



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO FACULTAD DE
CIENCIAS DE LA SALUD ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION Y
DESARROLLO PROFESIONAL
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACION**



**VARIACIONES DE PH INTRACELULAR EN
TUBULOS DE MALPIGHI DE RHODNIUS PROLIXUS EN
CONDICIONES DE REPOSO Y SECRECION FRENTE A
5-HIDROXITRIPTAMINA Y BAFILOMICINA**

AUTORES:

Galán Diana
Guzmán Angel

TUTORES:

Güeres Romina
Gutiérrez Antonio

ASESOR:

Fernandez Yolima

VALENCIA, OCTUBRE 2010



ACTA DE EVALUACIÓN

Quienes suscriben, miembros del Jurado designado por la Coordinación de la Asignatura Trabajo de Investigación, para evaluar el trabajo titulado: **“Variaciones de pH intracelular en túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* en condiciones de reposo y secreción frente a 5-Hidroxitriptamina y Bafilomicina.”**, presentado por los estudiantes: **Diana Galán** y **Ángel Guzmán**, titulares de las Cédulas de Identidad No. V-19.283.655 y E-83.406.095; y tutorado por los Profs. **Antonio Gutiérrez**, titular de la Cédula de Identidad No. V-6.127.609 y **Romina Güeres**, titular de la Cédula de Identidad No. V-10.228.449. Hacemos de su conocimiento que hemos actuado como jurado evaluador del informe escrito, presentación y defensa del citado trabajo. Consideramos que reúne los requisitos de mérito para su **APROBACIÓN**.

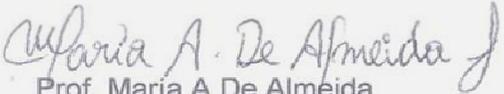
En fe de lo cual se levanta esta acta en Valencia a los veintisiete días del mes de octubre del año dos mil diez.


Prof. Yolima Fernández
C.I: 13.382.234

Jurado Principal


Prof. Elisa Martínez
C.I: 7.014.751

Jurado Principal


Prof. Maria A De Almeida
C.I: 15.398.354

Jurado Principal





CONSTANCIA DE CERTIFICACION DEL TUTOR

Yo, Antonio Gutiérrez, por medio de la presente certifico que he tenido conocimiento del trabajo de investigación que lleva por título: “**Variaciones de pH intracelular en túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* en condiciones de reposo y secreción frente a 5-Hidroxitriptamina y Bafilomicina.**”, desde su inicio hasta su culminación. El mismo fue realizado por los bachilleres: **Diana Galán** y **Ángel Guzmán**. Considero que el presente estudio reúne los requisitos suficientes para ser sometido a evaluación.

Firma del tutor



CONSTANCIA DE CERTIFICACION DEL TUTOR

Yo, Romina Güeres, por medio de la presente certifico que he tenido conocimiento del trabajo de investigación que lleva por título: “**Variaciones de pH intracelular en túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* en condiciones de reposo y secreción frente a 5-Hidroxitriptamina y Bafilomicina.**”, desde su inicio hasta su culminación. El mismo fue realizado por los bachilleres: **Diana Galán** y **Ángel Guzmán**. Considero que el presente estudio reúne los requisitos suficientes para ser sometido a evaluación.

Firma del tutor

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por permitirnos usar sus instalaciones y recursos para el desarrollo de nuestra investigación.

Al Dr. Antonio Gutiérrez por permitirnos formar parte de tan valiosa investigación, por todos los conocimientos y colaboración aportada.

A la Dra. Romina Güeres por aceptar formar parte de nuestra investigación, guiarnos, orientarnos, compartir sus conocimientos y experiencia.

Al Msc. Rafael García por instruirnos tanto practica como teóricamente, por enseñarnos a manejar procedimientos tan importantes como la disección de los chipos y manejo de la microscopia de fluorescencia, por su ayuda con los experimentos, por brindarnos toda la información necesaria, por regalarnos su tiempo, paciencia y conocimientos.

A la Profesora Vita Calzolaio por guiarnos durante todo el proceso y brindarnos su ayuda incondicionalmente.

A la Profesora Yolima Fernández por, orientarnos, instruirnos y hacer de este trabajo algo impecable.

A la Universidad de Carabobo por brindarnos los conocimientos, recursos y apoyo necesario para llegar donde estamos.

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso por darme el regalo de la vida, por todas las cosas maravillosas que ha puesto en mi camino, por brindarme la fortaleza para afrontar todos los obstáculos y permitirme llegar hasta aquí.

A mis padres Gonzalo e Ismenia, seres maravillosos que con su amor hicieron posible mi existencia, por hacer a un lado sus vidas para atender la mía, por guiarme incondicionalmente en cada uno de los pasos que he dado, darme todo el apoyo necesario y ser ambos un impecable modelo a seguir. Gracias a ustedes hoy he logrado llegar hasta aquí.

A mi hija Isabel, pedacito de cielo que Dios me regalo para iluminar mi vida, por ser el motor que mueve mis actos y me motiva a luchar cada día, hija tu eres el norte de mis metas.

A mis padres postizos Edgar y Yeisi por acogerme en su seno como una hija propia, brindarme todo su cariño y comprensión, guiarme por el camino de la perfección y tomar parte responsablemente en cada una de mis metas.

A mis abuelos Waldemar (+), Pepe (+), Isabel (+) y Betilde por llenar mi vida de ternura y alegría, apoyarme incondicionalmente en cada camino recorrido, preocuparse por mí y sobreprotegerme desde mi llegada al mundo. Gracias por no escatimar esfuerzos para mí.

A mis tíos Tulio, Juan y María Consuelo por brindarme amor, apoyo incondicional y formar parte del buen ejemplo necesario para formarme como una persona de bien.

A mis primos por estar siempre pendientes de mí e iluminar mi vida con su cariño y alegría. Especialmente a mi prima Maritza Navarro por preocuparse tanto por mí, compartir sus conocimientos conmigo y guiarme en el maravilloso campo de la salud.

A la familia Montilla especialmente mi mejor amiga Yenifer y su mami Barbara por hacerme parte de la familia, darme todo su apoyo, ser siempre incondicionales conmigo y brindarme todo su cariño.

A Angelito por soportarme durante estos 5 años, escogerme como su compañera de tesis, darme tanto cariño y llenar mi vida con su incomparable personalidad.

A todos mis amigos y demás familiares gracias por su cariño y apoyo, por formar parte de mi vida y llenarla de felicidad.

Este logro es también de ustedes. Diana C. Galan V.

DEDICATORIA

Durante esta etapa de mi vida de lucha y dedicación constante llena de alegrías, éxitos y angustias he logrado alcanzar una de mis mayores metas que es culminar mi carrera universitaria, logrando vencer obstáculos. Es por esto que quiero dedicar este logro a quienes estuvieron conmigo en todo momento brindándome todo su amor y amistad.

A mi Dios todopoderoso quien es el creador de este mundo perfecto en el cual estamos y quien nos dio la vida para llevar a cabo sueños reales y nos da la fortaleza para continuar adelante siempre

A mis padres Marcos y Elizabeth (Chávela) quienes me dieron el don de la vida y poco a poco han ido contribuyendo a mi formación como hombre de bien, en especial a mi madre hoy y siempre estaré agradecido por ser esa mujer valiente y abnegada que es siempre con palabras de aliento y quien es hoy y siempre mi mejor ejemplo y mi más grande admiración.

A mis hermanos y sobrinos quienes me han regalado momentos felices y para quienes siempre podre ser un ejemplo a seguir.

A mis abuelos Georgina y Luis Angel quienes son el mejor ejemplo de amor y unión dándonos valores y amor incondicional en todo momento, a ti abuelo que sé que desde el cielo siempre nos seguirás guiando.

A mi novia Silvia quien ha sabido llevar poco a poco y con mucha paciencia a este personaje y quien me demuestra cada día más el amor que me tiene.

A mi compañera dianita quien es la persona más inteligente que he conocido juntos nos hemos compenetrado como equipo y hermanos siempre te querré como mi hermana gracias por todo.

A mis amigos a quienes no puedo nombrar por completo porque necesitaría un libro para ello, ustedes son la fuente de poder que me permite llevar cada día una sonrisa, una lagrima al salón de clases todos son para mí un vivo ejemplo de personalidad y ocurrencias gracias por dejarme formar parte de sus vidas.

A mis profesores quienes desde la etapa escolar me han demostrado lo importante del aprendizaje y de la vida y han logrado guiarme a cumplir esta etapa tan importante muchas gracias.

Angel J. Guzmán S.

INDICE

| | Página |
|--------------------------------|--------|
| Índice de Gráficos | viii |
| Índice de Figuras | ix |
| Resumen | x |
| INTRODUCCION | 1 |
| Objetivo General | 11 |
| Objetivos Específicos | 11 |
| METODOLOGIA | 12 |
| Diseño y Tipo de Investigación | 12 |
| Población | 12 |
| Muestra | 12 |
| Procedimiento Metodológico | 13 |
| Análisis de Datos | 18 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 19 |
| CONCLUSIONES | 23 |
| RECOMENDACIONES | 24 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 25 |

INDICE DE GRAFICOS

| Número del gráfico | Descripción | Página |
|--------------------|--|--------|
| 1 | Variación de fluorescencia en función del tiempo, en túbulos de Malpighi de <i>Rhodnius prolixus</i> estimulados con 5-HT 10uM | 20 |
| 2 | Variación de fluorescencia en función del tiempo, en túbulos de Malpighi de <i>Rhodnius prolixus</i> estimulados con 5-HT 10uM y Bafilomicina 1uM + 5-HT 10uM. | 21 |

INDICE DE FIGURAS

| Figura | Descripción | Página |
|--------|--------------------------------|--------|
| 1 | Modelo de Secreción de los TM. | 22 |

VARIACIONES DE PH INTRACELULAR EN TUBULOS DE MALPIGHI DE
RHODNIUS PROLIXUS EN CONDICIONES DE REPOSO Y SECRECION
FRENTE A 5-HIDROXITRIPTAMINA Y BAFILOMICINA.

Autores: Angel Guzmán y Diana Galan.

Tutores: Dr. Antonio Gutierrez y Dra. Romina Güeres

Asesor: Prof. Yolima Fernández

Realizado en: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

Financiado por: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

RESUMEN

Rhodnius prolixus (RP) es el principal transmisor del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, su sistema excretor está compuesto por los túbulos de Malpighi (TM) equivalentes a los túbulos renales en los humanos, los procesos de secreción tubular son estimulados por hormonas como la 5- hidroxil- triptamina (5-HT) que son producidas por el sistema nervioso del insecto en respuesta a diversos estímulos, RP está dotado de bombas de iones conocidas como ATPasas entre ellas la V-H⁺ATPasa apical que produce un intercambio de Na⁺ por H⁺. El presente trabajo estuvo dirigido a determinar las variaciones de pH intracelular en los túbulos de Malpighi de RP al ser estimulados con 5-HT e inhibidos con Bafilomicina, durante la secreción y el reposo, a través de la técnica de microscopia de fluorescencia, empleando el fluoroforo BCECF. Para ello se diseñó un estudio experimental, descriptivo, correlacional y explicativo, y se empleó una población de chipos del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas de 5to instar de los cuales se extrajeron los TM mediante disección. Los resultados mostraron que el pH en los TM en reposo fue de 6,95±0,02 y al ser perfundidos con 5- HT disminuyó drásticamente la fluorescencia y por ende el pH a 6,79 ±0,06 en conclusión la 5-HT ejerce acciones diuréticas y por lo tanto activa la V-H⁺ATPasa apical favoreciendo la entrada de H⁺ a la célula disminuyendo el pH. Al ser estimulados con 5-HT + Bafilomicina el pH sufre una disminución menos drástica quedando en evidencia el efecto antagonista de la Bafilomicina sobre la V-H⁺ATPasa.

Palabras clave: *Rhodnius prolixus*, pH, túbulos de Malpighi, 5-HT, Bafilomicina.

INTRODUCCION

El chipo, cuyo nombre científico es *Rhodnius prolixus* es uno de los principales vectores del parásito *Trypanosoma cruzi* en Venezuela, agente causal de la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana), esta patología ocasiona graves afecciones a nivel del corazón, así como lesiones del tracto gastrointestinal, (1). Dicha enfermedad deteriora progresivamente la calidad de vida del paciente, degenerando el desempeño de su vida normal, incapacitándolo, en la mayor parte de los casos en la etapa productiva de su vida (2). Es la principal causa de muerte cardiovascular en Latinoamérica, afecta a más de diez millones de personas, siendo los países más afectados Venezuela, Brasil y Colombia. Según la Organización Mundial de la Salud se estima un total entre 16 y 18 millones de personas infectadas con la enfermedad de Chagas en 18 países de Latinoamérica, donde las muertes por causa de esta afección, se calculan entre 45 mil y 50 mil cada año (3).

El *Rhodnius prolixus* (*R. prolixus*) pertenece a la familia de los reduvidos, subfamilia triatominae, morfológicamente los triatominos se caracterizan por tener un color general pardo-amarillento con manchas marrón oscuro en varias regiones del cuerpo. La cabeza es alargada hacia adelante (cabeza prognata), ojos compuestos predominantes. Delante de los ojos se extiende la región anteocular; en la cual se implanta un par de tubérculos anteníferos, que sirven de base de sustentación a las antenas. Los tubérculos anteníferos se encuentran situados en estos insectos cerca de la extremidad anterior de la región anteocular, lo cual caracteriza el género *Rhodnius*. La probóscide es recta y está integrada por tres segmentos. Cuando el insecto no está alimentándose, permanece flexionada por debajo de la cabeza y su extremidad descansa en una ranura del tórax (surco estridulatorio) en medio del primer par de patas.

En cuanto al tórax, visto por la cara dorsal, solamente se observa el pronoto ya que el mesonoto y metanoto están ocultos por las alas plegadas, del tórax salen tres pares de patas delgadas terminadas en un par de uñas. El abdomen es de forma oval y sus bordes laterales aplanados presentan dibujos utilizados para la

clasificación. Durante su ciclo de vida presenta 5 estadios inmaduros, que van desde el 1^{er} hasta el 5^{to} instar, y un estadio adulto, en líneas generales, se puede decir que las ninfas tienen una morfología muy parecida a la de los adultos, diferenciándose de ellos principalmente, por ser de menor tamaño y carecer de alas. En la ninfa de IV estadio comienzan a ser vistos los rudimentos alares los cuales presentan un mayor desarrollo en el V estadio. Este insecto es hematófago exclusivo, alimentándose únicamente de sangre tanto el macho como la hembra. Esta adaptado a largos períodos de ayuno, seguidos a su vez por cortas y al mismo tiempo grandes ingestas de sangre en las que puede aumentar su peso hasta 10 veces (4). Después de alimentarse, en pocos minutos pierden mucho del volumen ingerido, ya que tienen la característica de excretar inmediatamente después de alimentarse (5), esto a su vez permite la transmisión del *Trypanosoma cruzi* debido a que este parásito es excretado en la orina del insecto y esta al contaminar las abrasiones o heridas en la piel, especialmente el sitio de la picadura, permite que se produzca el contagio de la enfermedad de Chagas (1).

En el abdomen de *R. prolixus* se localiza el celoma: una cavidad donde están inmersos el tubo digestivo, los túbulos de Malpighi los cuales representan el riñón, los ganglios del sistema nervioso, el sistema propulsor de la hemolinfa el cual es el corazón. Al celoma entra y sale aire por difusión a través de las traquéolas, desde las células llegan allí los productos del metabolismo y desde allí es donde inician su viaje al exterior. La cavidad celomática estará casi vacía y seca cuando el *R. prolixus* ha pasado un periodo largo en ayunas, y estará llena de un líquido claro llamado hemolinfa cuando la alimentación es reciente, el *R. prolixus* ingiere sangre, el agua y las sales de la sangre salen del tubo digestivo y van a la hemolinfa y de allí, al exterior (6).

Los túbulos de Malpighi (TM) del *Rhodnius* son equivalentes al sistema de túbulos renales en los humanos. Este posee en total un conjunto de 4 túbulos, cada uno tiene un extremo ciego que flota en la hemolinfa y todos desembocan en la cloaca. Estos

constan, de adentro hacia afuera, de epitelio urinario y membrana basal, a esta última se adhieren por fuera tráqueas, traqueoblastos que facilitan su intercambio gaseoso, y frecuentemente músculos que pueden formar bandas circulares, longitudinales o en espiral. Generalmente bastan de dos a tres células para formar la periferia del tubo, aunque en algunos casos el número puede ser mayor. El núcleo suele ser aplanado, de forma irregular, muchas veces lobulado y poliploide. Los dos primeros tercios de cada túbulo (a partir del extremo ciego) poseen función secretora, mientras que el último tercio (cercano a la cloaca) tiene función reabsortiva. En la porción proximal de los túbulos se lleva a cabo la excreción del agua en conjunto con sales y otros metabolitos en forma de orina primaria, la cual es cuasi-isosmótica (7).

Los procesos de secreción tubular, son estimulados por hormonas como la 5-hidroxi-triptamina (5-HT o Serotonina) que son producidas por el sistema nervioso del insecto en respuesta a estímulos como el cambio de volumen o el incremento de la presión hidrostática del exoesqueleto. Los TM de *Rhodnius* que están en “reposo” o “no funcionales”, durante los periodos de ayuno, secretan volúmenes a velocidades de 50nl/s x cm² a los pocos minutos de comenzada la ingesta. Esto se debe a la influencia de las hormonas antidiuréticas (8).

Han sido numerosos los estudios realizados con el objetivo de comprender la fisiología del *R. prolixus* uno de ellos fue el de Montoreano, quien en el año 2003, describió cómo el insecto puede aumentar 10 veces su peso después de ser colocado ante un alimentador con sangre humana heparinizada a 37 °C y cómo la sangre puede ser reemplaza por Solución Ringer insecto + ATP. La excreción está regulada por la acción de las hormonas diurética y 5-HT, actuando en forma sinérgica. Estas co-hormonas tienen como segundo mensajero al AMPc y es posible encontrar al péptido en la orina y heces del *R. prolixus* así como en el fluido producido por los TM. El AMPc podría ser un factor inductor de la metaciclologénesis del *T. cruzi*, completando el ciclo del parásito. Por su parte, la 5- HT también actúa debilitando la unión de las placas cuticulares del insecto, permitiendo la distensión de su abdomen durante la ingestión de sangre o Ringer y su acción puede ser inhibida por antagonistas. El

insecto inyecta, para facilitar su ingesta de sangre, donadores de óxido nítrico, que actúa como vasodilatador y antiagregante plaquetario. El *R. prolixus* es, entonces, un excelente modelo que permite, mediante un simple ejercicio de fisiología comparada, comprender mecanismos fisiológicos del hombre y otros animales más evolucionados (6).

La orina formada en los TM es el resultado de una compleja interacción de diferentes mecanismos de transporte iónico como bombas, canales y transportadores, que se encuentran distribuidos en las membranas celulares. La secreción de los TM de *Rhodnius* está compuesta, por lo general, de NaCl y KCl en una concentración aproximada de 90 mM (9). Algunos autores han propuesto que la secreción de iones por los TM está energizada por un mecanismo de transporte activo, una ATPasa- H^+ del tipo vacuolar. Este transporte electrogénico de H^+ desde el interior celular hacia el lumen se cree que activa un intercambiador sensible a amilorida, que transporta K^+ y/o Na^+ citoplasmático por cada H^+ luminal (10). En la membrana basolateral de los TM de *Rhodnius* se ha propuesto un cotransportador de Na-K-Cl Este cotransportador y/o un cotrasporte K^+ - Cl^- sensible a DIOA (Ácido dihidro-indenil-oxi-alcanoico) también han sido relacionados con la entrada basolateral de iones en los túbulos de mosquito (11).

El *R. prolixus* está dotado de bombas de iones conocidas como ATPasas, estas son un subconjunto de enzimas que son capaces de producir la hidrólisis del adenosín trifosfato y realizar transporte de iones en contra de gradiente de concentración, en *Rhodnius* una ATPasa de Na-K está localizada en la membrana basolateral de los TM (12). La Ouabaina un conocido inhibidor de ésta, cuando se aplica en el lado basolateral estimula significativamente el flujo de agua en un 29% (13). Se sabe que la ATPasa de Na-K bombea tres iones Na^+ del citosol al lado peritubular (en sentido contrario al flujo de secreción), mientras que toma dos iones K^+ del lado peritubular hacia el interior celular (14). Lo que produce el movimiento neto “invertido” de un ión por vuelta, ej., el regreso del Na^+ de la célula al espacio peritubular. Esto último tiende a “disminuir” la secreción cuando el movimiento de iones es bloqueado por ouabaina, el gradiente de concentración de Na^+ a través de la membrana basolateral

será reducido, facilitando la secreción de Na^+ e incrementado flujo hacia el interior celular (15).

Se había mencionado que la secreción de los TM en *Rhodnius* es energizada por una ATPasa de Hidrogeniones tipo V apical (10), que a su vez es bloqueada por un ambiente oxidativo y activada por bajo pH (16). Las células ricas en mitocondrias tienen una actividad importante de ATPasa-H-V en la membrana plasmática, como sería el caso de los TM de *Rhodnius* donde numerosas mitocondrias gigantes penetran las microvellosidades de la membrana apical. Esto podría crear un medio consistente con condiciones reductoras, que estimularía la actividad de la ATPasa H-V. Aunque no se ha detectado fosforilación directa, el AMPc actúa estimulando la ATPasa H-V apical en los TM, después que el metabolismo es reactivado, el pH intracelular disminuye estimulando la actividad de la ATPasa H-V (17).

Los cotransportadores son los mayores responsables de la secreción, el cotransportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ es una proteína transmembrana que facilita el co-transporte de un ion de sodio, uno de potasio y dos de cloro desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula. Si alguno de los cotransportadores $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ y/o de $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ se encontraran presentes en la membrana basolateral de la célula, su inhibición disminuiría en forma significativa el movimiento del volumen de agua. La utilización a nivel basolateral de los inhibidores del co-transporte de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$, tales como los diuréticos furosamida y de bumetanida produce una disminución del flujo neto de agua en un 80 % en el epitelio secretor, este transportador basolateral de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ es activado por fosforilación en respuesta a un aumento del AMPc. Esto conduce a la entrada del ión desde la perfusión hacia la célula junto al agua, permitiendo a la célula llenarse de sal lo cual incrementa su volumen, en concordancia con los gradientes electroquímicos (12).

Uno de los principales reguladores fisiológicos de este cotransportador es el volumen celular. Por lo tanto, el aumento del volumen celular producido por la actividad del cotransportador basolateral de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ activaría al cotransportador apical $\text{K}^+\text{-Cl}^-$. Esta sería la ruta principal para la excreción de K^+ y probablemente del

Cl⁻. Para *Rhodnius* se ha propuesto la existencia de un intercambiador de Na⁺ y/o K⁺ apical vs H⁺ (10), la amilorida es su más conocido inhibidor pero también interactúan otras proteínas, incluyendo otros transportadores y los canales de Na⁺. Un intercambiador de H⁺-Na⁺ apical sensible a amilorida es una ruta importante para la excreción de Na⁺. Otros mecanismos para la extrusión de Na⁺ en el lumen del túbulo, no se pueden descartar, por ejemplo la bomba de Na⁺ insensible a ouabaina, previamente descrita en TM de *Rhodnius* (8).

Otra de las contribuciones al estudio de la fisiología de *R. prolixus* es la de Ianowski y O'Donnell quienes en el año 2004 examinaron los efectos de la perfusión salina Na⁺ / K⁺, en relación con bumetanida e hidroclorotiazida sobre fluidos y transporte de iones en los TM de *R. prolixus* estimulados con 5-HT. Previamente estudios farmacológicos y electrofisiológicos indican que un cotransportador Na⁺ /K⁺/2Cl⁻ sensible a la bumetanida es la principal ruta basolateral de entrada de iones a la célula durante el periodo de secreción. La meta de este estudio fue el de resolver el aparente conflicto entre las tasas de secreción relativamente altas en los túbulos bañados en solución salina libre de K⁺ y la evidencia de que los cotransportadores Na⁺/K⁺/2Cl⁻ descritos en otros sistemas, son un requisito absoluto para los tres iones de translocación. Los flujos de iones y respuestas electrofisiológicas a la 5-HT mostraron que la secreción de líquido en solución salina libre de K⁺ es sensible a la bumetanida e insensible a la hidroclorotiazida. La curva dosis respuesta de las tasas de secreción vs. la concentración de bumetanida fueron idénticas para los túbulos bañados en solución salina libre de K⁺ y el control con solución salina con valores de IC50 de 2.6310⁻⁶ mmol l⁻¹ y 2.9310⁻⁶ mmol l⁻¹, respectivamente. Las cámaras dobles- recíprocas de flujo de iones K⁺ vs. concentración de solución salina de perfusión con K⁺ muestran que el aumento de la concentración de Na⁺ en la solución de perfusión aumentan el Kt pero no tiene ningún efecto sobre Jmax, coherente con la inhibición competitiva de los transportes de K⁺ por Na⁺. Se propone que la competición entre Na⁺ y K⁺ por el transporte de sustancias sensibles a la bumetanida es parte de un mecanismo autónomo por el cual los TM regulan la concentración de K⁺ en la hemolinfa (18).

Posteriormente en el año 2005, Gutiérrez y col., midieron la tasa de secreción y los cambios en la concentración interna de sodio y protones de los TM de *R. prolixus* bajo estimulación con 5-HT. Para ello emplearon un sistema de doble perfusión para tener acceso por separado a las membranas basolateral y/o apical de la célula. Los flujos iónicos se midieron por microfluorometría, aplicándose hasta trece agentes farmacológicos: Ouabaina, Bafilomicina A1, Furosamida, Bumetanida, DIOA, Probenecina, SITS, Acetazolamida, Amilorida, DPC, BaCl₂, pCMBS y DTT. Estos agentes son bloqueadores conocidos de diferentes funciones de transporte de iones, conocidos como ATPasas, co- y/o contra transportadores así como de canales iónicos y de agua. La asunción básica es que los cambios en los movimientos de agua reflejan cambios en los mecanismos del transporte de iones que se localizan de la siguiente manera: a) en la membrana basolateral de la célula, los principales son un cotransportador de Na⁺K⁺-2Cl⁻ y el intercambiador de Cl⁻-HCO⁻ 3; la ATPasa de Na⁺- K⁺ y la ATPasa de Na⁺ y los canales de Cl⁻ y de agua (Rp-MIP) son de importancia intermedia, mientras que los canales de K⁺ son menos importantes. b) en la membrana celular apical, la mayor importancia la tiene un cotransportador de K⁺-Cl⁻, que ha sido localizado por primera vez, una ATPasa de H⁺ tipo V, y un intercambiador de Na⁺-H⁺; el intercambiador urato-anión y los canales de K⁺ son importantes mientras que los canales de Cl⁻ no lo son, presentándose un modelo actualizado que explica la secreción del TM (13).

Asimismo, las mediciones de las actividades de iones intracelulares y lumbales así como los potenciales de membrana, se utilizan para calcular gradientes electroquímicos de Cl⁻, Na⁺, K⁺ y H⁺ que atraviesan la membrana apical durante la secreción de sustancias en TM de *R. prolixus*. Los resultados obtenidos por Ianowski y O'Donnell en el año 2006 muestran que la contribución de los intercambiadores de Na⁺/H⁺ y/o K⁺/H⁺ es factible en los túbulos tanto estimulados como no estimulados con 5-HT. Del mismo modo, el potencial electroquímico de Cl⁻ es coherente con el movimiento pasivo de Cl⁻ a la luz de la célula a través de los canales de Cl⁻. La contribución de los cotransportadores apicales de Cl⁻-K⁺ y/o el movimiento paracelular neto de Cl⁻, el transporte

transepitelial de iones es termodinámicamente no viable. El pH en el lumen (pH \cdot 6.08 \pm 0.1, N=6) fue más ácido que el pH basal (pH \cdot 7.25 \pm 0.01, n=26) y la estimulación con 5-HT produce un aumento significativo en el pH del lumen 6.32 \pm 0.04 (n=5). El pH intracelular fue de 6.97 \pm 0.01 y 6.82 \pm 0.04 en los túbulos sin estimulación y en los estimulados con 5-HT respectivamente. En el Lumen se modificó el pH intracelular, el pH fue estrictamente regulado en el tratamiento con 5-HT y bumetanida. Además, el tratamiento con DIDs o amilorida no afectó el pH intracelular. Sin embargo, el pH se desplazó 0.25 unidades más ácido en sodio salino libre, lo que sugiere que el mecanismo de regulación de pH dependiente de sodio participa en el estado de equilibrio del pH durante la secreción en los TM de *R. prolixus*. Los datos son consistentes con el papel del intercambiador basolateral Na⁺/H⁺ en la regulación del pH intracelular durante la secreción (19).

Como se mencionó anteriormente en el insecto hematófago *R. prolixus*, la diuresis se logra mediante las acciones combinadas de hormonas peptídicas diuréticas y 5-HT liberadas en los nervios abdominales. En este sentido Paluzzi y Orchard, en el año 2006 evidenciaron que una hormona antidiurética con propiedades similares a CAP2b (pELYAFPRVamide; recientemente renombrada Mas-CAPA-1) también podría estar presente en *R. prolixus*. Resultados de análisis inmunohistoquímicos sugieren que un neuropéptido como PRXamide puede ser liberado de los nervios abdominales en las 3 o 4 horas siguientes a partir de alimentación, una vez que coincide con el cese de la diuresis. También mostraron evidencia de un factor endógeno, aislado del sistema nervioso central utilizando cromatografía líquida de fase inversa de alto rendimiento que imita los efectos de Mas-CAPA-1, específicamente, este factor endógeno anti-diurético inhibe las tasas de 5-HT que estimula la secreción en una manera dosis-dependiente y eleva los niveles de GMPc intracelular de los TM estimulados con 5-HT (20).

Continuando en la línea de investigación acerca de la secreción urinaria en insectos. García y col., estudiaron en el año 2008 el efecto de la Furosamida en el flujo de Na⁺ en células epiteliales y el rol fisiológico de la segunda bomba de Na⁺ y

de la Na^+/K^+ ATPasa. Para ello utilizaron un microscopio invertido equipado para epifluorescencia, perfundieron los TM y aplicaron drogas en el lado basolateral de la preparación. Utilizando para esto TM disecados de *Rhodnius* del 5to instar. Cargaron los TM con el indicador fluorescente sensible a Na^+ : SBFI- AM. Posteriormente expusieron los TM a concentraciones de $10 \mu\text{M}$ de 5-HT. Determinaron los cambios en la relación 340/380 (DR). Y obtuvieron como resultados que la entrada de Na^+ durante la secreción inducida por 5-HT se refleja en un incremento en la relación de fluorescencia para Na^+ como $\text{DR}_{5\text{-HT}} = 0,0511 \pm 0,0070$. Sin 5-HT, la ouabaína no cambia dicha relación. Contrariamente la furosamida incrementa $\text{DR}_{\text{furo}} = 0,0629 \pm 0,0094$. Este efecto se potencia por la adición conjunta de furosamida y ouabaína $\text{DR}_{\text{Ou+Furo}} = 0,1040 \pm 0,0745$. La Amilorida invalida dichos incrementos $\text{DR}_{\text{Amil+Ouab+Furo}} = -0,0099 \pm 0,0140$. Estos experimentos corroboran la existencia de una segunda Na^+ -ATPasa que juega un papel mayor que la Na^+/K^+ ATPasa. El efecto conjunto de la furosamida y la inhibición de la Na^+/K^+ ATPasa evidencian una posible conductancia de Na^+ basolateral cuya actividad podría estar asociada a un canal de Na^+ (21).

La evidencia experimental previamente discutida conduce a proponer un modelo para la secreción de TM en *Rhodnius*. Las direcciones de los flujos propuestos están en concordancia con los diferentes potenciales eléctricos y las actividades iónicas. La localización basolateral de la Na^+/K^+ -ATPasa, del $\text{Na}^+/\text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ y la localización apical del V-H^+ ATPasa se ajusta con las proposiciones anteriores para *Rhodnius* que se basaron en el efecto de los cambios en las soluciones que bañaban la membrana basolateral de la célula (11). La perfusión luminal ha producido el actual modelo, que conserva el concepto que la V-H^+ ATPasa proporciona la fuerza impulsora para el transporte apical de iones. Sin embargo, separa Na^+ de K^+ en la membrana celular apical. En este modelo, Na^+ se intercambia por H^+ , y es cotransportado con Cl^- . Previamente, los modelos proponían que el Na^+ y K^+ se movían en intercambio con H^+ (8).

Estudios anteriores han planteado la hipótesis de que, al estimular los TM con

diferentes sustancias diuréticas entre ellas la 5-HT los niveles de Na^+ aumentan y en consecuencia el pH disminuye.

Todas estas investigaciones han permitido construir modelos fisiológicos que describen el funcionamiento del aparato excretor del insecto. Sin embargo hasta los momentos existen escasas investigaciones que estudien las variaciones del pH intracelular en los TM y los mecanismos fisiológicos que lo controlan. Por lo que el estudio de las variaciones de pH en los TM que son los responsables de la secreción de la orina, así como de las sustancias y condiciones que influyen en dichas variaciones, podrían servir de base para posteriores estudios y ensayos con fármacos sobre la fisiología y comportamiento de *Rhodnius prolixus*. De la misma forma estudiar cómo afectan éstos el desarrollo del *Trypanosoma cruzi* en el interior del insecto, aportando una perspectiva interesante para el control del propio vector a través de la manipulación del equilibrio fisiológico de sus sustancias de desecho. Lo cual desde el punto de vista práctico se traduce en un sin fin de posibilidades tecnológicas de importancia en la epidemiología y el control de vectores.

Tomando en cuenta que los productos de excreción de este vector son de suma importancia en la transmisión de la enfermedad de Chagas, por lo que conocer los mecanismos fisiológicos del insecto es fundamental, el propósito de la presente investigación es determinar a través de la técnica de fluorescencia, cómo se ve afectado el pH intracelular en los túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* al ser estimulado con sustancias como la 5- hidroxitriptamina y la Bafilomicina, y asimismo estudiar las condiciones fisiológicas que podrían afectar dichas variaciones de pH.

Objetivo General

- Determinar las variaciones del pH intracelular en los túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* al ser estimulados con 5- Hidroxitriptamina, e inhibidos con Bafilomicina, durante el reposo y la secreción.

Objetivos Específicos

- Determinar las variaciones que sufre el pH intracelular en los túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* durante la secreción y el reposo empleando la técnica de microscopía de fluorescencia.

- Describir los cambios del pH intracelular en los túbulos de Malpighi durante la estimulación con 5-HT, e inhibición con Bafilomicina a través de la técnica de microscopía de fluorescencia.

- Estudiar los mecanismos de control y regulación de la secreción de volumen en los túbulos de Malpighi en cuanto a las variaciones del pH intracelular.

METODOLOGIA

Diseño y tipo de investigación

La investigación estuvo enmarcada dentro de un estudio con diseño experimental, el cual consistió en la manipulación de una variable experimental no comprobada, en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produjo una situación o acontecimiento en particular. Asimismo el estudio fue de tipo descriptivo, correlacional y explicativo. El estudio descriptivo tuvo como propósito describir situaciones y eventos, es decir, cómo fue y se manifestó el fenómeno, midiendo y evaluando diversos aspectos, dimensiones o componentes del mismo. Por su parte el estudio fue correlacional porque midió el grado de relación y la manera como interactuaron dos o más variables entre sí. El estudio fue explicativo debido a que se estableció el sentido de comprensión o entendimiento de un fenómeno, apuntando a las causas del mismo (22).

Población

En el presente estudio la población estuvo constituida por todos los *R. prolixus* (chipos) criados en el Laboratorio de Fisiología Renal del Departamento de Biofísica y Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Muestra

La muestra en este estudio estuvo integrada por los TM extraídos mediante disección de los *R. prolixus* de 5to instar de ambos sexos criados en el Laboratorio de Fisiología Renal del Departamento de Biofísica y Bioquímica del IVIC, alimentados con sangre de carnero heparinizada (2 unidades /ml), a través de una membrana de látex bajo agitación constante a 37 C°, los ejemplares seleccionados tenían aproximadamente 30 días sin alimentarse.

Procedimiento metodológico

Disección de los *R. prolixus*

1. Se tomó un chipo en su 5to instar, se sujetó con la pinza dentada por una de las patas traseras y se colocó en la cámara con parafina sólida, sin dejar de sujetarlo con la pinza, se procedió a cortar rápidamente la cabeza con la tijera de corte ocular (para evitar que se produjera la secreción de neurotransmisores)
2. Se fijó el insecto a la cámara con los alfileres colocándolos en partes específicas para un mejor trabajo.
3. Se le agregó a la cámara la solución Ringer en la cual quedó sumergido el chipo, esta solución permitió mantener las características fisiológicas de los órganos del insecto.
4. Se sujetaron las patas del insecto hacia adelante con los alfileres, para así evitar que los TM o cualquier otro órgano se adhiriesen a ellas durante el proceso.
5. Se cortaron las alas.
6. Se cortó el borde de la cutícula siguiendo la línea del contorno del cuerpo.
7. Se separó la cutícula del cuerpo, cuidadosamente para no perforar ningún órgano y se fijó a un lado de la cámara con un alfiler.
8. Se apartó cuidadosamente la grasa y traqueolas del insecto con el objetivo de dejar los túbulos visibles, y luego se procedió a desenrollar cada uno con mucho cuidado hasta conseguir el extremo ciego.
9. Se cortó cada túbulo dejando una distancia del extremo ciego de 2 cm

aproximadamente.

10. Por último los túbulos fueron extraídos de la cámara con una pipeta Pasteur de vidrio.

Preparación de la solución Ringer para insectos

Se procedió a pesarse con la balanza:

- 8,48 gr de NaCl 145 mM
- 0,64 gr de KCl 8.6 mM
- 0,52 gr de NaH₂PO₄ 4.3 mM
- 0,86gr de NaHCO₃ 10.2 mM
- 0,22 gr de CaCl₂ 2 mM
- 0,27 gr de Alanina (C₃H₇NO₂) 3 mM
- 1,19 gr de Hepes (C₈H₁₈N₂O₄S) 5 Mm
- 6,12 gr de Glucosa (C₆H₁₂O₆) 34 Mm

Cada uno de los reactivos se colocó en beakers diferentes, luego en un beaker de 1000 mL se midieron 600 mL de agua destilada, se colocaron todos los reactivos excepto el CaCl₂ y se mezclaron en un calentador con agitación, se agregó lentamente un reactivo a la vez, luego se agregaron 80 mL de agua destilada en un beaker de 100mL se disolvió el CaCl₂ en polvo y se mezcló en un dispositivo de baño de ultrasonido, evitando así que quedaran partículas sin disolver.

Una vez que todos los reactivos estuvieron totalmente disueltos se procedió a agregarse lentamente el CaCl₂ evitando que este precipitara, se continuó agitando la solución hasta que todos sus componentes estuvieron disueltos, luego se trasvasó a una fiola de 1000 mL y se enrasó.

La solución se mezcló manteniendo siempre el beaker tapado con papel parafilm,

todos los materiales de vidrio fueron curados antes de usarse, La solución después de ser preparada se rotuló con todos sus datos correspondientes, se le midió el pH con un pHchmetro y la osmolaridad con un osmómetro, se mantuvo siempre refrigerada y la glucosa se agregó inmediatamente antes de usar la solución.

Medición del pH intracelular en los TM a través de la técnica de microscopia de fluorescencia empleando el fluoróforo BCECF. Calibración del fluoróforo. Perfusión de los túbulos.

Para la medida del pH intracelular se utilizó un derivado de carboxifluoresceína, el 2' 7' bis (carboxietil)5 – (6') carboxifluoresceína (BCECF) sensible a los cambios de pH del entorno. El penta- acetoximetil- ester de este compuesto (BCECF/AM) no es fluorescente y penetra fácilmente en las células donde es hidrolizado por las esterasas citosolicas, liberándose la forma polianionica fluorescente BCECF. El espectro de excitación de este compuesto depende de su estado de ionización, mostrando un desplazamiento de la λ del máximo de excitación. Así pues las medidas de fluorescencia se realizaron a una λ de emisión de 530 nm, después de haber excitado la muestra alternativamente a 500nm y 450nm. La emisión fluorescente obtenida a 530nm tras haber excitado a 500nm fue altamente sensible al pH, mientras que a 450nm fue prácticamente independiente del pH (punto isoeléctrico) (23).

Después de corregir la fluorescencia basal de la muestra, el uso de la relación de las fluorescencias obtenidas para las 2 longitudes de onda de excitación ($R = F_{500} / F_{450}$) proporcionó medidas de pH intracelular que no se vieron afectadas por los cambios de concentración intracelular de sonda debidos a su pérdida o al fotodesteñido. Se midió la fluorescencia basal de la cámara y seguidamente se incubaron las células con BCECF 10 μ l durante 5 minutos a 37 °C a continuación se excitó la muestra alternativamente a λ 450 – 500nm midiendo la fluorescencia (F) emitida a 530 nm. Después de corregir estos valores con la fluorescencia basal, se calculó la relación $R = F_{500} / F_{450}$ (23).

Todas las medidas de F se llevaron a cabo perfundiendo continuamente la cubeta con el tampón de ensayo, para evitar la posible interferencia de sonda liberada al medio tras haber sido incorporada. Con el fin de convertir los coeficientes obtenidos de $R = F_{500} / F_{450}$ en valores concretos de pH intracelular se realizó una curva de calibrado tanto en las células control como en las tratadas con 5-HT y bafilomicina. Para ello se perfundió la cubeta con soluciones tamponadas a distintos pHs y que contenía nigericina la cual actuó como ionóforo igualando el pH con el pH del tampón en cuestión. En estos tampones de calibrado se sustituyeron el NaCl por KCl 120 mM. Procediendo de modo análogo a lo explicado anteriormente, se evaluó el cociente R determinado por cada uno de los tampones de calibrado, y con la curva obtenida se calculó por interpolación los valores de pH correspondientes a los F_{500} / F_{450} medidos con anterioridad al calibrado (23).

Finalmente para el cálculo de los valores de pH se empleó la fórmula:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{(R - R_A) \times \frac{F_A(\lambda_2)}{F_B(\lambda_2)}}{(R_B - R)}$$

Donde pKa es la constante de disociación del BCECF, R es el cociente $F_{(\lambda_1)} / F_{(\lambda_2)}$ de las lecturas a las longitudes de onda utilizadas (440 y 500 nm respectivamente), R_A y R_B representan los valores límite en los extremos ácidos y básicos de la valoración. F_A / F_B es el cociente de fluorescencia a 500 nm de una solución sin 5-HT dividida por el de una saturada.

El BCECF posee 2 grandes ventajas:

1. Tiene un pKa de aproximadamente 7.0 lo cual es muy cercano al pH intracelular normalmente observado en la mayoría de las células.
2. Posee 4 grupos carboxilos, por lo tanto es bastante impermeable a través de las membranas celulares y por ello permanece atrapado en el citoplasma.

Preparación del fluoróforo BCECF.

Se tomó un vial de BCECF de concentración 10 μM y peso de 50 μg y se le agregaron 20 μl de DMSO, se sonicó durante 15 – 20 minutos, luego se separó en 10 alícuotas que se colocaron en tubos de ependorf rotulados con los datos de la solución.

La solución se mantuvo refrigerada y protegida de la luz, inmediatamente antes de usarse el fluoróforo para la técnica, se agregaron aproximadamente de 2 a 4 μl de ácido plurónico, se enrasó con 363 μl de solución ringer y se sonicó durante 2 minutos.

Cargado de los TM con el fluoróforo BCECF

Se colocó una gota de fluoróforo en la cámara de carga, se colocaron los TM y se dejaron cargando por un lapso de tiempo de 1 hora, luego fueron extraídos de esta cámara, montados en la cámara de perfusión y llevados al instrumento de medición de fluorescencia.

Una vez cargados los túbulos con el fluoróforo se lavaron con abundante solución RI y posteriormente fueron montados sobre cubreobjetos 22x40 para formar el piso de la cámara, estos cubreobjetos previamente fueron tratados con el reactivo silanizante trimetilclorosilano (Pfaltz and Bauer, Research Chemical Division, Standford Conn. USA.) Para permitir la adhesión del TM y evitar artefactos de movimiento por acción del sistema de perfusión.

La cámara empleada para los ensayos de fluorescencia consistió en una pieza de plexiglas translucido, labrada para formar un pozo experimental de 300ul con su respectiva entrada y salida de soluciones, las cuales estuvieron acopladas a un sistema de perfusión gravitatoria y una válvula multipuerto con las diferentes soluciones experimentales. En algunos casos se utilizó un sistema de micro perfusión superficial DAD-12 (Adam & List Associates, Westbury, NY. USA).

La cámara se fijó sobre la platina de un microscopio invertido (Diaphot, Nikon, Garden City, N.Y. USA.), y se conectaron las mangueras de perfusión y succión. El flujo de solución a través del pozo experimental se mantuvo constante durante los experimentos. Como fuente de luz se utilizó una lámpara de Xenon y las longitudes de excitación del fluoróforo se seleccionaron a través de una interfase en la cual se colocaron filtros de 450 y 530 nm. Un espejo dichroico permitió recoger la emisión en 530 nm. Las intensidades de fluorescencia se colectaron en tiempo real a 500ms, mediante un sistema de adquisición acoplado a una cámara CCD y un sistema de intensificación de imágenes (ION OPTIX Corporation, Milton, MA. USA.).

A cada preparación se le aplicaron soluciones Ringer insecto con diferentes agentes farmacológicos (5-HT y Bafilomicina) solos o en conjunto, variando el orden de aplicación para discriminar las diferentes respuestas fisiológicas.

Análisis de Datos

Para la adquisición y análisis de los datos obtenidos se empleó el Software comercial Ionwizard® (IonOptix Milton, MA USA), para el post procesamiento de los datos se utilizó la hoja de cálculo Microcal Origin 6.0 (OriginLabs, Northampton MA. USA), las gráficas obtenidas fueron del tipo ΔF versus tiempo, se emplearon gráficos de dispersión de puntos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

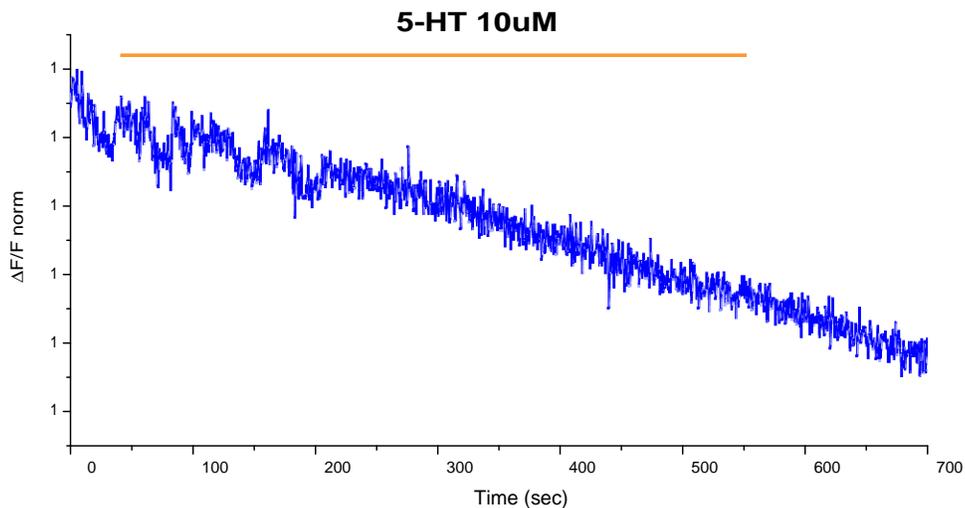
La fase experimental de este estudio comprendió la ejecución de una serie de experimentos que permitieran evaluar las variaciones del pH intracelular en los túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* al ser tratados con diferentes agentes farmacológicos, obteniéndose los siguientes resultados:

En los experimentos se empleó el fluoróforo BCECF que es sensible a los cambios de pH del entorno, por lo que, a través de la variación fluorescencia, pudieron determinarse los cambios de pH. En la gráfica 1 se observa como al perfundir los túbulos con la solución de 5-HT 10uM la fluorescencia disminuye a medida que aumenta el tiempo, lo que indica un aumento de los hidrogeniones a nivel intracelular a medida que la solución de 5-HT ingresa al túbulo y por ende una disminución del pH intracelular. Se evidenció una disminución de $\Delta F ([H^+]_i) = -6.598 \pm 1.33$ (n=7) en escalas de tiempo comparables BCECF: $t_0 = 34.6 \pm 5.86$, $t/2 = 108.37 \pm 6.06$, $t_{max} = 221.57 \pm 27.32$ (n=3) seg. En TM sin estimulación se observó un pH de 6.95 ± 0.02 , en TM estimulados con 5-HT se observó un pH de 6.79 ± 0.06 . Lo que es consistente con los resultados obtenidos por Ianowski y O'Donnell en el año 2006, donde el pH intracelular fue de 6.97 ± 0.01 y 6.82 ± 0.04 en los túbulos sin estimulación y en los estimulados con 5-HT respectivamente. Sustentándose así la teoría de que la 5-HT ejerce funciones diuréticas y produce la activación de la V-H⁺ATPasa apical produciendo un intercambio de Na⁺ por H⁺ en el cual el Na⁺ es expulsado al medio extracelular produciéndose asimismo la entrada de H⁺ al medio intracelular, con la consiguiente disminución del pH intracelular (13).

Teóricamente se conoce que una vez que el *R. prolixus* se alimenta, en pocos minutos pierden mucho del volumen ingerido, gracias a su capacidad de excretar inmediatamente después de alimentarse, a través del proceso de secreción a nivel de los túbulos de Malpighi (5), siendo estos procesos de secreción tubular, estimulados por hormonas como la 5-HT que son producidas por el sistema

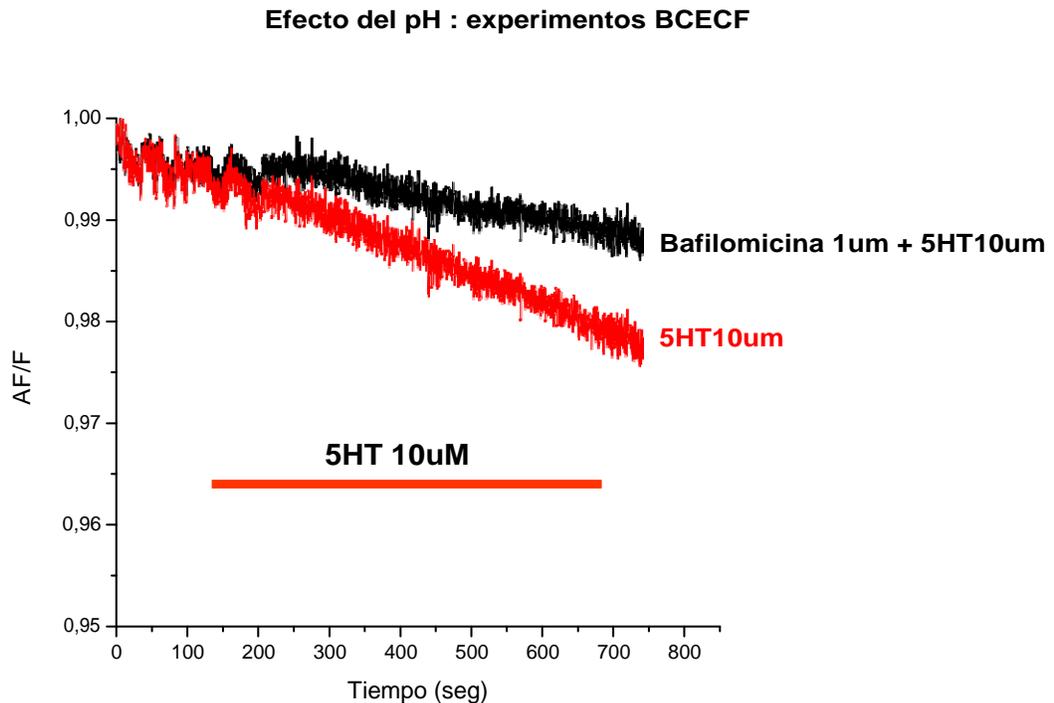
nervioso del insecto en respuesta a estímulos como el aumento del metabolismo, el cambio de volumen o el incremento de la presión hidrostática del exoesqueleto (8). En los experimentos realizados se perseguía recrear *in vitro* lo que sucede *in vivo* en el insecto, observándose como al suministrar la 5-HT evidentemente la concentración de H^+ intracelular aumenta produciéndose una disminución del pH esta evidencia experimental conduce a deducir que una vez que el insecto se alimenta y se produce el aumento del metabolismo celular efectivamente disminuye el pH intracelular en los túbulos de Malpighi.

Gráfico 1.- Variación de fluorescencia en función del tiempo, en túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* estimulados con 5-HT 10uM



En el gráfico 2 se muestra que al perfundir los túbulos con la solución de 5-HT 10uM la fluorescencia disminuye a medida que aumenta el tiempo, en el caso de perfundir con Bafilomicina 1uM + 5-HT 10uM se observa que la disminución de la fluorescencia es menos drástica que al emplear solamente 5-HT, observándose como la variación de la fluorescencia se mantiene casi estable, esto se debe a que la Bafilomicina ejerce un efecto antagonista a la 5-HT produciendo un bloqueo de la V-H⁺ATPasa apical, evitando así el intercambio Na⁺/H⁺ y de esta forma al bloquearse la entrada de H⁺ al medio intracelular no se produce la disminución de pH.

Gráfica 2.- Variación de fluorescencia en función del tiempo, en túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* estimulados con 5-HT 10uM y Bafilomicina 1uM + 5-HT 10uM.



A partir de la evidencia experimental obtenida, la documentación teórica y los modelos de secreción en túbulos de Malpighi se deduce el mecanismo de control y regulación de la secreción de volumen en los túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* observándose que a largo plazo la 5-HT promueve el aumento de la concentración de Na^+ que se traduce en una mayor actividad metabólica, el AMPc produce la activación de la V-H^+ ATPasa apical, produciéndose el intercambio Na^+/H^+ se aumenta la concentración de hidrogeniones intracelular lo cual conduce a una disminución del pH intracelular.

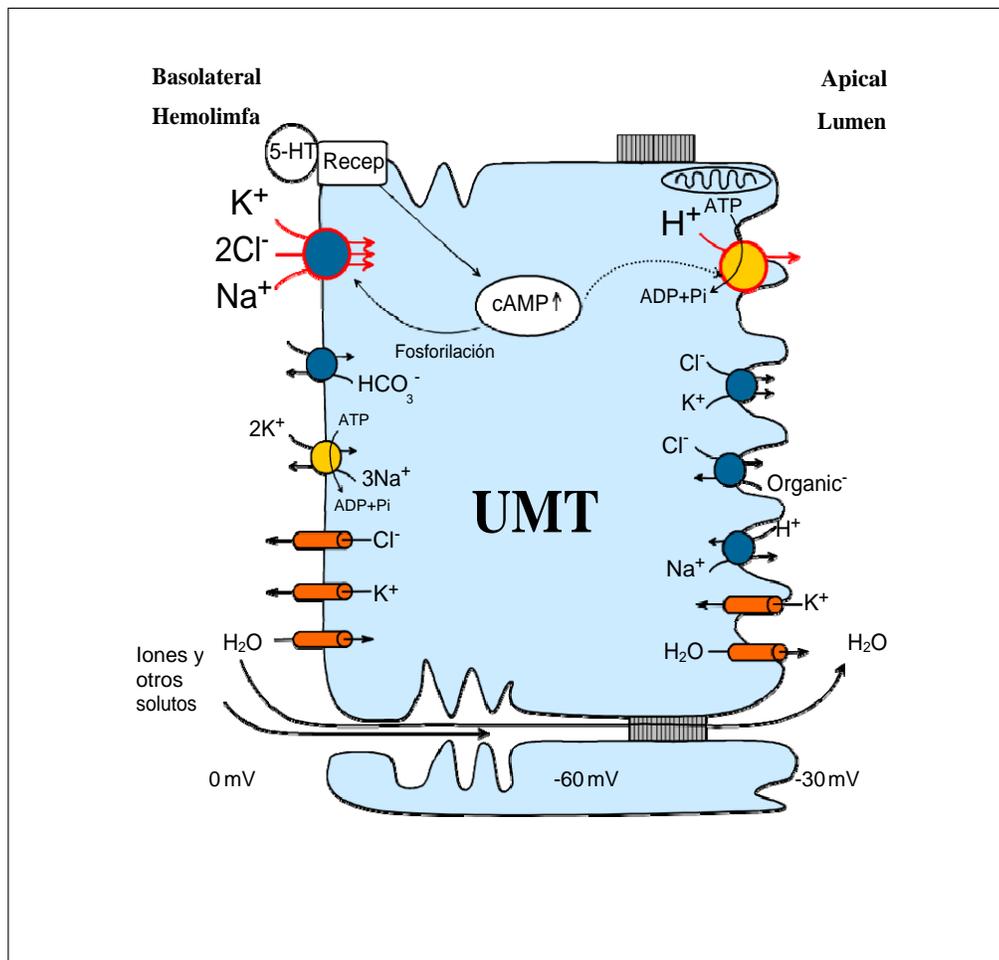


Fig. 1.- Modelo de Secreción de los TM. Tomado de Gutiérrez A, Hernández C, Whittombury G. A Model for Fluid Secretion in *Rhodnius* Upper Malpighian Tubules (UMT). J. Membr. Biol. 2004; 202: 111.

CONCLUSIONES

En TM de *R. prolixus* en condiciones de reposo (sin estimulación) se observó un pH de 6.95 ± 0.02 , al perfundir los túbulos con una solución de 5-HT 10uM se observó un pH de 6.79 ± 0.06 .

En *R. prolixus* la 5-hidroxi-triptamina produce la activación de la V-H⁺ATPasa apical produciendo un intercambio de Na⁺ por H⁺ en el cual el Na⁺ es expulsado al medio extracelular produciéndose asimismo la entrada de H⁺ al medio intracelular, con la consiguiente disminución del pH intracelular.

La Bafilomicina ejerce un efecto antagonista a la 5-HT produciendo un bloqueo de la V-H⁺ATPasa apical, evitando la disminución del pH.

RECOMENDACIONES

Se recomienda dar continuidad a la investigación, por la gran utilidad que trae este estudio en el ámbito científico, permitiendo perfeccionar los modelos fisiológicos que describen el funcionamiento del aparato excretor del insecto. Asimismo por su importancia desde el punto de vista epidemiológico a través del conocimiento de la fisiología y comportamiento de *Rhodnius prolixus*, así como la relevancia que tiene el manejo de una técnica como la microscopia de fluorescencia, totalmente nueva y desconocida para muchos profesionales, resulta sumamente provechoso ampliar los conocimientos sobre el tema y la técnica empleada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benenson A. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. décima quinta edición. Informe oficial de la asociación estadounidense de salud pública, O.P.S. 1992; Publicación científica N° 538: 634-643.
2. Zeledón R. Los vectores de la enfermedad de Chagas en America. In: Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas. Buenos Aires. Sociedad Argentina de Parasitología. 1972; 327-345.
3. Dujardin J, Muñoz M, Chavez T, Ponce C, Moreno J, Schofield C. The origin of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Medical & Veterinary Entomology*. 1998; 12: 113-115.
4. Wigglesworth V. The physiology of the excretion in a blood sucking insect, *Rhodnius Prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) II. Anatomy and histology of the excretory system. *J. Exp. Biol*. 1931; 8: 443-451.
5. Ramsay J. Excretion by the Malpighian tubules of the stick insect *Dixippus morosus*: (Orthoptera Plasmidae): aminoacids, sugar and urea. *J. Exp. Biol* 1958; 35: 871-891.
6. Montoreano R. Encuentro con *Rhodnius prolixus* y su sistema excretor. *Salus, Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo*. 2003; Vol. 7 - N° 1: 2-12.
7. Machado C, Ramírez J. Chipos, Cuadernos Científicos, 1a serie, No. 2, Dirección de Cultura, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 1967; p. 21-25.
8. García R. Un vistazo a la fisiología del transporte de iones en el chipo. *Lab. De Fisiología Renal, Centro de biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Cientificas, Caracas, Venezuela*. 2006; p. 1-7.
9. Phillips J. Comparative physiology of insect renal function. *Am. J. Physiol*. 1981; 241: R241-R257.
10. Maddrell H, O'Donnell M. Insect Malpighian tubules: V-ATpase action in ion and fluid transport. *J. Exp. Biol*. 1992; 172: 417-429
11. Hegarty J, Zhang B, Pennabecker T, Petzel D, Baustian M, Beyenbach K. Dibutyryl cAMP activates bumetanide-sensitive electrolyte transport in malpighian tubules. *Am. J. Physiol*. 1991; 261: C521-C529.
12. Gutierrez A, Hernandez C, Whittombury G. A Model for Fluid Secretion in

Rhodnius Upper Malpighian Tubules (UMT). *J. Membr. Biol.* 2004; 202: 105–114.

13. Gutiérrez A, García R, Gámez A, Hernández C, Whittembury G. Estudio de los mecanismos de transporte iónico involucrados en la secreción en túbulos de malpighi de chipo (*Rhodnius prolixus*). *Acta Científica Venezolana.* 2005; 56 (4):149-158.

14. Skou, J. The Na-K pump. *News Physiol. Sci.* 1992; 7: 95-100.

15. Maddrell H, Overton J. Stimulation of sodium transport and fluid secretion by ouabain in an insect malpighian tubule. *J. Exp. Biol.* 1988; 137: 265-276.

16. Harvey W, Wieczorek H. Animal plasma membrane energization by chemiosmotic H⁺ V-ATPases. *J. Exp. Biol.* 1997; 200: 203-216.

17. Wieczorek H, Grüber G, Harvey W, Huss M, Merzendorfer H, Zeiske W. Structure and regulation of insect plasma membrane H⁺- V-ATPase. *J. Exp. Biol.* 2000; 203: 127-135.

18. Ianowski J, Christensen R, O'Donnell M. Na⁺ competes with K⁺ in bumetanide-sensitive transport by Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* 2004; 207: 3707-3716.

19. Ianowski J, O'Donnell M. Electrochemical gradients for Na⁺, K⁺, Cl⁻ and H⁺ across the apical membrane in Malpighian (renal) tubule cells of *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* 2006; 209: 1964-1975.

20. Paluzzi J, Orchard I. Distribution, activity and evidence for the release of an anti-diuretic peptide in the kissing bug *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* 2006; 209: 907-915.

21. García R, Gutiérrez A, Whittembury G. Secreción urinaria en insectos. Efecto de la Furosamida en el flujo de Na⁺ en células epiteliales. Rol fisiológico de la segunda bomba de Na⁺ y de la Na⁺/K⁺ ATPasa. *Nefrol. Venezolana.* 2008; Vol 10 - N° 3: 6.

22. Hernandez R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. Tercera edición. Mc Graw Hill. 2003.

23. Negulescu P, Machen T. Intracellular ion activities and membrane transport in parietal cells. *Methods Enzymol* 1990; 192:38-81. (AN: 91163398).