triatoma maculata* de centro-occidente de Venezuela y su viabilidad alimentado con sangre humana en condiciones de laboratorio, *Biomédica*, **30(1)**: 72-81
- Velásquez, C.A., Dell'Orto, H., Trivelli, 1983, Distribución e importancia de los insectos que dañan granos y productos almacenados en Chile. FAO,
- Wanderley T., V., Teixeira, A. A. C., Cunah, F. M., Costa, M. K. C. M., Veiga, A. F. S. L., Oliveira, J. V., 2006. Histological description of the midgut and piloric valve of *Tropidacris collaris* (Stole, 1813) (Orthoptera: Romaleidae), *Braz. J. Biol.*, **66(4)**:1045-1049
- Wigglesworth, V. B. 1931. The physiology of excretion in blood sucking insect, *Rhodnius prolixus*, Hemiptera, Reduviidae. Part I-III., *J. Exp. Biol.*, **8**: 411-451.
- Zeledón, R., 1983, Vectores de la enfermedad de Chagas y sus características eco-fisiológicas. *Interciencia*, **8 (6)**: 384- 395.

Consultas en línea

- http://genomeold.wustl.edu/ancillary/genome_images/Rhodnius_prolixus.png
(Consultado: 4 de abril del 2010)
- <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cf/Pgeniculatus2.jpg>.
(Consultado: 4 de abril del 2010)

- http://www.afpmb.org/pubs/Field_Guide/Images/originals/Fig.%2085.jpg.
(Consultado: 4 de abril del 2010)
- http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=88.
- (Consultado: 4 de abril del 2010)