



302827  
9  
29<sup>o</sup>

**UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.**

**ESCUELA DE QUIMICA**

Con Estudios Incorporados a la U.N.A.M.

EMPLEO DE PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE LA HEMOLINFA  
COMO CRITERIO BIOQUÍMICO EN LA IDENTIFICACIÓN DE  
ESPECIES DE TRIATOMINOS (INSECTA: REDUVIDAE)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P R E S E N T A :

**CRUZ SARA LABRA OLIVARES**

México, D.F.

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

	PAG.
<b>CAPITULO I</b>	<b>INTRODUCCION</b>
1.1	Planteamiento del Problema . . . . . 1
1.2	Hipótesis . . . . . 2
1.3	Objetivo . . . . . 3
<b>CAPITULO II</b>	<b>ANTECEDENTES</b>
2.1	Empleo de técnicas moleculares con fines taxonómicos . . . . . 4
2.1.1	Trabajos previos sobre triatomíneos . . . . . 5
2.2	La separación de moléculas de interés a través de la electroforésis en geles de poliacrilamida . . . . . 7
2.3	Biología de la hemolinfa de los insectos . . . . . 9
2.3.1	Características generales de la hemolinfa . . . . . 9
2.3.2	Composición química de la hemolinfa . . . . . 10
2.3.3	Porción celular: hemocitos . . . . . 11
<b>CAPITULO III</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>
3.1	Diagrama . . . . . 12
3.2	Material . . . . . 13
3.2.1	Material biológico . . . . . 13
3.2.2	Material de laboratorio . . . . . 13
3.2.2.1	Material . . . . . 13
3.2.2.2	Equipo . . . . . 13
3.2.2.3	Reactivos . . . . . 14

3.3	Preparación de soluciones	15
3.4	Metodología	18
3.4.1	Alimentación de triatominos	18
3.4.2	Electroforésis	19
3.4.2.1	Preparación del gel inferior	19
3.4.2.2	Preparación del gel superior	20
3.4.2.3	Preparación de la cámara electroforética	21
3.4.2.4	Preparación de las muestras	21
3.4.2.5	Corrida electroforética	22
3.4.2.6	Tinción del gel	22

#### CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSION

4.1	Resultados	24
4.2	Discusión	36

#### CAPITULO V CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA	42
--------------	----

## CAPITULO I INTRODUCCION

### 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades transmitidas por artrópodos vectores, constituyen uno de los problemas en salud pública en México y América Latina, entre las que destacan: Malaria, Leishmaniasis, Dengue, Oncocercosis, Encefalitis, Tripanosomiasis Americana (22).

Dentro del estudio de la epidemiología de las enfermedades transmitidas por los artrópodos es fundamental la identificación de la ( o las ) especies de los vectores del padecimiento de una localidad dada.

La identificación de especies de artrópodos ha sido siempre en base a la morfología, pero no todos los artrópodos han sido ubicados en forma acertada en su posición Taxonómica. Por lo cual se ha hecho necesario recurrir a métodos más específicos como lo es en base a la diferenciación molecular o diferenciación Bioquímica para obtener buenos resultados de las poblaciones estudiadas (15).

Por otro lado, también se están aplicando métodos isoenzimáticos, así como el empleo de las citogenética y otros aspectos de clasificación, utilizando los hemocitos, elementos constituyentes de la hemolinfa de los triatominos para completar las investigaciones en la distinción de especies de triatominos ( 4,9,16 ).

La importancia del estudio de los triatominos radica en que son considerados los únicos transmisores de importancia epidemiológica de la enfermedad de Chagas, infección que dentro de las parasitosis transmitidas por artrópodos, ocupan el segundo lugar en importancia en Latinoamérica después del Paludismo (21).

La determinación de las especies de triatominos involucradas en la transmisión de la enfermedad de Chagas en una localidad específica es

muy importante para poder completar el estudio epidemiológico y estar en la posibilidad de establecer las medidas de control (7).

La identificación de las especies de triatominos se realiza básicamente a través de estudio morfológico de los ejemplares adultos ( 13 ). Esta tarea es muy problemática, ya que la identificación a nivel de estadios ninfales es muy difícil para personas que no tienen amplios conocimientos sobre el empleo de las claves dicotómicas que se describen en la literatura, de este modo, sólo un Entomólogo en la mayoría de las ocasiones puede realizar la identificación.

En el laboratorio de Entomología del Departamento de Parasitología de la ENCB-IPN, frecuentemente se realiza la identificación de ejemplares de triatominos capturados en el campo por nuestro personal; por personas que habitan en la región, o bien por estudiantes que salen de excursión.

La identificación sólo se realiza en el estadio adulto ya que claves para identificación de estadios ninfales de triatominos no están disponibles ( 13 ).

Por lo tanto, una metodología que permita la identificación de especies de triatominos utilizando los diferentes estados ninfales y adultos es muy necesario. Resultados preliminares en el estudio de los perfiles electroforéticos en geles de Poliacrilamida (PAGE) de hemolinfa obtenida a partir de diferentes especies de triatominos, muestran patrones de corrimientos que pueden ser aprovechados para la identificación de las especies típicas de México.

## 1.2 HIPOTESIS

Si la composición proteica de la hemolinfa de los triatominos varía de acuerdo a la especie; entonces estas diferencias podrán ser de utilidad taxonómica al obtener los patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida.

### 1.3 OBJETIVO

**Evaluar el empleo de patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida de las proteínas de la hemolinfa, como criterio de identificación de especies de triatomínos.**

## CAPITULO II ANTECEDENTES

### 2.1 EMPLEO DE TECNICAS MOLECULARES CON FINES TAXONOMICOS

El primer procedimiento en Biología Molecular con fines de identificación clínica fue reportado a finales del siglo XIX con el descubrimiento de la reacción de precipitación por Kraus en 1897. El observó la presencia de una precipitación cuando utilizó un filtrado celular en un cultivo de Salmonella typhi que fue mezclado con antisuero. Posteriormente él estableció que un antígeno soluble con su anticuerpo puede producir una precipitación ( 12 ).

En 1932 Petri desarrolló una técnica usando la difusión triple con agar para la identificación de bacterias; en el cual las bacterias desconocidas se inoculaban en agar que contenía suero específico tanto del género, especies o grupo de cada una de las bacterias desconocidas. El observó la formación de un halo o banda de precipitación alrededor de la colonia, debido a la reacción del antisuero con el antígeno difundido de la colonia ( 17 ).

En 1959 West et al. usando conejos para la producción de antisuero fueron capaces de distinguir a seis especies de avispas ( Diprionidos ) y demostró la concordancia de las relaciones de las especies usando el Fotorelectómetro ( 20 ).

En 1962 Pauly continúa sus estudios con conejos y gallinas para la producción de antisuero para los miembros de Felidae. El Fotorelectómetro fue utilizado para analizar los resultados de estos estudios basados en la serología para la revisión de la clasificación de la Familia Felidae y para el Orden Carnívora ( 15 ).

El avance más significativo en la inmunodifusión fueron las técnicas más desarrolladas conocidas como inmunoelectroforésis. En este procedimiento uno de los reactantes es fraccionado

electroforéticamente y anteriormente deja o permite la precipitación con el otro.

Adicionalmente la movilidad eléctrica que existe alrededor de la prueba de difusión doble da a la inmunoelectroforésis una combinación sensitiva de anteriores y nuevos procedimientos. Esta prueba es usada para detectar e identificar individualmente componentes en un sistema múltiple, así como también para detectar la pureza de los componentes. Este procedimiento es utilizado hoy día en la detección de proteínas anormales en la patología del suero ( 8 ).

En 1937, Tiselius construyó la primera cámara para el análisis electroforético utilizando un buffer como medio de separación. Esta celda se construyó de tal manera que la muestra proteica que va a ser separada es colocada entre el buffer y el tubo de vidrio en "U" que forma un borde agudo. Durante la electroforésis fue necesario observar la separación en forma óptica ( 6 ).

Para obtener una visualización más clara en la separación de las muestras se introduce los geles y papel filtro como soportes. La separación obtenida por estos materiales origina la llamada "Electroforésis de zona". El papel ha sido usado extensamente, pero hoy día han sido reemplazados por soportes de poliacetato de celulosa.

Laufer ( In Leone 1964:171-89 ), usando zonas electroforéticas en geles de almidón, fue capaz de diferenciar dos especies relativamente estrechas de saturnidos de gusanos de seda. Laufer estudió el desarrollo de éstos organismos y encontró que cada especie dada tiene patrones característicos ( 14 ).

### 2.1.1 TRABAJOS PREVIOS SOBRE TRIATOMINOS

Entre los trabajos citados en la literatura referentes a estudios de la hemolinfa de triatomos y que sirvieron de base al presente trabajo destacan los siguientes estudios:

En 1959 Benoit P.L.G. y Van Sande M. realizaron el estudio de dos proteínas de la hemolinfa de Triatoma infestans y Rhodnius prolixus por ultra-microelectroforésis sobre agar observando que esta técnica pone de manifiesto que la hemolinfa de una especie de triatoma y otra del género Rhodnius, presentan en la electroforésis sobre agar una morfología netamente diferente (5).

En 1960 Van Sande y Karcher estudiaron siete especies de chinches besuconas de cuatro géneros de triatomas usando la electroforésis en microtapas de la hemolinfa de estas. Los patrones obtenidos en este estudio han mostrado ser específicos para cada una de las especies sin tomar en cuenta edad, sexo, o infección con Trypanosoma cruzi. Esta investigación es sumamente importante e interesante y sugiere que la electroforésis de la hemolinfa de estos artrópodos pueda tener un valor taxonómico.

En 1961 Harington J.S. hace un estudio sobre la composición de aminoácidos de Rhodnius prolixus utilizando la técnica de cromatografía de partición en papel y detectando los siguientes aminoácidos: Valina, Leucina (como Isoleucina y Leucina ), Glicina, Prolina, Alanina, Acido aspártico, Cistina, Acido cístico, Glutamina, Histidina, Fenilalanina, Serina, Treonina, Taurina, Arginina, Lisina, Tirosina, Tiroxina, Acido glutámico, Asparagina, Acido alfa-amino-n-butírico, Beta-alanina, Hidroxiprolina, Metionina, Triptófano, Creatina, Creatinina y Cisteína (11).

En 1963 Zeledón et al. hacen un análisis electroforético en papel de la hemolinfa de algunas especies de triatomas, concluyendo que la técnica es favorable para estudios referentes a diferenciaciones taxonómicas al emplearse la metodología en especies Sudamericanas (23).

En 1964 Actis et al. realizaron estudios taxonómicos sobre el género Triatoma Laporte ( existentes en la República de Argentina, con la excepción de ( T. breyeri ), para este estudio se realizaron corridas electroforéticas en papel de la hemolinfa, y simultáneamente con la

corrida de cada especie se realizaron corridas de sueros humanos normales a efecto de establecer comparaciones de movilidad de fracciones.

Con los perfiles en papel fueron realizados diagramas por técnica densitométrica concluyendo con este trabajo la notable diferenciación entre especies, y destacándose por lo tanto, las diferencias en sus proteínas que las encontradas en estudios morfológicos (1).

En 1969 Adams R. Robert et al. realizaron un estudio taxonómico del complejo triatoma Rubida con poblaciones naturales y poblaciones híbridas, utilizando la electroforesis en acetato de celulosa para la diferenciación de proteínas en la hemolinfa para lo cual tomaron en cuenta variaciones en los siguientes parámetros: Tiempos de sangrado, alimentación con diferentes hospederos, presencia patológica, cambio de muda, diferencia de sexo y periodos de inanición (2).

## 2.2 LA SEPARACION DE MOLECULAS DE INTERES A TRAVES DE LA ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Un aspecto muy importante, en prácticamente cualquier proyecto de investigación que involucre moléculas de interés químico, bioquímico, biológico, inmunológico, etc. es su caracterización, purificación y análisis de pureza. Para estos propósitos, las técnicas electroforéticas constituyen un instrumento de ayuda invaluable, en los últimos veinte años los métodos electroforéticos han evolucionado extraordinariamente, al inicio éstos eran de baja resolución y con aplicaciones relativamente limitadas, pero en la actualidad existe una extensa variedad de métodos para uso analítico o preparativo (a baja escala), con gran capacidad resolutive y amplia versatilidad.

El término electroforesis se aplica para describir la migración de una partícula eléctricamente cuando esta se somete a un campo eléctrico, moléculas biológicamente importantes como el DNA, RNA y proteínas poseen cargas eléctricas y por ende pueden moverse cuando se someten a

un campo eléctrico; históricamente el primer método electroforético se realizó en una solución de sacarosa en la que se movían libremente ( electroforé debate libre ) los componentes por analizar cuando se aplicaba un campo eléctrico.

Las proteínas poseen carga eléctrica como resultado de los residuos de aminoácidos ácidos y básicos que la constituyen y puesto que las constantes de disociación (  $pK$  ) de estos grupos difieren ampliamente, la carga eléctrica neta de una proteína dependerá del  $pH$  en el cual se encuentre y esta será determinante para la movilidad electroforética de la molécula.

La electroforé debate en geles de poliacrilamida aumenta su resolución si en el gel existe un sistema discontinuo de  $pH$ , voltaje y concentración de acrilamida, y esto se logra si el gel se forma en dos partes; en una de ellas que constituye la mayor parte del gel y que comúnmente se le conoce como gel de corrimiento, la separación ocurre por efecto de la carga eléctrica de las moléculas y por diferencia de sus pesos moleculares; arriba de ese gel se forma otro gel que se conoce como gel espaciador, el cual tiene una concentración más baja de acrilamida; este gel tiene como función concentrar en una banda estrecha a toda las moléculas de proteína que constituyen a la muestra y en esa forma el ingreso de todos los componentes al gel de corrimiento es simultáneo, proporcionando así corrimientos más uniformes y una mejor resolución.

Finalmente una consideración que debe hacerse en la elaboración de geles de poliacrilamida, es la solución reguladora que debe emplearse; se debe de tomar en cuenta que las funciones de esta solución reguladora son: mantener el  $pH$  constante en el gel y en las cámaras de los electrodos como también en solución electrolítica para conducir la corriente a través del campo eléctrico.

Para que las funciones del regulador se cumplan adecuadamente, se deben reunir tres condiciones: la solución reguladora no debe interactuar con las macromoléculas por separarse, ya que de lo contrario puede

haber cambios en la velocidad de migración por la adición o neutralización de cargas sobre la macromolécula.

El pH al cual se lleva a cabo la electroforesis, deberá ser tal que las moléculas por separar estén cargadas eléctricamente, pero no desnaturalizadas, en el caso de proteínas los límites usuales son entre 4.5 y 9.0. La concentración y fuerza iónica del regulador debe ser la adecuada, ya que si la concentración de electrolitos en el gel es muy baja, las moléculas migrantes conducen gran parte de la corriente y como resultado de ello las moléculas no se localizan en banda estrechas sino que más bien en zonas difusas y así disminuye la resolución del método. La alta concentración de electrolitos en el gel provoca que la cantidad de corriente conducida se incremente mientras que el voltaje disminuye, y esto se refleja en una migración muy lenta con generación de calor, lo cual puede desnaturalizar a las proteínas por separar ( 3,6,10 ).

## 2.3 BIOLOGIA DE LA HEMOLINFA DE LOS INSECTOS

Los insectos tienen un sistema circulatorio abierto, llamado de este modo porque la sangre o hemolinfa baña a los órganos internos directamente en la cavidad del cuerpo o hemocele y no está enteramente delineada con el tejido mesodérmico.

La sangre del insecto es comúnmente llamada hemolinfa un término, el cual implica que lleva la función de ambas sangre y linfa; en el cual son distintamente diferentes de los fluidos en los vertebrados, los órganos están separados del hemocele por la membrana basal.

### 2.3.1 Características generales de la hemolinfa

La hemolinfa es un fluido claro usualmente sin color, o por algunos pigmentos, es ligeramente verde o amarillenta. Aunque en casos muy excepcionales la hemolinfa es roja en algunas moscas, larvas, todos ellos contienen el pigmento de la hemoglobina.

La hemolinfa ocupa aproximadamente del 5-40 % del peso total del cuerpo del insecto dependiendo de la especie. Sin embargo, el hemocele no está usualmente lleno de sangre y el volumen varía dependiendo del estado fisiológico del insecto. La sangre tiene un pH ligeramente ácido ( entre 6 y 7 ) y puede variar muy ligeramente dependiendo también de la especie.

En muy pocos insectos el pH puede ser ligeramente alcalino (pH 7-7.5) esta hemolinfa es ligeramente más densa que el agua, la gravedad específica está entre 1.015 y 1.060 y se llega a incrementar en los periodos de muda. La concentración molecular total en la hemolinfa es bastante alta, y en efecto se debe de tomar en cuenta la presión osmótica que es más alta que en sangre de los mamíferos.

En cuanto a los aminoácidos, ácidos orgánicos y otras moléculas orgánicas que se encuentran en forma libre en los insectos, juegan un papel muy importante como efectores osmolares, mientras que los aniones inorgánicos y cationes son en gran parte responsables de la presión osmótica en la sangre de los vertebrados.

Así como en la sangre de los vertebrados, la sangre de los insectos puede ser separada en plasma, y en una porción celular, los hematocitos. Existen también elementos no-hemocitos, que pueden ser encontrados, incluyendo fragmentos de músculo, células de cuerpo graso libres, oenocitos, cristales libres y varios organismos parásitos ( bacterias, protozoarios y nemátodos ).

### 2.3.2. COMPOSICION QUIMICA DE LA HEMOLINFA

La composición química de la hemolinfa muestra una considerable variación, ambas tanto en forma cualitativa y cuantitativa, entre varios grupos de insectos y sujeto a variaciones dentro de una misma especie, dependiendo sobre todo de estados fisiológicos, estadios, edad, sexo, alimentación y en sí del tipo de organismo.

A continuación se muestra una lista de la mayoría de los constituyentes encontrados en la hemolinfa: Agua, constituyentes inorgánicos, materiales de desecho nitrogenados, ácidos orgánicos, carbohidratos, lípidos , proteínas, aminoácidos, pigmentos y gases.

En resumen, la composición que tiene la hemolinfa de los insectos es en muchos aspectos algo similar a los fluidos internos del cuerpo de otros animales. Sin embargo, hay ciertas características en la hemolinfa que hacen bastante distintivos a los insectos, entre los que se pueden considerar más significativos es la alta aminoacidemia ( aminoácidos en la hemolinfa ), el funcionamiento de aminoácidos y otras ácidos orgánicos son importantes como efectores osmóticos.

### 2.3.3 PORCION CELULAR: HEMOCITOS

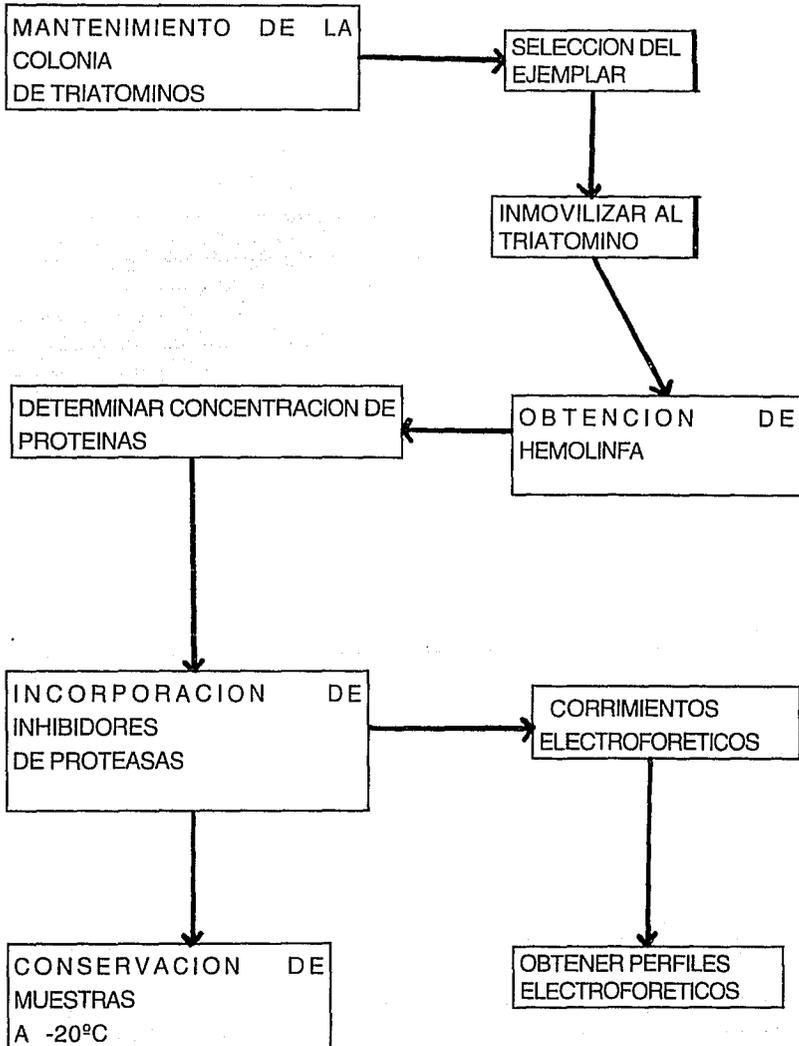
Las células presentes en la hemolinfa se les denominan hemocitos; los cuales se diferencian por su morfología y estos son: prohemocito, plasmatocito, hemocito granular, célula esférica, cistocito, células oenocitoides ( 18 ).

Dentro de los tipos de hemocitos anteriormente citados, los tres primeros han sido identificados en cada uno de los insectos estudiados.

Jones (1977) describe nueve tipos de hemocitos algunos de los cuales dan origen a otras formas celulares de hemocitos .

## CAPITULO III PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 DIAGRAMA DE FLUJO



## 3.2 MATERIAL

### 3.2.1 Material biológico : hemolinfa de triatominos

### 3.2.2 Material de laboratorio

#### 3.2.2.1 Material

- Pipetas graduadas Pyrex ( de 5,10, 20, 30 ml )
- Micropipetas Gilson ( de 50 $\mu$ l, 20 $\mu$ l, 200  $\mu$ l, )
- Matraces Erlenmeyer Pyrex ( de 50, 100 ml )
- Cristalizador de vidrio Pyrex ( 190 X 100 )
- Vasos de precipitado Pyrex ( de 50, 100 ml )
- Agitador de vidrio
- Jeringas Hamilton ( de 25 $\mu$ l, 50 $\mu$ l, 100 $\mu$ l )
- Pipetas pasteur
- Botellas de polipropileno de 250 ml
- Capilares
- Pinzas entomológicas
- Bulbos
- Tubos Eppendorf (de 0.5, 1.5 ml )
- Alfileres entomológicos
- Recipientes cuadrados de plástico
- Espátula de acero inoxidable
- Papel Whatman no.1
- Guantes de plástico
- Cubreboca

#### 3.2.2.2 Equipo

- Potenciómetro Modelo 20 ( Conductronic )
- Cámara de electroforesis Modelo SE-400 ( THE STURDIER )
- Cámara de electroforesis chica, fabricada de acuerdo a las especificaciones de la cámara THE ESTURDIER
- Espectrofotómetro Modelo M ( LEITZ )

- Bomba de vacío Modelo 0211-V45M G2140 (GAST)
- Fuente de poder Modelo 3000 Xi ( BIO-RAD)
- Densitómetro DCD-16 Modelo PN 394331 ( GELMAN )

### 3.2.2.3 Reactivos

- Acrilamida (Sigma)
  - Bisacrilamida (Sigma)
  - TEMED ( N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina).(Sigma)
  - EDTA (J.T.Baker)
  - Trizma base ( Sigma)
  - HCL ( J.T.Baker)
  - NaOH (J.T.Baker)
  - SDS ( Sigma )
  - Persulfato de amonio ( Sigma )
  - Mercaptoetanol ( Sigma )
  - Glicerol ( J.T. Baker )
  - Azul de bromofenol ( Sigma )
  - Glicina ( J.T.Baker )
  - Alcohol Isopropílico ( Merk )
  - Acido acético glacial ( Merk )
  - Azul de Coomasie ( Sigma )
  - Agar ( Merk )
  - Albúmina bovina ( Sigma )
  - PMSF ( Fenilmetilsulfonil-fluoro ). (Sigma )
  - Alcohol absoluto ( Merk )
  - Acido p-hidroximercuribenzoato ( Sigma )
  - Azul brillante de Commasie G-250 ( Sigma )
  - Acido fosfórico ( J.T. Baker )
  - Estándares de altos pesos moleculares ( Sigma )
- NOTA: Todos los reactivos son de grado analítico

## 3.3 PREPARACION DE SOLUCIONES

## A) Soluciones de uso general

1) Solución A ( Técnica de LOWRY ): Carbonato de sodio al 2% y 0.02 % de Tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0.1 N.

NaOH..... 0.4 g  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>..... 20.0 g  
Tartrato de sodio.... 0.2 g  
Aforar a 1000 ml en agua destilada

2) Solución B: Sulfato de Cobre al 0.5 % en agua destilada

Sulfato de Cobre..... 0.5 g  
Aforar a 100 ml con agua destilada

3) Solución C: Cupro-alkalina

Mezclar 50 ml de la solución A y 1 ml de la solución B

4) Solución D: Reactivo de Folin 1:3 con agua destilada

5) Solución estándar de albúmina bovina

Albúmina bovina..... 0.25 mg  
Disolver la albúmina en 1 ml de agua destilada

6) Solución de Bradford : Coomasie 0.01 %, Etanol 4.7 %, Acido fosfórico 8.8 %

Azul brillante de Coomasie G-250.... 100.0 mg

Etanol..... 50.0 ml  
Acido fosfórico..... 100.0 ml  
Aforar a 1000 ml en agua destilada

## B) Soluciones para electroforésis

### 1) Acrilamida-Bisacrilamida

Monómeros de acrilamida, solución madre al 30%, Bis-acrilamida al 0.8%

Acrilamida..... 30.0 g  
Bis-acrilamida..... 0.8 g  
Aforar a 100 ml con agua bidestilada, filtrar con papel  
Whatman no. 1

### 2) Dodecilsulfato de sodio ( SDS )

SDS..... 10.0 g  
Aforar a 100 ml con agua bidestilada, filtrar con papel  
Whatman no.1

### 3) Regulador para gel de corrimiento TRIS-HCL 3 M pH 8.8

TRIS..... 36.6 g  
Aforar a 150 ml con agua bidestilada, filtrar con papel  
Whatman no.1

### 4) Regulador para gel espaciador TRIS- HCL 0.5 M pH 6.8

TRIS..... 6.057 g  
Aforar a 100 ml con agua bidestilada, filtrar con papel  
Whatman no. 1

## 5) Persulfato de amonio ( APS )

Persulfato de amonio..... 0.1 g  
 Disolver en 0.9 ml de agua bidestilada.

## 6) Solución reguladora para la muestra 2X ( Usar tal cual )

Solución reguladora TRIS-HCL 0.5 M pH 6.8..... 1.25 ml  
 SDS 10 %..... 2.0 ml  
 Mercaptoetanol..... 0.5 ml  
 Glicerol..... 1.0 ml  
 Solución azul de bromofenol 0.2 %..... 0.25 ml  
 Mantener esta solución reguladora para la muestra 2X a -20°C

## 7) Amortiguador de corrida 10 X pH 8.3

Trizma-base..... 30.0 g  
 Glicina..... 144.0 g  
 Solución D ( SDS 10 % )..... 100.0 ml  
 EDTA 0.2 M pH 8..... 40.0 ml

Mezclar el Trizma-base y la Glicina con la Solución D (SDS), en 500 ml de agua con el EDTA y ajustar el pH a 8.3 y aforar a 1000 ml. Guardar la solución a temperatura ambiente.

## 8) Colorante de Fairbanks

Alcohol Isopropílico..... 125.0 ml  
 Acido acético glacial..... 50.0 ml  
 Azul de Coomasie..... 0.25 ml

Mezclar el alcohol Isopropílico y el colorante con 300.0 ml de agua destilada y aforar a 500 ml. Guardar la solución a temperatura ambiente.

## 9) Solución decolorante rápida

Acido acético..... 50.0 ml

Alcohol Isopropílico..... 255.0 ml

Mezclar el ácido acético y el alcohol isopropílico con 200 ml de agua destilada y aforar a 500 ml. Guardar a temperatura ambiente.

## 10) Preparación de inhibidores de proteasas

- PMSF Utilizando una concentración final de 0.2 M en alcohol absoluto
- p-hidroximercuribenzoato Utilizando una concentración de 0.4 mM
- EDTA Utilizando una concentración de 100 nM

## 11) PREPARACION DE ESTANDARES DE PESOS MOLECULARES

Estos son preparados según la técnica del boletín No. MWS-877 L de Sigma.

### 3.4 METODOLOGIA

#### 3.4.1 Alimentación de triatominos

Con ayuda de las pinzas entomológicas, colocar en cristalizadores a los triatominos y posteriormente en moldes de plástico que contienen cartones plegadizos; cubrir entonces con una malla y cerrar el molde con la tapa hueca.

Inmovilizar a los conejos, extendiéndolos en las tablas de madera, colocándolos de tal manera que éstos queden con el abdomen en el hueco del mismo, y amarrar firmemente con un cordón. Una vez terminado esto, rasurar el abdomen y posteriormente colocar los moldes preparados con los triatominos en la parte inferior de los conejos. Así los triatominos se prepararán por los cartones plegadizos y procederán a

alimentarse por 20 minutos; transcurridos cinco días después de la alimentación proceder a inmovilizar a cada ejemplar efectuándose una punción a nivel de coxa.

### 3.4.2 ELECTROFORESIS

#### 3.4.2.1 Preparación del gel inferior

A) Desenvolver las placas de vidrio asegurándose de no tocar con los dedos la superficie de éstas.

B) Armar la cámara para formar el gel con la pareja de placas de vidrio y sellar los bordes laterales e inferior aplicando agar fundido con pipeta pasteur, primero en la base y luego en los lados de la cámara. Para mantener fundido el agar durante su aplicación se debe colocar el matraz en baño maría.

C) Marcar con un lápiz graso el nivel que deberá alcanzar el gel separador en las placas de vidrio.

D) Mantener en matraz Erlenmeyer de 100 ml las soluciones en el orden que se anota a continuación: Acrilamida-Bisacrilamida, Tris-HCL 3 M pH 8.8-9.0, SDS al 10%, agua bidestilada, TEMED, persulfato de amonio al 10 % \*\*. Antes de agregar el TEMED y el persulfato de amonio, se tiene que desgasificar la mezcla en la bomba de vacío por espacio de 1 minuto.

\*\* Agregar al final para iniciar la polimerización

E) Con una pipeta pasteur añadir la mezcla cuidadosamente en el espacio contenido entre las placas de vidrio, y evitar la formación de burbujas.

F) Inmediatamente después de añadir la mezcla anterior, con una pipeta pasteur agregar por uno de los extremos de las placas alcohol isopropílico, para evitar el contacto del gel con el aire (El oxígeno inhibe la polimerización ), y esperar a que el gel polimerice. Esta

polimerización se observa por la formación de una interfase entre el gel y el alcohol isopropílico.

G) Eliminar el alcohol isopropílico que fue colocado sobre el gel separador por inversión de la cámara, tomándola por el soporte y secar el remanente que queda con papel adsorbente.

#### 3.4.2.2 Preparación del gel superior

A) Mezclar las siguientes soluciones: Acrilamida-Bisacrilamida, Tris-HCL 0.5 M pH 6.8, SDS al 10 %, agua bidestilada, TEMED y persulfato de amonio al 10 % \*\*.

Antes de agregar el TEMED y el Persulfato de amonio, se tiene que desgasificar la mezcla en la bomba de vacío por espacio de 1 minuto.

\*\* Agregar al final para iniciar la polimerización

B) Agitar suavemente y colocar inmediatamente la mezcla sobre el gel separador, hasta llenar el espacio que queda entre las placas de vidrio.

C) Colocar el peine entre las placas, introduciéndolas en la mezcla un poco inclinado para desplazar hacia arriba las burbujas que puedan quedar bajo el borde inferior de los dientes que formarán las hendiduras del gel superior. Procurar que al terminar de introducir el peine los dientes queden verticales y totalmente insertados en el borde la cámara y, además sus extremos inferiores lleguen hasta 1 cm por arriba del gel separador; esperar a que se lleve a cabo la polimerización.

### 3.4.2.3 Preparación de la cámara electroforética

- A) Antes de quitar el peine es conveniente marcar el fondo de cada carril con marcador indeleble y posteriormente quitar el peine sin deformar los carriles.
- B) Con el empaque e hule y las abrazaderas, montar las placas de vidrio con los geles dentro del tanque de electroforesis y sellar con agar.
- C) Separar en un vaso de precipitados de 50 ml el amortiguador de corrida 10 X, para lavar las jeringas Hamilton, con las que se aplicarán las muestras.
- D) Llenar la parte inferior del tanque con amortiguador de corrida 10 X, y verificar cuidadosamente que no exista fuga, y que no existan burbujas de aire.
- E) Con una jeringa Hamilton lavar varias veces con el amortiguador de corrida 10 X cada una de las hendiduras para muestra en el gel concentrador y eliminar cualquier burbuja.
- F) Sin mover el tanque de electroforesis agregar el amortiguador de corrida 10 X en la parte superior del tanque.

### 3.4.2.4 Preparación de las muestras

- A) Antes de empezar a colocar las muestras decidir y anotar en una hoja correspondiente la posición que tendrá en el gel.
- B) Calcular la dilución de las muestras para obtener la cantidad de proteína deseada en cada carril.
- C) Mezclar las muestras con un volumen igual de regulador de muestra 2X.

D) Con una jeringa Hamilton colocar cada muestra en el pozo correspondiente ( la jeringa Hamilton debe enjuagarse varias veces entre las muestras, aspirando con ella el amortiguador de corrimiento 10 X que se separó en el vaso de precipitados, desechando el líquido ). Procurar que el tiempo transcurrido entre la preparación de las muestras y su colocación en el carril sea mínimo.

#### 3.4.2.5 Corrida electroforética

A) Una vez preparada la cámara de electroforésis con muestras y amortiguador, conectar los electrodos a la fuente de poder.

B) Iniciar la corrida de las muestras con voltaje constante y cuando las muestras hayan pasado al gel separador el voltaje se aumenta. El tiempo de corrida varía.

C) La corrida termina cuando el colorante indicador ( azul de bromofenol ) casi llega al extremo inferior del gel separador.

#### 3.4.2.6 Tinción del gel

A) Utilizar guantes desechables para el procedimiento.

B) Llenar el recipiente cuadrado de plástico con agua bidestilada para colocar el gel de corrimiento, para lo cual colocar la cámara que contiene el gel de modo que la placa de vidrio posterior ( pequeña ) quede dentro del recipiente, quitar luego los separadores laterales de entre las placas de vidrio y moverlas cuidadosamente hacia afuera con la espátula de acero inoxidable, sin dañar el gel separador. Ejercer luego un poco de presión hacia arriba en la placa superior ( grande ) con la espátula colocada en el sitio en que se encontraba uno de los separadores laterales, para despegar la placa anterior del gel. Esta maniobra debe hacerse firme, pero suavemente, es decir quitar el gel, pero que no se rompa.

Luego colocar bien la placa de vidrio que todavía tenga adherido el gel inclinándolo y con el gel hacia abajo, para que éste quede en contacto con el agua y se vaya separando, así caerá suavemente en el recipiente.

C) Eliminar el agua bidestilada y vaciar un volumen suficiente de colorante azul de Coomassie para cubrir el gel. Manteniendo el gel en esta solución toda la noche.

D) Después de teñir toda la noche el gel, el colorante se debe escurrir en el frasco en donde se guarda. Enjuagar el gel dentro del mismo recipiente primero con agua corriente para eliminar el resto del colorante, luego con agua bidestilada. Cambiar el agua bidestilada por solución decolorante rápida.

E) Hacer cambios de solución decolorante rápida varias veces hasta la visualización de las bandas.

F) Guardar la solución decolorante rápida en una botella de polipropileno con carbón activado.

G) Luego de la visualización de las bandas, agregar agua bidestilada para que el gel regrese a su estado original.

H) Fotografiar el gel.

## CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 RESULTADOS

La fig.1 muestra el sitio de extracción de la hemolinfa, en la coxa del primer par de patas. Se eligió este sitio por obtenerse mayor volumen de hemolinfa. ( ver cuadro 1 ).

El cuadro 2 determina la concentración de proteínas en la hemolinfa de los triatomos por dos métodos, Lowry y Bradford las diferencias en las concentraciones dadas por ambas metodologías no es significativa, siendo ambos confiables y específicos para tal objetivo.

Los inhibidores de proteasas constituyen un elemento esencial en el mantenimiento y conservación de la hemolinfa, ya que si esta no contiene este pool de inhibidores, las bandas en los corrimientos electroforéticos dan un efecto de barrido como se presenta en la fig. 2

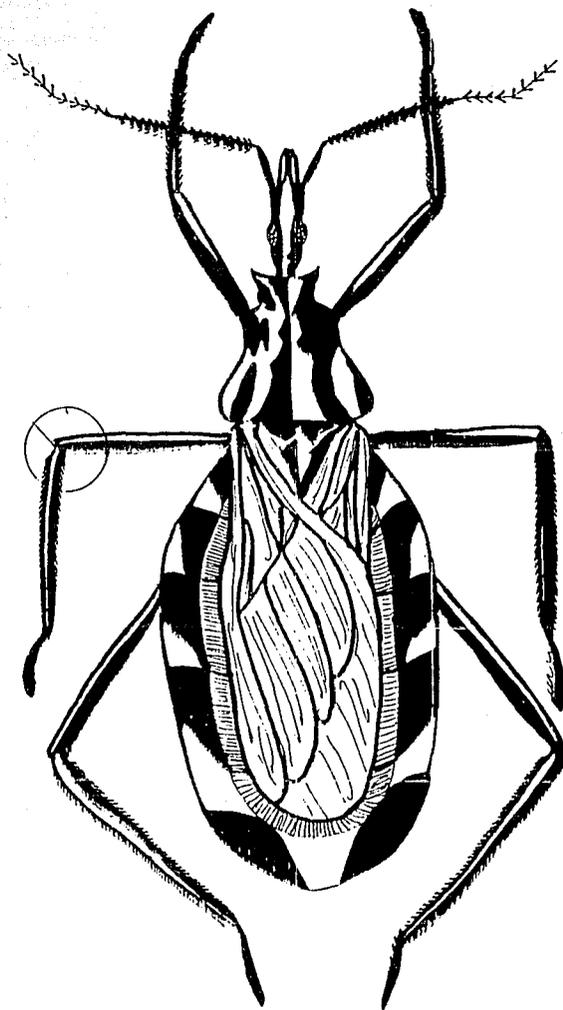
El haber realizado diversos corrimientos de triatomos machos y hembras fue encaminado a la selección de lo más específico y confiable en cuanto a la mejor, separación y visualización de bandas proteicas, por lo cual en la fig. 3 se observan los corrimientos de dos geles uno de machos y otros de hembras; las bandas separadas de los ejemplares hembras es más visible y selectivo para los fines perseguidos en este trabajo.

La asignación del número correspondiente a cada banda del perfil electroforético tanto de ejemplares adultos como de ninfas de V estadio es importante ya que como se indican en los cuadros 3 y 4, fue posible hacer la diferenciación en cuanto al peso molecular de cada banda característica.

En las figuras 4 y 5 se presentan los corrimientos electroforéticos de los adultos hembras y ninfas de V estadio, en donde las flechas

indican el peso molecular aproximado de los marcadores de alto peso molecular. En las figuras 6 al 15 se muestran en la parte superior de cada perfil densitométrico los corrimientos electroforéticos correspondientes a cada ejemplar adulto hembra y ninfas de V estadio, asignándosele un número a cada pico que fue leído por el densitómetro en base a un peso molecular en forma descendente. De tal manera que, para los ejemplares adultos el máximo de picos detectados fueron 12 y en ninfas de V estadio fueron 9.

Fig.1 Sitio de extracción de la hemolinfa de un triatomino, en la coxa del primer par de patas.



## CUADRO 1

VOLUMEN DE HEMOLINFA OBTENIDA POR ESPECIE  
DE TRIATOMINO.VALORES PROMEDIO<sup>a</sup> Y DESVIACION ESTANDARD

ESPECIE	VOLUMEN DE HEMOLINFA <sup>b</sup> (μl)	
	X	± S
ADULTOS		
<u>TRIATOMA MAZZOTTII</u>	6.8	3.11
<u>TRIATOMA PHYLLOSOMA</u>	8.4	2.07
<u>TRIATOMA PICTURATA</u>	6.6	2.07
<u>TRIATOMA PALLIDIPENNIS</u>	6.0	1.22
<u>TRIATOMA LONGIPENNIS</u>	7.2	3.89
V ESTADIO		
<u>TRIATOMA MAZZOTTII</u>	6.0	1.22
<u>TRIATOMA PHYLLOSOMA</u>	4.6	2.07
<u>TRIATOMA PICTURATA</u>	7.2	3.89
<u>TRIATOMA PALLIDIPENNIS</u>	3.2	0.83
<u>TRIATOMA LONGIPENNIS</u>	4.0	1.58

<sup>a</sup>LA HEMOLINFA SE OBTUVO POR PUNCION A NIVEL DE COXA DEL 1er PAR DE PATAS.

<sup>b</sup>LOS VALORES REFLEJAN EL PROMEDIO DE 15 DETERMINACIONES.

## CUADRO 2

CONCENTRACION<sup>a</sup> DE PROTEINAS EN HEMOLINFA  
DE TRIATOMINOS DETERMINADA A  
TRAVES DE DOS METODOS.

ESPECIE	CONCENTRACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	
ADULTOS	$\bar{X}$	$\pm S$
<u>TRIATOMA MAZZOTTII</u>	10.74	0.54
<u>TRIATOMA PHYLLOSOMA</u>	5.89	0.59
<u>TRIATOMA PICTURATA</u>	8.56	0.50
<u>TRIATOMA PALLIDIPENNIS</u>	6.84	0.05
<u>TRIATOMA LONGIPENNIS</u>	1.47	0.45
V ESTADIO	CONCENTRACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	
<u>TRIATOMA MAZZOTTII</u>	10.80	0.23
<u>TRIATOMA PHYLLOSOMA</u>	5.96	0.15
<u>TRIATOMA PICTURATA</u>	9.41	0.36
<u>TRIATOMA PALLIDIPENNIS</u>	6.81	0.40
<u>TRIATOMA LONGIPENNIS</u>	1.72	0.34

<sup>a</sup>LOS VALORES REFLEJAN EL PROMEDIO DE 10 DETERMINACIONES.

## CUADRO 3

ASIGNACION DEL NUMERO QUE CORRESPONDE A  
CADA BANDA DEL PERFIL ELECTROFORETICO  
DE EJEMPLARES ADULTOS.

PESO MOLECULAR	NUMERO DE PICO ASIGNADO
201 000	1
195 000	2
170 000	3
140 000	4
120 000	5
115 000	6
110 000	7
84 000	8
80 000	9
75 000	10
43 000	11
34 000	12

EL PESO MOLECULAR FUE CALCULADO A PARTIR DE LA COMPARACION CON  
MARCADORES DE PESO MOLECULAR UTILIZADOS EN ELECTROFORESIS.

## CUADRO 4

ASIGNACION DEL NUMERO QUE CORRESPONDE A CADA  
BANDA DEL PERFIL ELECTROFORETICO DE  
NINFAS DEL V ESTADIO.

PESO MOLECULAR	NUMERO DE PICO ASIGNADO
320 000	1
300 000	2
240 000	3
205 000	4
170 000	5
155 000	6
115 000	7
82 000	8
57 000	9

EL PESO MOLECULAR FUE CALCULADO A PARTIR DE LA COMPARACION CON  
MARCADORES DE PESO MOLECULAR UTILIZADOS EN LA ELECTROFORESIS.

FIGURA 2  
ELECTROFORESIS DE LA HEMOLINFA DE NINFAS DE  
V ESTADIO SIN INHIBIDORES DE PROTEASAS.

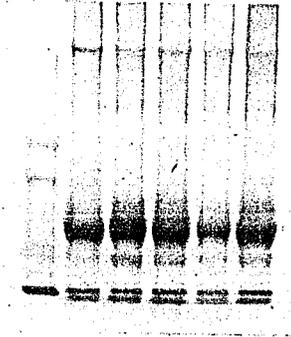
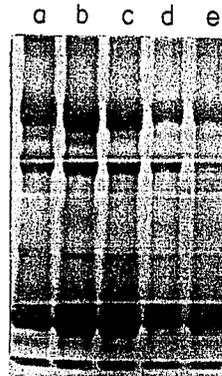
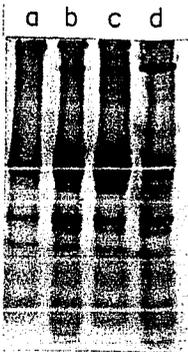


FIGURA 3  
ELECTROFORESIS DE LA HEMOLINFA DE EJEMPLARES MACHOS      ELECTROFORESIS DE LA HEMOLINFA  
DE EJEMPLARES HEMBRAS

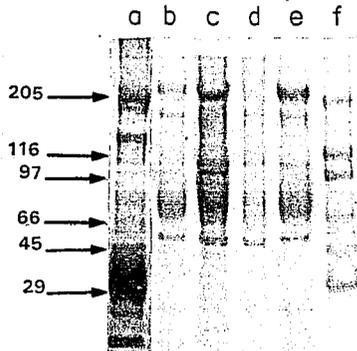


a) T. longipennis    b) T. picturata  
c) T. phyllosoma    d) T. mazzottii

a) T. picturata      b) T. mazzottii  
c) T. phyllosoma    d) T. pallidipennis  
e) T. longipennis

FIGURA 4

ELECTROFORESIS DE LA HEMOLINFA DE EJEMPLARES  
HEMBRAS DEL COMPLEJO PHYLLOSOMA.

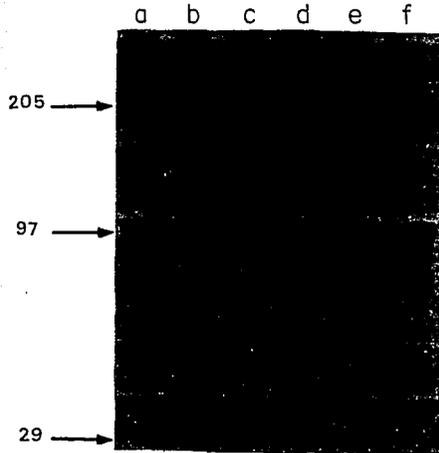


Cada carril contiene 5 $\mu$ l de la hemolinfa  
de las siguientes especies:

- a) T. longipennis
- b) T. pallidipennis
- c) T. phyllosoma
- d) T. mazzottii
- e) T. picturata
- f) Marcadores de peso molecular

FIGURA 5

ELECTROFORESIS DE LA HEMOLINFA DE  
NINFAS DE V ESTADIO DEL  
COMPLEJO PHYLLOSOMA.



Cada carril contiene 4  $\mu$ l de la hemolinfa  
de las siguientes especies:

- a) T. picturata
- b) T. phyllosoma
- c) T. mazzottii
- d) T. palidipennis
- e) T. longipennis
- f) Marcadores de peso molecular

LAS FIGURAS 6-10 MUESTRAN LOS PERFILES DENSITOMETRICOS OBTENIDOS A PARTIR DE LAS ELECTROFORESIS DE LA HEMOLINFA DE TRIATOMINOS HEMBRAS TOMANDO COMO BASE CADA CORRIMIENTO ELECTROFORETICO ( SEÑALADOS EN LOS INCISOS a,b,c,d y e ) MOSTRADO EN LA FIGURA 4.

FIGURA 6

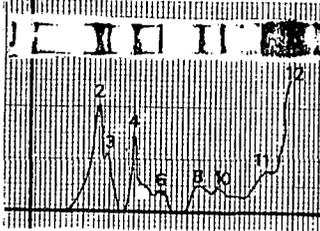
a) *T. longipennis*

FIGURA 7

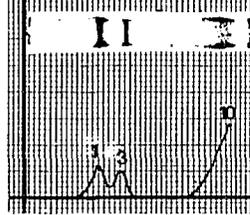
b) *T. palidipennis*

FIGURA 8

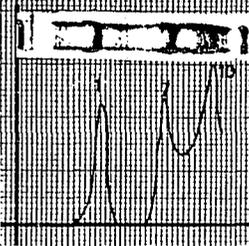
c) *T. phyllosoma*

FIGURA 9

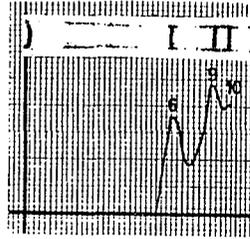
d) *T. mazzottii*

FIGURA 10

e) *T. picturata*

LAS FIGURAS 11-15 MUESTRAN LOS PERFILES DENSITOMETRICOS OBTENIDOS A PARTIR DE LAS ELECTROFORESIS DE LA HEMOLINFA DE NINFAS DE V ESTADIO TOMANDO COMO BASE CADA CORRIMIENTO ELECTROFORETICO ( SEÑALADOS EN LOS INCISOS a,b,c,d y e ) MOSTRADO EN LA FIGURA 5.

FIGURA 11

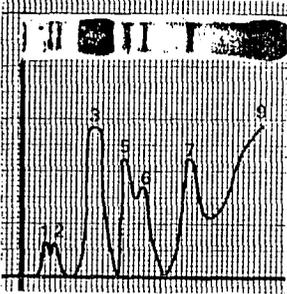
a) T. picturata

FIGURA 12

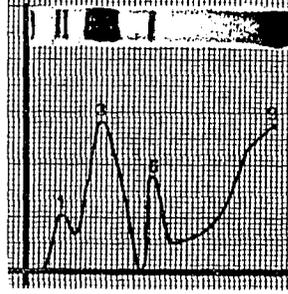
b) T. phyllosoma

FIGURA 13

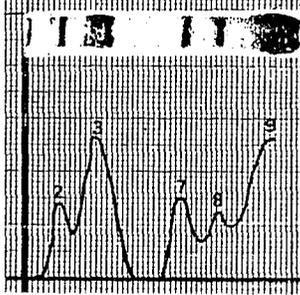
c) T. mazzottii

FIGURA 14

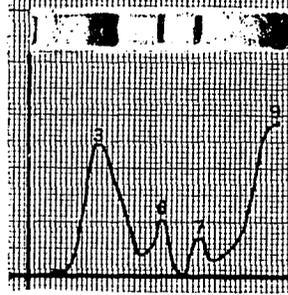
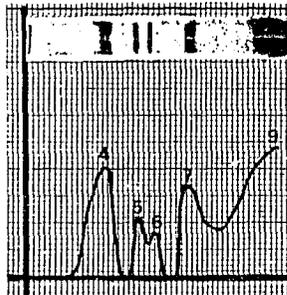
d) T. pallidipennis

FIGURA 15

e) T. longipennis

## 4.2 DISCUSION

El complejo phyllosoma, así llamado por la semejanza morfológica que guardan las especies que lo conforman, poseen una alta similitud entre las especies del complejo, lo cual dificulta su identificación tomando como base únicamente criterios morfológicos, por lo cual en el presente estudio se analizó el empleo de patrones electroforéticos de la hemolinfa como un criterio más, en la diferenciación e identificación de especies de triatomos del complejo phyllosoma, al realizar corrimientos electroforéticos en gel de poliacrilamida, así como la construcción de sus perfiles densitométricos de cada especie. Se inicio la investigación haciéndose necesario el mantenimiento de una colonia de triatomos del complejo phyllosoma seleccionándose adultos machos y hembras, así como ninfas de V estadio.

Los triatomos fueron alimentados en conejos cinco días antes, y una vez transcurrido este tiempo se inmovilizó a cada triatomo efectuándosele una punción a nivel de coxa ( Figura 1 ) del primer par de patas. Este sitio se seleccionó a) para obtener una mayor cantidad de hemolinfa pura ( cuadro 1 ). Si la punción se lleva a cabo en otro sitio, la hemolinfa puede llevar componentes de tejido graso y otros materiales alterando los resultados (18).

En el proyecto se utilizó un método electroforético para separar las proteínas de la hemolinfa estandarizándose dos técnicas para cuantificar la concentración de proteínas del complejo phyllosoma, y los resultados que se obtuvieron por ambas técnicas fueron semejantes ( Cuadro 2 ). Posteriormente a la cuantificación proteica, se evaluó la utilización de inhibidores de proteasas ( los más comúnmente utilizados ) agregando a cada muestra ( hasta una dilución de 1:3 ) del cóctel inhibidores; la adición de estos inhibidores es muy importante ya que las proteínas de la hemolinfa se degradan y las bandas de proteínas en los corrimientos dan un efecto de barrido ( Figura 2 ).

Para la conservación de las muestras, éstas fueron sometidas a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  para mantener constantes los patrones hasta por más de tres meses.

Para la estandarización de la técnica electroforética en gel de poliacrilamida para obtener los patrones de la hemolinfa, se realizaron diversos corrimientos; tomándose en cuenta los siguientes parámetros: a) Voltaje empleado b) buffer de corrida c) tiempo de corrida d) porcentaje de entrecruzamiento del gel. Este último parámetro fue muy importante, por lo que se hicieron corrimientos al 10%, 15% y 7.5% de entrecruzamiento, lográndose una mejor visualización y separación de las proteínas que podrían ser utilizadas para diferenciar las especies de triatomos, al emplearse un porcentaje del 7.5%. Para el conocimiento del peso molecular de las proteínas separadas, se utilizaron marcadores de alto peso molecular; trazándose una curva de calibración en función del peso molecular de cada marcador y su Rf.

Cuando se realizaron los corrimientos electroforéticos del complejo phyllosoma fueron seleccionados sólo para este estudio a las hembras adultos y ninfas de V estadio, por presentar mayor diferenciación y separación de las proteínas ( Figura 3).

Para cada corrimiento electroforético de triatomos hembras y ninfas de V estadio, se obtuvieron sus perfiles densitométricos, enumerándose los picos de cada perfil en base a su peso molecular (de acuerdo a los criterios propuestos por Adams R. Robert, et al.), siguiéndose un orden descendente; ya que las proteínas que se separan primero son aquellas de mayor tamaño ( Cuadro 3 y 4 ).

Los resultados que se obtuvieron para los adultos hembras fueron los siguientes picos:

T.longipennis 2,3,4,6,8,10,11 y 12

T.picturata 2,3,5,9

T.mazzottii 6,9 y 10

T.phyllosoma 1,7, y 10

T.pallidipennis 1,3 y 10

Las diferencias en las alturas que presenta cada pico, indican de cierta forma la cantidad de proteína registrados por el densitómetro, así por ejemplo en los perfiles de T.longipennis, el pico 2 fue más alto que el pico 3, lo cual indicó que existe mayor cantidad de proteína que en el pico 3.

Como se observó cada patrón electroforético de las cinco especies de triatomos es característico, al igual que sus perfiles densitométricos. Existen casos en que se presentan semejanzas, como es en T.longipennis y T.picturata en donde se encuentran en ambos patrones los picos 2 y 3, pero se diferenciaron a las especies porque en T.longipennis se encontraron los picos 4,6,8,10,11 y 12. y en T.picturata los picos 5 y 9.

En T.mazzottii, T.phyllosoma y T.pallidipennis el pico común en las tres especies es el 10, y sus diferencias se encontraron en que T.mazoottii mostró los picos 6 y 9. T.phyllosoma 1 y 7. Y T.pallidipennis 1 y 3.

Si existe dificultad para diferenciar entre los ejemplares adultos, es tarea casi imposible diferenciar entre estadios ninfales, por los que se intentó lograr la diferenciación a través de la hemolinfa de ninfas de V estadio del complejo phyllosoma. Los resultados que se obtuvieron para las ninfas de V estadio fueron los siguientes picos:

T.picturata 1,2,3,5,6,7 y 9

T.phyllosoma 1,3,6 y 9

T.mazoottii 2,3,7,8 y 9

T.pallidipennis 3,6,7 y 9

T.longipennis 4,5,6,7 y 9

Haciendo las comparaciones, se observó que entre T.picturata y T.phyllosoma los picos en común fueron el 1, 3, 6, y 9, pero en T.picturata se diferenciaron de T.phyllosoma por los picos 2, 5 y 7 característicos de esta última especie.

Entre T.mazzottii, T.pallidipennis y T.longipennis los picos en común fueron el 7 y 9; y se diferenciaron entre sí por los siguientes picos:

T.mazzottii 2,3 y 8

T.pallidipennis 3 y 6

T.longipennis 4,5 y 6

Al igual que los resultados anteriores se pudo comprobar la diferenciación y caracterización de cada ninfa de V estadio del complejo phyllosoma tanto por sus patrones electroforéticos como por sus perfiles densitométricos.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## CAPITULO V CONCLUSIONES

- 1.- A través de la punción a nivel de coxa del primer par de patas es posible obtener cantidades de hemolinfa que permiten su estudio electroforético.
- 2.- La utilización de inhibidores de proteasas y la congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  permiten la conservación de las características iniciales de la hemolinfa al menos por 90 días.
- 3.- Los patrones electroforéticos de la hemolinfa de las cinco especies de ejemplares machos presentan menos diferencias en comparación con las hembras, lo cual favorece el empleo de ejemplares hembras para el estudio con fines taxonómicos.
- 4.- Las bandas que permiten la diferencia entre las especies son de alto peso molecular, por lo que se recomienda emplear porcentajes de entrecruzamiento de la poliacrilamida del 7.5%.
- 5.- Los patrones electroforéticos y los perfiles densitométricos permiten ver la existencia de características diferenciales marcadas en las proteínas de ninfas de V estadio del complejo phyllosoma, por lo que resulta una herramienta potencial tanto de estudios epidemiológico como taxonómico.
- 6.- La composición proteica de la hemolinfa de los triatominos, mantenidas bajo las mismas condiciones de cultivo y dieta varía de acuerdo a la especie por lo que estas diferencias son de gran utilidad taxonómica cuando se obtienen sus patrones electroforéticos en geles de poliacrilamida.
- 7.- En base a los patrones electroforéticos y perfiles densitométricos de la hemolinfa de triatominos, es posible determinar las especies involucradas en la transmisión de la enfermedad de Chagas en una localidad específica y así completar el estudio epidemiológico para establecer las medidas de control necesarias.

8.- La identificación realizada a partir de patrones electroforéticos de la hemolinfa de triatomíneos, es importante, ya que cada especie queda bien ubicada dentro de su posición taxonómica.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Actis S. Alberto, Traversa C. Oscar, Carcavallo U. Rodolfo. Estudios taxonómicos sobre el género *Triatoma* Laporte mediante la electroforésis de la linfa. Annales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 13: 97-106 ( 1964 ).
- 2.- Adams R. Robert, Ryckman E. Raymond. A comparative electrophoresis study of the *Triatoma* Rubida Complex ( Hemiptera: Reduviidae: Triatominae ). J. Med. Ent. 6 ( 1 ): 1-18. ( 1969 ).
- 3.- Andrews, A. T. ELECTROPHORESIS. THEORY, TECHNIQUES AND BIOQUEMICAL AND CLINICAL APLICATIONS, Claredon Press, Oxford ( 1981 ).
- 4.- Azambuja De Patricia, García S, Eloi y Ratcliffe A. Norman. Aspects of classification oh Hemiptera hemocytes from six Triatominae species. Mem., Inst., Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. 86 (1): 1-10 (1991).
- 5.- Benoit P.L.G., Van Sande M. Etude des protéines de l'hémolymphe de *Triatoma infestans* et *Rhodnius prolixus* par ultramicroélectrophorese en gel de gélose. Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale. 39 ( 2 ): 135-143 ( 1959 ).
- 6.- Bier, M. Electrophoresis theory, methods, and applications. ( Introduction by A. Tiselius ) Academic Press Inc; New York. 563 p. ( 1959 ). Citado por Brodie D. Henry and Ryckman E. Raymond. Molecular Taxonomy of Triatominae ( Hemiptera: Reduviidae ). J. Med. Ent. 4 (4): 497-517. ( 1967 ).
- 7.- Brener, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 1:99-118 ( 1959 ).
- 8.- Campbell, D. H; J.S. Garvery, N.E. Cremer & D.H. Sussdorff. Methods in immunology. W.A. Benjamin, Inc. New York. 263 p. (1964). Citado por Brodie D. Henry & Ryckman E. Raymond. Molecular Taxonomy of

Triatominae ( Hemiptera: Reduviidae ). J. Med. Ent. 4 (4): 497-517. ( 1967 ).

9.- Dujardin et al. Which species of Rhodnius is invading houses in Brazil ? Trans. R. Soc. Trop. Med Hgg 85 : 679-680 (1988).

10.- Fausto Quezada Pascual. Laboratorio de Inmunoquímica II, Departamento de Inmunología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. ( 1990 ).

11.- Harington J. S. Studies of the aminoacids of Rhodnius prolixus. Parasitology, 51: 309-318 ( 1961 ).

12.- Kraus, R. Ueber specifische reactionen in Keimfreien filtraten aus cholera, aus cholera, typhus und pestbouillon culturen, erzeugt durch homologes serum. Wiener Klinische Wochensh. 10 (32): 736-38. ( 1897 ). Citado por Brodie D. Henry & Ryckman E. Raymond. Molecular Taxonomy of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). J. Med. Ent. 4 (4): 497-517. ( 1967 ).

13.- Lent, H. Wygodzinsky, P. Revision of the triatominae (Hemiptera:Reduviidae) and their significance as vector of Chagas'disease. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 16: 123-520. ( 1979).

14.- Leone, C.A. Taxonomic biochemistry and serology. Ronald Press Co. New York. 728 p. ( 1964 ).Citado por Brodie D. Henry & Ryckman E. Raymond. Molecular Taxonomy of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). J. Med. Ent. 4 (4): 497-517. ( 1967 ).

15.- Pauly, L. K. Systematic serology among the felidae and other closely related groups. Serolog. Mus. 28: 5-8. ( 1962 ).Citado por Brodie D. Henry & Ryckman E. Raymond. Molecular Taxonomy of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). J. Med. Ent. 4 (4): 497-517. ( 1967 ).

16.- Pérez Rubén, Panzera Yanina, Scafiezzo Sandra et al. Cytogenetics as a tool for Triatomine species distinction (Hemíptera: Reduviidae). 87 ( 3 ): 353-361 ( 1962 ).

17.- Petri, G. F. A specific precipiting reaction associated with the growth on agar plates of Meningococcus, Pneumococcus, and B. dysenteriae ( Shiga ). Brit. J. Exp. Pathol. 13 ( 4 ): 380-94. ( 1932 ).Citado por Brodie D. Henry & Ryckman E. Raymond. Molecular Taxonomy of Triatominae (Hemíptera: Reduviidae). J. Med. Ent. 4 (4): 497-517. ( 1967 ).

18.- Romoser S. Williams. The Science of Entomology. Second edition. Mac Millan Publishing Co. Inc. ( 1981 ).

19.- Van Sande, M. & D. Karcher. Species differentiation of insects by hemolymph electrophoresis. Science 131: 1103-04 (1960).Citado por Brodie D. Henry & Ryckman E. Raymond. Molecular Taxonomy of Triatominae (Hemíptera: Reduviidae). J. Med. Ent. 4 (4): 497-517. ( 1967 ).

20.- West, A.S; R. H. Horwood, T. K. R. Bourns & A. Hudson. Systematics of Neodiprion sawflies. 1. Preliminary report on serological and chromatographic studies. Rep. Ent. Soc. Ont. 89: 59-65. ( 1959 ).Citado por Brodie D. Henry & Ryckman E. Raymond. Molecular Taxonomy of Triatominae (Hemíptera: Reduviidae). J. Med. Ent. 4 (4): 497-517. ( 1967 ).

21.- W.H.O. World Health Organization. UNDP/WORLD BANK/W.H.O. Special Programme for Research and Training in Tropical Disease: Atividades de Pesquisa do Scientific Working Group ( SWG ) on Chagas' disease 1982/1985- Relatório dos "Screering Committee" (SC) ao "Scientific and Technical Revieco Committee" (STRC). Compilado por Moncayo, A; En Mem. Ins. Oswaldo Cruz 81 ( 8 ): 179-183 ( 1986 ).

22.- W.H.O. World Health Organization. Division of Tropical diseasea ( CTD ).UNDP/WORLD BANK/W.H.O. Special Programme for Research and

Training in Tropical Disease ( TDR ). american tripanosomiasis TDR-CTD/HH90.1: 12-13 (1990).

23.- Zeledón, R. & E. I. Morua. Análisis electroforético de la hemolinfa de algunas especies de triatominos (Hemíptera: Reduviidae). Rev. Biol. Trop. 11 ( 2 ): 185-95 ( 1963 ).