



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LA SEGUNDA  
BOMBA DE  $\text{Na}^+$  EN LOS CAMBIOS DE LA CONCENTRACIÓN  
INTRACELULAR DE  $\text{Na}^+$  RELACIONADOS A LA ACTIVACIÓN  
DE LA SECRECIÓN DE LOS TÚBULOS DE MALPIGHI DE  
*Rhodnius prolixus***

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Denise M. Romero Y. como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Prof. Antonio Gutiérrez

CARACAS, VENEZUELA  
OCTUBRE - 2019

**DEL EXÁMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL  
DE GRADO DE LA Br. Denise Mercedes Romero Yamarte**


Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Denise Mercedes Romero Yamarte, C.I. V-20.914.219, titulado “**EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LA SEGUNDA BOMBA DE Na<sup>+</sup> EN LOS CAMBIOS DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE Na<sup>+</sup> RELACIONADOS A LA ACTIVACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LOS TÚBULOS DE MALPIGHI DE *Rhodnius prolixus***”, para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los dieciocho (18) días del mes de octubre del año dos mil diecinueve (2019), dejando constar que el Prof. Antonio Gutiérrez actuó como coordinador del jurado examinador.

  
Dra. María Pérez Gordones  
(Jurado)



  
Dr. Jesús Del Castillo  
(Jurado)

  
Dr. Antonio Gutiérrez  
(Tutor)

## RESUMEN

*Rhodnius prolixus* es un insecto hematófago, vector del protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas (Lecuona y col., 2001). Un elemento esencial de este insecto es el transporte rápido en el proceso de absorción intestinal, seguido de una rápida secreción que es llevada a cabo por los túbulos de Malpighi (TM), que se encuentran bañados directamente por la hemolinfa. El modelo de secreción propuesto por Gámez y col. (2012), refleja que la secreción se produce hacia el lumen de los túbulos, esto es atravesando la membrana basolateral, el citoplasma y la membrana apical. Se destaca la ubicación de un triple cotransportador electroneutro  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ , una ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  sensible a la ouabaína, una ATPasa de  $\text{Na}^+$  inhibida por furosemida, un canal de  $\text{Na}^+$  inhibido por amilorida y canales de  $\text{K}^+$  en la membrana basolateral, además de otros mecanismos que permiten el equilibrio. A partir de este modelo, en este trabajo fue comprobada la respuesta de los túbulos a la presencia de distintos fármacos, destacando 5-HT y furosemida al inducir un aumento en la  $[\text{Na}^+]_i$ , y obteniéndose una mayor concentración al añadir ambos fármacos en conjunto; mientras que no fue observado un aumento en presencia de ouabaína. Como principal resultado destaca el efecto de 5-HT, el cual parece ejercer una inhibición sobre la ATPasa de sodio, además de estimular al triple cotransportador  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ . Esto último comprobado mediante experimentos con Ringer bajo cloruro. También, el efecto inhibitorio de la hormona sobre la ATPasa de sodio parece ser aditivo al de furosemida. Siendo esto así, la Segunda ATPasa de Sodio presenta una participación fundamental en la concentración intracelular de sodio, y por ende se sugiere que también en la secreción de los TM de *Rhodnius prolixus*.

Palabras clave: *Rhodnius prolixus*, túbulos de Malpighi, 5-HT, furosemida, ouabaína, amilorida, fluorescencia, probenecid.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar le agradezco a Dios, por permitirme siempre aprender y avanzar. Les agradezco a mis padres que incondicionalmente siempre me apoyaron con mucho amor y mucho orgullo haciendo más allá de lo posible, tanto en la realización de la tesis como durante el trayecto de toda la carrera. El cuidado y la disciplina por parte de mi papá, junto a la comprensión de mi mamá, han formado un buen equipo creciendo juntos cada día. Le agradezco a mis hermanos, quienes siempre estuvieron atentos e interesados por mis avances, compañías únicas que con personalidades opuestas permite un complemento lleno de consejos y de chistes, actitud independiente de la situación, amor sincero de hermanos. Especiales gracias a mi abuelo que con su atención magnífica y especial bendición siempre me brindó todo su cariño y su compañía. Fue, es y seguirá siendo la persona más especial y más pura que he conocido en la vida. Gracias al resto de mi familia, tíos y primos, que siempre me han brindado apoyo y estuvieron muy atentos a lo largo de la carrera.

Muchísimas gracias a mi tutor, el Dr. Antonio Gutiérrez, por permitirme formar parte del laboratorio de Fisiología y Biofísica en el Instituto de Biología Experimental (IBE). Gracias por alimentar mi crecimiento profesional otorgándome la oportunidad de realizar este trabajo bajo una tutela que siempre he descrito como única al dejarme avanzar bajo mis ideas y cuidándome en las caídas. Gracias por la enseñanza, la paciencia y el cariño. Con usted aprendí que realmente para todo aplica el “comenzar desde lo más fácil e ir hacia lo más difícil” y que siempre hay solución para todo.

Muchas gracias a Rafael García, mi profesor en la universidad, tutor en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), y el gran amigo que conocí gracias a la realización de este

trabajo. Gracias por la atención, el cuidado, la ayuda necesaria y cada consejo. Me has enseñado a ver mis cualidades, resolver por mí misma y tomar buenas decisiones. Gracias por ser tan especial y uno de mis mejores amigos.

Gracias únicas a la Universidad Central de Venezuela por abrirme las puertas de esta maravillosa casa de estudios y a la inigualable Facultad de Ciencias. Agradezco a mis profesores, que me brindaron una excelente educación y una bonita atención. Así como también a mis jurados de tesis que me permitieron ir más allá de lo básico.

Gracias al Laboratorio de Fisiología y Biofísica y a sus integrantes, ubicado en el Instituto de Biología Experimental (IBE), donde inicié el aprendizaje para este trabajo. Y muchísimas gracias al Laboratorio de Biología de Vectores y Parásitos del Instituto de Zoología y Ecología Tropical (IZET), dirigido por la Dra. Leidi Herrera, por la atención, por siempre donar amablemente los chipos utilizados en estos experimentos, y sobre todo gracias al querido Luis quien siempre estuvo atento a ayudarme con todo lo necesario para los experimentos. Así como también agradezco a los chipos que fueron utilizados para la realización del trabajo, los más importantes.

Muchísimas gracias al Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal, ubicado en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), que me adoptó, entrenó, confió en mí y me permitió la realización total de los experimentos, bajo el cuidado de Carolina Aristimuño y la jefa de laboratorio María Alexandra García. Por siempre agradecida con ustedes.

Gracias a mis amigos de la universidad, con la mayoría compartí la misma etapa de tesis, comprendiendo la situación y el sentimiento mutuo. La universidad me permitió conocer personas muy especiales, únicas a su manera. Gracias a Víctor De Oliveira que siempre estuvo atento a cada avance, cambio, estrés, tristezas y alegrías. Muchas gracias a Jesús Aranguren, que

siempre estuvo pendiente de mi bienestar en el laboratorio y me fue a buscar cuando lo necesité. En general, gracias a todos mis lindos amigos por siempre estar tan atentos en cada paso y a lo largo de la realización del trabajo, animándome con sus ocurrencias y brindándome gran apoyo.

Gracias a la familia García por siempre apoyarme y preocuparse por mí. Gracias a Adriana García, quien en momentos difíciles durante la realización de la tesis me dijo “nosotras vamos a ver cómo resolver, pero tu seguro terminas tu tesis”, 21 años de amistad demostrando fuerte cariño.

En general, hay muchísimas personas a las cuales reconocer y agradecer, puesto que de una u otra manera participaron y me permitieron continuar y solucionar en cada etapa del proyecto. Detalles que valen oro. Gracias por los valores, las palabras y las acciones

Finalmente, recordando el cambio de quien era antes de la tesis y quien soy hoy día, agradezco enormemente lo vivido, experiencias buenas y malas que al final comprendo y noto lo valiosas que son. Cada detalle siempre estará presente. No creo en las casualidades y sé que quise estudiar biología por una razón importante, sobre todo porque amo la investigación.

Gracias eternas.

# ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. ANTECEDENTES.....	19
III. OBJETIVOS.....	26
3.1. General.....	26
3.2. Específicos.....	26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
4.1. Material biológico.....	27
4.2. Reactivos y soluciones.....	27
4.2.1. Ringer Insecto (RI).....	27
4.2.2. Ringer bajo cloruro.....	28
4.3. Disección y aislamiento de los túbulos de Malpighi (TM).....	28
4.4. Montaje experimental.....	31
4.5. Medición de la concentración intracelular de sodio ( $[Na^+]_i$ ).....	34
4.6. Perfusión.....	38
4.7. Protocolo experimental.....	40
4.7.1. Efecto en la concentración intracelular de sodio en túbulos de Malpighi (TM) de <i>R. prolixus</i> en presencia de distintos fármacos.....	40
4.7.2. Efecto de furosemida en la concentración intracelular de sodio en TM previamente estimulados y que además se ha revertido la acción de la hormona.....	41
4.7.3. Medida de la $[Na^+]_i$ en TM de <i>R. prolixus</i> al añadir 5-HT o furosemida en presencia de un efecto previo.....	41

4.7.4. Cambio en la concentración intracelular de sodio en TM estimulados, al aplicar furosemida y amilorida.....	42
4.7.5. Cambio en la concentración intracelular de sodio, con una solución Ringer Insecto bajo cloruro.....	42
4.8. Adquisición y Análisis de datos.....	42
V. RESULTADOS.....	44
5.1. Carga de los Túbulos de Malpighi de <i>R. prolixus</i> con SBFI.....	44
5.2. Medida de la $[Na^+]_i$ en TM de <i>R. prolixus</i> en presencia de cada uno de los fármacos.....	47
5.3. Efecto de furosemida y 5-HT en la $[Na^+]_i$ en TM de <i>R. prolixus</i> a los que se le ha revertido la estimulación farmacológica.....	52
5.4. Medida de la $[Na^+]_i$ en TM de <i>R. prolixus</i> al añadir 5-HT o Furosemida en presencia de un efecto previo.....	56
5.4.1. 5-HT en presencia de furosemida.....	57
5.4.2. Furosemida en presencia de 5-HT.....	58
5.5. Cambio en la $[Na^+]_i$ en TM de <i>R. prolixus</i> estimulados al aplicar furosemida y amilorida.....	59
5.6. $[Na^+]_i$ en TM de <i>R. prolixus</i> durante la presencia de 5-HT y furosemida en condición Ringer 5 mM $Cl^-$ .....	62
VI. DISCUSIÓN.....	64
VII. CONCLUSIONES.....	73
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema del sistema excretor de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	15
Figura 2. Modelo de la secreción en una célula de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	25
Figura 3. Ejemplares de <i>Rhodnius prolixus</i> V instar y adulto.....	29
Figura 4. Procedimiento de disección y aislamiento de los túbulos de Malpighi de un ejemplar adulto de <i>R. prolixus</i> .....	30
Figura 5. Esquema del procedimiento empleado para la carga con el fluoróforo SBFI los túbulos de Malpighi .....	32
Figura 6. Montaje de la cámara utilizada para realizar los registros.....	33
Figura 7. Sistema de equipos utilizados para la medición de fluorescencia con SBFI.....	36
Figura 8. Esquema del equipo para la medición fluorescente de sodio con SBFI.....	37
Figura 9. Cauce de la perfusión en la cámara experimental.....	39
Figura 10. Sistema de superfusión utilizada durante cada registro experimental.....	39
Figura 11. Túbulos de Malpighi de <i>Rhodnius prolixus</i> cargados con SBFI-AM.....	45
Figura 12. Relación entre una micrografía y una imagen fluorescente de un túbulo de Malpighi de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	45
Figura 13. Efecto de la hormona 5-HT (10 $\mu$ M) sobre la concentración intracelular de Na <sup>+</sup> en TM de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	48
Figura 14. Efecto de furosemida (1 mM) sobre la concentración intracelular de Na <sup>+</sup> en TM de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	49
Figura 15. Efecto de ouabaína (25 $\mu$ M) sobre la concentración intracelular de Na <sup>+</sup> en TM de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	50
Figura 16. Comparación del efecto de 5-HT (10 $\mu$ M), furosemida (1 mM), ouabaína (25 $\mu$ M) y amilorida (0.1 $\mu$ M) en TM de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	51
Figura 17. Efecto de 5-HT (10 $\mu$ M) luego de la presencia de furosemida (1 mM) en TM de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	54
Figura 18. Efecto de furosemida (1 mM) luego de la presencia de 5-HT (10 $\mu$ M) en TM de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	55
Figura 19. Respuesta a furosemida (1 mM) y a 5-HT (10 $\mu$ M), luego de lavar el efecto de	

estimulación en TM de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	57
Figura 20. Respuesta a furosemida (1 mM) y a 5-HT (10 $\mu$ M), luego de lavar el efecto de estimulación en TM de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	58
Figura 21. Comparación entre el efecto de 5-HT (10 $\mu$ M), furosemida (1 mM) y amilorida (100 $\mu$ M) durante un mismo curso temporal en TM de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	60
Figura 22. Comparación entre el efecto de 5-HT (10 $\mu$ M), furosemida (1 mM) y amilorida (100 $\mu$ M) durante un mismo curso temporal en TM de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	61
Figura 23. Comparación entre el efecto de 5-HT (10 $\mu$ M) y furosemida (1 mM) en Ringer Insecto (RI) condición normal y condición 5 mM Cl <sup>-</sup> en TM de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	63

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Comparación entre el efecto único de distintos fármacos en TM de <i>R. prolixus</i> .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT: 5-hidroxitriptamina.

AMPC: Adenosín monofosfato cíclico.

ENaC: Epithelial Sodium Channel.

Furo: Furosemida.

Rhpro-DH: Hormona diurética de *Rhodnius prolixus*.

RI: Ringer Insecto.

SBFI: Sodium Binding Benzofuran Isophtalate

TM: Túbulo de Malpighi.

## I. INTRODUCCIÓN

*Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), comúnmente conocido como “chipo”, es un insecto hematófago perteneciente a la subfamilia de los triatominos y transmisor del protozooario *Tripanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas que, según la O.M.S. (2017), es una enfermedad tropical desatendida. *Rhodnius prolixus* es considerado como el principal vector de Chagas en Venezuela y Colombia, así como responsable de la transmisión de la enfermedad en gran parte de América Central (Lent y Wigodzinsky, 1979; Hashimoto y Schofield, 2012). Además de transmitir *T. cruzi*, este triatomino también puede ser infectado por *Trypanosoma rangeli* (Zeledón y Blanco, 1965), un protozoo que no causa enfermedades a los humanos. Debido a la reciente emergencia de un escenario epidemiológico de chipos en Venezuela (Reyes-Lugo y col., 2011; Berrizbeitia y col., 2013; García-Alzate y col., 2014; García-Jordán y col., 2015) y países vecinos como Brasil (Ricardo-Silva y col, 2016) y Colombia (Cantillo-Barraza y col., 2015), es pertinente llevar a cabo investigaciones que permitan la recopilación de información que complete el conocimiento total de estos insectos y por ende una futura erradicación a la enfermedad que transmiten.

En un estudio realizado por Farfán y col. (2007), fueron encontrados individuos que presentaron como principales fuentes de alimentación sangre de ave, humano, cerdo y cabra. A su vez, también encontraron individuos alimentados con sangre de animales silvestres, lo que demuestra la capacidad de desplazamiento que presentan estos insectos.

*Rhodnius* se caracteriza por presentar una tonalidad pardo-amarillenta con manchas de color marrón oscuro. Su cabeza es alargada hacia adelante (cabeza prognata), con ojos compuestos. En el tórax, visto por la cara dorsal, solamente se observa el pronoto, ya que el mesonoto y el

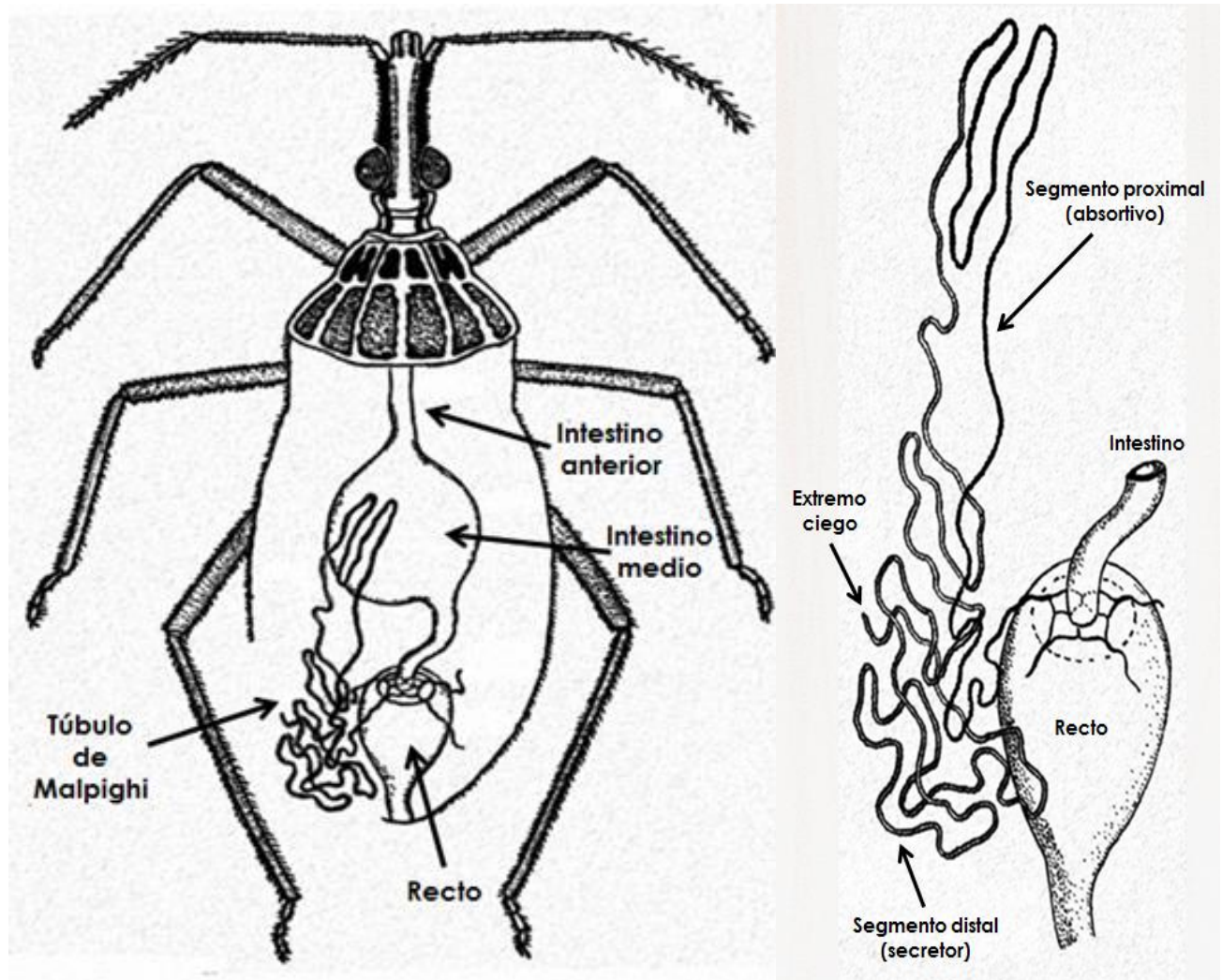
metanoto están ocultos por las alas plegadas; del tórax salen tres pares de patas delgadas terminadas en un par de uñas (adultos). Su abdomen es de forma oval y su borde lateral, llamado conexivo, presenta marcas distintivas que permiten su clasificación. Este insecto presenta 5 estadios inmaduros (ninfas) y un estadio adulto durante su ciclo de vida. Cabe destacar que las ninfas tienen una morfología similar a la de los adultos, solo que en un menor tamaño y con ausencia de alas (Wigglesworth, 1931).

*Rhodnius prolixus* en particular los ejemplares del 5to instar, ninfa previa al adulto, están adaptados a permanecer en ayuno por largos periodos de tiempo, seguidos de grandes y esporádicas ingestas de sangre, generando un aumento en su peso de 2 hasta 10 veces (Beyenbach y Petzel, 1987). Dicho cambio de volumen es posible gracias a la acción de mecanorreceptores ubicados en el abdomen, los cuales envían señales al sistema neurosecretor para que ocurra la liberación de hormonas, que debilitan la unión de las placas cuticulares del insecto, permitiendo la distensión del abdomen durante la ingesta de sangre (Maddrell y col., 1993; Orchard y col., 1989). En este estado de hinchazón, el insecto es vulnerable a la depredación y debe eliminar el exceso de agua y sal para reducir su propio volumen (Maddrell, 1976). De esta manera, el principal atractivo de *Rhodnius prolixus* es el transporte rápido a través del epitelio tubular, donde un líquido rico en NaCl y pobre en  $K^+$  (hiposmótico a la hemolinfa) es bombeado (Martini y col., 2007).

Los túbulos de Malpighi (TM) representan el sistema excretor osmorregulador de *Rhodnius prolixus*, equivalentes al sistema de túbulos renales en los humanos. Estos miden aproximadamente 4 cm, se encuentran suspendidos en la hemolinfa y bañados directamente por la hemolinfa. Se dividen en dos segmentos diferentes: el distal (extremo ciego) y el proximal, que desemboca en el recto (figura 1). Las longitudes superiores de los túbulos de Malpighi

eliminan rápidamente de la hemolinfa un fluido relativamente rico en  $K^+$  (isosmótico a la hemolinfa) (Maddrell, 1969); mientras que las longitudes más bajas de los túbulos modifican el fluido al reabsorber la solución hiperosmótica de KCl (Maddrell y Phillips, 1975). Lo cual deja para la eliminación un fluido similar, en composición iónica y osmótica, al plasma de la sangre ingerida. Cabe destacar que los TM en períodos de ayuno presentan tasas de secreción insignificantes respecto a las obtenidas con la estimulación de 5-HT, por lo cual se consideran “inactivos” (Whittembury y col., 1986; Maddrell, 1991).

El mecanismo de acción de los TM es atractivo desde el punto de vista fisiológico por dos razones principales. La primera y más importante es que, durante la diuresis, estos túbulos pueden transportar fluidos a una velocidad muy alta. En segundo lugar, estudios anteriores han demostrado que esta diuresis es inducida por una hormona diurética de insectos muy potente que, después de la alimentación, causa un aumento en la tasa de transporte de fluidos por los TM (Maddrell y col., 1993). Además, la especie presenta una serie de ventajas para los ensayos fisiológicos, relacionadas con su tamaño relativamente grande, donde las disecciones y manipulaciones experimentales se pueden realizar con relativa facilidad, y la conveniencia de su cría en insectarios (Wulff, 2018). Añadido a esto, autores sugieren que los TM presentan un mismo tipo celular de tipo epitelial binucleada y de morfología aplanada; lo cual facilita la interpretación de los resultados.



**Figura 1. Esquema del sistema excretor de *Rhodnius prolixus*.** Se muestra la distribución de los cuatro túbulo de Malighi (TM), suspendidos en el hemocele. Del lado derecho de la imagen se encuentran señalados los dos segmentos característicos que presentan cada uno de los TM. Modificado de Wiggleswort (1931)



*R. prolixus* está dotado de bombas de iones conocidas como ATPasas, subconjunto de enzimas que son capaces de producir la hidrólisis del adenosín trifosfato y realizar transporte de iones en contra de gradiente de concentración (Guzmán y col., 2011). *Rhodnius* presenta una ATPasa de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  sensible a ouabaína localizada en la membrana basolateral de los TM, la cual bombea tres iones  $\text{Na}^+$  del citosol al lado peritubular (en sentido contrario al flujo de secreción), mientras que toma dos iones  $\text{K}^+$  del lado peritubular hacia el interior celular, produciendo entonces un movimiento neto “invertido” de un ión por vuelta, como por ejemplo el regreso del  $\text{Na}^+$  de la célula al espacio peritubular (Guzmán y col., 2011). Esto último ocasiona una disminución en la secreción cuando el movimiento de iones es bloqueado por el inhibidor, resultando una reducción en el gradiente de concentración de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana basolateral y, por lo tanto, incrementando el flujo hacia el interior celular y facilitando la secreción a través de la membrana apical mediado por el intercambiador de  $\text{Na}^+$  y/o  $\text{K}^+ - \text{H}^+$ .

Al hallarse inactivo el triple cotransportador  $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ , se ha planteado que al no poder entrar suficiente sodio al citoplasma, la cantidad del catión que la  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPasa exporta del citoplasma podría ser considerablemente menor que aquella expulsada por un segundo mecanismo de transporte de sodio que sería fundamental para la homeostasis en condiciones no secretoras. Además, en estas condiciones, se ha demostrado que la ouabaína no tiene efecto sobre la concentración intracelular de sodio en los TM de los insectos (García, 2010), deduciéndose igualmente que la  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPasa parece no ser el único mecanismo de regulación de la concentración intracelular de sodio, se concluye que debe existir otra vía de salida hacia la hemolinfa y se sugiere la presencia de la Segunda ATPasa de  $\text{Na}^+$ , propuesta por Proverbio y col. (1970) para el riñón de mamífero, la cual es insensible a ouabaína pero sensible a furosemida y bumetamida. Esta enzima transporta sodio en contra de su gradiente electroquímico y no es

estimulada por  $K^+$  (Proverbio y col., 1989). Experimentos en TM de *Rhodnius*, en presencia de furosemida, corroboraron que esta segunda bomba tiene una mayor participación en comparación con la  $Na^+/K^+$ -ATPasa en condiciones de reposo.

En trabajos realizados en el laboratorio, con ejemplares de *Rhodnius prolixus* del 5to instar luego de 3 días de la última alimentación, al tratar los TM con furosemida, se observó que no hay un incremento en la concentración intracelular de sodio, lo que sugiere que no hay actividad por parte de la Segunda Bomba de sodio bajo esas condiciones (Freile, 2018). Estos resultados son contrarios a los obtenidos con el fármaco en condición de reposo, en el cual si se observa un aumento (García, 2010) que puede ser explicado por la inhibición de la ATPasa de  $Na^+$ , ya que el triple cotransportador también se encuentra inhibido. Por lo tanto se esperaría que el incremento del  $Na^+$  citoplasmático favoreciera el intercambio de  $Na^+$  y/o  $K^+$  por  $H^+$  luminal, facilitando el flujo del ion hacia el lumen, generando así el flujo de secreción de los TM.

Una vez que se alcanza un ritmo constante de secreción, la tasa de transporte apical tiende a ser más alto que el basolateral, lo que conlleva a la presencia de una zona de ligera hiperosmolalidad (Gámez y col., 2012). De hecho, hay informes de disminución del volumen celular (Hernández y col, 2001), así como también la presencia de un fluido ligeramente hiperosmótico durante la secreción en comparación con el de la hemolinfa (Maddrell, 1980).

A partir de los resultados experimentales previamente obtenidos, se propone - por parte de nuestro laboratorio - un modelo de transporte (Figura 2) para explicar la secreción de los TM en *Rhodnius prolixus*, que incluye, en la membrana basolateral, a la segunda bomba de  $Na^+$  y al canal ENaC. Entonces, este modelo puede ser resumido de la siguiente manera: en la membrana celular basolateral, se encuentra un triple cotransportador fundamental, unas ATPasas de

importancia intermedia, canales iónicos y canales de agua; mientras que en la membrana celular apical, lo más importante es una ATPasa de tipo vacuolar y un intercambiador.

Además, a pesar de conocerse la existencia de la segunda ATPasa de  $\text{Na}^+$ , su papel en la fisiología de los insectos aún no está completamente claro, es por eso que en esta investigación fue planteado estudiar aquellos cambios en la homeostasis de sodio enfocando la participación de la Segunda Bomba de  $\text{Na}^+$  en la activación de la secreción de los túbulos de Malpighi del insecto *Rhodnius prolixus*, así como también el efecto de los fármacos sobre el funcionamiento de la misma.

## II. ANTECEDENTES

Además de su importancia como vector de Chagas, *Rhodnius prolixus* ha sido utilizado como modelo para el estudio de la fisiología de insectos desde los trabajos pioneros del entomólogo inglés Sir. Vincent Wigglesworth entre las décadas de 1930 y 1960 (Wulff, 2018). Sin embargo, el principal antecedente directo a esta investigación comienza con Whittembury (1968), quien planteó la existencia de dos mecanismos de salida basolateral de sodio en células de riñón de mamífero, una  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa sensible a ouabaína y una  $\text{Na}^+$ -ATPasa insensible a ouabaína e inhibida por ácido etacrínico, la cual podría ser electrogénica. Posteriormente, Proverbio y col. (1986), utilizando membranas plasmáticas basolaterales de células de riñón de rata, presentaron evidencias que diferencian claramente la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y la  $\text{Na}^+$ -ATPasa insensible a ouabaína, denominando a esta última como Segunda Bomba de  $\text{Na}^+$ .

Proverbio y col. (1991) observaron, de la misma manera en células de riñón de rata, que la actividad de la  $\text{Na}^+$ -ATPasa está relacionada y modulada por el volumen celular, proponiendo que la función principal de la bomba de  $\text{Na}^+$  puede establecerse mediante su asociación con la regulación del volumen celular activo, respuesta diferencial en los cambios de volumen que apoya la hipótesis de la existencia de dos enzimas distintas con funciones similares en la extracción de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana basolateral.

A partir del hallazgo de la actividad de la  $\text{Na}^+$ -ATPasa insensible a ouabaína e inhibida por furosemida, Caruso-Neves y col. (1998) estudiaron la posible existencia de esta ATPasa en túbulos de Malpighi (TM) de *Rhodnius prolixus*. De esta manera determinaron la respuesta reguladora de la secreción en homogenatos, observando que no fue modificada por ouabaína 1 mM, sugiriendo la presencia de un mecanismo diferente de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, respuesta

reguladora que sí fue inhibida por furosemida y el ácido etacrínico, inhibidores de la  $\text{Na}^+$ -ATPasa.

Ianowski y O'Donnell (2001) midieron la actividad de iones intracelulares y el potencial de la membrana basolateral de los TM de *Rhodnius prolixus* usando microelectrodos selectivos a iones de cañón doble, en la cual observaron que en los TM no estimulados la  $[\text{Na}^+]_i$  fue de  $21 \text{ mmol.l}^{-1}$  y que aumentaba a  $33 \text{ mmol.l}^{-1}$  cuando los TM eran estimulados con 5-HT. Además, Gutiérrez y col. (2004) reportaron que la adición basolateral de furosemida en TM estimulados in vitro con 5-HT, produjo la disminución del volumen de secreción en un 80% en el epitelio excretor, como resultado de la inhibición de la principal entrada de sodio a través del triple cotransportador de  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ .

Apoyándose en estas observaciones, García (2010) estudió la homeostasis del sodio en células epiteliales de *Rhodnius prolixus*, utilizando un sistema de perfusión para evaluar el efecto conjunto de ouabaína  $25 \mu\text{M}$  y furosemida  $1\text{mM}$  sobre los cambios en la concentración intracelular de sodio en TM no estimulados. Los resultados obtenidos mostraron que la ouabaína no induce cambios, sin embargo, la adición de furosemida produjo un incremento, comprobando la existencia de la segunda ATPasa de  $\text{Na}^+$  insensible a ouabaína, responsable principal del movimiento de sodio desde el citoplasma hacia la hemolinfa en condiciones pasivas. Sin embargo, al registrar un aumento en la concentración de sodio, García (2010) propuso la existencia de un segundo mecanismo de entrada a nivel basolateral para el catión sodio mediante un canal de tipo ENaC (Epithelial Sodium Channel). Bajo esta premisa, García (2010) también realizó experimentos con amilorida (inhibidor del canal de sodio), comprobando que el efecto de amilorida evidenciaba la existencia del canal al disminuir la concentración intracelular de sodio.

Cabe resaltar que García (2010) utilizó en su investigación un microscopio invertido equipado para epifluorescencia y un sistema de microperfusión, aplicando drogas en el lado basolateral de TM de individuos de *Rhodnius prolixus* del 5to instar. Al tratar la preparación con SBFI-AM (Sodium - Binding Benzofuran Isophthalate - AM), se registraron variaciones en la relación de fluorescencia del fluoróforo, encontrándose un incremento en la relación de fluorescencia justo cuando se añadió al medio 5-HT 10  $\mu\text{M}$ , incremento correspondiente a la concentración intracelular de sodio.

García (2010) también realizó un estudio frente a una solución Ringer bajo  $\text{Cl}^-$  4 mM para evaluar el efecto de la contribución iónica en la solución fisiológica del medio externo sobre la permeabilidad para sodio en *Rhodnius prolixus* durante el curso temporal de la estimulación con la hormona 5-HT. Encontró que los cambios en los registros de la señal de SBFI al ingresar 5-HT fueron hasta 10 veces menor en magnitud al compararlos con aquellos obtenidos con 5-HT en Ringer Insecto. A su vez, túbulos tratados con Ringer 30 mM  $\text{Cl}^-$  mostraron que las señales correspondientes a 5-HT y a furosemida se mantuvieron a pesar de la concentración de cloruro en el medio extracelular, pero la respuesta con 5-HT mostro una menor magnitud a aquella observada frente a una solución Ringer Insecto con concentración habitual de cloruro.

En un estudio reciente, Freile (2018) evaluó el efecto de furosemida 1mM sobre la inducción de la secreción de los TM en reposo, tratados durante 120 min, donde estos mostraron un incremento significativo del volumen de la gota secretada respecto al control, cuyo resultado presenta por primera vez la secreción en reposo (sin estimulación) de los TM de *Rhodnius prolixus*. Como en estos ensayos no se utilizó ninguna sustancia para estimular la secreción, el volumen de secreción se le atribuye directamente a cambios en la homeostasis de sodio. Posterior a esto, con la finalidad de demostrar que los TM se encontraban activos y con

capacidad de secretar, a los 105 min agregó 5-HT y, como se esperaba, se observó un aumento significativo del volumen de la gota de secreción inmediatamente después de entrar en contacto con la hormona. Además que este resultado permitió comparar la diferencia entre la secreción en presencia de furosemida y en presencia de 5-HT, siendo la segunda mayor a la primera. Este cambio en el medio por estimulación con la hormona puede explicarse tal como lo hicieron Ianowski y O'Donnell (2006), quienes mostraron que la estimulación causa una pequeña disminución pero significativa en el pH intracelular y un aumento significativo en el pH luminal en relación con los túbulos no estimulados y, por tanto, un intercambio de protones por sodio.

A partir de lo observado en TM no estimulados, Freile (2018) realizó un estudio para verificar el efecto de furosemida sobre la secreción en TM que habían sido estimulados por las hormonas diuréticas utilizando ejemplares que habían sido alimentados con 3 días de anterioridad. Previo al experimento se realizaron tres lavados con Ringer Insecto a un volumen no aditivo, con la finalidad de eliminar la presencia de las hormonas. Los resultados obtenidos indicaron que la furosemida no tiene efectos significativos en la secreción de los TM estimulados, contrario al resultado obtenido en condición de reposo en que la furosemida induce la secreción. A su vez, transcurridos los 120 minutos se agregó 5-HT, lo que generó la secreción de los TM.

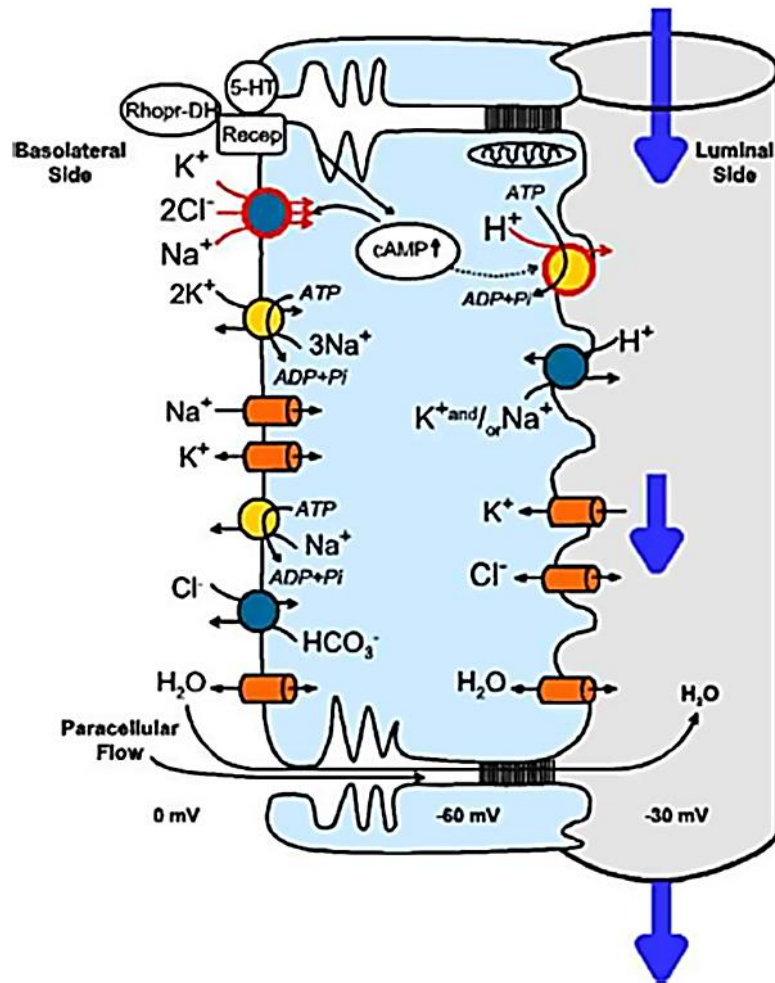
Por lo tanto, al comparar los resultados obtenidos por Freile (2018) surgió el planteamiento sobre un efecto anexo por parte de 5-HT que tal vez no permitiese el efecto de furosemida y, por ende, observar un incremento en la concentración intracelular de sodio en los TM. Además, el efecto de furosemida sobre la inducción de la secreción de los TM en reposo representa una fuerte evidencia de la existencia de la Segunda ATPasa de  $\text{Na}^+$ , localizada en la membrana basolateral. A su vez, a partir de esto se sugiere, que en condición de reposo, la actividad de la Segunda ATPasa de  $\text{Na}^+$  podría ser mayor que la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , ya que pareciera que ésta última por sí

sola no mantiene baja la concentración basal de  $\text{Na}^+$  en el interior celular (García, 2010; Freile, 2018). De esta manera se confirma la importancia de la segunda ATPasa de sodio insensible a ouabaína en la homeostasis de sodio de los TM como principal mecanismo de salida del ion en reposo.

Cada una de las observaciones propuestas por los antecedentes coinciden y se apoyan en el modelo de secreción de *Rhodnius prolixus* (figura 2), propuesto por Gámez y col. (2012). La secreción tubular de *R. prolixus* se inicia con la liberación de las hormonas 5-HT y Rhpro-DH por parte del sistema neurosecretor localizado en el ganglio mesotorácico del insecto en respuesta a estímulos como cambios de volumen o aumento en la presión hidrostática del exoesqueleto, esto activa a los receptores ubicados en la membrana basolateral de los TM (Maddrell y col., 1991), estimulando la actividad de la adenilatociclasa, que aumenta la concentración de AMPc intracelular, lo cual promovería una cascada de fosforilación (Aston, 1979; Maddrell y col., 1991). A través de este mecanismo se activa una  $\text{H}^+$ -ATPasa de tipo vacuolar ubicada en la membrana apical (Wieczorek y col., 1991), encargada de energizar el flujo transepitelial mediante el transporte electrogénico de  $\text{H}^+$  desde el citoplasma hacia el lumen creando un gradiente de protones desde el lumen hacia el citoplasma. Por otra parte, el efecto de la hormona estimula a su vez al triple cotransportador electroneutro  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$  ubicado en la membrana basolateral, promoviendo el ingreso de los tres iones al citoplasma (Haas y Forbush, 2000), y por ende promoviendo un aumento en la concentración citoplasmática de sodio. En la misma membrana basolateral también se encuentran dos mecanismo de salida de sodio: una  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa sensible a ouabaína y una  $\text{Na}^+$ -ATPasa insensible a ouabaína pero inhibida por furosemida; y, además, una segunda entrada de sodio mediante un canal de tipo ENaC inhibido por amilorida. Cabe destacar que este transporte de iones se encuentra acompañado por cloruro



y agua, mediante el intercambiador  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  y acuaporinas, generando entonces también un flujo neto de potasio y cloruro hacia el citoplasma y lumen, y un flujo de sodio hacia el lado extracelular.



**Figura 2. Modelo de la secreción en una célula de *Rhodnius prolixus*.** La secreción se produce de izquierda (membrana basolateral, hemolinfa) a derecha (membrana apical, luz del túbulo). Las ATPasas se muestran como círculos amarillos, intercambiadores como círculos azules sombreados, y los canales como cilindros. Las flechas indican las direcciones de flujo propuestas. El perfil de potencial eléctrico en estado estacionario de TM durante la secreción se muestra en la parte inferior. En la membrana basolateral, las hormonas diuréticas 5-HT y Rhopr-DH se muestran adyacentes de un receptor que, a través de una cascada de AMP cíclico, activaría varios mecanismos, como el cotransportador electroneuro  $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ . Se muestra la ATPasa  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  sensible a ouabaína y la ATPasa  $\text{Na}^+$  insensible a ouabaína e inhibida por furosemida y bumetamida. Se muestra un canal epitelial de  $\text{Na}^+$  y los canales  $\text{K}^+$ . En la membrana apical se localiza una ATPasa de  $\text{H}^+$  de tipo vacuolar encargada de energizar el flujo transepitelial, mediante el transporte electrogénico de  $\text{H}^+$  desde el citoplasma hacia el lumen creando un gradiente de protones desde el lumen hacia el citoplasma, además del intercambiador de  $\text{H}^+$  luminal sensible a amilorida por  $\text{Na}^+$  y/o  $\text{K}^+$  citoplasmático. (Tomado de Gámez y col., 2012).

### III. OBJETIVOS

#### General

Estudiar los cambios en la concentración intracelular del catión sodio, en estados de estimulación hormonal y luego de revertir el efecto de las hormonas, alterando los diferentes mecanismos de transporte ubicados en la membrana basolateral de los túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*.

#### Específicos

1. Comprobar el cambio de la concentración intracelular de sodio en los TM de individuos en ayuna, estimulados con 5-HT, y en presencia de furosemida y ouabaína.
2. Analizar el efecto de furosemida en la concentración intracelular de sodio en TM previamente estimulados y en los que además se ha revertido la acción de las hormonas.
  - 2.1. En individuos en ayuna estimulados *in vitro* con 5-HT.
  - 2.2. En individuos recién alimentados.
3. A partir del resultado del objetivo 2, analizar el cambio en la concentración intracelular de sodio en los TM, con y sin estimulación, al aplicar amilorida y furosemida.
4. A partir del resultado del objetivo 2, analizar el cambio en la concentración intracelular de sodio, con una solución Ringer Insecto bajo cloruro.
5. Estudiar el curso temporal de la desaparición de la actividad de la segunda bomba de sodio y su posterior aparición luego de un periodo prolongado de ayuno.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Material biológico

Para llevar a cabo los experimentos se utilizaron ejemplares de *Rhodnius prolixus* (figura 3), criados en cautiverio en el Laboratorio de Biología de Vectores y Parásitos del Instituto de Zoología y Ecología Tropical (IZET) adscrito a la U.C.V. Los túbulos de Malpighi (TM) fueron obtenidos de ejemplares de ambos sexos con más de tres semanas de ayuno, criados y mantenidos en el laboratorio, incubados a 28°C y 95% de humedad, y alimentados con sangre de gallina.

### 4.2. Reactivos y soluciones

Las soluciones empleadas fueron preparadas utilizando reactivos procedentes de las casas Merck y Sigma Chemicals Co. El indicador fluorescente para sodio fue adquirido de Molecular Probes (Invitrogen), y los fármacos para los diferentes tratamientos experimentales fueron añadidos al momento a partir de soluciones stock previamente preparadas antes de los experimentos y refrigeradas para garantizar su estabilidad.

#### 4.2.1. Ringer Insecto (RI)

La preparación de la solución fisiológica para el mantenimiento de las propiedades fisiológicas de los TM de *Rhodnius prolixus* se realizó de acuerdo a la receta propuesta por Maddrell (1969) para el aislamiento y estudio de estas células. Los compuestos y concentraciones utilizadas fueron: NaCl 145 mM, KCl 8,6 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,3 mM, NaHCO<sub>3</sub> 10,2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,0 mM, glucosa 34 mM; HEPES 5,0 mM, alanina 3 mM, pH 7,2 y osmolaridad 340 mOsm/kg, resultando una solución isosmótica frente a la hemolinfa del insecto.

#### **4.2.2. Ringer Insecto Bajo Cloruro**

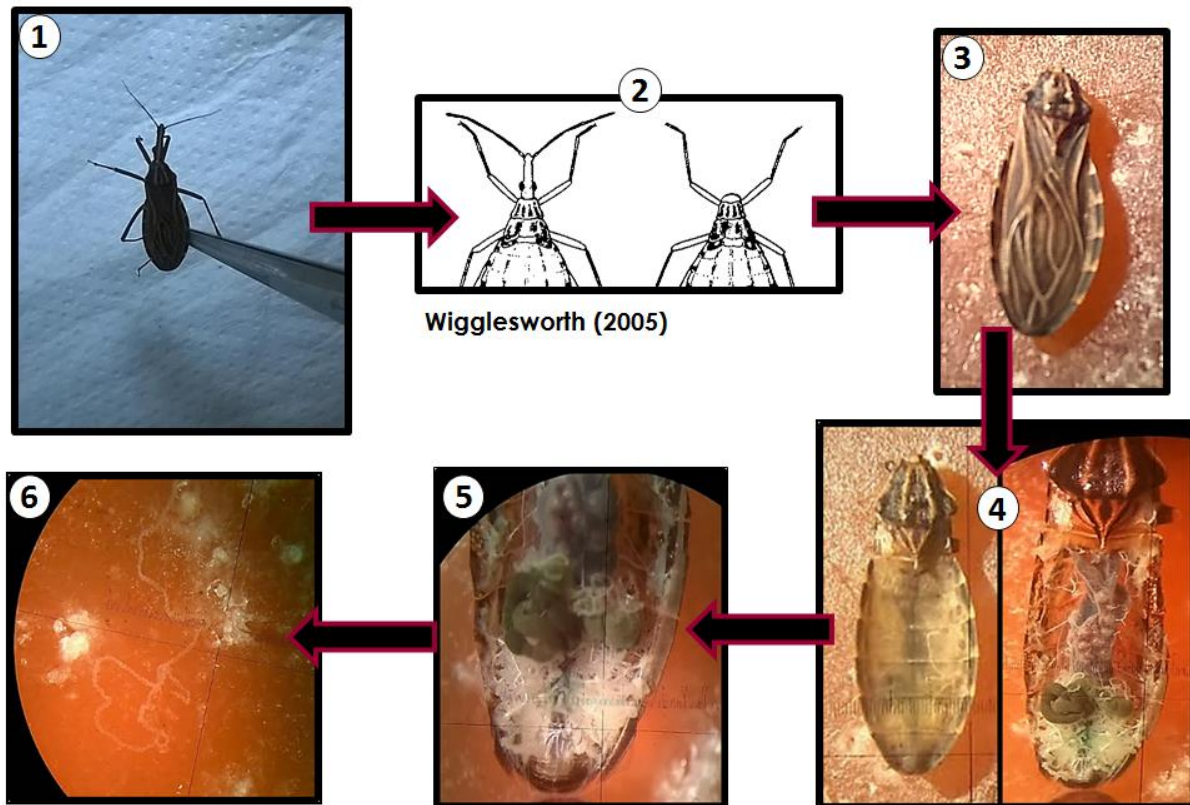
Para realizar experimentos con sustitución del anión cloruro, se preparó una solución Ringer con la siguiente composición:  $\text{NaNO}_3$  145.0 mM, KCl 8,6 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  4,3 mM,  $\text{NaHCO}_3$  10,2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2,0 mM, glucosa 34 mM, HEPES 5,0 mM, alanina 3 mM, pH 7,2 y osmolaridad 340 mOsm/kg.

#### **4.3. Disección y aislamiento de los túbulos de Malpighi**

Los túbulos de Malpighi (MT) de *Rhodnius prolixus* fueron aislados mediante disección en una cápsula de Petri cuyo fondo contenía cera coloreada para generar contraste. Tal como lo indica la figura 4, bajo la observación por medio de un estereoscopio y con la utilización de pinzas de disección, se sujetaba al insecto (paso 1) y empleando una tijera ocular se decapitaba (paso 2) para asegurar que el insecto no liberara hormonas que posiblemente interfirieran con la planificación y el curso de los experimentos. Luego, con ayuda de alfileres entomológicos, era fijado a la cera a nivel del mesotórax (paso 3), y se realizaba un posterior corte de las alas incipientes, del borde de quitina alrededor del abdomen en la región dorsal y por último un corte transversal del exoesqueleto a nivel del tórax lo cual permitía realizar un levantado y que quedaran expuestos los órganos internos (paso 4). A partir de esto se lograba observar los TM dispuestos en la hemocele del insecto (paso 5), los cuales eran desenrollados, limpiados de traqueolas y aislados de forma intacta manejándolos con asas de vidrio (paso 6).



**Figura 3. Ejemplares de *Rhodnius prolixus* V instar y adulto.** *Rhodnius* se caracteriza por presentar una tonalidad pardo-amarillenta con manchas de color marrón oscuro. Su abdomen es de forma oval y su borde lateral, llamado conexivo, presenta marcas distintivas que permiten su clasificación. Durante su ciclo de vida presenta 5 instars inmaduros (ninfas), morfología correspondiente al ejemplar de la izquierda, y la fase adulta, ejemplar a la derecha de la imagen. Las principales diferencias son el tamaño y la presencia de alas en los adultos. **Science Explained (2018) Recuperado de:** <http://science-explained.com/blog/project/egg-immunity-in-the-kissing-bug-the-carrier-of-chagas-disease/rodnius-prolixus-life-cycle/>



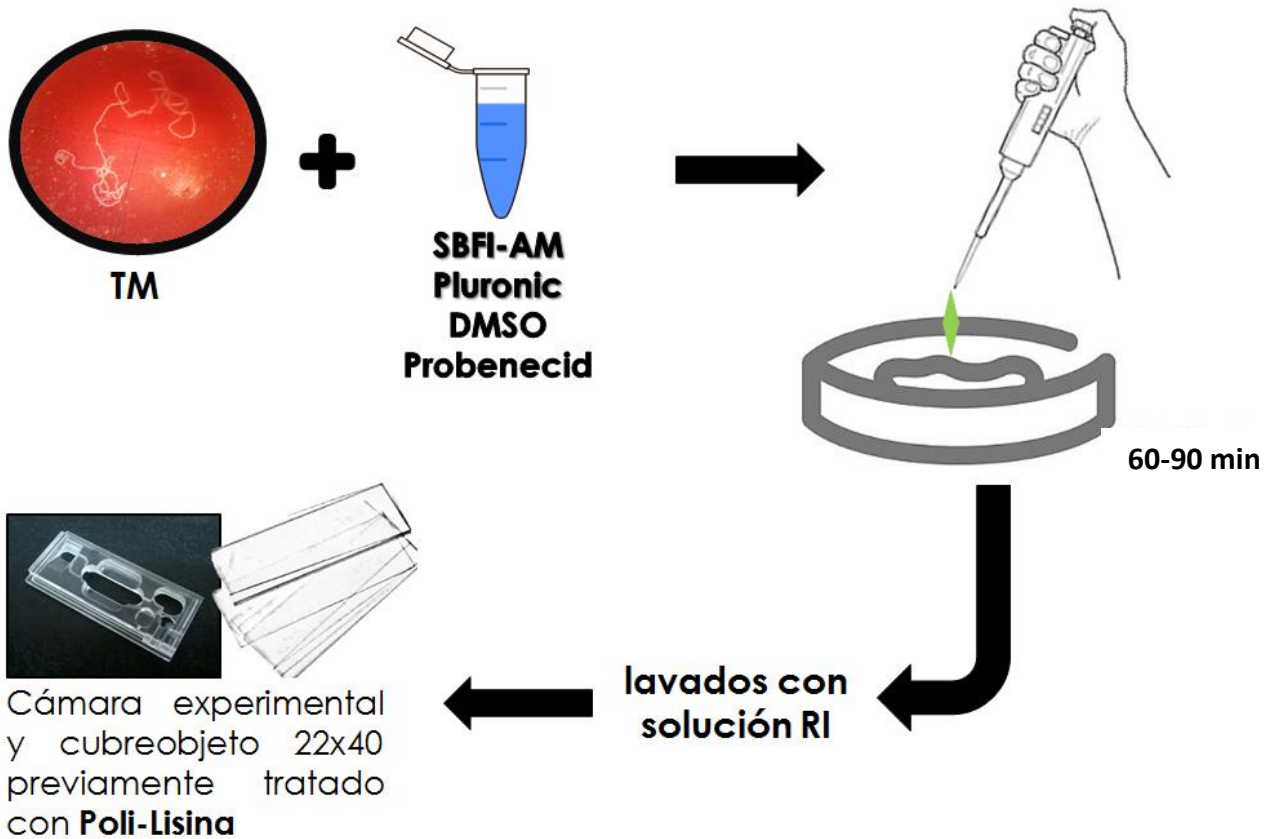
**Figura 4. Procedimiento de disección y aislamiento de los túbulos de Malpighi (TM) de un ejemplar adulto de *R. prolixus*.** En las imágenes se observan los pasos sucesivos de disección, aplicables para cualquier estadio del insecto, comenzando por el decapitado del insecto y su posterior fijado a una cámara utilizando alfileres entomológicos, el desprendimiento de alas, extremidades y borde conexivo (característico de los chipos), permitiendo así realizar un corte transversal exponiendo el interior del insecto y la ubicación de los túbulos de Malpighi. Finalmente la limpieza y el aislamiento de los TM.

#### **4.4. Montaje experimental**

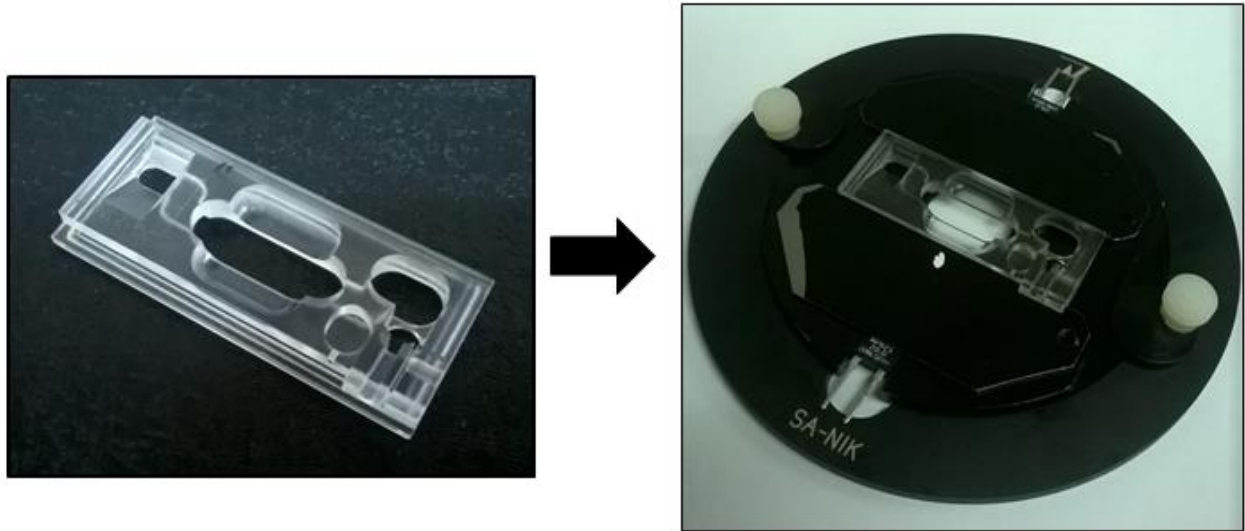
Los túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* fueron cargados a 37 °C, durante 45 – 60 minutos, con una solución del indicador fluorescente SBFI-AM 10 µM en RI, Pluronic al 20% en DMSO y DMSO adicional (figura 5). A esta preparación se le fue añadido Probenecid 1,2 mM, agente uricosúrico, propicio para la medición al evitar la fuga del colorante del interior de la célula, inhibiendo al intercambiador aniónico.

Luego de transcurrido el tiempo de carga, los TM fueron acomodados sobre cubreobjetos 22x40 para formar el piso de la cámara, los cuales eran previamente tratados con el reactivo Poli-Lisina (figura 4), permitiendo la adhesión del TM y evitando artefactos de movimiento por acción del sistema de perfusión y superfusión.





**Figura 5. Esquema del procedimiento empleado para la carga con el fluoróforo SBFI los túbulos de Malpighi (TM) y el posterior arreglo de la cámara experimental.** Una vez aislado el túbulo, se procedía a su carga con una solución que contenía SBFI, Pluronic, DMSO y Probenecid. Una vez finalizado el tiempo (60-90 min), el TM era lavado con abundante Ringer Insecto y extendido sobre un cubreobjeto 22x40 mm (previamente tratado con Poli-Lisina), que conformaba el suelo de la cámara experimental.



**Figura 6. Montaje de la cámara utilizada para realizar los registros.** A la izquierda se observa la pieza de plexiglás translucido que formaba el pozo. A la derecha se observa la pieza que mantenía y aseguraba al microscopio invertido de fluorescencia a la cámara de plexiglás, sujetándola por los bordes mediante imanes.

La cámara utilizada para los registros de fluorescencia se trataba de una pieza de plexiglás translucido, labrada para formar un pozo experimental de 300  $\mu$ l aproximadamente, con una entrada y salida de soluciones (figura 6), acopladas a un sistema de perfusión peristáltica para el Ringer Insecto y una salida que permitía mantener el nivel del baño a través de una aguja acoplada a un sistema de absorción.

La cámara era fijada a otra pieza perfectamente ajustable a la platina de un microscopio invertido de fluorescencia (figura 6), utilizando como fuente de luz una lámpara de Xenón. La longitud de excitación del fluoróforo es de 340 y 380 nm y un espejo dicróico permitió recoger la emisión en 510 nm. La intensidad de fluorescencia fue colectada en tiempo real, mediante un sistema de adquisición acoplado a una computadora para la digitalización y análisis de la señal.

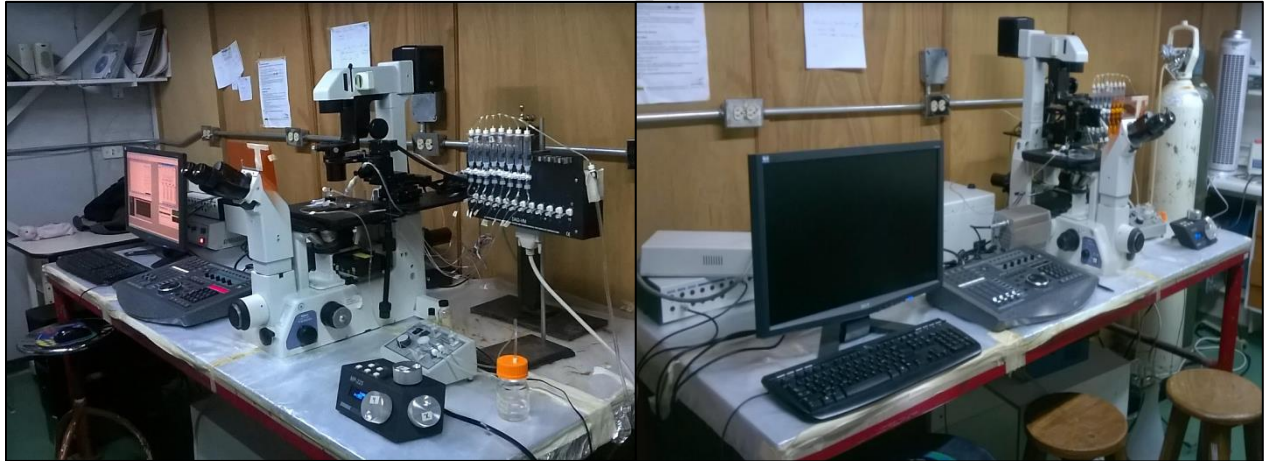
A cada preparación se le aplicaba soluciones RI con diferentes agentes farmacológicos: 5-hidroxitriptamina (5-HT) 10  $\mu$ M, ouabaína 25  $\mu$ M, furosemida 1000  $\mu$ M (1mM) y amilorida 100  $\mu$ M; solos o en conjunto y variando el orden de aplicación para discriminar entre las diferentes respuestas fisiológicas y poder observar el cambio en la concentración intracelular de sodio en las células de los TM de *Rhodnius prolixus*.

#### **4.5. Medición de la concentración intracelular de sodio ( $[Na^+]_i$ )**

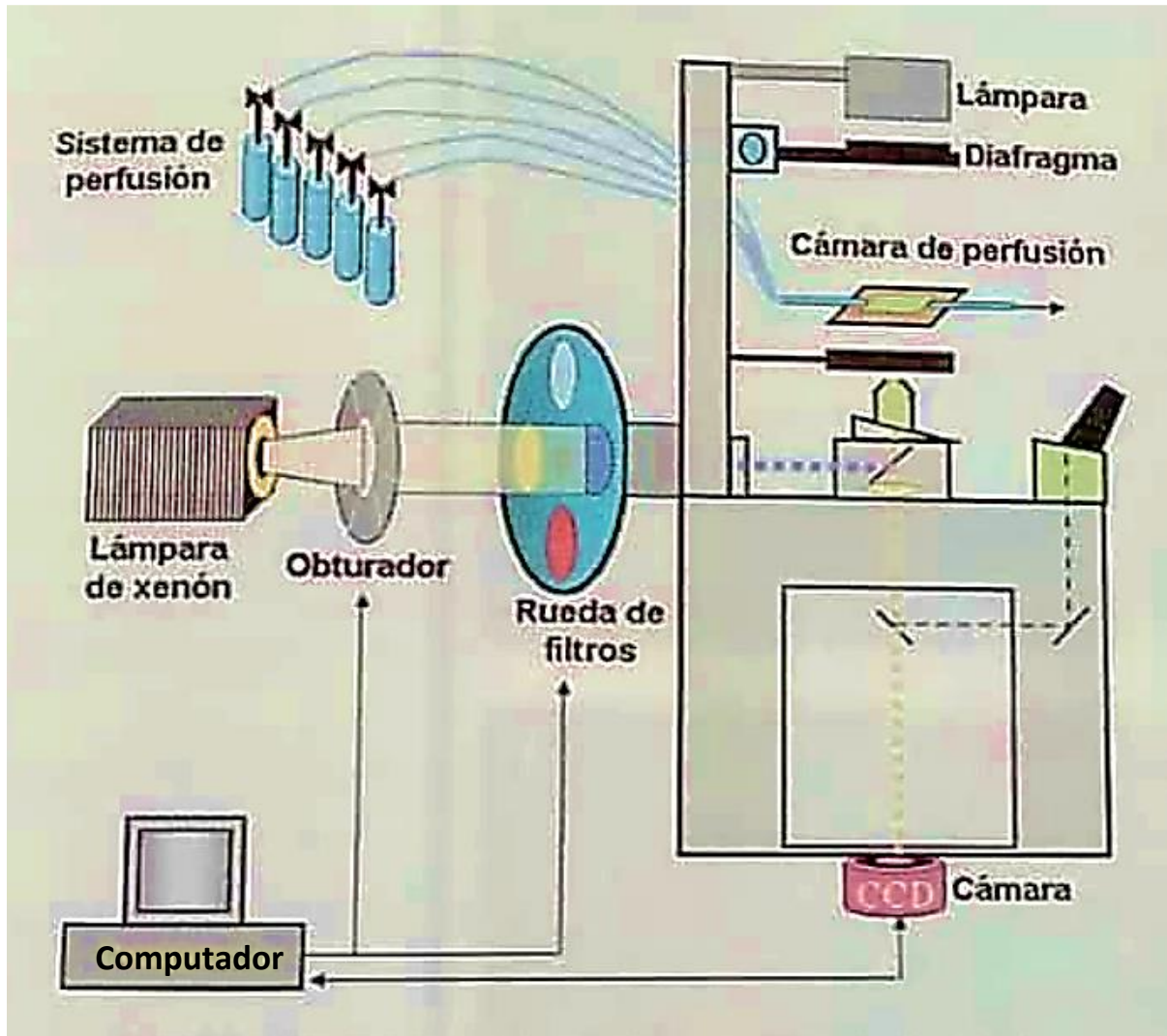
Para la medición de  $[Na^+]_i$ , se utilizó un arreglo experimental que constaba de un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon TE-300) equipado con una cámara CCD enfriada (Newcastle Photometric System) y una rueda de filtros (Newcastle Photometric System) para cambiar la longitud de onda de excitación. Anexo a esto, por medio de un obturador era controlado el tiempo de exposición de la muestra con la luz proveniente de la lámpara de Xenón (figura 7).

El equipo fue controlado por un sistema computarizado que utilizaba el software Camera75 (Newcastle Photometric System), en el cual era posible registrar la intensidad de fluorescencia de hasta 16 áreas de interés seleccionadas en una imagen inicial. Además, fue posible acompañar los datos obtenidos con imágenes adquiridas a diferentes tiempos durante el desarrollo del experimento, permitiendo, a su vez, guardar las características del experimento y correrlo nuevamente a posterioridad.

Las condiciones para la escogencia de las áreas de interés en la imagen del TM cargado, se basaron en aquellas cuya observación fue más brillante en la pantalla (mayor y/o mejor carga).



**Figura 7. Sistema de equipos utilizados para la medición de fluorescencia con SBFI.** Se observan los instrumentos utilizados en conjunto durante cada registro experimental, conformados por: microscopio invertido de fluorescencia equipado con una cámara CCD, sistema de perfusión, sistema de superfusión, y una computadora para la adquisición de los datos. Lab. de Fisiología Gastrointestinal, IVIC.



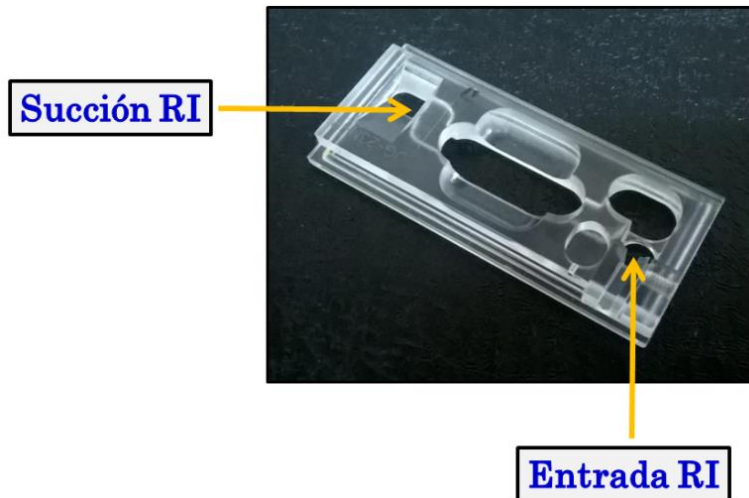
**Figura 8. Esquema del equipo para la medición fluorescente de sodio con SBF1.** Se observa el sistema en conjunto de los instrumentos utilizados para los registros experimentales. Microscopio invertido de fluorescencia acoplado a una cámara CCD, rueda de filtros para la excitación de la muestra en la longitud de onda correcta, obturador para restringir el paso de la luz proveniente de una lámpara, sistema de perfusión, superfusión, y computador. Tomado de: Material del Lab. Gastrointestinal, IVIC.

#### **4.6. Perfusión**

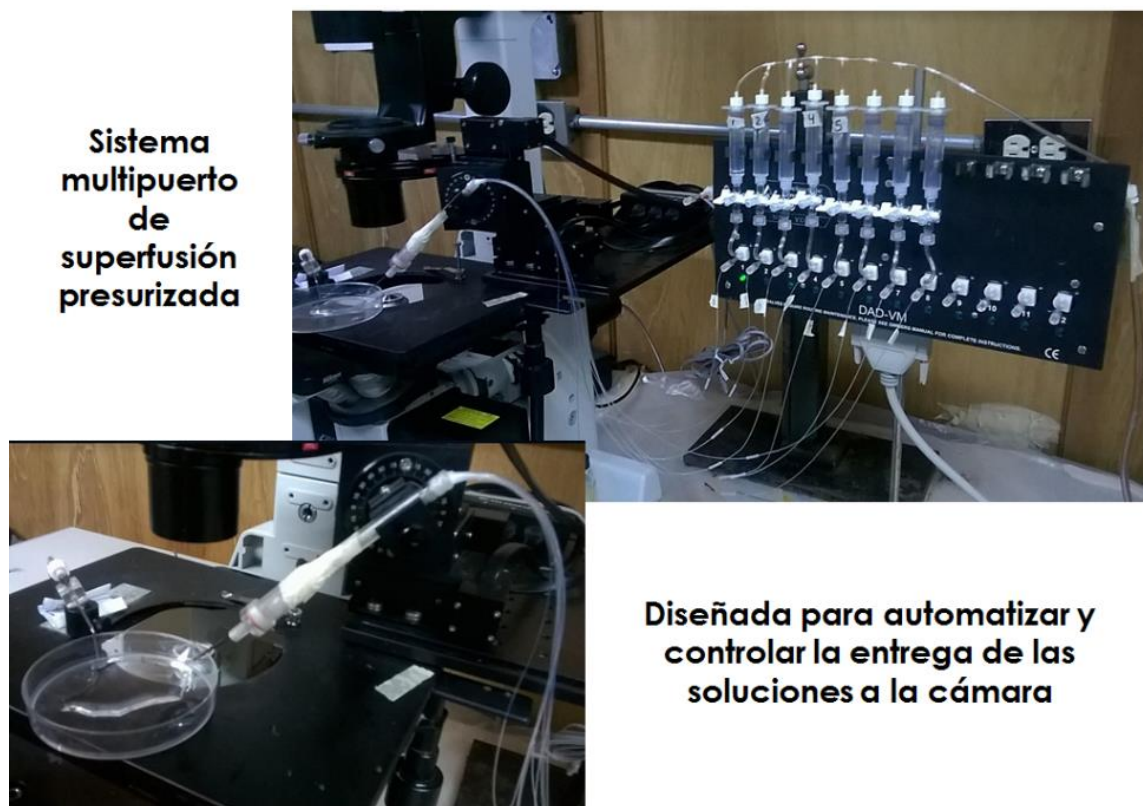
Durante la medición se mantuvo al TM bañado con Ringer Insecto en la cámara experimental a través de una perfusión peristáltica, con volumen y presión constante la cual presentaba una entrada y una salida en la cámara experimental (figura 9).

Para añadir las diferentes soluciones que contenían los fármacos, se utilizaba un sistema multipuerto de superfusión presurizada y diseñada para automatizar y controlar la entrega de estas soluciones a la cámara (figura 10). En este sistema se accedía individualmente a cada solución mediante un interruptor manual o una señal analógica directa desde el programa en digital OCTAFLOW™, pudiendo añadirse una solución a la vez y a velocidad controlada.





**Figura 9. Cauce de la perfusión en la cámara experimental.**

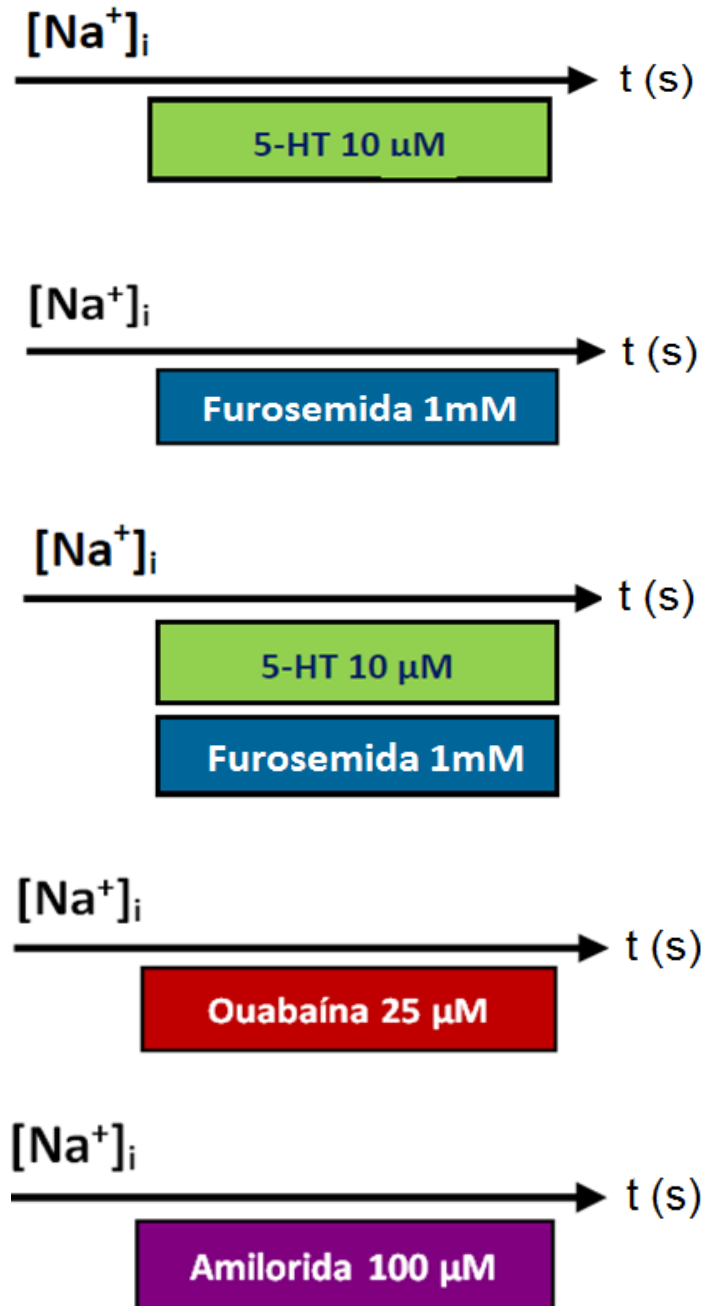


**Figura 10. Sistema de superfusión utilizada durante cada registro experimental.** A la derecha se observan los reservorios de las soluciones y la caja que protege las válvulas. Cada reservorio se encuentra conectado a un sistema de presión y cada reservorio a su vez está conectado a unas mangueras que terminan en capilares que forman multicanales en una sola salida constituida por una aguja fina, tal como se observa a la izquierda de la imagen.

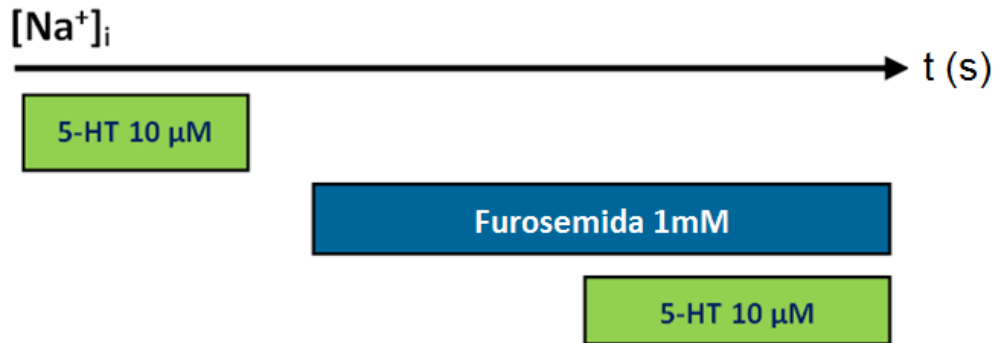


## 4.7. Protocolo experimental

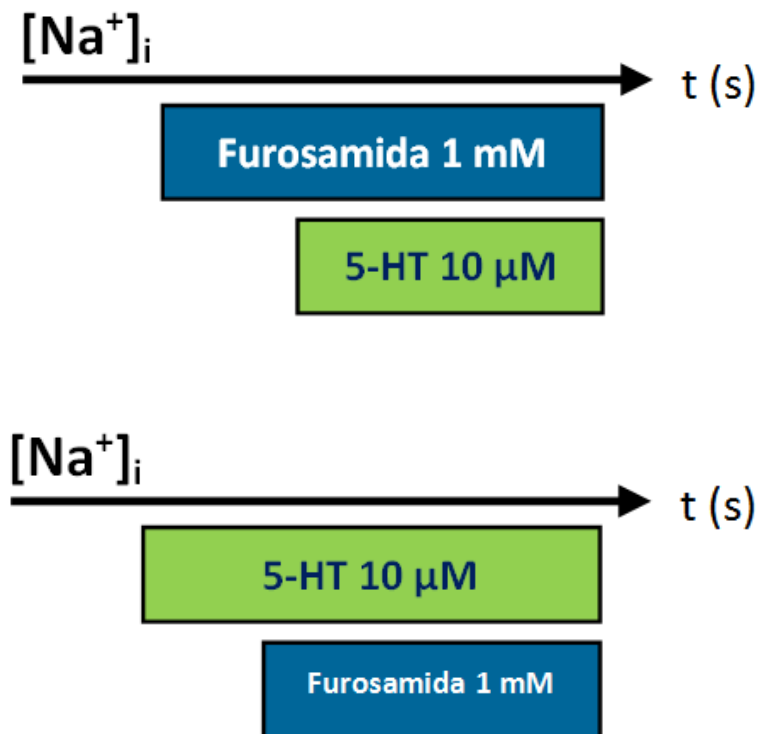
4.7.1. Efecto en la concentración intracelular de sodio en túbulos de Malpighi (TM) de *R. prolixus* en presencia de distintos fármacos.



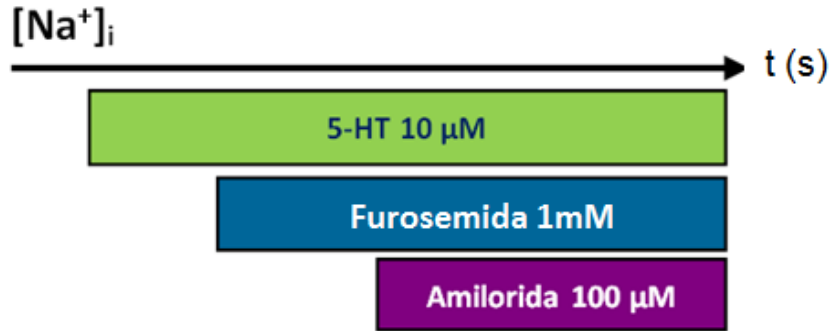
4.7.2. Efecto de furosemida en la concentración intracelular de sodio en TM previamente estimulados y que además se ha revertido la acción de la hormona.



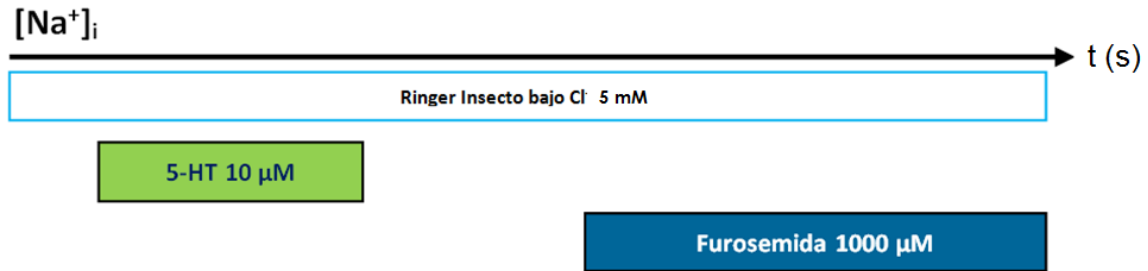
4.7.3. Medida de la  $[Na^+]_i$  en TM de *R. prolixus* al añadir 5-HT o furosemida en presencia de un efecto previo.



**4.7.4. Cambio en la concentración intracelular de sodio en TM estimulados, al aplicar furosemida y amilorida.**



**4.7.5. Cambio en la concentración intracelular de sodio en presencia de la hormona y de furosemida, en una solución Ringer Insecto bajo cloruro.**



#### **4.8. Adquisición y Análisis de datos.**

El programa mediante el cual se obtuvieron los registros fue Easy Ratio Pro y para el procesamiento de los datos fue utilizado Excel con un posterior análisis estadístico mediante Graph Pad InStat 3, en el cual se realizaron: paired t test, Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test y Mann-Whitney test, según fuera necesario.

Los registros fueron obtenidos como la relación de fluorescencia entre la longitud de onda de excitación 340/380 para el SBFI, y procesados con la finalidad de obtener valores numéricos capaces de comparar en los tratamientos. Para esto fue calculado  $\Delta R/R$ , en donde:

$$\Delta R = (R_1 - R_0)$$

Siendo  $R_1$  la media aritmética de la relación de fluorescencia del registro durante 20 datos después de aplicado el tratamiento y  $R_0$  la media aritmética de la relación de fluorescencia en el control 20 datos antes del tratamiento. Indicando esto el cambio efectuado justo al añadir el fármaco.

Por lo tanto, la normalización establecida para todos los casos es la siguiente:

$$\Delta R/R = (R_1 - R_0) / R_{\text{basal}}$$

De esta forma los valores son comparables independientemente de la relación basal de fluorescencia en cada preparación.

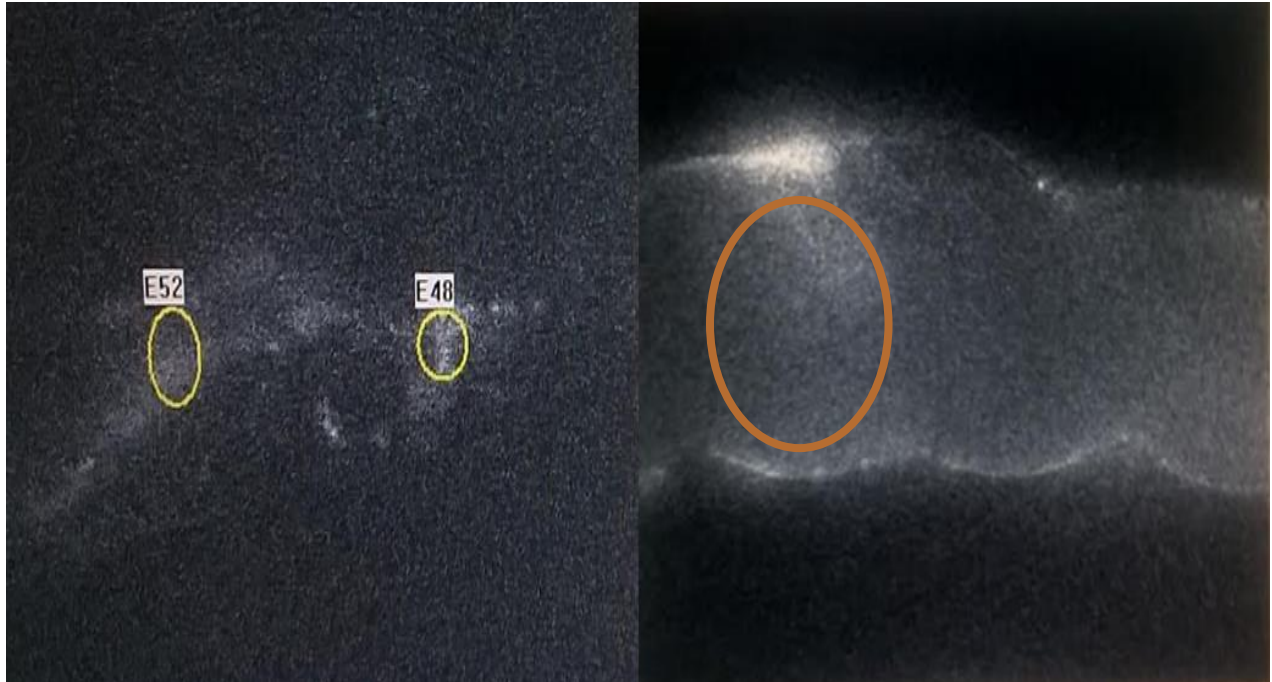
## V. RESULTADOS

Fueron realizados distintos experimentos que consistían en la adquisición de la relación de fluorescencia 340/380 en túbulos de Malpighi (TM) cargados con el fluoróforo sensible a la concentración de sodio ( $[Na^+]$ ) SBFI.

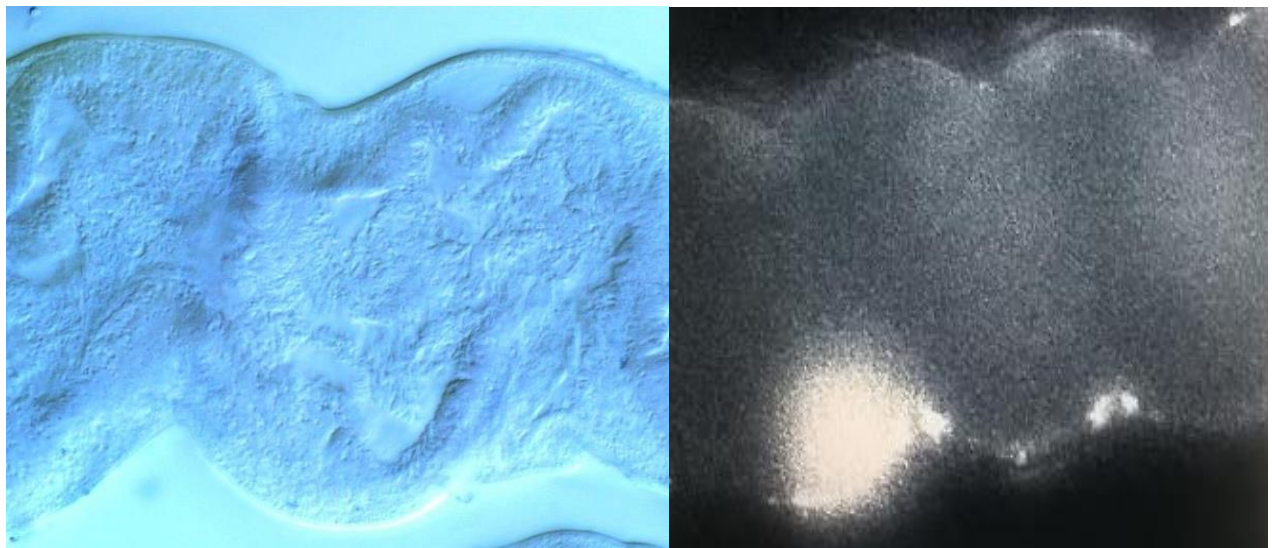
En todos los casos se presenta un curso temporal y con la aplicación y/o remoción de los distintos fármacos. Esto con la finalidad de observar el cambio en la concentración intracelular de sodio en los túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* como respuesta a la alteración del funcionamiento de los distintos mecanismos de transporte ubicados en la membrana basolateral de los túbulos.

### 5.1. Carga de los Túbulos de Malpighi de *R. prolixus* con SBFI.

Partiendo de los resultados obtenidos en diferentes pruebas realizadas durante el afinamiento de la metodología, la mejor carga de los túbulos, a partir de la sensibilidad de los instrumentos, fue observada con una concentración de SBFI 10  $\mu$ M, en presencia de Probenecid (1,2 mM) y manteniendo una temperatura constante de 37 °C a total oscuridad en un intervalo entre 60 – 90 minutos.



**Figura 11. Túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* cargados con SBFI-AM.** Se observa un TM cargado con el fluoróforo sin probenecid (izquierda) y con probenecid (derecha). Estas imágenes fueron obtenidas durante la evaluación de la eficiencia de carga. Los círculos en las imágenes representan ejemplos de zonas con carga de fluorescencia.



**Figura 12. Relación entre una micrografía y una imagen fluorescente de un túbulo de Malpighi de *Rhodnius prolixus*.** A la izquierda se observa una micrografía de un TM de *R. prolixus* obtenida por Echeverría y col. (2001), mientras que a la derecha se aprecia una imagen típica obtenida en uno de nuestros experimentos.

En la figura 11 se aprecia a un túbulo de Malpighi (izquierda) que fue cargado en ausencia de Probenecid, ejemplo de lo obtenido en todos aquellos túbulos bajo la misma condición. Se observa una fluorescencia deficiente que no permitía una buena selección de zonas para el registro, tal como se observa en los dos círculos en la imagen, las cuales eran las únicas zonas que parecían presentar una leve fluorescencia, lo cual no era totalmente confiable. Cuando este resultado fue comparado con túbulos que sí fueron cargados en presencia de Probenecid (derecha figura 11), resultó que estos sí presentaron una fluorescencia a lo largo del tejido, indicando así que el fármaco estaba realizando el efecto inhibitorio sobre los transportadores aniónicos impidiendo la salida del fluoróforo por medio de estos, tratamiento efectivo para permitir una prolongada fluorescencia durante los registros.

En la figura 12 se muestra la comparación morfológica entre una micrografía de un túbulo de Malpighi de *Rhodnius*, la cual es coincidente con la imagen obtenida en uno de los registros realizados en este estudio. Esto quiere decir una vez más que las condiciones de carga permitieron obtener una total carga a lo largo de todo el tejido, lo cual a su vez indica que la escogencia de cada célula, a partir de esto, podía realizarse con seguridad para llevar a cabo los registros necesarios.

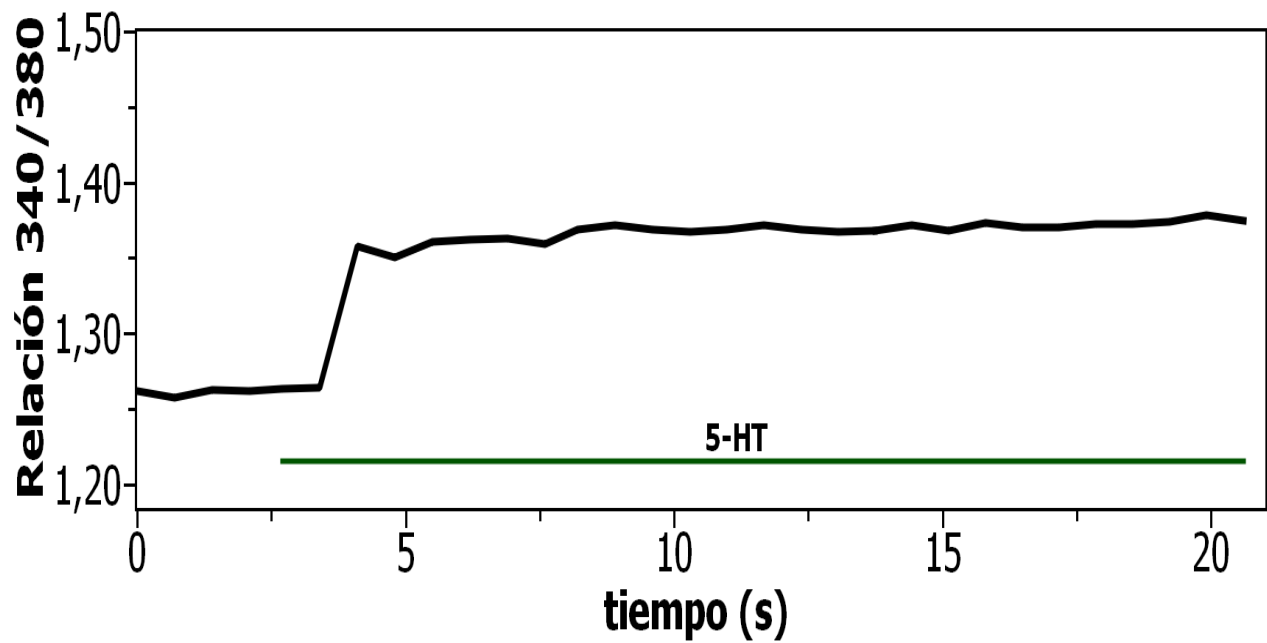
## 5.2. Medida de la $[Na^+]_i$ en TM de *R. prolixus* en presencia de cada uno de los fármacos.

El funcionamiento de los mecanismos de transporte ubicados en la membrana basolateral del túbulo de Malpighi de *Rhodnius prolixus* pueden ser alterados por la presencia de ciertos fármacos en la solución que baña los túbulos en la cámara experimental, lo cual trae como consecuencia una respuesta reflejada como cambio en la concentración intracelular del catión sodio que, a su vez, altera la secreción del túbulo, (García, 2010; Freile, 2018).

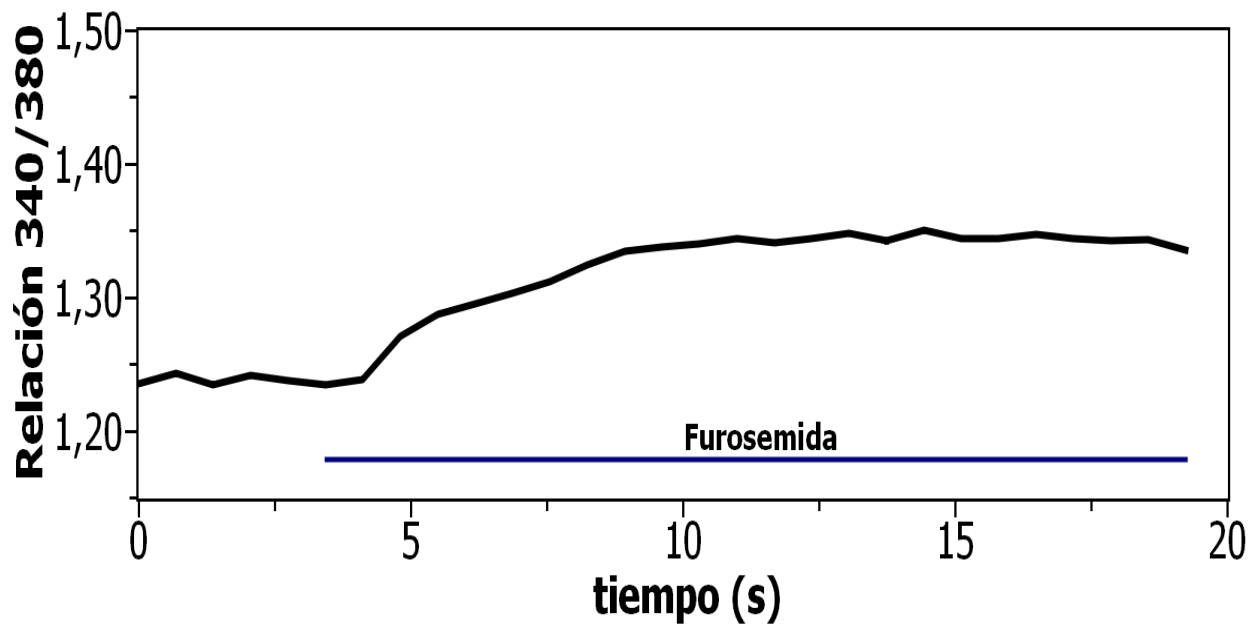
Las figuras 13, 14 y 15 son gráficas típicas de un registro. En la figura 13 y 14 se observa un aumento inmediato en la relación de fluorescencia 340/380 obtenida luego de la presencia de 5-HT y de furosemida, respectivamente, alcanzándose un plateau luego del aumento y aun en presencia del fármaco en cuestión, obteniéndose un valor de  $0,029 \pm 0,003$  con 5-HT y  $0,036 \pm 0,002$  con furosemida. El total de zonas utilizadas en los registros de 5-HT fue 151, de las cuales 45 fueron los que mostraron el comportamiento de la figura 13, mientras que con furosemida fueron utilizadas un total de 75 zonas y 55 mostraron la respuesta de la figura 14.

En presencia de ouabaína (figura 15), inhibidor la  $Na^+/K^+$ -ATPasa, fue observado un leve aumento que, bajo análisis estadístico, fue significativo, sin embargo también fue probado su efecto a una concentración de 100  $\mu$ M que, bajo tratamiento estadístico, resultó como no significativo. Siendo esto así, bajo el efecto de ambas concentraciones de ouabaína, no fue registrado un aumento representativo en la concentración intracelular de sodio en comparación con el resto de los efectos (figura 16). Además, el aumentar la concentración del fármaco no fue proporcional al aumento en la concentración del catión. Para el efecto de ouabaína 25  $\mu$ M fueron utilizados 47 zonas en total, de las cuales solo 17 respondieron con el comportamiento de la figura 15.





**Figura 13.** Efecto de la hormona 5-HT (10 $\mu$ M) sobre la concentración intracelular de Na<sup>+</sup> en TM de *Rhodnius prolixus*. Se muestra una gráfica típica de la relación de fluorescencia 340/380 (SBFI) vs. tiempo. La barra continua señala la presencia del fármaco.



**Figura 14. Efecto de furosemida (1 mM) sobre la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  en TM de *Rhodnius prolixus*.** Se muestra una gráfica típica de la relación de fluorescencia 340/380 (SBFI) vs. tiempo. La barra continua señala la presencia del fármaco.

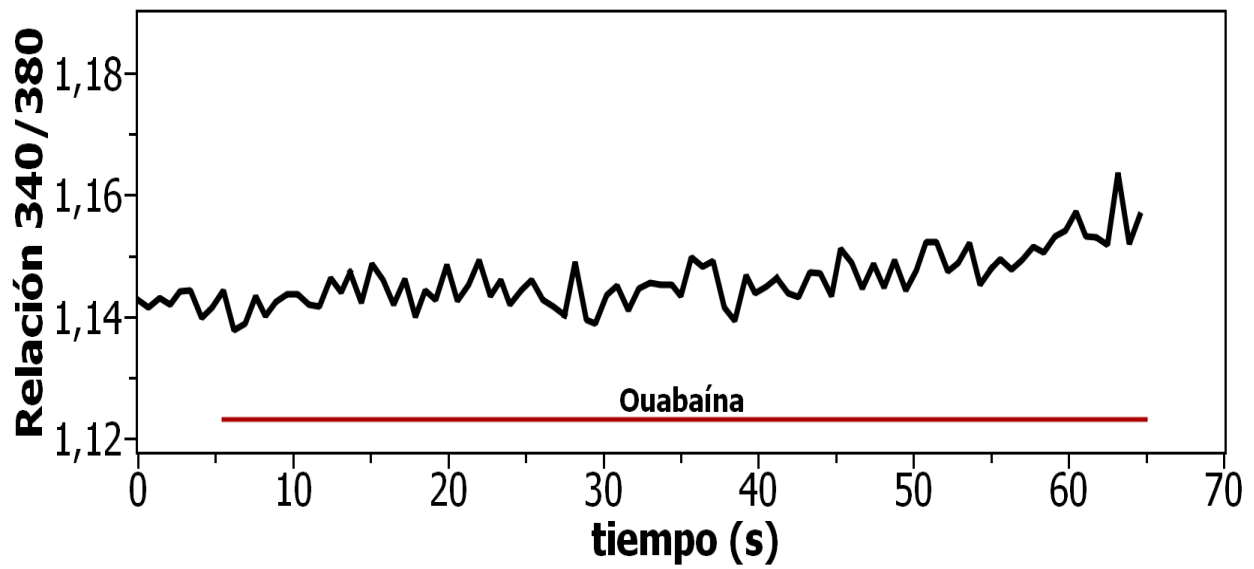
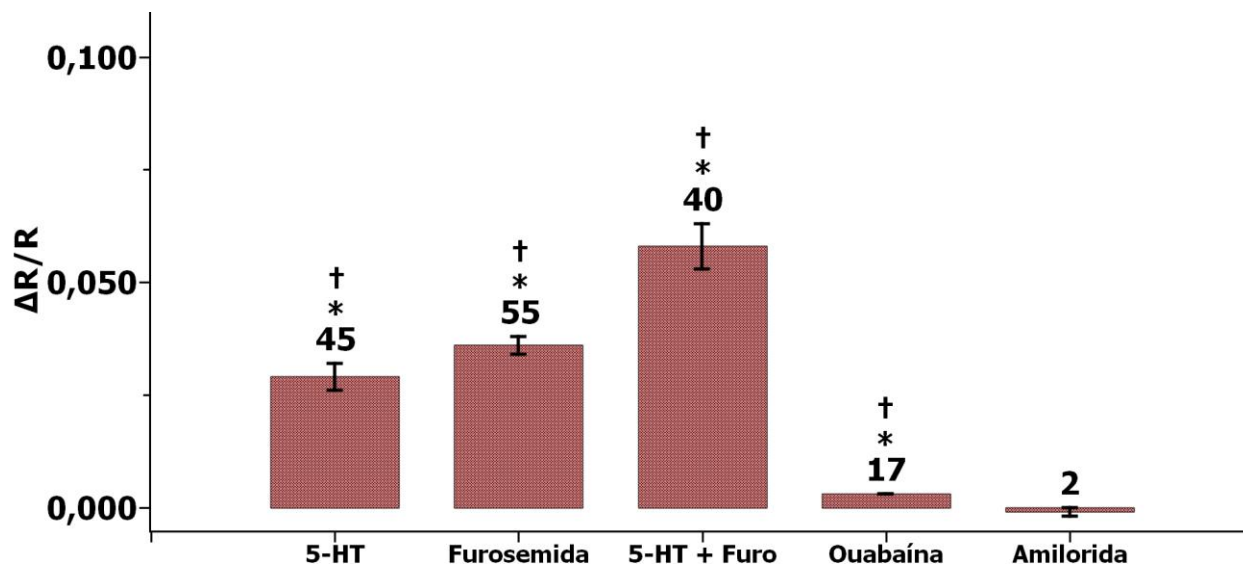


Figura 15. Efecto de ouabaína (25  $\mu\text{M}$ ) sobre la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  en TM de *Rhodnius prolixus*. Se muestra una gráfica típica de la relación de fluorescencia 340/380 (SBFI) vs. tiempo. La barra continua señala la presencia del fármaco.



**Figura 16.** Comparación del efecto de 5-HT (10  $\mu$ M), furosemida (1 mM), ouabaína (25  $\mu$ M) y amilorida (0.1  $\mu$ M) en TM de *Rhodnius prolixus*. Se observa la relación de fluorescencia normalizada (ver métodos), como el promedio  $\pm$  SEM, proporcional a la  $[Na^+]_i$  en los TM como respuesta a la presencia única del fármaco, destacándose la respuesta obtenida con 5-HT y furosemida en conjunto. El número sobre la barra indica el total de muestras que respondieron. \* Diferente de cero ( $p < 0,05$ ) † Diferente de los otros efectos ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 1.** Comparación entre el efecto de distintos fármacos en TM de *R. prolixus*. De izquierda a derecha se muestra para cada tratamiento la relación de fluorescencia seguida del error estándar indicando el número de muestras.

Tratamiento	$\Delta R/R$	SEm	n
<b>5-HT</b>	0,029	0,003	45
<b>Furosemida</b>	0,036	0,002	55
<b>5-HT + Furosemida</b>	0,058	0,005	40
<b>Ouabaína</b>	0,003	0,000	11
<b>Amilorida</b>	-0,001	0,001	2

[5-HT] = 10  $\mu$ M ; [Furosemida] = 1mM ; [Ouabaína] = 25  $\mu$ M ; [Amilorida] = 0.1  $\mu$ M

Tal como se observa en la figura 16 y en la tabla 1, en presencia del efecto de 5-HT y de furosemida –por separado- fue registrado un aumento en la concentración intracelular de sodio, sin embargo, el efecto de ambos en conjunto fue más pronunciado; es decir, cuando ambos fueron añadidos al mismo tiempo, la concentración intracelular de sodio obtenida fue mayor.

El resultado en presencia de amilorida no fue suficiente para una conclusión fuerte debido a que el número de muestras (n=2) fue muy pequeño, sin embargo fue tomado en cuenta como un apoyo al efecto del fármaco y la sensibilidad por parte de la población de túbulos de Malpighi con la que se trabajó. Cabe destacar que la concentración utilizada fue de 0.1  $\mu\text{M}$ , es decir, una concentración mil veces menor a la propuesta.

Con un número de muestras suficientes para los experimentos con amilorida hubiéramos esperado comprobar si por si sola ocasionaba una disminución observable y significativa en la concentración intracelular de sodio, al encontrarse inhibido el canal de sodio de tipo ENaC.

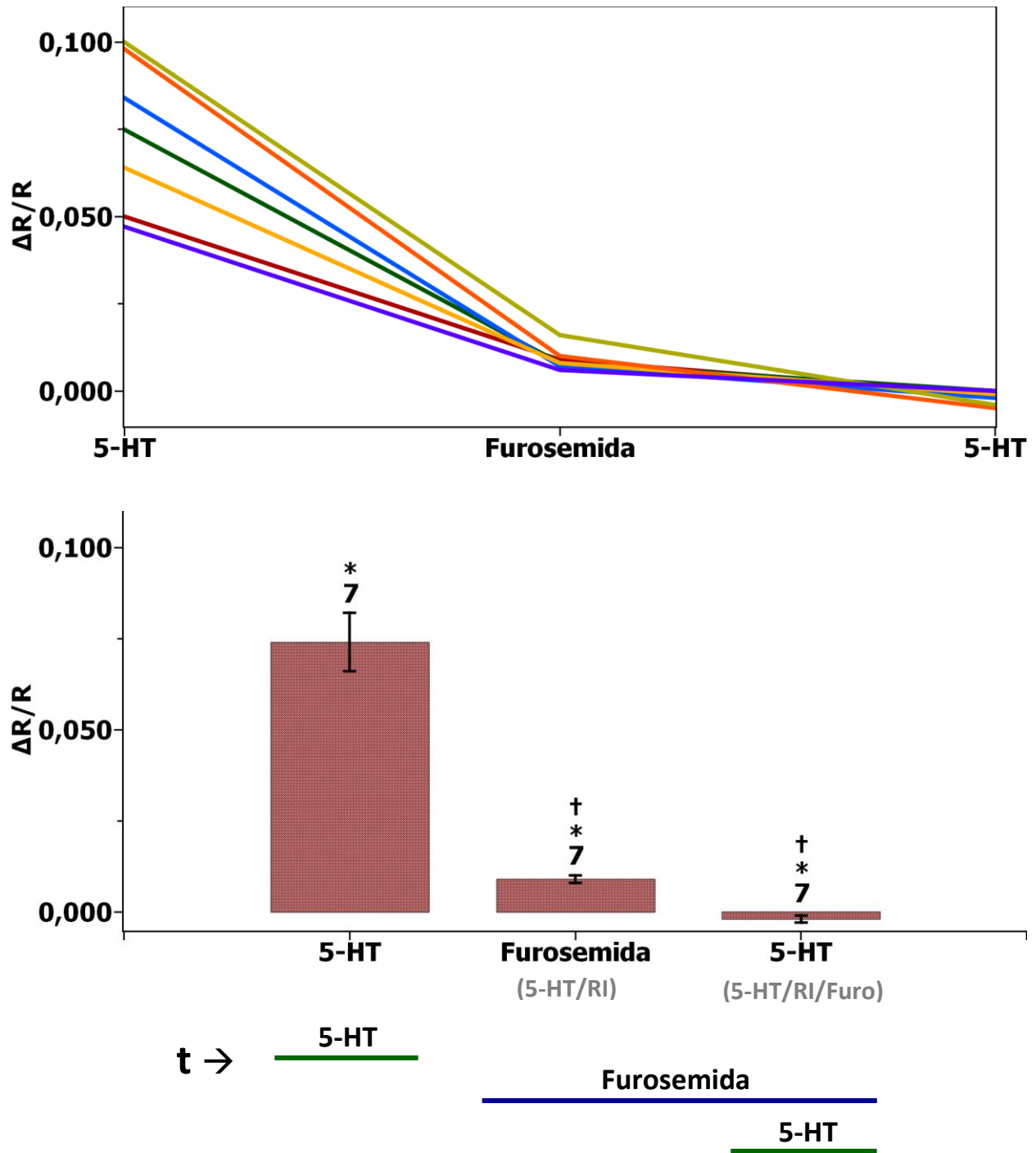
### **5.3. Efecto de furosemida y 5-HT en la $[\text{Na}^+]_i$ en TM de *R. prolixus* a los que se le ha revertido la estimulación farmacológica.**

Con la finalidad de comprobar si el efecto por parte de la hormona podía ser lavado en poco tiempo, se realizaron experimentos cuyo registro comparaba el efecto de 5-HT en un intervalo, y la posterior presencia de furosemida y en conjunto con 5-HT.

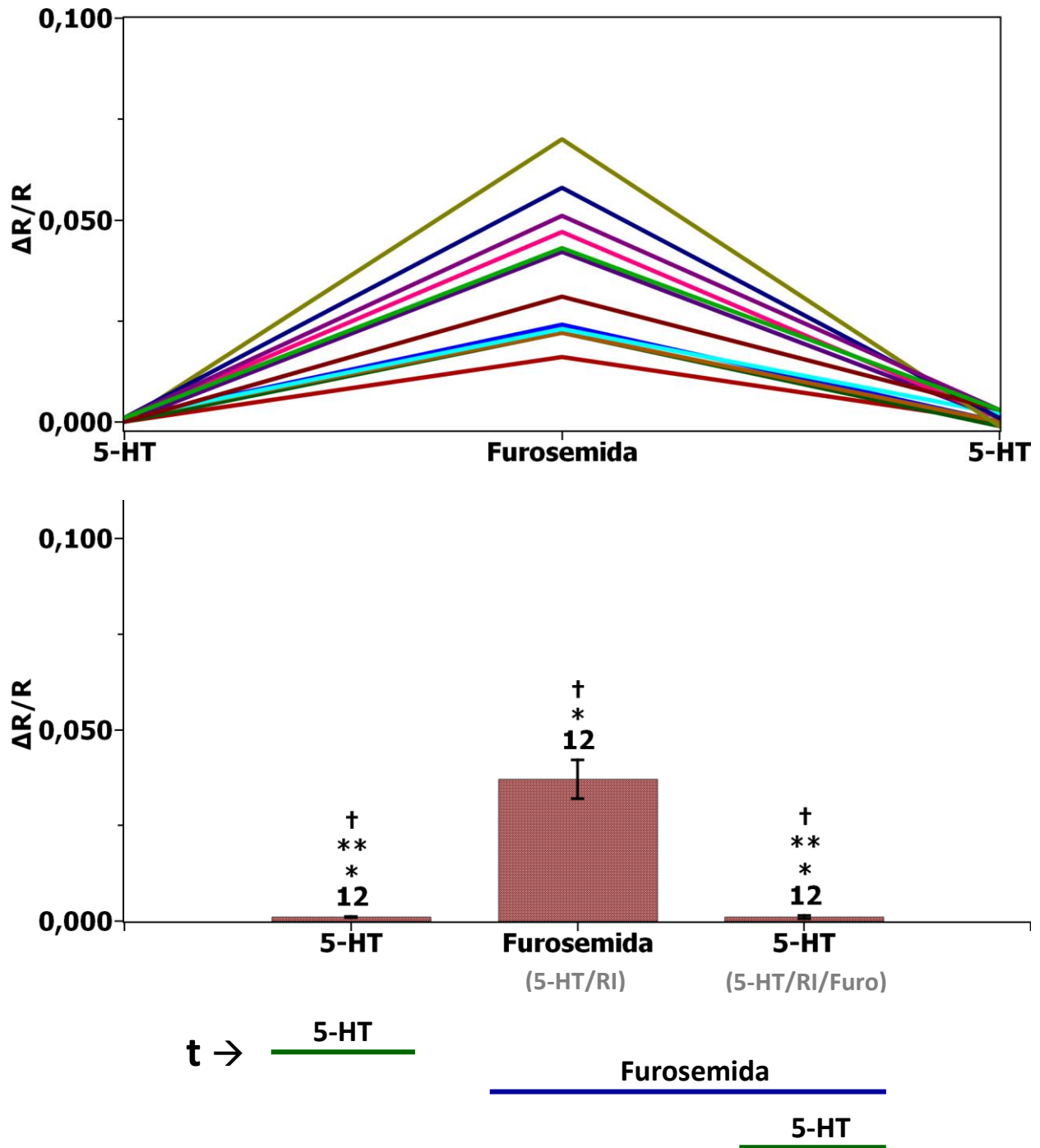
Para llevar a cabo estos experimentos fueron utilizadas 34 zonas en total, de las cuales 7 presentaron el comportamiento mostrado en la figura 19, mientras que 12 zonas el comportamiento de la figura 20. Cabe destacar que cada resultado fue obtenido en un mismo curso temporal, lo que quiere decir que había un efecto previo antes de la presencia de furosemida y de 5-HT al final.

Al evaluar el efecto de furosemida luego de aplicar 5-HT previamente y lavar su efecto con Ringer Insecto por aproximadamente 1 minuto, fueron observados dos comportamientos opuestos. Tal como lo muestran las figuras 17 y 18, cuando las células respondían al efecto de 5-HT, no se registraba un efecto por parte de furosemida, permitiendo sugerir en base a esto, que tal vez la hormona no solo estimulaba al triple cotransportador  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ , sino que probablemente su efecto también inhibe a la ATPasa de sodio. Bajo estas condiciones, el aumento registrado en la concentración intracelular de sodio se le atribuye principalmente al funcionamiento del canal de sodio.

Por otra parte, al añadir 5-HT después de furosemida, no se registró ningún aumento, resultado consistente puesto que para ambas poblaciones de zonas es válido que, si la hormona ya había realizado un efecto al principio, añadir más 5-HT no crearía un efecto sumatorio y que, para ese momento, furosemida ya se encontraba ejerciendo su efecto inhibitorio.



**Figura 17.** Respuesta a furosemida (1 mM) y a 5-HT (10  $\mu$ M), luego de lavar el efecto de estimulación en TM de *Rhodnius prolixus*. Se observa la relación de fluorescencia normalizada, como el promedio  $\pm$  SEM, proporcional a la  $[Na^+]_i$  en los TM. El escrito bajo el fármaco hace referencia a la condición previa a su efecto. El número sobre la barra indica el total de muestras que respondieron. \* Diferente de cero ( $p < 0,05$ ). † Diferente del efecto anterior ( $p < 0,05$ ). Las barras continuas debajo del gráfico señalan la presencia del fármaco durante la medida.



**Figura 18.** Respuesta a furosemida (1 mM) y a 5-HT (10  $\mu$ M), luego de lavar el efecto de estimulación en TM de *Rhodnius prolixus*. Se observa la relación de fluorescencia normalizada, como el promedio  $\pm$  SEM, proporcional a la  $[Na^+]_i$  en los TM. El escrito bajo el fármaco hace referencia a la condición previa a su efecto. El número sobre la barra indica el total de muestras que respondieron. \* Diferente de cero ( $p < 0,05$ ). † Diferente del efecto anterior ( $p < 0,05$ ). \*\* Sin diferencias significativas entre sí. Las barras continuas debajo del gráfico señalan la presencia del fármaco durante la medida.



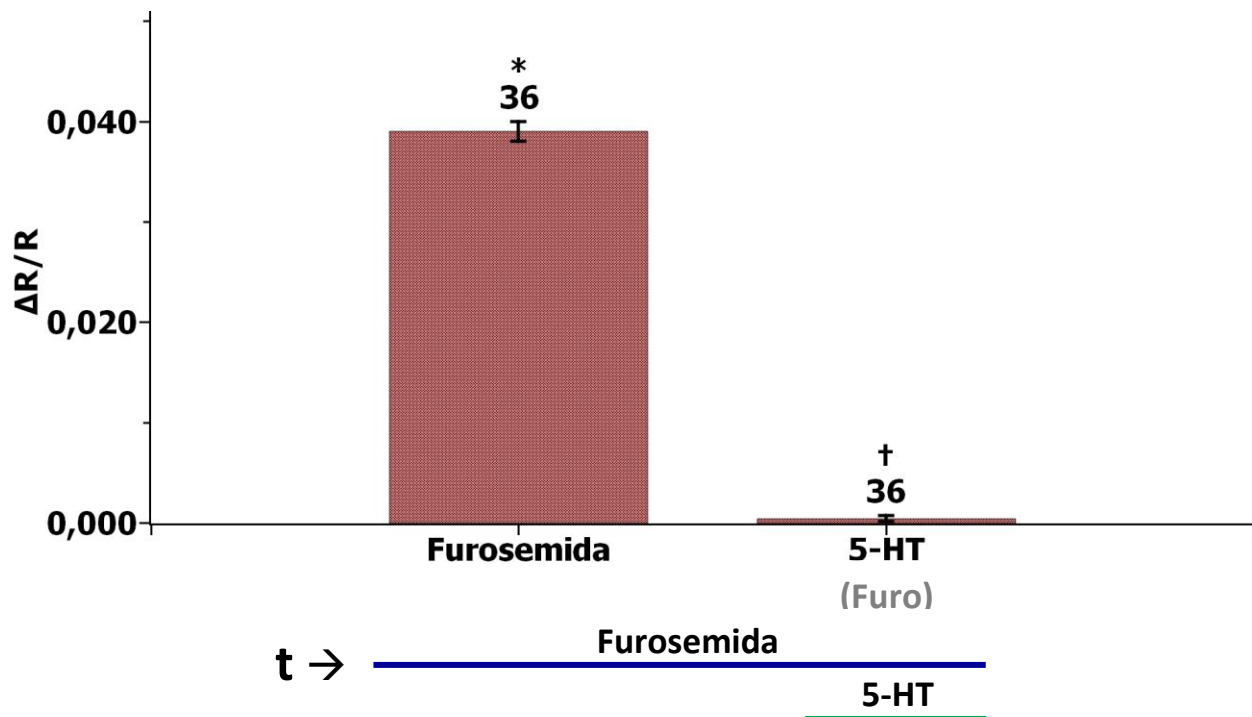
#### **5.4. Medida de la $[Na^+]_i$ en TM de *R. prolixus* al añadir 5-HT o Furosemida en presencia de un efecto previo.**

Puesto que en los resultados obtenidos en el estudio del efecto de furosemida y 5-HT en los TM de *R. prolixus* a los que se le ha revertido la estimulación farmacológica (sección 5.3), presentaron un comportamiento que parecía depender del efecto previo de 5-HT, planteamos los siguientes experimentos: 5-HT en presencia de furosemida y furosemida en presencia de 5-HT, sin lavado con Ringer Insecto entre cada efecto.

Los resultados mostrados en las figuras 19 y 20 concuerdan con los resultados de la sección 5.3. Además, fue notorio que el efecto de furosemida se vio afectado por la magnitud del efecto previo de 5-HT. A partir de lo cual se comprueba el planteamiento sobre el efecto inhibitorio de 5-HT en la ATPasa de sodio.

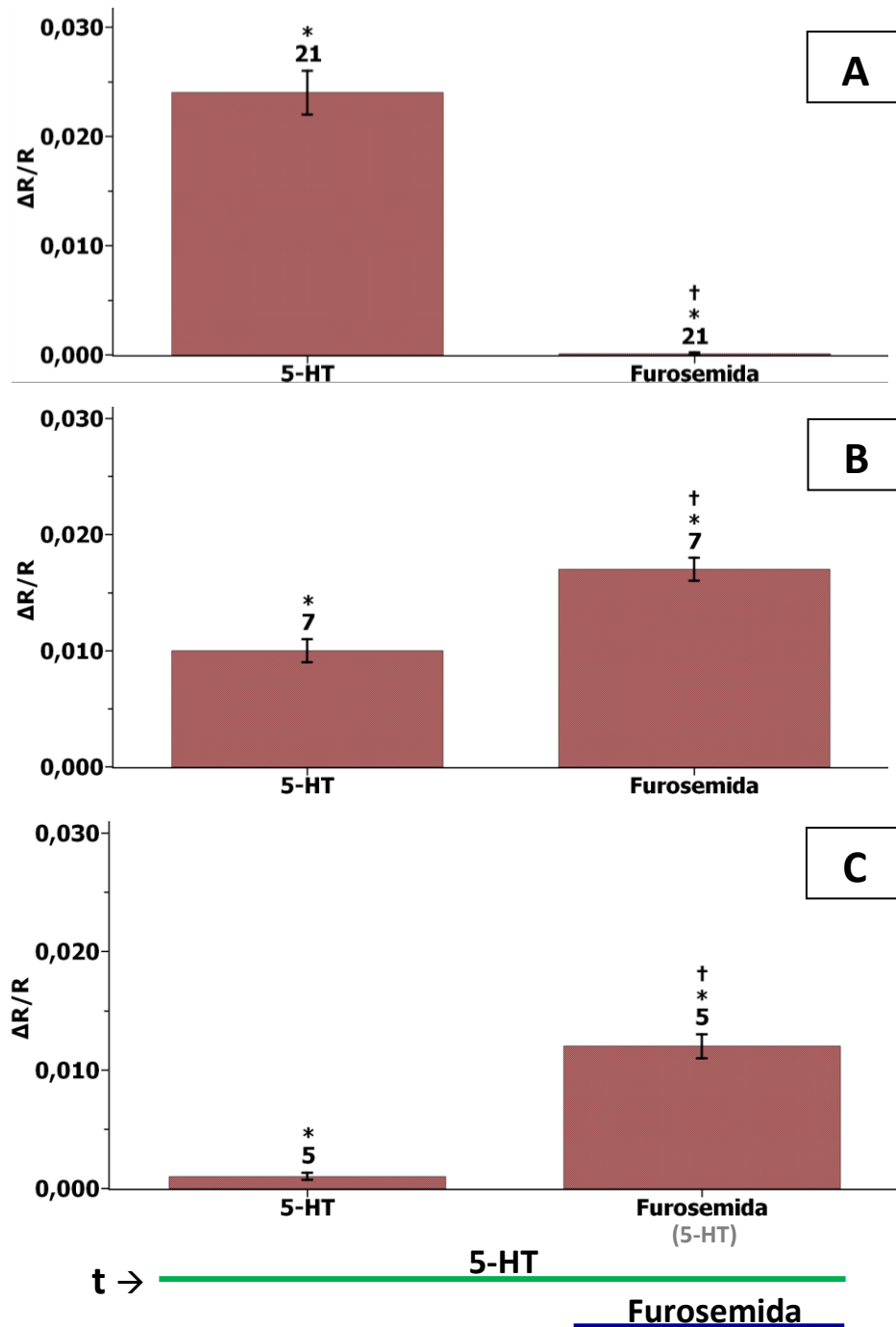
Para la realización de los experimentos mostrados en la figura 19 fueron utilizadas 47 zonas en total, de las cuales 36 mostraron el comportamiento reflejado, mientras que 11 no respondieron a ningún fármaco lo largo del registro. En cuanto a los experimentos cuyos resultados son los de la figura 20, se utilizaron 33 zonas, comportamientos agrupados en tres poblaciones: A, B y C.

#### 5.4.1. 5-HT en presencia de furosemida.



**Figura 19.** Efecto de 5-HT ( $10\mu\text{M}$ ) luego de la presencia de furosemida ( $1\text{ mM}$ ) en TM de *Rhodnius prolixus*. Se observa la relación de fluorescencia normalizada, como el promedio  $\pm$  SEM, proporcional a la  $[\text{Na}^+]_i$  en los TM como respuesta a la presencia de furosemida y luego a 5-HT aun en presencia de furosemida. El número sobre la barra indica el total de muestras que respondieron. \* Diferente de cero ( $p < 0,05$ ) † Diferente del efecto anterior ( $p < 0,05$ ). Las barras continuas debajo del gráfico señalan la presencia del fármaco durante la medida.

#### 5.4.2. Furosemida en presencia de 5-HT.

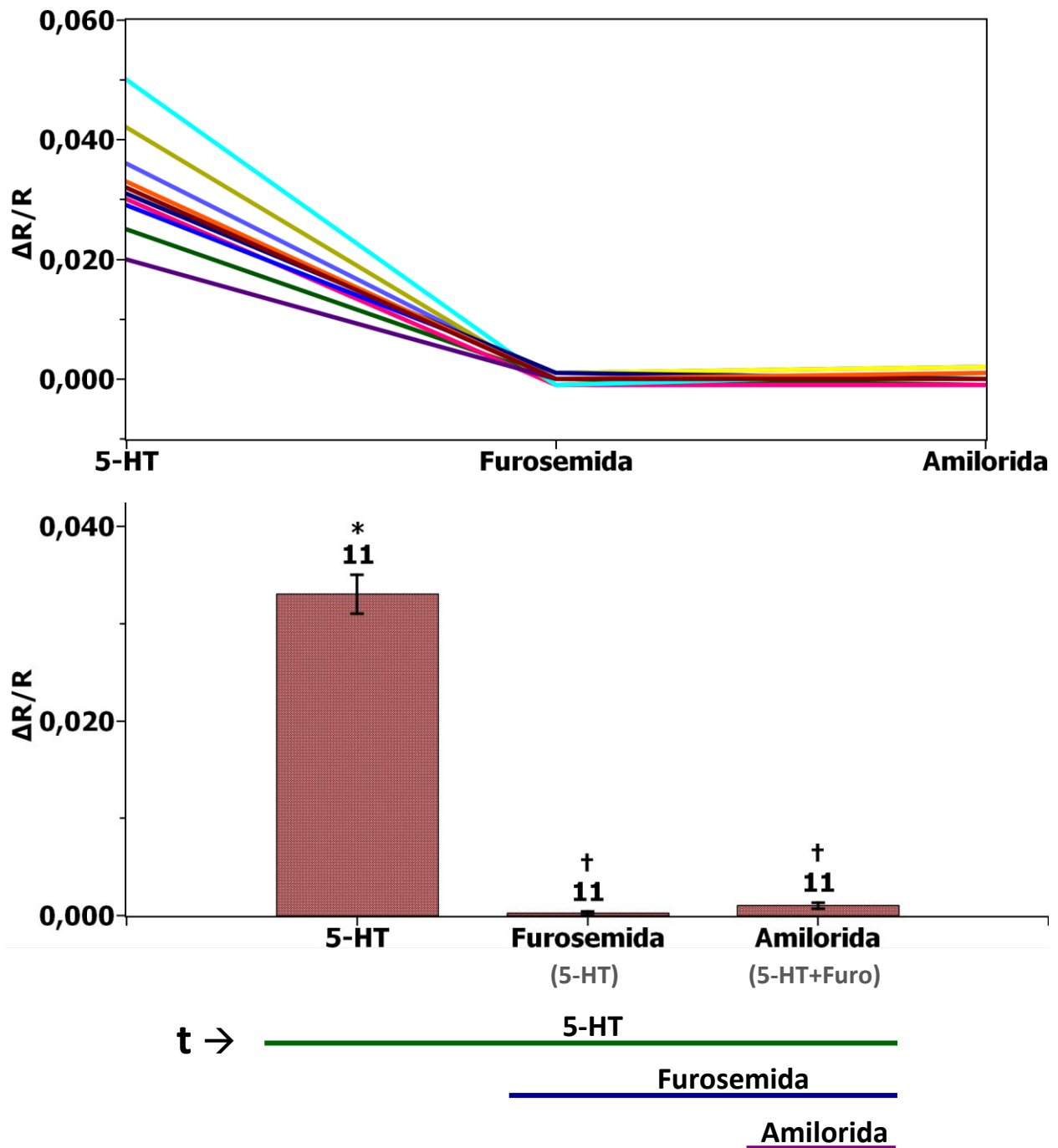


**Figura 20.** Efecto de furosemida (1 mM) luego de la presencia de 5-HT (10 $\mu$ M) en TM de *Rhodnius prolixus*. Se observa la relación de fluorescencia normalizada, como el promedio  $\pm$  SEM, proporcional a la  $[Na^+]_i$  en los TM como respuesta a la presencia de 5-HT y luego a furosemida aun en presencia de 5-HT. El número sobre la barra indica el total de muestras que respondieron. \* Diferente de cero ( $p < 0,05$ ) † Diferente del efecto anterior ( $p < 0,05$ ). Las barras continuas debajo del gráfico señalan la presencia del fármaco durante la medida.

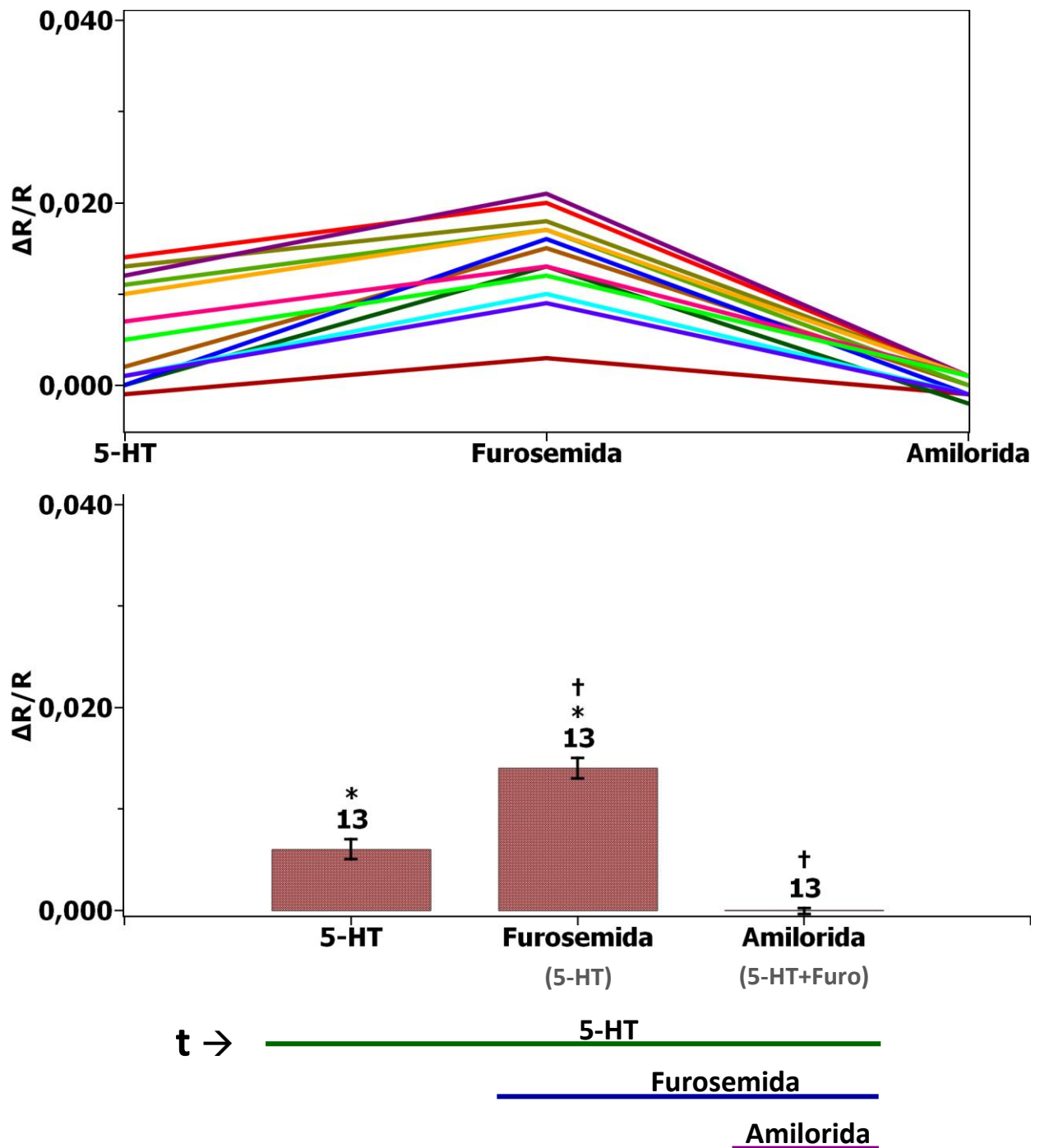
### **5.5. Cambio en la $[Na^+]_i$ en TM de *R. prolixus* estimulados al aplicar furosemida y amilorida.**

Conociendo el efecto de cada fármaco por separado, evaluamos el efecto de tres de ellos en conjunto, durante un mismo curso temporal. Para esto fueron utilizadas 44 zonas en total, de las cuales 24 respondieron en los comportamientos mostrados en las figuras 21 y 22.

A partir de la concentración intracelular de sodio obtenida mediante estos experimentos de comparación interna entre fármacos sucesivos y además aditivos, se observa, en la figura 21 y 22, que se obtuvieron dos poblaciones de resultados, en los cuales nuevamente 5-HT y furosemida mostraron un comportamiento en el que el efecto previo de 5-HT no permitía la observación del efecto de furosemida. Sin embargo, en este caso el fármaco central fue la amilorida, el cual no generó una disminución en la concentración al ser inhibido el canal de sodio, resultado negativo al esperado.



**Figura 21.** Comparación entre el efecto de 5-HT (10  $\mu$ M), furosemida (1 mM) y amilorida (100  $\mu$ M) durante un mismo curso temporal en TM de *Rhodnius prolixus*. Se observa la relación de fluorescencia normalizada, como el promedio  $\pm$  SEM, proporcional a la  $[Na^+]_i$  en TM, cuya única respuesta fue por 5-HT. El número sobre la barra indica el total de muestras que respondieron. El escrito bajo el fármaco hace referencia a la condición previa a su presencia en el baño. \* Diferente de cero ( $p < 0,05$ ). † Diferente del efecto anterior ( $p < 0,05$ ). Las barras continuas debajo del gráfico señalan la presencia del fármaco durante la medida.

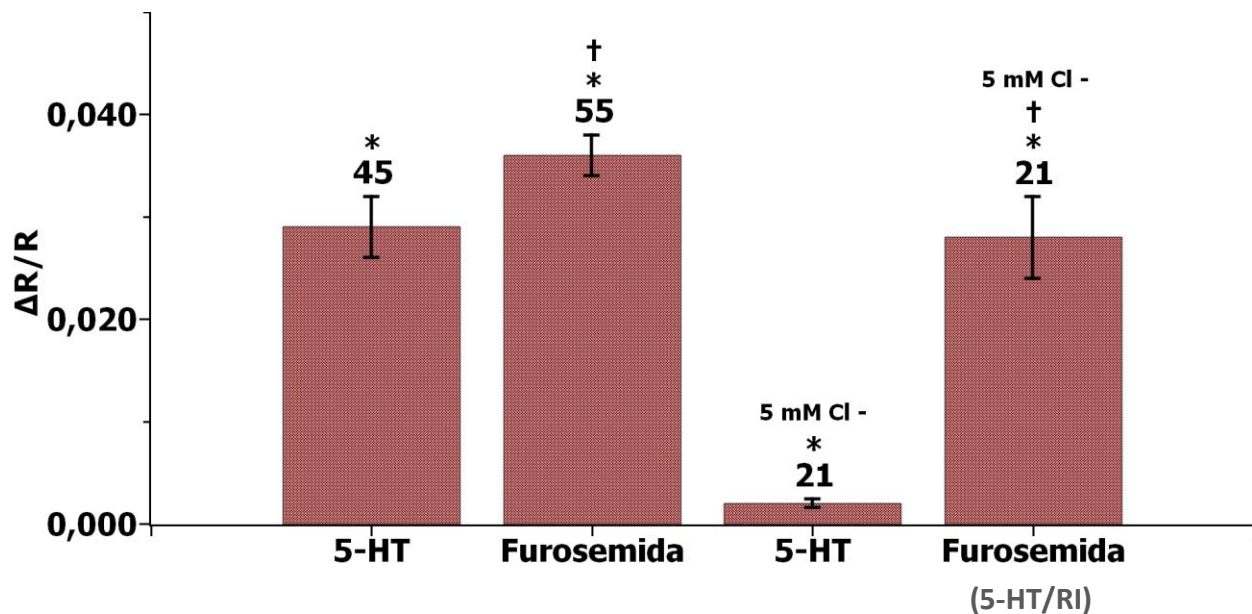


**Figura 22.** Comparación entre el efecto de 5-HT (10  $\mu$ M), furosemida (1 mM) y amilorida (100  $\mu$ M) durante un mismo curso temporal en TM de *Rhodnius prolixus*. Se observa la relación de fluorescencia normalizada, como el promedio  $\pm$  SEM, proporcional a la  $[Na^+]_i$  en TM, cuya respuesta de 5-HT fue baja y la de furosemida mayor. El número sobre la barra indica el total de muestras que respondieron. El escrito bajo el fármaco hace referencia a la condición previa a su presencia en el baño. \* Diferente de cero ( $p < 0,05$ ). † Diferente del efecto anterior ( $p < 0,05$ ). Las barras continuas debajo del gráfico señalan la presencia del fármaco durante la medida.

### **5.6. $[\text{Na}^+]_i$ en TM de *R. prolixus* durante la presencia de 5-HT y furosemida en condición Ringer 5 mM $\text{Cl}^-$ .**

Con la intención de comprobar el funcionamiento y participación del triple cotransportador  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$  ubicado en la membrana basolateral del túbulo, se realizó un experimento cuya solución del medio extracelular consistía en Ringer 5 mM  $\text{Cl}^-$ , lo cual representa una condición bajo cloruro en comparación con el Ringer Insecto. Para esto fueron utilizadas 37 zonas en total, de las cuales 21 respondieron a furosemida tal y como se muestra en la figura 23.

En la figura 23 se comparan las respuestas a los efectos de 5-HT y furosemida por separado en Ringer Insecto, y el efecto de los mismos fármacos –por separado- en solución Ringer bajo cloruro. Como se observa en el gráfico, bajo la condición de Ringer 5mM  $\text{Cl}^-$  furosemida presentó un efecto mayor a 5-HT. El diurético afecta el funcionamiento de la ATPasa de sodio y demuestra que la enzima no se ve alterada por la poca presencia de cloruro, la cual si presenta el triple cotransportador  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ , funcionamiento dependiente de la presencia de cloruro. Cabe destacar que el aumento registrado en la concentración de sodio es atribuible al funcionamiento del canal ENaC.



**Figura 23.** Comparación entre el efecto de 5-HT (10  $\mu$ M) y furosemida (1 mM) en Ringer Insecto (RI) condición normal y condición 5 mM Cl<sup>-</sup> en TM de *Rhodnius prolixus*. Se observa la relación de fluorescencia normalizada, como el promedio  $\pm$  SEM, proporcional a la  $[Na^+]_i$  en los TM como respuesta a la presencia de los fármacos bajo distintas condiciones de medio extracelular. El número sobre la barra indica el total de muestras que respondieron. El escrito bajo el fármaco hace referencia a la condición previa a su presencia en el baño. \* Diferente de cero ( $p < 0,05$ ). † Diferente del efecto anterior ( $p < 0,05$ ).



## VI. DISCUSIÓN

El sistema con el cual fue planificado llevar cabo la investigación en un principio, constaba de un microscopio invertido y una fuente de luz a partir de una lámpara de Mercurio. Este estaba acoplado a un fotomultiplicador que a su vez se conectaba a una computadora para la digitalización y el análisis de la señal. Sin embargo se encontraron diferentes inconvenientes tales como: fallas en la fuente de luz, cambio y ajuste de filtros, entre otros; y una vez solucionado esto, la sensibilidad del equipo no permitía la captación de la señal de SBFI que, para ese entonces, también presentó problemas en la carga que luego fueron solucionados al añadir Probenecid. Por lo tanto, para llevar a cabo la realización de los registros y obtención de los resultados mostrados, fue necesario un cambio de equipos hasta llegar al sistema observado en la figura 7 ubicado en el laboratorio de Fisiología Gastrointestinal – IVIC - cuyos instrumentos fueron minuciosamente restaurados, puesto que estuvieron sin funcionamiento previo durante más de cuatro años.

Además del cambio en el equipo experimental, también hubo cambios en los ejemplares utilizados. En el objetivo 2 fue planteado comparar la respuesta en la concentración intracelular de sodio bajo estimulación *in vitro* en túbulos de Malpighi (TM) proveniente de individuos en ayuno y túbulos proveniente de individuos recién alimentados; sin embargo no fue posible trabajar con los individuos recién alimentados y los objetivos fueron llevados a cabo con TM proveniente de individuos que presentaban aproximadamente 4 semanas de ayuno.

Los túbulos de Malpighi (TM) fueron cargados con SBFI en presencia de Probenecid tal como se observa en la figura 12, puesto que presentaron una mejor fluorescencia en los registros en

comparación con aquellos túbulos que solo habían sido cargados con el fluoróforo en solitario (figura 11).

El acetoximetil (AM) éster que acompaña en un inicio al SBFI facilita el paso del colorante a través de la membrana celular y, una vez adentro, estos grupos acetoximetilo se eliminan mediante las esterasas celulares, quedando así el fluoróforo atrapado en el citoplasma; sin embargo, para asegurar la retención del colorante se procedió a bloquear su salida inhibiendo el funcionamiento de los transportadores aniónicos utilizando Probenecid. La carga se realizó manteniendo una temperatura de 37 °C, ya que durante el afinamiento de la metodología fue observado que los túbulos no cargaban correctamente, y fue a partir de esto que tomamos en consideración que tal vez había una variación en la temperatura que dificultaba alcanzar una carga eficiente. En nuestro caso, se obtuvo la mejor carga a 37 °C, evitando así que el éster AM produjera una compartimentación intracelular de SBFI, y evitando también una variación en la temperatura que podía afectar la viscosidad de la matriz y por tanto el número de moléculas fluorescentes a entrar en contacto con las moléculas de la matriz celular. Por otro lado, mantener la temperatura adecuada asegura la desactivación de otros procesos distintos a la fluorescencia, permitiendo así una disminución en la eficiencia cuántica y aumentando el número de colisiones.

El Probenecid es un ácido orgánico débil cuyo mecanismo de acción es la inhibición de los transportadores de aniones orgánicos, cuyo bloqueo de la pérdida de colorante en varios tipos de células por parte del Probenecid se ha presentado como evidencia del papel de los transportadores en estos fenómenos (Silverman y col., 2008).

Al comparar la medida de la concentración intracelular de sodio en presencia de cada uno de los fármacos, se obtuvo lo representado en la figura 16, valores reflejados en la tabla 1. Dicho

gráfico muestra que tanto en presencia de 5-HT como en presencia de furosemida fueron registrados aumentos en la concentración intracelular de sodio, sin embargo, en presencia de ambos fármacos, los cuales fueron añadidos exactamente en el mismo instante, fue registrado un aumento mayor, en comparación con el resultado de ambos fármacos por separado. Esto permitió el planteamiento de un efecto extra, posiblemente por parte de la hormona, que permitiera el aumento intracelular del catión sodio en los túbulos de Malpighi. También fue observado que en presencia de ouabaína y de amilorida –por separado- no fue registrado ningún aumento comparable. La razón de cada uno de estos resultados en presencia de los fármacos por separado, pueden ser explicados mediante el modelo de secreción de *Rhodnius prolixus*, propuesto por Gámez y col. (2012), mostrado en la figura 2.

Cuando 5-HT se añade en el medio extracelular, se une a los receptores específicos ubicados en la membrana basolateral del túbulo de Malpighi. Una vez unida la hormona, desencadena un aumento en la adenilato ciclasa, lo cual permite el aumento de la concentración intracelular de AMPc, que a su vez se cree que desencadena una cascada de fosforilación (Aston, 1979; Maddrell, 1963; Maddrell y col., 1991). Esto último estimula al triple cotransportador  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ , quien representa la principal entrada de sodio al interior del túbulo, recordando igual el funcionamiento del resto de los otros mecanismos incluyendo a la otra entrada de sodio mediante el canal de tipo ENaC, y registrándose así el aumento de sodio en presencia de 5-HT, observado en la figura 16.

En presencia de furosemida, se inhibe a la ATPasa de sodio y al triple cotransportador  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ , sin embargo, fue registrado un aumento en la concentración intracelular puesto que el funcionamiento por parte del canal de sodio no se ve afectado bajo estas condiciones (figura 16).

Además, se puede sugerir que la actividad por parte del canal es mayor en comparación con el triple cotransportador  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ .

A pesar de los resultados observados con 5-HT y furosemida por separado, al probarlos en conjunto fue observado que el aumento era más pronunciado en comparación al resto, tal como se observa en la figura 16, permitiendo la pregunta sobre si 5-HT estaría ejerciendo otro efecto conjuntamente a la estimulación del triple cotransportador  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ , proponiendo como efecto inhibición sobre la ATPasa de sodio. El aumento registrado bajo esta condición también se encontraría principalmente atribuido al funcionamiento del canal de sodio de tipo ENaC.

Se conoce que la furosemida se une al sitio de unión del cloro en el triple cotransportador  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ , unión caracterizada por ser competitiva e irreversible (Buitrago, 2018), mientras que en la ATPasa de sodio, cuya acción fue reportada con la enzima purificada, fue demostrado que el diurético estabiliza al intermedio fosforilado en una forma E1.P.Na, sensible a ADP, aumentando la fosforilación (Rocafull y col., 2012).

En cuanto a la estructura del triple cotransportador  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ , Somasekharan y col. (2012) proponen que Met-382 se encuentra en la abertura externa de la cavidad en la conformación abierta hacia afuera y en contacto cercano con TM1 y TM10 en la conformación ocluida, cuyo cambio conformacional en la exposición a Met-382 se encuentra fuertemente respaldado por la gran disminución en la reactividad que se observa cuando el transportador está en la conformación ocluida con furosemida. Estos resultados de Somasekharan y col. (2012) son consistentes con la hipótesis de que esta clase de diuréticos se unen dentro del poro y sugieren que el sitio de unión puede estar cerca del extremo intracelular del bolsillo. Cabe destacar que el

concepto de inhibición irreversible implica que una vez conseguida la unión entre el fármaco y la proteína, esta queda inservible y es reemplazada por otro mecanismo.

En presencia de ouabaína no se registró un aumento pronunciado en la concentración intracelular de sodio (figura 16), coincidiendo la mayoría de los registros a la figura 15. Este resultado permite corroborar que la actividad de la ATPasa de sodio es mayor a la actividad de la Na/K ATPasa bajo estas condiciones. Según lo reportado por Caruso-Neves y col. (1998), no observaron un cambio en la secreción ni siquiera con ouabaína 1mM, concentración probada en el laboratorio más no reportada formalmente en este trabajo.

Profundizando un poco más, estos resultado con ouabaína pueden apoyarse en lo observado en modelos con *Drosophila*, cuyos túbulos de Malpighi contienen grandes cantidades de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, sin embargo, experimentos han demostrado que el tejido intacto casi no se ve afectado por concentraciones incluso extraordinarias. Torrie y col. (2004) atribuyen esto a que los túbulos están protegidos por un sistema activo de transporte de ouabaína ubicado junto a estas ATPasas, evitando así que el fármaco alcance concentraciones inhibitorias dentro de los pliegues basolaterales de las células. Y, estudios con ouabaína en otros tejidos han presentado resultados diferentes entre ellos, atribuyendo esto a las características intrínsecas del ejemplar.

En presencia de amilorida tampoco se observó un efecto –disminución- como se observa en la figura 16, sin embargo se esperaba tal resultado puesto que a pesar de inhibir al canal de sodio, el resto de los mecanismos se encontraban funcionando.

Con la intención de corroborar si el efecto de la hormona 5-HT era lavable o no con Ringer Insecto, aproximadamente por un minuto, y si el efecto de furosemida en túbulos a los que se les revirtió este efecto respondían de manera esperada, fue obtenido el resultado mostrado en la

figura 17. Se observa un aumento pronunciado en la concentración intracelular de sodio en presencia de 5-HT, sin embargo, que no fue registrado un aumento suficientemente comparable ni con el de 5-HT ni con el obtenido con furosemida en presencia única (figura 16). Sin embargo se obtuvo una segunda población de zonas que respondían diferente a la figura 17, la cual no respondía a 5-HT pero sí a furosemida (figura 18). Observación que permitió, una vez más, plantearnos la pregunta sobre qué ocurría realmente con los efectos de 5-HT y furosemida.

En estos mismos registros se añadía 5-HT al final con la intención de observar si había una respuesta distinta, pero tanto en la figura 17 como en la 18 se observa que 5-HT en ningún momento registro aumento puesto que si se registraba efecto con 5-HT, añadir más hormona no crearía un mayor efecto proporcional a la cantidad del fármaco y, por otra parte, independientemente del caso, furosemida se encontraba en el medio, cuyo efecto inhibitorio no permitiría la estimulación por su parte.

Retomando el efecto observado entre 5-HT y furosemida en las figuras 17 y 18, esto permitió plantearnos una serie de experimentos sin lavado entre fármaco y fármaco, para comprobar y/o descartar nuestra suposición sobre 5-HT y posibles efectos. Los resultados de estos experimentos son los mostrados en las figuras 19 y 20.

La figura 19 muestra un resultado esperado, basándonos en nuestros mismos experimentos. En esta se observa un registro pronunciado en el aumento de la concentración intracelular de sodio y ningún aumento con 5-HT aun en presencia de furosemida. Bajo esta condición se inhibe tanto a la ATPasa de sodio como al triple cotransportador  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ , lo cual no permite efecto alguno por parte de la hormona. Sin embargo, la figura 20 muestra 3 poblaciones de resultados, lo cual si permitió terminar de sugerir un segundo efecto por parte de 5-HT.

En la figura 20 se observa que a medida en que las zonas respondían al efecto de 5-HT, el efecto por parte de furosemida se veía desplazado. Es decir, a mayor aumento con la hormona, menor aumento con furosemida. Apoyando este resultado y estas observaciones al modelo de secreción, furosemida no podría ejercer un efecto sobre la ATPasa de sodio si 5-HT ya habría inducido inhibición sobre la enzima. Y este resultado permite también explicar lo observado en la figura 16, proponiendo una inhibición total sobre la ATPasa de sodio bajo el efecto de ambas cuando 5-HT y furosemida entran juntos al medio extracelular.

En el estudio del cambio en la concentración intracelular de sodio, con estimulación, en presencia de furosemida y amilorida, se obtuvo lo reflejado en las figuras 21 y 22, donde el comportamiento por parte de 5-HT y furosemida fue el esperado, bajo lo discutido anteriormente. Sin embargo, un resultado negativo fue el obtenido en presencia de amilorida, puesto que por inhibir al canal de sodio en estas condiciones esperábamos registrar una disminución. Atribuimos este resultado inesperado a cualquier causa que escapaba de nuestras posibilidades para ese entonces.

La figura 23 muestra la comparación de los resultados del efecto de 5-HT y furosemida, por separado, obtenidos en diferentes medios de Ringer. El estudio en condición bajo cloruro (5 mM), fue registrado que el aumento en la concentración intracelular de sodio en presencia de 5-HT fue menor al obtenido con la hormona en condición RI. Lo que quiere decir que el funcionamiento del triple cotransportador  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$  se ve afectado y presentaría el comportamiento de una especie de inhibición en consecuencia a la presencia de una baja concentración de cloruro, siendo modificada la relación

$$\Delta\Psi_{\text{Na}^+ \cdot \text{K}^+ \cdot \text{2Cl}^-} = \Delta\Psi_{\text{K}^+} + \Delta\Psi_{\text{Na}^+} + 2\Delta\Psi_{\text{Cl}^-}$$

A partir de esto se puede analizar que en esta condición tiende a favorecer el ingreso de sodio por difusión simple a través de otras conductancias de sodio ubicadas en la membrana basolateral, las cuales se encontrarían activas y tenderían a reestablecer el gradiente electroquímico para el catión (García, 2010). Por lo tanto, se comprueba que el cloruro es primordial para mantener un equilibrio y a su vez permitir el funcionamiento regular del mismo, ya que la concentración de los otros dos iones si se mantuvo. Siendo esto así, a pesar de la poca disponibilidad de cloruro en el medio extracelular, el bajo aumento registrado con 5-HT es atribuido al segundo mecanismo de entrada para sodio, el canal de tipo ENaC.

Por otra parte, tal y como observó García (2010), en experimentos condición Ringer bajo cloruro, los cambios inducidos por furosemida fueron mayores a aquellos con 5-HT, indicando así que un cambio en la concentración del cloruro intracelular no ejerce efecto negativo en el funcionamiento de la ATPasa de sodio (figura 23). Cabe destacar que fue utilizado Ringer  $\text{Cl}^-$  5mM y no una concentración mucho menor, ya que en experimentos realizados en el laboratorio se observó que las células no soportaban un medio con  $\text{Cl}^-$  0 mM.

Para el estudio de la desaparición o aparición de la actividad de la ATPasa de sodio, no fueron realizados experimentos específicos puesto que el efecto con la hormona 5-HT demostró inhibición de la enzima.

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos realizados en este trabajo, podemos afirmar nuestra teoría sobre que en condición de reposo la actividad de la ATPasa de sodio es mayor que la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (García, 2010; Freile, 2018), y su importancia en la homeostasis de este catión en los TM como principal mecanismo de salida del ion en reposo. Esto fue comprobado al haberse obtenido un aumento notorio en la concentración de sodio con



furosemida, mayor a la hormona sola, no haber registrado cambio con ouabaína o amilorida, y haberse obtenido aun un mayor aumento en presencia de 5-HT y furosemida en conjunto. A su vez, cabe destacar la importancia de la variabilidad de los túbulos y el efecto de la hormona, así como también el reforzamiento del modelo de secreción de *Rhodnius prolixus* (figura 2), al haberse observado que la hormona 5-HT ejerce un efecto inhibitorio por si sola sobre la ATPasa de sodio.

Cabe resaltar que entre los sistemas excretores de animales, la respuesta rápida y la alta tasa de transporte en los túbulos de Malpighi de insectos hematófagos se reconocen como adaptaciones cruciales para una estrategia de alimentación que se basa en el procesamiento rápido de grandes y diluidas comidas de sangre (Maddrell, 1991). El sistema de transporte en los túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* destaca por un alto flujo de secreción directamente relacionado a una compensación y a una regulación que permite un eficaz funcionamiento. Siendo esto así, bajo la propuesta de que la secreción depende directamente de la concentración intracelular de sodio, es posible afirmar que la participación de ATPasa de sodio es fundamental en la secreción de *Rhodnius prolixus*, siendo esta enzima regulada por las propias hormonas diuréticas.

## VII. CONCLUSIONES

- Se confirma que los túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* con más de cuatro semanas de ayuna presentan el funcionamiento del conjunto de mecanismos de transporte ubicados en la membrana basolateral, registrándose un aumento en la concentración intracelular de sodio en presencia de 5-hidroxitriptamina (5-HT) y de furosemida.
- Se confirma que los TM en reposo no responden en presencia de ouabaína.
- La hormona 5-HT no solo estimula al triple cotransportador  $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ , sino que parece ejercer un efecto inhibitorio sobre la ATPasa de sodio.
- El efecto inhibitorio de 5-HT y furosemida es aditivo.
- La estimulación de la secreción por 5-HT cursaría por dos efectos simultáneos: la estimulación del triple cotransportador  $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$  y la inhibición de la Segunda Bomba de Sodio. Esto permite un aumento en la concentración intracelular de sodio, lo cual es fundamental para la secreción en *Rhodnius prolixus*.
- Fue comprobado que el efecto de 5-HT aumenta la concentración de sodio intracelular a través de la estimulación al funcionamiento del triple cotransportador  $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ .
- La condición bajo cloruro no influye en el funcionamiento de la ATPasa de sodio.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aston, R.J. 1979.** Studies on the diuretic hormone of *Rhodnius prolixus*. Some observations on the purification and nature of the hormone and the dynamics of its release in vitro. *Insect Biochem.* 9:163-176.
2. **Berrizbeitia, M., Concepción, J., Carzola, V., Rodríguez, J., Cáceres, A., W. Quiñones. 2013.** Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en *Canis familiaris* del estado Sucre, Venezuela. *Biomédica.* 33: 214-225.
3. **Beyenbach, K.W., Petzel, D.H. 1987.** Diuresis in Mosquitoes: Role of a natriurectic factor. *NIPS.* 2: 171-175.
4. **Buitrago, C.A. 2018.** Diuréticos. *Nefrología Básica 2.* Asociación Colombiana de Nefrología. Bogotá, Colombia.
5. **Cantillo-Barraza, O., Garcés, E., Gómez-Palacio, A., Cortes, L.A., Pereira, A., Marcet, P.L., y col. 2015.** Eco-epidemiological study of an endemic Chagas disease region in northern Colombia reveals the importance of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae), dogs, and *Didelphis marsupialis* in *Trypanosoma cruzi* maintenance. *Parasit Vectors.* 8: 482.
6. **Caruso-Neves, C., Meyer-Fernández, J., Saad-Nehme, J., Proverbio, F., Marín, R., Lopes, A. 1998.** Ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-ATPase activity of Malpighian tubules from *Rhodnius prolixus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 119: 807-811.
7. **Echeverría, M., Ramírez-Lorca, R., Hernández, C., Gutiérrez, A., MéndezFerrer, S., González, E., Toledo-Aral, J., y colaboradores. 2001.** Identification of a new water channel (Rp-MIP) in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* 442: 27-34.

8. **Farfán, A.E., Gutiérrez, R., Angulo, V.M. 2007.** ELISA para la identificación de los patrones alimentarios de Triatominae en Colombia. *Rev. Salud Pública.* 9: 602-608.
9. **Freile, P. 2018.** Estudio *in vitro* del flujo de secreción dependiente de Na<sup>+</sup> de los túbulos de Malpighi del insecto hematófago *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), en condiciones de no estimulación. Tesis de Grado. Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.
10. **Gámez A.D, Gutiérrez A.M., García R., Whittembury G. 2012.** Recent experiments towards a model for fluid secretion in *Rhodnius* Upper Malpighian Tubules (UMT). *J. Insect Physiol.* 58: 543-550.
11. **García, R.D. 2010.** Estudio de la homeostasis del ion Na<sup>+</sup> en células epiteliales de *Rhodnius prolixus* y otros insectos. Tesis de Magister Scientarum. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Miranda, Venezuela.
12. **García-Alzate, R, Lozano-Arias, D., Reyes-Lugo, R. M., Morocoima, A., Herrera, L., Mendoza-León, A. 2014.** *Triatoma maculata*, the vector of *Trypanosoma cruzi*, in Venezuela. Phenotypic and genotypic variability as potential indicator of vector displacement into the domestic habitat. *Front Public Health.* 2: 1-9.
13. **García-Jordán, N., Berrizbeitia, M., Concepción, J. L., Aldana, E., Cáceres, A., Quiñones, W. 2015.** Estudio entomológico de vectores transmisores de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural del estado Sucre, Venezuela. *Biomédica.* 35: 247-257.
14. **Gutiérrez, A., Hernández, C., Whittembury, G. 2004.** A Model for Fluid Secretion in *Rhodnius* Upper Malpighian Tubules (UMT). *J. Membrane Biol.* 202: 105-114.
15. **Guzmán, Á., Galán, D., Gutiérrez, A., Güeres, R. 2011.** Variaciones de pH intracelular en túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* en condiciones de reposo y secreción frente

a 5-hidroxitriptamina y bafilomicina. Avances en Ciencia de la Salud. Volumen 1  
Número 1–39.

16. **Haas, M., Forbush, III. 2000.** The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelial. *Am. Rev. Physiol.* 62: 515-534.
17. **Hashimoto, K., Schofield, C. J. 2012.** Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Parasit Vectors* 5: 45.
18. **Hernández, C., Gutiérrez A., Vargas-Janzen, A., Noria, F., González, E., Ruiz, V., Whittembury, G. 2001.** Fluid secretion in *Rhodnius* upper Malpighian tubules (UMT): water osmotic permeabilities and morphometric studies. *J. Membrane Biol.* 184: 283-290.
19. **Ianowski, J.P., O'Donnell, M.J. 2001.** Transepithelial potential in Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*: lumen-negative voltages and the triphasic response to serotonin. *Journal of Insect Physiology* 47, 411–421.
20. **Ianowski, J.P., O'Donnell, M. 2006.** Electrochemical gradients for Na<sup>+</sup> , K<sup>+</sup> , Cl<sup>-</sup> and H<sup>+</sup> across the apical membrane in Malpighian (renal) tubule cells of *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* 209(10): 1964-1975
21. **Lecuona, R.E., Edelstein, J.D., Berretta, M.F., La Rossa, F.R., Arcas, J.A. 2001.** Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) Strains as Potential Agents for Control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 38 (2): 172-179.
22. **Lent, H., Wigodzensky, P. 1979.** Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas's disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 127–520.

23. **Maddrell, S. 1963.** Excretion in the blood-sucking bug. *Rhodnius prolixus* Stal. I. The control of diuresis. J. exp. Biol. 40: 247-256.
24. **Maddrell, S. 1969.** Secretion by the Malpighian tubules of *Rhodnius*. The movements of ions and water. J. Exp. Biol. 51:71-97.
25. **Maddrell, S. 1976.** Insect Malpighian tubules. In Transport of Ions and Water in Animals, (eds B. L. Gupta, R. B. Moreton, J. L. Oschman & B. J. Wall), pp. 541-569. London: Academic Press.
26. **Maddrell, S. 1980.** Characteristics of Epithelial Transport in Insect Malpighian Tubules. Curr. Topics. In Memb. And Transp. 14: 427-463.
27. **Maddrell, S. 1991.** The fastest fluid-secreting cell-known: the upper Malpighian tubule of *Rhodnius*. Bio. Essays. 13: 357-362.
28. **Maddrell, S., Herman, W., Mooney, R., J. Overton, J. 1991.** 5-Hydroxytryptamine: a second diuretic hormone in *Rhodnius prolixus*. J. Exp. Biol. 156: 557-566.
29. **Maddrell, S., Herman, W., Farndale, R., Riegel, J.A. 1993.** Synergism of hormones controlling epithelial fluid transport in an insect. J. Exp. Biol. 174: 65-80.
30. **Maddrell, S., Phillips, J. 1975.** Secretion of hipo-osmotic fluid by the lower Malpighian Tubules of *Rhodnius prolixus*. J. exp. Biol. 63: 671-683
31. **Martini, S., Nascimento, S., Morales, M. 2007.** *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules and control of diuresis by neurohormones. An. Acad. Bras. Ciênc. 79(1): 87-95.
32. **O.M.S. (2017).** "<http://www.who.int/gho/database/es/>." Retrieved: 12/11/17 from <http://www.who.int/gho/database/es/>

- 33. Orchard, I., Lange, A., Cook, H., Ramirez, J. 1989.** A subpopulation of dorsal unpaired median neurons in the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* displays serotonin-like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 289: 118-128.
- 34. Proverbio, F., Marín, R., Proverbio, T. 1986.** Na<sup>+</sup>-ATPase is a different entity from the (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-ATPase in rat kidney basolateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 858: 202-205.
- 35. Proverbio, F., Marín, R., Proverbio, T. 1989.** The “second” sodium pump and cell volume. *Curr. Membr. Transp.* 34: 105-119.
- 36. Proverbio, F., Marín, R., Proverbio, T. 1991.** The ouabain-insensitive sodium pump. *Camp. Biochem. Physiol.* 99<sup>a</sup> (3): 279-283.
- 37. Proverbio, F., Robinson J.W., Whittembury, G. 1970.** Sensitivities of (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-ATPase and Na<sup>+</sup> extrusion mechanisms to ouabain and ethacrynic acid in the cortex of the guinea-pig kidney. *Biochim. Biophys. Acta.* 211(2): 327-336.
- 38. Reyes-Lugo, M., Reyes-Contreras, M., Salvi, I., Gelves, W., Avilán, A., Llavaneras, D., y col. 2011.** The association of *Triatoma maculata* (Ericsson 1848) with the gecko *Thecadactylus rapicauda* (Houttuyn 1782) (Reptilia: Squamata: Gekkonidae): a strategy of domiciliation of the Chagas disease peridomestic vector in Venezuela? *Asian Pac J Trop Biomed.* 1: 279- 284.
- 39. Ricardo-Silva A., Gonçalves Teresa C.M., Luitgards- Moura J.F., Lopes C.M., Silva S., Bastos A.Q., y col. 2016.** *Triatoma maculata* colonises urban domicilies in Boa Vista, Roraima, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 111: 703-706.
- 40. Rocafull, M., Thomas, L., del Castillo, J. 2012.** The second sodium pump: from the function to the gene. *Pflugers Arch-Eur. J. Physiol.* 463: 755-777.

- 41. Silverman, W., Locovei, S., Dahl, G. 2008.** Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295: C761–C767.
- 42. Somasekharan, S., Tanis, J., Forbush, B. 2012.** Loop Diuretic and Ion-binding Residues Revealed by Scanning Mutagenesis of Transmembrane Helix 3 (TM3) of Na-K-Cl Cotransporter (NKCC1). *The Journal of Biological Chemistry.* 287 (21): 17308–17317.
- 43. Torrie, L.S., Radford, J.C., Southall, T.D., Kean, L., Dinsmore, A.J., Davies, S.A., Julian A.T. 2004.** Resolution of the insect ouabain paradox. *Dow Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(37): 13689–13693.
- 44. Whittembury, G. 1968.** Sodium and water transport in kidney proximal tubular cells. *J. Gen. Physiol.* 51: 303-314.
- 45. Whittembury, G., Biondi, A., Paz-Aliaga, A., Linares, H., Parthe, V., Linares, N. 1986.** Transcellular and paracellular flow of water during secretion in the upper segment of the Malpighian tubule of *Rhodnius prolixus*: solvent drag of molecules of graded size. *J. Exp. Biol.* 123: 71-92.
- 46. Wiczorek, H., Putzenlechner, M., Zeiske, W., Klein, U. 1991.** A vacuolar-type proton pump energizes  $K^+/H^+$  antiport in an animal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 266: 15340-15347.
- 47. Wigglesworth, V. 1931.** The physiology of excretion in blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). II. Anatomy and histology of excretory system. *J. Exp. Biol.* 8: 428-442.
- 48. Wigglesworth, V. 2005.** The principles of insect physiology. Segunda edición. Methuen and Company Limited. Londres.



- 49. Wulff, J.P. 2018.** Genómica, proteómica y fisiología de neuropéptidos en el insecto triatomino *Rhodnius prolixus*. Oportunidades para el diseño de nuevas estrategias de control de Chagas. Trabajo de Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- 50. Zeledón, R., Blanco, E. 1965.** Relaciones huésped-parásito en *Tripanosomiasis rangeli* I. Infección intestinal y hemolinfática comparativa de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*. Rev. Biol. Trap., 13(1): 143-1 58.