



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

**ESTUDIO *IN VITRO* DEL FLUJO DE SECRECIÓN
DEPENDIENTE DE Na^+ DE LOS TÚBULOS DE MALPIGHI
DEL INSECTO HEMATÓFAGO *Rhodnius prolixus*
(HEMIPTERA, REDUVIIDAE), EN CONDICIONES DE NO
ESTIMULACIÓN**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Paola Carolina Freile Hernández como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor: Prof. Antonio Gutiérrez.

CARACAS, VENEZUELA
FEBRERO - 2018

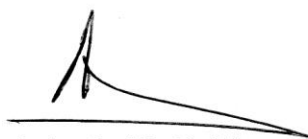
DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
DE LA BACHILLER PAOLA C. FREILE H.

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el trabajo especial de grado de la bachiller Paola C. Freile H., portadora de la cédula de identidad V-19.548.088, titulado:

“ESTUDIO *IN VITRO* DEL FLUJO DE SECRECIÓN DEPENDIENTE DE Na^+ DE LOS TÚBULOS DE MALPIGHI DEL INSECTO HEMATÓFAGO *Rhodnius prolixus* (HEMIPTERA, REDUVIIDAE), EN CONDICIONES DE NO ESTIMULACIÓN”.

Considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos para optar al título de Licenciada en Biología, lo declaramos **APROBADO** con una calificación de 20 puntos.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los cinco (23) días del mes de febrero del año dos mil dieciocho (2018), dejando constancia de ello los miembros del jurado.



Profesor Antonio M. Gutiérrez
(Tutor)



Doctor Reinaldo Marín
(Jurado)



Profesor Gustavo Benaim
(Jurado)

RESUMEN

Rhodnius prolixus es un insecto hematófago exclusivo. Es una especie adaptada a largos periodos de inanición seguidos de grandes ingestas de sangre. Inmediatamente después de alimentarse, excreta parte del volumen de sangre ingerida por medio del segmento superior de los Túbulos de Malpighi (TM). La secreción inicia con la liberación de las hormonas diuréticas, que conduce a la activación de los receptores de la membrana basolateral de los TM, incrementando la $[AMPc]_i$ que genera una cascada de fosforilación, lo cual activa una ATPasa de H^+ de tipo vacuolar ubicada en la membrana apical, encargada de energizar el flujo transepitelial, mediante el transporte electrogénico de H^+ desde el citoplasma hacia el lumen. El incremento de la $[AMPc]_i$ estimula el triple cotransportador de $Na^+/2Cl^-/K^+$ en la membrana basolateral, promoviendo el ingreso de los tres iones al citoplasma. El transporte de Na^+ es regulado por la ATPasa de Na^+/K^+ sensible a ouabaína además de otro mecanismo de salida del ion, la ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por furosemida, que sería el mecanismo principal para el flujo de Na^+ desde el citoplasma hacia la hemolinfa en condiciones de no estimulación de los TM. El objetivo del presente trabajo fue el estudio *in vitro* del flujo de secreción dependiente de Na^+ de los TM en ejemplares del 5^{to} instar de *Rhodnius prolixus* en condiciones de no estimulación, mediante la inhibición de los distintos mecanismos de transporte Na^+ aplicando fármacos cuyo efecto es conocido, y compararlos con los TM de *Rhodnius prolixus* recién alimentados (3 días), empleando el Ensayo de Ramsay. El análisis de los resultados obtenidos evidenció que la adición basolateral de furosemida induce la secreción de los TM sin estimulación, la cual no es comparable con la secreción producto de la estimulación endógena del insecto. Por otra parte, se determinó que la ouabaína no tiene efecto apreciable sobre la inducción de la secreción de los TM, indicando que la ATPasa de Na^+/K^+ no es el único mecanismo de salida de Na^+ desde el citoplasma hacia la hemolinfa. Los resultados constituyen una fuerte evidencia de la existencia de la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por furosemida ubicada probablemente en la membrana basolateral de los UMT, que sería fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de Na^+ de los TM sin estimular. Además, se corroboró la presencia de una conductancia selectiva de Na^+ sensible a milorida que estaría localizada en la membrana basolateral de los UMT. Finalmente se comprobó que la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por furosemida presenta una disminución de su actividad en los UMT estimulados, indicando una posible regulación de su expresión en presencia de las hormonas endógenas de *Rhodnius prolixus*.

Palabras Clave: Túbulos de Malpighi, *Rhodnius prolixus*, Secreción en insectos, Flujo transepitelial, Segunda ATPasa de Na^+ , Ouabaína, Furosemida, Amilorida.

A G R A D E C I M I E N T O S

Primeramente a Dios, por todas sus bendiciones y la fuerza para seguir adelante en los momentos más difíciles. Gracias por guiarme hacia la Biología, y enseñarme el camino correcto.

A mi mamá, por toda la paciencia, el apoyo y el amor que me ha brindado durante toda mi vida. Cada paso que doy es por ti y gracias a ti. Este logro es tuyo. Te lo mereces mamá.

A mi casa de estudios, mi Querida UCV, anhelada desde pequeña por abrirme sus puertas y formarme como profesional. Eres mi sueño hecho realidad.

A Mi Querido Tutor, Dr. Antonio Gutiérrez, te agradezco por la confianza que depositaste en mí en este proyecto. Por la paciencia y el tiempo invertido en explicarme una y otra vez el modelo de secreción. Por tu buen humor y tu disposición en todo momento. Por las correcciones en esta etapa final de mi carrera. Fue grato y placentero ser tu tesista.

A Rafael García. Querido Amigo! Mil gracias por orientarme, enseñarme y corregirme desde el inicio de nuestra amistad. La pasión que le imprimas a la fisiología me la contagiaste. Ahora te entiendo. Gracias por estar ahí para escucharme siempre.

A Jesús Romero, debo agradecerte por tu amistad incondicional, tu cariño y orientación, hasta tus regaños. A pesar de estar lejos, nunca estas ausente. Gracias por tanto.

A la Profesora Leidi Herrera, Jefe del Laboratorio de Biología de Vectores y Parásitos del IZET y a todo su equipo, Luis y José. Quienes en todo momento prestaron su apoyo incondicional facilitándome los ejemplares, durante todo este año de trabajo. Excelente compañeros de trabajo.

A mis Profesores de la Cátedra de Fisiología Animal. Profesor Fernando, Christian, Alejandro, Finol, Ángeles y Heicher. Gracias a ustedes amé la fisiología. Excelentes personas, siempre dispuestas a compartir sus conocimientos.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	Vi
INDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Anatomía de los túbulos de Malpighi.....	3
1.2. Anatomía de los túbulos de Malpighi en <i>Rhodnius prolixus</i>	6
1.3. Fisiología de la excreción en <i>Rhodnius prolixus</i>	14
1.4. Homeostasis de Na^+ intracelular.....	17
1.5. Antecedentes de la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaina.....	20
II. ANTECEDENTES	23
III. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo general.....	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1. Material biológico.....	28
4.2. Reactivos y soluciones.....	28
4.2.1. Ringer Insecto (RI).....	28
4.2.2. Ringer Bajo Na^+	29
4.2.3. Concentración de fármacos.....	29
4.3. Diseño experimental.....	29
4.3.1. Disección y aislamiento de los túbulos de Malpighi de <i>Rhodnius prolixus</i>	29
4.3.2. Montaje de los túbulos de Malpighi en la cámara de medición del volumen de secreción - Ensayo de Ramsay.....	30
4.3.3. Determinación del volumen secretado.....	34
4.4. Análisis Estadístico de los datos.....	35
4.5. Protocolo de lavado de los Túbulos de Malpighi estimulados.....	36

V. RESULTADOS.....	38
5.1. Evaluación del efecto de Furosemida sobre la inducción de la secreción de los UMT en reposo.....	38
5.2. Estudio del efecto de Ouabaína sobre la secreción inducida por Furosemida de los UMT en reposo.....	42
5.3. Estudio del efecto de Amilorida sobre la secreción inducida por Furosemida de los UMT en reposo.....	51
5.4. Estudio de la secreción inducida por Furosemida en presencia de bajo Na ⁺ extracelular de los UMT en reposo.....	53
5.5. Evaluación del efecto de Furosemida sobre la inducción de los UMT estimulados.....	57
VI. DISCUSIÓN.....	66
VII. CONCLUSIONES.....	87
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Secreción de los U M T de <i>Rhodnius prolixus</i> bajo los efectos de los diferentes tratamientos farmacológicos.....	64
Tabla II. Secreción de los U M T de <i>Rhodnius prolixus</i> bajo los efectos de la sustitución del ion Na ⁺	65

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Micrografía de los Túbulos de Malpighi de <i>Rhodnius prolixus</i>	5
Figura 2. Esquema del sistema excretor <i>Rhodnius prolixus</i> y su disposición respecto al sistema digestivo.	7
Figura 3. Esquema ampliado y detallado del sistema excretor de <i>Rhodnius prolixus</i>	8
Figura 4. Micrografía del extremo luminal de los Túbulos de Malpighi de <i>Rhodnius prolixus</i>	11
Figura 5. Modelo de secreción de una célula de <i>Rhodnius prolixus</i>	16
Figura 6. Vista lateral de la disposición experimental usada para determinar el flujo de secreción por un Túbulo de Malpighi aislado.....	32
Figura 7. Vista frontal de la disposición experimental <i>in vitro</i> empleada para determinar el flujo de secreción en los UMT.....	33
Figura 8. Efecto de Furosemida sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de <i>Rhodnius prolixus</i> en reposo.....	40
Figura 9. Histograma comparativo entre los efectos del tratamiento de Furosemida y el tratamiento aditivo de Furosemida y 5-HT sobre la acumulación del volumen secretado.....	41
Figura 10. Efecto de Ouabaína sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de <i>Rhodnius prolixus</i> en reposo.....	43
Figura 11. Efecto sinérgico de Ouabaína y Furosemida sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de <i>Rhodnius prolixus</i> en reposo.....	45
Figura 12. Efecto sinérgico de Furosemida y Ouabaína sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de <i>Rhodnius prolixus</i> en reposo.....	47
Figura 13. Histograma comparativo entre los efectos del tratamiento de Ouabaína antes y después de la adición de Furosemida sobre la acumulación del volumen secretado.....	48
Figura 14. Efecto simultáneo de Ouabaína y Furosemida sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de <i>Rhodnius prolixus</i> en reposo.....	50
Figura 15. Efecto sinérgico de Furosemida y Amilorida sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de <i>Rhodnius prolixus</i> en reposo.....	52
Figura 16. Efecto de Furosemida en presencia de bajo Na^+ extracelular sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de <i>Rhodnius prolixus</i> en reposo.....	55
Figura 17. Efecto de Furosemida tras el aumento de la concentración extracelular de Na^+ sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de <i>Rhodnius prolixus</i> en reposo.....	56

Figura 18. Efecto del pre-tratamiento de los UMT con distintos volúmenes de solución RI normal...	59
Figura 19. Efecto del pre-tratamiento de los UMT con 3 volúmenes de solución RI. normal...	60
Figura 20. Comparación del volumen total secretado de los UMT de <i>Rhodnius prolixus</i> en cada condición de lavado...	61
Figura 21. Efecto de Furosemida sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de <i>Rhodnius prolixus</i> recién alimentados (3 días)...	62

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT: 5-Hidroxitriptamina.

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

ENaC: Epithelial Sodium Channel.

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

RI: Ringer Insecto.

TM: Túbulos de Malpighi.

UMT: Upper Malpighian Tubules.

LMT: Lower Malpighian Tubules.

SDS: Sodecilsulfato sódico.

INTRODUCCIÓN

Rhodnius prolixus es un insecto hematófago exclusivo, del orden Hemiptera perteneciente a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Se caracteriza por presentar una coloración pardo-amarillento con manchas marrón oscuro en varias áreas del cuerpo. La cabeza es alargada hacia adelante (cabeza prognata), ojos compuestos. La probóscide es recta y está integrada por tres segmentos. En el tórax, visto por la cara dorsal, solamente se observa el pronoto, ya que el mesonoto y el metanoto están ocultos por las alas plegadas; del tórax salen tres pares de patas delgadas terminadas en un par de uñas. El abdomen es de forma oval y sus bordes laterales aplanados presentan marcas distintivas que permiten su clasificación. Durante su ciclo de vida presentan 5 estadios inmaduros (ninfas), y un estadio adulto. Las ninfas tienen una morfología similar a la de los adultos, sin embargo presentan menor tamaño y ausencia de alas (Wigglesworth, 1931).

Rhodnius prolixus es considerado el principal vector en Venezuela de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, causada por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi* y transmitida a través de la heces de insectos hematófagos, que al entrar en contacto con las heridas en la piel, específicamente en el área de la picadura, permite que se produzca el contagio de la enfermedad de Chagas (Benenson, 1992). Esta patología es una enfermedad parasitaria crónica caracterizada por cardiopatías, respuesta inmune descontrolada y muerte súbita (Molina y col., 2016).

Esta especie, en particular los ejemplares del 5^{to} instar (ninfa del quinto estadio previo al adulto) están adaptados a permanecer en ayuno por largos periodos de tiempo, seguidos de grandes y esporádicas ingestas de sangre, generando un aumento en su peso de

hasta 10 veces (Beyenbach y Petzel, 1987). Este cambio de volumen es posible gracias a la acción mecanorreceptores ubicados en el abdomen, que envían señales al sistema neurosecretor para que ocurra la liberación de hormonas, que debilitan la unión de las placas cuticulares del insecto, permitiendo la distensión del abdomen durante la ingesta de sangre (Maddrell y col., 1993; Orchard y col., 1989). El volumen de sangre ingerido representa una limitación durante el vuelo, además que implica un desbalance en el equilibrio osmótico e iónico de la hemolinfa. A manera de contrarrestar estos efectos, evolutivamente han desarrollado como estrategia la capacidad de iniciar, inmediatamente después de alimentarse, una diuresis (aumento en la excreción urinaria) de una fracción de agua y sales de la sangre ingerida en forma de orina “primaria” cuasi-isosmótica a la hemolinfa del insecto (Maddrell, 1963, 1980). Es posible que esto ocurra como una señal de saciedad, ya que el insecto detiene la ingesta de sangre justamente cuando inicia el proceso de excreción. Estos ejemplares pesan alrededor de 20 a 30 mg y tienen la capacidad de ingerir hasta 300 µL de sangre entre 10-20 minutos aproximadamente y secretar la mitad de ese volumen en 15-30 minutos por mecanismos regulados por hormonas (Maddrell y col., 1991a; Te Brugge y col., 2009).

Cuando *Rhodnius prolixus* toma sangre de un huésped mamífero, ingiere un líquido que contiene eritrocitos suspendidos en plasma rico en Na^+ , que es claramente hiposmótico (280-300 mOsm/kg H_2O) a su propia hemolinfa (370 mOsm/kg H_2O ; Maddrell, 1976). La sangre ingerida está compuesta por una mezcla de 55% de volumen de plasma y 45% de eritrocitos, cuyo citoplasma es rico en K^+ (150 mEq/l), mientras que el plasma tiene una alta concentración de cloruro de sodio (Na^+ : 140 mEq/l y Cl^- : 100 mEq/l; Maddrell y Phillips, 1975).

El plasma es digerido en primera instancia, incrementando la concentración de Na^+ en el fluido secretado, posteriormente se asimilan los eritrocitos lo que conlleva a un aumento en la concentración de potasio en el mismo. Por ejemplo, en el inicio de la diuresis el fluido secretado por el segmento superior de los túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* consiste en aproximadamente 100 mmol.l^{-1} de NaCl y 80 mmol.l^{-1} de KCl (Maddrell y Phillips, 1975).

Los túbulos de Malpighi (TM) representan el sistema excretor osmorregulador de *Rhodnius prolixus*, equivalentes al sistema de túbulos renales en los humanos. Los TM en periodos de ayuno presentan tasas de secreción insignificantes respecto a las obtenidas con la estimulación de 5-HT, por lo cual se consideran “inactivos” o “no funcionales”, y a los pocos minutos de comenzada la ingesta de sangre secretan un volumen a velocidades hasta de 50 nL/s.cm^2 (Whittembury y col., 1986; Maddrell, 1991) por la acción de las hormonas diuréticas, la Rhpro-DH (Te Brugge y col., 2011) y la 5-HT, la cual es una de las principales hormonas moduladoras de la diuresis (Aston, 1979; Maddrell y col., 1991a).

1.1. Anatomía de los túbulos de Malpighi en insectos.

Los TM son órganos constituidos por un epitelio simple no asociado a tejido conectivo subyacente (O'Donnell y Maddrell, 1984). Son tubos simples, de morfología cilíndrica, que presentan ligeras constricciones y abultamientos que les confieren un perfil ondulado (Figura 1). Los TM no están distribuidos homogéneamente en el proctodeo, sino formando grupos que parten de cada lado del tubo digestivo. De esta manera en los insectos, dependiendo de la especie, pueden presentarse túbulos individuales y otros que se disponen en grupos de dos o tres con un túbulo común llamado uréter, o de una vesícula

llamada vesícula urinaria (Barnes y Rupert, 1996). Los túbulos varían de 2 mm a más de 100 mm de longitud y de 30 a 100 μ m de diámetro (Wigglesworth, 1931).

Los TM se encuentran suspendidos en el hemocoele (cavidad general del cuerpo de los insectos) a los lados del tubo digestivo y poseen cierto grado de movimiento, a pesar de las numerosas tráqueas y traqueolas que median su intercambio gaseoso mediante uniones subcelulares (Wigglesworth, 1931).

De acuerdo a los estudios de la ultraestructura de los TM, están estructurados partiendo desde el interior al exterior del túbulo, de epitelio urinario y membrana basal, de la cual se adhieren externamente las tráqueas, los traqueoblastos y frecuentemente músculos que pueden formar bandas circulares, longitudinales o en espiral. Generalmente bastan de dos a tres células para formar la periferia del tubo, aunque en algunos casos el número puede ser mayor. El núcleo suele ser aplanado, de forma irregular, muchas veces lobulado y poliploide (Barnes y Rupert, 1996).

La matriz celular próxima a la membrana basal se invagina profundamente en las células formando numerosos pliegues. Estos pliegues dan a la superficie externa del epitelio urinario una apariencia estriada al microscopio de luz. Generalmente se diferencian dos extremos estructuralmente disímiles: una porción distal respecto al tubo digestivo (Upper Malpighian Tubules, UMT: Túbulo de Malpighi superior) considerada secretora y una proximal (Lower Malpighian Tubules, LMT: Túbulo de Malpighi inferior) de función absorbente. En el interior del tubo, así como entre los filamentos anteriormente descritos, pueden encontrarse corpúsculos redondeados que constituyen sustancias de excreción (Barnes y Rupert, 1996).

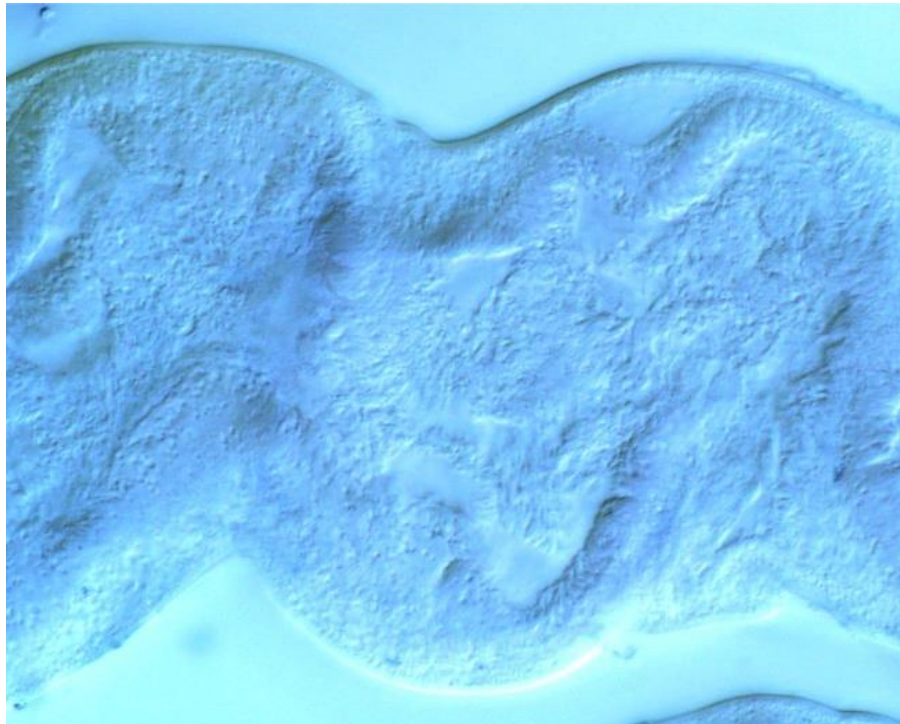


Figura 1. Micrografía del Túbulo de Malpighi de *Rhodnius prolixus*. Se muestra el perfil ondulado de los TM (Echeverría y colaboradores, 2001).

1.2. Anatomía de los túbulos de Malpighi en *Rhodnius prolixus*.

El sistema excretor osmorregulador de los insecto hematófagos, como es el caso de *Rhodnius prolixus*, está formado por los túbulos de Malpighi (TM).

En *Rhodnius prolixus* existen cuatro TM que miden aproximadamente la misma longitud (4 cm), poseen un extremo ciego (distal) inmerso en la hemolinfa, y un extremo proximal que desemboca en el recto a través de una región especializada, denominada ampolla rectal. Las cuatro ampollas están agrupadas alrededor de la abertura del intestino medio. El recto consta de un saco piriforme que incluye todo el intestino grueso, siendo éste capaz de distenderse de manera pronunciada apenas el insecto acaba de ingerir sangre durante su alimentación; la región glandular del epitelio está confinada al área alrededor de la abertura del intestino medio y los túbulos de Malpighi (Figura 2). El recto posee dimensiones de 2 mm de ancho por 2,5 mm de largo (Wigglesworth, 1931).

Cada uno de los cuatro túbulos poseen un extremo secretor (distal o UMT) que mide cerca de $\frac{2}{3}$ de su longitud total y que culmina en un extremo ciego (Figura 3), además constan de un extremo absortivo (inferior o proximal, respecto a la inserción del intestino) que equivale al $\frac{1}{3}$ restante y es el que desemboca propiamente a la ampolla rectal (Wigglesworth, 1931).

Las paredes de los túbulos están constituidas por un epitelio simple monoestratificado que descansa sobre una membrana homogénea y elástica denominada membrana basal, que interactúa con la hemolinfa (Wigglesworth, 1931).

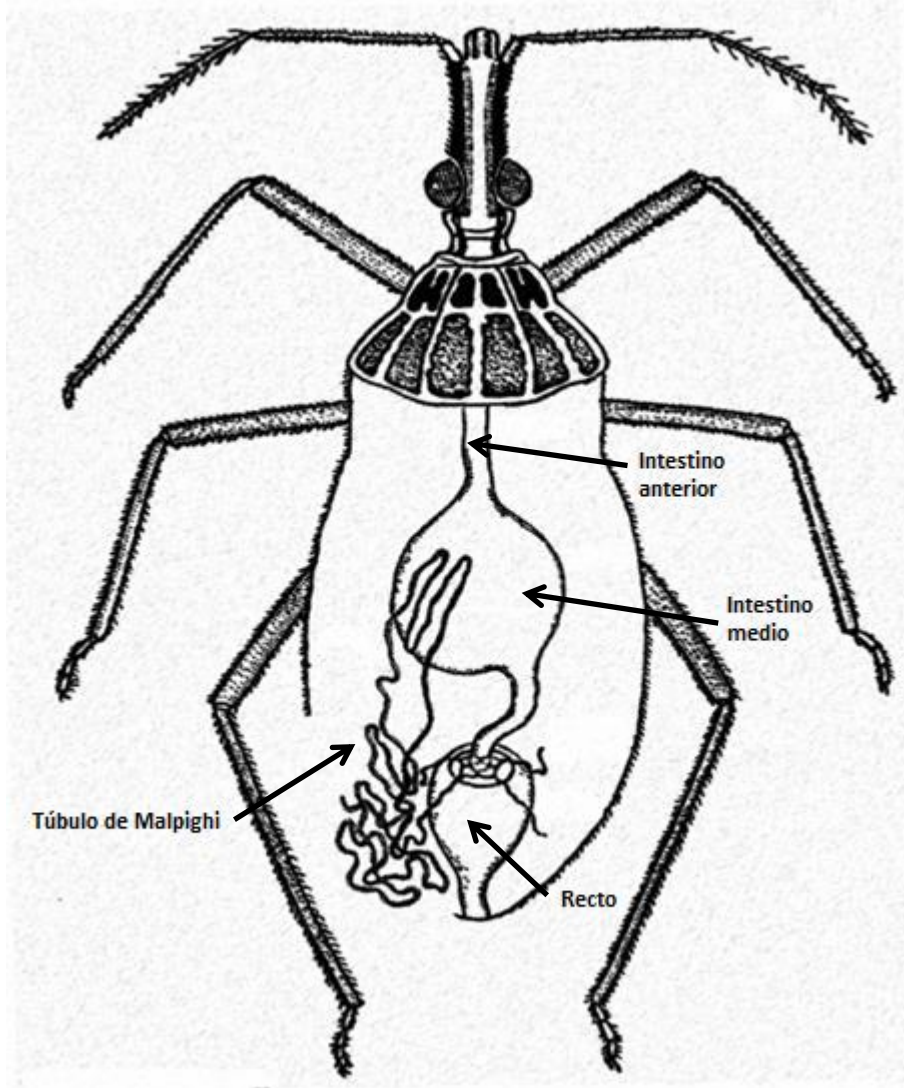


Figura 2. Esquema del sistema excretor de *Rhodnius prolixus* y su disposición respecto al sistema digestivo. Se muestra la inserción de los cuatro túbulos de Malpighi en el recto, y la distensión de un túbulo. (Modificado de Wigglesworth, 1931).

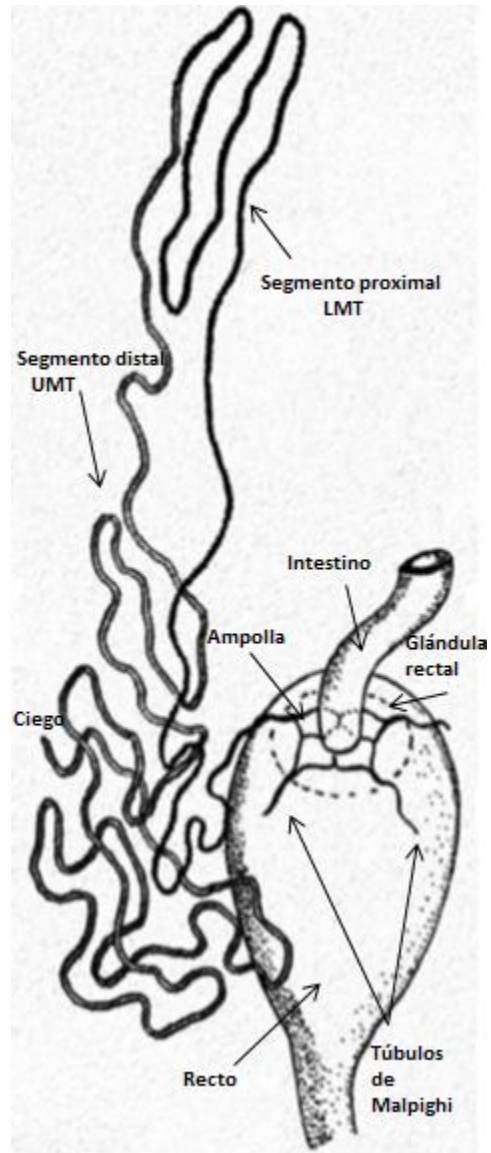


Figura 3. Esquema ampliado y detallado del sistema excretor de *Rhodnius prolixus*. Se muestra un tubo distendido, donde se observa el segmento distal (secretor) y proximal (absortivo) y su inserción en la ampolla rectal. (Modificado de Wigglesworth, 1931).

Los TM de *Rhodnius prolixus* presentan una transición evidente entre las porciones distal y proximal caracterizada por un cambio en el borde estriado: la parte proximal tiene paredes transparentes con un borde en cepillo y parece ser el sitio de precipitación de ácido úrico y reabsorción de agua. La parte distal tiene paredes ligeramente opacas con un borde en panal de abeja y es aquí donde se forma la orina (Wigglesworth, 1931).

Una diferencia considerable entre los segmentos distal y proximal que permite diferenciarlos subyace en que el primero presenta precipitados blanquecinos que corresponden a cuerpos de concreción al microscopio de luz, que son estructuras mineralizadas de calcio que se forman como consecuencia de la alimentación del animal, del cual el insecto ingiere la sangre (Maddrell y col., 1991b), los cuales no se encuentran presentes en el segmento proximal que son casi transparentes. Además, en la zona de unión de ambos segmentos puede apreciarse un cambio en el tipo celular encontrándose que las células que conforman la porción distal presentan pliegues regulares y paralelos, poseen filamentos ricos en mitocondrias, sin embargo es posible también hallar éstas en el segmento proximal pero en menor densidad y en ausencia de pliegues (Wigglesworth, 1972).

En *Rhodnius*, la superficie luminal del epitelio de la zona secretora (distal) está ocupada por multitud de microvellosidades apicales que contienen mitocondrias de gran tamaño (Figura 4). Estas microvellosidades, de 3 a 10 μm de longitud dan a esta superficie una apariencia estriada. En la zona excretora en cambio, se observan en la superficie interna del epitelio urinario microvellosidades mucho más escasas, de espesor variable y de 7 a 40 μm de longitud, de modo que son perfectamente visibles al microscopio óptico (Skaer y col., 1987).

El segmento secretor está constituido por un tipo celular, caracterizado por células grandes, binucleadas de morfología aplanada, cuyos núcleos están localizados en la región central. Estas células poseen patrones regulares alrededor del lumen mostrando una morfología semejante a una estructura hexagonal cuyos lados miden alrededor de 60 μm (Skaer y col., 1987) extendiéndose desde el extremo basal de la célula hacia las microvellosidades apicales.

Las paredes del segmento distal están constituidas por un epitelio simple, monoestratificado, de aspecto granular. Posee microvellosidades con una sección transversal de aproximadamente 0,25 μm de diámetro y una longitud variable de 3 a 10 μm , siendo el espacio entre las membranas de filamentos adyacentes de 150 a 200 Å , distancia que es del mismo orden de magnitud que el espacio existente entre membranas plasmáticas de células adyacentes (Wigglesworth y Salpeter, 1962; Hernández y col., 2001). También el segmento absortivo presenta microvellosidades, empaquetadas fuertemente entre sí, en su estructura del borde apical con una sección transversal de diámetro promedio de 0,25 μm y una longitud que varía entre 3 a 10 μm .

Los TM son responsables de llevar a cabo procesos de secreción y reabsorción de fluidos y electrolitos; cada extremo cumple una función específica, el extremo distal se considera secretor mientras que el proximal, cumple funciones absortivas. El segmento distal (extremo ciego) de los TM secreta electrolitos, solutos orgánicos y agua, mientras que extremo proximal reabsorbe solutos y agua (Marshall y col., 1993; Van Kerkhove, 1994; Beyenbach, 1995; O'Donnell y Maddrell, 1995; Linton y O'Donnell, 2000). La reabsorción continúa en el intestino medio y el recto (Chao y col., 1989; Phillips y col., 1996; Coast, 2001).

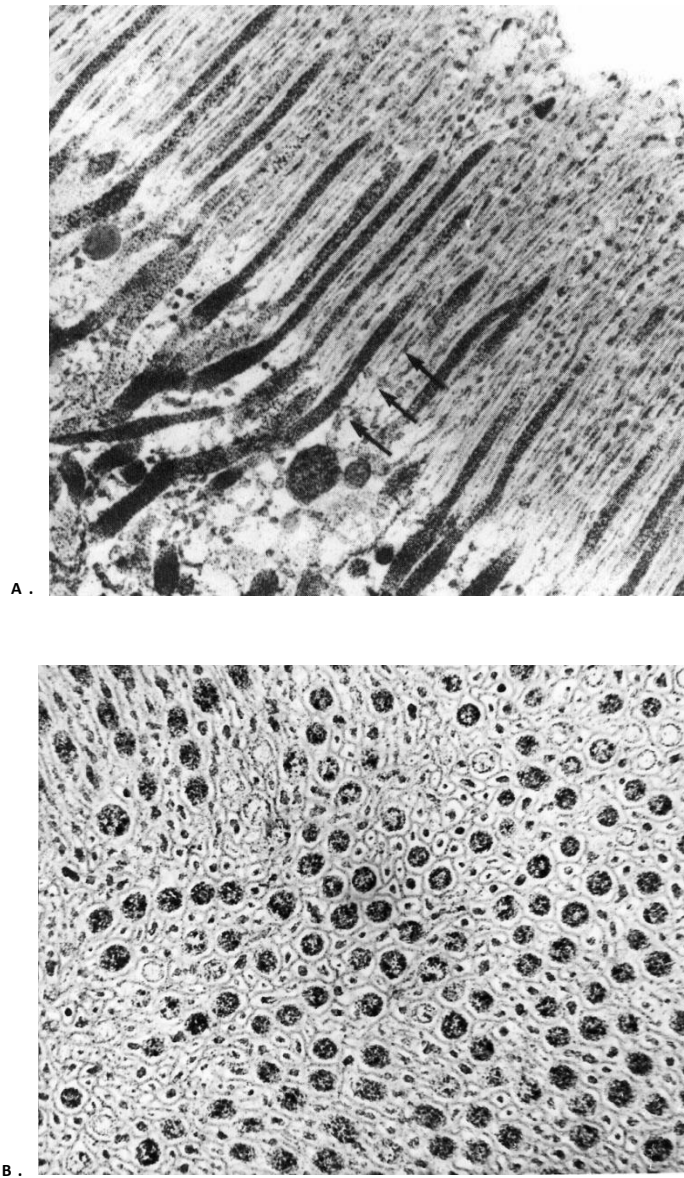


Figura 4. Micrografías del extremo luminal de TM de *Rhodnius prolixus*. A. Corte longitudinal de las microvellosidades apicales y la inserción de las numerosas mitocondrias de gran tamaño (Whittembury y col., 1986). B. Corte transversal de las microvellosidades apicales, se observan las mitocondrias distribuidas a lo largo de las microvellosidades (Berthelet y col., 1987).

Cada célula de las porciones secretoras de fluidos de los túbulos del insecto *Rhodnius prolixus* puede transportar 3 pmoles.s^{-1} iones (o $2.10^{12} \text{ iones.s}^{-1}$) y su propio volumen de líquido cada 15 segundos (Maddrell, 1991).

Debido que los TM no presentan inervación, la regulación del transporte epitelial está mediada a través de mecanismos intrínsecos y de mensajeros que circulan en la hemolinfa (Beyenbach, 2003). Maddrell (1963) demostró que la diuresis en *Rhodnius* está regulada por una “hormona diurética”, que es secretada por las células neurosecretoras localizadas en los ganglios mesotorácicos lo que genera una rápida secreción de la orina primaria. Posteriormente, demostró que es la 5-Hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina la cual es sintetizada naturalmente por el insecto cumpliendo funciones diuréticas (Maddrell, 1991).

Cuando *Rhodnius prolixus* se alimenta de sangre, la distensión del abdomen es captada por los receptores de estiramiento en la cutícula abdominal, que induce la liberación de la serotonina (5-HT) y Rhpro-DH por un sistema neurosecretor localizado en el ganglio mesotorácico de *Rhodnius prolixus* y los nervios abdominales asociados (Orchard y col., 1989; Maddrell y col., 1993). Los movimientos peristálticos del intestino medio son un factor importante en el transporte de 5-HT y Rhpro-DH a los TM, donde se une a los receptores de la membrana basolateral, desencadenando la diuresis (Maddrell, 1964).

La rápida eliminación de la orina generalmente comienza dentro de 2-3 minutos después de la alimentación y se prolonga durante las 3 horas siguientes, en las cuales el insecto puede perder 40-50% del volumen de la sangre ingerida (Martini y col., 2007).

La temperatura juega un papel importante en los procesos fisiológicos y metabólicos. En el caso particular de *Rhodnius prolixus*, los procesos fisiológicos se llevan a cabo en un intervalo de temperatura óptimo entre 28°C y 33°C. Un aumento de la temperatura aproximado a 33°C genera un rápido incremento en la tasa de secreción, mientras que la tasa decae pronto en respuesta a una disminución de temperatura (menores de 28°C). El tiempo necesario para alcanzar una nueva tasa de secreción constante es probablemente el requerido para que la temperatura del insecto alcance la del entorno (Maddrell, 1964). En este sentido, en el laboratorio se ha observado que a temperaturas menores a 28°C ocurre la disminución de la excreción en los ejemplares del 5¹⁰ instar de *Rhodnius prolixus*, quedando interrumpida hasta por 2 semanas (datos no publicados).

El mecanismo de acción TM es atractivo desde el punto de vista fisiológico por dos razones principales. La primera y más importante es que durante la diuresis, estos túbulos pueden transportar fluidos a una velocidad muy alta de hasta $3,3 \mu\text{L} \cdot \text{m} \cdot \text{in}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ (equivalente a $55 \text{ nl} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$). Esto se puede comparar con la cifra de $0,25 \mu\text{L} \cdot \text{m} \cdot \text{in}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ de los túbulos de Malpighi de la cucaracha (Diamond, 1962), $1,1 \mu\text{L} \cdot \text{m} \cdot \text{in}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ de la vesícula biliar del perro (Grim y Smith, 1957). Además en el túbulo proximal del conejo se encontró que la velocidad media de absorción es de $2 \cdot 10^{-3} \mu\text{L} \cdot \text{m} \cdot \text{in}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ (Burg y Orloff, 1968) siendo evidentemente menor que la velocidad de transporte de los TM.

La segunda razón es que la interpretación de los resultados obtenidos con los túbulos de *Rhodnius prolixus* es probablemente facilitada por el hecho de que la parte secretora del túbulo consiste en un solo tipo de célula, mientras que se ha demostrado que los túbulos de *Calliphora* consisten en una población heterogénea de dos tipos de células,

las primarias y las estrelladas, que cumplen funciones distintas en el mecanismo de secreción del insecto (Berridge y Oschman, 1969).

1.3. Fisiología de la excreción en *Rhodnius prolixus*.

Las células de los TM de *Rhodnius prolixus* experimentan condiciones de estrés osmótico dependiendo del estado de alimentación del insecto. Luego de la alimentación la osmolaridad de la hemolinfa decrece, debido a que la osmolaridad del plasma sanguíneo es más baja que la de ésta. Por ende, es necesario que existan mecanismos específicos de regulación tales como el control del volumen celular, para que el insecto sobreviva.

La formación de la orina es llevada a cabo por el transporte transepitelial de solutos y agua entre la hemolinfa del insecto y la luz de los UMT por medio de intercambiadores, canales y un mecanismo activo de bombeo provisto por ATPasas de membrana, además es regulada por hormonas diuréticas que activan el flujo de secreción de los UMT.

La secreción tubular en *Rhodnius prolixus* se inicia con la liberación de 5-HT y Rhpro-DH por parte del sistema neurosecretor localizado en el ganglio mesotorácico del insecto en respuesta a estímulos como cambios de volumen o aumento en la presión hidrostática del exoesqueleto, esto activa a los receptores ubicados en la membrana basolateral de los UMT (Maddrell, 1980; Maddrell y col., 1991a, 1993), estimulando la actividad de la adenilatociclasa que aumenta la concentración de AMPc intracelular, lo cual promovería una cascada de fosforilación (Aston, 1979; Maddrell, 1963; Maddrell y col., 1991).

El incremento de la concentración intracelular del AMPc activa una ATPasa de H^+ de tipo vacuolar ubicada en la membrana apical (Wieczorek y col., 1991; revisado por

Beyenbach, 2001) encargada de energizar el flujo transepitelial, mediante el transporte electrogénico de H^+ desde el citoplasma hacia el lumen creando un gradiente de protones desde el lumen hacia el citoplasma. Esta salida de H^+ desde el citoplasma hacia la luz tubular genera un gradiente que permite el intercambio luminal de H^+ sensible a amilorida por Na^+ y/o K^+ citoplasmático (Maddrell y O'Donnell, 1992; Beyenbach, 2001). La salida de cloruro del citoplasma hacia el lumen ocurre espontáneamente a través del canal de Cl^- ubicado en la membrana apical. El movimiento de iones está acompañado por el flujo de H_2O a través de los canales de agua, de manera de mantener estable el potencial electroquímico de la célula.

Por otra parte se cree que el incremento de la concentración de AMPc estimula el triple cotransportador electroneutro $Na^+/2Cl^-/K^+$ en la membrana basolateral, promoviendo el ingreso de los tres iones al citoplasma (Haas y Forbush, 2000). A través del cual ingresa el Na^+ a la célula promoviendo un aumento en la concentración citoplasmática del ion, lo cual activa la ATPasa de Na^+/K^+ sensible a ouabaína así como también se activa el intercambiador Cl^-/HCO_3^- , generando entonces un flujo neto de K^+ y Cl^- hacia el citoplasma y lumen, y un flujo de Na^+ hacia lado extracelular (Figura 5).

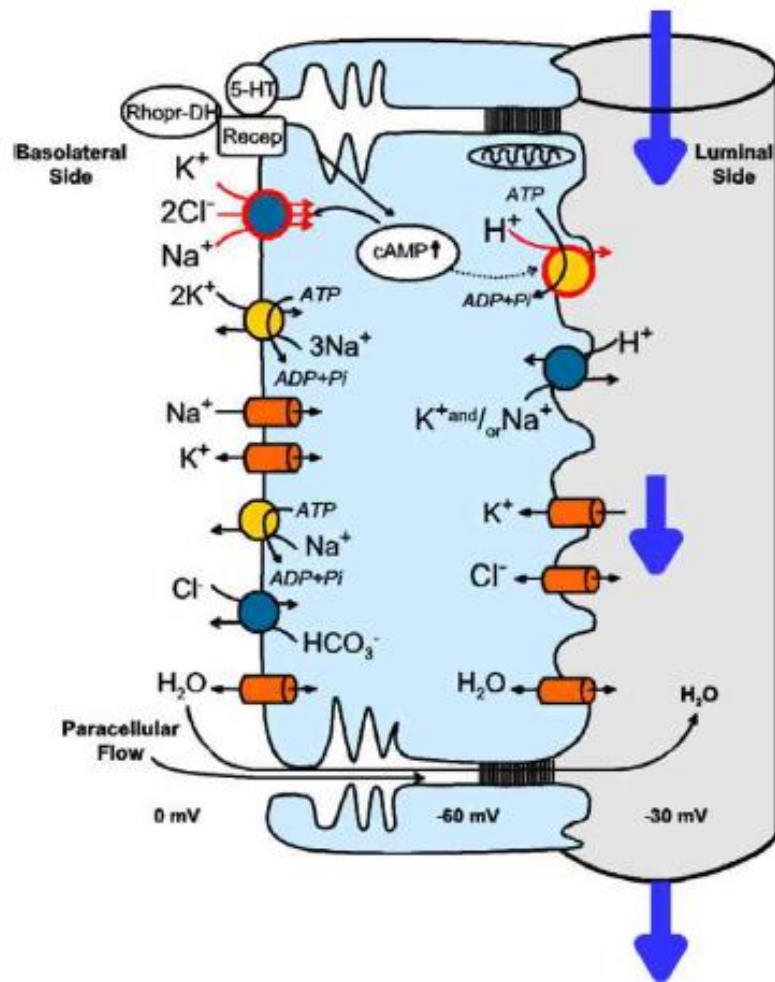


Figura 5. Modelo de la secreción en una célula de *Rhodnius prolixus*. El esquema explica dirección de la secreción es de izquierda (membrana basolateral, hemolinfa) a derecha (membrana apical, luz del túbulo). Las ATPasas se muestran como círculos amarillos, intercambiadores como círculos sombreados azules, y los canales como cilindros. Las flechas indican las direcciones de flujo propuestas. El perfil de potencial eléctrico en estado estacionario de UMT durante la secreción se muestra en la parte inferior. En la membrana basolateral, las hormonas diuréticas 5-HT y Rhopr-DH se muestran adyacentes de un receptor que a través de una cascada de AMP cíclico activaría varios mecanismos, como el cotransportador electroneutro $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$. Se muestran la ATPasa Na^+/K^+ sensible a la ouabaína y la ATPasa Na^+ de resistente a la ouabaína e inhibida por furosemida y bumetamida. Se muestra un canal epitelial de Na^+ y los canales K^+ . En la membrana apical se localiza una ATPasa de H^+ (Wieczorek y col., 1991; revisado por Beyenbach, 2001) de tipo vacuolar encargada de energizar el flujo transepitelial, mediante el transporte electrogénico de H^+ desde el citoplasma hacia el lumen creando un gradiente de protones desde el lumen hacia el citoplasma, además del intercambiador de H^+ luminal sensible a amilorida por Na^+ y K^+ citoplasmático (Maddrell, O'Donnell, 1992; Beyenbach, 2001). (Tomado y modificado de Gámez y col., 2012).

1.4. Homeostasis de Na^+ intracelular.

Al igual que en toda célula epitelial la ATPasa Na^+/K^+ es una proteína integral de membrana ubicada en la membrana basolateral, participa en la regulación de la osmolaridad y el volumen celular controlando el flujo de 2K^+ hacia el citoplasma y 3Na^+ hacia la hemolinfa, manteniendo el gradiente electroquímico de Na^+ y K^+ a través de la membrana celular. Si bien la ATPasa Na^+/K^+ contribuye a la salida de Na^+ , en *Rhodnius prolixus* media el transporte de Na^+ en contra del flujo de secreción (Gutiérrez y col., 2004).

La ouabaína es un reconocido y eficaz inhibidor de la ATPasa Na^+/K^+ . Al inhibir la bomba de Na^+/K^+ se genera una disminución del flujo de Na^+ a través de la membrana basolateral debido al bloqueo de la salida del ion, en consecuencia aumenta la concentración citoplasmática de Na^+ , acrecentando su disponibilidad para el transporte a través de la membrana apical mediado por el intercambiador de Na^+ y/o K^+-H^+ , lo que facilita el flujo del ion hacia el lumen. Por otra parte también se ha propuesto que la estimulación con serotonina (5-HT) también inhibe a la bomba Na^+/K^+ en un 60% (Grieco y Lopes, 1997). Esta secreción continua en presencia de ouabaína confirmando la importancia de la ATPasa de H^+ de tipo vacuolar en el transporte epitelial (Beyenbach y col, 2000; Ianowski y O'Donnell, 2001).

La ouabaína cumple funciones de toxina en las plantas, por ser un conocido y potente inhibidor de la ATPasa Na^+/K^+ , sin embargo no tiene un efecto evidente en los TM de muchos insectos como por ejemplo *Drosophila melanogaster*, *Formica polyctena*, *Glossina morsitans*, entre otros. Torrei y colaboradores (2004) demostraron que existe una vía de transporte activo, denominada oatps, para la ouabaína (primario o secundario) al

encontrar el glucósido en el flujo secretado de los TM de *Drosophila* (la cepa silvestre Oregon R) sin ninguna modificación en su estructura. El sistema de transporte activo de ouabaína representa una protección para los túbulos, ya que impiden que la toxina alcance concentraciones inhibitorias en los TM, lo cual explica que muchos insectos sean altamente resistentes a toxinas vegetales como la ouabaína. La explicación de la estimulación aparentemente paradójica de la secreción de fluidos y del transporte de Na^+ por la ouabaína en el epitelio secretor es que la bomba Na^+/K^+ transporta el Na^+ en una dirección opuesta a la secreción de fluido. La acción normal de esta bomba es minimizar el flujo neto de Na^+ a través del epitelio y, en consecuencia disminuir la secreción de fluido. Al inhibir la bomba de Na^+/K^+ con ouabaína se esperaría minimizar el flujo de Na^+ a través de la membrana basolateral, dado el bloqueo de la salida del ion, generando un aumento en la concentración intracelular de Na^+ que favorece la disponibilidad del ion para el transporte a través de la membrana apical, mediado por el intercambiador de Na^+ y/o K^+-H^+ , facilitando el flujo del ion hacia el lumen (Hernández y col., 2001).

Sin embargo, en condiciones de no estimulación o en reposo de los TM de los insectos se ha demostrado que la ouabaína no tiene efecto sobre la concentración intracelular de Na^+ (García, 2010). En células epiteliales de mamífero, la ouabaína induce un aumento en el volumen de la célula, por la acumulación de Na^+ citoplasmático que viene seguido del ingreso de agua, lo que genera la lisis celular (Proverbio y col., 1970; Proverbio y del Castillo, 1981; Marín y col., 1983, del Castillo y Robinson, 1985a, 1985b; Orsenigo y col., 1988).

Además se ha observado que la aplicación de ouabaína en condiciones de no estimulación de los TM no produce efectos en la acumulación de Na^+ intracelular (García,

2010), por lo que se deduce que la ATPasa Na^+/K^+ parece no ser el único mecanismo de regulación de la concentración intracelular de Na^+ , dado que al inhibir esta bomba, se esperaría un concomitante aumento de dicho ion en el fluido de secreción, al no observar estos cambios entonces debe existir otra vía de salida de Na^+ hacia la hemolinfa.

Se ha planteado como una explicación alternativa que al no poder entrar suficiente Na^+ al citoplasma al encontrarse inactivo el triple cotransportador $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{K}^+$, la cantidad de Na^+ que la ATPasa Na^+/K^+ exporta del citoplasma podría ser considerablemente menor que aquella expulsada por un segundo mecanismo de transporte de Na^+ que sería fundamental para la homeostasis en condiciones no secretoras. Proverbio y colaboradores (1970) plantearon la segunda bomba de Na^+ para el riñón de mamífero, que podría elucidar aspectos de este fenómeno.

Esta ATPasa de Na^+ insensible a Ouabaína e inhibida por Furosemida y Bumetamida localizada en la membrana basolateral, estaría desplazando Na^+ del espacio intracelular cuando la ATPasa Na^+/K^+ está siendo bloqueada por ouabaína, esto podría explicar que el ion no se acumule en el citoplasma.

Además en condiciones no secretoras, es decir en ausencia de estimulación de secreción por parte de las hormonas, el triple cotransportador $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{K}^+$ no está activo lo que conlleva a la disminución del flujo de Na^+ hacia el interior citoplasmático, en consecuencia no se activa ATPasa Na^+/K^+ , debido a que la $[\text{Na}^+]_i$ es la señal activadora de esta bomba.

Bajo estas condiciones se ha observado en los UMT de *Rhodnius prolixus* un aumento significativo en la concentración intracelular de Na^+ en presencia de furosemida

(García, 2010), por lo que se esperaría que el incremento del Na^+ citoplasmático favorezca el intercambio de Na^+ y 6K^+ por H^+ luminal, facilitando el flujo del ion hacia el lumen, y en consecuencia generar el flujo de secreción de los UMT.

1.5. Antecedentes de la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína.

Esta bomba de Na^+ fue propuesta por primera vez por Whittembury (1968), en cortes de riñón de mamífero, como un mecanismo de salida de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por ácido etacrínico, cuya actividad sería independiente de la concentración extracelular de K^+ , en consecuencia este mecanismo sería distinto de la ATPasa de Na^+/K^+ . Establece que esta salida de Na^+ podría ser una bomba electrogénica que desplazaría Na^+ del citoplasma en compañía principalmente de Cl^- y un movimiento significativo de agua, regulando el volumen celular.

En 1970, Proverbio y colaboradores proponen la segunda bomba de Na^+ en células de riñón de mamífero. En 1986, Proverbio y colaboradores demostraron en membranas plasmáticas basolaterales a partir de células tubulares proximales de riñón de rata, la existencia de dos sistemas de ATPasa estimulados con Na^+ : la ATPasa sensible a la ouabaína e insensible a furosemida (Na^+/K^+) y la ATPasa Na^+ insensible a la ouabaína e inhibida por furosemida y bumetamida.

Esta bomba ha sido descrita en varios tejidos como riñón (Proverbio y col., 1970; Proverbio y del Castillo, 1981; Marín y col., 1983), intestino delgado (del Castillo y Robinson, 1985a, 1985b; Orsenigo y col., 1988) y branquias (Pfeiler y Kirschner, 1972; Ventrella y col., 1987), por lo que Proverbio y colaboradores (1991) proponen que la función de la Segunda ATPasa Na^+ en tales tejidos sería generar un flujo vectorial de Na^+ ,

de un lado a otro de las células epiteliales, contribuyendo en esta manera al control de este ion dentro del organismo.

Se ha propuesto la existencia de la Segunda ATPasa Na^+ insensible a ouabaína en los TM de *Rhodnius prolixus* (Caruso-Neves y col., 1998), realizando ensayos de la actividad de la ATPasa en homogenatos celulares de los TM; determinaron que su actividad es dependiente de Mg^{2+} , además es inhibida por pequeñas cantidades de vanadato (intervalo micromolar), indicando una ATPasa de tipo P. Aunque esta ATPasa Na^+ se ha descrito en varios tipos de células (Proverbio y col., 1989; Moretti y col., 1991; Caruso-Neves y col., 1998, 1999; Rangel y col., 1999), no existen evidencias que señalen la localización exacta de la ATPasa en alguna de las dos membranas.

Estas evidencias apoyan la existencia de una ATPasa de Na^+ en la membrana basolateral. Su actividad podría estar enmascarada por la ATPasa Na^+/K^+ cuando los TM se encuentran estimulados. Al ser inhibida con furosemida en TM sin estimular, mantiene la concentración intracelular de Na^+ estable lo que facilita su secreción hacia el lumen a través del intercambiador Na^+ y/o $\text{K}^+ - \text{H}^+$ en la membrana apical. La ATPasa Na^+ insensible a ouabaína sería el mecanismo principal para el movimiento de Na^+ desde el citoplasma hacia la hemolinfa en condiciones de no estimulación regulando de esta manera la homeostasis celular. Según Caruso-Neves y colaboradores (2002) la ATPasa de Na^+ es aproximadamente 10 veces menos activa que la ATPasa Na^+/K^+ lo que sugiere que esta enzima puede estar involucrada en el ajuste fino, mientras que la ATPasa Na^+/K^+ es responsable de la mayor parte de la reabsorción de Na^+ en el segmento proximal.

En trabajos realizados en el laboratorio, con ejemplares de *Rhodnius prolixus* del 5^{to} instar luego de 3 días de la última alimentación, al tratar los TM con furosemida se ha observado que no hay incremento en la concentración intracelular de Na^+ . Por lo que se sugiere un cese en la actividad de la segunda bomba de Na^+ bajo esas condiciones (Datos no publicados).

Es por consiguiente interesante estudiar el transporte epitelial de Na^+ en condición de reposo (sin estimulación de las hormonas diuréticas) a través de la Segunda ATPasa de Na^+ en la membrana basolateral del epitelio excretor de los UMT de *Rhodnius prolixus*.

En el presente trabajo se plantea como objetivo principal el estudio *in vitro* del flujo de la secreción dependiente Na^+ en condición de no estimulación del epitelio excretor de los UMT de *Rhodnius prolixus* empleando diferentes fármacos inhibitorios cuyo efecto es conocido, responsables de perturbar la actividad de los mecanismos de transporte epitelial a nivel de la membrana basolateral de la célula.

II. ANTECEDENTES

Los túbulos de Malpighi (TM) de *Rhodnius prolixus* tienen la capacidad de pasar de una condición no secretora (cuando no están estimulados por 5-HT ni Rhpro-DH) a secretar un volumen de fluido a velocidades hasta de 50 nL/s.cm^2 (Whittembury y col., 1986; Maddrell, 1991) a los pocos minutos de comenzada la ingesta de sangre, por la acción de la hormona Rhpro-DH (Te Brugge y col., 2011) y la 5-HT, la cual es una de las principales hormonas moduladoras de la diuresis (Aston, 1979; Maddrell y col., 1991a). En periodos de ayuno presentan tasas de secreción insignificantes respecto a las obtenidas con la estimulación de 5-HT, por lo cual se consideran “inactivos” o “no funcionales”.

Maddrell (1969) demostró en los TM de *Rhodnius prolixus* existe una relación lineal entre el volumen de fluido secretado (μL) y el tiempo (min).

Ianowski y colaboradores (2001) midieron la actividad de iones intracelulares y el potencial de membrana basolateral en células de los TM de *Rhodnius prolixus* usando microelectrodos selectivos de iones de cañón doble. Observaron que en TM no estimulados la $[\text{Na}^+]_i$ fue de 21 mmol.l^{-1} y que aumentaba a 33 mmol.l^{-1} cuando los TM eran estimulados con 5-HT. Estos resultados llevaron a García (2010) a estudiar la homeostasis del Na^+ en células epiteliales de *Rhodnius prolixus*, *Aedes aegypti* y células C6/36 de *Aedes albopictus*. Utilizando un sistema de perfusión evaluó el efecto conjunto de ouabaína $25 \mu\text{M}$ y furosemida 1 mM sobre los cambios en $[\text{Na}^+]_i$ en TM no estimulados. Los resultados obtenidos mostraron que la ouabaína no induce cambios en la concentración de Na^+ intracelular, sin embargo la adición de furosemida produjo un incremento en la $[\text{Na}^+]_i$. En

consecuencia, sus resultados confirman la existencia de la segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína, la cual sería la principal responsable del movimiento de Na^+ desde el citoplasma hacia la hemolinfa en condiciones no activas.

Se han presentado evidencias experimentales de la existencia de una ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína en células de mamíferos, que han permitido explicar el segundo mecanismo de transporte de Na^+ en los TM de *Rhodnius prolixus*. Whittembury (1968) planteó la existencia de dos mecanismos de salida basolateral de Na^+ en células de riñón de mamífero, un intercambiador de Na^+/K^+ sensible a ouabaína, y bomba de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por ácido etacrínico, que podría ser electrogénica. Proverbio y colaboradores (1986) presentaron evidencias que diferencian claramente la ATPasa Na^+/K^+ y la ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína en membranas plasmáticas basolaterales de células tubulares proximales de riñón de rata. En su estudio encontraron que ambas ATPasas reaccionan de manera disímil frente diferentes concentraciones de SDS, además que la digestión de la ATPasa Na^+/K^+ ocasiona la pérdida de actividad de la enzima, mientras que la tripsina no afecta la actividad de la ATPasa de Na^+ .

Proverbio y colaboradores (1991) además observaron en células de riñón de rata que la actividad de la ATPasa de Na^+ está relacionada y modulada por el volumen celular y sugieren que la función principal de la bomba de Na^+ puede establecerse mediante su asociación con la regulación del volumen celular activo, esta respuesta diferencial hacia los cambios de volumen apoya la hipótesis de la existencia de dos enzimas distintas con funciones similares en la extracción de Na^+ a través de la membrana basolateral.

Rocafull y colaboradores (2012) lograron la purificación y la clonación de la subunidad α de la ATPasa de Na^+ de células del epitelio intestinal de cobaya, que les permitió definirla como una entidad bioquímica y molecular única. Los genes de la ATPasa Na^+/K^+ y la ATPasa de Na^+ se encuentran en el mismo locus, *atplal*, pero tienen promotores independientes y algunos exones diferentes. La obtención de un clon de la subunidad α de la ATPasa de Na^+ que no corresponde a la ATPasa de Na^+/K^+ representan la prueba definitiva de la existencia de la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por furosemida.

Teniendo en cuenta que la actividad de la ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por furosemida se ha encontrado en una variedad de tejidos de diferentes animales, Caruso-Neves y colaboradores (1998) estudiaron la posible existencia de esta ATPasa en células tubulares de *Rhodnius prolixus*. Determinaron la respuesta reguladora de la secreción en homogenatos de células tubulares observando que no fue modificada por ouabaína 1 mM, lo que sugiere la presencia de un mecanismo diferente de la ATPasa Na^+/K^+ . Esta respuesta reguladora fue inhibida por la furosemida y el ácido etacrínico, inhibidores de la ATPasa insensible a ouabaína. Los autores señalan que las células de los TM de *Rhodnius prolixus* expresan la actividad de ATPasa dependiente de Mg^{2+} estimulada por Na^+ , que es inhibida por cantidades en el rango micromolar de vanadato, indicando que es una ATPasa tipo P. Además que la actividad de la ATPasa de Na^+ es inhibida por 2 mM de furosemida y no es sensible a concentraciones de ouabaína de hasta 10 mM, por lo que proponen que esta ATPasa es una enzima diferente a la ATPasa Na^+/K^+ .

Resultados preliminares del laboratorio muestran una disminución en el efecto de furosemida cuando se estudian UMT de *Rhodnius* recién alimentados. Considerando el

modelo de secreción de los TM de *Rhodnius prolixus* (Gutiérrez y col., 2004), la adición de furosemida estaría inhibiendo la actividad del triple cotransportador de $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$, dejando disponible la entrada de Na^+ a través de la conductancia de Na^+ tipo ENaC (del inglés Epithelial Sodium Channel) propuesta por García (2010). La furosemida además genera un incremento de la concentración de Na^+ intracelular por el bloqueo de la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína. Al no observar cambios en la concentración citoplasmática del ion, se sugiere que no hay la actividad de la segunda bomba de Na^+ bajo esas condiciones (datos no publicados).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Estudiar *in vitro* el flujo de secreción transepitelial dependiente de Na^+ , de los túbulos de Malpighi (UMT) de *Rhodnius prolixus* en condiciones de no estimulación y en ejemplares recién alimentados (3 días).

3.2. Objetivos Específicos

- Evaluar si la adición de furosemida induce la secreción de los UMT en reposo.
- Estudiar el efecto de ouabaína sobre la secreción inducida por furosemida de los UMT en reposo.
- Determinar el efecto de amilorida sobre la secreción inducida por furosemida de los UMT en reposo.
- Evaluar la secreción inducida por furosemida en presencia de bajo Na^+ extracelular de los UMT en reposo.
- Determinar si la adición de furosemida induce la secreción de los UMT de ejemplares recién alimentados.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Material biológico

Los ensayos se efectuaron con ejemplares de *Rhodnius prolixus* criados en cautiverio en el Laboratorio de Biología de Vectores y Parásitos del Instituto de Zoología y Ecología Tropical (IZET) adscrito a la U.C.V. Para la obtención de los túbulos de Malpighi (TM), se emplearon imagos del 5^{to} instar de ambos sexos, que fueron criados y mantenidos en el laboratorio en incubadoras a una temperatura de 28 °C y 95 % de humedad, a los cuales se les alimentó con sangre de gallinas. Se utilizaron dos grupos de insectos: el primer grupo constituido por ejemplares con 3 semanas en ayuno, mientras que el otro grupo constaba de chipos con 3 días a partir de la última alimentación.

4.2. Reactivos y soluciones

Los reactivos empleados para la preparación de las soluciones utilizadas pertenecen a las casas comerciales Merck y Sigma Chemicals Co. Las soluciones fueron separadas en alícuotas y congeladas para asegurar su estabilidad. De manera que todos los experimentos fueron realizados con soluciones frescas descongeladas en el mismo día. Los fármacos se añadieron en pequeños volúmenes (\leq a 5 μ l) de soluciones concentradas. Las concentraciones reportadas son las alcanzadas en el pozo de la cámara de secreción.

4.2.1. Ringer Insecto (RI)

La preparación de la solución fisiológica para *Rhodnius prolixus* se efectuó con modificaciones de la fórmula de Ringer Insecto propuesta por Maddrell (1969) para el

aislamiento y estudio de los túbulos de Malpighi y contiene los siguientes componentes: NaCl 145 mM ; KCl 8.6 mM ; NaHPO₄ 4.3 mM ; NaHCO₃, 10.2 mM ; CaCl₂, 2 mM ; glucosa 34 mM ; HEPES 5 mM ; alanina 3 mM ; pH 7.2; osmolaridad 340 mOsm/kg siendo esta isosmótica respecto a la hemolinfa del insecto.

4.2.2. Ringer Bajo Na⁺

Para realizar experimentos en ausencia del catión Na⁺ se empleó Cloruro de n-metilglucamina 145 mM ; KCl 8.6 mM ; NaHPO₄ 4.3 mM ; NaHCO₃ 10.2 mM ; CaCl₂ 2 mM ; glucosa 34 mM ; HEPES 5 mM ; alanina 3 mM ; pH 7.2; osmolaridad, 340 mOsm/kg.

4.2.3. Concentraciones de los fármacos

En cada uno de los experimentos fueron agregados soluciones RI con diferentes agentes farmacológicos, alcanzándose concentraciones finales de: Furosemida 1000 μM (1mM), Ouabaína 25 μM, Amilorida 100 μM, 5-HT 2 μM, para evaluar sus efectos individuales o en conjunto sobre el volumen de secreción.

4.3. Diseño experimental

4.3.1. Disección y Aislamiento de los Túbulos de Malpighi (TM) de *Rhodnius prolixus*.

Bajo un estereoscopio y con asistencia de pinzas de disección, se sujetó al insecto a nivel del cuello, empleando una tijera ocular se decapitó y se fijó con alfileres entomológicos a nivel del mesotórax y las patas, en decúbito ventral, a una cápsula de Petri cuyo fondo contenía cera coloreada para generar contraste con los TM. Luego de esto, se agregó solución RI sobre la preparación. Se cortaron las alas incipientes y el borde de

quitina alrededor del abdomen (conexivo) en la región dorsal. Posteriormente se realizó un corte transversal del exoesqueleto a nivel del tórax, y se levantó y fijó a la cámara de forma tal que quedaran expuestos los órganos internos del insecto, de esta manera se lograron visualizar los TM dispuestos en la hemocela del insecto unidos a la ampolla rectal.

Con ayuda de asas de vidrio se desenrollaron y aislaron intactos los túbulos de Malpighi, con las cuales se limpió el tejido de las traqueolas adosadas a él. Finalmente, se cortó el extremo proximal de cada túbulo, empleando una micropipeta de 1 mL de la casa comercial Eppendorf[®] cuya punta fue sustituida por una pipeta Pasteur modificada, fueron transportados a la cámara de medición donde se llevaron a cabo los experimentos. Los segmentos de UMT una vez aislados se mantuvieron en solución fisiológica Ringer Insecto.

4.3.2. Montaje de los Túbulos de Malpighi en la cámara de medición del volumen de secreción – Ensayo de Ramsay.

La cámara de medición es una cápsula de Petri cuya superficie fue modelada con Sylgard, resina transparente que permitió la visualización óptima del sistema proporcionando un mejor contraste entre el fondo de la cámara y la preparación.

A la superficie de la resina que se realizaron depresiones semiesféricas y se insertaron alfileres entomológicos a una distancia de 0,5 cm del borde de la depresión. Cada pozo formado tenía una capacidad de 50 μ L. La superficie de la cámara fue bañada en parafina líquida hidratada (Figura 6 y Figura 7).

Para realizar el Ensayo de Ramsay (1952), se procedió a montar en la cámara de medición los UMT bajo un estereoscopio a un aumento de 12X. Se colocó en cada uno de

los pozos formados una gota de un volumen $< 50 \mu\text{L}$ de solución RI, sobre el cual se adiciona el volumen de cada fármaco.

El segmento proximal (cortado) del túbulo fue enrollado alrededor del alfiler entomológico, mientras que el segmento distal (ciego) quedó sumergido en el pozo con la solución RI.

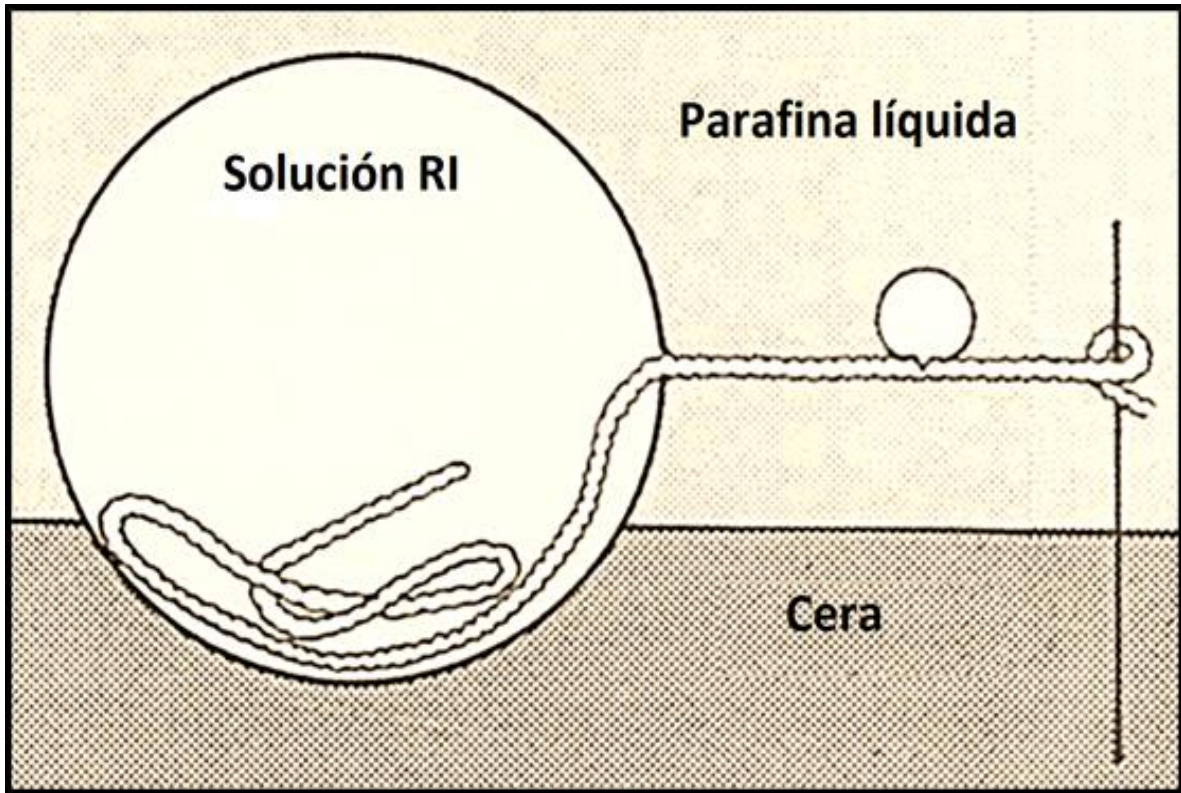


Figura 6. Vista lateral de la disposición experimental usada para determinar el flujo de secreción por un túbulo de Malpighi aislado. Una gota de la solución Ringer Insecto se coloca en una depresión en la base de Sylgar bajo una capa de parafina líquida hidratada. El extremo proximal del túbulo se extrae de la gota a través de la parafina líquida y enrollado alrededor de un alfiler entomológico fijo en la cámara. El líquido segregado por el túbulo emerge a través de una incisión hecha en la pared del túbulo (Modificado de Maddrell y col., 1988).

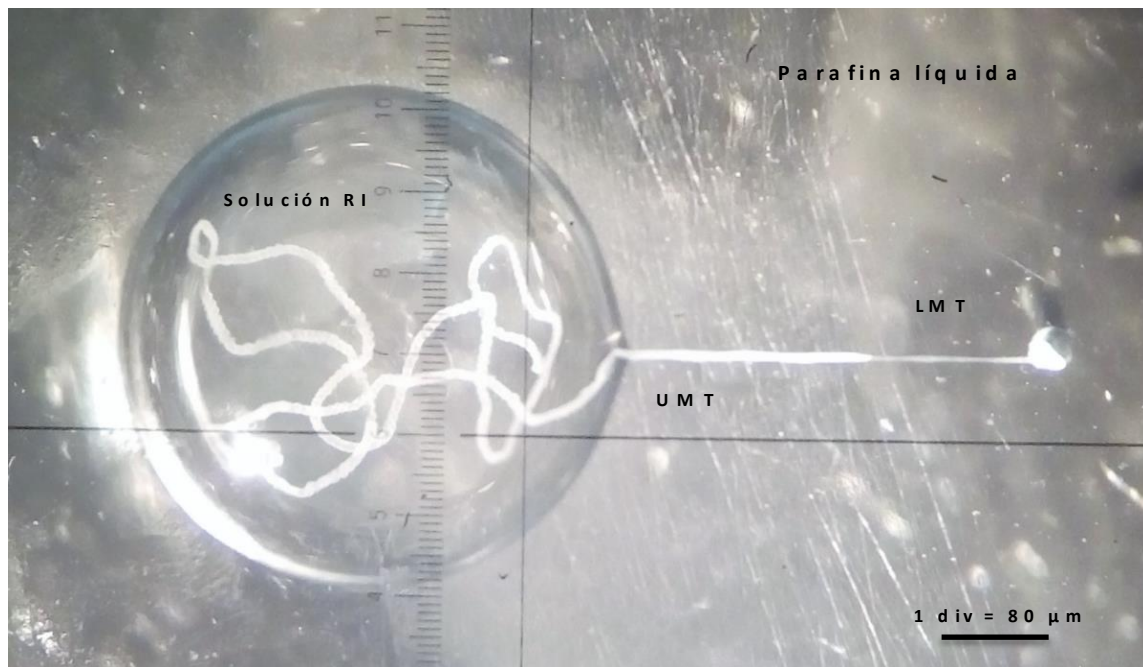


Figura 7. Vista frontal de la disposición experimental *in vitro* empleada para determinar el flujo de secreción en los UMT. En la gota de la solución Ringer Insecto se coloca el extremo distal (UMT) del túbulo, mientras que el extremo proximal (LMT) se extrae de la gota a través de la parafina líquida y es enrollado alrededor de un alfiler entomológico fijo en la cámara de Ramsay (Ramsay, 1952).

La cámara de medición se colocará sobre una base metálica, por dentro de la cual circula un baño de temperatura de flujo continuo a 33 °C para emular las condiciones ambientales y fisiológicas del insecto.

El transporte del fluido a través del lumen de los TM va desde el extremo ciego hacia el extremo proximal. La secreción del fluido se aprecia por la generación de una gota esférica que se acumula alrededor del alfiler entomológico. Empleando pinzas de disección se efectuaron incisiones delimitadas en el extremo proximal enrollado en el alfiler para permitir la acumulación de la gota.

4.3.3. Determinación del volumen secretado.

Para determinar el volumen de la gota formada se midió el diámetro de la gota empleando un micrómetro de ocular, cada 15 minutos durante un periodo de 2 horas.

Se calculó el volumen secretado a partir de la fórmula del volumen de la esfera generada por la gota alrededor del alfiler, mediante la ecuación:

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3$$

donde, r es el radio de la gota de secreción, medido en micrómetros. Este valor se va a estandarizar dividiéndolo entre la longitud lineal del segmento distal del TM, sumergido en el pozo.

El volumen total secretado fue acumulativo, es decir que a los 15 minutos el volumen total fue lo acumulado en la gota de secreción desde 0' hasta 15', de manera que a los 120 minutos el volumen total de secreción fue la acumulación del fluido desde 0' hasta

120'. El volumen total de secreción fue producto del efecto de los fármacos aplicados de manera individual o en conjunto, el cual será expresado en nanolitros (nL).

Se realizó un gráfico de Volumen total de secreción ($\text{nL} \cdot \text{mm}^{-1}$) vs Tiempo (min). Dado que hay un antecedente (Maddrell, 1969) de una relación directamente proporcional entre ambos parámetros, a los datos se les realizará una regresión lineal. Se midió la longitud en milímetro lineal de la sección del TM sumergido en la gota del pozo, que corresponde al extremo secretor denominado en el presente trabajo como UMT. Por consiguiente los datos se expresaron en mm lineal. La pendiente de recta del ajuste lineal fue la tasa de secreción, expresada en unidades de $\text{nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Las gráficas se realizaron empleando el software de análisis y visualización de datos científicos SciDAVis distribuido gratuitamente bajo los términos de la licencia GNU (Free Software Foundation) y disponible en la web.

4.4. Análisis estadístico de los datos.

Se realizaron los cálculos de promedio y error estándar al volumen de secreción ($\text{nL} \cdot \text{mm}^{-1}$) obtenido experimentalmente bajo el efecto de los fármacos.

Para el análisis estadístico se empleó la prueba de t de Student para datos pareados con la finalidad de determinar si hay o no diferencias significativas entre cada una de las condiciones experimentales y la condición anterior, considerando el $p=0.05$ como significativo; del mismo modo se aplicó la prueba estadística a los TM control para determinar si existen diferencias significativas en la acumulación del volumen secretado a los 120' respecto al tiempo 0' (tiempo inicial). Se utilizó el programa estadístico PAST

distribuido gratuitamente bajo los términos de la licencia GNU (Free Software Foundation) y disponible en la web.

4.5. Protocolo de lavado de los Túbulos de Malpighi estimulados.

Luego que el insecto se alimenta de la sangre del huésped vertebrado, son liberadas las hormonas diuréticas, Rhpro-DH y 5-HT, desde el ganglio mesotorácico del insecto hacia la hemolinfa. Según nuestro modelo de trabajo (Gutiérrez y col., 2004), las hormonas diuréticas activan los receptores localizados en la membrana basolateral, activando los mecanismos de transporte epitelial involucrados en la secreción. Resultados (no publicados) obtenidos en nuestro laboratorio evidencian que la furosemida no tiene efecto sobre la concentración intracelular de Na^+ en UMT de *Rhodnius prolixus* recién alimentados, contrario a los resultados obtenidos en condición de reposo (García, 2010).

Para la determinación del efecto de furosemida sobre la inducción de secreción de los TM posterior a 3 días de la última alimentación del insecto, se evaluó la condición de estimulación endógena de los TM luego de la disección, esto con el objetivo de comprobar el efecto de las hormonas diuréticas sobre la secreción de los TM de ejemplares recién alimentados.

Posteriormente, los túbulos fueron lavados con un volumen de 15 mL de solución RI control durante 15 minutos en un beaker de 30 mL, luego se trasladaron a la cámara de Ramsay con el propósito de determinar si se logró eliminar el efecto de las hormonas. En caso de que los TM secretaran espontáneamente, se repitió el lavado con volúmenes no aditivos de solución RI normal. Esto con la finalidad de eliminar la presencia de las

hormonas que pudieran influir en los resultados esperados. Posteriormente, se procedió a la determinación del volumen mediante el Ensayo de Ramsay (Sección 4.3.3).

V. RESULTADOS

Con la finalidad de estudiar la secreción dependiente de Na^+ de UMT de *Rhodnius prolixus* en condición de reposo (sin estimulación con 5-HT), se trataron los UMT con agentes farmacológicos de efecto conocido, que actúan sobre mecanismos específicos de transporte transepitelial como lo son ATPasas, cotransportadores y canales, adicionando tales fármacos en el espacio peritubular para estudiar su efecto a nivel de la membrana basolateral.

5.1. Evaluación del efecto de Furosemida sobre la inducción de la secreción de los UMT en reposo.

Los UMT en reposo se trataron con el fármaco furosemida (1mM) durante 120 min de duración del experimento. El fármaco actúa inhibiendo específicamente la actividad del triple cotransportador $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ y de la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por furosemida. Un total de 34 UMT aislados presentaron un comportamiento similar frente al fármaco (Figura 8), mostrando un incremento significativo del volumen de la gota secretada respecto al control (n=13, Tabla I), en el lapso del experimento.

En este trabajo se presenta por primera vez la secreción en reposo (sin estimulación) de los UMT de *Rhodnius prolixus*, tal como se observa en la Figura 8, la cual muestra el curso temporal del efecto de furosemida obtenido para los UMT, en donde se puede identificar transcurridos los primeros 15 min del montaje experimental, la generación de un volumen de secreción. Es de hacer notar que en estos ensayos no se utilizó ninguna

sustancia para estimular la secreción, por consiguiente debe atribuirse el volumen de secreción a cambios en la homeostasis de Na^+ . La pendiente de la recta del ajuste lineal realizado a los datos obtenidos experimentalmente, indica que la tasa de secreción de los UMT analizados bajo el efecto del fármaco fue de $0,29 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$.

Con la finalidad de demostrar que los UMT están activos y son capaces de secretar, a los 105 minutos se agregó 5-HT ($2 \mu\text{M}$). Como se esperaba los UMT mostraron un aumento significativo del volumen de la gota de secreción inmediatamente después de entrar en contacto con la hormona (Figura 9). La tasa de secreción del efecto aditivo de la hormona fue de $8,47 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$.

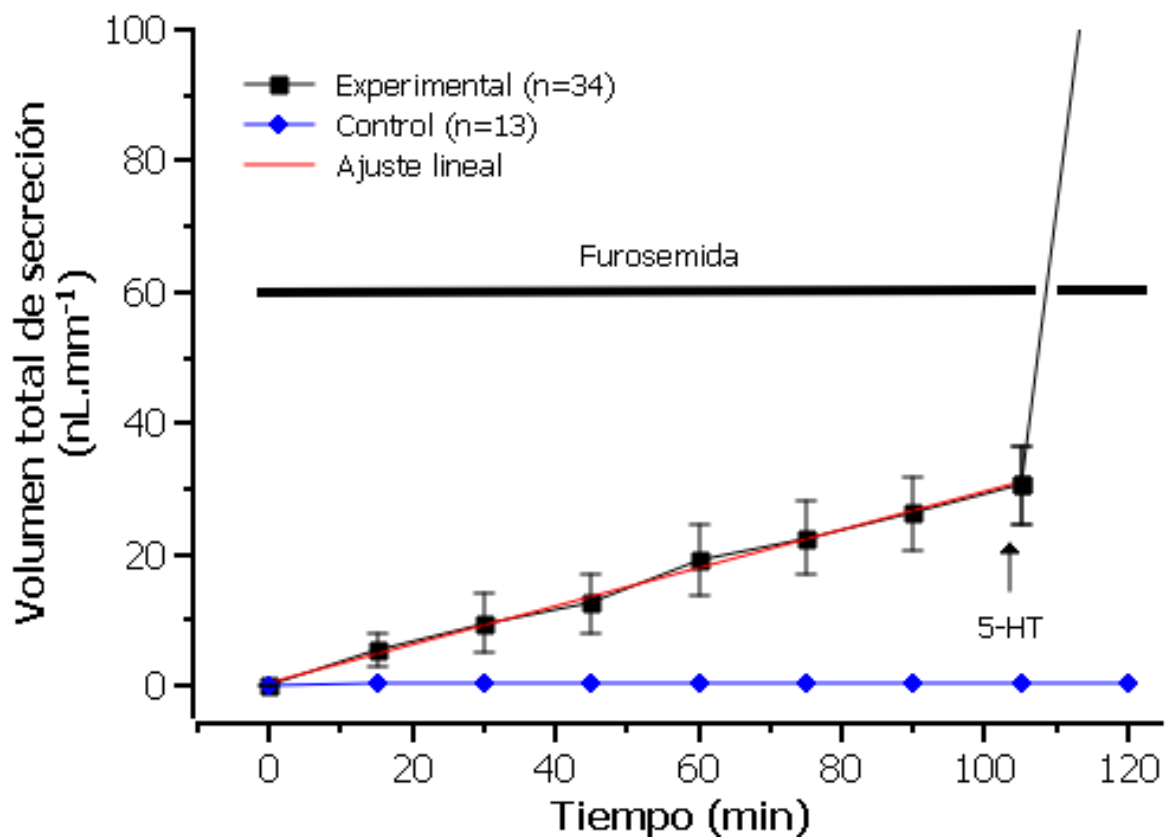


Figura 8. Efecto de Furosemida sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de *Rhodnius prolixus* en reposo. Se presenta el volumen secretado ($\text{nL} \cdot \text{mm}^{-1}$) en función del tiempo (min). El promedio de la secreción de los UMT control ($n=13$) está representado por la línea azul, a los cuales no se les agregó el fármaco. La línea negra muestra el promedio del volumen secretado por los UMT ($n=34$) bajo el efecto de Furosemida (1 mM). La recta obtenida del ajuste lineal (línea roja) es: $Y = 0,29x + 0,58$ ($R^2 = 0,99$), obteniéndose una tasa de secreción de $0,29 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. A los 105 minutos se añadió 5-HT, tal como lo indica la flecha. La recta obtenida que une los puntos es $Y = 8,47x - 858,25$; la tasa de secreción es $8,47 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

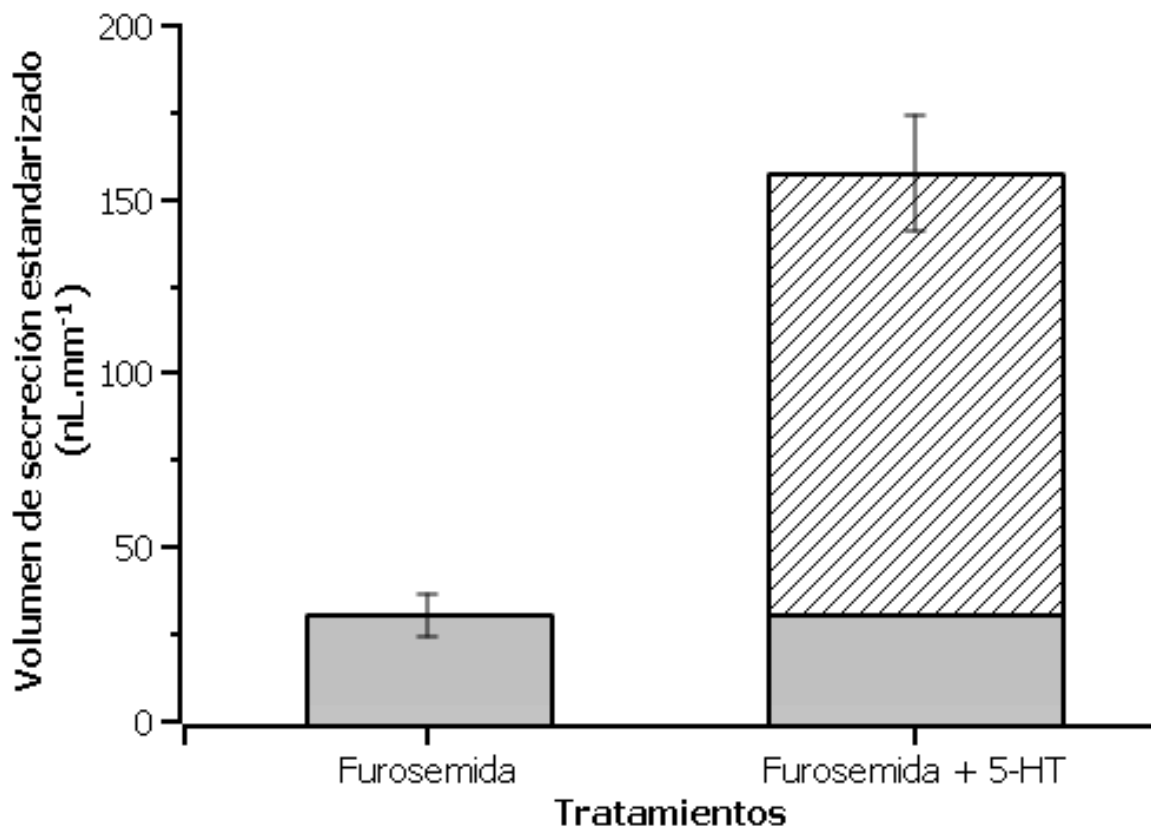


Figura 9. Histograma comparativo entre los efectos del tratamiento de Furosemida y el tratamiento aditivo de Furosemida y 5-HT sobre la acumulación del volumen secretado. Se observa un cambio significativo en la magnitud de volumen de secreción inducido por la adición de la hormona diurética 5-HT (▨) a los UMT con Furosemida, en comparación con el cambio observado bajo el efecto individual del fármaco (■).

5.2. Estudio del efecto de Ouabaína sobre la secreción inducida por Furosemida de los UMT en reposo.

Se ha reportado que al tratar los UMT en reposo con ouabaína, con el objetivo de inhibir la salida basolateral de Na^+ a través de la ATPasa Na^+/K^+ , no se produce efectos significativos en la concentración intracelular de Na^+ (García, 2010). En consecuencia, con el propósito de determinar si la ouabaína generaba algún efecto sobre la secreción de los UMT en reposo, éstos fueron tratados con ouabaína ($25 \mu\text{M}$).

Los UMT bajo el efecto del fármaco ($n=13$) no presentaron diferencias significativas (Tabla I) en el volumen de secreción respecto a los UMT control ($n=5$), tal como se observa en la Figura 10, la cual muestra el curso temporal del efecto de ouabaína obtenido para los UMT. La pendiente de la recta del ajuste lineal realizado a los datos obtenidos experimentalmente, indica que la tasa de secreción de los UMT bajo el efecto del fármaco fue $0,02 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$.

Transcurridos 105 minutos del montaje experimental, se agregó 5-HT ($2 \mu\text{M}$), demostrando que los UMT estaban activos y eran capaces de secretar, observado como un incremento significativo (Tabla I) del volumen de la gota de secreción inmediatamente después de entrar en contacto con la hormona. La tasa de secreción del efecto de la hormona fue $3,91 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$.

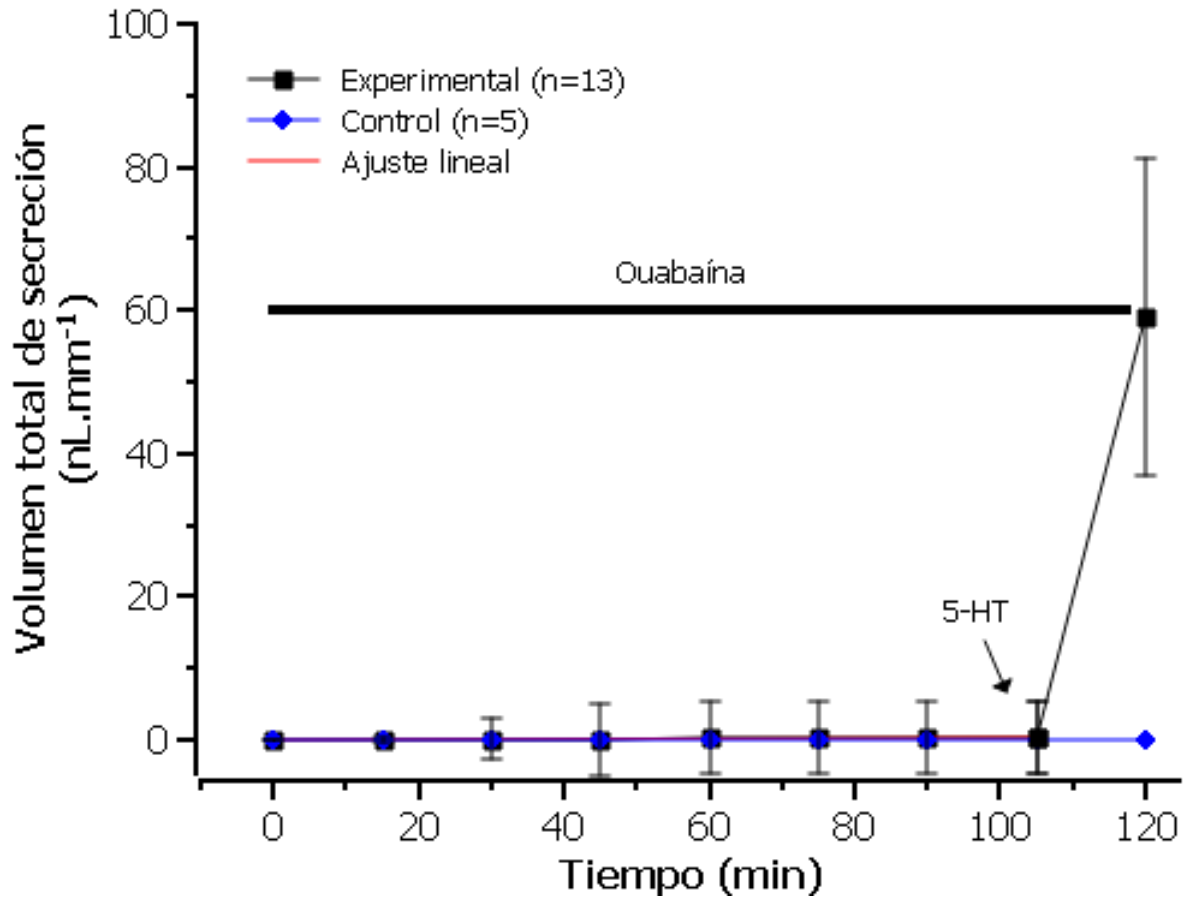


Figura 10. Efecto de Ouabaína sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de *Rhodnius prolixus* en reposo. Se presenta el volumen secretado ($\text{nL} \cdot \text{mm}^{-1}$) en función del tiempo (min). El promedio de la secreción de los UMT control ($n=5$) está representado por la línea azul, a los cuales no se les agregó el fármaco. La línea negra muestra el promedio del volumen secretado por los UMT ($n=13$) bajo el efecto de Ouabaína ($25 \mu\text{M}$). La recta obtenida del ajuste lineal (línea roja) es: $Y = 0,02x + 0,03$ ($R^2 = 0,87$), obteniéndose una tasa de secreción de $0,02 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Nótese que no hay diferencia apreciable entre la condición experimental y la condición control. La flecha indica la adición de 5-HT a los 105 minutos. La recta obtenida que une los puntos es: $Y = 3,91x - 410,5$; la tasa de secreción es $3,91 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Para evaluar el efecto sinérgico de ouabaína (25 μM) y furosemida (1 mM), se llevaron a cabo ensayos en los que se alternó el orden de adición de cada fármaco, con lo que se pretendió estudiar si el orden de adición generaba efectos distintos en la secreción de los UMT.

En primera instancia se realizaron una serie de experimentos que permitieron estudiar el efecto de ouabaína (25 μM) antes de furosemida (1 mM). Se sabe que la ouabaína inhibe a la ATPasa Na^+/K^+ , mientras que la furosemida tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína.

Experimentalmente, se evidenció que la adición de ouabaína no indujo un aumento significativo en el volumen de secreción de los UMT aislados ($n=36$) respecto a los UMT control ($n=17$), presentando una tasa de secreción de $0,02 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$, este resultado es consistente con lo observado anteriormente respecto al efecto de ouabaína sobre los UMT. Transcurridos 30 minutos, la aplicación de furosemida generó un incremento importante en el volumen de secreción (Figura 11). La tasa de secreción obtenida por el efecto aditivo de furosemida fue $0,25 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$, similar a la tasa alcanzada con sólo furosemida en la sección 5.1 (Figura 13, Tabla I).

Se demostró que los UMT continuaban activos a los 105 minutos, tras aplicar 5-HT (2 μM). El volumen de secreción incrementó significativamente después de entrar en contacto con la hormona. La tasa de secreción del efecto aditivo de la hormona fue $11,15 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Tabla I).

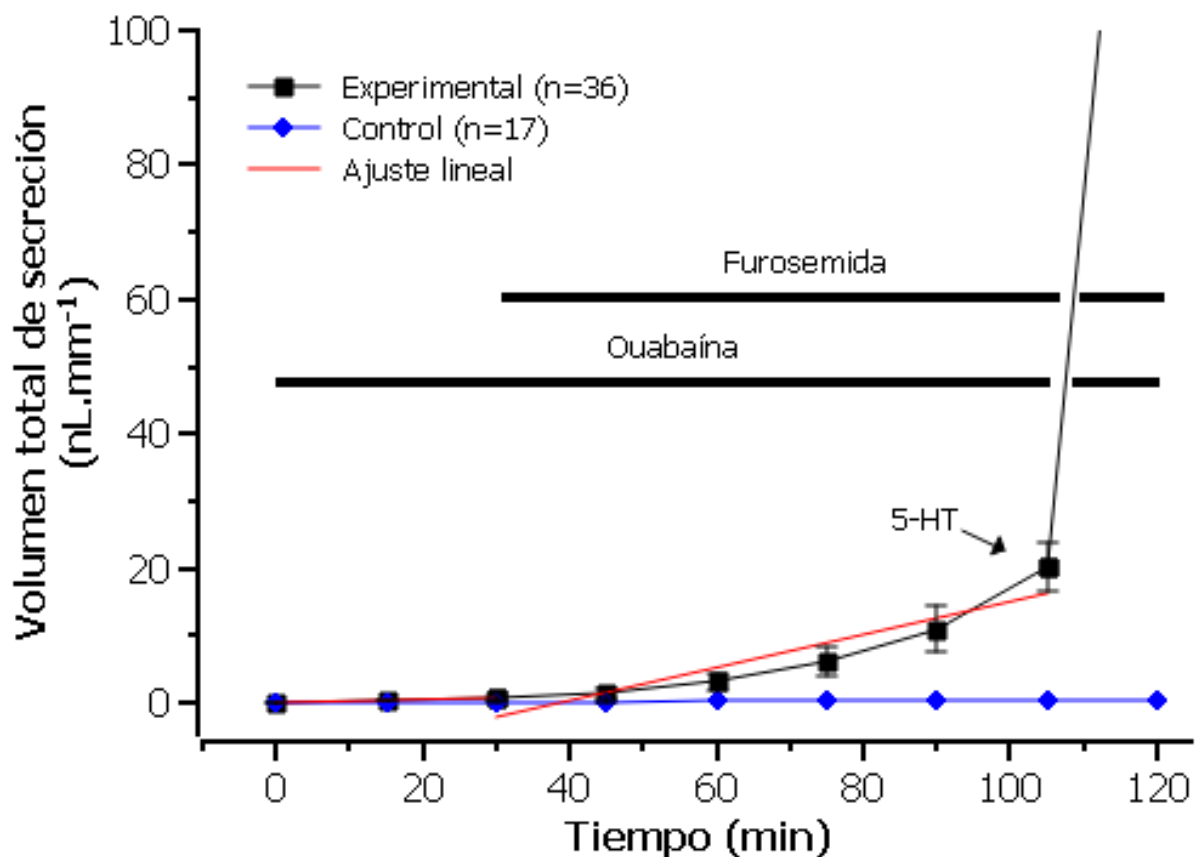


Figura 11. Efecto sinérgico de Ouabaína y Furosemida sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de *Rhodnius prolixus* en reposo. Se presenta el volumen secretado ($\text{nL} \cdot \text{mm}^{-1}$) en función del tiempo (min). El promedio de la secreción de los UMT control ($n=17$) está representado por la línea azul, a los cuales no se les agregaron los fármacos. La línea negra muestra el promedio del volumen secretado por los UMT ($n=36$), bajo el efecto de Ouabaína ($25 \mu\text{M}$) y Furosemida (1mM). La recta obtenida del ajuste lineal (línea roja) bajo el efecto de Ouabaína es: $Y = 0,02x + 0,03$ ($R^2 = 0,96$), obteniéndose una tasa de secreción de $0,02 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, mientras que al agregar Furosemida a los 30 minutos se obtuvo una recta de: $Y = 0,25x - 9,5$ ($R^2 = 0,87$), cuya tasa de secreción fue $0,25 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. A los 105 minutos se agregó 5-HT, tal como lo indica la flecha. La recta obtenida que une los puntos es: $Y = 11,15x - 1150,98$. La tasa de secreción es $11,15 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Al invertir el orden de los fármacos, se examinó el efecto de ouabaína (25 μM) sobre la secreción inducida por el efecto de furosemida (1 mM). Análogamente al orden anterior de inhibidores, al agregar primero furosemida a los UMT se inhibe tanto la entrada de Na^+ a través del triple cotransportador $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{K}^+$ como la salida de ion por medio de Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína.

Los resultados obtenidos confirman que la furosemida induce la secreción en los UMT ($n=24$) tal como se muestra en la sección 5.1., presentando una tasa de secreción de $0,20 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$, mientras que la adición de ouabaína incrementa significativamente la secreción de los UMT (Tabla I), un efecto contrario al obtenido cuando éste fármaco es agregado antes de furosemida (Figura 12). La tasa de secreción alcanzada debido al efecto de ouabaína fue $0,34 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Figura 13). Por otra parte, las tasas de secreción alcanzadas por el efecto de ouabaína antes o después de la adición de furosemida resultaron no ser significativamente distintas entre sí. La adición de 5-HT (2 μM) a la preparación luego de 105 minutos, produjo una tasa de secreción de $5,88 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Tabla I).

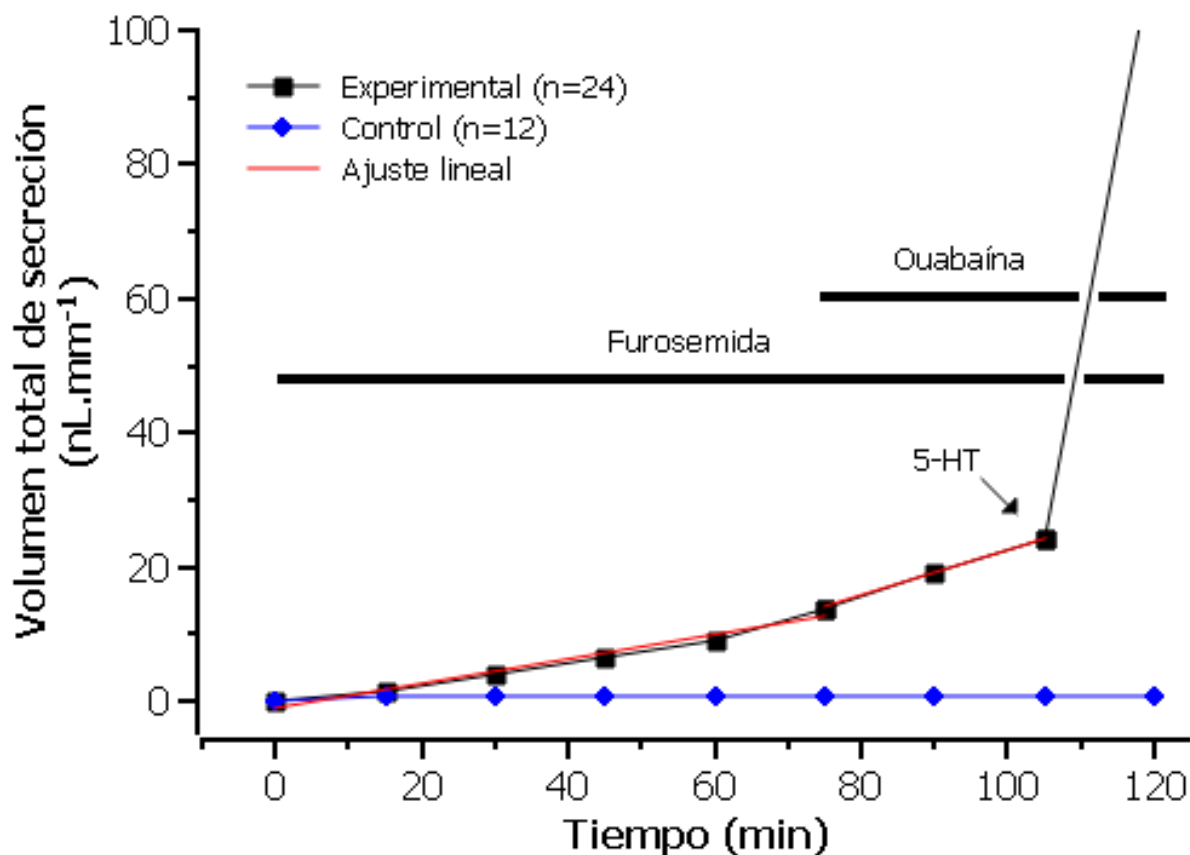


Figura 12. Efecto sinérgico de Furosemida y Ouabaína sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de *Rhodnius prolixus* en reposo. Se presenta el volumen secretado ($\text{nL} \cdot \text{mm}^{-1}$) en función del tiempo (min). El promedio de la secreción de los UMT control ($n=12$) está representado por la línea azul, a los cuales no se les agregaron los fármacos. La línea negra muestra el promedio del volumen secretado por los UMT ($n=24$) bajo el efecto de Furosemida (1 mM) y Ouabaína ($25 \mu\text{M}$). La recta obtenida del ajuste lineal (línea roja) bajo el efecto de Furosemida es: $Y = 0,20x - 1,95$ ($R^2 = 0,98$), obteniéndose una tasa de secreción de $0,20 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, mientras que al agregar Ouabaína a los 75 minutos, se obtuvo una recta de: $Y = 0,34x - 11,6$ ($R^2 = 0,99$), cuya tasa de secreción fue $0,34 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. A los 105 minutos se añadió 5-HT, tal como lo indica la flecha: La recta obtenida que une los puntos es: $Y = 5,88x - 593,25$. La tasa de secreción es $5,88 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

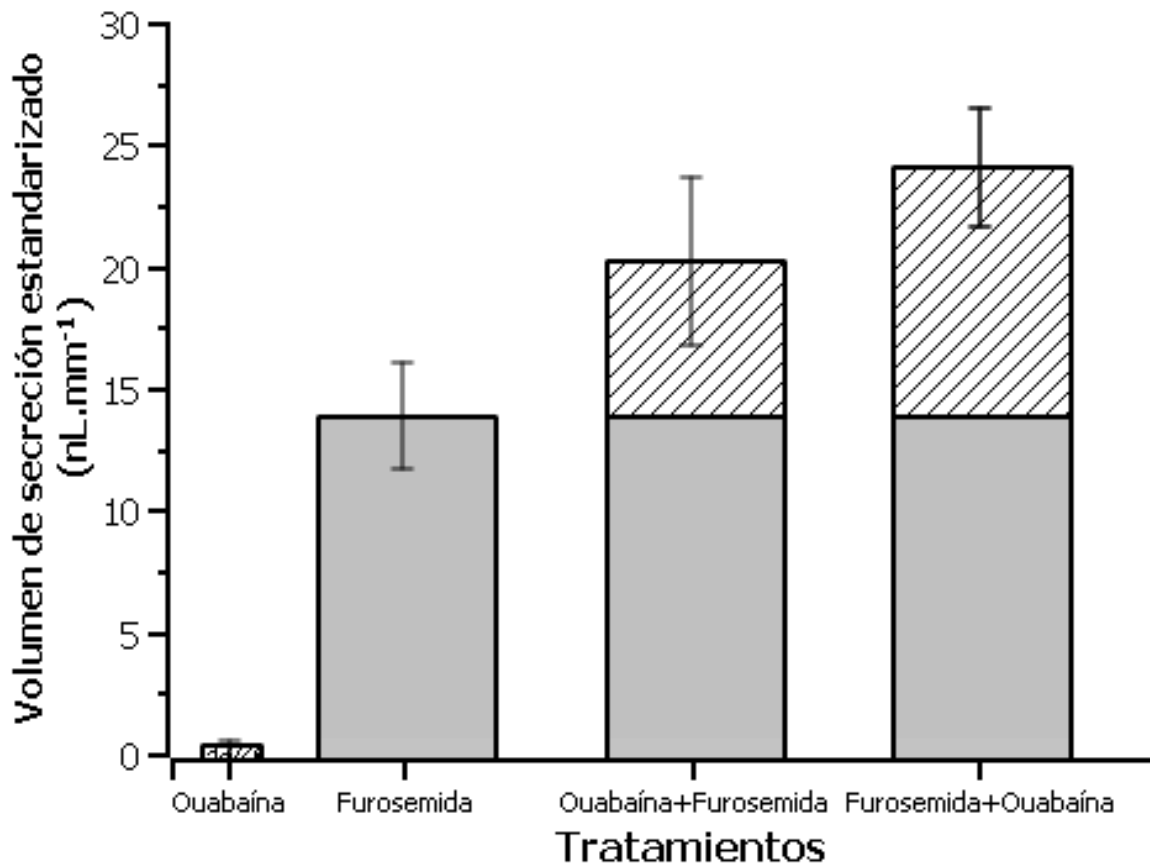




Figura 13. Histograma comparativo entre los efectos del tratamiento de Ouabaína antes y después de la adición de Furosemida sobre la acumulación del volumen secretado. Se observa un cambio significativo en la magnitud del volumen de secreción inducido por el efecto aditivo de Ouabaína () y Furosemida (), respecto al cambio observado en el tratamiento con Ouabaína. Las tasas obtenidas son similares a la tasa de secreción de los UMT bajo el efecto individual de Furosemida (sección 5.1).

Ahora bien, dado que en los experimentos anteriores los UMT no estuvieron expuestos al efecto de ambos inhibidores durante el mismo lapso de tiempo, nos planteamos evaluar si la secreción inducida por furosemida en presencia de ouabaína observado en la Figura 11 y la Figura 12 fue producto de un efecto agudo o a largo plazo. Por tal motivo, los inhibidores se aplicaron conjuntamente dentro de la gota en el pozo de la cámara de secreción desde el inicio del experimento.

Los resultados obtenidos para los UMT (n=9) indican que ouabaína y furosemida tienen un efecto sinérgico que induce un aumento en el volumen de secreción a largo plazo, evidenciado por una tasa de secreción de $0,20 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Figura 14, Tabla I), que no resultó ser significativamente diferente a la tasa de secreción reportada en este trabajo para el efecto de ouabaína antes o después de la adición de furosemida. La adición de 5-HT ($2 \mu\text{M}$) a la preparación luego de 105 minutos, produjo una tasa de secreción de $6,43 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Tabla I).

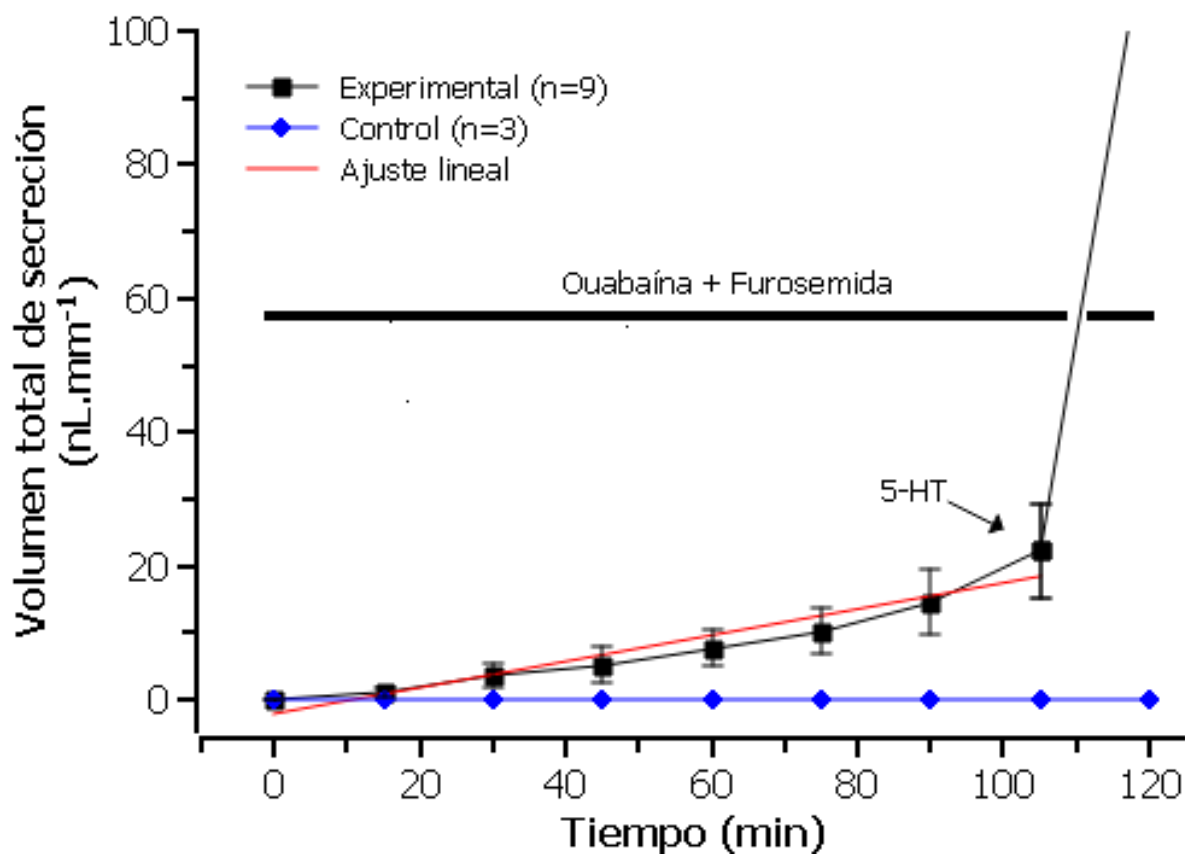


Figura 14. Efecto simultáneo de Ouabaína y Furosemida sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de *Rhodnius prolixus* en reposo. Se presenta el volumen secretado ($\text{nL} \cdot \text{mm}^{-1}$) en función del tiempo (min). El promedio de la secreción de los UMT control ($n=3$) está representado por la línea azul, a los cuales no se les agregaron los fármacos. La línea negra muestra el promedio del volumen secretado por los UMT ($n=9$) bajo el efecto de Ouabaína ($25 \mu\text{M}$) y Furosemida (1 mM). La recta obtenida del ajuste lineal (línea roja) bajo el efecto de ambos inhibidores es: $Y = 0,20x - 2,08$ ($R^2 = 0,91$), obteniéndose una tasa de secreción de $0,20 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. A los 105 minutos se añadió 5-HT, tal como lo indica la flecha: La recta obtenida que une los puntos es: $Y = 6,43x - 652,66$. La tasa de secreción es $6,43 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

5.3. Estudio del efecto de Amilorida sobre la secreción inducida por Furosemida de los UMT en reposo.

Partiendo de la suposición de que la secreción de los UMT es dependiente de Na^+ , además considerando que García (2010) propuso la existencia de una conductancia de Na^+ tipo ENaC (del inglés Epithelial Sodium Channel) en la membrana basolateral de los UMT de *Rhodnius prolixus*, se realizaron experimentos empleando un inhibidor específico del canal de sodio epitelial ubicado en la membrana apical (ENaC), esto con el objeto de inhibir la entrada de Na^+ a través de la conductancia selectiva de Na^+ que podría estar localizada en la membrana basolateral, y de este modo demostrar la importancia del Na^+ en la secreción de los UMT. El inhibidor amilorida se empleó a una concentración de 0,1 mM, de manera de no interferir con la actividad del intercambiador de Na^+ y/o K^+ ubicado en la membrana apical.

Los resultados evidencian que el volumen de secreción inducido por furosemida (1 mM) no aumenta tras la adición de amilorida (0,1 mM), tal como se muestra en la Figura 15, manteniéndose constante en el tiempo. Estos resultados son producto de la inhibición de la conductancia selectiva de Na^+ , que se ha propuesto como una de las entradas del ion a la célula a través de la membrana basolateral. Un total de 28 UMT aislados respondieron de manera similar al agregar furosemida, mostrando un aumento significativo del volumen de secreción respecto al control (n=10), cuya tasa de secreción fue $0,46 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Tabla I). La amilorida se adicionó a los 45 minutos, lo cual no generó cambios apreciables en el volumen de secreción, evidenciado por una tasa de secreción de $0,06 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Tabla I). La serotonina se agregó transcurridos 105 minutos, incrementando el volumen de secreción a una tasa de $1,23 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Tabla I).

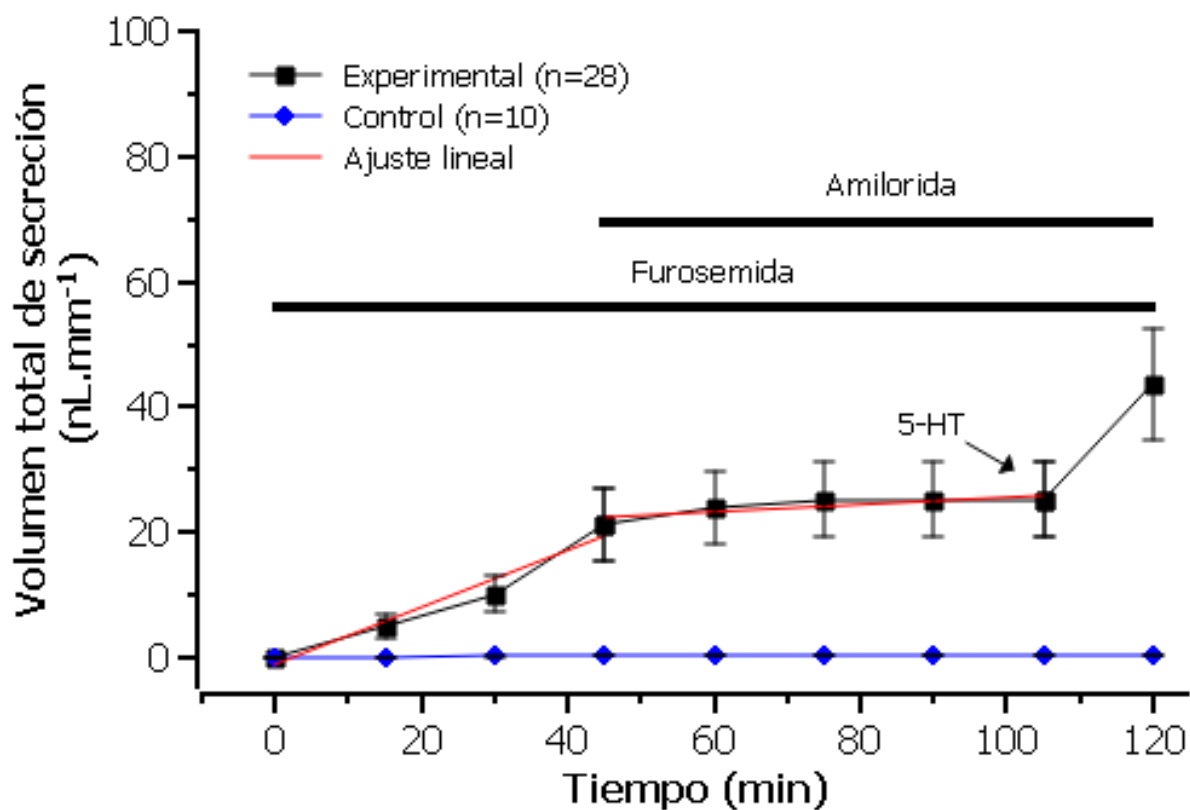


Figura 15. Efecto sinérgico de Furosemida y Amilorida sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de *Rhodnius prolixus* en reposo. Se presenta el volumen secretado ($\text{nL} \cdot \text{mm}^{-1}$) en función del tiempo (min). El promedio de la secreción de los UMT control ($n=10$) está representado por la línea azul, a los cuales no se les agregaron los fármacos. La línea negra muestra el promedio del volumen secretado por los UMT ($n=28$) bajo el efecto de Furosemida (1 mM) y Amilorida ($0,1 \text{ mM}$). La recta obtenida del ajuste lineal (línea roja) bajo el efecto de Furosemida es: $Y = 0,46x - 1,18$ ($R^2 = 0,96$), obteniéndose una tasa de secreción de $0,46 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, mientras que al agregar Amilorida a los 45 minutos, se alcanzó una recta de: $Y = 0,06x + 19,62$ ($R^2 = 0,71$), cuya tasa de secreción fue $0,06 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. A los 105 minutos se aplicó 5-HT, tal como lo indica la flecha. La recta obtenida que une los puntos es: $Y = 1,23x - 104,39$. La tasa de secreción es $1,23 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

5.4. Estudio de la secreción inducida por Furosemida en presencia de bajo Na^+ extracelular de los UMT en reposo.

Con el objetivo de confirmar la dependencia de Na^+ en la secreción de la UMT, se realizaron experimentos con una solución Ringer Insecto, a la cual se le sustituyó el NaCl por Cloruro de n-metil glucamina (145 mM). El NaCl contribuye mayoritariamente a la concentración de Na^+ en la solución RI. Al disminuir la concentración del ion en el baño se intentó evaluar la participación la conductancia selectiva de Na^+ propuesta por García (2010) en la secreción.

Los resultados obtenidos evidencian que a bajas concentraciones de Na^+ (15 mM) no se genera un volumen de secreción significativo (Condición 1, Tabla II) en los UMT, alcanzando una tasa de secreción fue $0,026 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$, condición que no varía tras la adición de furosemida a los 30 minutos, la tasa de secreción fue $0,001 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$, tal como se observar en la Figura 16 y en la Tabla II. Un aumento en la concentración de Na^+ (90 mM) en el baño, transcurridos 60 minutos, generó que el volumen de secreción incrementara ligeramente a una tasa de $0,09 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$. A los 105 minutos se aplicó 5-HT ($2 \mu\text{M}$) lo que produjo un aumento en la secreción a una tasa de $0,5 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Tabla II), este valor es considerablemente inferior respecto a los obtenidos en las secciones anteriores.

Debido a que la adición de furosemida pareciera no inducir la secreción de los UMT cuando la concentración extracelular de Na^+ es baja, se planteó aumentar la concentración del ion en el baño antes de aplicar el inhibidor en el pozo de la cámara (Condición 2, Tabla II). En esta condición se obtuvo una tasa de secreción en bajo Na^+ (15

m M) de $0,019 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Figura 17), el aumento de la concentración extracelular del ion (90 m M) a los 30 minutos, generó un volumen de secreción a una tasa de $0,011 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$. La adición de furosemida transcurridos 60 minutos indujo que el volumen de secreción incrementara ligeramente a una tasa de $0,069 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$. A los 105 minutos se agregó 5-HT ($2 \mu \text{M}$), aumentando la secreción a una tasa de $0,34 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$, siendo una tasa de secreción significativamente menor a las obtenidas bajo el efecto de la hormona en las secciones anteriores. Las tasas de secreción alcanzadas tanto en la Condición 1 como en la Condición 2 no son significativamente diferentes entre sí (Tabla II).

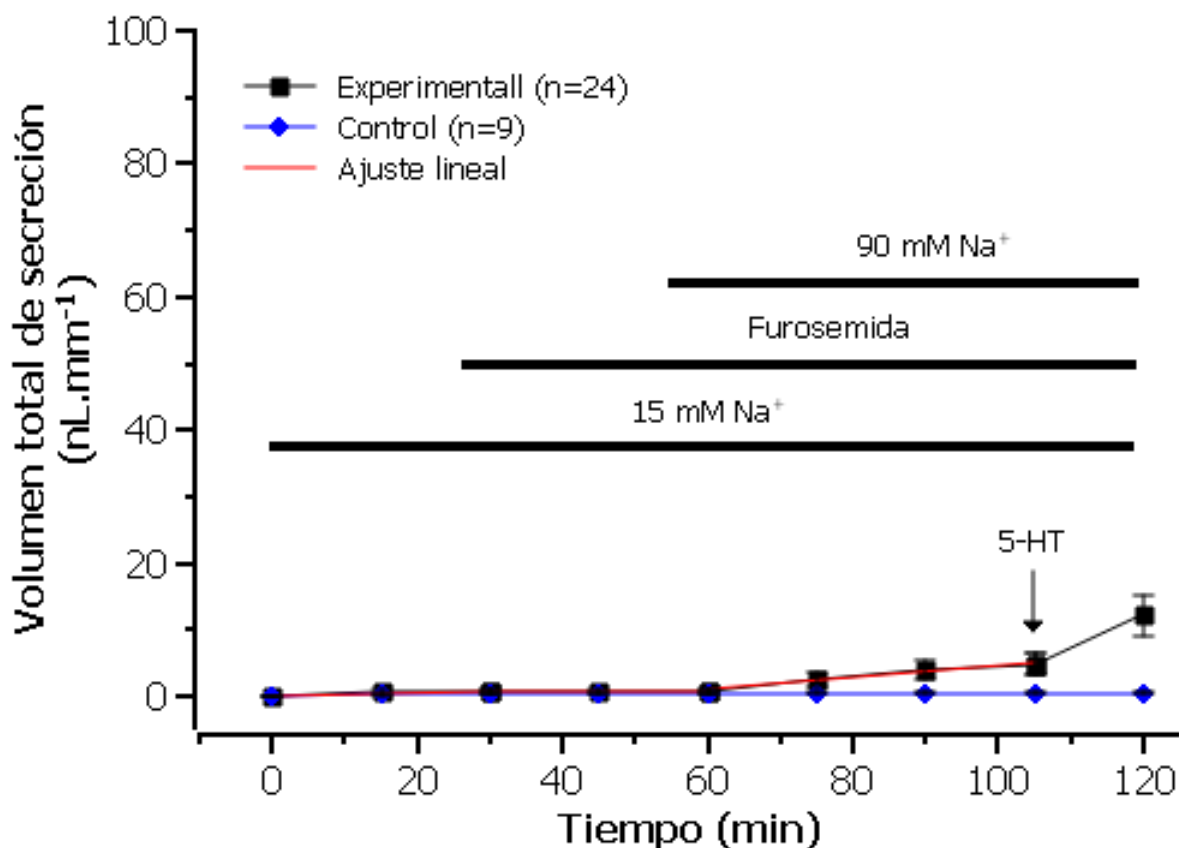


Figura 16. Efecto de Furosemida en presencia de bajo Na^+ extracelular sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de *Rhodnius prolixus* en reposo. Se presenta el volumen secretado ($\text{nL} \cdot \text{mm}^{-1}$) en función del tiempo (min). El promedio de la secreción de los UMT control ($n=9$) está representado por la línea azul, a los cuales no se añadió el fármaco. La línea negra muestra el promedio del volumen secretado por los UMT ($n=28$) bajo el efecto de Furosemida (1 mM) y NaCl (360 mM). La recta obtenida del ajuste lineal (línea roja) bajo el efecto de la solución bajo Na^+ es $Y = 0,026x + 0,13$ ($R^2 = 0,77$), presentando una tasa de secreción de $0,026 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, mientras que al añadir Furosemida a los 30 minutos, se obtuvo una recta de: $Y = 0,001x + 0,76$ ($R^2 = 0,75$), cuya tasa de secreción fue $0,001 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. La adición de una solución de 90 mM Na^+ a los 60 minutos, produjo una recta de: $Y = 0,09x - 4,37$ ($R^2 = 0,98$), y una tasa de secreción de $0,09 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. A los 105 minutos se aplicó 5-HT, tal como lo indica la flecha. La recta obtenida que une los puntos es: $Y = 0,5x - 46,36$. La tasa de secreción es $0,5 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

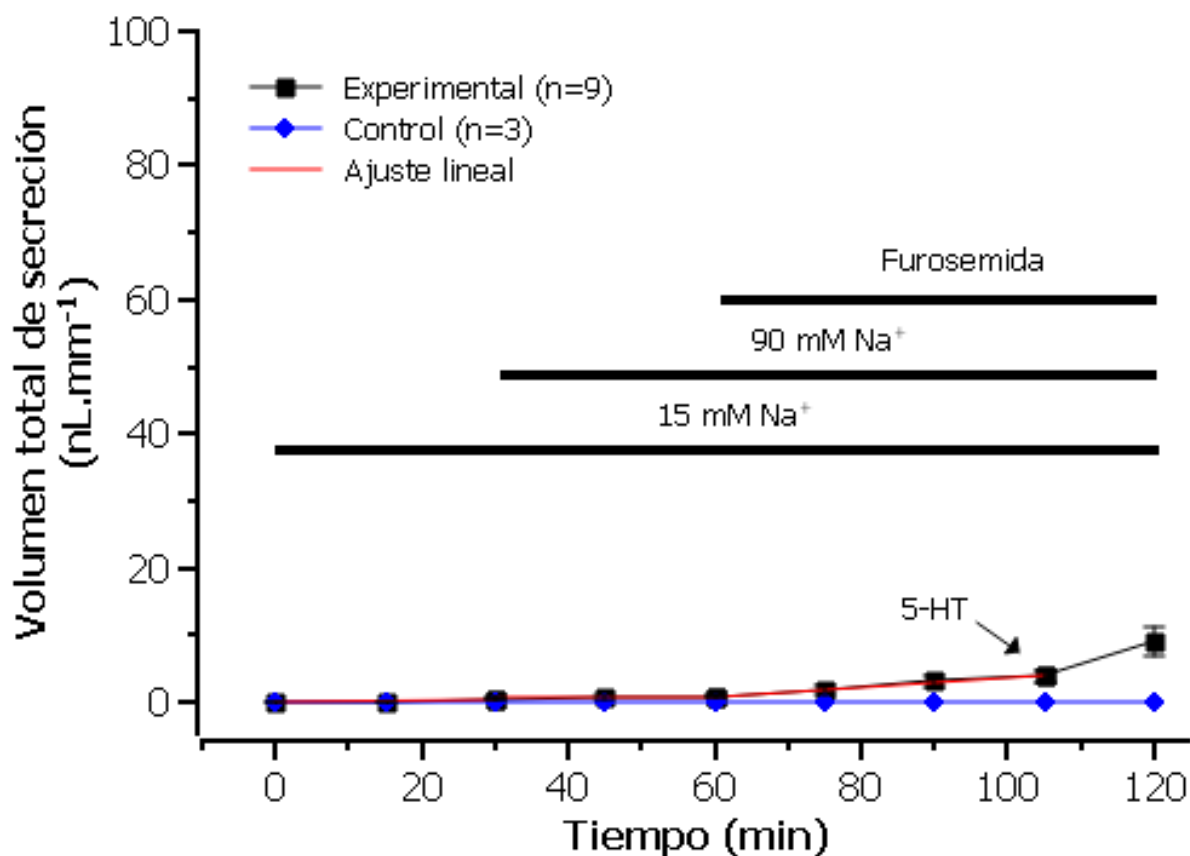


Figura 17. Efecto de Furosemida tras el aumento de la concentración extracelular de Na^+ sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de *Rhodnius prolixus* en reposo. Se presenta el volumen secretado ($\text{nL} \cdot \text{mm}^{-1}$) en función del tiempo (min). El promedio de la secreción de los UMT control ($n=3$) está representado por la línea azul, a los cuales no se añadió el fármaco ni se aumentó la concentración de Na^+ . La línea negra muestra el promedio del volumen secretado por los UMT ($n=9$) bajo el efecto de NaCl (360 mM) y Furosemida (1 mM). La recta obtenida del ajuste lineal (línea roja) bajo el efecto de la solución bajo Na^+ es $Y = 0,019x - 0,06$ ($R^2 = 0,88$), presentando una tasa de secreción de $0,019 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, mientras que al añadir una solución de 90 mM Na^+ a los 30 minutos, se obtuvo una recta de: $Y = 0,011x + 0,27$ ($R^2 = 0,92$), cuya tasa de secreción fue $0,011 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. La adición de una Furosemida a los 60 minutos, produjo una recta de: $Y = 0,069x - 3,3$ ($R^2 = 0,99$), y una tasa de secreción de $0,069 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. A los 105 minutos se aplicó 5-HT, tal como lo indica la flecha. La recta obtenida que une los puntos es: $Y = 0,34x - 31,88$. La tasa de secreción es $0,34 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

5.5. Evaluación del efecto de Furosemida sobre la inducción de la secreción de los UMT luego de 3 días desde la última alimentación.

Resultados obtenidos en el laboratorio muestran una disminución en la concentración intracelular de Na^+ en los UMT de ejemplares recién alimentados, lo cual indica una posible disminución en la actividad de la Segunda ATPasa de Na^+ , contraria a la obtenida en la condición de reposo (sin estimulación) reportada por García (2010).

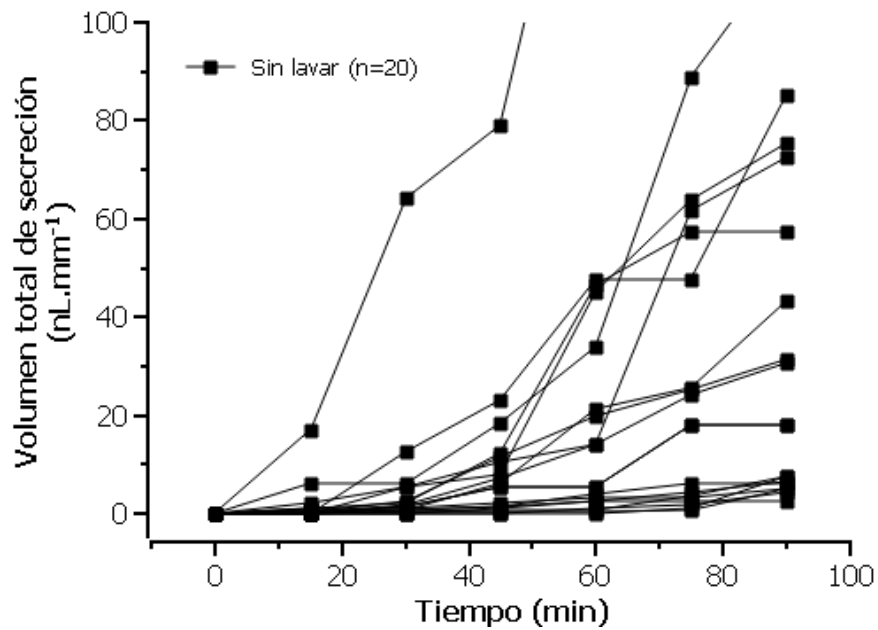
Partiendo de la suposición de que en condición de reposo la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína presentaría mayor actividad que la ATPasa de Na^+/K^+ , se pretendió estudiar el efecto de furosemida sobre la Segunda ATPasa de Na^+ en UMT que han estado estimulados por la hormonas diuréticas, Rhpro-DH y 5-HT, durante la alimentación. Con la finalidad de eliminar la presencia de las hormonas que pudieran influir en el efecto del fármaco, los UMT fueron pre-tratados con solución RI normal siguiendo el protocolo de lavado descrito en la sección 4.5.

Previo a realizar los experimentos con el fármaco, se evaluó la condición inicial de la estimulación endógena de los UMT. En la Figura 18.A se observa individualmente la secreción de los UMT aislados ($n=20$), sin adición de algún fármaco. El efecto de Rhpro-DH y 5-HT en estos UMT fue parcialmente diluido en solución RI durante la disección y es directamente dependiente del tiempo de exposición a la solución RI, esto se evidencia en los UMT cuya secreción tiene valores cercanos a cero (0), los cuales estuvieron inmersos en la cámara de disección durante un tiempo prolongado. Al pre-tratar los UMT con un volumen de solución RI ($n=16$), no se logró lavar satisfactoriamente el efecto de las hormonas endógenas, sin embargo se consiguió disminuir el volumen de secreción en los

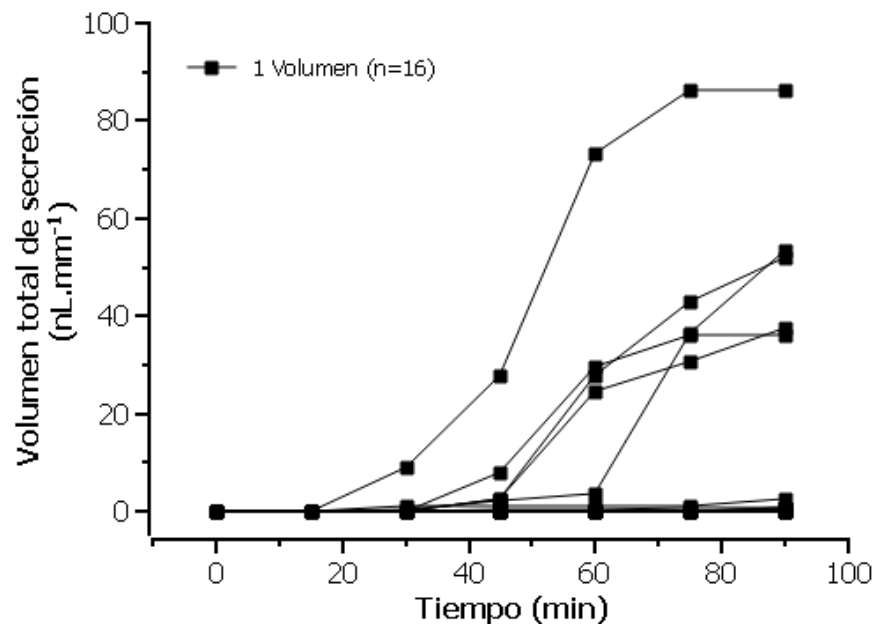
mismos (Figura 18.B). Considerando los resultados obtenidos, se decidió finalmente pre-tratar los UMT con tres volúmenes no aditivos de solución RI (n=20), evidenciando que se había conseguido eliminar completamente el efecto estimulador de las hormonas endógenas de los UMT, tal como se puede observar en la Figura 19. Por consiguiente, se estableció que los UMT fueran pre-tratados con tres volúmenes de solución RI antes de evaluar el efecto de furosemida.

La Figura 20 muestra la secreción promedio de cada una de las condiciones de lavado descritas en este trabajo. La tasa de secreción inicial de los UMT (n=20) sin lavar fue $1,53 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ en comparación con $0,63 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$, obtenida luego de haber lavado los UMT (n=16) con un volumen de solución RI, logrando de así disminuir el efecto de la hormona aproximadamente a la mitad. Con tres volúmenes de solución RI, la tasa de secreción alcanzada fue $0,0006 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (n=20), siendo considerablemente menor respecto a las tasas obtenidas anteriormente.

Finalmente, una vez estandarizado el protocolo de lavado de los UMT, se evaluó el efecto de furosemida en UMT que han estado estimulados por las hormonas endógenas. Los resultados indican que la furosemida no tiene efectos significativos en la secreción de UMT estimulados (Figura 21, Tabla I), presentando una tasa de secreción de $0,0006 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$, contrario al resultado obtenido en condición de reposo en que la furosemida induce la secreción (sección 5.1). Transcurridos 120 minutos se agregó 5-HT, lo que generó la secreción de los UMT a una tasa de $3,85 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$.



A.



B.

Figura 18. Efecto del pre-tratamiento de los UMT con distintos volúmenes de solución RI normal. A. Secreción de los UMT sin pre-tratar con solución RI. El volumen secretado se representa en función del tiempo. La línea negra muestra la secreción individual de cada UMT aislado (n=20). B. Secreción de los UMT pre-tratados con 1 Volumen de solución RI. El volumen secretado se representa en función del tiempo. La línea negra muestra la secreción individual de cada UMT aislado (n=16).

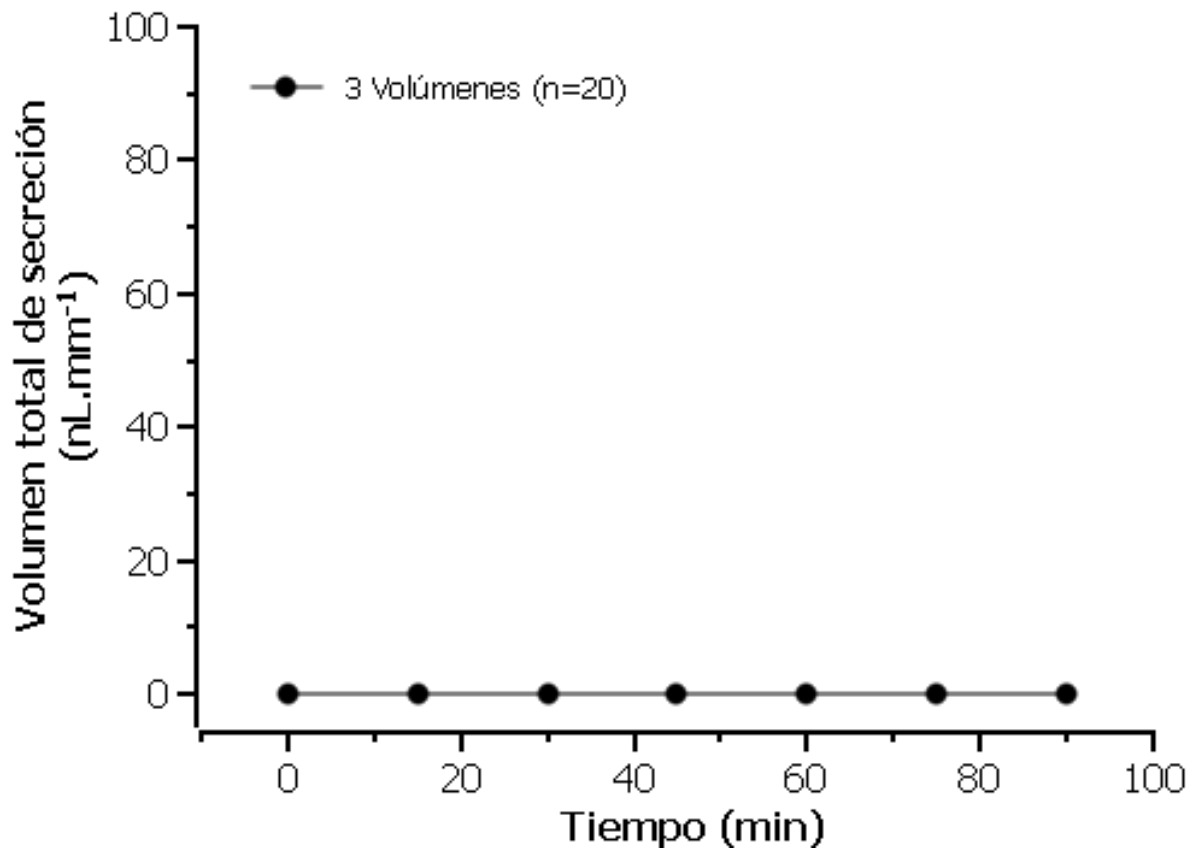


Figura 19. Efecto del pre-tratamiento de los UMT con 3 volúmenes de solución RI normal. El volumen secretado se representa en función del tiempo. La línea negra indica que los UMT (n=20) aislados y pre-tratados con 3 volúmenes de solución RI no secretaron durante 90 minutos.

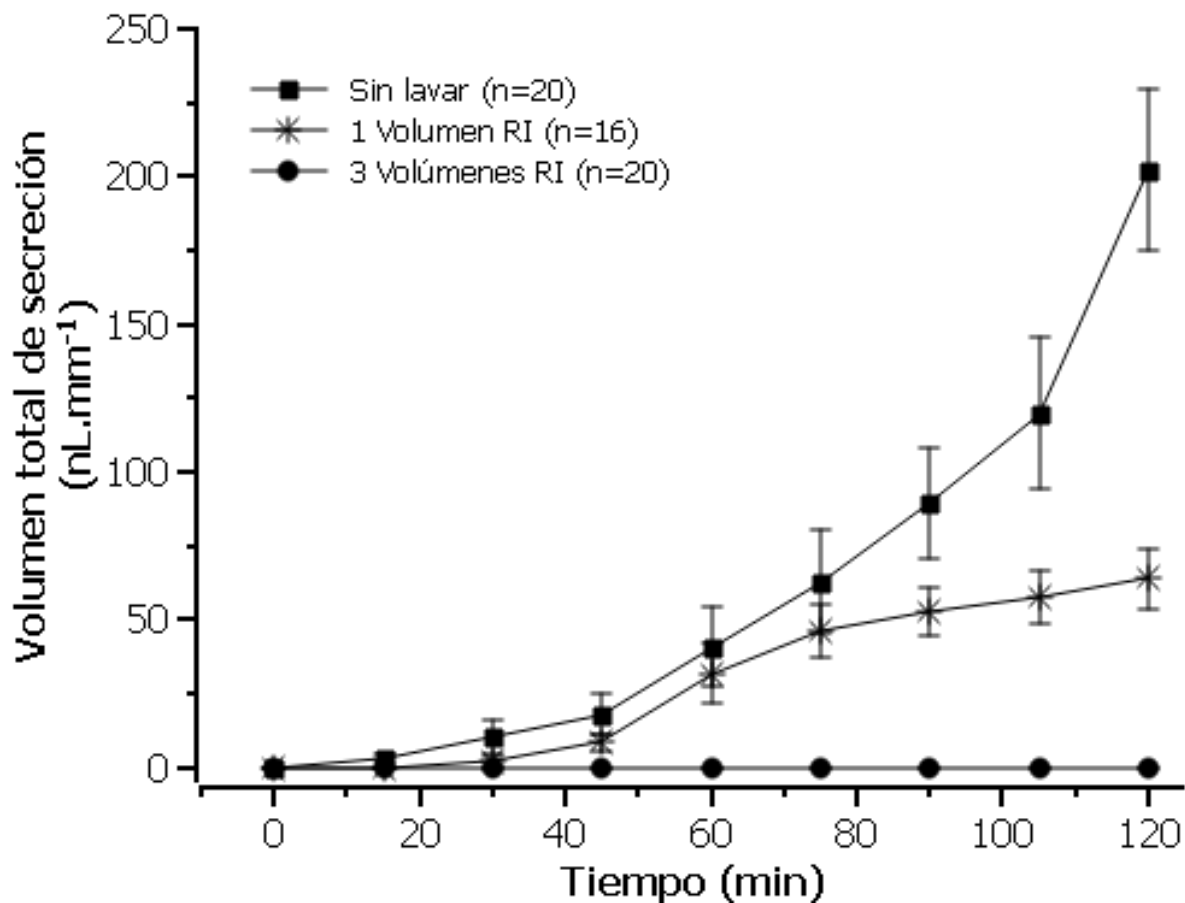


Figura 20. Comparación del volumen total secretado de los UMT de *Rhodnius prolixus* en cada condición de lavado. Se presenta el volumen secretado ($\text{nL} \cdot \text{mm}^{-1}$) en función del tiempo (min). La línea negra muestra el promedio del volumen secretado por los UMT bajo cada condición de lavado. La recta obtenida del ajuste lineal realizado a los datos obtenidos con los UMT sin lavar es: $Y = 1,53x - 30,16$ ($R^2 = 0,86$), y una tasa de secreción de $1,53 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, mientras que al pre-tratar los UMT con 1 volumen de solución RI, la recta es: $Y = 0,063x - 8,59$ ($R^2 = 0,94$), cuya tasa de secreción fue $0,063 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Con 3 volúmenes de solución RI se obtuvo una recta de: $Y = 0,0006x - 0,017$. La tasa de secreción es $0,0006 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

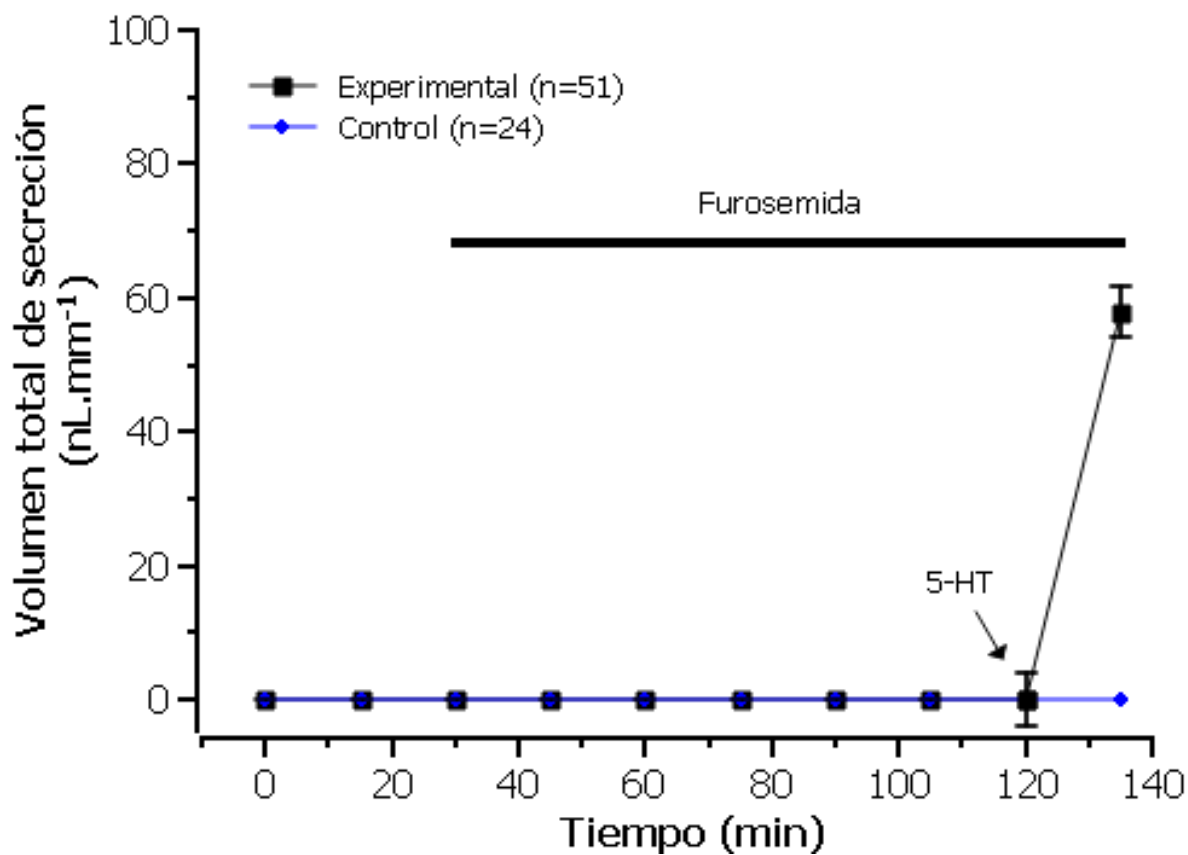


Figura 21. Efecto de Furosemida sobre la acumulación del volumen secretado de los UMT de *Rhodnius prolixus* recién alimentados (3 días). Se presenta el volumen secretado ($\text{nL} \cdot \text{mm}^{-1}$) en función del tiempo (min). El promedio de la secreción de los UMT control ($n=24$) está representado por la línea azul, a los cuales no se les aplicó el fármaco. La línea negra muestra el promedio del volumen secretado por los UMT ($n=51$) bajo el efecto Furosemida (1 mM). La recta obtenida del ajuste línea bajo el efecto de Furosemida es: $Y = 0,0006x - 0,017$ ($R^2 = 0,98$), obteniéndose una tasa de secreción de $0,0006 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Se no observaron diferencias significativas entre los UMT control y los UMT experimentales. A los 120 minutos se agregó 5-HT, tal como lo indica la flecha. La recta obtenida que une los puntos es: $Y = 3,85x - 462,26$. La tasa de secreción es $3,85 \text{ nL} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Finalmente, se resumen los resultados obtenidos del estudio de la secreción de los UMT de *Rhodnius prolixus* bajo los distintos tratamientos farmacológicos empleados (Tabla I) o la sustitución del ion Na^+ (Tabla II), evaluados en el presente trabajo.

Tabla I. Secreción de los UMT de *Rhodnius prolixus* bajo los efectos de los diferentes tratamientos farmacológicos. Para cada uno de los tratamientos se realizó una prueba de t-Student para datos pareados con $p < 0,05$, donde p es la probabilidad de que la diferencia entre cada condición y la condición anterior sea significativa.

(*) indica que la acumulación del volumen secretado no es significativamente diferente a la condición anterior.

Tratamiento	Volumen sec. \pm ES (nL.m m ⁻¹)	Tasa de secreción (nL.m in ⁻¹ .m m ⁻¹)	n
Furosemida (1 m M)			
Control	0,39 \pm 0,14 *	---	13
Furosemida	30,61 \pm 5,89	0,29	34
Furosemida + 5-HT	157,59 \pm 16,45	8,47	
Ouabaína (25 μ M) antes de Furosemida (1 m M)			
Control	0 *	---	5
Ouabaína	0,41 \pm 0,19 *	0,02	13
Ouabaína + 5-HT	59,04 \pm 22,15	3,91	
Ouabaína + Furosemida	20,26 \pm 3,47	0,25	36
Ouabaína + Furosemida + 5-HT	187,58 \pm 28,21	11,15	
Ouabaína (25 μ M) después de Furosemida (1 m M)			
Control	0,83 \pm 0,45 *	---	12
Furosemida	13,92 \pm 2,19	0,20	24
Furosemida + Ouabaína	24,15 \pm 2,45	0,34	
Furosemida + Ouabaína + 5-HT	112,35 \pm 14,56	5,88	
Ouabaína (25 μ M) + Furosemida (1 m M)			
Control	0 *	---	3
Ouabaína + Furosemida	22,35 \pm 7,01	0,20	9
Ouabaína + Furosemida + 5-HT	118,78 \pm 42,54	6,43	
Amilorida (0,1 m M)			
Control	0,41 \pm 0,16 *	---	10
Furosemida	21,27 \pm 5,86	0,46	28
Furosemida + Amilorida	25,18 \pm 5,97 *	0,06	
Furosemida + Amilorida + 5-HT	43,69 \pm 8,87	1,23	
Furosemida (recién alimentados)			
Control	0,12 \pm 0,08 *	---	24
Furosemida	0,05 \pm 0,03 *	0,0006	51
Furosemida + 5-HT	57,85 \pm 3,82	3,85	

Tabla II. Secreción de los UMT de *Rhodnius prolixus* bajo los efectos de la sustitución del ion Na⁺. Para cada uno de los tratamientos se realizó una prueba de t-Student para datos pareados con $p < 0,05$, donde p es la probabilidad de que la diferencia entre cada condición y la condición anterior sea significativa.

(*) indica que la acumulación del volumen secretado no es significativamente diferente a la condición anterior.

Tratamiento	Volumen sec. \pm ES (nL.m m ⁻¹)	Tasa de secreción (nL.m in ⁻¹ .m m ⁻¹)	n
Condición 1			
Control	0,59 \pm 0,27 *	---	9
15 mM Na ⁺	0,79 \pm 0,36 *	0,026	24
15 mM Na ⁺ + Furosemida	0,82 \pm 0,36 *	0,001	
105 mM Na ⁺ + Furosemida	4,88 \pm 1,64	0,09	
105 mM Na ⁺ + Furosemida + 5-HT	12,20 \pm 3,05	0,5	
Condición 2			
Control	0,26 \pm 0,04 *	---	3
15 mM Na ⁺	0,70 \pm 0,31 *	0,019	9
105 mM Na ⁺	0,77 \pm 0,40 *	0,011	
105 mM Na ⁺ + Furosemida	5,62 \pm 1,27	0,069	
105 mM Na ⁺ + Furosemida + 5-HT	14,08 \pm 1,12	0,34	

VI. DISCUSIÓN

Los túbulos de Malpighi representan el sistema excretor osmorregulador de *Rhodnius prolixus*, equivalentes al sistema de túbulos renales en los humanos, sin embargo éstos no poseen glomérulos por lo tanto la formación de la orina primaria depende principalmente de mecanismos específicos de transporte transepitelial.

Cuando *Rhodnius prolixus* se alimenta de la sangre del huésped vertebrado, se liberan las hormonas diuréticas desde el ganglio mesotorácico a la hemolinfa. Siguiendo el modelo de trabajo (Gutiérrez y col., 2004) esquematizado en la Figura 5, la liberación de las hormonas diuréticas activan receptores en la membrana basolateral generando un aumento en la concentración intracelular de AMPc, promoviendo una cascada de fosforilación. El incremento de AMPc intracelular activa principalmente una ATPasa de H^+ de tipo vacuolar ubicada en la membrana apical, encargada de energizar el flujo transepitelial a través la hidrólisis de ATP, la cual se transforma directamente en voltaje mediante el bombeo de H^+ (Maddrell y O'Donnell, 1992; Beyenbach, 2001). Esta bomba genera un gradiente de H^+ desde la luz tubular hacia el citoplasma, que permite el intercambio sensible a amilorida de Na^+ y/o K^+ citoplasmático por H^+ luminal (Maddrell y O'Donnell, 1992; Beyenbach, 2001), favoreciendo la salida de los iones hacia el lumen.

Además, se propone que el incremento de AMPc intracelular estimula el triple cotransportador de $Na^+/2Cl^-/K^+$ en la membrana basolateral, promoviendo la entrada de los tres iones al citoplasma. La actividad del triple cotransportador puede ser inhibida por furosemida. Según nuestro modelo (Figura 5), la adición de furosemida inhibiría la entrada

de los tres iones al citoplasma, disminuyendo su transporte hacia la luz tubular (Hernández y col., 2001).

Por otra parte, el aumento la concentración intracelular de Na^+ activa una ATPasa de Na^+/K^+ sensible a ouabaína, localizada en la membrana basolateral. La actividad de esta bomba en *Rhodnius prolixus* va en contra del flujo de secreción, minimizando el desplazamiento neto de Na^+ a través del epitelio. Al inhibir la bomba de Na^+/K^+ con ouabaína, siguiendo el modelo de trabajo, se esperaría disminuir la salida de Na^+ a través de la membrana basolateral, generando un aumento en la concentración intracelular de Na^+ que favorece la disponibilidad del ion para el transporte a través de la membrana apical, mediado por el intercambiador de Na^+ y/o K^+-H^+ , facilitando el flujo del ion hacia el lumen. Esto fue demostrado en el laboratorio presentándose una estimulación de la secreción de 29% , cuando se aplicó ouabaína a túbulos estimulados por 5-HT (Gutiérrez y col., 2004).

En la mayoría de los tejidos animales, la ouabaína induce un incremento en el volumen de la célula, por la acumulación intracelular de Na^+ acompañado del ingreso de agua, generando finalmente la lisis celular. No obstante, en muchos epitelios de insectos se ha demostrado que la ouabaína no tiene efecto, hasta en concentraciones muy altas (Torrei y col., 2004). Inclusive, en condiciones de no estimulación o en reposo de los TM de *Rhodnius prolixus* se ha demostrado que la ouabaína no tiene ningún efecto sobre la concentración intracelular de Na^+ (García, 2010).

Los TM de *Rhodnius prolixus* en reposo presentan un gradiente de H^+ muy significativo, de casi 1 unidad de pH entre el lumen y el citoplasma a través de la membrana apical (Ianowski y col., 2006), a pesar de esto no hay secreción en los TM sin

estimulación o en reposo. Esto llevó a García en el 2010 a estudiar la homeostasis de Na^+ en los TM en reposo (sin estimulación) de este modelo experimental.

García (2010) comprobó que 5-HT eleva la concentración intracelular de Na^+ en TM de *Rhodnius prolixus* en reposo, cuyo efecto ha sido previamente reportado para la activación de la secreción (Maddrell y col., 1991; Ianowski y col., 2002). En este trabajo, García demostró que el aumento del Na^+ citoplasmático por efecto de la hormona depende principalmente del triple cotransportador, que en condición de reposo no ha sido estimulado. Este resultado es consistente con nuestro modelo de trabajo (Figura 5).

Asimismo, los resultados obtenidos por García (2010) estudiando TM en reposo, mostraron que la ouabaína no induce cambios en la concentración de Na^+ intracelular, mientras que la adición de furosemida produjo un aumento significativo en la $[\text{Na}^+]_i$. Adicionalmente, observo que la ouabaína genera un aumento en la $[\text{Na}^+]_i$ si se aplica después de la furosemida. Por otra parte, la adición de amilorida en TM bajo el efecto de ouabaína y furosemida, abolió el aumento de la $[\text{Na}^+]_i$. En consecuencia, sus resultados proponen la existencia basolateral de una conductancia selectiva a Na^+ tipo ENaC sensible a amilorida, y confirmarían la existencia de la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína, propuesta por Caruso-Neves y colaboradores (1998). En conclusión, el modelo de secreción propuesto por Gutiérrez y colaboradores (2004) muestra dos entradas de Na^+ al citoplasma, a través del conocido triple cotransportador de $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ y una conductancia selectiva a Na^+ tipo ENaC sensible a amilorida, y dos salidas de Na^+ basolateral a través de la ATPasa de Na^+ / K^+ y la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por furosemida, ésta sería la principal responsable del movimiento de Na^+ desde el citoplasma hacia la hemolinfa en condición de reposo.

Considerando los resultados de García, nos planteamos investigar la posibilidad de que la manipulación de la homeostasis de Na^+ genere secreción en los TM de *Rhodnius prolixus* bajo la condición de reposo (sin estimulación).

La premisa de nuestro trabajo es que el control de la $[\text{Na}^+]_i$ juega un papel primordial en la secreción de los UMT de *Rhodnius prolixus*. Por lo tanto, los cambios observados en el volumen del fluido secretado reportados en el presente trabajo se deben al efecto de los agentes farmacológicos empleados que afectan el movimiento neto de los iones, principalmente de Na^+ , a través de la membrana basolateral.

Para llevar a cabo cada objetivo planteado, se utilizaron insectos pertenecientes al mismo grupo experimental, que fueron mantenidos y cultivados bajo las mismas condiciones. Es de esperarse que existan diferencias entre los grupos experimentales debido a las condiciones fisiológicas intrínsecas de los ejemplares utilizados.

Efecto de Furosemida sobre la inducción de la secreción de los UMT en condición de reposo.

La Furosemida es un natriurético distal en riñón de mamífero que actúa inhibiendo específicamente la actividad del triple cotransportador de $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$. Se sabe que este fármaco inhibe tanto al triple cotransportador de $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ como la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por furosemida (Proverbio y col., 1986). En el presente trabajo la principal función que se adjudica a furosemida es la inhibición de la ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína. Siguiendo nuestro modelo de trabajo (Figura 5), la adición basolateral de furosemida inhibe al triple cotransportador, minimizando el

transporte de Na^+ , Cl^- y K^+ al citoplasma; por otra parte se inhibe la ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína, bloqueando una de las salidas del ion del citoplasma hacia la hemolinfa.

Gutiérrez y colaboradores (2004) reportaron que la adición basolateral de furosemida en UMT estimulados *in vitro* con 5-HT, produjo la disminución del volumen de secreción en un 80% en el epitelio excretor, como resultado de la inhibición de la principal entrada de Na^+ a través del triple cotransportador de $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$. Por otra parte, García (2010) observó un incremento significativo en la concentración intracelular de Na^+ bajo el efecto de furosemida en UMT en reposo, que según el modelo de trabajo favorecería la secreción a través de la luz tubular. Este aumento en Na^+ sólo puede ser explicado por la inhibición de la ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína, ya que inhibiendo el triple cotransportador no puede generarse un aumento de Na^+ .

En este trabajo se observó la generación significativa de un volumen de secreción tras la aplicación de furosemida del lado basolateral (Figura 8) en los UMT en reposo, presentando una tasa de secreción de $0,29 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Tabla I), evidenciando que la furosemida en efecto induce la secreción en los UMT en condición de reposo. Esto se puede explicar considerando que la inhibición de la principal salida de Na^+ citoplasmático en reposo a través de la ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína, induce el desplazamiento del ion al interior celular por medio de la conductancia selectiva a Na^+ propuesta por García (2010), ocasionando la acumulación del ion en el citoplasma. Este resultado es consistente con lo reportado por García (2010), el incremento de la $[\text{Na}^+]_i$ aumenta la disponibilidad del Na^+ para el intercambio por H^+ luminal, seguido por Cl^- y agua, generando finalmente el volumen de secreción descrito en este trabajo.

El resultado obtenido en este trabajo con el efecto de furosemida sobre la inducción de la secreción de los UMT en reposo constituye una fuerte evidencia de la existencia de la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por furosemida, que estaría localizada en la membrana basolateral. Por lo que se sugiere, que en condición de reposo, la actividad de la ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína podría ser mayor que la ATPasa de Na^+/K^+ , ya que pareciera que ésta última por sí sola no mantiene baja la concentración de basal de Na^+ en el interior celular, dado que al inhibir la ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína, aumenta la concentración intracelular de Na^+ (García, 2010) induciendo la secreción en los UMT como se demostró en este trabajo. Con esto se confirma la importancia de la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína en la homeostasis de Na^+ de los UMT como principal mecanismo de salida del ion en reposo.

En este trabajo se presenta por primera vez la secreción de UMT de *Rhodnius prolixus* en condición de reposo, es decir sin haber sido estimulados con las hormonas endógenas, como consecuencia de la modificación de la homeostasis de Na^+ bajo el efecto de furosemida.

Es importante reiterar que la secreción obtenida como resultado del efecto de furosemida no es comparable con la alcanzada por el efecto *in vitro* de 5-HT. Se observó experimentalmente que la serotonina o 5-HT promueve un aumento significativo del volumen secretado por los UMT analizados bajo el efecto de furosemida (Figura 9), cuya tasa de secreción fue $8,47 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Tabla I), lo que implica un aumento en la $[\text{Na}^+]_i$, corroborando el efecto de la hormona diurética reportado sobre la secreción (Maddrelly col., 1991; Ianowski y col., 2002). Según el modelo de trabajo, la adición de la hormona activaría al receptor serotoninérgico en la membrana basolateral, ocasionando una

cascada de fosforilación en el citoplasma, que aumentaría la concentración de AMPc (Aston, 1979; Maddrell, 1963; Maddrell y col., 1991), activando varios de los mecanismos principales de transporte transepitelial en las células de los UMT.

En este trabajo se demostró que el efecto de furosemida sobre la entrada de Na^+ al citoplasma no es agudo ni a corto plazo, podemos definirlo como un efecto crónico que se extiende hasta los 120 minutos observados experimentalmente. Por ende, se concluye que el mantenimiento de la homeostasis de Na^+ es fundamental para la fisiología de los TM de *Rhodnius prolixus*.

Efecto de Ouabaína sobre la secreción inducida por furosemida de los UMT en condición de reposo.

El fármaco Ouabaína es un conocido y potente inhibidor de la ATPasa de Na^+/K^+ , localizada en la membrana basolateral de los epitelios (Glynn, 1964). En *Rhodnius prolixus*, la ATPasa de Na^+/K^+ media el transporte de Na^+ en contra del flujo de secreción. Considerando el modelo de secreción (Figura 5), en UMT estimulados la adición de ouabaína generaría la disminución del gradiente de Na^+ a través de la membrana basolateral debido al bloqueo de la salida del ion, esto produciría un aumento en la concentración citoplasmática de Na^+ , beneficiando su competitividad para el transporte a través de la membrana apical mediado por el intercambiador de Na^+ y/o K^+-H^+ , facilitando el flujo del ion hacia el lumen.

La ouabaína cumple funciones de toxina en las plantas, por ser un potente inhibidor de la ATPasa Na^+/K^+ , sin embargo no tiene un efecto evidente en los TM de muchos

insectos como por ejemplo *Drosophila melanogaster*, *Formica polyctena*, *Glossina morsitans*, entre otros (Torrei y col., 2004). Esto ha llevado a plantear la “Paradoja de la ouabaína” señalando que el inhibidor no tiene efecto sobre la ATPasa Na^+/K^+ en los TM de algunos insectos por no tener acceso a la bomba. Torrei y colaboradores (2004) proponen una vía de transporte activo, denominada oatps, para la ouabaína al encontrar el glucósido en el flujo secretado de los TM de *Drosophila*.

Sin embargo, en UMT de *Rhodnius prolixus* la ouabaína estimula eficientemente el transporte basolateral de Na^+ y la secreción a través del lumen (Maddrell y Overton, 1988), en un 29% según lo reportado por Gutiérrez y colaboradores (2004) en UMT estimulados *in vitro* con 5-HT. Por otra parte, se ha observado que la aplicación de ouabaína en UMT en condición de reposo no produce efectos en la acumulación de Na^+ intracelular (García, 2010).

Experimentalmente, se comprobó que la ouabaína no tiene un efecto significativo sobre la secreción de los UMT en reposo (Figura 10), presentando una tasa de secreción de $0,02 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Tabla I) que no fue considerablemente distinta a la obtenida en los UMT control. Nuestros resultados son consistentes con lo reportado por García (2010), en donde señaló que la ouabaína no tiene efecto sobre la concentración intracelular de Na^+ . Por lo tanto, los resultados obtenidos refuerzan la existencia de dos salidas basolaterales de Na^+ esquematizadas en nuestro modelo de trabajo (Figura 5), a través de la ATPasa Na^+/K^+ y la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por furosemida propuesta por Proverbio y colaboradores (1970) en células de riñón de rata, y por Caruso-Neves y colaboradores (1998) en homogenatos celulares de TM de *Rhodnius prolixus*.

La adición de 5-HT permitió comprobar que los UMT tenían la capacidad de secretar y que se encontraban en condiciones fisiológicas óptimas, presentando una tasa de secreción de $3,91 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Figura 10, Tabla I).

En conclusión, los resultados sugieren que la ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por furosemida localizada en la membrana basolateral, estaría desplazando Na^+ en contra del gradiente electroquímico, cuando la ATPasa de Na^+/K^+ está siendo bloqueada por ouabaína, esto podría explicar que el ion no se acumule en el citoplasma, manteniendo baja la $[\text{Na}^+]_i$ basal. Este resultado señala que la ouabaína parece no tener un papel relevante sobre la homeostasis de Na^+ en condición de reposo, sin embargo no se descarta lo propuesto por Torrei y colaboradores (2004).

Considerando los resultados obtenidos respecto al efecto de furosemida (Figura 8) y ouabaína (Figura 10) sobre la inducción de la secreción en los UMT en reposo, se estudió el efecto sinérgico de ambos inhibidores, debido a que García (2010) observó un incremento significativo en la $[\text{Na}^+]_i$ como consecuencia del efecto aditivo de ouabaína y furosemida en UMT en reposo.

Tal como se observó, la ouabaína no indujo la secreción en los UMT. Entonces al inhibir la segunda ATPasa de Na^+ con furosemida luego de la adición de ouabaína (Figura 11), se evidenció un aumento significativo en la tasa de secreción de $0,25 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Tabla I), producto de la acumulación del Na^+ en el citoplasma como consecuencia del bloqueo de ambos mecanismos de bombeo del ion hacia la hemolinfa. Sin embargo, la tasa de secreción alcanzada por el efecto aditivo de ouabaína y furosemida no fue significativamente diferente a la tasa de secreción inducida únicamente por furosemida,

corroborando que la ouabaína pareciera no tener un efecto relevante sobre los UMT en reposo.

Para confirmar lo anterior, al invertir el orden de los fármacos se obtuvo un resultado interesante respecto al efecto de ouabaína. Se observó experimentalmente que la adición de ouabaína después de furosemida generó un aumento significativo en la tasa de secreción de $0,34 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Figura 12, Tabla I). Esto es producto de la inhibición con furosemida de la ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína, que incrementa la $[\text{Na}^+]_i$ y podría activar a la ATPasa de Na^+/K^+ , la cual desplazaría el ion al espacio extracelular. Posteriormente, la ATPasa de Na^+/K^+ es inhibida con ouabaína produciendo el señalado aumento del Na^+ intracelular reportado por García (2010), lo que podría dilucidar el aumento en el volumen de la célula por la entrada de agua a través de los canales de agua (Rp-MIP, Echeverría y col., 2001) y la subsiguiente secreción. La actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ queda en evidencia sólo cuando la Segunda ATPasa de Na^+ se encuentra inhibida por furosemida. No obstante, la tasa de secreción obtenida al invertir el orden de adición de los fármacos tampoco fue significativamente diferente de la alcanzada tras el efecto individual de furosemida (Figura 8).

La secreción de los UMT inducida por la acción sinérgica de ouabaína y furosemida en condición de reposo es posible que dependa de la actividad intrínseca de las bombas en esta condición, el número relativo de cada ATPasa en las células y, de la afinidad de las bombas por la $[\text{Na}^+]_i$. En la Figura 13 se comparó el efecto de ouabaína antes y después de la adición de furosemida, evidenciando que las tasas de secreción obtenidas en cada caso no son significativamente diferentes entre sí (Tabla I).

Ahora bien, tomando en cuenta que tanto en la Figura 11 y la Figura 12 se puede notar un incremento en la pendiente de la curva experimental cuando ambos inhibidores actúan simultáneamente sobre los UMT, y que el tiempo de exposición a ambos fármacos fue insuficiente, nos planteamos evaluar el efecto sinérgico de ouabaína y furosemida durante los 120 minutos experimentales.

Los resultados obtenidos comprueban que no hay diferencias significativas en las tasas de secreción alcanzadas por el efecto de ouabaína antes o después de la adición de furosemida (Tabla I), respecto la tasa de secreción obtenida cuando los inhibidores se aplican conjuntamente desde el inicio del experimento, indicando que el efecto de ouabaína y furosemida sobre la inducción de la secreción de los UMT no es agudo, más bien pareciera permanecer en el tiempo, tal como se muestra en la Figura 14.

Aunque García (2010) reportó un aumento significativo en la magnitud de la concentración de Na^+ intracelular debido al efecto aditivo de ouabaína y furosemida, experimentalmente se comprobó que el efecto sinérgico de ambos inhibidores no aumenta significativamente la secreción en los UMT en reposo. Por lo tanto, se puede concluir que un aumento relevante de la $[\text{Na}^+]_i$ no induciría precisamente a un incremento en el volumen de secreción generado en los UMT bajo la condición de reposo, tal como lo muestran nuestros resultados, ya que es posible que se haya alcanzado la capacidad de secreción de los UMT en reposo, la cual dependería de la actividad basal de la ATPasa de H^+ en la membrana apical, esto podría explicar que ambos inhibidores no aumenten considerablemente el volumen de secreción.

Estos resultados de nuevo corroboran la existencia de la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína en los TM de *Rhodnius prolixus*, que sería primordial en la homeostasis de Na^+ en condiciones de reposo, y cuya actividad pudiese ser mayor que la ATPasa de Na^+/K^+ cuando los TM no están estimulados.

Efecto de Amilorida sobre la inducción de la secreción por Furosemida de los UMT en reposo.

La Amilorida es un eficaz inhibidor del intercambiador de $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ (Kleyman y Cragoe, 1988), además también puede interactuar con otras proteínas, canales de Na^+ y transportadores. Aunado de esto, cuando se emplea a concentraciones micromolares tiene la capacidad de antagonizar con la actividad de canales epiteliales de Na^+ (ENaC, del inglés Epithelial Sodium Channel). Se ha reportado que a una concentración de 0,1 mM de amilorida es posible eliminar el incremento de la $[\text{Na}^+]_i$ inducido por furosemida en células epiteliales (Kleyman y Cragoe, 1988; Garty y Palmer, 1997), sin afectar la actividad del intercambiador apical. Los canales epiteliales de Na^+ median el transporte del ion en varios epitelios con una resistencia eléctrica alta, además se expresan en la superficie apical de las células renales, vías respiratorias y la piel de anfibios (Duc y col., 1994; Renard y col., 1995). Sin embargo, se ha propuesto la existencia de una conductancia selectiva de Na^+ que estaría localizada en la membrana basolateral del epitelio secretor de *Rhodnius prolixus*, que se asemeja a un ENaC o alguna conductancia del ion análoga (García, 2010).

Según el modelo de secreción (Figura 5), la aplicación basolateral de amilorida (0,1 mM) inhibiría la entrada basolateral selectiva de Na^+ , permitiendo el ingreso del ion a

través del triple cotransportador de $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ cuando los TM están estimulados. En el 2010, García observó que la adición de amilorida abolía el incremento de la concentración intracelular de Na^+ inducida por el efecto sinérgico de ouabaína y furosemida en UMT en reposo.

Considerando lo anteriormente expuesto, se estudió el efecto de amilorida sobre la secreción inducida por furosemida en UMT sin estimulación, con el propósito de corroborar la existencia de ésta conductancia selectiva de Na^+ basolateral. Experimentalmente, se evidenció que la amilorida abolió la secreción inducida por furosemida, lo que implica que la tasa de secreción alcanzada por el efecto de furosemida se fue a cero, es decir, de 0,46 a 0,06 $\text{nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Figura 15, Tabla I).

En nuestro modelo de secreción (Figura 5) se han propuesto dos entradas y dos salidas de Na^+ basolateral, la furosemida inhibe una salida basolateral del ion al citoplasma a través de la ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína, generando un incremento del volumen secretado por los UMT en reposo, como se demostró por primera vez en este trabajo (Figura 8). Igualmente, la furosemida inhibe la actividad del triple cotransportador de $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$, siendo una de las dos entradas de Na^+ al citoplasma descritas en el modelo. Por lo tanto, los resultados sugieren que la secreción obtenida de los UMT en reposo, bajo el efecto de furosemida, se debe a la entrada del ion a través de la conductancia selectiva de Na^+ que sería inhibida por amilorida.

Así, la adición de amilorida estaría inhibiendo la entrada del ion al citoplasma que minimizaría el intercambio de Na^+ por H^+ luminal, ocasionando el cese de la secreción inducida por furosemida en los TM en reposo. Los resultados reportados en este trabajo

sobre el efecto de amilorida son consistentes con las observaciones de García (2010) respecto a los cambios en la concentración de Na^+ intracelular inducidos por el efecto basolateral de amilorida. En experimentos realizados con TM estimulados, Gutiérrez y colaboradores reportaron que la adición de amilorida (0.4 mM), concentración capaz de inhibir la actividad del intercambiador apical de $\text{Na}^+ - \text{H}^+$, logró inhibir considerablemente el flujo de secreción en un 77% cuando es aplicado en el lumen, mas no en el lado basolateral, indicando que el triple cotransportador es la principal entrada de Na^+ hacia el citoplasma en TM estimulados, y que la conductancia de Na^+ sería una entrada secundaria localizada en la membrana basolateral. La existencia de esta conductancia queda en evidencia cuando el triple cotransportador es inhibido por furosemida en UMT en reposo, como lo muestran nuestros resultados (Figura 15).

Los resultados sugieren que la amilorida pareciera no estar inhibiendo la actividad del intercambiador de $\text{Na}^+ - \text{H}^+$, lo que se comprobó mediante la adición de 5-HT, permitiendo corroborar que los UMT tenían la capacidad de secretar y que se encontraban en condiciones fisiológicas óptimas, presentando una tasa de secreción de $1,23 \text{ nL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Figura 15, Tabla I). Una vez más, se comprobó que la 5-HT estimula la secreción, al activar el receptor serotoninérgico en la membrana basolateral. Sin embargo, la secreción producida por el efecto de la hormona diurética resultó ser considerablemente inferior a las obtenidas en los casos anteriores, debido a la poca disponibilidad del ion en el citoplasma, ya que las dos entradas basolaterales de Na^+ , propuestas en el modelo de secreción, estarían bloqueadas.

Estudio de la secreción inducida por Furosemida en presencia de bajo Na^+ extracelular de los UMT en reposo.

El cloruro de sodio representa más del 90% de la osmolaridad del líquido extracelular en preparaciones animales. En general, como el flujo de sales a través del epitelio osmorregulador provoca el movimiento de agua, la cantidad de sal en el organismo es determinante del volumen de líquido extracelular. En insectos, el sistema osmorregulador está representado por los túbulos de Malpighi, en los cuales se llevan a cabo los procesos de reabsorción (en la porción proximal o LMT) y secreción (porción distal o UMT) de electrolitos entre la hemolinfa y el lumen. Como hemos discutido con anterioridad, el mantenimiento de la homeostasis de Na^+ en el citoplasma del epitelio secretor, es fundamental para el movimiento transepitelial de iones y en consecuencia, el flujo de sales y agua a través del lumen de los TM.

En nuestro modelo de trabajo, esquematizado en la Figura 5, la principal entrada de Na^+ a la célula se llevaría a cabo mediante el triple cotransportador de $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ cuando los UMT están estimulados. Si la $[\text{Na}^+]_o$ es baja, disminuiría el desplazamiento del ion hacia el citoplasma, y en consecuencia el movimiento neto de Na^+ , Cl^- y K^+ a través de la membrana basolateral, reduciendo el intercambio del Na^+ por H^+ luminal, y finalmente la aboliendo la secreción.

García (2010) realizando la sustitución parcial iones Na^+ en la solución del baño en presencia de furosemida y ouabaína, observó una disminución de la $[\text{Na}^+]_i$ en UMT en reposo, debido a que la poca disponibilidad del ion en el lado extracelular minimizó el aumento de la concentración intracelular de Na^+ inducida por ambos fármacos. Estas

observaciones nos permitieron plantearnos evaluar el efecto de la sustitución de Na^+ sobre la secreción inducida por furosemida, con el propósito de confirmar que es dependiente de la entrada de Na^+ por medio de la conductancia basolateral en UMT en reposo. Por ese motivo, se realizaron experimentos con una solución Ringer Insecto, a la cual se le sustituyó el NaCl por Cloruro de n-metil glucamina (145 mM). El NaCl contribuye mayoritariamente a la concentración de Na^+ en la solución RI.

Nuestros resultados evidencian que la adición de furosemida en presencia de bajo $[\text{Na}^+]_o$ no generó un volumen de secreción significativo respecto a la condición control (Figura 16), debido a la mínima cantidad de Na^+ que ingresaría al citoplasma por medio de la conductancia selectiva de Na^+ (Condición 1, Tabla II). Sin embargo, al aumentar la $[\text{Na}^+]_o$ se logró generar un incremento significativo en el volumen secretado, el cual fue mayor tras la estimulación *in vitro* con 5-HT (Condición 1, Tabla II). Cabe destacar, que las tasas de secreción obtenidas en este caso son considerablemente menores en comparación a los experimentos donde no se modificó la concentración de Na^+ en la solución RI.

Estos resultados parecieran indicar que hay un efecto de furosemida sólo cuando la $[\text{Na}^+]_o$ es significativamente alta. Con el objetivo de confirmar esto, se realizaron experimentos en los cuales se aumentó la concentración de Na^+ en el pozo de la cámara antes de la adición de furosemida (Condición 2, Tabla II), obteniéndose un incremento significativo del volumen de secreción (Figura 17), lo que corrobora los resultados reportados en la Condición 1. Las tasas de secreción obtenidas en la Tabla II para las Condiciones 1 y 2 no son significativamente diferentes entre sí.

Seguando el modelo de trabajo, nuestros resultados sugieren que al aumentar la $[Na^+]_o$, ingresaría una mayor cantidad del ion al citoplasma que favorece su transporte luminal cuando se aplica furosemida tras la inhibición de la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína. Como ya se ha comprobado en los experimentos anteriores, la adición de 5-HT estimuló la secreción, siendo en este caso (Condición 1 y Condición 2) significativamente inferior a las tasas alcanzadas en las secciones anteriores (Tabla II).

Experimentalmente se evidenció que los UMT se tornaron rígidos al momento de manipularlos dentro del pozo de la cámara, por lo tanto es importante enfatizar que la sustitución de Na^+ extracelular por Cloruro de n-metilglucamina pareciera afectar de manera irreversible la fisiología de los TM de *Rhodnius prolixus* que no varía con un aumento de $[Na^+]_o$, a pesar de ello se pudo observar en ambas condiciones un aumento en el volumen de secreción (Tabla II) por el efecto de furosemida sobre los UMT en reposo.

En conclusión, nuestros resultados indican que la secreción inducida por furosemida es dependiente de una entrada basolateral de Na^+ distinta del triple cotransportador, ya que según el modelo de trabajo al inhibir al triple cotransportador de $Na^+/2Cl^-/K^+$ se favorece la entrada del ion a través de la conductancia de Na^+ descrita anteriormente, sin embargo la disponibilidad del ion es mínima por lo que no se produce el flujo luminal significativo. Además, la sustitución de NaCl por Cloruro de n-metilglucamina perturba el comportamiento observado de los UMT en reposo bajo el efecto tanto de furosemida y como de 5-HT, estas observaciones fueron el principal motivo por el cual se realizaron ambas condiciones experimentales, considerando la posibilidad de que el aumento en la $[Na^+]_o$ permitiría que la furosemida indujera la secreción como se evidenció en los otros casos reportados en esta investigación.

Estudio del efecto de Furosemida sobre la inducción de la secreción de los UMT de *Rhodnius prolixus* recién alimentados (3 días).

En la presente investigación, se demostró experimentalmente que la furosemida induce la secreción en UMT bajo la condición de reposo (Figura 8), en concordancia con el aumento en la $[Na^+]_i$ reportada por García (2010) en UMT bajo la misma condición. Es importante destacar que la secreción alcanzada en reposo bajo el efecto de furosemida es significativamente menor respecto a la obtenida con UMT estimulados.

Por otra parte, en trabajos realizados en el laboratorio con ejemplares del 5^{to} instar recién alimentados (aproximadamente 3 días), al tratar los TM con furosemida se ha observado que no hay incremento en la $[Na^+]_i$ (datos no publicados), por lo que se sugiere un posible cese en la actividad de la segunda bomba de Na^+ bajo esas condiciones, en contraposición al resultado obtenido bajo la condición de reposo en donde se observó un incremento en la concentración citoplasmática de Na^+ (García, 2010). Considerando lo anterior, en este trabajo se estudió el efecto de furosemida sobre la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína en UMT que han estado estimulados naturalmente por las hormonas diuréticas, Rhpro-DH y 5-HT.

Para ello, se diseñó un protocolo de lavado de los TM con el objetivo de eliminar la presencia de las hormonas que pudieran influir en los resultados esperados. Es importante recalcar que este protocolo se ideó considerando dos factores importantes como lo son, la dilución en solución RI de las hormonas endógenas del insecto y, la duración del lavado de los TM. El primer factor nos asegura lavar completamente el efecto de las hormonas diuréticas, empleando tres volúmenes no aditivos de 15 mL de solución RI, en cuyo caso

los UMT no secretaron durante el tiempo experimental (Figura 19), ya que inicialmente el lavado de los TM con un volumen de solución RI dio como resultado la secreción de los UMT (Figura 18.B), comprobando que aún se mantenía el efecto de las hormonas en el citoplasma de la célula.

Ahora bien, el segundo factor a considerar es la duración del lavado. La unión de las hormonas a los receptores genera una cascada de fosforilación, lo que estimula un aumento de AMPc y probablemente de protein kinasa A, que inducen la activación de diferentes mecanismos de transporte transepitelial. Por tal razón, los TM se lavaron durante 45 minutos (15 minutos por cada lavado), con lo que se garantiza que hayan cesado los procesos desencadenados como consecuencia de la unión de las hormonas diuréticas a los receptores, al momento de realizar los experimentos.

Lo anterior se debe comparar con los TM sin lavar, en los que se evidenció que mantenían el efecto de las hormonas diuréticas, aun después de la dilución en solución RI durante la disección de los mismos (Figura 18.A). Sin embargo, la secreción de los UMT sin lavar fue considerablemente mayor respecto a la lograda con los UMT pre-tratados con uno y tres volúmenes de solución RI (Figura 20).

Una vez estandarizado el protocolo de lavado, se evaluó el efecto de furosemida sobre los UMT pre-tratados con tres volúmenes de solución RI (Figura 21, Tabla I). Los resultados evidencian que la furosemida no induce la secreción de los UMT de ejemplares recién alimentados, lo que indicaría una disminución o cese de la actividad de la Segunda ATPasa de Na^+ cuando los UMT están estimulados por las hormonas endógenas, siendo

estos resultados contrarios a los obtenidos con el fármaco en condición de reposo reportados en la presente investigación (Figura 8, Tabla I).

En consecuencia, se propone que en condiciones secretoras la ATPasa de Na^+/K^+ presentaría mayor actividad que la ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína, enmascarando a su vez su actividad cuando los TM están estimulados. Entonces, la adición de furosemida no induce a la secreción de los UMT estimulados, por lo que se sugiere que la Segunda ATPasa de Na^+ estaría bajo una regulación a la baja o *down regulation* por efecto de las hormonas diuréticas, disminuyendo la actividad de la bomba cuando los TM están estimulados por las hormonas endógenas después de la alimentación.

En el modelo de secreción, elaborado en condición de estimulación (Figura 5), se han propuesto dos entradas de Na^+ a través del triple cotransportador de $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ y una entrada selectiva de Na^+ sensible a ilorida, así como también dos salidas de Na^+ por medio de la ATPasa de Na^+ / K^+ y la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por furosemida. Sin embargo, en condición de reposo (sin estimulación), tanto las dos entradas como las dos salidas de Na^+ estarían presentes.

En este trabajo se continuó con la línea de investigación de García (2010) estudiando la homeostasis de Na^+ en los UMT de *Rhodnius prolixus*, obteniéndose resultados importantes para el conocimiento del proceso de secreción de los UMT de nuestro modelo experimental tanto en condición de reposo como en TM estimulados naturalmente, por las hormonas endógenas del insecto, respecto a la secreción dependiente de Na^+ . Se demuestra, por primera vez, que los UMT de *Rhodnius prolixus* pueden secretar en reposo (sin estimulación) bajo el efecto de furosemida, este resultado representa una

fuerte evidencia de la existencia de la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por furosemida en UMT, que sería fundamental para mantener la homeostasis de Na^+ en condición de reposo. Además, no se pudo comprobar el efecto sinérgico de ouabaína y furosemida, reportado por García (2010), dado que es posible que a pesar del aumento de la $[\text{Na}^+]_i$ se haya alcanzado la capacidad de secreción de los UMT en reposo. También se demostró que la amilorida logra abolir la secreción inducida por furosemida, resultado que refuerza el existencia de una conductancia selectiva de Na^+ sensible a amilorida propuesta por García (2010), que estaría localizada en la membrana basolateral de los UMT de *Rhodnius prolixus*. Por otra parte, en los UMT estimulados, siguiendo el modelo, nuestros resultados sugieren que una de las salidas de Na^+ basolateral estaría inhibida por la acción de las hormonas endógenas del insecto. En este sentido, se demostró que la furosemida no induce la secreción cuando los UMT están estimulados, sugiriendo una disminución significativa de la actividad de la Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína.

VII. CONCLUSIONES

- La adición basolateral de furosemida induce la secreción de los UMT de *Rhodnius prolixus* en condición de reposo, es decir, provenientes de insectos con tres semanas de ayuno y sin ser estimulados *in vitro* con 5-HT.
- La ouabaína no tiene efecto sobre los UMT de *Rhodnius prolixus* en reposo, por lo que se confirma que la ATPasa Na^+/K^+ no es el único mecanismo que regula la concentración intracelular de Na^+ .
- Estos resultados confirmarían la existencia de La Segunda ATPasa de Na^+ insensible a ouabaína e inhibida por furosemida, siendo esta el principal mecanismo para el movimiento de Na^+ desde el citoplasma hacia la hemolinfa en condiciones de reposo en los UMT de *Rhodnius prolixus*.
- El efecto de amilorida sobre la secreción inducida por furosemida confirmó la existencia de una conductancia selectiva de Na^+ sensible a amilorida, sugiriendo su ubicación en la membrana basolateral de los UMT de *Rhodnius prolixus*.
- La sustitución de la $[\text{Na}^+]_o$ por Cloruro de n-metilglucamina en reposo, tiene un efecto irreversible sobre la fisiología de la secreción de los UMT de *Rhodnius prolixus*, disminuyendo su capacidad de secreción en presencia de furosemida y luego de la estimulación *in vitro* por 5-HT.
- Los UMT de *Rhodnius prolixus* recién alimentados secretan espontáneamente, debido al efecto de las hormonas endógenas del insecto.

- Es posible lavar el efecto de las hormonas diuréticas del insecto, lo que permite evaluar el efecto de diferentes fármacos sobre los UMT que han sido estimulados naturalmente.
- La furosemida no induce la secreción en los UMT de *Rhodnius prolixus* recién alimentados, sugiriendo un cese en la actividad de la Segunda ATPasa de Na⁺ insensible a ouabaína.
- Es posible activar los mecanismos de transporte epitelial involucrados en la secreción de los UMT de *Rhodnius prolixus* luego de lavar el efecto de las hormonas endógenas, mediante la estimulación *in vitro* con la hormona 5-HT.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Aston, R.J. 1979.** Studies on the diuretic hormone of *Rhodnius prolixus*. Some observations on the purification and nature of the hormone and the dynamics of its release *in vitro*. *Insect. Biochem.* **9**: 163-176.
- **Barnes, R., Rupert, E. 1996.** Zoología de Invertebrados. Editorial Interamericana. Sexta Edición. D.F., México.
- **Benenson, A. 1992.** El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. Informe oficial de la Asociación estadounidense de Salud Pública. Décima Quinta Edición. *O.P.S.* **538**: 634-643.
- **Berridge, M.J., Oschman, J.L. 1969.** A structural basis for fluid secretion by Malpighian tubules. *Tissue Cell.* **1**: 247-272.
- **Berthelet, F., Beaudry-Lonergan, M., Linares, H., Whitembury, G., Bergeron, M. 1987.** Polimorphic organization of the endoplasmic reticulum of the Malpighian tubule. Evidence for a transcellular route. *La Cellule.* **74**: 281-293.
- **Beyenbach, K.W., Petzel, D.H. 1987.** Diuresis in Mosquitoes: Role of a natriurectic factor. *NIPS.* **2**: 171-175.
- **Beyenbach, K.W. 1995.** Mechanism and regulation of electrolyte transport in Malpighian tubules. *J. Insect. Physiol.* **41**: 197-207.
- **Beyenbach, K.W., Pannabecker, T.L., Nagel, W. 2000.** Central role of the apical membrane H^+ -ATPase in electrogenesis and epithelial transport in Malpighian tubules. *J. Exp. Biol.* **203**: 1459-1468.
- **Beyenbach, K.W. 2001.** Energizing epithelial transport with the vacuolar H^+ -ATPase. *News Physiol. Sci.* **16**: 145-151.
- **Beyenbach, K.W. 2003.** Transport mechanisms of diuresis in Malpighian Tubules of insects. *J. Exp. Biol.* **206**: 3845-3856.
- **Burg, M., Orloff, J. 1968.** Control of Fluid Absorption in the Renal Proximal Tubule. *J. Clin. Invest.* **47**: 2016-2024.

- **Caruso-Neves, C., Meyer-Fernandes, J., Saad-Nehme, J., Proverbio, F., Marín, R., Lopes, A.G. 1998.** Ouabain-insensitive Na^+ -ATPase activity of Malpighian tubules from *Rhodnius prolixus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **119**: 807-811.
- **Caruso-Neves, C., Siqueira, A., Iso-Cohen, G., Lopes, A. 1999.** Bradykinin modulates the ouabain-insensitive Na^+ -ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta.* **1431**: 483-491.
- **Caruso-Neves, C., Coelho-Souza, S., Vives, D., Goes, G., Lara, L., Lopes, A. 2002.** Modulation of ouabain-insensitive Na^+ -ATPase activity in the renal proximal tubule by Mg^{2+} , Mg -ATP and furosemide. *Int J. Biochem. Cell Biol.* **34**: 1586-1593.
- **Chao, A., Koch, A., Moffett, D. 1989.** Active chloride transport in isolated posterior midgut of tobacco hornworm (*Manduca sexta*). *Am. J. Physiol.* **257**: 752-761.
- **Coast, G.M. 2001.** The neuroendocrine regulation of salt and water balance in insects. *Zoology.* **103**: 179-188.
- **del Castillo, J.R., Robinson, J. 1985a.** Mg^{2+} -ATP-dependent sodium transport in inside-out basolateral plasma membrane vesicles from guinea pig small intestinal epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **812**: 401-412.
- **del Castillo, J.R., Robinson, J. 1985b.** Na^+ -stimulated ATPase activities in basolateral plasma membranes from guinea pig small intestinal epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **812**: 413-422.
- **Diamond, J.M. 1962.** The reabsorptive function of the gall-bladder. *J. Physiol.* **161**: 442-473.
- **Duc, C., Farmán, N., Canessa, C.M., Bonvalet, J.P., Rossier, B.C. 1994.** Cell specific expression of epithelial sodium channel α , β and γ subunits in aldosterone responsive epithelia from the rat: localization by in situ hybridization and immunocytochemistry. *J. Cell Biol.* **127**: 1907-1921.
- **Echeverría, M., Ramírez-Lorca, R., Hernández, C., Gutiérrez, A., Méndez-Ferrer, S., González, E., Toledo-Aral, J., y colaboradores. 2001.** Identification of a new water channel (Rp-MIP) in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* **442**: 27-34.

- **G ámez, A., Gutiérrez, A., García, R., Whitembury, G. 2012.** Recent experiments towards a model for fluid secretion in *Rhodnius* Upper Malpighian Tubules (UM T). *J. Insect Physiol.* **58**: 543-550.
- **García, R.D. 2010.** Estudio de la homeostasis del ion Na^+ en células epiteliales de *Rhodnius prolixus* y otros insectos. Tesis de Magister Scientiarum. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Miranda, Venezuela.
- **Garty, H., Palmer, L. 1997.** Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev.* **77**: 359-396.
- **Glynn, I. 1964.** The action of cardiac glycosides on ion movements. *Pharmac. Rev.* **16**: 381-407.
- **Grieco, M., Lopes, A. 1997.** 5-hydroxytryptamine regulates the (Na^+/K^+) ATPase activity in Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*: evidence for involvement of G-protein and cAMP-dependent protein kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **36**: 203-214.
- **Grim, E., Smith, G.A. 1957.** Water flux rates across dog gallbladder wall. *Am. J. Physiol.* **191**: 555-560.
- **Gutiérrez, A., Hernández, C., Whitembury, G. 2004.** A Model for Fluid Secretion in *Rhodnius* Upper Malpighian Tubules (UM T). *J. Membrane Biol.* **202**: 105-114.
- **Haas, M., Forbush, III. 2000.** The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelial. *Am. Rev. Physiol.* **62**: 515-534.
- **Hernández, C., Gutiérrez A., Vargas-Janzen, A., Noria, F., Gonzalez, E., Ruiz, V., Whitembury, G. 2001.** Fluid secretion in *Rhodnius* upper Malpighian tubules (UM T): water osmotic permeabilities and morphometric studies. *J. Membrane Biol.* **184**: 283-290.
- **Ianowski, J.P., O'Donnell, M. 2001.** Transepithelial potential in Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*: lumen-negative voltages and the triphasic response to serotonin. *J. Insect Physiol.* **47**: 411-421.
- **Ianowski, J.P., Christensen, R., O'Donnell, M. 2002.** Intracellular ion activities in Malpighian tubule cells of *Rhodnius prolixus*: evaluation of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransport across the basolateral membrane. *J. Exp. Biol.* **205**: 1645-1655.

- **Ianowski, J.P., O'Donnell, M. 2006.** Electrochemical gradients for Na^+ , K^+ , Cl^- and H^+ across the apical membrane in Malpighian (renal) tubule cells of *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* **209**: 1964-1975.
- **Kleyman, T., Cragoe, E.J. 1988.** Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J. Membr. Biol.* **105**: 1-21.
- **Linton, S.M., O'Donnell, M. 2000.** Novel aspects of the transport of organic anions by the Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **203**: 3575-3584.
- **Maddrell, S. 1963.** Excretion in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* Stål. I. The control of diuresis. *J. Exp. Biol.* **40**: 247-256.
- **Maddrell, S. 1964.** Excretion in the blood sucking insect *Rhodnius prolixus* Stål. II. The normal course of diuresis and the effect of temperature. *J. Exp. Biol.* **41**: 163-176.
- **Maddrell, S. 1969.** Secretion by the Malpighian tubules of *Rhodnius*. The movements of ions and water. *J. Exp. Biol.* **51**:71-97.
- **Maddrell, S., Phillips, J. 1975.** Secretion of hipo-osmotic fluid by the lower Malpighian Tubules of *Rhodnius prolixus*. *J. exp. Biol.* **63**: 671-683
- **Maddrell, S. 1980.** Characteristics of Epithelial Transport in Insect Malpighian Tubules. *Curr. Topics. in Memb. And Transp.* **14**: 427-463.
- **Maddrell, S., Overton, J.A. 1988.** Stimulation of sodium transport and fluid secretion by ouabain in an insect Malpighian tubule. *J. Exp. Biol.* **137**: 265-276.
- **Maddrell, S. 1991.** The fastest fluid-secreting cell-known: the upper Malpighian tubule of *Rhodnius*. *Bio. Essays.* **13**: 357-362.
- **Maddrell, S., Herman, W., Mooney, R., Overton J. 1991a.** 5-Hydroxytryptamine: a second diuretic hormone in *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* **156**: 557-566.
- **Maddrell, S., Whitembury, G., Mooney, R., Harrison, J., Overton, J., Rodriguez, B. 1991b.** The fate of calcium in the diet of *Rhodnius prolixus*: storage in concretion bodies in the Malpighian tubules. *J. Exp. Biol.* **157**: 483-502.
- **Maddrell, S., O'Donnell, M.J. 1992.** Insect Malpighian tubules: V-ATPase action in ion and fluid transport. *J. Exp. Biol.* **172**: 417-429.

- **M addrell, S., Hernan, W ., Farndale, R., Riegel, J.A. 1993.** Synergism of hormones controlling epithelial fluid transport in an insect. *J. Exp. Biol.* **174**: 65-80.
- **M arín, R., Proverbio, T., Proverbio, F. 1983.** Ouabain insensitive Na⁺-stimulated ATPase activity associated to basal-lateral plasma membranes of rat kidney cells. *Acta Cient. Venez.* **34**: 46-55.
- **M arshall, A ., Cooper, P., Rippon, G ., Patak, A . 1993.** Ion and fluid secretion by different segments of the Malpighian tubules of the black field cricket *Teleogryllus oceanicus*. *J. Exp. Biol.* **177**: 1-22.
- **M artini, S., Nascimento, S., Morales, M . 2007.** *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules and control of diuresis by neurohormones. *An.Acad.Bras.Ciênc.* **79(1)**: 87-95.
- **M olina, I., Salvador, F., Sánchez-Montalvá, A . 2016.** Actualización en enfermedad de Chagas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **34**: 132-138.
- **M oretti, R., Martín, M ., Proverbio, T., Proverbio, F., Marín, R. 1991.** Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity in homogenates from different animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* **98**: 623-626.
- **O rchard, I., Lange, A ., Cook, H ., Ramirez, J. 1989.** A subpopulation of dorsal unpaired median neurons in the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* displays serotonin-like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* **289**: 118-128.
- **O rsenigo, M ., Tosco, M ., Esposito, G ., Faelli, A . 1988.** Ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity in the basolateral membrane from rat jejunum. *Int. J. Biochem.* **28**: 1411-1415.
- **O 'Donnell, M ., M addrell, S. 1984.** Secretion by the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* Stål: electrical events. *J. Exp. Biol.* **110**: 275-290.
- **O 'Donnell, M ., M addrell, S. 1995.** Fluid reabsorption and ion transport by the lower Malpighian tubules of adult female *Drosophila*. *J. Exp. Biol.* **198**: 1647-1653.
- **P feiler, L., Kirschner, L. 1972.** Studies on gill ATPase of rainbow trout (*Salmon gairdneri*). *Biochim. Biophys. Acta.* **282**: 301-310.
- **P hillips, J., Wiens, C., Audsley, N., Jeffs, L., Bilgen, T., Meredith, J. 1996.** Nature and control of chloride transport in insect absorptive epithelia. *J. Exp. Zool.* **275**: 292-299.

- **Proverbio, F., Robinson J.W., Whitembury, G. 1970.** Sensitivities of $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -ATPase and Na^+ extrusion mechanisms to ouabain and ethacrynic acid in the cortex of the guinea-pig kidney. *Biochim. Biophys. Acta.* **211**: 327-336.
- **Proverbio, F., del Castillo, J. 1981.** Na^+ -stimulated ATPase activities in kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **646**: 99-108.
- **Proverbio, F., Marín, R., Proverbio, T. 1986.** Na^+ -ATPase is a different entity from the (Na^+/K^+) -ATPase in rat kidney basolateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **858**: 202-205.
- **Proverbio, F., Marín, R., Proverbio, T. 1989.** The “second” sodium pump and cell volume. *Curr. Membr. Transp.* **34**: 105-119.
- **Proverbio, F., Marín, R., Proverbio, T. 1991.** The ouabain-insensitive sodium pump. *Camp. Biochem. Physiol.* **99**: 279-283.
- **Ramsay, J.A. 1952.** The excretion of sodium and potassium by The Malpighian Tubules of *Rhodnius*. *J. Exp. Biol.* **35**: 871-891.
- **Rangel, L., Caruso-Neves, C., Lara, L., Brasil, F., Lopes A. 1999.** Angiotensin II activates the ouabain-insensitive Na^+ -ATPase from renal proximal tubules through a G-protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1416**: 309-319.
- **Renard, S., Voilley, N., Bassilana, F., Lazdunski, M., Barbry, P. 1995.** Localization and regulation by steroids of the alpha, beta and gamma subunits of the amiloride-sensitive Na^+ channel in colon, lung and kidney. *Pflügers Arch.* **430**: 299-307.
- **Rocafull, M., Thomas, L., del Castillo, J. 2012.** The second sodium pump: from the function to the gene. *Pflugers Arch-Eur. J. Physiol.* **463**: 755-777.
- **Skaer, H., Maddrell, S., Harrison, J. 1987.** The permeability properties of septate junctions in Malpighian tubules of *Rhodnius*. *J. Cell. Sci.* **88**: 251-265.
- **Te Brugge, V., Ianowski, J., Orchard, I. 2009.** Biological activity of diuretic factors on the anterior midgut of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **162**: 105-112.
- **Te Brugge, V., Paluzzi, J., Schooley, D., Orchard, I. 2011.** Identification of the elusive peptidergic diuretic hormone in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*: a CRF-related peptide. *J. Exp. Biol.* **214**: 371-381.

- **Torrie, L., Radford, J., Southall, T., Kean, L., Dinsmore, A., Davies, S., Dow, J. 2004.** Resolution of the insect ouabain paradox. *PNAS*. **101**: 13689-13693.
- **Van Kerkhove, E. 1994.** Cellular mechanisms of salt secretion by the Malpighian tubules of insects. *Belg. J. Zool.* **124**: 73-90.
- **Ventrella, V., Pagliarani, A., Trigari, G., Trombetti, F., Borgatti, A. 1987.** Na⁺-like effect of monovalent cations in the stimulation of sea bass gill Mg²⁺ dependent, Na⁺-stimulated ATPase. *Comp. Biochem. Physiol.* **88**: 691-695.
- **Wieczorek, H., Putzenlechner, M., Zeiske, W., Klein, U. 1991.** A vacuolar-type proton pump energizes K⁺/H⁺ antiport in an animal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **266**: 15340-15347.
- **Wigglesworth, V. 1931.** The physiology of excretion in blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). II. Anatomy and histology of excretory system. *J. Exp. Biol.* **8**: 428-442.
- **Wigglesworth, V., Salpeter, M. 1962.** Histology of the Malpighian tubules in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera). *J. Insect. Physiol.* **8**: 299-307.
- **Wigglesworth, V. 1972.** The principles of insect physiology. Chapman and Hall, Séptima Edición. London.
- **Whittembury, G. 1968.** Sodium and water transport in kidney proximal tubular cells. *J. Gen. Physiol.* **51**: 303-314.
- **Whittembury, G., Biondi, A., Paz-Aliaga, A., Linares, H., Parthe, V., Linares, N. 1986.** Transcellular and paracellular flow of water during secretion in the upper segment of the Malpighian tubule of *Rhodnius prolixus*: solvent drag of molecules of graded size. *J. Exp. Biol.* **123**: 71-92.

