

## Análisis electroforético de la hemolinfa de algunas especies de triatóminos (Hemiptera: Reduviidae)\*

por

Rodrigo Zeledón\*\* y Elena I. Morúa\*\*

(Recibido para su publicación el 4 de diciembre de 1963)

En el transcurso de investigaciones tendientes a conocer las variaciones electroforéticas de la hemolinfa de insectos triatóminos infectados con *Trypanosoma rangeli* (fase hemolinfática), tropezamos con la ausencia de datos cuantitativos básicos obtenidos con sangre de insectos normales. En efecto, la información que aparece en la literatura es sumamente escasa; se refiere a dos especies y, ofrece solamente datos cualitativos (5) o semicuantitativos (3). Trabajos más recientes presentan consideraciones generales interesantes en electroforesis de hemolinfa de otros insectos (1) y la posibilidad de que por este método puedan notarse diferencias fundamentales en sangre de insectos parasitados en relación a normales (2). En la presente nota damos a conocer algunos aspectos cuantitativos de las proteínas hemolinfáticas de ninfas de insectos triatóminos normales. En un trabajo posterior nos referiremos a las mismas proteínas en insectos parasitados con *T. rangeli*.

### MATERIAL Y METODOS

Se emplearon únicamente ninfas vacías de 5º estadio de *Rhodnius prolixus*, *Triatoma phyllosoma* y *T. infestans*, las cuales fueron alimentadas unas veces en paloma y otras en conejo, y sangradas inmediatamente, 1 hora, 1 día y 7 días después de la refacción sanguínea, la cual tuvo una duración de 15 minutos. Estando ya concluido el trabajo, tuvimos oportunidad de contar con pequeñas muestras de sangre de *T. platensis* y de *T. pallidipennis*, alimentados en paloma (25 y 7 ninfas de 5º estadio respectivamente), de las cuales adicionamos algunos da-

---

\* Este trabajo ha sido posible gracias a una subvención del U. S. Public Health Service, N.I.A.I.D., Grant AI 03304-03.

\*\* Departamento de Parasitología, Universidad de Costa Rica,

tos por considerarlos de interés comparativo. En general, los mismos insectos sangrados una hora después de la alimentación fueron empleados para obtener las muestras del primero y sétimo días. En todos los casos los insectos fueron mantenidos en estufa a  $26.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  y 55% de humedad relativa. Las muestras usadas consistieron en mezclas de sangres de 14 a 127 donadores que eran obtenidas por punción con alfiler entomológico entre la 2ª y 3ª coxas. La gota que brotaba de cada insecto era colecta en un tubo estéril colocado sobre hielo, y las mezclas inmediatamente centrifugadas en cámara refrigerada ( $5^\circ\text{C}$ ) a  $1900 \times g$  por 20 minutos. La hemolinfa era decantada y guardada en un congelador ( $-20^\circ\text{C}$ ) hasta el momento de su uso. Las proteínas totales fueron determinadas por el método de LOWRY *et al.* (4). Las electroforesis fueron hechas en papel, empleando el aparato "Electro-Rheo-Phorese" de Macheboeuf & Rebeyrotte (Laboratories Leres, París), usando buffer de veronal (pH 8.6, fuerza iónica 0.05) y dejando pasar la corriente eléctrica durante 4 horas. Se probó, además, un buffer de fosfatos de pH 7.2 el cual hubo de ser abandonado por no permitir una buena separación. Se aplicó, en todos los casos,  $10 \mu\text{l}$  de muestra de hemolinfa y se corrieron al mismo tiempo mezclas de sangres de los huéspedes y de hombre para comparación. La coloración se hizo con azul de bromofenol, por 12-14 horas, y las gráficas por medio del fotómetro registrador de la misma marca, calculando las áreas con ayuda de un planímetro (Compensating Polar Planimeter, Keuffel & Esser Co.).

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los resultados muestran que en general existe gran especificidad en las proteínas sanguíneas de los insectos estudiados no sólo en cuanto al tipo y número de fracciones encontradas, sino también en cuanto a sus valores absolutos y relativos (cuadros 1 a 5, figs. 1 a 5). Asimismo, las proteínas totales tienen

CUADRO 1

*Concentración de las fracciones proteicas, en gramos % y en porcentaje relativo, 1 hora después de alimentados los insectos en paloma. Promedios de 5 determinaciones  $\pm$  desviación estandar.*

ESPECIE Y N° DE INSECTOS	FRACCIONES				
	1	1'	2	3	4
<i>R. prolixus</i> (40)	$0.27 \pm 0.04$ (8.4%)	—	$1.17 \pm 0.07$ (36.5%)	$1.07 \pm 0.09$ (33.3%)	$0.70 \pm 0.03$ (21.8%)
<i>T. phyllosoma</i> (14-37)	$0.17 \pm 0.04$ (4.7%)	$0.06 \pm 0.03$ (1.7%)	$2.34 \pm 0.06$ (65.0%)	$1.03 \pm 0.07$ (28.6%)	—

CUADRO 2

Concentración de las fracciones proteicas, en gramos % y en porcentaje relativo, al día siguiente (1 día después) de alimentados los insectos en paloma.  
Promedios de 7 determinaciones  $\pm$  desviación estandar.

ESPECIE Y N° DE INSECTOS	FRACCIONES				
	1	1'	2	3	4
<i>R. prolixus</i> (106)	0.12 $\pm$ 0.05 (4.3%)	—	0.83 $\pm$ 0.05 (29.6%)	0.99 $\pm$ 0.05 (35.4%)	0.86 $\pm$ 0.06 (30.7%)
<i>T. phyllosoma</i> (52-66)	0.16 $\pm$ 0.06 (5.0%)	0.05 $\pm$ 0.04 (1.3%)	2.08 $\pm$ 0.05 (65.0%)	0.92 $\pm$ 0.06 (28.8%)	—
<i>T. infestans</i> (54)	0.07 $\pm$ 0.03 (1.6%)	0.13 $\pm$ 0.05 (3.0%)	1.55 $\pm$ 0.08 <sup>*</sup> (36.1%)	1.55 $\pm$ 0.13 (36.1%)	1.00 $\pm$ 0.11 (23.3%)

CUADRO 3

Concentración de las fracciones proteicas, en gramos % y en porcentaje relativo, al día siguiente (1 día después) de alimentados los insectos en conejo.  
Promedios de 5 determinaciones  $\pm$  desviación estandar.

ESPECIE Y N° DE INSECTOS	FRACCIONES				
	1	1'	2	3	4
<i>R. prolixus</i> (127)	0.22 $\pm$ 0.05 (7.3%)	—	1.08 $\pm$ 0.05 (36.0%)	0.90 $\pm$ 0.07 (30.0%)	0.80 $\pm$ 0.07 (26.7%)
<i>T. infestans</i> (27)	0.09 $\pm$ 0.05 (2.3%)	0.12 $\pm$ 0.05 (3.1%)	1.50 $\pm$ 0.05 (38.6%)	1.48 $\pm$ 0.05 (38.1%)	0.70 $\pm$ 0.09 (18.0%)

CUADRO 4

Concentración de las fracciones proteicas, en gramos % y en porcentaje relativo, 7 días después de haber comido los insectos en paloma. Promedios de 7 determinaciones  $\pm$  desviación estandar.

ESPECIE Y N° DE INSECTOS	FRACCIONES				
	1	1'	2	3	4
<i>R. prolixus</i> (98)	0.17 $\pm$ 0.09 <sup>*</sup> (5.3%)	—	0.91 $\pm$ 0.05 (28.5%)	1.13 $\pm$ 0.09 (35.4%)	0.98 $\pm$ 0.08 (30.7%)
<i>T. phyllosoma</i> (52-62)	0.15 $\pm$ 0.05 (4.1%)	0.04 $\pm$ 0.02 (1.1%)	2.24 $\pm$ 0.13 (60.5%)	1.27 $\pm$ 0.03 (34.3%)	—
<i>T. infestans</i> (54)	0.04 $\pm$ 0.02 (0.8%)	0.06 $\pm$ 0.03 (1.3%)	1.66 $\pm$ 0.10 (34.7%)	1.78 $\pm$ 0.13 (37.2%)	1.25 $\pm$ 0.15 (26.1%)

## CUADRO 5

Concentración de las fracciones proteicas, en gramos % y en porcentaje relativo, 7 días después de haber comido los insectos en conejo. Promedios de 5 determinaciones  $\pm$  desviación estandar.

ESPECIE Y N° DE INSECTOS	FRACCIONES				
	1	1'	2	3	4
<i>R. prolixus</i> (123)	0.17 $\pm$ 0.05 (4.6%)	—	1.11 $\pm$ 0.12 (30.0%)	1.24 $\pm$ 0.09 (33.5%)	1.18 $\pm$ 0.09 (31.9%)
<i>T. infestans</i> (27)	0.13 $\pm$ 0.04 (2.6%)	0.10 $\pm$ 0.03 (1.9%)	1.88 $\pm$ 0.11 (36.9%)	1.91 $\pm$ 0.13 (37.5%)	1.08 $\pm$ 0.10 (21.2%)

valores propios en las especies, independientemente de los valores proteicos del huésped expoliado, siendo algo mayores inmediatamente después de la comida para luego descender, lo cual es ya evidenciable 1 hora después, y tornar a subir ligeramente durante el ayuno (Cuadro 6). En efecto, al comparar estadísticamente

## CUADRO 6

Comparación de las proteínas totales de la hemolinfa de los insectos en gramos %. Los valores son el promedio de 4-5 determinaciones, hechas en duplicado  $\pm$  la desviación estandar.

ESPECIE	TIEMPO			
	15 min.	1 hora	1° día	7° día
<i>R. prolixus</i>	3.9 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.2 3.0 $\pm$ 0.3*	3.2 $\pm$ 0.2 3.7 $\pm$ 0.2*
<i>T. phyllosoma</i>	4.1 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.3
<i>T. infestans</i>	5.4 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.3 3.9 $\pm$ 0.1*	4.8 $\pm$ 0.3 5.1 $\pm$ 0.3*
<i>T. platensis</i>	—	—	5.8 $\pm$ 0.2	6.4 $\pm$ 0.2
<i>T. pallidipennis</i>	—	—	3.8 $\pm$ 0.2	—

\* Los insectos de estos grupos fueron alimentados en conejo (prot. tot., mezcla de 3 sueros: 6.1 $\pm$ 0.1); todos los demás comieron en paloma (prot. tot., mezcla de 5 sueros: 3.6 $\pm$ 0.2).

te (prueba de "t") los valores de proteínas totales obtenidos para cada especie independientemente a los 15 y 60 minutos, se encontró que esas diferencias son consistentemente significativas en todos los casos ( $p < 0.02$ ). Lo mismo es cierto al comparar los valores obtenidos al primero y séptimo días ( $p < 0.02$ ). El análisis de los datos obtenidos al comer los insectos en paloma o en conejo (caso de *R. prolixus* y *T. infestans*) sugiere que no hay una tendencia de los resultados a presentar diferencias reales. Por otra parte, la comparación de los valores obtenidos para las 5 especies, al primer día de comidas en paloma, muestra que cada uno de ellos es diferente de los otros ( $p < 0.01$ ).

La fracción que hemos llamado 1 y que muestra mayor movilidad que la correspondiente a la albúmina del huésped, se presenta difusa o estriada, de límites imprecisos, insinuando un mínimo de 2 fracciones en *T. dimidiata*, *T. phyllosoma* y *T. pallidipennis*, y es algo más compacta en *R. prolixus* y *T. platensis* por lo que la hemos tomado como una sola fracción en estas dos últimas especies. Como puede apreciarse en la fig. 1 hemos designado convencionalmente con números a las fracciones a partir de las de mayor movilidad, sin que ésto signifique que necesariamente dos fracciones con un mismo número se correspondan. Esto se aprecia bien comparando el ferograma de *T. phyllosoma* o *T. pallidipennis*, los cuales aparecen más cortos en cuanto a las fracciones cuantitativamente más importantes, con los de las otras especies.

Los diagramas electroforéticos de estas dos últimas especies pueden considerarse iguales aunque no pudimos evaluar el porcentaje relativo entre las fracciones debido a que no contamos con material suficiente de *T. pallidipennis*. En *T. platensis* aparece constante un pequeño pico (fracción 4), de menor movilidad que la fracción 3, a la que en algunos ferogramas parece unida, llevando el total de fracciones a 5 (figs. 1 y 5). Los electroferogramas practicados con sangre obtenida inmediatamente después de la comida se mostraron esencialmente idénticos a los ulteriores.

## DISCUSION

No hay duda de que el método de electroforesis en papel, a pesar de sus limitaciones, es útil para separar algunas de las fracciones más importantes de la hemolinfa de insectos hematófagos como los triatóminos. Asimismo el buffer usado comúnmente en electroforesis de suero humano, se mostró superior a otro de fosfatos de pH más bajo, el cual parece ser mejor en otros casos como lo demostró BARLOW (1) con hemolinfa de prepupas y larvas de un himenóptero y dos dípteros usando gel de almidón.

Electroforesis de sangre de adultos de *R. prolixus* y *T. infestans* en gel de agar permitió a BENOIT & SANDE (3) la separación de cerca de 12 fracciones para la primera especie y de 10 para la segunda. Por este método fue posible distinguir al menos 2 fracciones anódicas de alta motilidad en ambas especies, con relaciones cuantitativas diferentes entre ellas. Estas fracciones parecen corresponder a lo que nosotros hemos denominado 1 y 1' en nuestros casos. Por otro lado, las fracciones catódicas encontradas por ellos mostraron diferencias cualitativas

fundamentales en los insectos considerados, demostrando buenas posibilidades de diferenciación por este método. Una vez más parece confirmarse la especificidad del electroferograma de la hemolinfa de diferentes artrópodos tal y como lo discuten los autores arriba mencionados, quienes inclusive lo han verificado en electroforesis de sangre de diversas garrapatas. Además, nuestros resultados están de acuerdo con los de BENOIT & SANDE (3) en cuanto a que hay diferencias profundas al comparar el electroferograma del huésped (cobayo en el caso de ellos) y el de los insectos.

Por otro lado, la observación de PICK (5) hecha en *T. infestans* (estadio?), de que las proteínas del huésped pueden influenciar profundamente el ferograma del insecto si el examen es practicado poco después de la comida, no se reconcilia con la nuestra. Todo parece indicar que el insecto fabrica sus propias proteínas a partir de los aminoácidos obtenidos de la digestión de la comida sanguínea, manteniendo sus características cualitativas y cuantitativas relativas, bastante constantes.

Las proteínas totales parecen estar influenciadas por un factor de dilución. Inmediatamente después de la comida, probablemente por no haber pasado aún suficiente líquido del intestino a la sangre, su cifra es más elevada, volviendo el fenómeno a repetirse a medida que aumenta el ayuno con la consiguiente disminución del volumen sanguíneo.

### AGRADECIMIENTO

Los autores desean dejar constancia de su agradecimiento a la Sra. Eugénie de Monge por su asistencia técnica durante el desarrollo del trabajo y al Lic. Rodrigo Umaña por sus consejos en el análisis estadístico de los datos.

### RESUMEN

Se presentan los resultados del análisis electroforético en papel de la hemolinfa de ninfas de 5º estadio de *R. prolixus*, *T. phyllosoma*, *T. infestans*, *T. platensis* y *T. pallidipennis*, alimentadas unas veces en paloma, y otras en conejo. Para *R. prolixus* y *T. infestans* se anotan 3 fracciones principales; para *T. platensis* 4 y para *T. phyllosoma* y *T. pallidipennis* 2; además, se señala una fracción más para todas las especies, dividida en dos en *T. infestans*, *T. phyllosoma* y *T. pallidipennis*, de mayor movilidad que la albúmina de mamíferos y de menor importancia cuantitativa que las otras fracciones.

En general, se encuentra especificidad del ferograma en cuanto al tipo de fracciones y sus valores absolutos y relativos, y se señala su independencia de las características del ferograma del huésped, aún inmediatamente después de la comida sanguínea.

Se anotan datos cuantitativos para las fracciones y proteínas totales de las tres primeras especies y para las proteínas totales de las dos últimas, a diversos tiempos después de la comida sanguínea.

## SUMMARY

The results of paper electrophoretic analysis of hemolymph pools of fifth instar nymphs of *R. prolixus*, *T. phyllosoma*, *T. infestans*, *T. platensis* and *T. pallidipennis*, fed either on pigeons or on rabbits are presented. *R. prolixus* and *T. infestans* show 3 main fractions; *T. platensis* 4, and *T. phyllosoma* and *T. pallidipennis* only 2. A quantitatively less important fraction is present in all the species and is characterized for its higher mobility, as compared with mammalian albumin, and is usually divided in two smaller fractions in *T. infestans*, *T. phyllosoma* and *T. pallidipennis*. Each species has a qualitatively and quantitatively distinct electrophoretic pattern, except *T. phyllosoma* and *T. pallidipennis*, which show similar patterns. The insect electropherogram is different from that of the host even immediately after the blood meal.

Quantitative data are given for the fractions and or the total proteins of the five species, at several intervals after the blood meal. Total protein values are different for each species and higher right after the meal and again after a certain period of starvation.

## REFERENCIAS

1. BARLOW, J. S.  
1962. Electrophoresis of insect hemolymph on starch gel: Effect of pH and buffer. *Anal. Biochem.*, 3: 206-211.
2. BARLOW, J. S.  
1962. An effect of parasitism on hemolymph electropherograms. *J. Insect Pathol.*, 4(2): 274-275.
3. BENOIT, P. L. G. & M. VAN SANDE  
1959. Etude des protéines de l'hémolymph de *Triatoma infestans* et *Rhodnius prolixus* par ultra-microélectrophorèse en gel de gélose. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 39(2): 135-143.
4. LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR. & R. J. RANDALL.  
1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
5. PICK, F.  
1956. Recherches électrophorétiques sur l'hémolymph des Réduvidés hémathophages. *C. R. Acad. Sc.*, 242: 564-565.

Fig. 1. Modelos electroforéticos de las cinco especies de triatóminos y sus fracciones. Los de hombre, conejo y paloma se han incluido para comparación; hemolinfas y sueros fueron corridas en el mismo papel, bajo idénticas condiciones (Experimento 25).

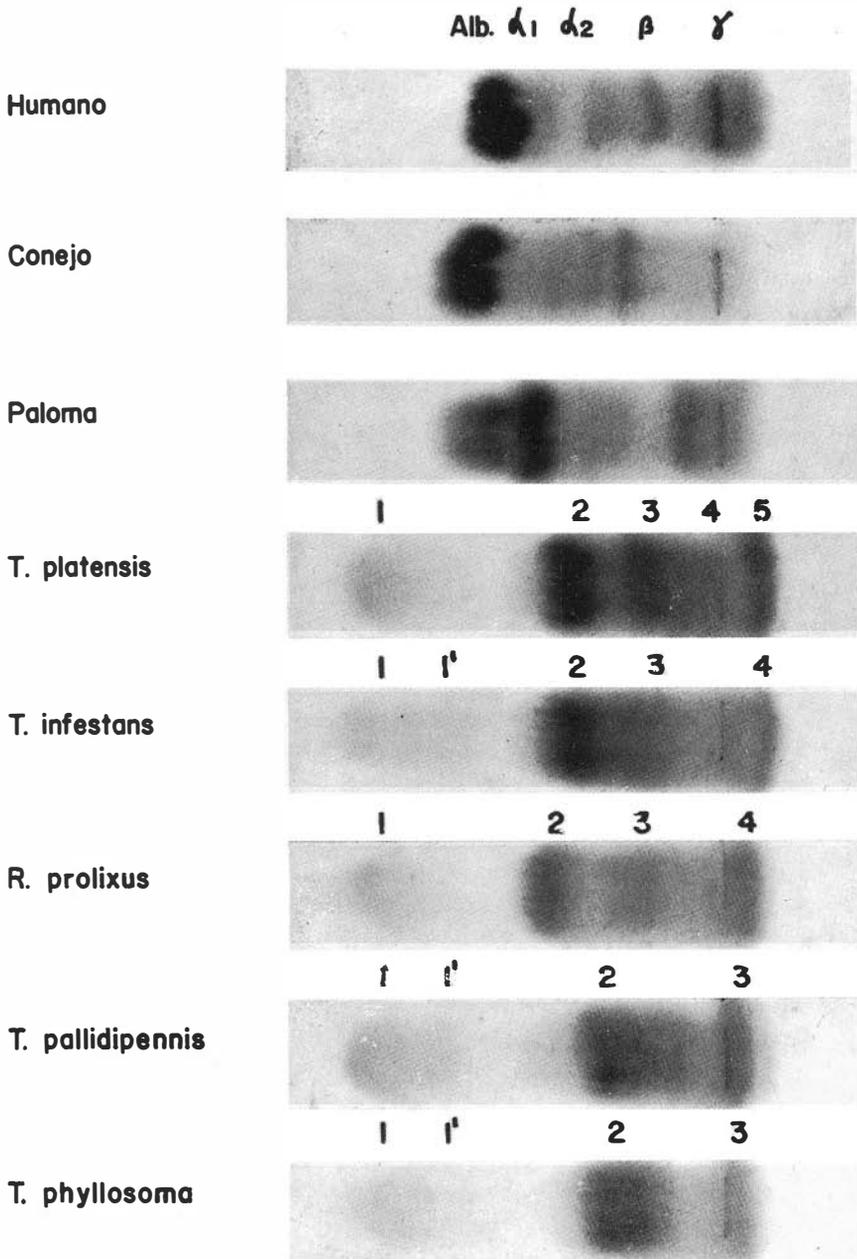
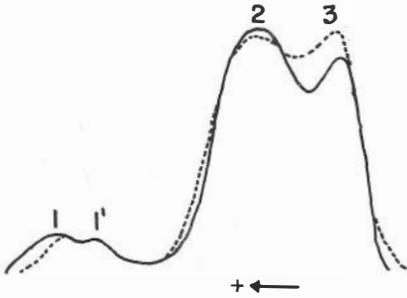


FIG. 1

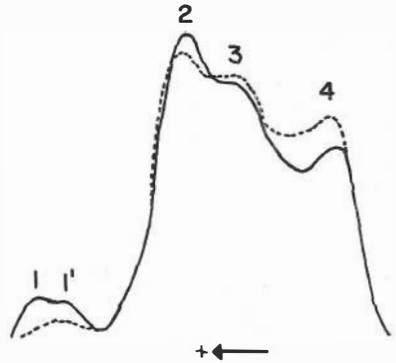
Figs. 2-5 Curvas de las fracciones electroforéticas de cuatro especies superpuestas las del 1º y 7º días (Experimentos 9. 19. y 26)...

FIG. 2



*T. phyllosoma*

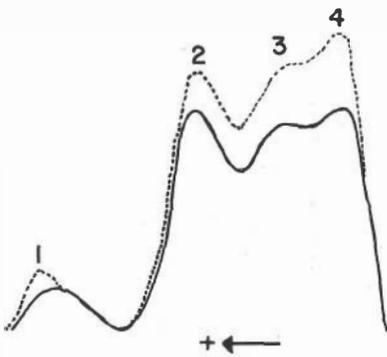
FIG. 3



*T. infestans*

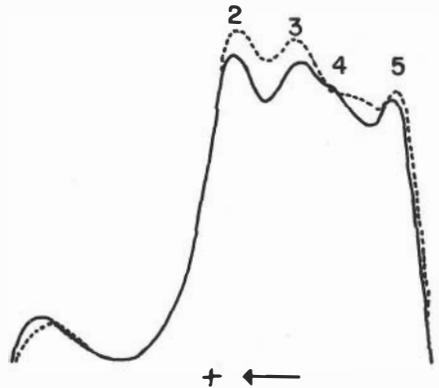
— 1° día  
- - - 7° día

FIG. 4



*R. prolixus*

FIG. 5



*T. platensis*