

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL TRACTO
DIGESTIVO DE *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae).**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA

MARÍA DEL SOCORRO CHARCAS LÓPEZ

TUTOR

DR. FIDEL DE LA CRUZ HERNANDEZ HERNANDEZ
Profesor Investigador del Departamento de Patología Experimental
Del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional
(CINVESTAV-IPN)

México, D. F. Enero 2002.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



U.N.A.M. CAMPUS

Dedicatoria

IZT.

Dedico esta tesis con cariño, admiración y respeto a la imborrable memoria de
mi madre

Juana López Martínez (†)

Este trabajo también forma parte de toda mi familia que de una u otra manera siempre me han motivado a continuar hasta el final, gracias Papi por todo, Juanito bien sabes que sin ti no habría llegado hasta aquí, Chuy, Carmen, Jesús, Arcadio, Libra, Mago, José, Raúl, Maty, Jorge, Rosi, Mary y Ruth, ustedes saben cuanto les agradezco la confianza y el apoyo que desinteresadamente me brindaron, gracias por todo.

De la misma forma también deseo expresar mi agradecimiento a todos y cada uno de mis sobrinos, con quienes he convivido en diferentes etapas de mi vida, bien saben cuanto les quiero y agradezco que siempre hayan estado ahí dando lata.

Sra. Alicia Reyes permítame expresarle cuanto le aprecio y estimo por su enorme calidad humana y sencillez, gracias por ser mi amiga y por darme la oportunidad de convivir un poco más con su familia.

A cada uno de mis compañeros del laboratorio 12 de Entomología Molecular que me han ayudado a incrementar mi conocimiento y a despejar casi todas mis dudas, muchas gracias a todos: Tere, Jorge, Lety, Sr. Juan, Ciro, Hortensia, Febe, Fernando, Rebeca, Karina, Octavio y muy en especial al Dr. Fidel de la Cruz Hernández H.

También deseo agradecer a los compañeros del laboratorio de Patología 2 por brindarme su amistad y apoyarme en todo favor que les pedí, mil gracias a Guille, Lalo, Chio, Alfredo, Maty, Lupiux, Cecy, Cesar, Laurence, Dulce, Ramón, Karina, Adriana, Lalo 2, Esther H., Juan Pedro L., Mario R., Tomás, Claudia, Máximo, Xóchitl, Sra. Ale, Alberto y a la Dra. Esther Orozco.

También deseo ratificar mi agradecimiento a Maritza, Juan, Juanita, Normita, Gabriela T., Yazy, Norma, Miriam, Pablo, Ariadna, Tere, Rocío.

A todos los compañeros inflásticos de Iztacala que saben que esto también es parte de ustedes: Pancho, Saúl, Gerardo, Liliana, Luis, Federico, Arturo, Gonzalo, Karla, Everlyn, Horacio, Jorge y a todos aquellos que no menciono pero saben quienes son y de igual manera les agradezco.

Y gracias a ti Israel, por fastidiarme todos los días con lo de la tesis, sin eso se me habría olvidado, tu sabes cuanto te lo agradezco, gracias por ser siempre antes que nada mi amigo

por ti nena, gracias por motivarme a continuar adelante...

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 12 de Entomología Molecular del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la tutoría del Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández y bajo la asesoría de la Biol. Ana Lilia Muñoz Viveros, Dr. Sergio González Moreno, Dr. Ignacio Peñalosa Castro y del Biol. Hugo Perales Vela.

INDICE

Indice	1
Lista de cuadros	4
Lista de figuras	4
Lista de tablas	4
Resumen	5
I INTRODUCCIÓN	6
1.1. Antecedentes generales	7
1.2. Antecedentes específicos	9
1.3. Hábitat de triatominos	10
1.4. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
1.5. Patología de la enfermedad de Chagas	14
1.6. Ciclo de vida de <i>Rhodnius prolixus</i>	15
1.7. Descripción del aparato picador	17
1.8. Estructura y fisiología del aparato digestivo del vector	17
1.9. Enzimas del insecto	20
1.10. Enzimas proteolíticas	21
• Serina proteasas	22
• Metallo proteasas	22
• Cisteína proteasas	23
• Asparto proteasas	24
1.11. Justificación	25

II. OBJETIVOS

- 2.1. Objetivo general 26
- 2.2. Objetivos particulares 26

III MATERIAL

- 3.1. Material biológico 27
- 3.2. Reactivos químicos 27

IV. METODOLOGÍA

- 4.1. Obtención de extractos 28
- 4.2. Caracterización de la actividad enzimática 29
 - A) Cuantificación de proteínas 29
 - B) Obtención y análisis de proteínas totales 30
 - C) Electroforesis en geles de poliacrilamida copolimerizados con diferentes sustratos 32
 - D) Ensayos de proteasas por digestión de bandas 33
 - E) Ensayos espectrofotométricos de la actividad proteolítica del Tracto digestivo de *R. prolixus* 36
 - F) Cálculos estadísticos 37

V. RESULTADOS

- 5.1 Proteínas totales 38
- 5.2. Detección de la actividad proteolítica en el tracto digestivo 42
- 5.3. Identificación de las proteasas del tracto digestivo 43
- 5.4. Ensayos espectrofotométricos de la actividad proteolítica del tracto digestivo de *R. prolixus* 45

VI. DISCUSIÓN	
6.1. Caracterización de las proteínas totales	53
6.2. Caracterización de las proteasas del tracto digestivo de <i>R. prolixus</i>	54
6.3. Tipos de proteasas presentes en el tracto digestivo	56
6.4. Ensayos espectrofotométricos de la actividad proteolítica del tracto digestivo de <i>R. prolixus</i>	57
VII. CONCLUSIONES	61
VIII. BIBLIOGRAFIA	63
IX. APENDICE. La Caseína de <i>Bos taurus</i>	71
X. ANEXO. Preparación de soluciones	80

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Seroprevalencia mundial de las enfermedades parasitarias	7
Cuadro 2. Estudios epidemiológicos en México	9
Cuadro 3. Proteínas totales del buche de <i>R. prolixus</i>	40
Cuadro 4. Proteínas totales del intestino de <i>R. prolixus</i>	41
Cuadro 5. Actividad espectrofotométrica bajo el inhibidor E64	47
Cuadro 6. Actividad espectrofotométrica bajo el inhibidor Pepstatina	48
Cuadro 7. Actividad espectrofotométrica bajo el inhibidor TLCK	49
Cuadro 8. Actividad espectrofotométrica bajo el inhibidor TPCK	50

Lista de figuras

Figura 1. Distribución geográfica de <i>R. prolixus</i>	8
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma. cruzi</i>	13
Figura 3. Ciclo de vida de <i>R. prolixus</i>	16
Figura 4. Tracto digestivo de <i>R. prolixus</i>	20
Figura 5. Proteínas totales y contenido estomacal en el tracto digestivo	39
Figura 6. Geles copolimerizados con hemoglobina y caseína	43
Figura 7. Efecto de los inhibidores de cisteína, serina y asparto proteasas	45

Lista de tablas

Tabla 1. Familias de enzimas proteolíticas	24
Tabla 2. Inhibidores de proteasas	35
Tabla 3. Características de la caseína de <i>Bos taurus</i>	72

RESUMEN

La actividad proteolítica del tracto digestivo de *R. prolixus* fue visualizada mediante diferentes técnicas, las cuales nos permitieron conocer el comportamiento de la actividad enzimática de las proteasas de este insecto. Cuando los extractos del tracto digestivo fueron sometidos a los detergentes iónicos NP40 y DOC a una concentración de 1 % y se analizaron por electroforesis en geles con sustrato, se apreció una banda con un peso molecular aparente de 60 kDa sobre el sustrato de hemoglobina para los extractos del buche, y al probar en el sustrato de caseína se apreció una banda con un peso molecular aparente de 90 kDa para los extractos del intestino. Al probar con la técnica de digestión de caseína en solución y analizarla posteriormente por electroforesis en los extractos del buche, observamos la desaparición de las bandas correspondientes a la α y β caseína. El inhibidor de cisteína proteasas E64 inhibió la banda α , indicando la presencia de una catepsina tipo B o L (una cisteína proteasa). Los extractos del intestino digirieron la pepstatina un potente inhibidor de asparto proteasas, en los extractos del intestino evitó la digestión tanto de la banda α como de la β indicando la existencia de una catepsina tipo D (una asparto proteasa). Por otra parte, en ensayos espectrofotométricos sobre la actividad proteolítica en el buche, a tiempos tempranos detectamos enzimas sensibles a los inhibidores de serina - cisteína proteasas (E64, TLCK y TPCK). La actividad disminuyó al transcurrir los 9 días de postalimentación. Estos datos sugieren la presencia de enzimas tipo catepsinas las cuales son las responsables de la digestión temprana, mismas que disminuyen conforme transcurre el tiempo del período postalimentación pero, se recuperan al término del ciclo digestivo.

I. INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas, llamada así en honor del médico brasileño Carlos Chagas, existe sólo en el continente Americano. En general, la enfermedad de Chagas es típica de zonas cálidas y húmedas. Este padecimiento es causado por el protozooario parásito flagelado, *Trypanosoma cruzi*, que es transmitido a los humanos por insectos triatominos conocidos popularmente en diferentes lugares como: "vinchucas", "barbeiros", "chipos", "chinchas besuconas", etc. La biología de la tripanosomiosis fue descrita en 1909 por Carlos Chagas quien descubrió al parásito y su vector. Chagas descubrió las formas metacíclicas de *T. cruzi* en el intestino del triatomino *Panstrongylus megistus*. Posteriormente, este investigador permitió a los insectos parasitados picar a un mono y observó las formas de tripomastigote en la sangre del animal. Poco después, Chagas encontró los mismos parásitos en la sangre de un niño que padecía de fiebre, anemia y agrandamiento de nódulos linfáticos. Esta fue la primera vez en la historia en que un parásito y su vector se descubrieron antes de que se reconociera la enfermedad como tal (Beaver *et al*, 1984). La infección puede ser mortal y a menudo conduce a lesiones muy debilitantes de los órganos vitales, especialmente el corazón y el tracto intestinal. Además ya que la infección es incurable, excepto durante las primeras fases, y de que no hay vacunas, el control depende mucho de la eliminación de las poblaciones domésticas de los insectos vectores (Schofield, 1994).

1.1. Antecedentes generales

Epidemiología de la enfermedad de Chagas

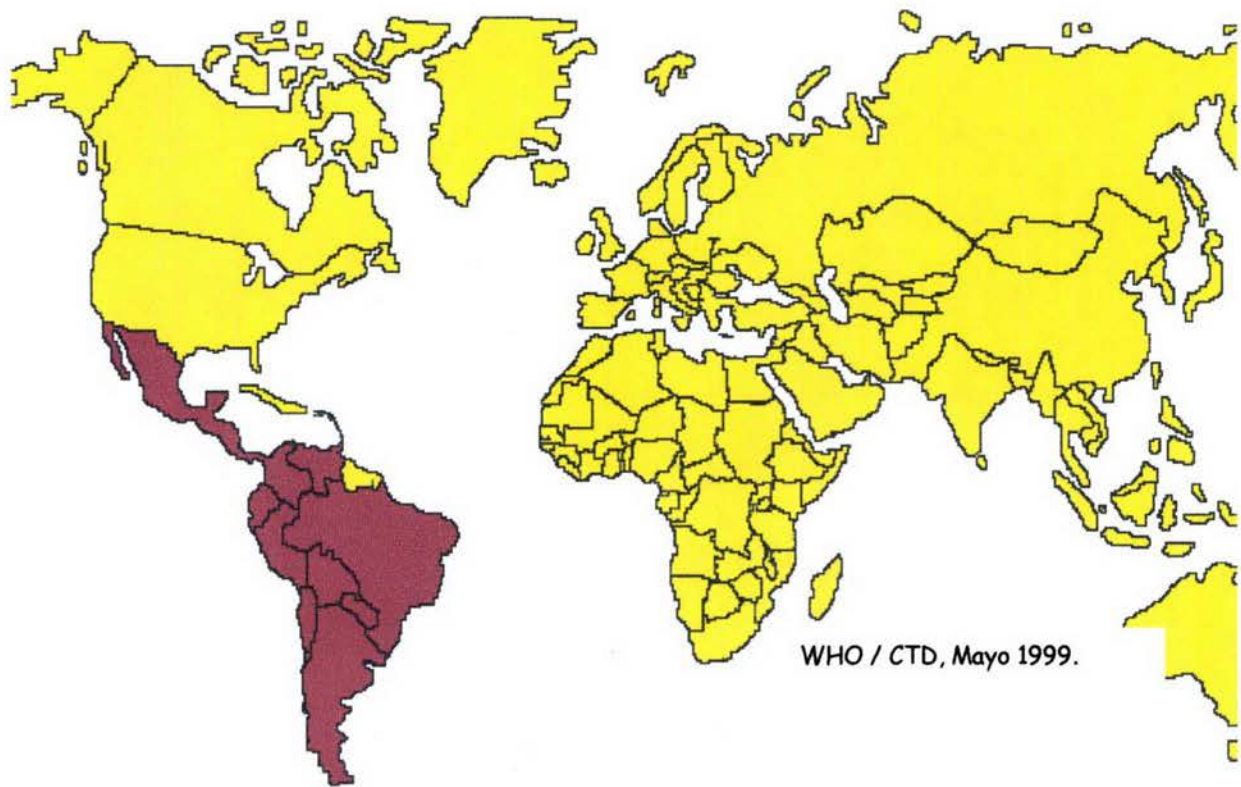
La distribución geográfica de la infección humana causada por *T. cruzi* se localiza en las zonas rurales y periurbanas de las ciudades tropicales y subtropicales extendiéndose aproximadamente de los 42.5° latitud Norte a los 43.5° latitud Sur, de México a Argentina y Chile (Fig. 1). La enfermedad ocupa el cuarto sitio entre las enfermedades prioritarias que interesan a la Organización Mundial de la Salud (OMS), y es la causa más frecuente de cardiopatía en ciertas áreas, principalmente rurales, en la mayoría de los países de Sudamérica (WHO, 1999). Se estima que en América latina 90 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la infección y aproximadamente 17 millones están ya infectados, de las cuales 6.2 millones han desarrollado las formas crónicas de la enfermedad (Moncayo, 1992) (Cuadro 1).

Seroprevalencia Mundial de las enfermedades parasitarias

Enfermedad	Infectados 1×10^6	Riesgo 1×10^6	Países Afectados
Malaria	270	2,100	103
Esquistosomiosis	200	600	76
Filariasis linfática	90	900	76
Oncocercosis	17	90	34
Enfermedad de Chagas	17	90	21
Leishmaniasis	12	35	80
Enfermedad del sueño	0.025	50	35

OMS, 1999

Cuadro 1. Seroprevalencia mundial de las enfermedades parasitarias de mayor importancia de acuerdo a individuos en riesgo y países afectados.



■ Países endémicos con la Tripanosomiosis Americana.

Fig. 1. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas.

1.2. Antecedentes específicos.

En México, la primer referencia sobre la tripanosomiosis producida por *T. cruzi* se debe a Hoffman, quien encontró chinches infectadas de la especie *Triatoma dimidiata* en Veracruz en 1928 (Soberón *et al*, 1988). En los resultados de la Encuesta Serológica Nacional empleando la prueba de hemaglutinación (HA), se encontró que la enfermedad de Chagas está presente en un 1.2 % de la población (Velasco Castrejon, 1992), sin embargo, estudios efectuados en áreas rurales y zonas en condiciones socioeconómicas y ecológicas adecuadas para la presencia de los factores involucrados en la enfermedad, demuestran una seroprevalencia que va del 10 al 85 % (hasta 540,000 individuos seropositivos), predominando comunidades de los estados de Guerrero, Jalisco, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Veracruz y Zacatecas (Cuadro 2).

Estudios epidemiológicos en México

Comunidad	Estado	Sero (+)	Autor
Costa Chica	Guerrero	85.00%	Goldsmith, 1971
Yosotiche	Oaxaca	25.00%	Cortés, 1985
Amoxochitl	Zacatecas	18.40%	Cortés, 1990
Zoacalco	Jalisco	21.00%	Kasten, 1990
Xalisco	Nayarit	50.70%	Vivanco, 1990
Varias	Morelos	28.00%	García, 1990
Palma de Arriba	Veracruz	19.50%	Velasco, 1990
J. Herrera	Querétaro	15.00%	De Haro, 1990
Varias	México	1.20%	Velasco, 1992
General Terán	Nuevo León	12.50%	Lara, 1994

Cuadro 2. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas, por comunidad y estado. Mostrando individuos sero (+) (seropositivos) identificados por diversos autores (Goldsmith, 1973).

1.3. Hábitat de los triatominos

En general cada especie de triatolino tiene tendencia a ocupar una zona geográfica discreta y, ordinariamente, las discontinuidades en la distribución se pueden atribuir a la dispersión pasiva, en asociación con un huésped vertebrado migratorio. La mayoría de las especies de triatominos ocupan principalmente hábitats selváticos, en asociación estrecha con sus huéspedes vertebrados. Dichos hábitats incluyen diferentes tipos de nidos de aves, madrigueras y nidos de animales homeotermos tales como: marsupiales, edentados, roedores, carnívoros, murciélagos y aves. Los triatominos también se encuentran entre rocas y en piedras, donde ellos se alimentan de la sangre de pequeños roedores y, en algunos casos, de la sangre de iguanas y de lagartijas que comparten su hábitat. Algunos triatominos tienen preferencia por un hospedero. A estos insectos también se les encuentra en troncos caídos y árboles huecos, entre raíces expuestas y bajo las cortezas flojas, en frondas de palma y bromeliáceas epífitas (Barreto, 1967; Pipkin, 1968). A semejanza de todas las parasitosis, la enfermedad de Chagas esta ligada a la pobreza, el tipo de vivienda de los campesinos, hecha de palma, vara, adobe, lodo y piso de tierra tan común en toda Latinoamérica, desempeña un papel decisivo en la transmisión ya que constituye un criadero ideal para el vector (Velasco Castrejon *et al*, 1994) (Fig. 1). Algunas especies de triatominos también invaden y colonizan los hábitats peridomésticos tales como: gallineros y corrales, y algunos han realizado la transición para colonizar las viviendas humanas. En general, de acuerdo a su hábitat, los triatominos se dividen en especies silvestres y domésticas, con una categoría intermedia de peridomésticas, las cuales ocasionalmente penetran a las casas atraídas por

la luz pero no la colonizan y sólo se alimentan del hombre en forma ocasional (Lent, 1979).

En la naturaleza, los tritominos son voraces, ya que pasan por prolongados ayunos dependiendo de la disponibilidad del hospedero.

1.4. Ciclo de vida de *T. cruzi*

Conocer el ciclo de vida de un parásito es importante porque indica las condiciones en que ocurre la transmisión, los organismos implicados y los órganos y tejidos afectados, permitiendo anticipar los momentos y lugares donde se puede interferir la transmisión y/o diseñarse una cura.

El ciclo de vida de *T. cruzi* comprende dos etapas: una en el hombre o en un huésped reservorio y otra en los insectos transmisores (FIG. 2). En el hombre la infección se inicia cuando los tripomastigotes, formas del parásito alargadas, con flagelo y membrana ondulante, entran al huésped a través de discontinuidades de la piel, penetran en los tejidos e invaden células. Dentro de las células, los parásitos se transforman en amastigotes, formas redondas intracelulares sin flagelo ni membrana ondulante (esta forma es necesaria para la reproducción) y se dividen por fisión binaria, produciendo gran número de individuos, que eventualmente se transforman a las formas de promastigote, después a epimastigote (formas ovaladas intermedias entre amastigote y tripomastigote) hasta la forma de tripomastigote, las cuales aparecen en sangre periférica, completando el ciclo en el vertebrado (FIG. 2) (Velasco Castrejón, *et al*, 1994).

Los vectores de *T. cruzi* pertenecen al Orden Hemiptera, Familia Reduviidae y Subfamilia Triatominae, por lo que se les conoce como redúvidos o triatominos.

El ciclo del parásito en el vector se inicia cuando el insecto ingiere el tripomastigote con la sangre, único alimento del insecto. Dentro del tracto intestinal las formas de tripomastigote se acortan, transformándose a epimastigotes, que se multiplican y producen epimastigotes alargados. Estos se diferencian a tripomastigotes metacíclicos y es posible localizarlos en el recto del insecto de 8 a 10 días después de la infección. Cuando los reduvidos se alimentan, frecuentemente defecan sobre la piel de su hospedero depositando los tripomastigotes metacíclicos, los cuales penetran al cuerpo a través del agujero de la picadura así como por escoriaciones producidas con el rascado de la piel o, más a menudo, a través de las membranas mucosas que son frotadas con los dedos contaminados con las heces del insecto. La infección también puede adquirirse por ingestión de animales infectados o de alimentos contaminados por heces del insecto (Velasco Castrejon *et al*, 1994). Recientemente, se describió que el ciclo completo del parásito puede ocurrir en las glándulas odoríferas anales del tlacuache (*Didelphis sp*) incluyendo el desarrollo tripomastigote - epimastigote - tripomastigote metacíclico infectivo, del cual sólo se conocía que ocurre en el intestino del vector triatomino, (Urdaneta-Morales, 1996). La producción de tripomastigotes metacíclicos en los tlacuaches se probó experimentalmente tomando material de las glándulas infectadas e inoculando en zarigüeyas jóvenes saludables y en ratones blancos, por diferentes rutas: subcutáneamente, intraperitonealmente, oralmente y sobre la mucosa de los ojos. Las infecciones de *T. cruzi* inducidas de este modo produjeron en los animales la invasión de los parásitos a músculo cardíaco y esquelético, observándose la multiplicación intracelular de amastigotes.

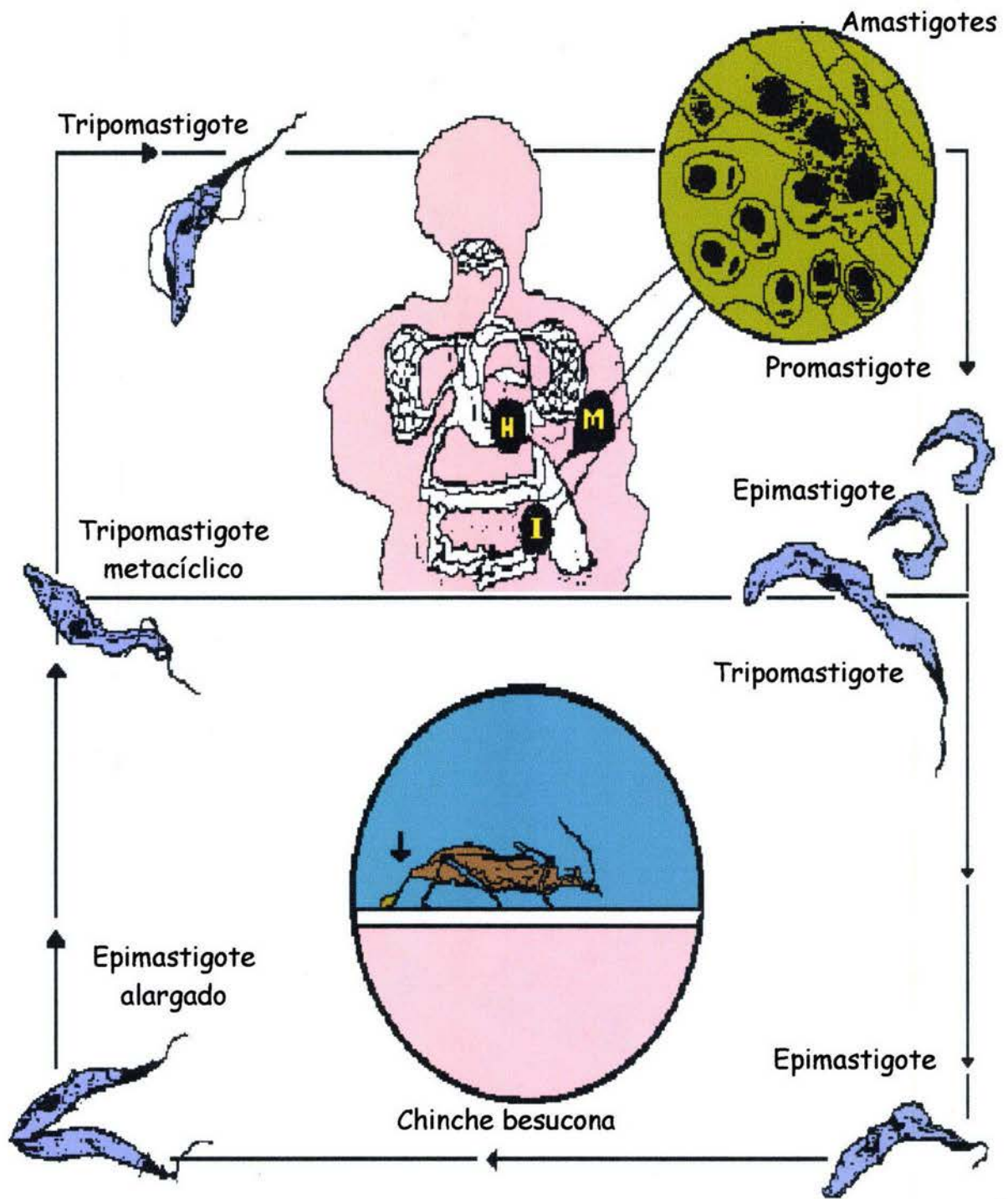


Fig. 2. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*
 H= hígado, M= músculo, I= intestino

Por estos motivos las excretas de la zarigüeya pueden transmitir la enfermedad de Chagas por contaminación (Urdaneta-Morales, 1996). En los insectos transmisores el desarrollo de formas infectivas se realiza en el intestino tanto en los estadios ninfales como en el insecto adulto.

1.5. Patología de la enfermedad de Chagas

Clínicamente la enfermedad de Chagas se caracteriza por tres fases: la aguda, la indeterminada y la crónica. En la fase aguda (dependiendo de la edad del individuo, número de exposiciones y cantidad de inóculo) posterior a un período de incubación variable (4 a 10 días), se presenta fiebre en el 98 % de los casos que oscila entre 38° y 40° C con un patrón de comportamiento irregular, acompañado de cefalea, astenia, mialgias, artralgias e hiporexia; además puede presentarse hepatoesplenomegalia, y si el sitio de entrada ocurre por conjuntiva se produce el signo patognomónico de Romaña, que se reconoce en el 90 % de las infecciones recientes. En casos graves, la miocardiopatía chagásica aguda puede evolucionar a insuficiencia cardiaca congestiva y conducir a la muerte en un lapso corto. Alternativamente puede presentarse la meningoencefalitis como una de las complicaciones más severas, en cuyo caso la mortalidad es alta en niños menores de 2 años (WHO, 1991). Además, ya que la infección es incurable, excepto durante las primeras fases, y de que no hay vacunas, el control depende mucho de la eliminación de las poblaciones domésticas de los insectos vectores (Schofield, 1994).

1.6. Ciclo de vida de *R. prolixus*

R. prolixus es un importante vector de *T. cruzi* en Sudamérica perteneciente al orden Hemiptera. El nombre hemiptera significa "alas a la mitad", debido a que de los dos pares de alas que poseen, las alas delanteras presentan la mitad basal muy esclerotizada y el resto membranoso. El segundo par de alas es membranoso. Los hemípteros tienen partes bucales succionadoras cortantes bien adaptadas para alimentarse de plantas, pequeños artrópodos y sangre. Estos insectos son considerados paurometábolos ya que se desarrollan a través de una metamorfosis simple (Borrór, 1981). Presentan ojos operculados de 2 mm de largo y aunque al inicio los presentan blancos se tornan de un color rojo en pocas horas. El desarrollo de los huevos es relativamente largo requiriendo cerca de un mes a 22° C y 22 días a 32° C. El primer estadio de la ninfa es aproximadamente del tamaño del huevecillo de 2.7 mm. Cada uno de los cinco estadios ninfales se alimenta y muda incrementando aproximadamente 1.5 veces su talla original en cada muda. El ciclo de vida en el laboratorio requiere de aproximadamente 120 días en el transcurso del huevo al adulto. El volumen de sangre ingerida por una ninfa es relativamente pequeño pero un adulto puede tomar cerca de 0.25 ml de sangre cuando se alimenta. Durante el transcurso de la vida de una chinche puede tomar de 4 a 10 ml de sangre de vertebrado (Fig. 3). Desde el punto de vista epidemiológico las especies transmisoras más importantes son: *T. dimidiata* (México, Panamá, Este de Ecuador y Colombia), *Triatoma barberi* (México), *T. infestans*, *T. gerstaeckeri*, y *T. longipennis* (Uruguay Chile y Venezuela).

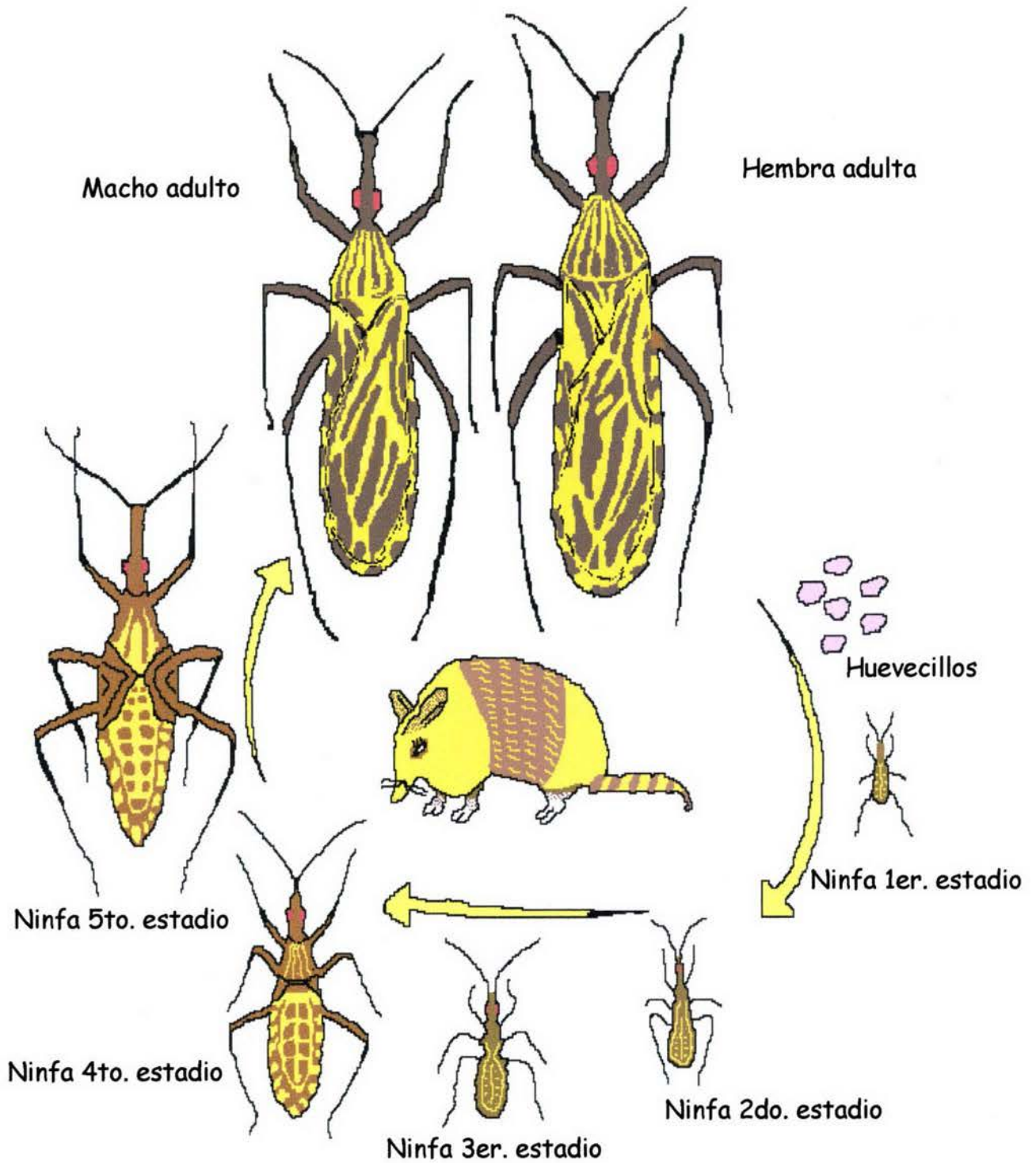


Figura 3. Ciclo de vida de *Rhodnius prolixus*

T. sordida y *T. mazzottii*, (este de Bolivia, Brasil y noreste de Paraguay), *T. brasiliensis*, *T. pallidipennis* y *T. phyllosoma* (noreste de Brasil), *R. prolixus* (Panamá y México) y *Pastrongylus megistus* (Brasil) (Velasco Castrejon *et al*, 1994), (Moncayo-Medina, 1987).

1.7. Descripción del aparato picador

El aparato picador de los triatominos comprende dos pares de estiletes mandibulares, los cuales perforan el integumento del huésped para anclar el rostro, mientras que los delgados estiletes maxilares horadan y laceran los vasos sanguíneos subyacentes. Durante la picadura el insecto inyecta saliva al huésped, la cual favorece la vasodilatación, inhibe la hemostasis y, tiene propiedades anticoagulantes (Ribeiro, 1987). Las chinches repletas por ingestión de la sangre comienzan a evacuar los restos de su comida anterior, realizan la diuresis y excretan el exceso de agua de la sangre recién ingerida.

1.8. Estructura y fisiología del aparato digestivo del vector

La digestión de la comida por los triatominos es un proceso lento que dura unos 14 días. Este ritmo metabólico del insecto también determina que las chinches pueden tolerar varios meses de privación del alimento si no encuentran huésped disponible (Schofield, 1994). El tracto digestivo de los insectos de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, se divide funcionalmente en tres partes: buche, intestino y recto. El buche tiene como función el almacenamiento del alimento y su deshidratación.

La sangre ingerida, frecuentemente un gran volumen (equivalente de hasta 10 veces el peso corporal del insecto), se recibe en el buche e inmediatamente comienza su deshidratación por el transporte activo de sodio del lumen hacia la hemolinfa, vía una bomba de sodio/potasio y este fluido es eliminado por medio de los túbulos de Malpighi (sistema de filtración de la hemolinfa). La actividad de eliminación de fluidos es inducida por una hormona diurética, la cual acelera la velocidad de secreción 1000 veces en comparación con el nivel que presenta el triatomino cuando no se ha alimentado. Durante la diuresis los túbulos no recuperan iones, dada la gran velocidad a la que eliminan el exceso de líquido de la hemolinfa. Se ha observado que en *R. prolixus* la concentración de sales en la orina del insecto es similar a la del plasma de la sangre que ingirió (Madrell, 1969). El intestino de estos insectos se considera dividido en anterior y posterior (Fig. 4), éste último tiene el papel más relevante de la digestión ya que en él se expresan, por inducción, la mayoría de las enzimas digestivas (García *et al.*, 1978). Después de la diuresis el alimento está concentrado como una pasta, la cual va pasando en pequeñas cantidades del buche al intestino, donde se digiere y absorbe. En el tracto digestivo de estos insectos no existe membrana peritrófica, pero el epitelio del intestino reacciona a la comida produciendo un revestimiento extracelular que probablemente desempeña una función parecida (Billingsley, 1990; Lehane, 1991). El insecto puede obtener su alimento dejando, entre una alimentación y otra, períodos prolongados de un mes o más y en ese tiempo el insecto digiere su alimento a medida que lo necesita para su crecimiento, o para el desarrollo de huevecillos (Downe, 1986; Persaud y Davey, 1971). El recto tiene como función principal la recuperación de iones y la conservación de agua (Downe, 1986).

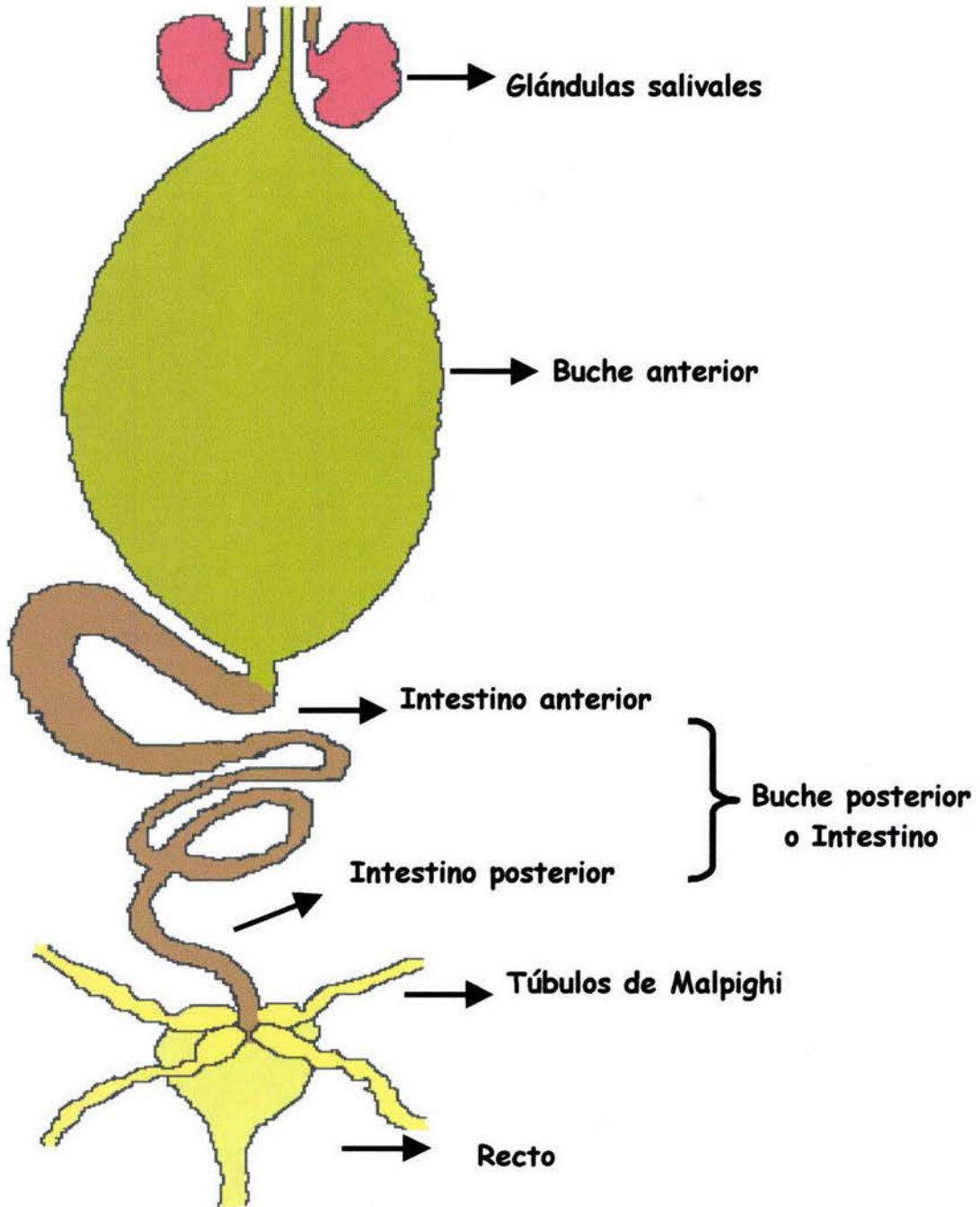


Figura 4. Esquema del tracto digestivo de *Rhodnius prolixus*

1.9. Enzimas del insecto.

Dentro del buche y en el intestino de *R. prolixus* se han descrito diversas glicosidasas: alfa y beta-glucosidasas, alfa y beta-galactosidasas, alfa y beta manosidasas, alfa-fucosidasa, beta-N-acetil glucosaminidasa, alfa y beta-N-acetil galactosaminidasas (Ribeiro y Pereira, 1984). Entre las proteasas que se han detectado en *R. prolixus* aparecen actividades de degradación de caseína (Persuad y Davey, 1971; García y García, 1977), de proteasas dependientes de grupos sulfhidrilo las cuales hidrolizan benzoil-L-tirosina etil ester (BTEE, sustrato usado para quimiotripsina) (García *et al*, 1978); actividad de aminopeptidasa usando como sustrato leucil-beta-naftilamida, esta última actividad está asociada a las membranas del intestino y se sugiere que participa en la digestión de la sangre (Houseman *et al*, 1985; Billingsley y Downe, 1985). En el tracto digestivo de *R. prolixus* se utilizan enzimas del tipo de la catepsina para la digestión de las proteínas de la sangre, las cuales son cisteína proteasas activas en un medio ácido (pH del intestino= 5.5) (Miranda y Ribeiro, 1980, citados por Terra, *et al*, 1988), a diferencia de otros insectos hematófagos como mosquitos del género *Anopheles* que utilizan serina proteasas tipo tripsina para digerir la sangre en un medio alcalino (pH 8.4) (Houseman y Downe, 1981, 1982; Houseman *et al*, 1985; Terra *et al*, 1988; Sánchez Contreras, 1993). Se han realizado algunos experimentos en los cuales se prueban los efectos de inhibidores y activadores de catepsinas sobre la actividad de proteasa del intestino de *R. prolixus* y los resultados sugieren que en el intestino de este insecto la actividad de proteasa se debe mayoritariamente a una catepsina tipo B, la

cual es una cisteína proteasa y en menor grado a la catepsina tipo D, la cual es una asparto proteasa (Terra *et al*, 1988).

Recientemente se describió el gen de una catepsina tipo L que se expresa en el intestino y se plantea la cuestión de que esta enzima podría corresponder a la catepsina tipo B descrita anteriormente (López-Ordoñez *et al*, 2001).

1.10. Enzimas proteolíticas

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos. Las proteasas que degradan aminoácidos del extremo de la cadena polipeptídica son llamadas peptidasas. Aquellas que catalizan la división de un péptido interno se les llama endopeptidasas o proteinasas. En base a los grupos químicos presentes en su sitio activo, las proteasas se dividen en 4 grandes clases:

- Serina proteasas
- Metalo proteasas
- Tiol (cisteína) proteasas y
- Asparto (carboxil) proteasas

Las proteasas catalizan un amplio espectro de reacciones biológicas, incluyendo digestión, procesamiento de prohormonas, coagulación de la sangre y fibrinólisis, metabolismo de proteínas, reacciones inmunes, y remodelación tisular. En los parásitos, las proteasas desempeñan roles críticos durante la invasión y destrucción de tejidos digiriendo las proteínas del huésped, además de que estas enzimas ayudan a los parásitos a evadir la respuesta inmune del huésped, y a prevenir la coagulación de la sangre (Mckerrow, 1989).

Para que la catálisis ocurra, los sustratos deben colocarse en la orientación adecuada dentro de una región específica de la enzima denominada "centro activo" o "sitio activo", el cual suele tener secuencias conservadas entre los miembros de una familia enzimática.

Muchas enzimas se activan por la hidrólisis de uno o unos pocos enlaces peptídicos en sus precursores inactivos, denominados "zimógenos" o "proenzimas". Este mecanismo regulador genera las enzimas digestivas activas como ocurre con la quimiotripsina, tripsina y pepsina. La activación proteolítica sólo tiene lugar una vez en la vida de una molécula enzimática. (Stryer, 1995).

- Serina proteasas

Las serina proteasas constituyen una clase extendida de enzimas proteolíticos que se caracterizan por poseer en su sitio activo un aspartato en la posición 102, una histidina en la posición 57 y un residuo de serina en la posición 195, según la numeración de la quimiotripsina, formando la "tríada catalítica", la cual tiene un papel decisivo en la actividad de todas las proteasas dependientes de serina. La primera etapa en la hidrólisis de un sustrato peptídico es la acilación, es decir la formación de un intermediario covalente acil enzima en el cual el fragmento carboxílico del sustrato esterifica al grupo hidroxilo de la serina 195.

- Metallo proteasas

Las metalo-proteasas incluyen dos grupos: la familia de la carboxipeptidasa pancreática de mamíferos, y la termolisina de bacterias que difiere de la primera en su estructura química, aunque los miembros de ambas familias son metalo-enzimas con zinc y tienen sitios activos con configuraciones similares.

Otras metalo enzimas proteolíticas han sido identificadas y aisladas pero no entran dentro de esta clasificación, por ejemplo la familia de las colagenasas, la de las aminopeptidasas y las carboxipeptidasas A y B las cuales son exopeptidasas similares en sus sitios activos y estructura.

La carboxipeptidasa A, como la quimiotripsina, prefiere las cadenas carboxilo terminal de naturaleza hidrofóbica, mientras que la acción de la carboxipeptidasa B está dirigida hacia residuos de arginina y lisina. La carboxipeptidasa A es una de las proteasas que se ha investigado más detalladamente empleando cinética, métodos de análisis de espectroscopía y cristalografía. Sin embargo el mecanismo de acción dirigido hacia péptidos y sustratos éster es aún desconocido. Los componentes del sitio activo incluyen dos ácidos glutámicos y una histidina los cuales actúan como ligandos del zinc (Beynon, 1989) (Tabla 2).

- Cisteína proteasas

Las proteasas con tiol (llamadas también cisteína-sulfhidrilo tiol-proteasas), contienen un centro activo con un residuo de cisteína en la posición 25, una histidina en la posición 159 y un ácido aspártico en la posición 158 actuando de forma análoga a la de la serina 195 de la quimiotripsina. La catálisis de las tiol proteasas se produce a través de un intermediario tioéster y es facilitada por una cadena lateral de histidina próxima a la serina y un aspartato. La tiolproteasa catepsina B degrada las proteínas en los lisosomas, orgánulos rodeados de membrana, que en las células animales realizan la digestión intracelular (Stryer, 1995).

Para inhibir las tiol proteasas se conocen dos potentes inhibidores, el E64, efectivo inhibidor irreversible de cisteína proteasas que no se ve afectado por restos de cisteína ni por cualquier otra enzima, o que pueda reaccionar

con grupos tiol de bajo peso molecular como el β -mercaptoetanol, y el ácido iodoacético que, a diferencia del E64, no es específico para sitios activos con residuos de cisteína y que puede inhibir muchas otras enzimas, puede reaccionar con grupos tiol de bajo peso molecular como el β -mercaptoetanol (Beynon, 1989).

- Asparto proteasas

Las aspartato proteasas incluyen a la penicillopepsina bacteriana, la cual es el modelo de esta familia, la pepsina de mamíferos, la renina, la quimosina y ciertas proteasas de hongos. Los residuos característicos del sitio activo de estas enzimas son ácidos aspárticos en posiciones 33 y 213, los cuales están geométricamente próximos uno de otro. Su actividad enzimática es a un pH óptimo entre 2-3, donde uno de estos residuos es ionizado y el otro no. Un potente inhibidor de las asparto proteasas es la pepstatina, un hexapéptido que, en el estado de transición, imita sustratos normales (Beynon, 1989).

Familias de enzimas proteolíticas.

	Proteasas	Sitio activo
Serina proteasas I	Quimiotripsina Tripsina Elastasa	Asp ¹⁰² , Ser ¹⁹⁵ , His ⁵⁷
Serina Proteasas II	Subtilisina	Asp ³² , Ser ²²¹ , His ⁶⁴
Cisteina proteasas	Papaína Catepsina B y H	Cys ²⁵ , His ¹⁵⁹ , Asn ¹⁷⁵
Asparto proteasas	Penicillopepsina	Asp ³³ , Asp ²¹³
Metalo proteasas	Carboxipeptidasa A Termolisina	Zn, Glu ²⁷⁰ , Try ²⁴⁶ Zn, Glu ¹⁴³ , His ²³¹

Tabla 1. Clasificación de las enzimas proteolíticas (Beynon, 1989).

1.11. Justificación

Existen pocas opciones para el control de la enfermedad de Chagas. No se cuenta todavía con una quimioterapia efectiva para los pacientes infectados, no hay vacunas ni prospectos para una en el futuro. Los métodos de control basados en el uso de insecticidas y mejora de vivienda para disminuir las poblaciones del vector son los que han mostrado eficacia para reducir la transmisión doméstica y la incidencia de la infección.

Sin embargo, se han reportado casos de tolerancia de *R. prolixus* a malatión, (Lima, 1991) y también se ha observado que este insecto es capaz de soportar cipermetrina y DDVP (Oliveira, 1996). Por otra parte los esquemas de mejoramiento de la vivienda han dado buenos resultados, por la destrucción consecuente del hábitat de los insectos (WHO, 1995), sin embargo también se ha observado que especies transmisoras del insecto están desarrollando domesticación hacia hábitats urbanos. El control de la enfermedad de Chagas se verá afectado por la aparición y/o aumento en la frecuencia de insectos con la capacidad de invadir nuevos hábitats (Schofield *et al.*, 1994). Los métodos de control de la enfermedad de Chagas que se han aplicado hasta la fecha no representan una solución global al problema, por lo que se estudian otras alternativas, como aquellas encaminadas a la elaboración de una vacuna. Otra posible forma de control de la enfermedad de Chagas es la modificación genética del vector, con el objeto de obtener insectos resistentes a la invasión del parásito. Para este propósito, se ha considerado importante estudiar el papel que desempeñan las proteasas producidas en el tracto digestivo de estos insectos hematófagos, debido a que este es el medio donde se desarrollan y multiplican parásitos y virus.

Otra aplicación del conocimiento de las características de las enzimas que participan en la digestión en los triatomíneos sería el diseño de insecticidas biológicos que se activen específicamente por éstas enzimas creando así un método de control exclusivo para triatomíneos pero inócuo para otros organismos. En el presente estudio nos propusimos implementar un sistema de detección de la actividad proteolítica en el tejido intestinal de *R. prolixus*. Una vez logrado esto, caracterizar enzimas digestivas y el efecto de algunos inhibidores sobre las enzimas del tracto digestivo del vector, con la finalidad de aportar conocimientos que permitan, a futuro, diseñar medidas para el control de la transmisión de la enfermedad de Chagas.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Caracterizar algunas actividades proteolíticas del tracto digestivo de *R. prolixus*.

2.2. Objetivos particulares

- Implementar un sistema de detección de la actividad de proteasa presente en los 2 órganos principales relacionados con la digestión en *R. prolixus*: buche e intestino
- Observar el efecto de inhibidores específicos de proteasas sobre la actividad proteolítica de los órganos digestivos de *R. prolixus* a fin de caracterizar el tipo de enzimas que están presentes en ellos.

III. MATERIAL

3.1. Material Biológico

Insectos: Se utilizaron adultos machos y hembras de *R. prolixus* provenientes de la colonia mantenida en el insectario del Centro de Investigación de Paludismo (CIP) de Tapachula, Chiapas. Los insectos se mantuvieron separados por edad y por día de ingesta en vasos de plástico cerrados con tul sujeto con ligas. Para alimentar a los insectos se procedió a retirar el exceso de pelo y limpiar perfectamente el vientre de un conejo Nueva Zelanda, y los vasos con los insectos previamente separados se colocaron encima del animal para que obtuvieran su alimento durante 30 min. o hasta la distensión del abdomen.

3.2. Material - Reactivos Químicos

Para la preparación de soluciones se empleó agua desionizada. De la compañía Sigma (St. Louis, MO) se utilizó Albúmina sérica bovina (BSA), Persulfato de Amonio (APS), Acido cítrico, Caseína, Deoxicolato de sodio (DOC), Tartrato de sodio-potasio, sulfato de cobre, Tris HCl pH 6.8 y pH 8.8, trizma base, azul de Coomasie R-250. Los inhibidores de proteasas empleados fueron: TLCK, TPCK, IA, E-64 Pepstatin, Leupeptin, EDTA de las marcas Sigma y Roche. Los reactivos utilizados para la electroforesis fueron de la marca Bio-Rad (Hercules, CA) entre los cuales se encuentra Acrilamida, Bis-acrilamida, Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), TEMED, azul de bromofenol y Tritón X-100. Todos los marcadores de alto y bajo peso molecular, glicina, EDTA y la agarosa fueron marca Gibco (Grand Island, N. Y.).

De la compañía Merck (Darmstadt, R. F. Alemania) se utilizó ácido tricloroacético, Cloruro de sodio, Cloruro de potasio, Carbonato de sodio, Hidróxido de sodio, sodio dihidrogenofosfato 1-hidrato, acetato de sodio, ácido acético, metanol, ácido láctico, ácido perclórico, glicerol, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, di-hidrogenofosfato de potasio, acetato de potasio, reactivo de Folin- Ciocalteu y sulfato de amonio. Para los ensayos de sustratos de hemoglobina se utilizó de la marca Bioxon (Becton Dickinson, México). La gelatina que se empleó en los ensayos fue de la marca J. T. Baker (USA).

IV. METODOLOGIA

4.1 Insectos

Obtención de extractos

Se obtuvieron los buches e intestinos de *R. prolixus* alimentados con sangre de conejo por medio de disección de los triatominos, anestesiados por frío. Estos órganos se lavaron con buffer salino de fosfatos (PBS, 8 g. de NaCl, 0.2 g. de KCl, 1.44 g. de Na_2HPO_4 y 0.24 g. de KH_2PO_4 en 800 ml de agua destilada ajustando el pH a 7.4 con HCl y aforando con un litro de agua), para eliminar el exceso de sangre y posteriormente homogenizar con un macerador en 100 μl en la solución salina limpia. Como control de actividad de proteasa tipo catepsina (papaína) se usaron extractos de papaya *Carica papaya* preparados de la siguiente forma: a un trozo de la fruta fresca se le cortaron porciones de 0.5 gramos que se pusieron en tubos de microfuga y se les agregaron 300 μl de PBS para homogenizarlos.

4.2 Caracterización de la actividad enzimática.

Para estudiar la actividad proteolítica en los órganos del tracto digestivo de *R. prolixus* se utilizaron las siguientes técnicas:

- A) Cuantificación de proteínas
- B) Obtención y análisis de proteínas totales
- C) Electroforesis en geles de poliacrilamida copolimerizados con diferentes sustratos (Heussen, 1980)
- D) Ensayos de proteasas por digestión de bandas (Zhao, 1998)
- E) Ensayos de la actividad de enzimas tipo pepsina (Umezawa, 1972)
- F) Cálculos estadísticos

A) Cuantificación de proteínas

Previo a la detección de la actividad proteolítica, se determinó la cantidad de proteína soluble presente en los extractos ensayados, a fin de estandarizar la prueba. Para esto se utilizó la técnica de Lowry (Smith, 1989) la cual se realizó de la siguiente forma:

Se construyó una curva estándar de albúmina sérica bovina ($10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), colocando 0, 10, 20, 30 y 40 μg en 200 μl de agua. Las muestras a ensayar también se diluyeron en 200 μl de agua. Tanto a los tubos para la curva estándar como a las muestras se les adicionaron 20 μl de deoxicolato de sodio 0.15 %, se agitaron en el vórtex y se incubaron durante 10 min. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se adicionó a las mezclas de reacción 20 μl de ácido tricloroacético al 72 %, se agitaron en el vórtex y posteriormente se centrifugaron durante 5 min. a una velocidad de 14,000 rpm, descartando el sobrenadante y la pastilla se redisolvió en 200 μl de agua destilada.

A las muestras se les adicionó 1 ml de la solución C que contenía 2 % de carbonato de sodio, 0.4 % de hidróxido de sodio, 0.02 % de tartrato de sodio-potasio y 0.5 % de sulfato de cobre. La solución, contenida en tubos para microfuga se mezcló con la ayuda de un vórtex y se incubó por 10 min. a temperatura ambiente. Posteriormente a las muestras se les añadió 100 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck), se incubaron por 45 min. a temperatura ambiente y la absorbancia se midió a 660 nm.

B) Obtención y análisis de proteínas totales

Para obtener las proteínas presentes en los extractos de las partes del tracto digestivo las muestras se extrajeron en presencia de inhibidores de proteasas, para lo cual se probaron las pastillas inhibitorias llamadas Complete (los efectos de inhibición protegen proteínas aisladas de tejidos animales, plantas, levaduras y bacterias). Para esto se realizó la disección de órganos a diferentes días postalimentación (1o, 3o y 6o día postalimentación) en PBS, retirando el exceso de sangre y macerando los extractos, posteriormente se colocaron en tubos de microfuga. Se usaron los inhibidores de las pastillas a una concentración final de 7X. A continuación las muestras se colocaron en 500 μ l de buffer de muestra con SDS 4X y de inmediato se hirvieron durante 4 min. a 40°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 5 min. a 15,000 rpm y el sobrenadante fue transferido a tubos limpios. A continuación se midió la cantidad de proteína según la técnica de Lowry (Smith, 1989) y se colocaron aproximadamente 70 μ g de proteína. Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida al 12 % sin sustrato bajo condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS).

Para lo cual se utilizaron cámaras de electroforesis (BRL) que permiten obtener geles de aproximadamente 16 cm de largo, sus partes individuales se limpiaron con alcohol y secaron debidamente y la ranura de la base se selló con agarosa al 1%. Para el gel separador, a una concentración del 12 %, se mezclaron 14.4 ml de acrilamida-bisacrilamida al 30 %, 12.6 ml de agua desionizada, 9.0 ml de buffer a pH 8.8, 0.195 ml de SDS al 20 %, 120 μ l de persulfato de amonio al 10 % y finalmente se tomaron 24 μ l de TEMED directamente del frasco. Para alinear la superficie del gel se adicionó alcohol sobre el gel separador. La polimerización ocurrió en aproximadamente 30 min. A continuación el alcohol se eliminó y la superficie del gel se lavó con agua desionizada, las paredes internas de las placas se secaron con papel filtro sin tocar el gel. Para el gel concentrador (concentración de 4 %) se mezclaron 0.65 ml de acrilamida-bisacrilamida al 30 %, 1.25 ml de buffer concentrador a pH 6.8, 3.05 ml de agua desionizada, 25 μ l de persulfato de amonio y 5 μ l de TEMED. El buffer de corrida se preparó con 50 mM de Tris pH 8.3, 0.38 M de glicina y 0.05 % de SDS. La electroforesis se llevó a cabo a 22 °C a un voltaje constante de 85 V. Al terminar de correr el gel este se fijó y tiñó simultáneamente en una solución de azul de Coomassie al 0.25 % en metanol-ácido acético-agua (45-10-45) en rotación lenta durante 4 o 5 h. El gel se destiñó para hacer visibles las bandas de nuestro interés en una solución de metanol-agua-ácido acético (5-4-1).

C) Electroforesis en geles de poliacrilamida copolimerizados con diferentes sustratos (Heussen, 1980).

Los homogenados del tracto digestivo de *R. prolixus* (10 µg) se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en ausencia de SDS al 8 % copolimerizados con distintos sustratos (Heussen & Dowdle, 1980). Los geles se prepararon en placas de 7.0 x 8.5 cm. Para la electroforesis se utilizaron cámaras pequeñas (Owl Scientific) las cuales utilizan geles de aproximadamente 8 cm de largo; sus partes individuales se limpiaron y secaron debidamente y la ranura de la base se selló con agarosa al 1 %. Para el gel separador (concentración de 8 %), se adicionó 2.46 ml de acrilamida-bisacrilamida al 30 % en 1.99 ml de agua desionizada, 2.5 ml de caseína al 1 %. Para preparar el stock de caseína se disolvió 1 g en 10 ml de PBS calentándose durante 20-30 min. agitando fuertemente hasta conseguir la desaparición de los grumos, posteriormente se tomaron 2 ml y se centrifugaron por 7 min. y el sobrenadante se utilizó para la preparación del gel, se tomaron 2.5 ml de buffer separador pH 8.8, 50 µl de persulfato de amonio al 10 % y finalmente se tomaron 5 µl de TEMED directamente del frasco. La mezcla se vació en un tubo cónico donde se agitó suavemente durante 1 min. La polimerización ocurrió en aproximadamente 30 min.

El gel concentrador (concentración de 7 %) contenía 0.670 ml de acrilamida-bisacrilamida, al 30 %, 1.25 ml de buffer concentrador pH 6.8, 3.1 ml de agua desionizada, 25 µl de persulfato de amonio y 5 µl de TEMED y se procedió a colocar el peine. Una vez polimerizado el gel se colocó en la cámara y de nuevo se selló con agarosa y se agregó buffer de corrida que contenía 50 mM de Tris pH 8.3, y 0.38 M de glicina. La electroforesis se llevó a cabo a 4° C a un voltaje constante de 85 V.

Al terminar de correr el gel, éste se incubó en buffer de Acetatos 0.2 M pH 5 ($\text{CH}_3\text{COO Na}_3\text{H}_2\text{O}$) y DTT 10 mM durante 24 h. Posteriormente el gel se fijó y tiñó simultáneamente en una solución de Azul de Coomassie R-250, al 0.25 % en metanol-ácido acético-agua (45-10-45) en rotación lenta durante 3 o 4 h. El gel se destiñó para hacer visibles las bandas de nuestro interés en una solución de metanol-agua-ácido acético (5-4-1). En otros experimentos se utilizaron como sustratos a la gelatina, hemoglobina y albúmina. La gelatina y albúmina se disolvieron en agua caliente durante 3-5 min. y la hemoglobina se disolvió en buffer de citratos 0.1 M a un pH de 3.

D) Ensayos de proteasas por digestión de bandas: (Zhao, 1998)

Esta técnica experimental se basó en mezclar la fuente de proteasas con un sustrato protéico conocido, incubar la mezcla y visualizar por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % (PAGE-SDS) la desaparición de las bandas de proteínas correspondientes al sustrato conocido (Zhao, 1998). Para este fin se hicieron extractos del buche e intestino, (20-30 μg), y se les agregó el sustrato. En primera instancia se probaron albúmina, gelatina, hemoglobina y caseína al 1 % obteniendo buenos resultados con ésta última. Posteriormente las muestras se incubaron a 37° C y/o a temperatura ambiente durante 3 h, se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 min. y el sobrenadante se utilizó para correrlo en un gel de poliacrilamida al 12%, preparado según la técnica descrita por (Smith, 1989).

Ensayos con inhibidores de proteasas

Para averiguar la naturaleza de las proteasas detectadas, se agregaron diferentes inhibidores (Tabla 1) que fueron incluidos en las muestras antes de agregar el sustrato. A las mezclas muestra-inhibidor se les añadió el sustrato y se colocaron a 37°C durante 3 h. Posteriormente las mezclas de reacción se centrifugaron a 14,000 rpm y se utilizó la porción soluble para correrlo en un gel al 12 % (Zhao, 1998). Los inhibidores de proteasas fueron los siguientes: 10 mM E64, 10 mM TLCK, 10 mM TPCK, y Pepstatin 10 mM (Tabla 2).

Inhibidores de proteasas.

Inhibidor		Concentración	Proteasa blanco
Acido etilen diamino tetracetico	EDTA	1-10 mM	Metaloproteasas
L-trans-epoxysuccinyl- Leucylamide-(4 guanidino) butane,N-N-L-3- Transcarboxyirane 2-carbonyl)-L-leucyl)- Agmatine	E64	1-10 uM	Cisteína proteasas
1-10 Fenantrolina	Fenantrolina	1-10 mM	Metaloproteasas
Acido iodoacetico Iodoacetamida	IA	10-100 uM	Cisteína proteasas (manera reversible)
Leupeptin	Leupeptina	10-100 uM	Serina proteasas (tipo Tripsina y cisteína proteasas)
Pepstatin	Pepstatina	1 uM	Asparto proteasas (Catepsina D)
Phenylmethanesulphonyl Fluoride	PMSF	0.1-1 mM	Todas las Serina Proteasas
Tosyl lysil chloromethyl Ketone	TLCK	10-100 uM	Serina proteasas tipo tripsina
Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone	TPCK	10-100 uM	Serina proteasas tipo quimiotripsina

Tabla 2. Clasificación de los inhibidores de proteasas utilizados para detectar actividad proteolítica adaptado de Beynon (1989).

E) Ensayos espectrofotométricos de la actividad proteolítica del tracto digestivo de *R. prolixus* (Umezawa, 1972)

La actividad espectrofotométrica de la actividad proteolítica del tracto digestivo de *R. prolixus* es medida por el cambio de absorbancia a 280 nanómetros durante la hidrólisis de la caseína. Para este ensayo se tomaron 600 μ l de sustrato (0.6 g de caseína disuelta en 100 ml de ácido láctico al 0.75 %), 300 μ l de buffer KCl-HCl 0.02 M a pH 2, con los respectivos inhibidores dentro de tubos de microfuga a 37°C. Después de 3 min. se añadió el extracto a probar. como control, se preparó al instante una solución stock de pepsina porcina utilizando 1 mg/ml en 0.01 N de HCl, antes de usar el stock de la enzima, se diluyó con buffer KCl-HCl 0.02 M a una concentración de 4 μ g/0.1 ml de pepsina y se mezcló bien, agregándose de 40-50 μ g de extracto por cada control. La reacción fue terminada 30 min. después por adición de 350 μ l de ácido perclórico a 1.7 M, posteriormente los tubos se centrifugaron durante 5 min. a una velocidad de 14,000 rpm, la absorbancia de la proteína libre en el sobrenadante fue medida a 280 nanómetros. Esta metodología fue empleada para probar la actividad de cada uno de los inhibidores utilizados. Las concentraciones a las cuales se utilizaron los inhibidores en este experimento fueron de 10 mM para el E64, 100 mM para la pepstatina y de 100 mM para TLCK y TPCK (Tabla 2).

F) Cálculos estadísticos

Los datos fueron obtenidos en experimentos por duplicado con el fin de minimizar el error, manejando los distintos días probados por separado. De éstas lecturas de absorbancia se obtuvo un promedio y se calculó la desviación estándar. Para obtener el porcentaje de inhibición el valor de absorbancia del sustrato en presencia del inhibidor se dividió entre el valor del control experimental.

Para corroborar los resultados obtenidos se decidió analizarlos mediante la *t* de student, ordenándolos por día de alimentación, también se ordenaron las lecturas de absorbancia de cada control experimental las cuales fueron analizadas con el programa de cómputa llamado Sigma Plot SS550 y se obtuvieron los valores para distinguir las diferencias entre los distintos días postalimentación.

V. Resultados

5.1 Proteínas totales

Para conocer las proteínas de los tejidos del tracto digestivo en diferentes estadios de desarrollo de *R. prolixus* se analizaron por PAGE-SDS extractos del buche, intestino y del contenido estomacal. Para esto se utilizaron concentraciones elevadas de inhibidores de proteasas (10-100 mM), las cuales nos permitieron detectar en buen estado las proteínas presentes al primero, tercero y sexto día postalimentación. Los patrones de proteínas fueron en general similares para un órgano a los distintos días postalimentación, aunque presentaron detalles particulares en cada muestra. En los extractos del buche de chinches recién nacidas sin alimentar se detectaron 9 bandas principales con pesos moleculares de 150, 96, 86, 69, 65, 61, 58, 50 y 48 kDa. Para el primer estadio ninfal, al primer día postalimentación, en el buche se identificaron 14 bandas, entre las cuales se presentaron 7 bandas nuevas con pesos moleculares aparentes de 220, 200, 150, 56, 46, 30 y 16 kDa (Cuadro 3). Al tercer día postalimentación en los extractos del buche se identificaron 16 bandas, apareciendo bandas nuevas de 59 y 49 kDa (Fig. 5). Al sexto día postalimentación el buche disminuyó la intensidad relativa de la mayor parte de las proteínas y se distinguieron 4 bandas principales con pesos moleculares de 86, 61, 16 y una muy intensa de 30 kDa (Fig. 5). Por otro lado, para los extractos del buche de adultos al primero, tercero y sexto día, se distinguieron 13 bandas, las cuales varían a los distintos días postalimentación aunque en general se sigue el mismo patrón, cuyos pesos moleculares aparentes son de 200, 150, 130, 129, 96, 86, 61, 58, 50, 48, 46, 27 y 16 kDa (Fig. 5).



U.N.A.M. CAMPUS IZT.

Buche Intestino CEstom Buche Intestino CEstom
Ninfas Ninfas Ninfas Adultos Adultos Adultos

MW 0 1 3 6 0 1 3 6 1 3 6 1 3 6 1 3 6 1 3 6 S

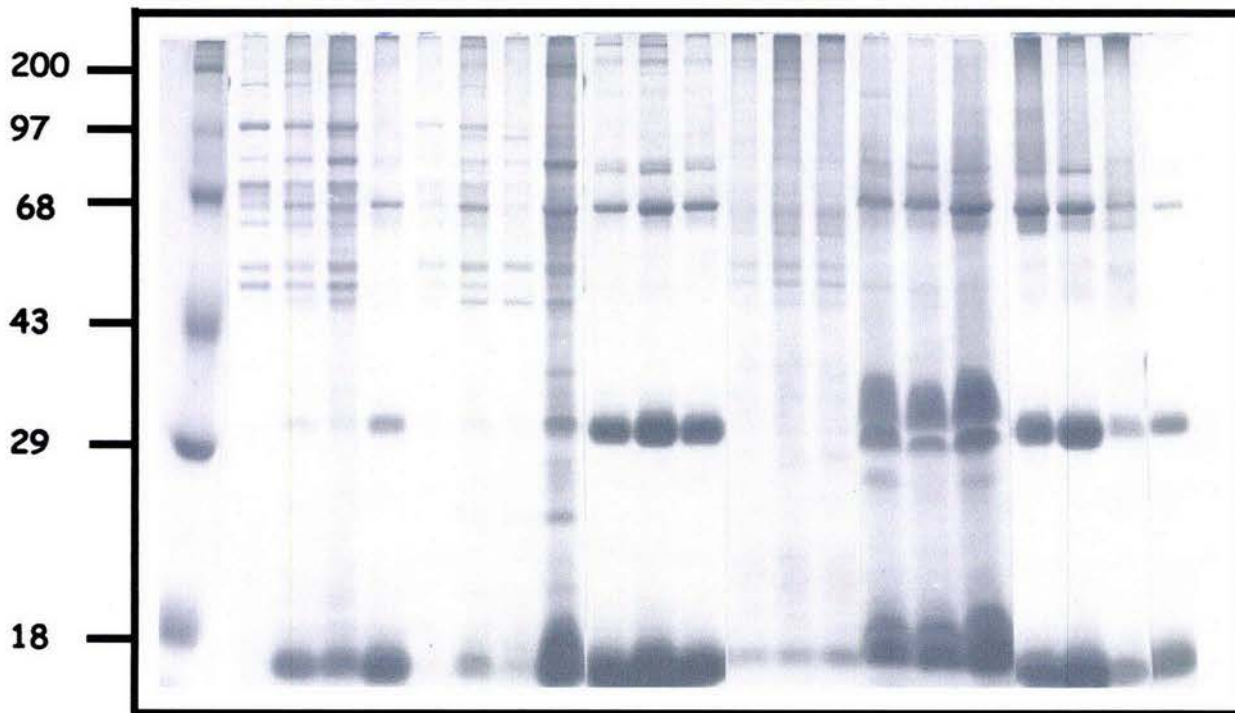


Fig. 5. Proteínas totales en el tracto digestivo y contenido estomacal de distintas fases de desarrollo y a distintos días postalimentación de *R. prolixus*. Carriles: MW= marcador de peso molecular, 0= recién nacidas sin alimentar, 1°= Ninfas de primer estadio alimentadas al primer día, 3°= Ninfas de primer estadio al tercer día postalimentación, 6°= Ninfas de primer estadio al sexto día de alimentación, S= control de sangre de conejo, CEstom ninfas= contenido estomacal de ninfas y adultos.

Proteínas	No. de Proteínas	Peso molecular kDa
Buche rn-alim	9	150,96,86,69,65,61,58, 50,48
Buche Ninfa 1° día	14	220,200,150,86,69,65,61, 58,56,50,48,46,30,16
Buche Ninfa 3° día	16	220,150,96,94,86,69,65,61, 59,58,56,50,49,48,46,16
Buche Ninfa 6° día	4	86,61,30,16
Cont Estom. Rnacidadas	9	220,210,150,129,86,85,61,29,14
Cont Estom. Adultos	6	170,87,86,61,29,14
Buche Adultos 1°, 3°, 6°	13	200, 150, 130, 129, 96, 86, 61, 58, 50, 48, 46, 27,16

Cuadro 3. Proteínas totales del buche de *R. prolixus* durante los distintos días postalimentación. Buche rn-alim= buche de recién nacidas sin alimentar, Buche Ninfa 1° día= buche de primer estadio a un día, Buche Ninfa 3° día= buche de primer estadio al tercer día, Buche Ninfa 6° día= buche de primer estadio al sexto día. Buche Adult 1°, 3°, 6°= buche de adultos al primero, tercero y sexto día postalimentación, Cont. Estom. Rnacidadas= contenido estomacal de recién nacidas, Cont. Estom. Adultos= Contenido estomacal de adultos.

En el intestino de chinches recién nacidas sin alimentar se apreciaron 8 bandas mayoritarias, las cuales mostraron pesos moleculares aproximados de 96, 86, 69, 61, 58, 50, 48 y 46 kDa. (Fig. 5). En intestino del primer estadio al primer día postalimentación se distinguieron 16 bandas de 210, 129, 96, 94, 86, 85, 69, 65, 61, 58, 50, 48, 46, 30, 25 y 16 kDa. Al tercer día fueron 10 las bandas que apreciamos entre ellas están la de 129, 96, 86, 85, 69, 61, 50, 48, 46 y 16 kDa, pero al sexto día el número de bandas se incrementó a 20, entre las cuales se localizan las bandas nuevas cuyos pesos moleculares fueron de 65, 59, 56, 42, 27 y 22 kDa aproximadamente. Para extractos de intestino de adultos se apreciaron 10 bandas de 140, 94, 86, 85, 61, 48, 42, 29, 28 y 16 kDa (Cuadro 4).

También se analizó el contenido estomacal de los insectos en distintas fases de desarrollo y períodos postalimentación, con lo que se encontró que en chinches recién nacidas se presentaron 9 bandas principales con pesos de 220, 210, 150, 129, 86, 85, 61, 29 y 14 kDa, a comparación del contenido estomacal de adultos donde se distinguieron 7 bandas de 170, 87, 86, 61, 58, 29 y 14 kDa aproximadamente (Fig. 5).

Proteínas	No.de proteínas	Peso molecular kDa
Intestino rn-alim	8	96,86,69,61,58,50,48,46
Intestino Ninfa 1° dia	16	210,129,96,94,86,85,69,65,61,58, 50,48,46,30,25,16
Intestino Ninfa 3° dia	10	129,96,86,85,69,61,50,48,46,16
Intestino Ninfa 6° dia	20	210,170,129,96,86,69,65,61,59,58, 56,50,48,46,42,30,27,25,22,16
Cont Estom Rnacidadas	9	220,210,150,129,86,85,61,29,14
Cont Estom Adultos	7	170,87,86,61,58,29,14
Intestino Adultos 1°,3°,6°	10	140,94,86,85,61,48,42,29,28,16

Cuadro 4. Proteínas totales del intestino de *R. prolixus* durante los distintos días postalimentación. Intestino rn-alim= intestino de recién nacidas sin alimentar, Intestino Ninfa 1° día= intestino de ninfa a un día, Intestino Ninfa 3° día= intestino de ninfa al tercer día, Intestino Ninfa 6° dia= intestino de ninfa al sexto día Intestino Adultos 1°, 3°, 6°= intestino de adultos al primero, tercero y sexto día postalimentación, Cont. Estom. Rnacidadas= contenido estomacal de recién nacidos, Cont. Estom. Adultos= Contenido estomacal de adultos.

5.2. Detección de la actividad proteolítica en el tracto digestivo

Actividad proteolítica en geles copolimerizados con diferentes sustratos

La identificación de la actividad proteolítica en el tracto digestivo de *R. prolixus* fue visualizada por electroforesis en geles de sustrato. Para la detección de actividad en los extractos del tracto digestivo de este insecto, las muestras se obtuvieron rompiendo mecánicamente los tejidos en PBS, y debido a que estos extractos no presentaron actividad en los geles de sustrato, se decidió preparar extractos con detergentes iónicos como el NP40 y el deoxicolato de sodio (DOC). Se realizaron ensayos de digestión de geles copolimerizados con hemoglobina aplicando extractos del buche, preparados con concentraciones crecientes del detergente NP40 y solo al llegar a la concentración de 1 %, se detectó una sola banda con baja migración (Fig. 6A). Por otra parte, en geles copolimerizados con caseína, al probar los extractos del intestino preparados con una mezcla de detergentes NP40 + DOC a una concentración de 1 %, fue posible distinguir una banda con un peso molecular aparente de aproximadamente 60 kDa (Fig. 6B). Cuando se probaron los extractos del control positivo de papaya preparados bajo las mismas condiciones no fue posible evidenciar alguna banda debido, tal vez a la autodigestión que sufrieron estos extractos, o bien a que el uso de detergentes pudo cambiar la conformación de las proteasas de la papaya, haciéndolas inactivas (Fig. 6).

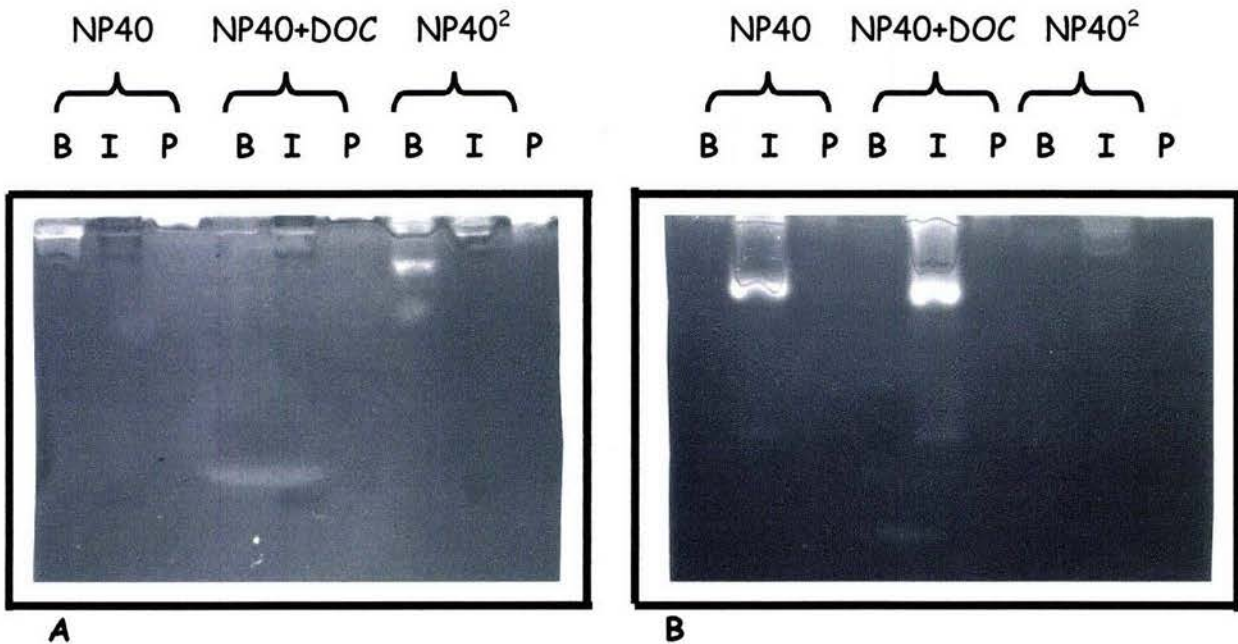


Fig. 6. Geles de poliacrilamida al 8 % copolimerizados con los sustratos de hemoglobina (Panel A) y caseína (Panel B) para detectar actividad proteolitica, B= extractos del buche, I= extractos del intestino y P= extractos de papaya. Las mezclas de detergentes usados en la preparación de los extractos fueron: NP40= extractos con el detergente no iónico NP40 (1 %), NP40 + DOC= mezcla de deoxicolato de sodio y NP40 (1 % cada uno), NP40²= detergente NP40 al 2 %.

5.3. Identificación de las proteasas del tracto digestivo de *R. prolixus*.

Ensayos de proteasas por digestión de bandas

El análisis de la actividad de proteasa por digestión de un sustrato conocido, se basó en mezclar la fuente de proteasas con un sustrato protéico ya caracterizado en su comportamiento electroforético y visualizar la digestión de las bandas de proteínas correspondientes al sustrato conocido. En los geles control se observó que la preparación comercial de caseína presentó dos bandas principales con pesos moleculares aparentes de 33 y 25 kDa las cuales probablemente corresponden a las formas α y β de la caseína (Fig. 7) (vid anexo).

Los extractos del buche digirieron la banda α pero no la β (Fig. 7), mientras que los extractos de intestino y el control de papaya digirieron ambas bandas.

Al probar en estos ensayos el efecto de diferentes inhibidores de proteasas encontramos que el buche en presencia de una concentración de 10 mM de E64 digirió la banda α pero no la β , en los extractos de intestino se apreció digestión de ambas bandas, y una inhibición parcial de la digestión de ambas bandas en los extractos de papaya (Fig. 7A).

La pepstatina a una concentración de 100 mM inhibió la digestión en los extractos del buche observándose las bandas α y β (Fig. 7A), en contraste este inhibidor no tuvo efecto sobre la actividad presente en los extractos de intestino y en papaya (Fig. 7A). El TLCK a una concentración de 100 mM inhibió parcialmente la actividad del buche ya que se apreció la banda β y la banda α disminuyó su intensidad pero no desapareció totalmente. En los extractos del intestino y de papaya este inhibidor no presentó ningún efecto sobre la actividad de proteasa (Fig. 7B). Al inhibir con TPCK a la misma concentración, en el buche las bandas α y β , fueron parcialmente digeridas y se apreciaron muy tenues en extractos de intestino y ninguna en la papaya (Fig. 7B).

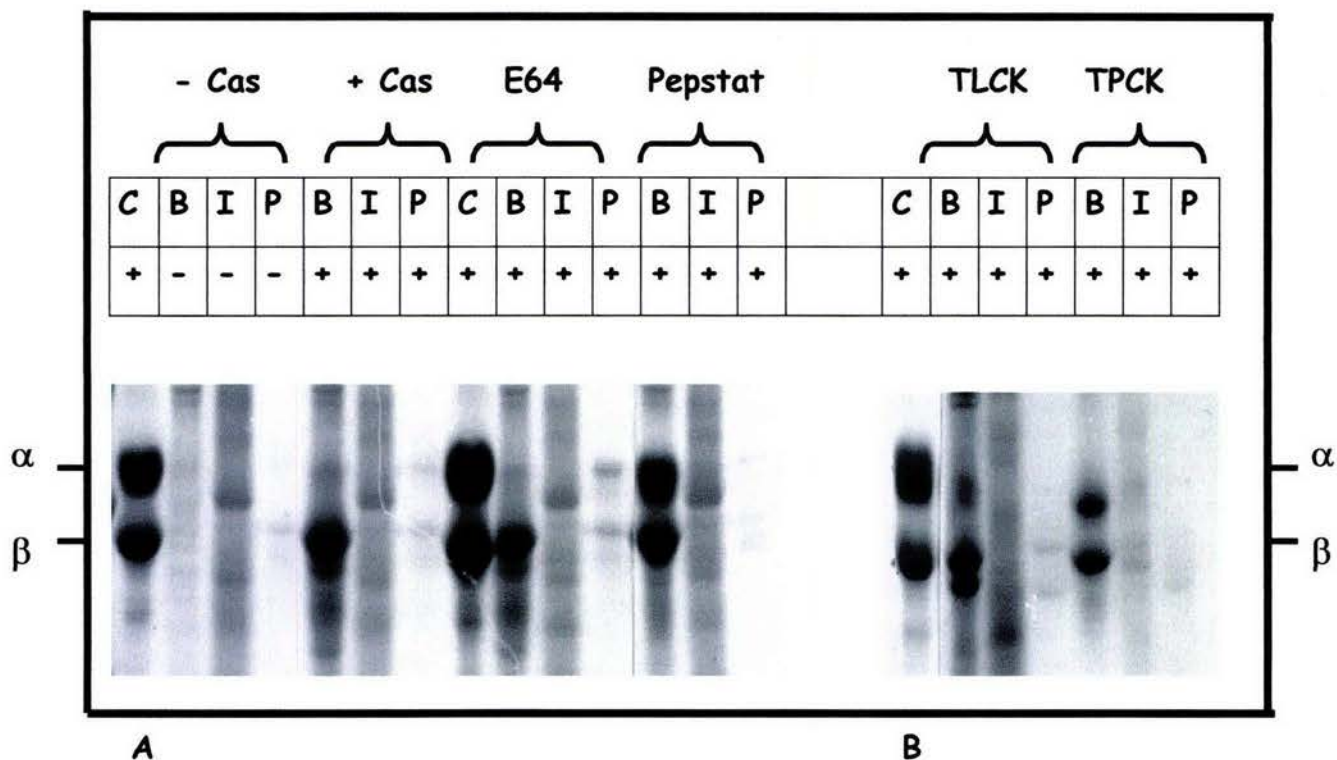


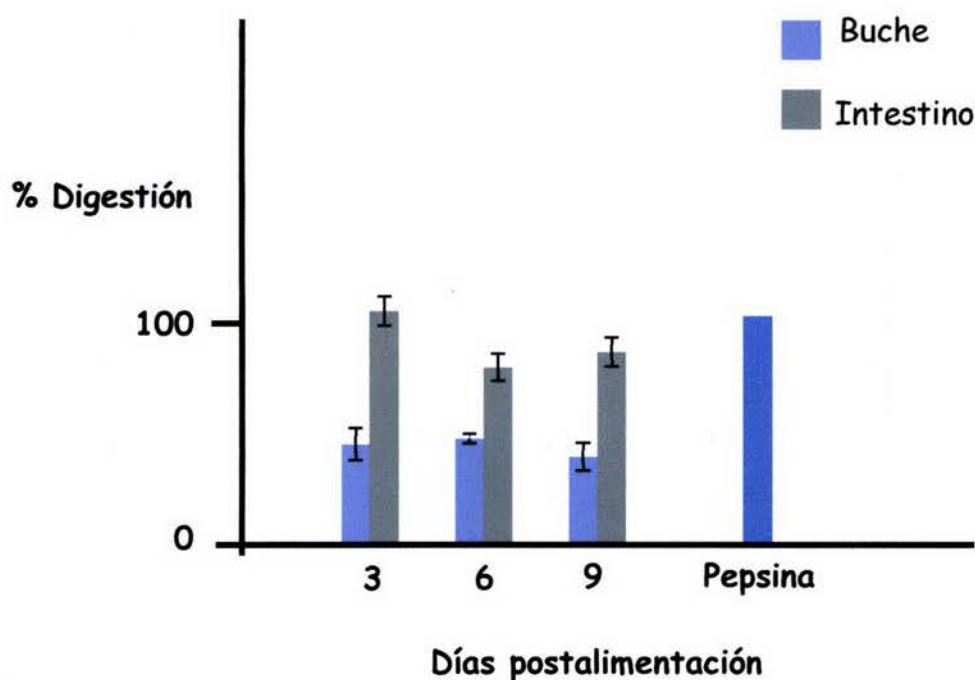
Fig. 7. Efecto de los inhibidores de cisteína, serina y asparto proteasas sobre las actividades enzimáticas del tracto digestivo de *R. prolixus* en geles copolimerizados con caseína que fueron expuestos a extractos del tracto digestivo del triatomino. Panel A= Se utilizaron los inhibidores E64 y Pepstatina, mientras que Panel B= corresponde al TLCK y TPCK. Carriles: C= preparación comercial de caseína donde se distinguen las bandas α y β características de este sustrato B= extractos del buche, I= intestino, P= papaya, - Cas= extractos sin caseína e incubados a temperatura ambiente, + Cas= extractos con caseína e incubados a 37°C. Los recuadros de la parte posterior corresponden a las fotografías de la parte anterior.

5.4. Ensayos espectrofotométricos de la actividad proteolítica del tracto digestivo de *R. prolixus*

Para detectar la actividad de los ensayos espectrofotométricos de la actividad proteolítica de *R. prolixus* se mezcló la caseína con extractos del buche, intestino y del control positivo de papaya y la absorbancia fue leída a 280 nm (Umezawa, 1972). Además se empleó, como enzima control, pepsina porcina comercial. Para estos ensayos se trabajó con extractos de órganos

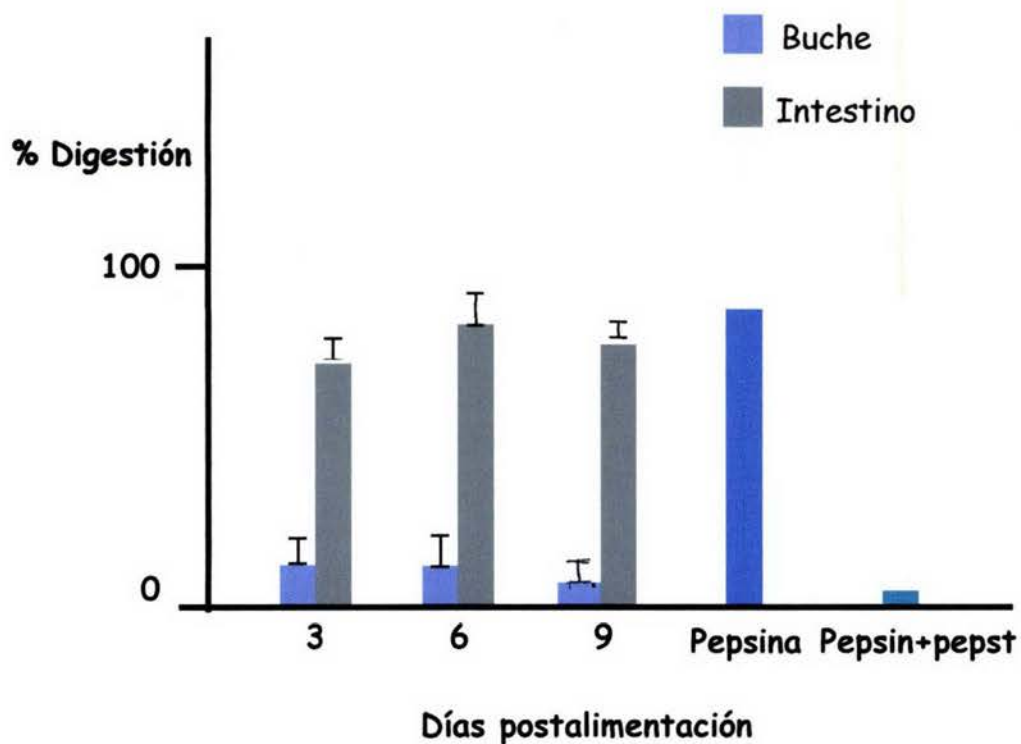
de los insectos adultos obtenidos a diferentes días postalimentación y se observó el efecto de varios inhibidores. En todos los casos la digestión en presencia del inhibidor se expresó como el porcentaje de digestión con respecto al valor de la misma muestra en ausencia del inhibidor. Para el E64 a una concentración de 10 mM se obtuvo un valor de digestión igual a 22 %, la pepstatina 100 mM redujo la digestión al 33 %, y los inhibidores TLCK y TPCK a las mismas concentraciones presentaron valores de 11.2 y 73 % respectivamente. Cuando se observó el efecto del E64 10 mM sobre los extractos del buche al tercer día se apreciaron valores de 43.99 ± 7.2 . Al probar E64 a la misma concentración en extractos de intestino se obtuvo un valor de 102.39 ± 6.4 , al sexto día los valores obtenidos al probar con el E64 fueron de 46.37 ± 2.2 para el buche, y de 77.75 ± 5.9 para el intestino. Al noveno día los datos mostraron un decremento, observando para el buche un valor de 38.42 ± 6 y para el intestino 84.43 ± 6.5 (Cuadro 6). Por otro lado al probar con la pepstatina, a una concentración de 100 mM, en los extractos del buche al tercer día se apreció un valor de 14.01 ± 4.3 , en los extractos de intestino con el mismo inhibidor el valor fue de 81.80 ± 3.4 , mientras que al sexto día se obtuvo para el buche un valor de 13.82 ± 5.3 , y para el intestino 94.87 ± 5.2 , al noveno día se obtuvieron valores de 1.14 ± 1.5 para el buche y de 88.2 ± 2.6 para el intestino (Cuadro 8). Con el TLCK a una concentración de 100 mM al tercer día el valor fue de 55.98 ± 12 para los extractos del buche, y de 81.48 ± 4.2 para el intestino, al sexto día los valores fueron para buche de 38.45 ± 2.9 , y de 84.76 ± 4.5 para intestino y al noveno día se obtuvo un valor de 21.17 ± 4.3 para buche y de 75.74 ± 5.6 para el intestino (Cuadro 8). También se probó con TPCK 100 mM donde se obtuvieron, al tercer día, valores de 53.07 ± 10 para el buche, de 54.97 ± 19 para el

intestino, comparando con el sexto día obtuvimos valores de 37.31 ± 2.9 para el buche y para el intestino el valor fue de 77.93 ± 5.9 . Mientras que al noveno día los valores fueron de 18.21 ± 11 para extractos del buche, y para el intestino fue de 97.54 ± 14 (Cuadro 9).



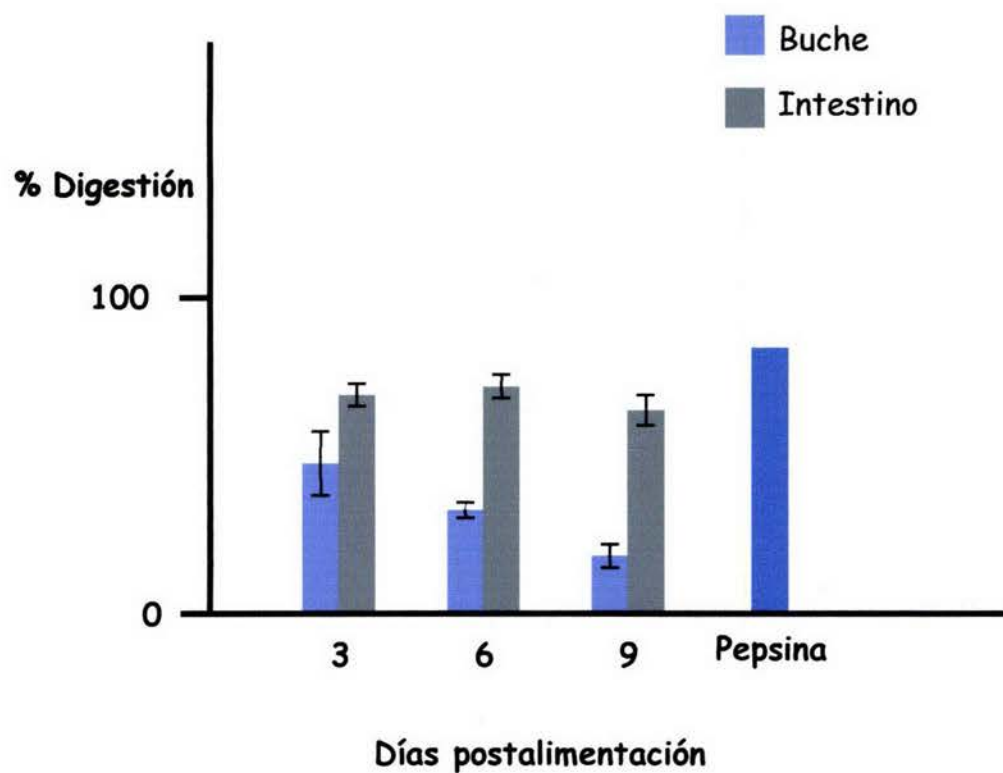
Días postalimentación	Actividad Relativa %		
	3	6	9
Blanco	0.0002	0.0002	0.0002
Buche	43.9 ± 7.2	46.37 ± 2.2	38.42 ± 6
Intestino	102.39 ± 6.4	77.75 ± 5.9	84.43 ± 6.5
Pepsina			100

Cuadro 5. Ensayos espectrofotométricos de la actividad proteolítica bajo el efecto del inhibidor de cisteína proteasas E64 en el tracto digestivo de *R. prolixus*.



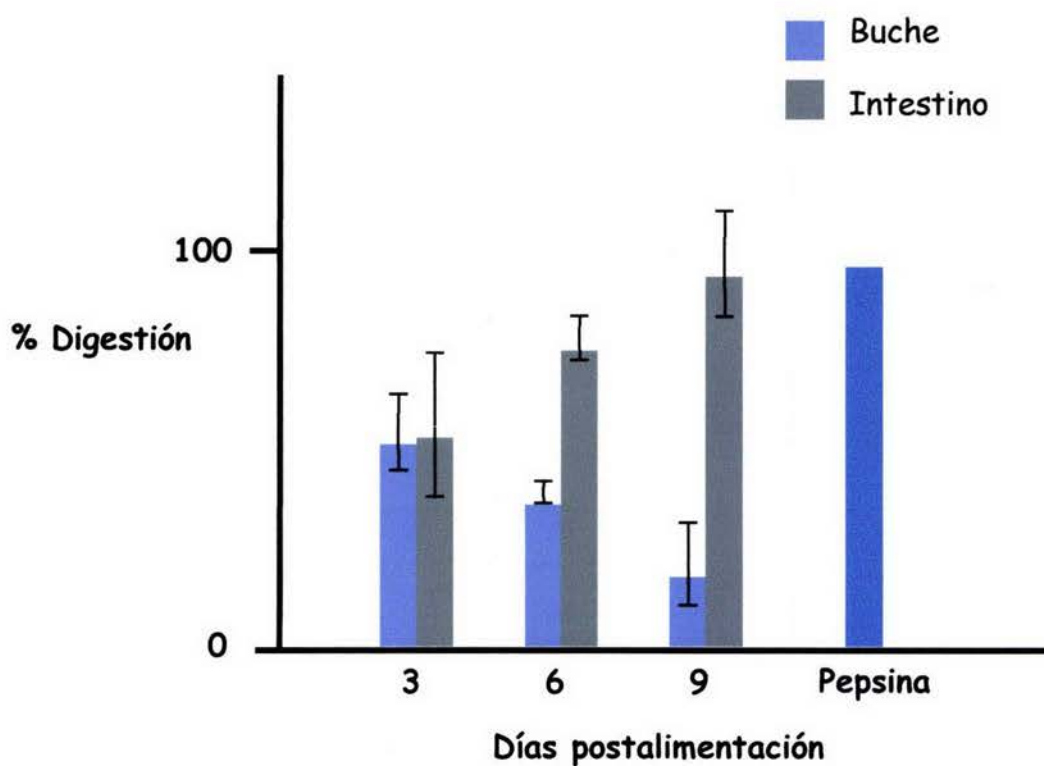
Días postalimentación	Actividad Relativa %		
	3	6	9
Blanco	0.0002	0.0002	0.0002
Buche	14.01 ± 4.3	13.82 ± 5.3	1.14 ± 1.5
Intestino	81.8 ± 3.4	94.87 ± 5.2	88.2 ± 2.6
Pepsina			100
Pepsina pepstatina			5.5

Cuadro 6. Ensayos espectrofotometricos de la actividad proteolítica bajo el efecto del inhibidor de asparto proteasas pepstatin en el tracto digestivo de *R. prolixus*.



Días postalimentación	Actividad Relativa %		
	3	6	9
Blanco	0.0002	0.0002	0.0002
Buche	55.98 ± 12	38.45 ± 2.9	21.17 ± 4.3
Intestino	81.48 ± 4.2	84.76 ± 4.5	75.74 ± 5.6
Pepsina			100

Cuadro 7. Ensayos espectrofotométricos de la actividad proteolítica bajo el efecto del inhibidor de serina proteasas TLCK en el tracto digestivo de *R. prolixus*.



Días postalimentación	Actividad Relativa %		
	3	6	9
Blanco	0.0002	0.0002	0.0002
Buche	53.07 ± 10	37.1 ± 2.9	18.21 ± 11
Intestino	54.97 ± 19	77.93 ± 5.9	97.54 ± 14
Pepsina			100

Cuadro 8. Ensayos espectrofotométricos de la actividad proteolítica bajo el efecto del inhibidor de serina proteasas TPCK en el tracto digestivo de *R. prolixus*.

Valor de la prueba t de student

La t de student es una distribución simétrica, con media cero y de forma muy semejante a la normal estándar, es una distribución unimodal, asíntotica en el eje horizontal y dependiente de los grados de libertad (Dowdy, 1991). En general tiene una varianza mayor que 1, la cual tiende hacia 1 a medida que el tamaño de la muestra se hace grande (Daniel, 1984).

Analizando el comportamiento a los 3 distintos días postalimentación observamos que al calcular la t de student en el buche con E64 se distinguen valores que oscilan entre 1.82 y 3.03, lo que indica que la actividad del buche es muy sensible además de mantenerse constante (Cuadro 6). Cuando los datos del buche fueron analizados bajo el efecto del inhibidor pepstatina se apreciaron valores para t que van de 1.39 a 3.88, manteniéndose de la misma forma la actividad (Cuadro 7). Al realizar el análisis estadístico cuando el buche se probó con TLCK los valores se encontraron entre el rango de 2.41 a 3.53, presentando una actividad elevada muy sensible a los cambios (Cuadro 8), mientras que cuando estos datos se analizaron bajo el inhibidor TPCK los valores obtenidos para t se encontraron entre 1.05 a 1.71, se presentó una actividad alta y sensible que va disminuyendo (Cuadro 9). Al analizar los datos del intestino bajo el inhibidor E64 se apreció que los valores de t se encuentran entre 3.50 a 4.02, disminuyendo la sensibilidad de la media. Cuando los datos del intestino se analizaron bajo el inhibidor pepstatina sus valores fueron de 1.25 a 1.76, donde la media se mantiene constante. Cuando los datos del intestino fueron analizados bajo el efecto del inhibidor TLCK los valores se encontraron entre 1.46 a 1.82, indicando también que la actividad se mantiene constante.

Al analizar los datos bajo el inhibidor TPCK en el intestino obtuvimos para t valores de 1.33 a 2.27, encontrando que la actividad aumenta cuando la t es sensible (Cuadro 9 y 10).

Prueba t de student.

	Buche			Intestino		
	3°-6°	6°-9°	3°-9°	3°-6°	6°-9°	3°-9°
E64 10 mM	3.03	1.82	2.03	4.02	3.92	3.5
Pepstatina 100 mM	3.88	1.39	2.75	1.41	1.25	1.76
TLCK 100 mM	3.53	3.08	2.41	1.46	1.82	1.62
TPCK 100 mM	1.71	1.49	1.05	2.27	1.85	1.33

Cuadro 10. Valores de la prueba estadística t de student para los controles del tracto digestivo de *R. prolixus* comparando al 3°, 6° y 9° día postalimentación.

VI. Discusión

6.1. Proteínas totales

Con el fin de detectar la mayor cantidad de proteínas del tracto digestivo de este insecto, se decidieron realizar pruebas con inhibidores de proteasas a elevadas concentraciones, utilizando para ello concentraciones superiores a 10 y 100 μM .

Las proteínas totales de las distintas partes del tracto digestivo de *R. prolixus* de los distintos días postalimentación probados no mostraron cambios significativos entre las muestras aunque en los extractos del buche de ninfas sin alimentar se apreció un menor número de bandas que en aquellas que ya se habían alimentado al 1° y 3° día seguramente por la presencia de proteínas del alimento, mientras que para el 6° día las bandas no cambiaron significativamente lo que indica, que en este período la digestión es lenta. En los extractos del intestino de ninfas se distinguió el mismo comportamiento para el 1° y 3° día, en tanto que al día 6 el número de bandas aumentó notablemente en intestino, indicando que la actividad proteolítica en estos triatomíneos se encuentra ligada primordialmente a este órgano (Chapman, 1971). En cuanto al número de bandas encontradas podemos agregar que éstas mantienen un patrón constante, también se observaron bandas extra de péptidos pequeños, probablemente productos de la digestión de la sangre. En general se encontró que tanto en ninfas como en adultos la digestión ocurrió muy lentamente en los 9 días postalimentación.

En el contenido estomacal de ninfas no se apreciaron diferencias entre los distintos días probados, en general todas las bandas siguieron un comportamiento idéntico al del control de sangre de conejo.

Para los extractos de buche en adultos al 1º, 3º y 6º día no se observaron diferencias (Cuadro 3). Al 1º día postalimentación en el control de intestino de adultos las bandas se notaron más marcadas, conservándose sin ninguna variación durante los 3 días analizados, (Fig. 5, Cuadro 4). En el contenido estomacal de adultos no se apreciaron diferencias entre los distintos días probados.

Para estudiar el proceso digestivo de *R. prolixus* durante el desarrollo de esta tesis se probaron diversos ensayos de actividad enzimática como: la digestión de Azocoll (Lindquist, 1986), los ensayos de endopeptidasas y los de proteasas ácidas (Beynon, 1989), y debido a que con varios de ellos se obtuvieron resultados irregulares, estas metodologías fueron descartadas, y se reportan los resultados obtenidos con los métodos de proteínas totales, actividad proteolítica en geles copolimerizados con diferentes sustratos (Heussen, 1980), ensayos de proteasas por digestión de bandas (Zhao, 1998) y ensayos de la actividad de enzimas tipo pepsina (Umezawa, 1972) que mostraron los resultados más reproducibles.

6.2. Caracterización de las proteasas del tracto digestivo de *R. prolixus*.

Actividad proteolítica en geles copolimerizados con diferentes sustratos

La actividad proteolítica en el tracto digestivo de *R. prolixus* fue estudiada por PAGE en geles de sustrato. Esta técnica permite detectar la actividad de diversas enzimas, gracias a que después de la separación electroforética éstas son renaturalizadas in situ, y actúan sobre el sustrato incluido en el gel (Sanford & Springhorn, 1980).

La caseína es frecuentemente usada como sustrato específico para la determinación de actividad proteolítica por ser económica fácilmente obtenible de una fuente comercial y estable bajo condiciones de almacenaje (Reimerders 1974).

La caseína es digerida por enzimas tipo catepsinas (Houseman & Downe, 1982) y se sabe que la principal actividad digestiva en *R. prolixus* se debe a una catepsina tipo B (Terra *et al*, 1988) o bien a una tipo L (López Ordoñez, *et al*, 2001). Sin embargo no se conoce ni el número ni el peso molecular de las especies activas. Sobre este sustrato se encontró actividad en extractos del intestino, preparados con el detergente no iónico NP40 a una concentración de 1 %, usando un pH de 5 y 45 °C, la necesidad de añadir un detergente a los extractos se puede deber a que las enzimas están adosadas a membranas (Ribeiro, 1984) o bien a que algunas enzimas proteolíticas son funcionales cuando se solubilizan con un detergente estándar entre el rango de 0.1 al 1 %. Estas condiciones se han usado en ensayos con leguminosas y mamíferos que poseen endopeptidasas del tipo de las cisteína proteasas (Krupa 2000).

En otros ensayos se usó como sustrato a la hemoglobina, la cual es la proteína mayoritaria de la sangre y debe ser digerida en el tracto digestivo de este insecto. De manera similar a lo observado con caseína como sustrato, se detectó actividad de proteasa cuando los extractos del buche fueron incubados en presencia del detergente no iónico NP40 a una concentración de 1 %.

En condiciones similares un tejido rico en proteasas, los extractos del fruto de papaya, no presentaron actividad proteolítica lo cual fue ocasionado quizás

a la autodigestión de los extractos o, alternativamente, a que el uso de detergentes pudo inactivar a estas proteasas.

6.3. Tipos de proteasas presentes en el tracto digestivo

Ensayos de proteasas por digestión de bandas

El ensayo que proporcionó los datos más reproducibles fue el de digestión de un sustrato conocido y el análisis electroforético de los productos generados, usando caseína como sustrato (digestión de bandas) (Zhao, 1998). Las preparaciones comerciales de caseína de bovino están compuestas de varias especies de caseína llamadas α , β y κ . En adición están presentes aproximadamente del 10 al 20 % de elementos llamados caseína menores, que incluyen las formas γ , R, S, T, y α_2 -5 caseína.

Se ha observado que las preparaciones comerciales de caseína pueden estar contaminadas además por albúminas y globulinas (Reimerdes, 1974). En nuestros experimentos observamos dos bandas principales de proteína en nuestras preparaciones de caseína las cuales pueden corresponder a las dos bandas observadas: la banda A es la α caseína y la banda B la β caseína cuyos pesos moleculares son de 33 y 25 kDa respectivamente (Walstra, 1984).

El E64 es un inhibidor irreversible de tiol proteasas, el cual inhibió en los extractos de buche la banda A indicando que la actividad que digiere este sustrato es el de las cisteína proteasas. Los extractos del intestino tratados con E64 digirieron la banda A, mientras que en el control de papaya se apreciaron las bandas A y B confirmando que en este sistema se detectan adecuadamente cisteína proteasas. Cuando los extractos del buche fueron tratados con pepstatina se apreció inhibición en ambas bandas, comprobando la presencia de asparto proteasas, tal como lo afirman Houseman & Downe

(1982) donde al utilizar una proteasa del tracto digestivo de *R. prolixus* y basándose en el efecto de inhibidores, agentes quelantes, agentes sulfhidril y un pH óptimo para la detección de actividad, se describieron dos actividades principales de proteasa como responsables de la digestión. Estos autores reportaron que la proteasa más abundante hidroliza BAPA a pH de 5.5 y se ve pobremente afectada por pepstatina. Esta enzima corresponde a una catepsina tipo B (una cisteína proteasa) la cual es responsable del 85 % del total de la actividad proteolítica en el intestino. Las otras actividades hidrolizan BTEE y son inhibidas por pepstatina.

Esta es una proteasa menor y corresponde a una catepsina tipo D (una asparto proteasa) (Terra *et al.*, 1988). Estos resultados concuerdan con lo reportado por García *et al* (1978) quienes reportaron la purificación de una proteasa del intestino dependiente de grupos sulfhidrilo, la cual hidroliza BTEE (un sustrato para quimiotripsina y caseína). Sus experimentos con inhibidores sugieren que una proteasa tipo pepsina es responsable de la digestión de la sangre a la cual se le llamo tiol proteasa de *R. prolixus*. Otros estudios sugieren que esta tiol proteasa se encuentra en pequeñas cantidades en el intestino y no participa en la digestión de la sangre (Terra *et al*, 1988).

6.4. Ensayos espectrofotométricos de la actividad proteolítica del tracto digestivo de *R. prolixus*

Los ensayos espectrofotométricos de la actividad proteolítica fueron medidos por el cambio de absorbancia a 280 nm durante la hidrólisis de la caseína (Umezawa, 1972). En base a los datos obtenidos midiendo la digestión de la caseína en solución e inhibiendo con reactivos específicos contra los

distintos tipos de proteasas se propone un modelo preliminar de la digestión en el buche y el intestino de *R. prolixus*.

En el buche a tiempos tempranos existen enzimas sensibles a los inhibidores de serina - cisteína proteasas (TLCK, TPCK y E-64). Esta actividad disminuyó al correr de los 9 días analizados. Estos datos sugieren la presencia de enzimas tipo catepsinas, las cuales serían responsables de la digestión temprana, disminuyen con la digestión y tal vez se incrementen al término del ciclo digestivo como ocurre en otros insectos hematófagos (Lehane, 1996).

Al comparar estadísticamente los valores de los extractos del buche cuando fueron probados con el inhibidor de cisteína proteasas E-64 distinguimos que las medias de las muestras no son significativamente diferentes entre los 3 días probados, lo que indica que la actividad del buche se mantiene constante (Cuadro 6). Por otra parte en el buche no se puede descartar la existencia de enzimas tipo tripsinas, tal vez aún no descritas. De hecho, en experimentos realizados en el laboratorio se detectó de manera preliminar por medio del método de RT-PCR a enzimas de este tipo usando iniciadores genéricos de serina - proteasas (Lopez-Ordoñez, comunicación personal). Es notable que el pepstatin, inhibidor de catepsinas tipo D (asparto-proteasas) tuvo un fuerte efecto sobre el proceso de digestión en el buche, indicando la presencia de este tipo de enzima en el buche (Terra *et al.*, 1988), y dado que los valores de t no son significativamente diferentes entre los 3 días analizados, esta actividad se mantiene en el buche durante todo el proceso digestivo (Cuadro 7). Cabe mencionar que este mecanismo se ha observado en las catepsinas L *in vivo* (Kirschke y Wiederanders 1994).

Es posible que varias isoformas de cisteína y asparto proteasas puedan ser detectadas en el tracto digestivo de *R. prolixus* (Lam, 1999).

Al probar con el inhibidor de serina proteasas TPCK distinguimos que los extractos del buche presentaron un comportamiento semejante que cuando fueron tratados con TLCK, apreciando menos digestión en los primeros días, e invirtiéndose el efecto hacia el día 9 donde la actividad aumentó. Los valores de *t* mostraron que si existen diferencias significativas entre los días probados, presentando una actividad elevada y sensible que va disminuyendo al transcurrir el período postalimentación.

En cuanto al intestino, la actividad digestiva total no fue muy intensa y fue principalmente afectada por los inhibidores de serina - cisteína proteasas, lo cual es esperado en base a los reportes anteriores donde se atribuye la digestión intestinal a enzimas tipo catepsina, principalmente del tipo B.

Para el caso de los extractos de intestino se apreciaron valores de actividad altos al 3er día, pero al 6º día estos valores decrecieron y para el día 9 volvió a aumentar la actividad, al comparar estadísticamente las medias encontramos que presentan diferencias significativas entre el día 3º y 9º disminuyendo la sensibilidad de la media. Al analizar los extractos del intestino apreciamos que la actividad mostró una elevada digestión hacia el día 3 y conforme transcurrieron los días, la digestión fue disminuyendo, encontrando además que las medias de las muestras de *t* presentaron diferencias significativas. Cuando los extractos del intestino se analizaron bajo el inhibidor pepstatina se detectó que la media se mantuvo igual que cuando se probó con TLCK, para el caso del TPCK la actividad aumentó cuando la *t* se mostró más sensible. Se piensa que el TLCK y TPCK usualmente inhiben serina proteasas, pero también pueden inhibir cisteína proteasas (Rosenthal, *et al.*, 1998) (Cuadro 9).

Recientemente, este dato se ha precisado con la resolución de la secuencia de una catepsina del intestino de *R. prolixus* que corresponde con una catepsina tipo L (Lopez-Ordoñez, *et al* 2001). Por otro lado, la actividad tipo catepsina fue constante durante el período analizado.

Por otra parte, al analizar las proteínas totales presentes en el contenido intestinal de *R. prolixus*, se observó que si bien se generan productos de digestión en el buche, estos se mantienen constantes en el intestino a lo largo del período analizado. En conjunto estos datos sugieren una rápida digestión inicial en el buche de *R. prolixus*, dependiente de una catepsina tipo D, seguida de una digestión gradual debida a la catepsinas tipo L en el intestino. Este mecanismo explicaría el proceso digestivo de *R. prolixus*, el cual ocurre en períodos que pueden durar hasta varios meses (Terra *et al* 1988), durante los cuales el insecto no se alimenta y debe administrar sus nutrientes obtenidos durante una alimentación de sangre afortunada.

CONCLUSIONES

-El análisis general de las proteínas totales del tracto digestivo de *R. prolixus* a los distintos días postalimentación mostró que en general, tanto ninfas como adultos conservan el mismo patrón.

-Al analizar las proteínas totales del contenido estomacal de *R. prolixus*, se observó que los productos de digestión generados en el buche se mantienen constantes en el intestino a lo largo del período analizado.

-Cuando los extractos del tracto digestivo de *R. prolixus*: buche e intestino fueron incubados en presencia de los detergentes NP40 y DOC a una concentración entre 0.1 y 1 %, fue posible encontrar actividad de proteasa sobre los sustratos de hemoglobina y caseína respectivamente.

-Se detectó que las enzimas proteolíticas del tracto digestivo de *R. prolixus* son funcionales cuando son tratadas a una temperatura de 45 ° C y a un pH ácido de 3-4.

-El buche de *R. prolixus* degrada preferentemente a la forma α de la caseína, mientras que el intestino degradó ambas proteínas.

-En el buche a tiempos tempranos existen enzimas sensibles a los inhibidores de serina - cisteina proteasas, éstas enzimas son del tipo de las catepsinas, las cuales son responsables de la digestión temprana, disminuyen con la digestión y se encuentran al término del ciclo digestivo.

-El pepstatin, inhibidor de catepsinas tipo D (asparto proteasas) tuvo un fuerte efecto sobre el proceso digestivo en el buche indicando la presencia de este tipo de enzimas en este órgano.

-En el intestino, la actividad digestiva no fue muy intensa y fue inhibida por inhibidores de serina - cisteina proteasas, atribuyéndose la digestión intestinal a enzimas tipo catepsinas, principalmente del tipo B.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Barret A. J. 1979. Cathepsin D: the lysosomal aspartic proteinase. *Ciba Found Symp* (75): 37-50.

Barret A. J., Kembhavi, A. A., Brown, M. A., Kirsche, H., Knight, C. J. Tamai, M. and Hanada, K. 1982. L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido (guanidine) butane (E64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* 201, 189-198.

Barreto M. P. 1967. Studies on wild reservoirs and vector of *Trypanosoma cruzi*. XIX Preliminary survey on wild triatomineas in the south eastern region of the state of Goias, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 9 (5): 313.

Beaver P. C.; Jung, R. C. y Cupp, E. W. 1984. *Clinical Parasitology*. 9th. Lea and Febiger. Philadelphia, P.A. Cap. 3. pp. 40-53.

Beynon R. J. and J. S. Bond. 1989. *Proteolytic enzymes*. IRL Press, New York. Cap. 1, Apéndice III.

Billingsley P. F. and Downe, A. E. R. 1985. Cellular localisation of aminopeptidase in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera:Reduviidae) during digestion. *Cell Tiss. Res.* 241: 421-428.

Billingsley P. F. 1988. Morphometric analysis of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera:Reduviidae) midgut cells during blood digestion. *Tissue Cell.* 20 (2): 291-301.

Billingsley P. F. 1990. The midgut ultrastructure of haematophagous arthropods. *An. Rev. Entomol.* 35: 219-248

Billingsley P. F., and M. J. Lehane 1996. *Biology of the Insect Midgut*. Caps. 6, 7 y 8. Chapman & Hall. New York.

- Borror, J. D., D. M. Long., and Charles M. Triplehorn. 1981. An introduction to the study of insects. 5th ed. Saunders College Publishing, New York.
- Chapman, R. F. The insects: Structure and Function. 1971. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Daniel, W. W. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. 1984. Limusa. México.
- Dowdy, S. & Stanley W. 1991. Statics for research. Wiley-Interscience. John Wiley and Sons. New York.
- Downe J. A. T. 1986. Insect Midgut Function. *Adv Insect Physiol.* 19: 187-328.
- Feder D., S. A. O. Gomes., E. S. García and P. Azambuja. 1999. Metalloproteases in *Trypanosoma rangeli*-infected *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94 (6): 771-777.
- Ferreira C., Ribeiro, A. F., García, E. S. & Terra W. R. 1988. Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. *Insect Biochem.*, 18, 521-30.
- García E. S. y García, M. L. M. 1977. Control of protease secretion in the intestine of fifth instar larvae of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 23: 247-251.
- García E. S.; Guimares, J. A. y Prado, J. L. 1978. *Arch. Biochem Biophys.* 188(2): 315-322.
- Gilmour D. 1961. The Biochemistry of Insects. Academic Press, New York.
- Goldsmith R. S.; Zárate, R. J.; Kagan, I.; Jacobson, L. B.; Morales, G. 1973. El potencial de la transmisión de la enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea. Hallazgos serológicos entre donadores en el estado de Oaxaca. *Sal. Pub. Méx.*:4:439.

Grosclaude, F., Mercier, J. C., et Ribadeau Dumas, B., 1970. Caractérisation des variants génétiques des caséines α_1 et β bovines. *Eur. J. Biochem.* 14. 98-106.

Heussen, C & E. B. Dowdle. 1980. Electrophoresis analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate (SDS) and copolymerized substrates. *Analyt. Biochem.* 102: 196-202.

Holt C., Sawyer L. 1988. Primary and predicted secondary structures of the caseins in relation to their biological function. *Protein Eng.* 2: 251-259.

House H. L. 1965. Digestion. In *The Physiology of Insecta* (Edited by Rockstein M.) pp. 815-862. Academic Press, New York.

Houseman J. G., A. E. R. Downe 1980. Endoproteinase activity in the posterior midgut of the *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem.*, 10, 363-6.

Houseman, J. G. y Downe, A. E. R. 1981. Exoproteinase activity in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem.* 12: 579-582.

Houseman, J. G. y Downe, A. E. R. 1982. Characterization of an acidic proteinase from the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Insect. Biochem.* 12: 651-655.

Houseman, J. G.; Downe, A. E. R. y Morrison, P. E. 1985. Similarities in digestive proteinases production in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) and *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Insect Biochem.* 15: 471-474.

Kirschke H., A. Kembhavi., A. J. Barret., and P. Bohley. 1987. Proteases of diverse origin and function. *Meth. Enzymol.* 45: 558-581.

- Kirschke, H. and Wiederanders, B. 1994. Cathepsin S and related lysosomal endopeptidases. *Meth. Enzymol.* 244: 500-511
- Kruppa C. J. and John S. Mort. 2000. Optimization of detergents for the assay of cathepsins B, L, S and K. *Analyt. Biochem.* 283: 99-103.
- Lam, W. Geoffrey M. and Richard C. Rayne. 1999. Isolation and characterisation of two chymotrypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 653-660.
- Lehane M. J. 1991. Biology of blood-sucking Insects. Harper Collins Academic, London. Pp. 288.
- Lehane, M. J. & P. F. Billingsley. 1996. Biology of the insect midgut. Chapman & Hall. New York.
- Lent H. & Wygodzinsky P. 1979. Revision of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am. Mus Nat His*, New York; 163:3.
- Lima M. M.; Rey, L. y de Mello, R. P. 1991. Lethality of triatomines (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chaga's disease, feeding on blood baits containing synthetic insecticides, under laboratory conditions. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 33: 427-433.
- Lindquist, N. R., Senft, W. A., Mckerrow, J., Petitt, M. 1986 *Schistosoma mansoni*. Purification and characterization of the major acidic proteinase from adults worms. *Exp. Parasitol.* 61:398-404
- Lopez-Ordoñez T, M. H. Rodríguez and Fidel de la Cruz Hernández H. 2001. Characterization of a cDNA encoding a cathepsin L-like protein of *Rhodnius prolixus*. *Insect Mol. Biol.* 10 (1) 505-511.
- Lowry O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randal, R. J., 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193. 265-275.

- Mackinlay A. G. and R. G. Wake 1971. Milk proteins: Chemistry and Molecular Biology, Vol. 2, Academic Press, New York, pp. 175.
- Madrell S. H. P. 1969. Secretion by the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*: the movements of ions and water. *J. Exp. Biol.* 51: 71-97.
- Mckerrow H. J. 1989. Parasite proteases. *Exp. Parasitol.* 68, 111-115.
- Moncayo, A. 1992. Chagas disease: Epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. *World Health State-Q*; 45:276.
- Moncayo-Medina A. 1987. Chagas disease. Tropical disease research: a global partnership: eight programme report. Maurice J. Perace AM eds. G eneva: World Health Organization, 87.
- Nakai, S., and Kason, C. 1974. A fluorescence study of the interactions between [Kappa]-and [alpha] s1-casein and between lysozyme and ovalbumin, *Biochim. Biophys. Acta*, 351, 21.
- Oliveira F. A. 1996. Use of new tools for controlling triatomines in different entomologic situations in the American continent. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*; 30 (1): 41-6.
- P erez F. R. 1998. Enfermedad de chagas: Estudio hol stico de la relación huésped-*Trypanosoma cruzi* en individuos de una comunidad del estado de Puebla, Tesis Doctorado CINVESTAV. México. pp. 1-32.
- Persuad C. E. y Davey, K. G. 1971. The control of proteinase synthesis in the intestine of adults of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.* 17: 1429-1440.
- Pipkin A. C. 1968. A temperature controlled feeding apparatus for haematophagus arthropods. *J. Med. Entomol.* 5:507
- Reimerdes E. H. and Klostermeyer H. 1974. Determination of proteolytic activities on casein substrates. *Meth. Enzymol.* 45: 26-28.

- Ribadeau, D. B., Brignon, G., Grosclaude, F., et Mercier, J. C. (1971). *Eur. J. Biochem.*, 20, 264.
- Ribeiro, J. M. C. y Pereira, M. E. A. 1984. Midgut glicosidases of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem.* 14(1): 103-108.
- Ribeiro, J. M. C. 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *A. Rev. Entomol.* 32,463-478.
- Rosenthal P. J., McKerrow, J. H., Aikawa, M., Nagasawa, H. and Leech, J. H. 1998. A malarial cysteine proteinase is necessary for hemoglobin degradation by *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Invest.* 82: 1560-1566.
- Sánchez M. E. 1993. Caracterización de las proteasas de *Anopheles albimanus*. Reporte para obtener el grado de licenciatura en el área de Biología Experimental, UAM- Iztapalapa.
- Sanford, A. Lacks and Sylvia S. Springhorn. 1980. Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* 255 (15): 7467-7470.
- Schofield J. C. 1994. Triatominae, biología y control. Eurocommunica Publications. U. K. Caps. 1, 2, 3, y 4.
- Smith A. J.; Ausubel, M.F.; Brent, R.; Kingston, E. R.; Moore, D. D.; Seidman, G.J.; Struhl, K. 1989 . *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2. John Wiley & Sons. USA. Cap. 1
- Soberón G.; Kumate, J. y Laguna, J. (Compiladores) 1988. Tomo II: Problemas y Programas de Salud. Secretaría de Salud. México.
- Stryer, L. 1995. *Bioquímica*. 4ta ed. Reverté. Barcelona. Caps. 8, 9 y 10.
- Takahashi T. and Tang J. 1981. Cathepsin D from porcine and bovine spleen. *Meth. Enzymol.* 80: 565-581.

- Terra W. R.; Ferreira, C. y García, E. S. 1988. Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hidrolases. *Insect Biochem.* 18: 423-434.
- Terra W. R., Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B, 1-62.
- Thompson, M. P., Farrell, H. M. Jr., et Greenberg, R., (1969). *Comp. Biochem. Physiol.* 28: 471.
- Umezawa, H. 1972. Enzyme inhibitors of microbial origin. In *Methods in Enzymology* (Edited by Lorand L.) Vol. 45, Academic Press, New York, pp. 679-693.
- Urdaneta-Morales S.; Nironi, I. 1996. *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of urban opossums. I-Isolation and experimental infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 91: 399-403.
- Velasco Castrejón O.; Valdespino, J. L.; Tapia Conyer, R., Salvatierra, B.; Guzmán Bracho, C.; Magos, C.; Llausás, A.; Gutierrez, G. Y Sepúlveda, J. 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Pública de México.* 34: 186-196.
- Velasco Castrejón O.; Guzmán Bracho, C. E. Ibáñez-Bernal, S. 1994. En: Valdespino, *et al* (Editores) Enfermedades tropicales en México. Diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica. INDRE. SSA.
- Walstra, P. and R. Jenness. 1984. Dairy Chemistry and Physics. John Wiley and Sons, New York.
- WHO 1991. Chagas Disease. World Health Organization. Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. Geneva. Cap. 7, pp. 79.
- WHO 1993. Chagas Disease. World Health Organization. Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. Geneva. Cap. 7, pp. 67.

WHO 1995. Chagas Disease. World Health Organization. Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. Geneva. Cap. 9, pp. 125.

WHO 1999. Chagas Disease. World Health Organization. Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. Geneva. Cap. 7, pp. 110.

Zhao F. X.; Wang, X. J; Wang, C. Y. 1998. Purification and characterization of a cysteine proteinase from eggs of the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 28: 259-264.

IX. APENDICE

La caseína de *Bos taurus* (Bovino)

La caseína es la principal proteína que constituye la leche de bovino (Holt, 1988). El contenido de caseína representa cerca del 80 % de la fracción proteica de la leche de vaca. Es una fosfoproteína que mantiene el equilibrio entre los agregados solubles. Una propiedad distintiva de las caseínas son su baja solubilidad a pH de 4.6. Por otra parte, muchas de ellas poseen grupos fosfato esterificados a residuos de serina (Nakai and Kason, 1974). Las mejores preparaciones de caseínas de bovino están compuestas por las variaciones genéticas de α , β y κ caseína

Descripción	Proteína madura	Residuos fosforilados	Repetidos	Variantes	Conflictos en la secuencia
Alfa S1 Caseína MW 23-24.5 kDa	16-214	61,63,68,79,8 1,82,83,90, 130 68 (vte. D)	85-99 125-140	29-41 (vte. A) 68-68 (vte. D) 207- 207 (vte. C)	42-42 P-L 50-50 E-Q 95-95 H-Q 143-143 H-D 211-212 MP-IS
Alfa S2 Caseína MW 26 kDa	16-222 Péptido 165-203	23,24,25,31,7 1,72,73,76,14 4,146	76-140 158-222 Casocidina I*		102-102 (Q-E)
Beta Caseína MW 24-25 kDa	16-224	30,32,33,34,5 0 (vte. C)	Carbohidratos 70,72,95,183 unido a O- galNAc	51-52 (vte. E) 52 (vte. C) 82 (A1, B y C) 121 (vte. A3) 137 (vte. B)	108-108 M-L 132-132 E-Q 152-153 LP-PL 190-190 Q-E 210-210 E-Q 215-224 PVRGPFIIIV-DPSLLL

Tabla 3. Características generales de las diferentes fracciones de las caseínas de *Bos taurus* (Bovino). Se muestran los residuos de aminoácidos fosforilados y los repetidos.

	Fragmentos repetidos		Péptido (Casocidina I)
	Péptido señal		Carbohidratos
	Sitios de fosforilacion		Deleciones

[] Región hidrofóbica

[] Región hidrofílica

♠ ♠ Residuos de la γ caseína

♥ ♥ Caseína S y TSA

♣ ♣ Caseína R y TSB

CAS1_BOVIN MKLLILTCLVAVALARPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNEL

CAS2_BOVIN MKFFIFTCLLAVALAKNTMEHVSSSEESII SQETYKQEKNMMAINPSKENLCSTF

CASB_BOVIN MKVLILACLVALALARELEELNVPGEIVE SLSSSEESITRINKKIEKFQSEEQQQTEDEL

CAS1_BOVIN SKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAESISSSEIIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQL

CAS2_BOVIN CKEVVRNANEEEYSIGSSSEESAEVAATEEVKITVDDKHYQKALNEINQFYQKFPQY

CASB_BOVIN QDKIHPPFAQTQSLVYFP GPIPNSLPQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVKEAMAPK

CAS1_BOVIN LRLKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLDA

CAS2_BOVIN LQYLYQGPIVLNPWDQVKRNAVPITPTLNREQLS SEENSKKTVD MESTEVFTKKTCLTE

CASB_BOVIN HKEMPPFKYPVEPFTESQLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLS

CAS1_BOVIN YPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW

CAS2_BOVIN EEKNRLNFLKKISQRYQKFALPQYLKTVYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRYL

CASB_BOVIN LSQSKVLPVPQKAVPYPPQRDMPIQAFLLYQEPVLGPVVRGPFPIIV

Alfa s1 caseína de bovino

La cadena polipeptídica de la alfa caseína contiene 3 regiones hidrofóbicas las cuales van de 1-44, 90-113 y 132-199. Las dos primeras se caracterizan por poseer más residuos básicos que ácidos, en la tercera región se localizan muchos residuos aromáticos. Las regiones 45-89 y 114-131 son hidrofílicas, estas contienen más de la mitad del total de los residuos ácidos, en general siete de los ocho residuos fosfoserilados totales. Otra característica notable de la caseína alfa s1 es la presencia de amino ácidos con cadenas carboxiladas, particularmente ácido glutámico, en la proximidad de dos grupos de residuos fosfoserilados. Los residuos fosfoserilados en la caseína α s1 son arreglados de manera similar a los de la β caseína. En particular en la caseína α s1 las regiones 62-70 contienen cuatro residuos fosfoserilados, los cuales son similares a los de las regiones 13-21 de la β caseína (Ribadeau, 1971). La sustitución de aminoácidos que caracteriza la caseína α s1 variante D y la β caseína variante C provee evidencias de una fosforilación enzimática de la caseína. Las variantes C y D de la caseína α s1 difieren de la variante B por la sustitución de glicina por ácido glutámico en la posición 192 y de triptófano por alanina en la posición 53 respectivamente (Ribadeau, 1971). La variante A se caracteriza por una deleción de trece residuos de aminoácidos en las posiciones 14 y 26 del extremo amino terminal hidrofóbico de la cadena polipeptídica (Grosclaude, 1970). La alteración de la estructura primaria de la proteína ocasiona una modificación de las propiedades fisicoquímicas de la caseína α s1. La caseína α s1 variante A es soluble en presencia de calcio a bajas temperaturas y los micelios de caseína que la conforman son más hidratados y más estables (Thompson, 1969). La variante C se polimeriza a una temperatura más elevada que las variantes B y D.

Alfa s2 caseína de bovino

La cadena de la caseína α s2 comparte el péptido señal en las posiciones 1-15 al igual que todas las muestras de caseína probadas, los fragmentos repetidos se localizan en las posiciones 100-137 y 145-207, además de ser el único tipo de caseína que posee el péptido de Casocidina I en las posiciones 151-189, el cual funciona como inhibidor del crecimiento de algunas bacterias en el sustrato (Tabla 3). Los sitios de fosforilación compartidos se encuentran en las posiciones 8-10, 17, 57-59, 62 y 130-132.

Beta caseína de bovino

10	20	30	40
RELEELNVPG	EIVE SLSSSE	ESITRINK ▲ KI	EKFQ SEEQQQ
50	60	70	80
TEDELQDKIH	PFAQ TQSLVY	PFPGPIF NSL	PQNIPPLT QT
90	100	110	120
PVVVPPFLQP	EVMGVSKVKE	AMAPK ♥ H ♣ KEMP	FPKYPVEPFT
130	140	150	160
ESQSLTLTDV	ENLHLPLPLL	QSWMHQPHQP	LPPTVMFPPQ
170	180	190	200
SVLSLSQ SKV	LPVPQKAVPY	PQRDMPIQAF	LLYQEPVLGP
209			
VRGPFPIIV ▲ ♥ ♣			

Beta caseína de bovino

Las variantes B y C de la β caseína se ven afectadas por las sustituciones de serina por arginina en la posición 123, de ácido glutámico por lisina en la posición 37 y de fosfoserina por serina en la posición 35, éstas difieren de la variante A por una sustitución de prolina por histidina en la posición 67. La caseína γ representa a los fragmentos correspondientes a los residuos 29 a 209, las caseínas llamadas S y TSA corresponden a los residuos 106 a 209 y las caseínas denominadas R y TSB corresponden a los residuos 108 a 209. Todas las sustituciones de aminoácidos diferencian las variantes de la β caseína, además de estar localizadas después del residuo 29, que representa el residuo amino terminal de la γ caseína. El polimorfismo genético de la γ caseína altera el polimorfismo de la β caseína, ya que se ha observado que la ausencia de γ caseína en las leches de vacas homocigóticas depende de la hidrólisis de la γ caseína por una proteasa de la β caseína entre los residuos 28 y 29, la alteración que afecta la β caseína variante C en los residuos 35 y 37 puede inhibir completamente la acción de esta proteasa. En todos los casos está claro que las γ caseínas no son determinadas por dos locus de estructura específica, sino más bien por dos partes del locus de la β caseína variante C (Mackinlay, 1971). La localización de todas las sustituciones de aminoácidos que observamos nos permite definir la disposición relativa de 10 locus que presentan distancias mínimas entre los sitios considerados, presentando distancias entre los alelos de 43, 73 y 128 codones. La β caseína posee además carbohidratos únicos en las posiciones 55, 57, 79 y 168 (Tabla 3).

Estructura de los componentes de la caseína de bovino



Alfa s1 caseína de *Bos taurus* (bovino)



Importante capacidad para transportar fosfato de calcio en la

leche. Posee dos regiones hidrofóbicas que contienen todos los residuos de prolina, separados por una región polar la cual contiene uno de los ocho grupos fosfato. Con localización extracelular. Posee un peso molecular de 23.000 kDa, con 199 residuos y 15 residuos de prolina. Presenta variantes en las posiciones 29-41, 68 y 207, además de poseer conflictos en las posiciones 42, 50, 95, 143, 211 y 212.

Alfa s2 caseína de bovino



Posee concentradas cargas negativas cerca del extremo amino terminal y cargas positivas cerca del extremo carboxilo. Tiene una localización extracelular. La casocidina-I* inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus carnosus*. Por lo menos presenta dos alelos polimórficos. La secuencia del alelo D difiere de la mostrada y tienen una deleción de nueve residuos, los cuales pueden ser 49-58, 50-59, o 51-60. Con un peso molecular de 25.000 kDa, 207 residuos y 15 residuos de prolina. Además de poseer conflicto en la posición 102.

Beta caseína de bovino



Importante función en la determinación de las propiedades de superficie de los micelios de caseína. Con elevadas cargas en la región amino terminal además de una región hidrofóbica en el extremo carboxilo. Actúa como una proteína muy anfifílica. Su asociación es dependiente de la temperatura, suele formar grandes polímeros a 20° C, pero no a 4° C. Con un peso molecular aproximado de 25-26.000 kDa, con 209 residuos y 15 prolinas. Presenta variantes en las posiciones 51, 52, 82, 121 y 137, además de conflictos en las posiciones 108, 132, 153, 190, 210, 215 y 224.



X. ANEXO

U.N.A.M. CAMPUS

PREPARACION DE SOLUCIONES PARA GELES DE POLIACRILAMIDA.

Buffer para gel separador pH 8.8:

Para preparar 100 ml de éste buffer, se disuelve 18.15 g de Trizma-base en aproximadamente 40 ml de agua desionizada, se adiciona HCl 1M hasta alcanzar el pH deseado y se afora a 100 ml con agua desionizada. Filtrar con papel Whatman N° 1 y guardar a 4° C

IZT.

Buffer para gel concentrador pH 6.8

Para preparar 100 ml, se disuelven 6 g de trizma-base en aproximadamente 40 ml de agua desionizada, se adiciona HCl 1 M hasta que el pH se ajuste a 6.8 y posteriormente se afora a 100 ml con agua desionizada. Filtrar y guardar a 4° C.

Acrilamida al 30.8 %

Para preparar 100 ml se disuelven 30 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida en aproximadamente 70 ml de agua desionizada a 50°C, una vez disuelto se afora a 100ml, se filtra y se guarda a 4°C en frasco ámbar.

Dodecil sulfato de sodio al 20 % (SDS)

Para un volumen de 100 ml, disolver 20 g de SDS en 100 ml de agua desionizada. Filtrar y guardar a temperatura ambiente.

Buffer de muestra 2X SDS

Para preparar 40 ml agregar 1.52 g de Trizma-base, 20 ml de glicerol.

2.0 g de SDS y 1 mg de azul de bromofenol o rojo de pirimina.



U.N.A.M. CAMPUS

Azul de Coomasie

Para un volumen de 100 ml pesar 0.25 g de azul de Coomasie, 45 ml de metanol, 45 ml de agua y 10 ml de ácido acético glacial, filtrar la solución en papel Whatman N° 1 y guardar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

PBS

Para preparar PBS pesar 4.77 g y adicionarle 500 ml de agua desionizada, mezclar bien y guardar a temperatura ambiente.

Solución decolorante débil

Para preparar un litro de solución decolorante agregar 500 ml de metanol, 400 ml de ácido acético glacial y 100 ml de agua desionizada mezclar bien y guardar a temperatura ambiente.

Buffer de corrida 10 X

Para preparar 500 ml, se adicionaron 15 g de Trizma-base, 72 g de glicina, 50 ml de SDS al 10 % y disolver en agua desionizada.

Buffer de Citratos pH 4

Para preparar 200 ml de este buffer se tomaron 20 ml de ácido cítrico 0.1 M y se llevaron a pH de 4 con citrato de sodio 0.1 M y se aforo con agua desionizada.

Buffer de acetatos pH 5

Para preparar este buffer de incubación se tomaron 20 ml de ácido acético 0.2 M, y posteriormente se llevaron a pH de 5.4 con acetato de sodio 0.2 M y se aforo con 200 ml agua desionizada.

Buffer de Fosfatos pH 6

Se tomaron 20 ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 M y se llevaron a pH de 6 con Na_2HPO_4 0.1 y finalmente se aforó con 200 ml de agua desionizada.

Cuantificación de proteínas (Lowry)

- BSA
- Deoxicolato de sodio 0.15 %

Para preparar este reactivo pesar 0.15 g de DOC y aforar con 100 ml de agua desionizada, envasar y guardar a 4 ° C.

- TCA 72 %

Para preparar TCA tomar 72 ml de ácido tricloroacético al 100 % y aforar a 100 ml con agua desionizada.

- Solución A

Para preparar 100 ml de esta mezcla pesar 2 g de Na_2CO_3 , 0.3 g de NaOH , y 0.0268 g de tartrato de sodio/potasio, mezclar bien y guardar en botella ámbar a 4 ° C.

- Solución B

Para preparar 100 ml de este reactivo pesar 0.5 g de Cu SO_4 y aforar con agua desionizada, guardar en botella ámbar a 4 ° C.

- Solución C

Tomar 50 partes de la solución A + 1 parte de la solución B

Tomar 10 ml de la solución A + 200 μl de la solución B

Tomar 12 ml de la solución A + 240 μl de la solución B.

Buffer KCl-HCl 0.02 M pH 2.0

Para la preparación de este buffer pesar 0.14912 g de KCl en 50 ml de agua desionizada, llevar a pH de 2 con HCl y aforar a 100 ml guardar a temperatura ambiente.

Acido perclórico 1.7 M

Para preparar 100 ml de este reactivo tomar 17.07905 ml de ácido perclórico y aforar con 100 ml de agua desionizada, guardar en botella ámbar a 4 ° C.

Pepsina Porcina

Para preparar una solución stock que contenga 1 mg/ml en 0.01 N HCl, antes de usar diluir con buffer KCl-HCl 0.02 M pH 2 que contenga 4 µg/0.1 ml. Es importante preparar esta solución