

03072

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO 3
24

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE SALIVA
DE TRIATOMINOS MEXICANOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A
DELIA ANATOLIA CUEVAS AGUIRRE

CUERNAVACA, MOR.

TESIS CON 1992
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

ADP	Adenosin difosfato
ATP	Adenosin trifosfato
AMP	Adenosin monofosfato
Pi	Fosfato inorgánico
TXA ₂	Tromboxana A ₂
EDTA	Acido etilén diamino tetracético
PRP	Plasma rico en plaquetas
HEPES	N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2 ácido etano sulfónico
TRIS	Trishidroximetilaminometano
HCl	Acido clorhidrico
NaCl	Cloruro de sodio
SDS	Dodecil sulfato de sodio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
BSA	Albúmina sérica bovina
KCl	Cloruro de potasio
DMF	Dimetil formamida
ATC	Acido tricloroacético
ELISA	ensayo inmunoenzimático
NBT	Azul de nitro tetrazolio
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indoilfosfato
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
EACA	Acido épsilon aminocaproico
A	Absorbencia
nm	nanómetros
mg	miligramos
µg	microgramos
ml	mililitros
µl	microlitros
NIH	National Institute of Health
FI-FXIII	Factores del I al XIII de la coagulación de la sangre
M	Molar
mM	milimolar

RESUMEN

Los triatominos son insectos hematófagos pertenecientes a la familia Reduviidae. En nuestro laboratorio hemos obtenido la saliva de varias especies de triatomas entre las cuales están: Triatoma pallidipennis, Triatoma longipennis, Triatoma mazzotti, Triatoma picturata y Triatoma sp con la finalidad de caracterizar bioquímicamente la saliva de las mismas, además de buscar y caracterizar alguna(s) substancia(s) con actividad antiemostática que eventualmente pudiera ser de interés médico.

La saliva de las diferentes especies fueron analizadas electroforéticamente en los sistemas de SDS y enfoque isoelectrico, encontrándose diferencias en los patrones electroforéticos. Los componentes de bajo peso molecular predominan de forma importante sobre los de alto peso molecular, así como las proteínas con puntos isoelectricos acidos.

Se probaron las siguientes actividades enzimáticas en saliva de Triatoma pallidipennis: actividad proteolitica inespecifica, actividad fosfatasa, actividad fosfolipásica, actividad fibrinolítica, actividad fibrinogenolítica, actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria (actividad antiplaquetaria) y actividad apirasa. De estas actividades probadas sólo la actividad antiplaquetaria y la actividad apirasa resultaron positivas.

La saliva se fraccionó por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-75 fino, encontrándose las fracciones I y II con actividad apirasa, estas fracciones de proteínas concuerdan con las fracciones con actividad antiplaquetaria, esto sugiere que por lo menos parte de la actividad antiplaquetaria de la saliva es debida a la apirasa presente .

INDICE

	pag.
I.-INTRODUCCION	1
1.-Triatomas	1
2.-Antecedentes sobre saliva de insectos hematófagos	5
3.-Estudios sobre apirasa	7
4.-Plaquetas	8
5.-Objetivo	19
II.-MATERIALES Y METODOS	20
1.-Obtención de saliva	20
2.-Separación cromatográfica de la saliva	20
3.-Electroforesis	21
4.-Ensayos enzimáticos	22
5.-Tiempo de coagulación	26
6.-Agregación plaquetaria	26
III.-RESULTADOS	28
1.-Recuperación de la saliva	28
2.-Caracterización general	28
3.-Fraccionamiento cromatográfico de la saliva.	34
4.-Actividad antiplaquetaria	34
5.-Actividad apirasa	38
IV.-DISCUSION	45
V.-CONCLUSIONES	54
VI.-BIBLIOGRAFIA	55

LISTA DE FIGURAS

	pag.
FIGURA 1.-Figura de <u>Triatoma pallidipennis</u>	2
FIGURA 2.-Ciclo de vida de un triatomino	3
FIGURA 3.-Esquema de una plaqueta	9
FIGURA 4.-Cinética de agregación plaquetaria	14
FIGURA 5.-Cinética de agregación y desagregación plaquetaria	15
FIGURA 6.-Representación esquemática del papel de las plaquetas en la hemostásis.	17
FIGURA 7.-Cascada de coagulación de la sangre	18
FIGURA 8.-Patrones electroforéticos comparativos de saliva de triatomas de diferentes especies	32
FIGURA 9.-Patrones electroforéticos comparativos de saliva de triatomas de diferentes especies y sexo	33
FIGURA 10.-Enfoque isoeléctrico de saliva de diferentes especies de triatomas.	35
FIGURA 11.-Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-75 fino de saliva de <u>Triatoma pallidipennis</u> .	36
FIGURA 12.-Cinética de inhibición de la agregación plaquetaria en saliva total de <u>Triatoma pallidipennis</u> .	37
FIGURA 13.-Cinética de inhibición plaquetaria de la fracción 19	39
FIGURA 14.-Cinética de la actividad apirasa presente en saliva total de <u>Triatoma pallidipennis</u> .	40
FIGURA 15.-Fraccionamiento cromatográfico de saliva de <u>Triatoma pallidipennis</u> .	42
FIGURA 16.-Electroforesis de la apirasa presente en la fracción Ia.	44

LISTA DE TABLAS

	pag.
TABLA 1.-Correlación entre anatomía y función plaquetaria	10
TABLA 2.-Rendimiento de la saliva de diferentes especies de triatóminos mexicanos en dos diferentes estadios de su ciclo biológico.	29
TABLA 3.-Actividades enzimáticas probadas en saliva de <u>Triatoma pallidipennis</u> .	30
TABLA 4.-Dependencia de calcio de la apirasa presente en saliva de <u>Triatoma pallidipennis</u>	41

I.-INTRODUCCION

1.-Triatomas

Biología y Morfología

Los triatomas son insectos pertenecientes a la subfamilia Triatominae, que comprende a miembros de una gran familia de chinches microdepredadoras.

La morfología de los adultos es característica. Tienen un aspecto similar al de las chinches fitófagas, con una forma alargada y el abdomen ancho (Fig.1). El tamaño y coloración varía según la especie. La cabeza es alargada, estrecha con ojos compuestos prominentes, generalmente presentan dos ocelos. Tienen antenas largas y finas compuestas por cuatro artejos y una probóscide recta y alargada, compuesta por tres segmentos, está fletada bajo la cabeza durante el reposo y se extiende hacia adelante cuando el insecto pica. El tórax es firme, duro y bien quitinizado; del tórax nacen dos pares de alas; en el primer par, la mitad es coriácea y la otra mitad membranosa. En el borde del abdomen (conexivo) presentan una alternancia de manchas negras y de colores vivos, que van del amarillo claro al rojo naranja, según la especie (Atias, A., Neghme, A. 1978).

Ciclo Vital

La hembra pone de 100 a 300 huevos. Los huevos son de color blanco, después se vuelven amarillos o rosados en algunas especies. La hembra los deposita de uno en uno. Los huevos tardan de dos a tres semanas en incubarse dependiendo de la temperatura; después de este tiempo salen las ninfas I que al nacer carecen de alas, son de color claro al principio, pero no tardan en oscurecerse. Efectúan un total de cinco mudas, siempre después de saciarse completamente de sangre. Tanto las hembras como los machos y todos los estadios ninfales son hematofagos. En condiciones óptimas (28°C y 60% de humedad relativa) el desarrollo de una chinche desde el huevo hasta la forma adulta dura aproximadamente un año en algunas especies, bajo otras condiciones su desarrollo puede durar hasta dos años esto se muestra en la Fig. 2 (Biagi, F. 1982).

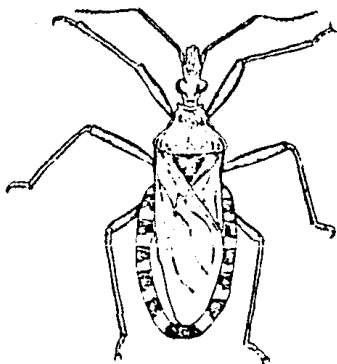


FIGURA 1.-FIGURA DE Triatoma pallidipennis (Atias & Neghme 1978).

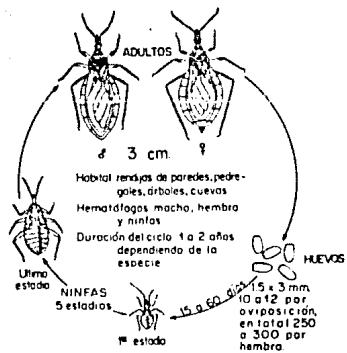


FIGURA 2.-CICLO DE VIDA DE UN TRIATOMINO (Biagi, F. 1982)

Importancia Médica

La importancia desde el punto de vista médico está representada principalmente por:

a).-Las lesiones debidas a la picadura en el huésped humano. Los triatóminos al picar inyectan la secreción de sus glándulas salivales, de efectos probablemente anestésico en la piel y fluidizante en la sangre. Esta secreción puede provocar una reacción de hipersensibilidad local, histaminica, que se traduce en una roncha urticarial muy pruriginosa y de tamaño variable, que suele desaparecer varios días despues. El rascado enérgico agrega reacciones traumáticas de escoriación de la piel abriendo camino a la infección secundaria provocada por otros microorganismos.

Aunque algunas especies se alimentan de hemolinfa de insectos, la mayoría son hematófagos. La picadura es indolora y de larga duración, pues el insecto necesita llenar la amplia capacidad de su abdomen sin despertar a su presa. Por lo general defecan durante el acto de alimentación, lo que tiene gran importancia para el mecanismo de transmisión de Trypanosoma cruzi agente causal de la enfermedad de Chagas (Atias, A., Neghme, A. 1978)

b).-El aspecto más importante es que algunas especies pueden ser vectores biológicos del Tripanozoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas (Atias, A., Neghme, A. 1978).

Los triatomas se infectan al picar animales o personas chagásicos que tengan tripomastigotes sanguíneos. Los parásitos se multiplican en el lumen del intestino medio del insecto, evolucionando luego hacia tripomastigotes metacíclicos infectantes, en el intestino posterior desde donde pasan al exterior con las deyecciones cuando el insecto defeca. Por eso es tan peligrosa la circunstancia de que defequen mientras están picando, pues depositan sobre la piel las formas infectantes, desde donde pueden ser arrastradas hacia la herida de la picadura, o penetrar por las lesiones traumáticas (Biagi, F. 1982).

2.-Antecedentes sobre saliva de insectos hematófagos

Como se mencionó anteriormente la saliva de insectos hematófagos contiene una serie de componentes con acción específica.

Se ha observado que la mayoría de ellos han desarrollado mecanismos para prevenir la coagulación de la sangre del huésped. Durante años se le han adscrito diversas funciones a la saliva de estos insectos hematófagos como por ejemplo ayudar a la disolución de azúcares, lubricación del estilote de alimentación en mosquitos y como fuente de alérgenos y toxinas. Investigaciones recientes han demostrado que la saliva juega un papel importante en el acto de succión de la sangre del huésped (Ribeiro, J.M.C. 1987).

En los últimos años se ha demostrado que artrópodos no relacionados tienen actividades antiplaquetarias comunes y otras actividades antihomeostáticas que facilitan la localización de la sangre y previenen la hemostásis del huésped durante su alimentación (Ribeiro et al 1984a).

Rhodnius prolixus es un insecto hematófago perteneciente a la familia Reduviidae, el cual requiere ingerir una gran cantidad de sangre antes de cada muda y continúa alimentándose de sangre a través de su vida adulta. El insecto después de penetrar la piel del huésped inyecta su saliva (Ribeiro et al 1986).

La saliva de Rhodnius prolixus ha sido ampliamente estudiada. En 1964 Hellman y Hawkins descubrieron una actividad anticoagulante en un extracto de glándulas salivales de Rhodnius prolixus, además de una enzima fibrinolítica y otra anticoagulante en un extracto de intestino del mismo insecto. Posteriormente ellos mismos en 1965 demostraron que las dos actividades anticoagulantes eran debidas a substancias diferentes y las llamaron prolixina G (la del intestino) y prolixina S (de glándulas salivales). La prolixina G inhibe el factor VIII de la coagulación de la sangre.

Estudios hechos por Gaarder et al 1963 y Born & Cross 1963 demostraron que el ADP es el principal nucleótido que causa agregación de plaquetas in vivo e in vitro. En la saliva de Rhodnius prolixus se ha encontrado una actividad apirasa (ATP---> AMP + 2Pi) (Ribeiro y García 1980, Ribeiro y García 1981). Es probable que la actividad apirasa encontrada en Rhodnius prolixus tenga el papel fisiológico de agotar el ADP del plasma sanguíneo y de esta manera impedir la agregación plaquetaria.

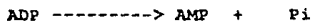
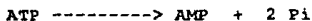
Se ha encontrado también actividad apirasa en la saliva de la mosca Tsé-Tsé (Mant & Parker 1981), en mosquitos (Ribeiro 1984, Ribeiro 1985) y en otros insectos hematófagos. Es interesante notar que insectos no relacionados tengan esta enzima en altas concentraciones en sus glándulas salivales. Es posible que esta enzima tuviera una función metabólica importante antes de que estos insectos desarrollaran su hábito hematófago, pero esto no está aún muy claro.

Ribeiro en 1981 descubrió que la saliva de Rhodnius prolixus inhibe la agregación plaquetaria inducida por colágena. Además se ha encontrado una actividad antitromboxano A₂ (TXA₂) (Ribeiro 1981, Ribeiro & Sarkin 1982); esta actividad, además de prevenir la agregación plaquetaria inducida por TXA₂, también previene el efecto vasoconstrictor de la TXA₂. También, fueron encontradas actividades de antiserotonina y antihistamínica en la saliva de Rhodnius (Ribeiro 1982); estas actividades ayudan a antagonizar el efecto vasoconstrictor de la hemostásis del huésped. Todas estas actividades actúan sinérgicamente para impedir la coagulación de la sangre del huésped.

Por los trabajos revisados en la literatura se ha visto que la mayoría están encaminados al estudio de la saliva de Rhodnius prolixus, es muy posible que en otros miembros de la subfamilia Triatominae existan actividades anticoagulantes similares.

3.-Estudios sobre apirasa

Meyerhof (1945), trabajando con levaduras fue el primer investigador que sugirió el nombre de apirasa para describir a la enzima que emplea como sustrato ADP y/o ATP, hidrolizándolos y liberando 1 y 2 moles de fosfato inorgánico por cada mol de nucleótido, respectivamente.



Este tipo de actividad se describió más tarde en vertebrados (LeBel et al 1980, Hamlyn & Senior 1983) e invertebrados (Ribeiro & García 1980, Smith et al 1980, Mant & Parker 1981, Ribeiro et al 1985 a). También se ha descrito una actividad apirasa en papa (Molnar & Lorand 1960).

En vertebrados la actividad apirasa ha sido bien caracterizada en páncreas de rata, pero su papel fisiológico permanece aún sin conocerse.

En invertebrados, la actividad se ha asociado con las glándulas salivales de artrópodos hematófagos, esta actividad apirasa se ha relacionado con un papel antihemostático debido al papel central que juega el ADP en la agregación plaquetaria (Vargaftig et al 1981).

La saliva o glándulas salivales de muchos insectos no relacionados, tales como la chinche Rhodnius prolixus (Ribeiro & García 1981 a), el mosquito Aedes aegypti (Ribeiro et al 1984a), la mosca Glossina austeni (Mant & Parker 1981), la garrapata Ixodes dammini (Ribeiro et al 1985 a) inhiben la agregación plaquetaria in vitro, encontrándose en todos ellos actividad apirasa, lo cual sugiere fuertemente que la principal función de la apirasa es agotar el ADP, que se sabe es un fuerte inductor de la agregación plaquetaria, y de esta manera en conjunto con otros factores existentes en la saliva prevenir la coagulación de la sangre durante el tiempo en que el insecto se está alimentando.

4.-Plaquetas

Morfología

El papel de las plaquetas es fundamental en la hemostásis, ya que contribuyen a ella formando un tapón plaquetario que en conjunto con la vasoconstricción local y el mecanismo de cascada de los factores de coagulación presentes en el plasma sanguíneo se forma el coágulo definitivo.

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos sin núcleo derivados de megacariocitos medulares. En condiciones normales las plaquetas circulan durante 10 días, tienen un diámetro de 2 a 3 μ m, y su número normal se encuentra entre 150,000 y 400,000 por mm^3 . Se ha observado que las plaquetas pueden cambiar fácilmente de una forma esférica a una forma irregular, este cambio de forma se favorece por la exposición de las plaquetas a ciertas substancias tales como ácido etilendiaminotetracético (EDTA), citrato de sodio, difosfato de adenosina (ADP) y otras. Coincidiendo con el cambio de forma se produce movimiento de iones sodio hacia adentro de las plaquetas que es similar al efecto de agentes despolarizantes tales como acetil colina sobre células excitables. El cambio de forma es acompañado por un incremento en la relación superficie/ volumen. Así, el cambio de forma parece ser la primera respuesta de las plaquetas a los estímulos (Born et al 1972).

La estructura de las plaquetas se muestra en la Fig.3. Las plaquetas están rodeadas por una cubierta de 10 a 20 nm de espesor, compuesta por carbohidratos y glicoproteínas, dicha cubierta es importante en los procesos de agregación y adhesión de las plaquetas (Tabla 1). Debajo de la cubierta está la membrana plasmática, la cuál tiene una estructura trilaminar con un grosor aproximado de 7 a 9 nm. Se han identificado algunas proteínas de membrana como la adenil-ciclasa y varias glicosil-transferasas las cuales pueden estar involucradas en los procesos de adhesión y agregación (Bosmann 1971). Además, se han identificado tres glicoproteínas que están expuestas hacia el exterior de la membrana (Nurden & Caen 1974). La membrana plasmática está cargada negativamente, las cargas están probablemente arregladas en conglomerados sobre su superficie. Partículas cargadas positivamente, como la polilisina causan la agregación de plaquetas. En suma, la membrana plasmática tiene sitios receptores a ciertas substancias (serotonina, ADP,

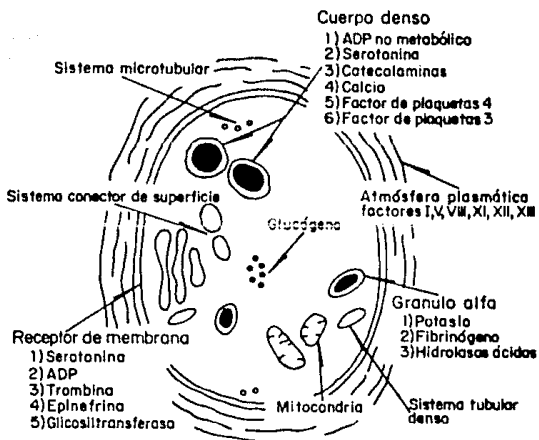


FIGURA 3.-ESQUEMA DE UNA PLAQUETA (Triplett et al 1978).

TABLA 1.-Correlación entre anatomía y función plaquetaria.

ZONA ANATOMICA	FUNCION
PERIFERICA	ADHESION Y AGREGACION
1.-Cubierta exterior	
2.-Membrana	
ORGANELO	ALMACENAMIENTO Y SECRECION
1.-Gránulos	
2.-Cuerpos densos	
3.-Mitocondria	

trombina, epinefrina y glicosil-transferasas entre otras) las cuales inducen la función plaquetaria. La función plaquetaria puede iniciarse por la presencia de una amplia variedad de substancias, incluyendo enzimas proteolíticas tales como trombina y tripsina, fibras de colágeno y substancias de bajo peso molecular como ADP.

Otra característica de la membrana además del cambio de forma es que forma una red de canales que se comunican con el citoplasma. Este sistema de canales está constituido por invaginaciones de la membrana y recibe el nombre de sistema conector de superficie o sistema conector tubular, estos canales incrementan grandemente la superficie de la membrana y sirve como un medio para la captación de substancias del plasma y para la rápida salida de gránulos secretorios durante la reacción de liberación de las plaquetas (Behnke 1970).

Intimamente relacionado con el sistema conector de superficie existe otro sistema llamado sistema tubular denso porque los túbulos membranosos contienen un material moderadamente electrodenso, parece probable que los componentes de este sistema provengan del aparato de Golgi de los megacariocitos.

Se han identificado dos tipos de gránulos dentro del citoplasma. Los principales son conocidos como gránulos alfa, tienen moderada densidad electrónica y contienen enzimas tales como catepsina, β -glucuronidasa y fosfatasa ácida, además de fibrinógeno y potasio. Existen entre 20-200 gránulos alfa por plaqueta y miden entre 0.2-0.3 μm de diámetro. El segundo tipo son llamados cuerpos densos, tienen una alta densidad electrónica, existen de 2 a 10 cuerpos densos por plaqueta y son el sitio donde se almacena ADP, ATP, serotonina, calcio, factor de plaquetas 3 y factor de plaquetas 4. El ADP almacenado en los cuerpos densos es aproximadamente el 60% del ADP total de las plaquetas; este ADP no es metabólico.

Las plaquetas también contienen un sistema microtubular que contiene filamentos; la función de los microtúbulos en las plaquetas es probablemente mantener un citoesqueleto.

Existen además otras estructuras como las mitocondrias que son relativamente fácil de identificar por su doble membrana, se encuentran en un número pequeño o a veces en conglomerados.

Los ribosomas no son frecuentes en las plaquetas, pero cuando se pueden observar indican que la plaqueta se formó recientemente y en consecuencia lleva consigo algunos de los ribosomas del citoplasma del megacariocito.

Adherencia

Las plaquetas en la circulación en estado normal no se adhieren al endotelio de los vasos sanguíneos, pero si se interrumpe la continuidad del endotelio ya sea por lesión física o por enfermedad, pueden ponerse en contacto con ciertos componentes tisulares. Se sabe que la colágena puede inducir la adherencia de las plaquetas. Las microfibrillas de la membrana basal también hacen que las plaquetas se adhieran a ellas al quedar descubiertas, pero a diferencia, ello exige que haya calcio.

Reacción de liberación

La reacción de liberación se pone en marcha por la adherencia de plaquetas y consiste en la liberación de los gránulos alfa y cuerpos densos a través del sistema de túbulos que comunican con la superficie de las plaquetas que desembocan en el exterior. La reacción de liberación puede desencadenarse por diversas sustancias tales como ADP, colágena y trombina entre muchas otras. Day & Holmsen (1971) han llamado el proceso de liberación del contenido de los cuerpos densos "liberación I" y el proceso de liberación del contenido de los gránulos alfa "liberación II". Se supone que estos dos procesos están gobernados por mecanismos diferentes (Halmsen 1957).

Agregación plaquetaria

Las plaquetas participan en la hemostasis primaria mediante la formación de agregados en el sitio que ha sido

dañado. El ADP es una substancia que induce la agregación y puede provenir de diversas fuentes (tejido dañado, eritrocitos o plaquetas). La trombina y epinefrina pueden actuar como agentes agregantes y/o inductores de la liberación de ADP endógeno.

Existen otros inductores de la agregación tales como la colágena, complejos antígeno-anticuerpo, fibrina parcialmente polimerizada y algunas enzimas proteolíticas, como trombina y tripsina, amins tales como serotonina y epinefrina, antibióticos como ritostatina y ácidos grasos como el araquidónico.

La agregación plaquetaria puede seguirse con un agregómetro de plaquetas, el cual es básicamente un instrumento foto-óptico conectado a un registrador. El plasma rico en plaquetas (PRP) se coloca dentro de una cubeta con agitación, enseguida se le adiciona el agente agregante que se desea probar y si existe algún efecto, se observa un incremento en la cantidad de luz transmitida a través de la muestra, esto se convierte en señales electrónicas que son amplificadas y registradas en un papel.

El ADP es un agente inductor de la agregación plaquetaria muy importante que produce una respuesta bifásica, es decir produce una respuesta primaria y una secundaria. Existen ciertas características generales de una curva típica de agregación, esto se muestra en la Figura 4. Antes de la adición de cualquier agente agregante, se tiene una línea base con PRP, una vez que se inicia la agitación, la basal está representada por un trazo oscilante horizontal, las oscilaciones son resultado de la polarización de la luz que pasa a través de las plaquetas. Una vez que el agente agregante es adicionado se observa un aumento inicial en la transmitancia como resultado de la dilución producida. Los agentes agregantes que producen cambio en la forma de las plaquetas dan como resultado un decremento temporal en la transmitancia debido al incremento de la luz dispersada. La agregación subsecuente causa el incremento característico en transmitancia, enseguida tiene lugar la reacción de liberación, por lo tanto se libera el ADP endógeno y éste produce una onda de agregación secundaria, produciéndose una agregación máxima.

Cuando la concentración de ADP es baja sólo se produce una respuesta primaria de agregación, en ausencia de agregación secundaria puede ocurrir disgregación debido a que se "rompe" el tapón plaquetario, esto se muestra en la Figura 5.

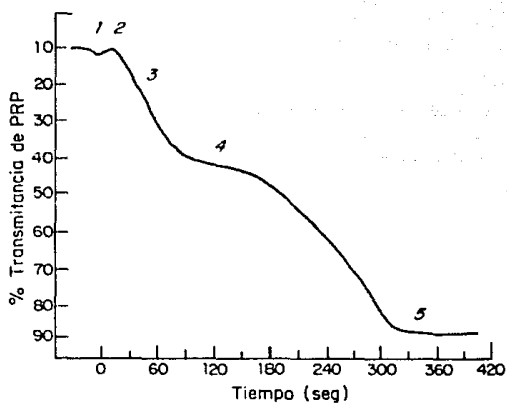


FIGURA 4.-CINETICA DE AGREGACION PLAQUETARIA (Triplett et al 1978)
 1)La dilución con el inductor causa un ligero incremento
 2)el cambio de forma de las plaquetas causa un ligero decremento
 3)reacción de liberación
 4)agregación secundaria
 5)agregación máxima.

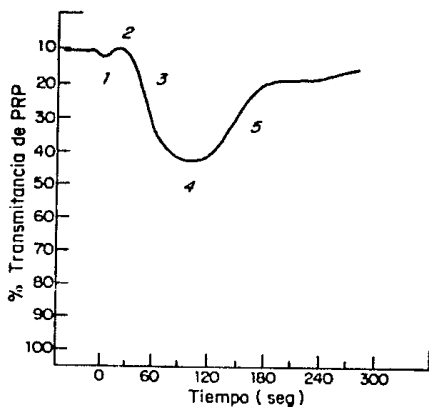


FIGURA 5.-CINETICA DE AGREGACION Y DESAGREGACION PLAQUETARIA (Triplett et al 1978).

Se utilizó como agente inductor ADP (0.5ug/ml)

- 1) la dilución con ADP causa un ligero incremento
- 2) cambio de forma de las plaquetas
- 3) agregación primaria
- 4) agregación máxima
- 5) desagregación plaquetaria.

Tapón Hemostático Primario

En circunstancias normales las plaquetas son fragmentos celulares de forma circular que no se adhieren a otras plaquetas, elementos celulares o endotelio vascular. Cuando hay daño endotelial, las plaquetas se ponen en contacto con tejido conectivo y se adhieren a la colágena, fragmentos de membrana y microfibrillas las cuales están asociadas con elastina (Fig 6).

Después de la adhesión, se inicia el proceso de liberación del contenido de los gránulos alfa y los cuerpos densos, este proceso no es destructivo.

La agregación directa de las plaquetas por ADP es llamada agregación primaria o agregación reversible o primera fase de la agregación. La agregación irreversible o agregación secundaria está mediada por los productos de liberación del contenido de los cuerpos densos.

Contribución a la Coagulación

Las plaquetas además de su importancia en la hemostasis primaria, contribuyen con fosfolípidos que juegan un papel importante en las dos últimas etapas de la cascada de coagulación (Fig 7). Los fosfolípidos han sido llamados factores plaquetarios y se encuentra en la membrana y en los gránulos.

La Figura 7 ilustra el mecanismo de cascada de la coagulación de la sangre. Existen dos mecanismos distintos para la coagulación sanguínea, uno llamado sistema intrínseco y el otro sistema extrínseco. El primero consiste en una serie de reacciones en cascada, en la cual el factor XII se transforma en XII_a, éste a su vez activa el factor XI a XI_a, y así sucesivamente hasta la formación del complejo Factor V-Ca⁺⁺-PF3, que activa la protrombina a trombina. El sistema extrínseco actúa a nivel del factor X transformándolo en X_a. La trombina actúa sobre fibrinógeno para formar monómeros de fibrina, los cuales a su vez forman el coágulo de fibrina estable.

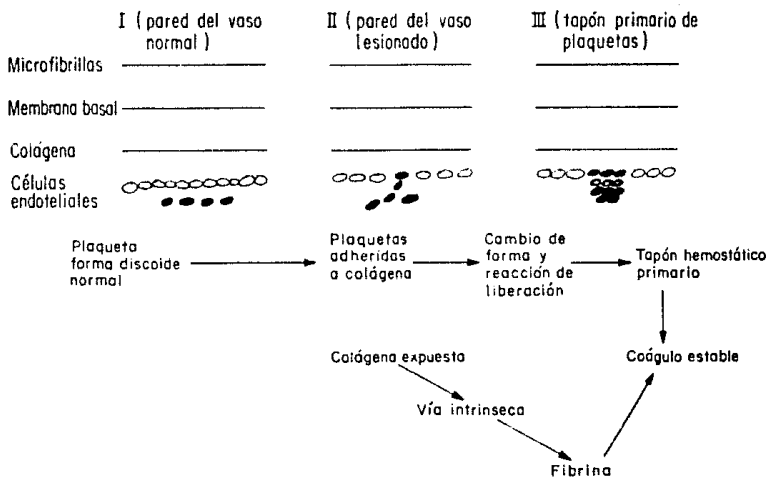


FIGURA 6.-REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN LA HEMOSTASIS (Triplett et al 1978).

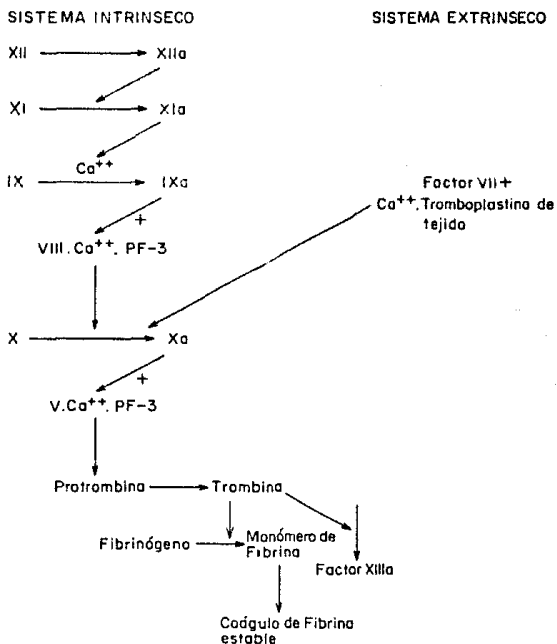


FIGURA 7.-CASCADA DE COAGULACION DE LA SANGRE (Triplett et al 1978)
 Mecanismo propuesto para la formación del coágulo de fibrina. El calcio está representado por Ca^{++} ; Factor plaquetario 3, PF3; Factores de coagulación en la forma activa, a.

OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es contribuir al estudio de la bioquímica básica de la saliva de triatomíneos mexicanos, en especial de Triatoma pallidipennis, así como la búsqueda y análisis de alguna(s) substancia(s) con actividad antihemostática que pudiera tener utilidad terapéutica.

II.-MATERIALES Y METODOS

1.-Obtención de Saliva

Se trabajó con saliva de diferentes especies (Triatoma pallidipennis, Triatoma mazzotti, Triatoma longipennis, Triatoma picturata y Triatoma sp), la cual fue proporcionada por los Dres. Máximo Cortés y Ricardo Alejandro, del Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politecnico Nacional.

El cultivo de los triatomas y la obtención de la saliva se hizo de la siguiente manera:

Todos los triatomas fueron cultivados y mantenidos en una incubadora con una humedad relativa del 50-60 % a 28°C dentro de frascos de boca ancha con tapa horadada para permitir la entrada de aire. Fueron alimentados cada dos semanas colocando los insectos sobre el abdomen afeitado de un conejo. Por este procedimiento es posible alimentar un gran número de insectos al mismo tiempo.

La saliva se obtuvo por estimulación manual del pronoto del triatoma y colectada en capilares, que fueron posteriormente sellados. Se colectó la saliva de 12 triatomas por capilar. Los capilares se guardaron a -20°C hasta su recuperación con agua bidestilada.

La saliva de cada capilar se recuperó en 500 µl de agua bidestilada en tubos eppendorf, centrifugada durante 1 minuto (Microfuga Beckman). Al sobrenadante obtenido se le midió proteína por su absorbencia a 280 nm. Posteriormente se liofilizó y una vez seca la saliva se pesó, guardándose después a -20°C hasta su uso.

2.- Separación Cromatográfica de la Saliva

La saliva fue fraccionada utilizando cromatografía de exclusión molecular, para lo cual se empleó Sephadex G-75 fino (Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Suecia) preparado de acuerdo a

las indicaciones del fabricante. Se usó una columna de vidrio de 0.4 cm de diámetro por 76.5 cm de longitud empacada por gravedad y corrida a presión constante y temperatura ambiente. La columna fue equilibrada y eluida con amortiguador de HEPES/TRIS 30 mM + 150 mM de cloruro de sodio pH 7.25, a una velocidad de flujo de 9 ml por hora, se colectaron fracciones de 0.6 ml y se midió la absorbencia a 280 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU-50).

3.-Electroforesis

Electroforésis en presencia de SDS

Para el estudio electroforético de la saliva de las diferentes especies de triatoma, así como criterio de pureza en el proceso de purificación y cálculo del peso molecular aparente de los componentes proteínicos, se realizó electroforesis en placa de poliacrilamida en presencia de SDS de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Los geles fueron teñidos con azul brillante de coomasie R-250 de acuerdo al método de Swank y Munkres (1971).

La estimación del peso molecular aparente de los polipéptidos se hizo por el método descrito por Weber y Osborn (1979), empleando las siguientes proteínas como estándares: Fosforilasa b (94 000), Albúmina (67 000), ovoalbúmina (43 000), anhidrasa carbónica (30 000), inhibidor de tripsina de soya (21 000) y alfa lactoglobulina (14 000).

Enfoque isoeléctrico

Para la estimación del punto isoeléctrico de los componentes proteínicos de la saliva de las diferentes especies se utilizó la técnica de enfoque isoeléctrico, para lo cual se utilizó el PhastSystem Development Unit (Pharmacia, Laboratory Separation Division). Los minigeles se tiñeron con plata siguiendo el protocolo establecido para el aparato. Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos de Pharmacia.

4.-Ensayos enzimáticos

Actividad Proteolítica Inespecífica

La actividad proteolítica fue determinada de acuerdo al método de Reinderknecht et al (1968). Se utilizó como sustrato 5 mg de Hide Powder Azure (Calbiochem), se adicionó 100 μ l de amortiguador de TRIS/HCl 100 mM pH 7.95 + 50 μ l de saliva (con una concentración de 1 μ g/ μ l). Esto se llevó a un volumen final de 1.5 ml, la mezcla se incubó en agitación por 20 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo se midió el colorante liberado a 595 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU-50).

Actividad apirasa

La actividad apirasa fue determinada de la siguiente manera: Se preincubó por 5 min a 37°C un medio de reacción conteniendo 1 mM de ADP + 100 mM KCl + 10 mM de CaCl₂ en amortiguador de TRIS/HCl 50 mM pH 7.5.

A 70 μ l de este medio de reacción preincubado se le adicionó una mezcla de 10 μ l de saliva + 60 μ l de KCl 100 mM. La reacción se dejó transcurrir por 4 horas a 37°C y se detuvo adicionando 140 μ l de ácido tricloroacético (ATC) al 10 %, posteriormente se centrifugó en microfuga por 1 min (en el caso de los controles la adición de ATC se hizo antes de incubar por 4 horas). El fosfato inorgánico (Pi) liberado se determinó en el sobrenadante por el método de Russell et al (1984) modificado por nosotros.

La detección del fosfato inorgánico se hizo de la siguiente manera:

a).- Preparación de la solución A: A 10 ml de acetato de sodio 0.5 M pH 4.5 se le adicionaron 70 mg de ácido ascórbico y 1 ml de heptamolíbato de amonio al 35 %, se agitó vigorosamente durante 5 min (adquiere un tono amarillo - verdoso) y se colocó sobre hielo.

b).-Preparación de la solución B: Se hizo una mezcla de arsenito de sodio al 2% + citrato de sodio al 2% + ácido acético glacial al 2%.

c).-A 200 μ l de la muestra problema se le adicionó 400 μ l de la solución A, se mezcló y se dejó reposar sobre hielo por 10 min .

d).- Posteriormente se le adicionó 600 μ l de la solución B, se agitó en vórtex y se incubó en baño de agua a 37° C durante 5 min.

e).- Se leyeron los tubos en un espectrofotómetro Beckman DU-8 a 700 nm.

Paralelamente se hizo una curva estandar de fosfatos usando una solución de Na_2HPO_4 anhidro en agua y se utilizaron concentraciones de 0 - 126 nmoles de Pi, procediéndose en la forma descrita arriba.

Se ha reportado la existencia de apirasas dependientes de calcio, por lo tanto se probó si en la saliva existía este tipo de apirasa. Esto se hizo de la siguiente manera:

Al medio de reacción conteniendo calcio se le adicionó EDTA hasta una concentración final de 5 mM y se procedió de igual manera al protocolo descrito anteriormente.

Actividad fosfolipásica

La actividad fosfolipásica se determinó de acuerdo al método descrito por Haberman et al (1972), el cual emplea como sustrato yema de huevo en un gel de agarosa en donde se observa el halo de degradación de fosfolípidos. El método consiste en lo siguiente:

a).-Preparación del reactivo 1: Se mezclaron 12 ml de yema de huevo fresca con 36 ml de NaCl 0.85%, se centrifugó a baja velocidad, el precipitado se descartó.

b).-Preparación del reactivo 2: Se disolvieron 0.3 g de agarosa en 50 ml de amortiguador de TRIS/HCl 50 mM pH 7.95 en un baño maría.

c).-Preparación del reactivo 3: Solución de cloruro de calcio 10 mM

d).-Preparación del reactivo 4: Solución de BSA (1 mg/ml) en cloruro de sodio al 0.85%

Se mezclaron 0.5 ml del reactivo 1 + 50 ml del reactivo 2 + 0.5 ml del reactivo 3, se vació la mezcla en cajas de petri con un espesor aproximado de 3 mm se dejó gelificar y posteriormente se hicieron pocitos en los cuales se colocó 20 µl de saliva de triatoma. Se utilizó como testigo negativo la solución 4 y como testigo positivo una fosfolipasa de veneno de serpiente, purificada en nuestro laboratorio.

Actividad de fosfatasa alcalina

Se determinó por el método de Leary et al (1983) con algunas modificaciones. Se utilizó una placa de ELISA de 96 pozos (Costar, Cambridge, USA).

a).- En el pozo número 1 se adicionó 100 µl de saliva de triatoma (1 mg/ml) a partir de ahí se hicieron diluciones seriadas hasta 1/508 con amortiguador de carbonatos 100 mM pH 7.5 + 150 mM NaCl

b).-Preparación del sustrato de la siguiente manera: Se mezcló 50 µl de dimetil formamida (DMF) con 5 mg de azul de nitro tetrazolio (NBT) y 2.5 mg de 5-Bromo-4-Cloro-3 indoilfosfato (BCIP) y se llevó a un volumen final de 15 ml con amortiguador de carbonatos 10 mM + 159 mM de NaCl pH 9.5.

c).- Enseguida se adicionó 50 µl de sustrato en cada pozo, la mezcla se incubó a 37°C por 2 horas.

d).- La reacción se paró adicionando 50 µl de ácido etilén diaminotetracético (EDTA) 50 mM en cada pozo.

e).- Se midió la absorbencia a 570 nm en un lector de ELISA.

Para hacer la curva estandar se preparó una solución de fosfatasa alcalina (Sigma) de 10 µg/ml en amortiguador de carbonatos 100 mM + 150 mM de NaCl pH 7.5 . Se adicionó 100 µl de esta solución al pozo número 1 y se procedió a hacer las diluciones y procedimiento descrito para la saliva.

Actividades Fibrinolítica y Fibrinogenolítica

Se utilizó el procedimiento descrito por Reich et al (1978) con ligeras modificaciones. Los geles de fibrinógeno se prepararon de la siguiente manera:

Se preparó agarosa al 1% en amortiguador de TRIS/HCl 25 mM a pH 7.2 y se mantuvo en un baño de agua a 42°C, también se preparó fibrinógeno a una concentración de 5.7 mg/ml en amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.2 a una temperatura de 42°C. Se hizo una mezcla de 15 ml de cada solución y se vació en cajas de Petri con un grosor aproximado de 4 mm, después de la gelificación se procedió a hacer pocitos en el gel.

Para la preparación de los geles de fibrina se procedió de la misma manera que para los geles de fibrinógeno, pero a la mezcla de las soluciones se le adicionó 0.5 unidades NIH de trombina (Sigma) en 50 µl de amortiguador de citrato de sodio 50 mM pH 7.2 + NaCl 0.5 M. De esta manera se convierte el fibrinógeno en fibrina por acción de la trombina en aproximadamente 1 hora.

Para probar estas actividades se adicionó 20 µl de saliva de triatoma dentro de pozos hechos en el gel, se incubaron los geles a temperatura ambiente por 24 horas. Enseguida los geles se lavaron con NaCl 150 mM y se tiñeron con negro de amido 0.01% en metanol al 70% y ácido acético al 10%.

La actividad fibrinogenolítica fue seguida por la degradación de fibrinógeno en los geles de agarosa- fibrinógeno. La actividad fibrinolítica fue detectada por la lisis producida en los geles de agarosa-fibrina.

5.-Tiempo de coagulación

La sangre fue extraída de una persona sana, que no había tomado medicamentos durante las 2 semanas anteriores. Se colocaron 500 μ l de sangre en tubos de plástico y se adicionaron 20 μ l de saliva de Triatoma pallidipennis (1 μ g/ μ l). Al mismo tiempo se puso en marcha un cronómetro. Después, a intervalos de 10 segundos se inclinaban los tubos hasta que se formó el coágulo. Al mismo tiempo se puso un control adicionando en lugar de la saliva 20 μ l de salina.

6.-Agregación Plaquetaria

La sangre fue obtenida de donadores sanos, inmediatamente se mezcló con citrato de sodio 0.11 M en una relación de 9:1 (V/V), luego fue centrifugada por 10 min a 230 g (1100 rpm) en una centrifuga clinica Beckman. El sobrenadante constituye el plasma rico en plaquetas (PRP) el cual se saca del tubo con una pipeta pasteur silanizada. El precipitado se descarta. Al PRP se le adicionó ácido epsilon amino caproico (EACA) hasta obtener una concentración final de 10 mg/ml (Hawkey 1967), esto se hace con el fin de inhibir el activador de plasminógeno en el caso de que estuviera presente en saliva. El PRP tratado de esta manera se usó en todos los ensayos de agregación plaquetaria. En todos los casos el PRP se incubaba en un baño de agua a 37°C durante el transcurso de las pruebas, teniendo cuidado de terminar los ensayos en un tiempo no mayor de 4 horas contadas a partir del momento de la extracción de la sangre, porque después de este tiempo la actividad plaquetaria bajaba notablemente, por lo tanto los resultados no eran muy confiables después de este tiempo. La agregación plaquetaria fue seguida por medición de cambios en la absorbencia a 600 nm de la suspensión (Born & Cross 1963).

Primeramente se realizó una prueba control de la siguiente manera:

En un tubo de polietileno se mezclaron 400 μ l de PRP + 200 μ l de solución tyrode (200 mg CaCl₂ + 8 g NaCl + 200 mg KCl + 1 g NaHCO₃ + 98 mg NaHPO₄·7H₂O + 106.8 mg MgCl₂·6H₂O se lleva a un volumen final de 1 litro con agua destilada) + 200 μ l de ADP (6.25 μ M en salina 0.09 %), se colocó el tubo en un baño de agua a 37°C con agitación vigorosa paralelamente se marca el tiempo en

el cronómetro y se mide la absorbencia a 600 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU-50) en celdas de plástico. Se hicieron lecturas a intervalos de 30 segundos. Se tomó una lectura al tiempo cero (A₀) en todos los casos.

La mezcla de reacción para los problemas se hizo así: 400 µl de PRP + 200 µl de ADP + 5 µl de saliva + 195 µl de solución tyrode, la mezcla se colocó en el baño de agua a 37°C y se siguió el mismo protocolo descrito arriba para el control.

Cálculo de la Actividad Antiplaquetaria (% de inhibición de agregación plaquetaria).

El cálculo de inhibición de la agregación plaquetaria se hizo a un tiempo de 8 min y se emplearon las siguientes fórmulas.

$$\% \text{ agregación plaquetaria} = \frac{A_c}{A_m} \times 100$$

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \% \text{ agregación plaquetaria}$$

Donde:

A_c = Absorbencia a 280 nm del control a un tiempo de 8 min

A_m = Absorbencia a 280 nm de la muestra a un tiempo de 8 min

III.-RESULTADOS

1.- Recuperación de la Saliva

Durante el desarrollo de este trabajo nos proporcionaron saliva de triatoma de las siguientes especies: Triatoma pallidipennis, Triatoma longipennis, Triatoma mazzotti, Triatoma picturata y Triatoma sp en dos fases de su ciclo biológico (adulto y ninfa de V estadio).

La saliva nos llegaba al laboratorio congelada dentro de capilares sellados. Cada capilar contenía la saliva de 12 triatomas. El material se recuperaba como se describe en materiales y métodos, posteriormente se procedió a medirle proteína por su absorbencia a 280 nm, asumiendo que una A_{280} de 1 era igual a una concentración de 1 mg/ml.

El material se liofilizó y se pesó el polvo, con estos datos se calculó el rendimiento expresado en μ g de proteína/triatoma. Los resultados de rendimiento obtenidos son el promedio de varios lotes recibidos a lo largo del proyecto. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

2.-Caracterización General de la saliva

En el laboratorio donde realicé este trabajo pensamos que en la saliva de estos insectos se pueden encontrar componentes con actividades biológicas muy interesantes desde el punto de vista de la Biotecnología, por lo tanto, basándome en los datos de rendimiento de cada especie (Tabla 2) y en el tamaño de población de los triatomas, se decidió hacer la caracterización bioquímica de la saliva de Triatoma pallidipennis en su fase adulta.

Actividades Enzimáticas

Se probaron las siguientes actividades enzimáticas: Actividad proteolítica inespecífica, actividad de fosfatasa alcalina, actividad fosfolipásica, actividad fibrinolítica, actividad fibrinogenolítica y actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria (actividad antiplaquetaria).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA 2.-Rendimiento de la saliva de diferentes especies de triatóminos mexicanos en dos diferentes estadios de su ciclo biológico.

ESPECIE	ETAPA	RENDIMIENTO ug saliva/triatoma
<u>Triatoma pallidipennis</u>	adulto	112 \pm 37 (27)
<u>Triatoma pallidipennis</u>	ninfa V estadio	25 \pm 4 (3)
<u>Triatoma longipennis</u>	adulto	85 \pm 26 (7)
<u>Triatoma longipennis</u>	ninfa V estadio	23 \pm 7 (3)
<u>Triatoma mazzotti</u>	adulto	89 \pm 14 (14)
<u>Triatoma mazzotti</u>	ninfa V estadio	22 \pm 5 (5)
<u>Triatoma picturata</u>	adulto	87 \pm 6 (3)
<u>Triatoma sp</u>	adulto	75 \pm 4 (3)

Los valores mostrados en la tabla son promedios \pm DS de un número variable de datos (n).
DS:Desviación estándar.

TABLA 3.-Actividades enzimáticas probadas en saliva de Triatoma pallidipennis.

ENZIMA	RESULTADOS
Actividad anticoagulante	positiva
Actividad fibrinogenolítica	negativa
Actividad fibrinolítica	negativa
Apirasa	positiva
Fosfolipásica	negativa
Fosfatasa	negativa
Proteasa inespecífica	negativa

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos. Como se observa las actividades que dieron resultados positivos fueron la actividad apirasa y la actividad antiplaquetaria.

Tiempo de coagulación

El tiempo de coagulación es el tiempo que necesita la sangre para coagular después de ser extraída del organismo. Se sabe que el tiempo de coagulación para individuos normales varía entre 6-10 minutos. Tiempos más largos indican que existe alguna anomalía que interfiere con el proceso de coagulación.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Saliva de <u>Triatoma pallidipennis</u>	40 min 10 s + 8 min 46 s
Control	6 min 23 s + 0 min 29 s

Los resultados son el valor promedio + desviación estándar de 3 determinaciones.

Análisis Electroforético de la Saliva de Triatomas.

Sabemos que en ocasiones los entomólogos se encuentran con problemas para clasificar algunas especies de triatomas, en estos casos los patrones electroforéticos pudieran ayudar a su clasificación sistemática.

Se hizo un corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida al 12.5% en presencia de SDS de saliva de diferentes especies de triatóminos adultos esto se puede observar en la Figura 8.

Además se hizo un gel de gradiente de 8-15 % en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol, con saliva de diferentes especies diferenciando entre macho, hembra y ninfa de V estadio. Este gel se muestra en la Figura 9.

Como se observa en el gel, cada especie presenta un patrón electroforético característico, con algo en común, que es el hecho de que existe un predominio importante de componentes proteínicos de bajo peso molecular (15 a 25 Kd).

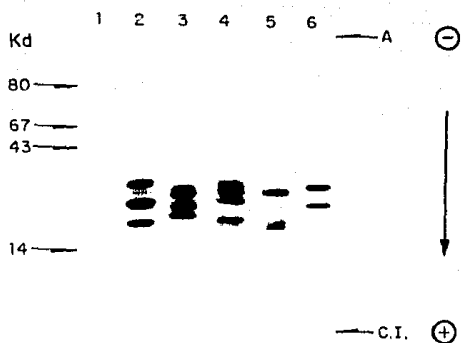


FIGURA 8.-PATRONES ELECTROFORETICOS COMPARATIVOS DE SALIVA DE TRIATOMA DE DIFERENTES ESPECIES.

1) marcadores de peso molecular

2) Triatoma pallidipennis

3) Triatoma mazzotti

4) Triatoma longipennis

5) Triatoma picturata

6) Triatoma sp

En todos los carriles se aplicó el equivalente a 5 ug de proteína.

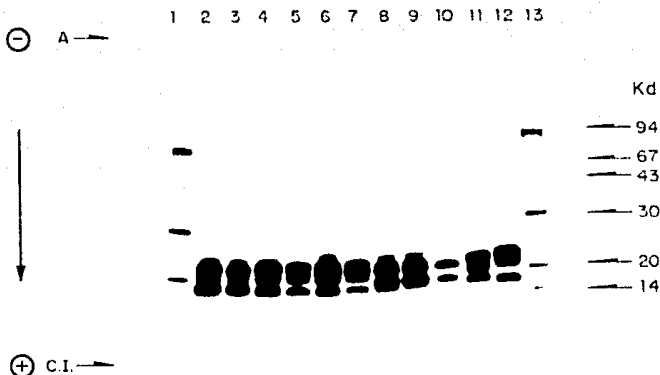


FIGURA 9.-PATRONES ELECTROFORETICOS COMPARATIVOS DE SALIVA DE TRIATOMA DE DIFERENTES ESPECIES Y SEXO.

La fotografía corresponde a un gel de poliacrilamida de gradiente (8-15%) en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol. El gel fue teñido con azul de coomassie y todos los carriles contienen 10 µg de proteína.

1) marcadores de peso molecular 2) Triatoma pallidipennis macho 3) Triatoma longipennis hembra 4) Triatoma longipennis ninfa 5) Triatoma pallidipennis macho 6) Triatoma pallidipennis hembra 7) Triatoma pallidipennis ninfa 8) Triatoma mazzotti macho 9) Triatoma mazzotti hembra 10) Triatoma mazzotti ninfa 11) Triatoma picturata 12) Triatoma sp 13) marcadores de peso molecular.

Enfoque Isoeléctrico

Por otra parte, la saliva de Triatoma pallidipennis, Triatoma mazzotti, Triatoma longipennis y Triatoma sp fueron analizadas en un sistema de enfoque isoelectrico, utilizando un gradiente de pH de 4-9.

Las preparaciones de saliva aplicadas en geles de enfoque isoelectrico presentan una mayor proporción de componentes con puntos isoelectricos ácidos, si bien existan algunos fuertemente básicos, como se puede ver en la Figura 10.

3.-Fraccionamiento Cromatográfico de la Saliva

En vista de los resultados obtenidos (Tabla 3) se realizó una cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex G-75 fino, con la finalidad de fraccionar los diferentes componentes de la saliva, y de esta manera separar (si fuera posible) las actividades correspondientes al componente con actividad apirasa y al componente con actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria (actividad antiplaquetaria). El perfil cromatográfico de la saliva se muestra en la Figura 11.

4.-Actividad antiplaquetaria o Actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria.

Se procedió a medir la actividad antiplaquetaria de saliva total de Triatoma pallidipennis, utilizando como inductor ADP. La Figura 12 muestra una gráfica de absorbencia a 600 nm contra tiempo (min), donde se puede observar la cinética de agregación plaquetaria. El control presenta una cinética de máxima agregación, en tanto que las muestras con diferentes cantidades de saliva no presentan agregación, es decir, la saliva inhibe la agregación plaquetaria en un 100% bajo las condiciones descritas y en todas las concentraciones de saliva utilizadas. Por otro lado, al preincubar el inductor de agregación, el ADP, con 100 ul de saliva (100 µg) el resultado fué idéntico, es decir, no hubo agregación plaquetaria (resultados no mostrados).

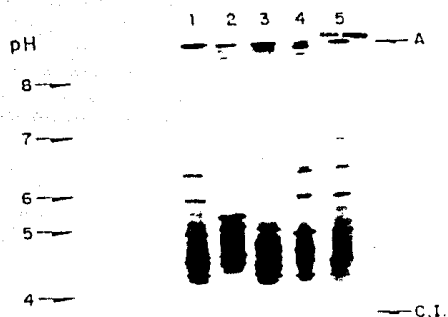


FIGURA 10 ENFOQUE ISOELECTRICO DE SALIVA DE DIFERENTES ESPECIES DE TRIATOMAS. Se utilizaron minigeles con un gradiente de pH de 4-9 y se tiñeron con plata. Se aplicaron 3 μ g de proteina por carril.

- 1) Triatoma pallidipennis
- 2) Triatoma mazzotti
- 3) Triatoma picturata
- 4) Triatoma sp
- 5) Triatoma longipennis

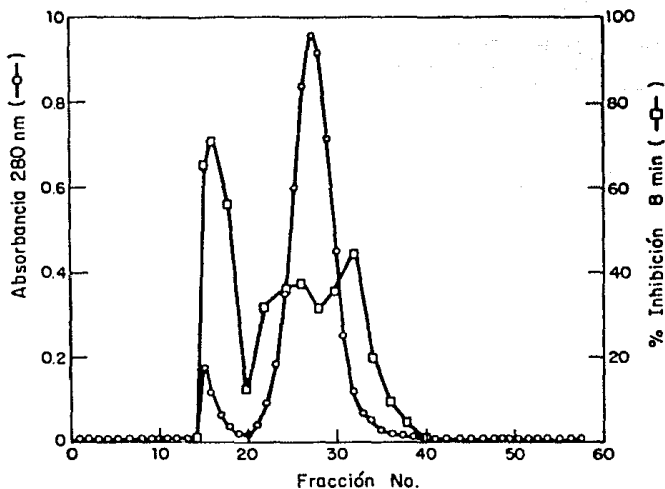


FIGURA 11.-CROMATOGRAFIA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR EN SEPHADEX G-75 FINO DE SALIVA DE *Triatoma pallidipennis*. Se aplicaron 7.5 mg de saliva en las condiciones mencionadas en materiales y métodos y se procedió a medir la absorbancia a 280 nm y el % de inhibición de agregación plaquetaria a 8 minutos de cada una de las fracciones.

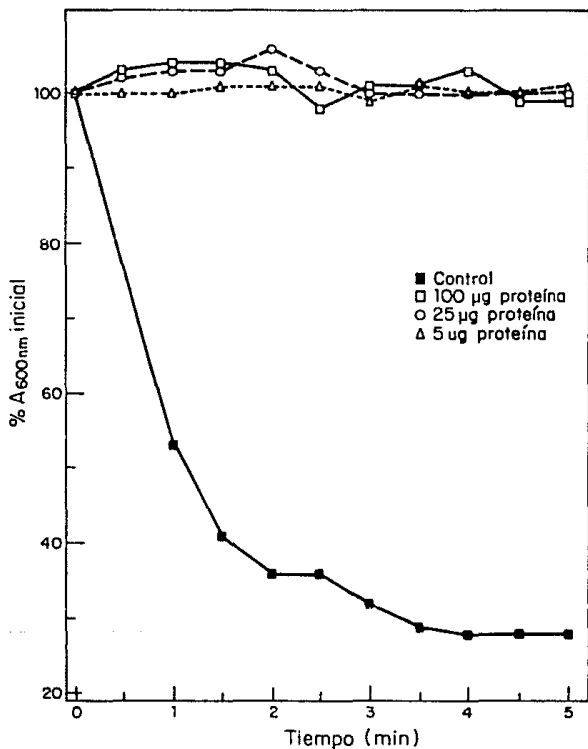


FIGURA 12.-CINETICA DE INHIBICION DE LA AGREGACION PLAQUETARIA CON SALIVA TOTAL DE Triatoma pallidipennis (1mg/ml).

Por otra parte, se midió el porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria a 8 min en las fracciones provenientes de una cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-75, esto se puede observar en la figura 11. Se ve que el máximo de inhibición de la agregación concuerda con el pico de proteína. Además, hay otras dos zonas que también inhiben la agregación. Para realizar estas pruebas se emplearon 5 µl de cada una de las fracciones.

En la Figura 13 se muestra el comportamiento de la fracción 19, en presencia de ADP como inductor. Esta fracción presentó una máxima inhibición de la agregación plaquetaria.

5.-Actividad Apirásica

La actividad apirásica se ha relacionado con un papel antihemostático, por esta razón se montó el ensayo para buscar una posible actividad apirásica en saliva de triatoma.

La actividad apirásica de saliva total de Triatoma pallidipennis se midió a intervalos de 10 min de incubación, desde un tiempo cero hasta 120 min. Esta cinética se ilustra en la Figura 14. Se observa que sigue un comportamiento lineal. Se calculó una actividad específica de 1064 nmoles de fosfato liberado/hora / mg de proteína.

Dado que las apirasas reportadas en otros sistemas biológicos caen dentro de dos grupos, las que dependen de Ca⁺⁺ para su actividad y las que no, (Ribeiro & García 1980, Ribeiro et al 1986), se realizó una prueba poniendo al medio de reacción EDTA como se detalla en materiales y métodos. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4 y muestran una inhibición máxima del 60 % en presencia del quelante, lo que sugiere la presencia de más de un componente enzimático en la saliva.

En las fracciones provenientes del Sephadex G-75 se probó actividad apirásica. El comportamiento de la actividad apirásica se muestra en la Figura 15 junto con el perfil cromatográfico. Puede observarse que la actividad apirásica parece estar compuesta de tres componentes. El primero, de mayor peso molecular, se encuentra localizado en la fracción Ia y parte

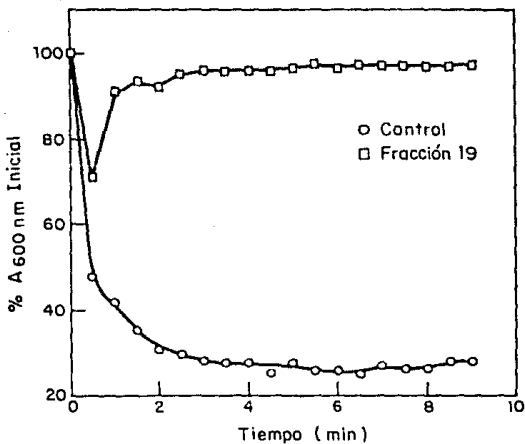


FIGURA 13.-CINETICA DE INHIBICION PLAQUETARIA DE LA FRACCION 19. La fracción 19 proveniente del Sephadex G-75 presentó el máximo porcentaje de inhibición a un tiempo de 8 minutos.

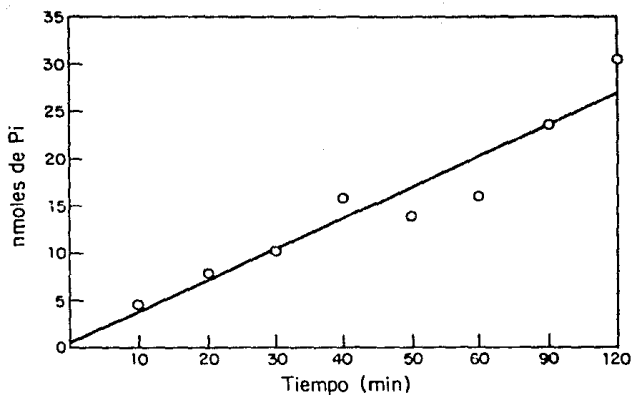


FIGURA 14.-CINETICA DE LA ACTIVIDAD APIRASA PRESENTE EN SALIVA DE Triatoma pallidipennis.

Se midió la actividad apirasa en saliva total a intervalos regulares de tiempo. Para esta determinación se utilizaron 15 ug de proteína por muestra. Se calculó una actividad específica de 1064 nmoles de fosfato liberado/hora/mg de proteína.

TABLA 4.-Dependencia de calcio de la apirasa presente en saliva total de Triatoma pallidipennis.

ENSAYO	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nmoles Pi/ h / mg proteína)
Sustrato/Ca++	1208 <u>±</u> 92
Sustrato/Ca++/EDTA 5 mM	486 <u>±</u> 31

Los valores son el promedio ± SD de tres experimentos independientes.

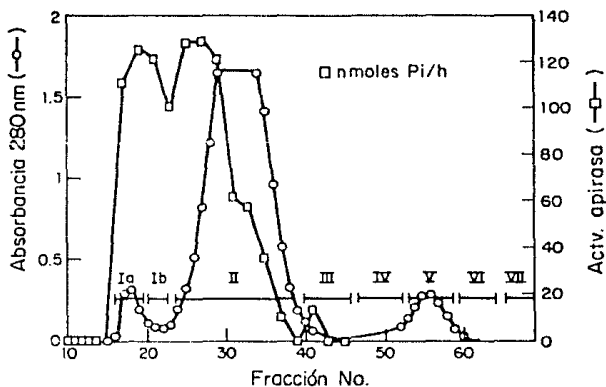


FIGURA 15.-FRACCIONAMIENTO CROMATOGRAFICO DE SALIVA DE *Triatoma pallidipennis*. 20 mg de saliva se solubilizaron en 0.6 ml de agua bidestilada, se aplicaron a una columna de Sephadex G-75 fino (0.4 x 76.5 cm), equilibrada con amortiguador de HEPES/TRIS 30 mM + 0.15M de NaCl pH 7.25. La columna se eluyó a temperatura ambiente a una velocidad de flujo de 9 ml/h. Se colectaron fracciones de 0.6 ml y se midió la absorbancia a 280 nm. En la misma gráfica se muestra la actividad apirasa de cada una de las fracciones expresada como nmoles de Pi/h.

de la Ib; el segundo abarca el final de la fracción Ib y la primera mitad de la fracción II; finalmente, el último componente, que aparece como un hombro del pico de actividad anterior, comprende el resto de la fracción II.

En la figura 16 se muestra un gel de poliacrilamida al 12.5%. En los carriles 2 y 3 las muestras fueron tratadas con SDS, en tanto que las muestras de los carriles 4 y 5 fueron tratadas con SDS y 2-mercaptoetanol. En el carril 2 se aplicó 5 μ g de proteína de saliva; en el carril 3 se aplicó 5 μ g de proteína de la fracción Ia, se observa que existe dos bandas de muy alto peso molecular que no entran al gel separador, se ve, además, otra banda muy intensa con un peso molecular aparente de 87 Kd. En el carril 4 se aplicó 5 μ g de la fracción Ia, en este carril se ve que en condiciones reductoras desaparece el doblete que no logró entrar al gel separador en ausencia de 2-mercaptoetanol, se conserva el componente de 87 KD y aparece un doblete de alrededor de 50 Kd. En el carril 5 se aplicó 5 μ g de saliva en presencia de 2-mercaptoetanol.

Se realizó un intento para fraccionar el corte Ia proveniente de la cromatografía de saliva en Sephadex G-75, a fin de conseguir la apirasa de esta fracción en forma homogénea. Para esto, el corte Ia se hizo pasar a través de una columna de intercambio iónico empleando DEAE-celulosa equilibrada con amortiguador de TRIS/HCl 20 mM pH 7.25. Se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0 - 0.2 M, al final se aplicó 1M de NaCl. Se obtuvieron 2 picos de proteína, uno al inicio del gradiente y el otro después de aplicar NaCl 1M. El cromatograma no se muestra, ya que la actividad enzimática se perdió por completo después de este fraccionamiento.

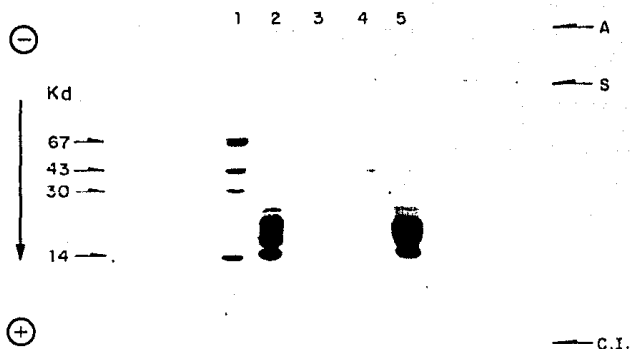


FIGURA 16.-ELECTROFORESIS DE LA APIRASA PRESENTE EN LA FRACCION Ia

- 1) marcadores de peso molecular
- 2) saliva total en presencia de SDS
- 3) fracción Ia en presencia de SDS
- 4) Fracción Ia en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol
- 5) saliva total en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol.

IV.-DISCUSION

Los triatomas, al igual que otros animales que se alimentan de sangre, enfrentan para alimentarse el gran problema de inactivar los mecanismos hemostáticos de sus víctimas. La hemostasis es un mecanismo de defensa muy complejo y eficiente, presente en todos los animales vertebrados, que tiene como función específica prevenir la pérdida excesiva de sangre si se lesiona el sistema vascular. En condiciones normales, una herida similar a la ocasionada por la proboscis de una chinche triatoma, dejaría de sangrar en menos de 15 segundos. Sin embargo, en el caso de Triatoma pallidipennis adulto es capaz, en 15 a 20 minutos, de ingerir de 1 a 2 ml de sangre, que equivale a dos o tres veces su peso corporal. Estas observaciones demuestran de manera empírica que estos insectos poseen la capacidad de inhibir la hemostasis del hospedero del que se alimentan.

De hecho, durante los últimos 10 años, el grupo de Ribeiro ha descrito una serie de actividades antihemostáticas en la saliva de otro triatomino, el Rhodnius prolixus (Ribeiro 1987). La conclusión más destacable de sus observaciones es la presencia de compuestos que actúan en varios niveles del sistema hemostático, desde la inhibición de la contracción de los vasos sanguíneos hasta la interferencia en las vías que llevan a la formación del coágulo de fibrina, sin dejar a un lado la interferencia en la agregación plaquetaria por más de un mecanismo.

Si se deja a un lado el interés meramente biológico que todos estos compuestos tienen, su estudio puede conducir al desarrollo de nuevos y mejores fármacos que puedan aplicarse en el tratamiento de padecimientos tromboembólicos. Basta, para ejemplificar esta aseveración, observar el caso de los activadores de plasminógeno que se encuentran en la saliva del vampiro Desmodus rotundus (Gardell et al 1989; Hawkey, 1967; Kratzchmar et al 1991), que están impactando fuertemente el desarrollo de la segunda generación de activadores de plasminógeno (tPAs) (Higgins & Bennett 1990). Es este el marco en que se encuadra el presente trabajo.

Dado que no existe información alguna respecto a la bioquímica o las actividades antihemostáticas de la saliva de ninguna especie del género Triatoma, el objetivo fundamental de esta tesis fue iniciar el estudio de algunas de las

características bioquímicas y actividades biológicas relevantes de la saliva de Triatoma pallidipennis. Este estudio se debe entender dentro de un contexto mucho más amplio de los intereses y objetivos de los grupos involucrados, los de los Drs. L.D. Possani y A. Alagón.

Así las cosas, el primer problema enfrentado para iniciar el presente trabajo, fue el desarrollo de un método eficaz y rápido, para la obtención del material biológico. Los triatomas tienen la particularidad de salivar, como mecanismo de defensa, ante amenazas externas como puede ser la manipulación de su cuerpo, en particular, su pronoto. Basados en esta observación, uno de mis tutores, el Dr. Possani, tuvo la idea de estimular mecánicamente a los insectos al tiempo que se recogía la saliva producida con un tubo capilar.

Existe una referencia (Ribeiro & García 1980) de otro procedimiento para obtener saliva de otro triatomino, el Rhodnius prolixus, que consiste en hacer picar a las chinches una bolsa de celofán con agua caliente (38°C); los insectos secretan saliva al no encontrar sangre. La saliva, entonces, se colecta en bolsa, de manera muy diluida, y de ahí se concentra para su recuperación. El procedimiento utilizado por nosotros resulta rápido y tiene la ventaja que la saliva no se diluye como con el procedimiento de Ribeiro, ya que se obtiene directamente dentro de capilares y su recuperación es con volúmenes pequeños de agua. Una ventaja adicional de nuestro procedimiento es que el fluido obtenido se encuentra a temperatura ambiente y que después de colectar la saliva de 12 especímenes, los capilares son congelados rápidamente. Esta nueva forma de proceder, minimiza la posibilidad de que algún componente de la saliva sufra alguna alteración.

La Tabla 2 muestra los rendimientos en peso de saliva obtenida de diferentes especies de triatomas. Se puede observar que la especie que da un rendimiento mayor es Triatoma pallidipennis, seguido de Triatoma mazzotti, Triatoma picturata, Triatoma longipennis y Triatoma sp. Este orden puede correlacionarse directamente con el tamaño del insecto, ya que Triatoma pallidipennis tiene un tamaño mayor que las otras especies, y el resto sigue aproximadamente el orden indicado. Con respecto al estado de vida, la forma adulta es la que da un mayor rendimiento, y se puede pensar en la misma razón, ya que las ninfas tienen un tamaño menor que la forma adulta. Además en

la fase ninfal, es difícil distinguir entre sí a las especies estudiadas, y para no mezclar saliva de dos especies, preferimos trabajar con la fase adulta. De estos resultados se partió para decidir la especie de triatoma para trabajar con mayor profundidad a lo largo del proyecto y se eligió a Triatoma pallidipennis en su fase adulta. Además de que es una especie muy prolífica y fácilmente adaptable a su cultivo en el laboratorio.

A fin de tener una impresión tanto de la complejidad como de las diferencias de las salivas de triatomas de diferentes especies y estadios de desarrollo, se realizó un análisis electroforético en gels de poliacrilamida en presencia de SDS (Figs. 8 y 9) y otro mediante isoelectroenfoque (Fig. 10). Cabe resaltar varias cosas: 1) Las salivas son mezclas complejas de proteínas; por isoelectroenfoque puede apreciarse mejor esta situación. 2) Los componentes proteínicos más abundantes tienen pesos moleculares entre 15 y 25 Kd. 3) Los puntos isoelectrónicos del grueso de las proteínas caen dentro del intervalo que va de pH 4.2 a pH 6.4, si bien existen algunos componentes fuertemente básicos. 4) Las especies de triatomas tienen patrones proteínicos identificables como propios. 5) En términos generales, las diferencias de los patrones electroforéticos por sexo y por estadio de desarrollo dentro de una misma especie, son más de carácter cuantitativo que cualitativo.

Ya con Triatoma pallidipennis, quisimos ver el efecto grueso que su saliva tenía sobre la coagulación de la sangre; para este fin empleamos una prueba que mide el tiempo en que la sangre coagula en un tubo de ensayo. Se observó que la saliva retardaba considerablemente el tiempo de coagulación de la sangre. Este resultado mostró que la saliva de Triatoma pallidipennis tiene acción antihemostática poderosa. Para la caracterización de la(s) molécula(s) que ejercen esta acción, comenzamos por determinar una serie de actividades enzimáticas, que directa o indirectamente, pudieran estar relacionadas con la actividad antihemostática (Tabla 3).

Primeramente se midieron la actividad fosfolipásica y actividad proteolítica inespecífica, las cuáles dieron resultados negativos.

Estos tipos de actividades enzimáticas, son prevalentes en los venenos de especies animales, que son también

salivas especializadas, si bien, con otros propósitos (Tu et al 1967, Tu, 1977, Alagón et al 1982). De hecho, en particular con las proteasas inespecíficas, es posible vislumbrar mecanismos hemorrágicos. Este resultado negativo fue indicativo de que las propiedades antihemostáticas de la saliva estudiada son más selectivas.

También medimos actividades proteolíticas específicas que en otros modelos interfieren con la formación del coágulo de fibrina o, bien, proceden a su degradación en caso de que se forme. La saliva de Triatoma pallidipennis no tuvo actividad degradatoria de fibrinógeno, que es una actividad muy prevalente en los venenos de serpientes de la familia de los crotálicos (Rosenfeld, 1964). Esta actividad degrada al precursor inmediato de la fibrina, disminuyendo o aboliendo la capacidad de formar coágulos. La actividad fibrinolítica, que también fué negativa, puede ser ocasionada por dos mecanismos: el directo involucra la destrucción de la fibrina por actividades enzimáticas del tipo de la plasmina y se ha demostrado en venenos de serpientes (Mackay et al 1970); el segundo activa al precursor de plasmina, el plasminógeno, con lo que se logra un sistema de amplificación mucho más eficiente para la degradación de los coágulos. El mecanismo indirecto opera en la saliva del vampiro (Hawkey 1967). Hay que destacar la ausencia de activador de plasminógeno en la saliva de Triatoma pallidipennis ya que se trataría de una actividad con un potencial de uso en la clínica muy alto.

Otra actividad enzimática que exploramos y que también resultó negativa fue la de fosfatasa. Medimos esta actividad con el propósito de identificar actividades que pudieran degradar ADP, que es un fuerte inductor de la actividad plaquetaria. De hecho otra actividad fosfatásica, específica solamente para ADP y ATP, resultó positiva y fué una de las actividades que exploramos con mayor detalle en esta tesis (ver más adelante).

En este punto vale la pena hacer una recapitulación de los distintos niveles en que puede interferir con el mecanismo normal hemostático.

En condiciones fisiológicas cuando un vaso sanguíneo es seccionado o dañado, se inicia una serie de eventos que llevan a la formación de un coágulo (hemostásis) y conduce al "sellado" del vaso sanguíneo. Esto es resultado de tres mecanismos diferentes, que actúan conjuntamente: a) la vasoconstricción local, b) la formación de un tapón de plaquetas, c) la activación

de factores presentes en el plasma sanguíneo que dan lugar a la formación de una malla de fibrina insoluble y d) el proceso es revertido a través de la degradación del coágulo de fibrina.

Existen trabajos de Ribeiro y Garcia (1981c, 1982) que demuestran que en saliva de Rhodnius prolixus existen substancias que interfieren con el mecanismo (a) de vasoconstricción, ya que encontraron un factor con actividad antitromboxano A₂ (Ribeiro 1982) y otro factor antiserotonina (Ribeiro 1981c), se sabe que el tromboxano A₂ y la serotonina son potentes vasoconstrictores. En este trabajo no se exploró si en la saliva de Triatoma pallidipennis existen o no factores con efectos inhibidores de vasoconstricción o directamente vasodilatadores.

La interferencia con el mecanismo (b) está presente en la saliva de Triatoma pallidipennis, como lo veremos adelante.

El mecanismo (c) presenta múltiples puntos en los que se puede ejercer una acción inhibitoria. Baste sólo mencionar que la saliva de Rhodnius prolixus también actúa a este nivel (Hellman & Hawkins 1964), así que es muy probable que la saliva de triatomas también interfiera con este mecanismo.

En cuanto a una acción en el nivel (d), es decir, en el proceso degradatorio del coágulo, como se mencionó y discutió anteriormente, la saliva de Triatoma pallidipennis no tuvo efecto alguno.

Así las cosas, el resto de la presente discusión se centra en el mecanismo (b) y en particular la acción de la apirasa salival.

Para explorar el mecanismo (b), de formación del tapón plaquetario, se montó una técnica para medir la agregación plaquetaria, tomando como referencia el método de Born & Cross (1963). Como en nuestro laboratorio no contamos con un agregómetro comercial, tuvimos que hacer adaptaciones a la técnica de Born, estandarizando nuestro propio método, el cuál se detalla en la sección correspondiente.

Existe una gran variedad de substancias que inducen la agregación plaquetaria, entre las cuáles se encuentran ADP (Born & Cross 1963), epinefrina, serotonina, enzimas

proteolíticas (trombina, tripsina, papaina, algunas enzimas proteolíticas de venenos de serpientes), colágena, algunos antibióticos (ritostatina) y algunos ácidos grasos como el araquidónico (Douglas et al 1978)

Se sabe que el ADP in vitro y también en condiciones fisiológicas (Gaardner et al 1961, Born & Cross 1963, Honour & Mitchell 1963, Davey & Lander 1964) es el principal nucleótido que causa la agregación plaquetaria, por lo cual se montó la técnica de agregación plaquetaria utilizando como inductor ADP.

En primer lugar se probaron 2 concentraciones de ADP: 12.5 y 6.25 μM . Bajo las dos condiciones se obtuvieron respuestas secundarias de la agregación plaquetaria (datos no mostrados), Esto concuerda con lo reportado en la bibliografía donde indican que concentraciones de ADP arriba de 1 μM inducen la reacción de liberación y como consecuencia se produce la fase de agregación secundaria, la cual es irreversible (Mustard 1970, Holmsen 1972).

Con el anterior resultado se decidió trabajar todos los demás experimentos de agregación plaquetaria utilizando ADP a una concentración de 6.25 μM , que es, de hecho, una concentración frecuentemente utilizada por otros autores para la inducción de la agregación plaquetaria de mamíferos.

Se hizo una serie de experimentos de agregación plaquetaria utilizando diferentes cantidades de saliva de Triatoma pallidipennis (100, 25, 5 μl) en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. En las tres condiciones se inhibe la respuesta de agregación plaquetaria en un 100 %. Estos resultados están graficados en la Figura 12. Aún queda por hacer un experimento dosis-respuesta, para encontrar cuál es la cantidad mínima de saliva que produce una respuesta inhibitoria de la agregación plaquetaria. Sin embargo, el hecho de que aún 5 μg de saliva de Triatoma pallidipennis haya inhibido totalmente la agregación plaquetaria, indica que su potencia es muy alta. Para ilustrar esta aseveración basta decir que para lograr un efecto equivalente con la saliva del vampiro, es necesario añadir 800 o más μg de saliva (Astorga, E. 1991).

Los experimentos descritos en el párrafo anterior se realizaron de manera usual, es decir, el ADP se añadió de forma inmediata a la mezcla saliva/amortiguador/PRP.

Otro resultado, que no se muestra, es que la mezcla saliva/amortiguador/PRP fué preincubada durante 10 min a 37°C previamente a la adición del inductor dieron resultados semejantes; es decir, que a las dosis de saliva empleadas no hubo diferencias en la respuesta inhibitoria con o sin preincubación del PRP con la saliva, probablemente, debido a que se estaban empleando dosis muy altas.

En paralelo, con la hipótesis de que la saliva ejerciera la inhibición degradando el ADP (actividad de apirasa) se hizo otro experimento en el que el inductor fue preincubado 10 min a 37°C con 100 µg de saliva. El resultado experimental, que era el esperado, fué la abolición de la agregación plaquetaria. Si juntamos este resultado con los descritos en el párrafo previo, hasta lo que se sabía en este momento del desarrollo de este trabajo, es posible plantear dos hipótesis: 1) La saliva tiene una actividad apirásica muy potente capaz de degradar al ADP en forma casi instantánea o, 2) La saliva además de tener actividad apirásica contiene otra(s) substancia(s) que inhiben la agregación de forma rápida y actuando en otro nivel. Como se describió en los resultados sabemos que la saliva tiene apirasa y por otros experimentos que no forman parte de esta tesis, se sabe que existen otros dos factores que actúan a este nivel, por lo cual, ahora se sabe que la segunda hipótesis es la correcta.

Al medir directamente actividad de apirasa en saliva de Triatoma pallidipennis se encontró una actividad específica de 1064 nmoles de ADP hidrolizados por mg de saliva, en el lapso de una hora. Esta actividad específica resulta bastante significativa si la comparamos con la actividad de un preparado semipurificado de apirasa de papa que fue de 200 nmoles/h/mg (Astorga, E.1991).

Por esta razón, nos abocamos a fraccionar y caracterizar mejor la actividad apirásica en la saliva de Triatoma pallidipennis.

Se fraccionó la saliva de Triatoma pallidipennis en una columna de Sephadex G-75 fino (Fig. 11) y se probó la inhibición plaquetaria a 8 min en cada una de las fracciones colectadas. Se observa la presencia de un pico máximo de actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria que coincide con el pico de proteínas de alto peso molecular y también existen otros dos picos de actividad inhibitoria en la zona del pico

principal de proteínas que eluye después. La fracción 19 proveniente de la cromatografía de exclusión molecular es la que presentó el máximo efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria.

En la Fig. 13 se muestra la cinética de agregación plaquetaria en presencia de 5 μ l del tubo 19; se ve que se produce la respuesta primaria de la agregación, pero no ocurre la segunda fase, revirtiéndose la agregación inicial. La interpretación a este resultado, es congruente con la presencia de apirasa que, al consumir el ADP, disminuye su concentración por debajo de 1μ M (Mustard et al 1970, Holmsen 1972) situación en la que no puede ocurrir la reacción de liberación plaquetaria que hace a la agregación irreversible.

Al medir la actividad apirásica en las fracciones provenientes de otra cromatografía de saliva de Triatoma pallidipennis desarrolladas bajo las mismas condiciones (Fig. 15) se observaron nuevamente tres picos (dos claros y un hombro) con actividad apirásica. El primero coincide con la fracción de mayor peso molecular y con el primer pico con actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria. Los otros dos en términos generales, siguen el patrón de los otros dos picos con actividad antiplaquetaria.

Dado que mediante el uso de EDTA se pudieron distinguir dos tipos de actividades de apirasa (una dependiente de calcio y otra independiente, Tabla 4) es posible que las apirasas separadas por filtración en gel correspondan a dichos tipos. Falta por realizar experimentos de inhibición con quelantes de las mismas para poder afirmarlo. Vale la pena resaltar que la actividad apirásica descrita para otro triatómino (Rhodnius prolixus) es totalmente dependiente de calcio (Ribeiro 1986).

Para los siguientes experimentos se decidió continuar con la fracción Ia de la Fig. 15 dado que era la fracción con mayor actividad específica (11,400 nmoles Pi liberados/h/mg).

El análisis electroforético en geles de poliacrilamida/SDS de la fracción Ia aparece en la Fig. 17. En condiciones no reductoras dos bandas de muy alto peso molecular que ni siquiera entran al gel separador y otra banda con un peso

molecular aparente de 87 Kd; en tanto que en presencia de 2-mercaptoetanol, apareció un doblete de alrededor de 50 Kd y desaparecieron las dos bandas de altísimo peso molecular en tanto que la banda de 87 Kd permaneció. Si bien ésta última esta formada por dos bandas de peso molecular similares.

Los intentos para detectar "in situ" la actividad apirasa fueron infructuosos, dado que la actividad no pudo ser restablecida substituyendo el SDS por Tritón X-100 (resultados no mostrados).

El intento de separar las proteínas de la fracción Ia por intercambio catiónico en resina CM-32 dieron por resultado la pérdida total de la actividad enzimática. Es importante mencionar que los experimentos de fraccionamiento se hicieron en varias ocasiones con los resultados descritos.

V.-CONCLUSIONES

Las conclusiones mas destacables del presente trabajo son:

1.-Se desarrolló un nuevo método para la obtención de saliva de triatomas, bajo condiciones fisiológicas.

2.-Por primera vez se reporta el rendimiento de saliva que proporcionan algunas especies de triatomas, cultivadas bajo condiciones de laboratorio, la especie que dió un mayor rendimiento fue Triatoma pallidipennis, por lo cual se decidió trabajar con esta especie a lo largo del proyecto.

3.-Mediante un análisis electroforético se demostró que la saliva de triatomas es una mezcla compleja de proteínas, en la cual predominan los componentes de bajo peso molecular (15-25 Kd) y componentes con puntos isoelectricos ácidos (pH 4.2 a pH 6.4), aunque existen algunos fuertemente básicos.

4.-Las diferentes especies de triatomas tienen patrones proteínicos identificables como propios.

5.-La saliva de Triatoma pallidipennis no contiene actividades fosfolipásica, fosfatásica, fibrinolítica, fibrinogenolítica y proteolítica inespecífica.

6.-La saliva de Triatoma pallidipennis retarda en forma considerable el tiempo de coagulación de la sangre, lo que sugiere la presencia de cierta(s) substancia(s) que eventualmente tuviera(n) utilidad terapéutica.

7.-Se encontró la presencia de una enzima con actividad apirásica muy alta.

8.-La saliva tiene una fuerte acción inhibitoria de la agregación plaquetaria, debida, en parte, a la presencia de la apirasa presente.

9.-Con esta tesis se contribuyó al conocimiento de la bioquímica básica de la saliva de los triatomos, además, se abrieron varios caminos para el estudio y caracterización futura de substancias poco convencionales que pueden resultar de utilidad terapéutica en varios padecimientos relacionados con la homeostásis.

VI.-BIBLIOGRAFIA

Alagón, A.C., Maldonado, E.A., Julia, J.Z. Sanchez, C.R. and Possani, L.D. 1982. Venom from two sub-species of Heloderma horridum horridum (Mexican beaded lizard): General characterization and purification of N-benzoyl-L-Arginine Ethyl ester hydrolase. *Toxicon*. 20: 463-475

Astorga, E. 1991. Actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria por la saliva del murcielago hematofago. Tesis de Maestría. 1-62.

Behnke, O. 1970. The morphology of the blood platelet systems. *Ser. Haematol.* 3: 3-6

Born, G.V.R. & Cross, M.J. 1963. Effect of adenosine diphosphate on the concentration of platelets in circulating blood. *Nature, Lond.* 197: 974-976

Born, G.V.R., & Cross, M.J. 1963. The aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* 168: 178-195

Born, G.V.R., et al. 1972. Reversal of the rapid morphology reaction of platelets. *J. Physiol.* 225: 27-29

Davey, M.G., Lander, H. 1964. Effect of adenosine diphosphate on circulating platelets in man. *Nature, Lond.* 201: 1037-1039

Day, H.J., Holmsen, H. 1971. Concepts of the blood platelet release reaction. *Ser. Haematol.* 4: 3-6

Douglas, A.T., Harms, C.S., Newhouse, P., Clark, C. 1978. Platelet function laboratory evaluation and clinical application. American Society of Clinical Pathologists Inc. 16-18.

Gardell, S.J., Duong, L.T., Diehl, R.E., York, J.D., Hare, T.R., Register, R.B., Jacobs, J.W., Dixon, R.A. and Friedman, P.A. 1989. Isolation, characterization and cDNA cloning of a vampire bat salivary plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 264: 17947-17952.

Gardner, A., Jansen, J., Laland, S., Hellem, A. and Owren, P.A. 1961. Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets. *Nature, Lond.* 192: 531-532

Hawkey, C. 1967. Inhibitor of platelets aggregation present in saliva of vampire bat Desmodus rotundus. J. Brit. Haematol. 13: 104-1020

Haberman, E. and Hardt, K.L. 1972. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. Anal. Biochem. 50: 163-173

Hamlyn, J.M. and Senior, A.E. 1983. Evidence that Mg^{2+} or Ca^{2+} activated adenosine triphosphatase in rat pancreas is a plasma membrane ecto enzyme. J. Biochem. 214: 59-68

Hellmann, K., Hawkins, I.R. 1965. Prolixin-S and Prolixin-G; two anticoagulants from Rhodnius prolixus stal. Nature, Lond. 207: 265-267

Higgins, D.L. and Bennett, W.F. 1990. Tissue plasminogen activator: the biochemistry and pharmacology of variants produced by mutagenesis. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30: 91-121.

Holmsen, H., et al 1975. Content and thrombin-induced release of acid hydrolases in gel filtered platelets from patients with storage pool disease. Blood. 46: 131-135

Holmsen, H. 1972. The platelet: its membrane, physiology and biochemistry. Clin. Haematol. 1: 235-266

Holmsen, H., Day, H.J., Storm, E. 1969. Adenine nucleotide metabolism of blood platelets: VI subcellular localization of nucleotide pools with different functions in the platelet release reaction. Biochim Biophys Acta 186: 254

Honour, A.J. and Mitchell, J.R.A. 1963. Platelet clumping in vivo. Nature, Lond. 197: 1019

Kratzchmar, J., Haendler, B., Langer, G., Boidol, W., Bringmann, P., Alagon, A., Donner, P. and Schleuning, W.D. 1991. The plasminogen activator family from the salivary gland of the vampire bat Desmodus rotundus: cloning and expression. Gene. 105: 229-237

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage "T4". Nature, Lond. 227: 680-685

LeBel, D., Poirier, G.G., Phaneuf, S., St. Jean, P., Laliberte, J.P. and Beaudoin, A.R. 1980. Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP diphosphohidrolase from pig pancreas. *J. Biol. Chem.* 255: 1227-1233

Mackay, N., Ferguson, J.C. and McNicol, G.P. 1970. Effects of the venom of the rhinoceros harned viper (Bitis nasicornis) on blood coagulation, platelet aggregation and fibrinolysis. *J. Clin. Pathol.* 23: 789-794

Mant, M.J. and Parker, K.R. 1981. Two platelet aggregation inhibitors in Tsetse (Glossina) saliva with studies of roles of thrombin and citrate in in vitro platelet aggregation. *J. Brit. Haematol.* 48: 601-608

Meyerhof, O. 1945. The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. *J. Biol. Chem.* 157: 105-119

Molnar, J. and Lorand, L. 1961. Studies on apyrases. *Archives of Biochemistry and Biophyscis* 93: 353-363

Mustard, J.F., Packham, M.A. 1970. Factors influencing platelet function: adhesion, release and aggregation. *Pharmacol. Rev.* 22: 97-187

Nurden, A.T., Caen, J.P. 1974. An abnormal glycoprotein in three cases of Glanzmann's thrombasthenia. *J. Brit. Haematol.* 28: 253-257

Reich, E. 1978. Activation of plasminogen: A general mechanism for producing localized extracelular proteolysis. Rockefeller University, Internal Communication.

Ribeiro, J.M.C. 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Ann. Rev. Entomol.* 32: 463-478

Ribeiro, J.M.C. 1982. The antiserotin and antihistamine activities of salivary of Rhodnius prolixus. *J. Insect Physiol.* 28: 69-75

Ribeiro, J.M.C. and Garcia, E.S. 1980. The salivary and crop apyrase activity of Rhodnius prolixus. *J. Insect. Physiol.* 26: 303-307

Ribeiro, J.M.C. and Garcia, E.S. 1981a. Platelet antiaggregation in the salivary secretion of the blood sucking bug Rhodnius prolixus. *Experientia* 37:384-386

Ribeiro, J.M.C. and Garcia, E.S. 1981b. The role of the salivary glands in feeding in Rhodnius prolixus J. Exp. Biol. 94: 219-230

Ribeiro, J.M.C., Guimaraes, J.A. and Sarkis, J.F. 1986. Salivary apyrase of Rhodnius prolixus J. Biochem. 233: 885-889

Ribeiro, J.M.C., Makoul, G.T., Levine, J. Robinsen, D.R. and Spielman, A. 1985a. Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick Ixodes dammini. J. Exp. Med. 161: 332-344

Ribeiro, J.M.C., Rossignol, F.A. and Spielman, A. 1984a. Role of mosquito saliva in blood vessel location. J. Exp. Biol. 108: 1-7

Ribeiro, J.M.C., Sarkis, J.J.F. 1982. Anti-thromboxane activity in Rhodnius prolixus salivary secretion. J. Insect Physiol. 28: 655-660.

Rinderknecht, H., Geokas, M.C., Silveram, P. and Haverback, B.J. 1968. A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. Clin. Chim. Acta. 21: 197-203

Rosenberg, M.C. and Holmsen, H. 1968. Adenosine nucleotide metabolism of blood platelets. Biochim. Biophys. acta. 157: 280-288

Rosenfeld, G. 1964. Fibrinolysis by snake venoms. Blood. 9: 352-356

Russell, J.N.L. and Nicholson, J.W. 1984. Measurement of phosphate concentration in the presence of very labile phosphate esters. Anal. Biochem. 140: 424-426

Smith, J.J.B. Cornish, R.A. and Wilkes, J. 1980. Properties of a calcium-dependent apyrase in the saliva of the blood-feeding bug Rhodnius prolixus. Experientia. 36: 898-900

Swank, R.T. and Munkres, K.D. 1971. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrilamide gel with sodium dodecylsulfate. Anal. Biochem. 39: 462-477

Tu, A.T. 1977. Venoms. Chemistry and molecular biology. New York. John Wiley.

Tu, A.T. and Murdock, D.S. 1967. Protein nature and some enzymatic properties of the lizard Heloderma suspectum suspectum (Gila Monster). *Venom. Comp. Biochem. Physiol.* 22: 389-392.

Vargaftig, B.B., Chignard, M. and benveniste, J. 1981. Present concepts on the mechanisms of platelet aggregation. *Biochem. Pharmacol.* 30: 263-271

Weber, K. and Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecylsulfate polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412