



ACREDITACIÓN INSTITUCIONAL
Avanzamos... ¡Es nuestro objetivo!



Caracterización del perfil de las proteasas intestinales de *Belminus herreri*, *Belminus ferroae* y *Belminus corredori* (Hemíptera: Triatominae) en condiciones de hemolinfagia y hematofagia.

DIEGO ALEXANDER JAIMES MÉNDEZ

Microbiólogo

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Maestría en Biología Molecular y Biotecnología

Pamplona 2021



SC-CER96940



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



ACREDITACIÓN INSTITUCIONAL
Avanzamos... ¡Es nuestro objetivo!



Caracterización del perfil de las proteasas intestinales de *Belminus herreri*, *Belminus ferroae* y *Belminus corredori* (Hemiptera: Triatominae) en condiciones de hemolinfagia y hematofagia.

DIEGO ALEXANDER JAIMES MÉNDEZ

Microbiólogo

Tutores

REINALDO GUTIÉRREZ MARÍN

Bacteriólogo, M.Sc.

CLAUDIA MAGALY SANDOVAL RAMIREZ

Bióloga, Ph.D. M.Sc.

Grupo de investigaciones en enfermedades tropicales e infecciosas (GIEPATI)

Proyecto financiado por la Universidad de Pamplona y el Instituto venezolano de Investigaciones IVIC

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Maestría en Biología Molecular y Biotecnología

Pamplona 2021



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



ACREDITACIÓN INSTITUCIONAL
Avanzamos... ¡Es nuestro objetivo!



DEDICATORIA

A mi señora **GLADYS** y a mi hija **MARIANA** por todo el apoyo recibido durante el largo y duro camino que atravesamos, por soportarme cuando las cosas no iban bien, a mi familia por creer en mí y por enseñarme el valor del trabajo arduo, a mis amigos y compañeros de trabajo y estudio que me motivaron para nunca desfallecer. A todo aquel que cree en la ciencia, en descubrir nuevas cosas, en comprender lo incomprensible, en conocer lo desconocido y a todos los investigadores de hoy y de siempre, sin su aporte, este trabajo nunca existiría.



SC-CER96940



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



ACREDITACIÓN INSTITUCIONAL
Avanzamos... ¡Es nuestro objetivo!



AGRADECIMIENTOS

A mis tutores **CLAUDIA MAGALY SANDOVAL** Y **REINALDO GUTIÉRREZ MARÍN** por todo el conocimiento, tiempo y experiencia aportada a este proyecto.

A la **Universidad de Pamplona**, que hace más de 20 años es mi casa, por darme la oportunidad de seguir creciendo como persona y profesional.



SC-CER96940



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



Tabla de contenido

RESUMEN	7
CAPÍTULO I.....	8
1. TÍTULO	8
1.1 Introducción	8
1.2 Pregunta de investigación.....	9
1.3 Planteamiento del problema	9
1.4 Justificación.....	9
1.5 Objetivos	10
1.5.1 Objetivo general	10
1.5.2 Objetivos específicos	10
CAPÍTULO II.....	11
2. MARCO REFERENCIAL.....	11
2.1 Triatomíneos	11
2.2 Sangre	13
2.3 Hemolinfa.....	14
2.4 Proteasas.....	15
2.4.1 Endopeptidasas	16
2.4.2 Exopeptidasas.....	17
2.4.3 Proteasas en la digestión de insectos del orden Hemíptera	18
2.5 Intestino y digestión de la sangre en triatomíneos	19
2.5.1 Tracto intestinal y valores de pH	19
2.5.2 Digestión de la sangre en triatomíneos y su interacción con <i>T. cruzi</i>	21
2.6 Inhibidores	24
2.7 Importancia de la caracterización de proteasas en insectos y animales.....	25
CAPÍTULO III.....	29
3. DISEÑO METODOLÓGICO	29
3.1 Muestras de insectos.....	29
3.2 Reactivos.....	29



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



3.3	Extracción de proteasas del intestino de <i>Belminus spp</i>	29
3.4	pH óptimo de acción de las proteasas.....	30
3.5	Actividad proteolítica a diferentes tiempos pos ingesta	30
3.6	Caracterización de proteasas	31
3.7	Análisis estadístico.....	31
CAPÍTULO IV		33
4.	PRESENTACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	33
4.1	Determinación de pH óptimo.....	33
4.2	Actividad proteolítica pos ingesta	34
4.3	Caracterización de las proteasas en <i>Belminus spp</i>	36
4.4	Interpretación de análisis estadístico.....	39
4.4.1	Determinación de pH óptimo de acción de las proteasas	39
4.4.2	Actividad proteolítica pos ingesta.....	39
4.4.3	Caracterización de proteasas	41
5.	DISCUSIÓN	42
5.1	pH óptimo de acción de las proteasas.....	42
5.2	Actividad proteolítica pos ingesta	43
5.3	Caracterización de proteasas	45
6.	CONCLUSIONES.....	46
7.	RECOMENDACIONES	47
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
9.	APÉNDICES.....	64





RESUMEN

En el presente estudio se establecieron las características de la actividad proteolítica intestinal, en insectos de la subfamilia Triatominae, pertenecientes al género *Belminus* (*B. ferroae*, *B. herreri* y *B. corredori*). Se determinó que el pH óptimo en las tres especies, bajo condiciones de alimentación de hematofagia y hemolinfagia es de 5.5, también se observó que de las tres especies alimentadas con hemolinfa *B. ferroae* fue quien obtuvo los valores más altos de actividad proteolítica medida sobre el sustrato azocaseína a pH 5.5 con una absorbancia de 0.393. Analizando el grupo alimentado con sangre *B. corredori* fue quien obtuvo la mayor hidrólisis de azocaseína en pH 5.5 con una DO de 0,0336. En los análisis de actividad proteolítica posingesta se concluye que los tiempos de digestión de sangre y hemolinfa son diferentes. En las tres especies alimentadas con hemolinfa se observa actividad proteolítica a partir del día 1 posingesta y el primer pico en el día 2, por el contrario, cuando las especies son alimentadas con sangre la hidrólisis de la azocaseína se hace notoria a partir del día 5 en *B. herreri* y el primer pico se observa en el día 7 tanto en *B. herreri* como en *B. ferroae*. Esto sugiere que la hemolinfa es mucho más sencilla de digerir por estas tres especies que la sangre. Por otra parte, se estableció que las proteasas presentes en el intestino de las tres especies de *Belminus* en las dos condiciones de alimentación son proteasas cisteínicas y aspárticas, para lo cual se utilizaron inhibidores específicos como N-Tosil-L-fenilalanil Clorometil cetona (TPCK), Tosil-Lisil-clorometil-cetona (TLCK), el Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), pepstatin A y Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidin butano) E-64. Estas enzimas son catalogadas como proteasas ácidas por su mejor acción a pH bajo, lo cual fue coherente con el pH óptimo de acción de la actividad proteolítica mostrado por estas especies (5.5). Por lo tanto, en este trabajo se reporta por primera vez en especies del género *Belminus* la presencia de proteasa cisteínicas y aspártica, resultado que coincide con previas caracterizaciones en otras especies de la subfamilia con comportamiento marcadamente hematófago. El conocimiento de algunos procesos fisiológicos relacionados con la digestión de estas dos dietas involucradas en la ruta de insectos predadores a hematófagos o viceversa, sin duda puede aportar en el entendimiento de la evolución de los Triatominae. Por otra parte, además de actuar las proteasas en procesos vitales como la digestión, también están implicadas en el desarrollo de huevos e inmunidad, en la capacidad vectora de agentes causantes de enfermedades, por esto las proteasas pueden ser un blanco interesante en el control de vectores.

Palabras clave: Triatominae, *Belminus*, actividad proteolítica, proteasas, inhibidores, pH.





CAPÍTULO I

1. TÍTULO

Caracterización del perfil de las proteasas intestinales de *Belminus hereri*, *Belminus ferroae* y *Belminus corredori* (Hemiptera: Triatominae) en condiciones de hemolinfagia y hematofagia.

1.1 Introducción

Los triatominos o insectos besadores (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) son insectos hemimetabólicos que se alimentan de sangre y se encuentran predominantemente en todo el continente americano (Brown et al., 2020). Estos insectos tienen gran importancia médica ya que son el principal vector de la enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis americana, que es una enfermedad potencialmente mortal causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad se encuentra principalmente en 21 países de América Latina, se estima que 8 millones de personas están infectadas en todo el mundo, principalmente en América Latina. La enfermedad de Chagas es clínicamente curable si el tratamiento se inicia en una etapa temprana. Por lo tanto, el acceso universal a un diagnóstico y atención rápida es esencial. Se estima que más de 10.000 personas mueren cada año por manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas, y más de 25 millones de personas corren el riesgo de contraer la enfermedad. (WHO, 2020).

Hasta la fecha se han descrito 154 especies de triatominos (151 especies vivas y tres fósiles) con 19 géneros y cinco tribus (Oliveira & Alevi, 2017; Dorn et al., 2018; Oliveira et al., 2018; Lima-Cordón et al., 2019; Nascimento et al., 2019; Poinar, 2019). Las especies pertenecientes al género *Belminus*, a diferencia de los demás grupos taxonómicos de Triatominae, parecen estar más adaptadas al consumo de fluidos corporales de artrópodos, y por consiguiente al empleo de hemolinfa como fuente de alimentación. Esto permite abrir un primer interrogante, el cual cuestiona, si las proteasas presentes en los intestinos de especies de este género son similares a las presentes en el intestino de las demás especies de Triatominae que son hematófagas. Bien cabe mencionar que el comportamiento alimentario de los *Belminus* ha sido utilizado por algunos autores como evidencia del origen polifilético de la subfamilia (Schofield & Galvão, 2009). Sin embargo, el origen de los Triatominae aún no ha sido completamente esclarecido, a pesar de los esfuerzos realizados por los diferentes autores en esclarecer las relaciones filogenéticas del grupo (Monteiro et al., 2018). El conocimiento de perfil de proteasas en especies de este género podría aportar elementos en esta discusión. Las proteasas son enzimas hidrolíticas y degradan proteínas en pequeños péptidos y aminoácidos. Las proteasas se encuentran ubicuamente en plantas, animales y microorganismos (Patel et al., 2020).

De igual manera, el peculiar comportamiento alimentario de estos pequeños triatominos, reviste particular interés, debido a que estas especies, aunque con una menor frecuencia, pueden también ejercer la hematofagia. Este amplio rango de alimentación abre la posibilidad de estudiar en un mismo sistema biológico la actividad proteolítica del intestino con distintas dietas (hemolinfa y sangre), lo cual no ha sido abordado hasta el momento en especie alguna de Triatominae. Un



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



estudio demográfico previo que se enfocó en el análisis de cohortes de *Belminus ferroae* alimentadas con las dos dietas, mostró un menor tiempo de desarrollo desde huevo a adulto, cuando esta especie fue alimentada con hemolinfa, y mayor cuando fue mantenida con sangre de roedor (Sandoval et al., 2013). Este resultado permite suponer que la dinámica de la digestión en la especie puede ser distinta y estar asociada con procesos adaptativos relacionados con la dieta. De igual manera diferencias en la dinámica de la actividad proteolítica entre especies del mismo género podrían ocurrir. Es importante recordar que los Triatominae pertenecen a la gran familia de Reduviidae que alberga insectos predadores (entomófagos); el conocimiento de algunos procesos fisiológicos relacionados con la digestión de estas dos dietas involucradas en la ruta de insectos predadores a hematófagos o viceversa, podría también aportar en el entendimiento de la evolución de los Triatominae.

1.2 Pregunta de investigación

¿Cómo es el patrón y cuáles son las proteasas implicadas en la actividad proteolítica del intestino de tres especies de *Belminus* en condiciones de hemolinfagia y hematofagia?

1.3 Planteamiento del problema

Hasta el momento se desconocen detalles sobre el proceso de digestión en especies del género *Belminus*. Por lo cual, es interesante determinar que proteasas participan en el proceso de digestión de las proteínas ingeridas, así como el rango de pH óptimo y el efecto de la alimentación sobre el tipo de proteasas presentes en el intestino. Observaciones en laboratorio y en campo de *B. peruvianus* y *B. herreri* han indicado una dieta basada en una amplia gama de huéspedes, incluyendo los artrópodos, reptiles, aves y mamíferos. Por otra parte, el comportamiento de alimentación de estas especies es variable e incluye la práctica de canibalismo, cleptohematofagia, hemolinfagia y hematofagia (Herrer et al., 1954, Gaunt & Miles 2000, Sandoval et al., 2000, 2004). Por esta razón, es valioso aclarar ¿cómo es el proceso digestivo?, y ¿qué proteasas están presentes en el intestino de *Belminus spp?*, mantenidos en el laboratorio en condiciones de hemolinfagia y hematofagia. Lo anterior nos conduciría a conocer más el género *Belminus*, aportar datos importantes sobre su evolución y origen y a tener un blanco perfecto para su control como posible vector de la enfermedad de Chagas.

1.4 Justificación

Una de las principales características biológicas de los triatominos es su condición de hematófagos obligados, lo que implica que dependen de la sangre de vertebrados para completar su ciclo de vida (Lent & Wygodzinsky, 1979). Sin embargo, un reciente estudio demostró por primera vez que *Belminus ferroae* que es una especie de Triatominae, puede concluir con éxito (mayor capacidad biológica), su ciclo de vida a expensa de hemolinfa de cucaracha (Sandoval et al., 2013). En esa misma especie se también se evidenció, a través de un estudio de la ingesta sanguínea, y un estudio morfométrico entre los parentales y su progenie, que la dieta de los



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



insectos colectados dentro de domicilios principalmente se componía de cucarachas y no de hospedadores vertebrados (Sandoval et al., 2010, 2015).

A estas observaciones, se suman previos trabajos de campo y de laboratorio en especies como *Belminus peruvianus* y *Belminus herreri*, en donde, se venía señalando que la dieta de estos triatomíneos contenía una amplia gama de hospedadores, entre los cuales se incluyen: artrópodos, reptiles, aves y mamíferos. Aunado a la heterogeneidad de hospedadores, los comportamientos documentados para estas especies han sido variables, y se ha observado el canibalismo, la cleptohematofagia, la hemolinfagia y la hematofagia (Herrer et al., 1954, Gaunt & Miles 2000, Sandoval et al., 2000, 2004). El estudio de la dinámica de la actividad proteolítica en este género de Triatominae y el perfil de proteasas relacionado con dos fuentes tan disímiles de alimentación, puede proporcionar nuevos conocimientos sobre la ecología evolutiva de los triatomíneos.

En el Suborden Heteróptera se han descrito tanto proteasas alcalinas como ácidas, involucradas en la digestión en el intestino medio, pero con un predominio de las proteasas ácidas como las citrónicas y aspárticas (Goodchild, 1952; Hori, 1970; Takanona & Hori, 1974; Cohen, 1993; Houseman, 1978; Houseman & Downe 1982a, 1983; Houseman et al. 1984; Silva & Terra, 1994; Terra, 1988; Terra & Ferreira, 1994). Los Hemíptera desarrollaron un sistema digestivo basado en proteasas cisteínicas, con actividad máxima en condiciones ácidas (Terra et al., 1996; López-Ordoñez et al., 2001.; Foissac et al., 2002). En el intestino de triatomíneos se han caracterizado en mayor medida proteasas ácidas como las catepsinas B, L (proteasas cisteínicas) y catepsina D (proteasa aspartática), pero también se han descrito aminopeptidasas y carboxipeptidasas A, B (metalocarboxipeptidasas) y carboxipeptidasa D (Carboxipeptidasa serínica), (García & García, 1977; Houseman, 1978; Houseman & Downe, 1980, 1981a, b, 1983a; López-Ordoñez et al., 2001, Kollien et al., 2004, Waniek et al., 2014). Por lo tanto, el presente estudio se propone determinar el patrón de la actividad proteolítica en condiciones de hematofagia y hemolinfagia, y comprobar si el patrón de proteasas intestinales en estas especies es similar al de los demás triatomíneos en cuanto a la presencia de proteasas cisteínicas y aspárticas, a pesar de su distintivo comportamiento alimentario o si por el contrario contienen en su intestino proteasas serínicas o metaloproteasas descritas en procesos digestivos de garrapatas y dípteros.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Determinar la actividad proteolítica en el intestino de tres especies de *Belminus sp* (*B. herreri*, *B. corredori* y *B. ferroae*) bajo condiciones de hematofagia y hemolinfagia.

1.5.2 Objetivos específicos

Determinar el pH de mayor actividad proteolítica en el intestino de tres especies de *Belminus*.

Establecer la actividad proteolítica del intestino de tres especies *Belminus* medida en diferentes tiempos pos ingesta.

Caracterizar el perfil de proteasas presente en el intestino de tres especies de *Belminus* utilizando los inhibidores específicos (E64, TPCK, TLCK, pepstatin A, PMSF y EDTA).



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



CAPÍTULO II

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 Triatominos

Una de las principales características biológica de los triatominos es su condición de hematófago obligado: dependen de la sangre de vertebrados para completar su ciclo de vida (Lent & Wygodzinsky, 1979). La mayoría de los triatominos pueden alimentarse de sangre de una amplia variedad de animales vertebrados, tanto salvajes como domésticos. Esta flexibilidad les permite explorar y explotar diferentes hábitats y contribuye a mantener los ciclos de infección con *T. cruzi* en ambos ecotopos (Gorchakov et al., 2016). El género *Belminus* pertenece a esta subfamilia y se compone de ocho especies: *Belminus rugulosus* (Stål, 1859), *Belminus costaricensis* (Herrer, Lent & Wygodzinsky, 1954), *Belminus peruvianus* (Herrer, Lent & Wygodzinsky, 1954), *Belminus herreri* (Lent & Wygodzinsky, 1979), *Belminus pittieri* (Osuna & Ayala, 1993), *Belminus laportei* (Lent, Jurberg & Carcavallo, 1995), *Belminus corredori* (Galvão & Angulo, 2006) y *Belminus ferroae* (Sandoval et al., 2007). El área de distribución geográfica de estas especies incluye los territorios de México, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Perú y Brasil (Sandoval et al., 2007).

A excepción de algunas especies pertenecientes al género *Belminus* (figura 1), todos los miembros de Triatominae son hematófagos que viven en asociación con sus hospedadores vertebrados, bien sea en hábitats silvestres como palmas, nidos de aves, madrigueras de roedores, cuevas, o en el hábitat doméstico y peridoméstico (Lent & Wygodzinsky 1979; Sandoval et al., 2013). Algunas especies ocupan diversos ecotopos y se alimentan de diferentes hospedadores (Carcavallo et al., 1998), estudios de campo y de laboratorio han demostrado que el género *Belminus* se puede alimentar de artrópodos, reptiles, aves y mamíferos con comportamientos tan variados como canibalismo, cleptohematofagia, hemolinfagia y hematofagia (Herrer et al., 1954, Gaunt & Miles 2000, Sandoval et al., 2000, 2004), específicamente *B. ferroae* parece estar más adaptado a alimentarse de hemolinfa debido a que su ciclo de vida presenta mejores parámetros reproductivos comparado con ingesta de sangre y predación de otro triatomino, además análisis de su contenido intestinal en especímenes colectados en domicilios demuestran su predilección por la hemolinfa de cucaracha (Sandoval et al., 2010, 2013), No obstante, especializaciones por huésped pueden ser observadas en otras especies de Triatominae, tal como ocurre en el género *Psammolestes* cuyos miembros están asociados a aves de la familia Furnariidae o *Triatoma delpontei* (Romaña & Abalos) que está asociada a la especie de loros psitácidos *Myiopsitta monachus* (Boddaert) (Salvatella et al., 1993). Otros ejemplos son *Triatoma rubrofasciata* (De Geer) y *Cavernicola pilosa* (Barber), especies que se alimentan preferentemente de roedores y murciélagos respectivamente (Lent & Wygodzinsky, 1979; Noireau & Dujardin, 2010).

El género *Belminus* es considerado de hábito selvático y se encuentra principalmente en asociación con bromelias, corteza de árboles y árboles huecos. También se encuentra asociado



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750

a madrigueras de mamíferos (zarigüeyas) y reptiles; mientras que es raro encontrarlos en domicilios o peridomicilios del hábitat humano (Lent & Wygodzinsky, 1979; Gaunt & Miles, 2000). Sin embargo, casos de domiciliación en Perú y Colombia se han reportado (Herrer, 1955; Sandoval et al., 2010).

En la literatura, no existen estudios previos a cerca de la actividad proteolítica en el intestino de especies del género *Belminus*, y es fundamental conocer este aspecto de la digestión para aportar elementos sobre el proceso adaptativo de estas especies a sus hospedadores. Esta información puede ser importante para un efectivo control de los insectos y además proporcionar nuevos datos sobre la ecología evolutiva de los triatominos.

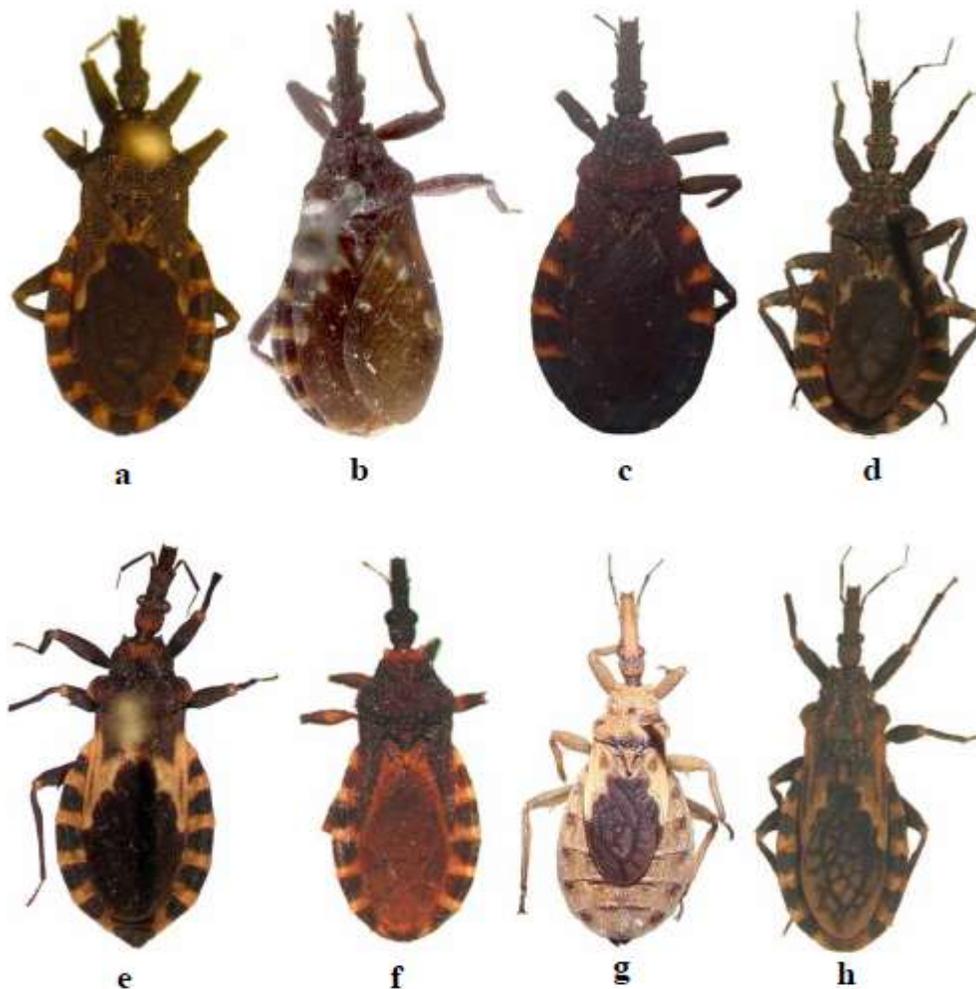


Figura 1. Especies del género *Belminus* en su etapa adulta. (a). *B. rugulosus*, (b). *B. costaricensis*, (c). *B. peruvianus*, (d). *B. herreri*, (e). *B. pittieri*, (f). *B. laportei*, (g). *B. corredori*, (h). *B. ferroae*. Fuente: (Sandoval et al., 2007).



TABLA 1. Clasificación taxonómica del género *Belminus*

<i>Belminus ferroae, Belminus herreri, Belminus corredori</i>	
Reino	Animalia
Filo	Artrópoda
Clase	Insecta
Orden	Hemíptera
suborden	Heteróptera
Infraorden	Cimicomorfa
Superfamilia	Reduivioidea
Familia	Reduviidae
Subfamilia	Triatominae
Género	Belminus

Fuente: Elaboración propia.

2.2 Sangre

La sangre es un tipo de tejido conjuntivo especializado, está compuesta por el plasma y las células sanguíneas donde encontramos glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. El plasma es la parte líquida de la sangre y se encuentra formada por aproximadamente 80% de agua, 15-20% de proteínas y 1% de sales, gases disueltos, glucosa, entre otros componentes. La albumina (60% de las proteínas del plasma), es la proteína más importante del plasma, es producida por el hígado, su función es mantener la presión coloidosmótica del plasma, es decir mantener el líquido dentro de los vasos sanguíneos, otra función es transportar sustancias a través del organismo, incluso de medicamentos para su distribución en diferentes órganos. Las globulinas (36% de proteínas del plasma), también son producidas por el hígado, excepto las g que son los anticuerpos, que son producidas por las células plasmáticas, las globulinas a y b se encargan del transporte de iones metálicos, vitaminas liposolubles y lípidos unidos a proteínas, otras proteínas presentes en el plasma son los factores de coagulación, las proteínas de complemento y las lipoproteínas. (González, 2010).

Se han realizado varios ensayos para determinar la composición de la sangre, donde la mayoría de constituyentes son razonablemente uniformes para los huéspedes animales de insectos, las proteínas son lejos el mayor nutriente de la sangre (Lehane, 2005), se ha reportado un porcentaje de agua del 80 en humanos, 81 en vacas y 87 en gallinas, también se estableció la cantidad de proteína presente con un 20 % en humanos, los carbohidratos son mucho más escasos con un hallazgo de 0,088 % en el hombre, 0,046% en vacas y 0.17% en gallinas, los lípidos también se encuentran en baja proporción con un 0,652% encontrado en el hombre (Albrinton, 1952; Almant & Dittmer, 1971).





2.3 Hemolinfa

La hemolinfa circula alrededor del cuerpo de los insectos, bañando directamente los tejidos, consiste en fluido plasmático en el cual las células conocidas como hemocitos están suspendidas. El plasma tiene la función de mantenimiento de los tejidos en todo el cuerpo y contiene muchos químicos (Chapman, 1998). La hemolinfa ha sido reconocida durante mucho tiempo como un mediador clave de la homeostasis nutricional e inmunológica en los insectos, con el entendimiento tácito de que la hemolinfa es un ambiente hostil para los microorganismos, y microbiológicamente estéril en insectos sanos (Blow & Douglas, 2019). Los principales componentes de la hemolinfa son agua, constituyentes inorgánicos, carbohidratos, lípidos, aminoácidos y proteínas.

La hemolinfa tiene un 90% de agua y un 10% de sólidos (Buck, 1953). Este gran porcentaje de agua se debe a que una importante función de la hemolinfa es ser un reservorio de agua para sostener los niveles de agua en los tejidos, por ejemplo, en *Onymachus* el agua de los tejidos no cambia como consecuencia de la desecación, aunque el volumen de hemolinfa caiga drásticamente. (Chapman, 1998).

El componente inorgánico más abundante en la hemolinfa es el anión cloruro, está presente en grandes concentraciones en Apterygota y hemimetábolos, pero es bajo en holometábolos, otros aniones inorgánicos presentes en la hemolinfa son el carbonato y el fosfato. El catión más abundante es el sodio, aunque su cantidad varía de acuerdo a la filogenia del insecto y su dieta. Muchos insectos fitófagos tienen altas concentraciones de potasio y magnesio y bajas concentraciones de sodio comparados con otros insectos que tienen otros hábitos alimenticios. En hemíptera se han reportado 139 y 9 miliequivalentes/L para sodio y potasio respectivamente.

El principal carbohidrato en la hemolinfa de la gran mayoría de insectos es la trehalosa, en concentraciones de 4-20 mg/ml, en *R. americana* se determinó una concentración de 140 mg/100 ml; la glucosa también está presente en la hemolinfa en concentraciones menores a la trehalosa, pero altos niveles se han reportado en *Apis* y *Phormia*, en *Bombyx mori* se encontró un máximo de glucosa de 5.2 mg/ 100 ml; en *R. americana* se reportaron 201 mg/100 ml de carbohidratos totales, en *B. mori* se estableció una máxima concentración de carbohidratos totales de 650 mg/ 100 ml (Wyatt, 1961; Florkin & Jeuniaux, 1964, Terra et al., 1974; Chapman, 1998).

La concentración de lípidos en la hemolinfa generalmente varía entre 1 a 5 mg/ml pero valores cercanos a 15 mg/ml son alcanzados en insectos como *Lacusta* y *Manduca*, quienes usan estos lípidos como combustible durante el vuelo, en *R. americana* se reportaron niveles de 520 mg/100 ml muy similar al encontrado en la hemolinfa de otras larvas de insectos (Buck, 1953; Wyatt, 1961; Terra et al. 1974; Chapman, 1998).

La hemolinfa de insectos contiene muchas proteínas con variedad de funciones. Los niveles de proteína en la hemolinfa insectos varían de acuerdo a la etapa de desarrollo y a la especie, pero picos de concentración de proteínas se han encontrado en etapas larvales de Lepidoptera y Diptera pudiendo alcanzar 100 y 200 mg/ml respectivamente (Chapman, 1998) otros ejemplos son los reportados en *B. mori* donde el máximo nivel de proteína reportado fue de 5.3 % para un quinto estadio tardío, muy diferente al 1,2 % reportado para un tercer estadio temprano (Wyatt et al., 1956) y en *R. americana* se determinó un nivel de proteína de 6.9% en una larva madura (Terra et al., 1974). Las proteínas usualmente son clasificadas de acuerdo a su función, de acuerdo a esta clasificación tenemos proteínas de almacenamiento, transportadoras de lípidos,



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



enzimas e inhibidores de proteasas. Las proteínas de almacenamiento han sido estudiadas en Lepidóptera y Díptera, estas proteínas tienen seis subunidades y por esta razón son llamadas hexamerinas, las proteínas transportadoras de lípidos como su nombre lo indica transportan lípidos debido a que estos son insolubles en agua, entonces son transportados a través de la hemolinfa envueltos en combinación con proteínas en forma de lipoproteínas, en insectos las lipoproteínas tienen una clasificación muy sencilla y son llamadas lipoforinas, los mayores componentes lípidicos de las lipoforinas son los diacilglicérols y los fosfolípidos. Se han reportado varias enzimas presentes en la hemolinfa entre ellas la trehalasa reportada en *Periplaneta*, *Lacusta* y *Phormia*, su función probablemente es regular los niveles de trehalosa en la hemolinfa, la fenoloxidasa fue reportada en *Bombyx* y es catalogada como una proenzima, la cual es activada por péptidos de enzimas mediante una serie de reacciones enzimáticas, otra enzima reportada son las esterases y una de sus funciones es regular los niveles de hormonas juveniles. Los inhibidores de proteasas están presentes por lo menos en algunos insectos, su función más aceptada es la regulación de las enzimas de la hemolinfa, por ejemplo, en *Manduca* los inhibidores de proteasas son conocidos por inhibir la activación de la proenzima fenoloxidasa (Chapman, 1998).

El plasma de la hemolinfa se caracteriza por tener altos niveles de aminoácidos libres, en endopterigotes es mayor a 6 mg/ml pero es menor en exopterigotes a los cuales pertenecen los hemípteros. La concentración de aminoácidos en la hemolinfa de insectos puede cambiar en las diferentes etapas del ciclo de vida, esta concentración probablemente se incrementa en muchos insectos después de la alimentación, en *Locusta*, la concentración retorna a sus niveles normales después de una hora, pero en *Rhodnius* alimentado una vez en cada etapa de desarrollo los niveles de aminoácidos permanecen constantes en el periodo de muda, esto parece ser por la lenta y continua digestión de la sangre ingerida (Chapman, 1998).

2.4 Proteasas

Las proteasas denominadas también como peptidasas, enzimas proteolíticas, péptido hidrolasas o proteinasas, agrupan un conjunto de enzimas estructural y funcionalmente diversas. Estas enzimas tienen la habilidad común de catalizar la escisión de los enlaces peptídicos e iso-peptídicos de proteínas y fragmentos de proteínas en proceso denominado proteólisis (Rawlings et al., 1998). Las proteasas se pueden clasificar en endopeptidasas o exopeptidasas en función de la localización del sitio de catálisis del enlace peptídico en la propia proteína. Endopeptidasas son aquellas proteasas capaces de hidrolizar a nivel de proteínas enlaces peptídicos internos. Las exopeptidasas a su vez se clasifican en aminopeptidasas, cuando la hidrólisis del enlace peptídico ocurre en el extremo amino terminal, o en carboxipeptidasas cuando se produce en el extremo carboxilo terminal (van der Hoorn, 2008; Vaseva et al., 2012). Las cinco familias principales de proteasas son serínicas (S), cisteínicas (C), treonínicas (T), aspárticas (A) y metalo- (M) (Deu et al., 2012). Quien establece la clasificación y nomenclatura de las proteasas es el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB).





Tabla 2. Clasificación y nomenclatura de proteasas según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB).

Sitio de acción en la cadena polipeptídica	Código sub-sub clase (NC-IUBMB)	Nombre
Exopeptidasa	EC 3.4.11	Aminopeptidasas
Exopeptidasa	EC 3.4.13	Dipeptidasas
Exopeptidasa	EC 3.4.14	Dipeptidil-peptidasas y tripeptidil-peptidasas
Exopeptidasa	EC 3.4.15	Peptidil-dipeptidasas
Exopeptidasa	EC 3.4.16	Serín-carboxidasas
Exopeptidasa	EC 3.4.17	Metalo-carboxidasas
Exopeptidasa	EC 3.4.18	Cisteín-carboxipeptidasas
Exopeptidasa	EC 3.4.19	Omega peptidasas
Endopeptidasa	EC 3.4.21	Serín-endopeptidasas
Endopeptidasa	EC 3.4.22	Cisteín-endopeptidasas
Endopeptidasa	EC 3.4.23	Aspártico-endopeptidasas
Endopeptidasa	EC 3.4.24	Metalo-endopeptidasas
Endopeptidasa	EC 3.4.25	Treonín-endopeptidasas
Endopeptidasa	EC 3.4.99	Mecanismo desconocido

<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC34/> (NC-IUBMB, 2020).

2.4.1 Endopeptidasas

Las principales endopeptidasas en la mayoría de los insectos son las proteasas serínicas, donde encontramos las proteasas tipo tripsina y quimotripsina, que tienen serina en su sitio activo. La tripsina rompe las uniones peptídicas que involucra los grupos carboxilos residuales de arginina y lisina. La quimotripsina es menos específica, rompiendo uniones que involucran el grupo carboxilo preferiblemente de la tirosina, fenilalanina y el triptófano, y más lentamente uniones que involucran a otros aminoácidos residuales. Usualmente ambos tipos de enzimas están presentes en muchos insectos que poseen proteasas serínicas. Sin embargo, en la mayoría de Coleóptera y succionadores de sangre pertenecientes al Orden Hemíptera, la mayoría de endopeptidasas tienen en su sitio activo cisteína o ácido aspártico y ellas son llamadas catepsinas (Murdock et al., 1987). Otro grupo de endopeptidasas son las metaloproteinasas que están presentes en todos los reinos de organismos vivos; son ubicuos y están ampliamente involucrados en la regulación del metabolismo a través de su capacidad de degradar ampliamente las proteínas o de hidrolizar selectivamente enlaces peptídicos específicos, aunque no han sido descritos aún en triatominos. Deben someterse a un control espacial y temporal estricto para evitar que este vasto potencial se vuelva destructivo. Estas enzimas dependen principalmente del zinc y la mayoría de ellas, llamadas zincinas, poseen una secuencia consenso corta, HEXXH, con las dos histidinas actuando como ligandos del zinc catalítico y el glutamato como base general. Una subclase de las zincinas se caracteriza por un motivo alargado C-terminal, HEXXHXXGXXH / D, con una glicina adicional estrictamente conservada y una tercera histidina o aspartato de unión a zinc (Gomis, 2003).





2.4.2 Exopeptidasas

Las exopeptidasas se dividen en dos categorías: carboxipeptidasas que atacan péptidos con terminal -COOH y aminopeptidasas que atacan la cadena terminal -NH₂. (Chapman, 1998).

Carboxipeptidasas

Las carboxipeptidasas hidrolizan residuos individuales del extremo C-terminal de los péptidos o proteínas, y se clasifican de acuerdo con su mecanismo catalítico (NC-IUBMB, 2020). Las carboxipeptidasas serínicas, incluidas las carboxipeptidasas C y D contienen una tríada catalítica compuesta de residuos Ser, Asp y His y están afectadas por inhibidores TLCK (*N*-α-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone o *N*-α-tosil-L-lisina clorometilcetona) o PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride o Fluoruro de fenil metil sulfonilo). Carboxipeptidasas Cisteínicas incluye sólo la catepsina X que es inhibida por E-64, leupeptina y antipaína, como miembro de la familia de las proteasas de papaína, es posiblemente activada por agentes reductores como el ditiotreitól (TDT) o beta-mercaptoetanol e inactivado por el ácido yodo acético (IAA) o tetracionato. Las metalocarboxipeptidasas, incluidas las carboxipeptidasas A y B y otras, poseen un ion zinc en su región catalítica y, por lo tanto, su actividad es inhibida por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) u otros agentes quelantes (Rawlings et al. 2010). Las carboxipeptidasas también muestran diferentes especificidades de sustrato, especialmente en relación con el residuo en el extremo C-terminal del sustrato P1' numeración de Schechter y Berger, 1967. Las carboxipeptidasas A y C prefieren péptidos con residuos hidrófobos (como Phe o Tyr) en P1' y carboxipeptidasas B y D prefieren sustratos con residuos básicos (Arg o Lys), en esta posición Catepsina X tiene amplia especificidad de sustrato, pero carece de acción sobre la prolina C-terminal. (Waniek et al., 2014).

Las carboxipeptidasas que participan en el proceso de digestión descrito en los insectos son principalmente metalocarboxipeptidasas, caracterizadas con frecuencia como la carboxipeptidasa A. Hay algunos ejemplos de enzimas carboxipeptidasa del tipo B, pero parecen ser menos activos y no está bien descrito (Terra & Ferreira, 1994, 2005). En triatomíneos, las enzimas digestivas de *R. prolixus* (García & Guimarães, 1979; Houseman & Downe, 1981a, 1983) y *T. p. pallidipennis* (Houseman & Downe, 1981b) fueron parcialmente caracterizadas y clasificadas inicialmente como carboxipeptidasa A o B. Terra y Ferreira (1994) consideran estas enzimas como carboxipeptidasas cisteínicas, ya que fueron activados por TDT, inhibida por IAA y no afectado por EDTA.

Aminopeptidasas

Las aminopeptidasas pertenecen a la familia de las exoproteasas, que pueden catalizar la división del enlace peptídico que conecta el aminoácido N-terminal con el penúltimo residuo en una proteína. Las aminopeptidasas catalizan el proceso de eliminación de los aminoácidos N-terminal de los sustratos objetivo mediante la escisión secuencial de un residuo de aminoácido a la vez. Las aminopeptidasas se usan ampliamente para la síntesis de biopéptidos y aminoácidos. Estas enzimas son capaces de hidrolizar compuestos organofosforados, por lo que tienen importancia



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



biológica y ambiental (Nandan & Madhavan, 2020). Ejemplos de aminopeptidasas son aminopeptidasa leucilica, tripeptídica, aspartílica, B, Y, S, y E (NC-IUBMB, 2020).

2.4.3 Proteasas en la digestión de insectos del orden Hemiptera

Diversas proteasas están involucradas en la digestión de proteínas sanguíneas como un medio para obtener la energía necesaria para los procesos biológicos vitales, garantizando la supervivencia, el desarrollo biológico y la reproducción de los artrópodos hematófagos (Sojka et al., 2013).

La digestión de proteínas en insectos incluye endopeptidasas que atacan los enlaces peptídicos en la molécula de proteína y exopeptidasas que remueven el aminoácido terminal de la molécula. Dentro de esta categoría general, las enzimas son clasificadas de acuerdo a la naturaleza de su sitio activo y al sitio donde ellas rompen la molécula de proteína (Chapman, 1998).

Otra forma de clasificar las proteasas es de acuerdo al pH óptimo de acción, de esta manera se clasifican en ácidas y alcalinas. Dentro de las proteasas ácidas encontramos las proteasas cisteínicas (catepsina B) y aspárticas (catepsina D) y dentro de las proteasas alcalinas las serínicas (tripsina y quimotripsina).

Tanto proteasas alcalinas (Goodchild, 1952; Hori, 1970; Takanona & Hori, 1974; Cohen, 1993) como proteasas ácidas (Houseman, 1978; Houseman & Downe 1982a, 1983; Houseman et al., 1984; Silva & Terra, 1994; Terra, 1988; Cohen, 1993), se han detectado en el intestino medio de los insectos del Suborden Heteróptera. Sin embargo, se considera que en este grupo las proteasas cisteínicas y aspárticas están presentes con mayor frecuencia (Terra & Ferreira, 1994).

La evidencia que apoya el predominio de las proteasas ácidas incluye la naturaleza ácida de los intestinos de insectos dentro de los heterópteros (Terra & Ferreira, 1994), que es más adecuado para proteasas cisteínicas y aspárticas que para las proteasas serínicas (Colebatch et al., 2001). Además, la actividad de la proteasa cisteínica, caracterizada como catepsina B, se ha observado en los intestinos de los insectos pertenecientes a cuatro familias Heteróptera (Houseman, 1978; Houseman & Downe, 1982b; Houseman et al., 1984, 1985), y proteasas aspárticas, caracterizadas como catepsina D, se han encontrado en los intestinos de los insectos de siete familias Heteróptera (Houseman & Downe 1982a, 1983).

El predominio de las proteasas ácidas en los intestinos de insectos dentro del Suborden Heteróptera contrasta con las proteasas serínicas, por lo general similares a la tripsina, que se encuentra en los intestinos de la mayoría de los otros grupos de insectos. Como una explicación, se ha propuesto que los hemípteros ancestrales perdieron la actividad de las proteasas serínicas en el intestino, debido a los bajos niveles de proteína en la dieta de los fitófagos (Houseman & Downe, 1983). A partir de estos ancestros surgieron los Heteróptera, que eran principalmente predadores (Goodchild, 1966; Cobben, 1978). Houseman y Downe (1983) sugieren que, al regresar a una dieta predatora, alta en proteínas, los heterópteros se adaptaron mediante la secreción previa de proteasas lisosomales en el intestino medio para completar la digestión de proteínas.





Las adaptaciones de los insectos hemípteros hematófagos exhiben una fisiología digestiva diferente de las de otros órdenes de insectos hematófagos. A diferencia de dípteros y anopluros (piojos), la digestión de la sangre en triatominos se produce en el transcurso de varios días (Lehane, 1991). Los mosquitos y piojos poseen proteasas serínicas, mientras los triatominos utilizan las proteasas cisteínicas y aspárticas (Lehane, 1994). El valor de pH del lumen del intestino medio de los mosquitos y piojos es alcalino; el lumen del intestino medio de los triatominos suele ser ácido (Schaub, 2009).

Las proteasas ácidas como la catepsina B, L y D, carboxipeptidasas A y B (metalocarboxipeptidasas), carboxipeptidas D (carboxipeptidasa serínica), carboxipeptidasas lisosomales (catepsina X o catepsina B₂) y aminopeptidasas se han caracterizado en el intestino delgado de *R. prolixus*, *Triatoma pallidipennis* y *T. infestans* por técnicas bioquímicas, utilizando sustratos sintéticos e inhibidores específicos y por secuenciación de cDNA (García & García, 1977; Houseman, 1978; Houseman & Downe, 1980, 1981a, b, 1983a; Terra y Ferreira, 1994, 2005 Kollien et al., 2004, Waniek et al., 2012, 2014).

Los insectos del Orden Hemiptera desarrollaron un sistema digestivo basado en proteasas cisteínicas, con actividad máxima en condiciones ácidas (Terra et al., 1996; López-Ordoñez et al., 2001.; Foissac et al., 2002). Los Reduviidae evolucionaron a partir de hemípteros chupadores de plantas. Probablemente, durante el proceso adaptativo perdieron la capacidad de sintetizar proteasas como la tripsina en el intestino medio. Es ampliamente conocido que, durante la digestión, en el intestino de los triatominos se activan principalmente proteasas ácidas como la catepsinas (García & García, 1977; Schofield, 1996). Sin embargo, en otros órganos, por ejemplo, las glándulas salivales, los triatominos sintetizan proteasas serínicas alcalinas (Amino et al., 2001; Meiser et al., 2010).

2.5 Intestino y digestión de la sangre en triatominos

2.5.1 Tracto intestinal y valores de pH

El tracto intestinal de los triatominos es un tubo relativamente simple y no contiene divertículos como otros insectos. El intestino anterior en la cabeza y el tórax se modifica como una fuerte bomba cibarial y faríngea, responsable de la ingestión de sangre y la liberación de saliva, y termina en el esófago (Wenk et al., 2010). El intestino anterior está cubierto por una cutícula, de este modo, el intestino medio se separa claramente, comenzando con un cardia corto, seguido de un estómago fuertemente distensible y el intestino delgado. Una región central estrecha subdivide el intestino delgado en el intestino delgado anterior, medio y posterior. En el borde del intestino posterior, en una región corta del píloro / íleon, terminan los túbulos de Malpighian. La mayor parte del intestino posterior forrado con cutícula es el recto en forma de saco (Balczun et al., 2012b). (Figura 2).



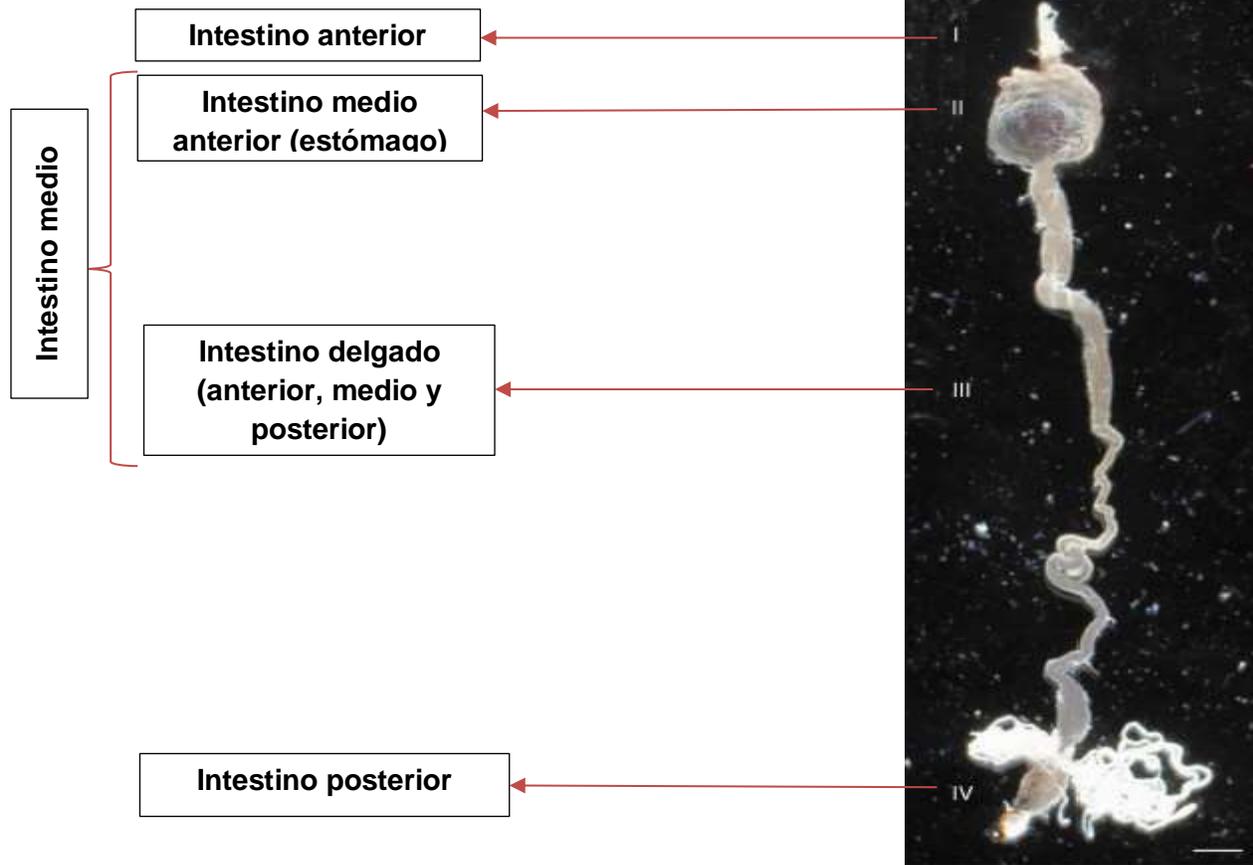


Figura 2. Regiones del tracto digestivo de triatominos. Escala ---- 2mm. (Kollien & Schaub 2000).

La digestión de la sangre en triatominos es excepcional ya que usan proteasas similares a catepsinas activas a un pH ácido (Lehane, 1991), y en una caracterización de catepsina D, la hidrólisis máxima de hemoglobina ocurrió a pH 2.8 (Houseman y Downe 1982a). Sin embargo, al usar soluciones indicadoras universales, el estómago y el intestino delgado de *R. prolixus* poseían variaciones dependientes de la alimentación entre pH 5.5 y 7.4 (Balczun et al., 2012b). En las ninfas de *T. brasiliensis* de quinto estadio no alimentadas, el valor del pH del estómago y el intestino delgado era de aproximadamente 7 y 5,5, respectivamente, con un límite agudo entre los diferentes tejidos (Waniek et al., 2012). Usando microelectrodos, el valor de pH en la luz de *T. brasiliensis* fue de 7.16 a las 2 h después de la alimentación de sangre y permaneció a este nivel durante 24 h (7.02) (Barros et al., 2009). En una investigación más exhaustiva, los valores de pH del estómago y las tres secciones morfológicamente distinguibles del intestino delgado de *Triatoma infestans* se determinaron por separado mediante microelectrodos hasta 20 días después de la alimentación. En las ninfas de quinto estadio no alimentadas, los valores de pH fueron aproximadamente 6.3 para el estómago y la región posterior del intestino delgado y 6.7 y 6.6 para la región anterior y media del intestino delgado, respectivamente (Balczun et al., 2012a). Inmediatamente después de la alimentación, el valor del pH del estómago aumentó hasta pH 7,4, probablemente debido a la sangre ingerida, y alcanzó su valor inicial, 1 día después de la alimentación. Los contenidos del estómago y las diferentes regiones del intestino delgado se



acidificaron continuamente hasta 8 y 10 días después de la alimentación, alcanzando valores mínimos de aproximadamente pH 5.2. Después de 15 días después de la alimentación, los valores de pH del estómago y el contenido del intestino delgado aumentaron, pero a los 20 días después de la alimentación, estaban considerablemente por debajo de los valores de los insectos no alimentados (Balczun et al., 2012b). Por otra parte, un hallazgo que demuestra la importancia de conocer el intestino de los triatominos y sus componentes es la presencia de quitina en intestino de *R. prolixus*, que tiene la función de proteger el intestino del insecto frente al daño mecánico y de patógenos, esta quitina está presente en PMM (membrana perimicrovillar), esta membrana juega un rol en la interacción entre *T. cruzi* y el epitelio intestinal, que facilita la replicación de los protozoos. Cuando la PMM es atacada y modificada por drogas u hormonas, el desarrollo de los protozoarios es inhibido. La presencia de quitina en el intestino medio de *R. prolixus* pueden sugerir un blanco para controlar los vectores de la enfermedad de Chagas (Burgos et al., 1989; Gonzalez et al., 1998; Gonzalez et al., 1999; Isola et al., 1986, 1981; Kollien et al., 1998; Nogueira et al., 1997, Alvarenga et al., 2015).

2.5.2 Digestión de la sangre en triatominos y su interacción con *T. cruzi*

En hábitats domésticos o peridomésticos, los triatominos pueden alimentarse de perros, gallinas, gatos y humanos (Castillo et al., 2015) e incluso de otros insectos (Sandoval et al., 2004). Sin embargo, la preferencia por un recurso específico puede influir en la dinámica de la enfermedad de Chagas y la interacción con *T. cruzi*. En este sentido, los ciclos de transmisión de *T. cruzi* podrían depender del tipo de fuente de alimentación (Jansen et al., 2017). Por ejemplo, la prevalencia de la enfermedad de Chagas cae en sitios donde los insectos se alimentan solo de sangre de aves (Quintal & Polanco, 1977; Christensen et al., 1988). En un estudio de laboratorio se estimó que *T. cruzi* no era tan letal para ratones, cuando el vector *Triatoma dimidiata* Latreille era alimentado con sangre de ave. (Calderón et al. 2003). Esto sugiere que en los triatominos con comportamiento ornitófilico, esta fuente de ingesta podría regular la virulencia del protozoo (De fuentes-Vicente, et al., 2018), pero cabe aclarar que la sangre de ave no detiene la proliferación de *T. cruzi* en el tracto digestivo de los triatominos, pero si puede reducir en gran medida la prevalencia de la enfermedad de Chagas en humanos (Calderón et al., 2003).

Inmediatamente después de la ingestión, la sangre es concentrada mediante la extracción de iones y agua (Schaub, 2008). Los principales ingredientes de la sangre como fuente de alimento son las proteínas derivadas del plasma y de los eritrocitos. Las proteínas de la sangre pasan al estómago de las triatominos esencialmente sin digerir, mientras que las glucosidasas, las fosfatasas alcalinas y ácidas, las sialidasas, las lipasas y las amilasas (derivadas de los simbioses) actúan sobre sus respectivas moléculas diana en la sangre (Schaub et al., 2011). Solo se encontró una ligera actividad de aminopeptidasa en el estómago que es mucho más débil en el intestino delgado (Kollien & Schaub, 2000). Al igual que en el estómago, también las glucosidasas, las fosfatasas alcalinas y ácidas, las lipasas y las amilasas (derivadas de simbioses) están activas en el intestino delgado (Balczun et al., 2012b). (Tabla 3).

En todos los estadios de ninfas y adultos, la sangre se procesa por lisis de los eritrocitos (Azambuja et al., 1983). Esta actividad hemolítica en el estómago es más alta de 2 a 4 días después de la alimentación. Los eritrocitos de diferentes fuentes de sangre se lisan eficientemente por el contenido estomacal de *Rhodnius prolixus*, lo que ilustra un mecanismo de



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



lisis similar para un amplio espectro de huéspedes (Azambuja et al., 1983). La mayor tasa de hemólisis fue inducida por la alimentación con sangre completa, mientras que se observaron actividades similares, pero considerablemente menores al alimentar con hemoglobina pura o eritrocitos. Después de la purificación parcial y la caracterización bioquímica, el factor hemolítico de *R. prolixus* se clasificó como un péptido básico que se libera a la luz del estómago y se activa al ingerir sangre. Esta actividad hemolítica está restringida a la luz (lumen) del estómago y no está asociada con el tejido de la pared del estómago o el intestino delgado (Balczun et al., 2012b).

Por el contrario, la actividad proteolítica solo se encontró en el intestino delgado después de un transporte de pequeñas porciones de sangre. Usando azocaseína como sustrato, no se detectó actividad en el estómago de *R. prolixus* (Azambuja et al., 1983). Sin embargo, las altas tasas de expresión de genes similares a la catepsina, sugeridos para codificar enzimas digestivas, también son evidentes en el tejido del estómago (Balczun et al., 2012a). Además, el pH en la luz del intestino nunca poseía condiciones ácidas que fueran óptimas para las actividades de la catepsina D. Es necesario un análisis cuidadoso de la actividad tipo catepsina D del contenido del estómago para dilucidar si las proteínas de la sangre no se procesan en el estómago de triatomos, ni por catepsina D ni por catepsinas B y L. (Balczun et al., 2012a).

Usando homogenatos del intestino delgado de *R. prolixus* y *Triatoma phyllosoma pallidipennis*, se identificaron actividades de diferentes exopeptidasas y endopeptidasas (Houseman 1978; Houseman y Downe 1980, 1981a, b; Terra et al., 1988). La carboxipeptidasa A y B (metaloproteasas) y la carboxipeptidasa lisosómica B (catepsina X ó catepsina B₂ una carboxipeptidasa cisteínica) se detectaron en homogeneizados del intestino medio y el intestino delgado (García & Guimarães, 1979; Houseman & Downe, 1981b), y al menos tres aminopeptidasas se localizaron entre las membranas microvillar o en la superficie de las células del intestino delgado (Ferreira et al. 1988). La proteasa aspártica catepsina D y proteasa cisteínica catepsina B de *R. prolixus* se identificaron en los contenidos lumbinales del intestino delgado por su pH óptimo y utilizando sustratos específicos (Houseman & Downe, 1983a, b). Para la catepsina B, D y la carboxipeptidasa lisosómica B, se midieron las altas actividades 6 días después de la alimentación, y se produjo un segundo pico de actividad de catepsina B en el momento de la ecdisis (Billingsley & Downe 1988; Houseman & Downe, 1983b). En *R. prolixus*, se sugirió la catepsina B como la proteasa digestiva principal, mientras que la catepsina D debería contribuir solo en menor medida a la actividad proteolítica general (Terra et al., 1988).

Sin embargo, las investigaciones biológicas moleculares de *R. prolixus*, *Triatoma brasiliensis* y *Triatoma infestans* identificaron las secuencias de nucleótidos no solo de la proteasa cisteínica llamada catepsina B, sino también de otra proteasa cisteínica, la catepsina L (Lopez et al., 2001; Kollien et al., 2004; Waniek et al., 2012). Dado que las mediciones previas de las actividades de las proteasas cisteínicas cubrieron las actividades de la catepsina B y la catepsina L sin diferenciación, el impacto relativo de ambas proteasas en la digestión de la sangre es una cuestión abierta. A pesar del motivo común de GCDGG, las proteasas cisteínicas de triatomos comparten motivos característicos de la respectiva familia C1 de las proteasas cisteínicas, en





particular los motivos ERFNIN y GNFD de catepsina L y el "bucle oclusivo" de catepsina B (Schaub et al., 2011).

Otro estudio de identificación de alto rendimiento del proteoma de *R. prolixus* revela la presencia de diez transcritos de proteasas aspárticas que en el intestino medio anterior (estómago) y en en intsetino medio posterior (intestino delgado), pero con mayor actividad en el estómago, lo anterior sugiere que puede existir una actividad proteolítica temprana en este compartimento. También se identificaron nueve proteasas cisteínicas en el intestino medio posterior (intestino delgado) de las cuales comparte seis con el intestino medio anterior y tres son exclusivas del intestino medio posterior. Estos patrones presentan un alto número de isoformas de proteasas aspárticas en el intestino medio anterior y un alto numero de proteasas citeínicas en el intestino medio posterior. (Ouali et al., 2020). Lo que nos indica que hay que realizar estudios más minuciosos para establecer con claridad que proteasas actúan, cuál es el tiempo de inicio de su acción luego de la alimentación y en que cantidad están presentes en las diferentes partes del tracto digestivo de los triatominos.

Aunque generalmente se han descrito proteasas cisteínicas y aspárticas en el intsetino de los triatominos, en un estudio en *T. brasiliensis* se encontarron dos isoformas de genes que codifican para carboxipeptidasas serínicas, estos genes son tbscp-1 y tbscp-2, y por medio del modelamiento molecular de tbscp-1 indicó que esta enzima puede actuar como una carboxipeptidasa D (waniek et al., 2014). Lo anterior sugiere que queda mucho por descubrir en cuanto a las enzimas implicadas en la digestión en el intestino de los triatominos.

Tabla 3. Enzimas digestivas del intestino de los triatominos

Especie	Enzima	pH	Localización
<i>R. prolixus</i>	β -Acetilglucosaminidasa	4.5	Estómago
<i>R. prolixus</i>	α -Galactosidasa	4.5	Estómago, intestino medio
<i>R. prolixus</i>	α - Glucosidasa	4.5	Estómago, intestino medio
<i>R. prolixus</i>	β -Glucosidasa	4.5	Intestino medio
<i>R. prolixus</i>	α -manosidasa	4.5	Estómago, intestino medio
<i>R. prolixus</i>	β -manosidasa	4.5	Intestino medio
<i>R. prolixus</i>	Fosfatasa alcalina	10.4	Estómago, intestino medio
<i>R. prolixus</i>	Fosfatasa ácida	4.5	Estómago, intestino medio
<i>R. prolixus</i>	Aminopeptidasa	8.0	Estómago, intestino medio
<i>R. prolixus</i>	Carboxipeptidasa A	n.d.	Intestino medio
<i>R. prolixus</i>	Carboxipeptidasa B (h)	n.d.	Intestino medio
<i>T. pallidipennis</i>	Carboxipeptidasa lisosomal B (g)	3.8	Intestino medio
<i>T. brasiliensis</i>	Carboxipeptidasa D (i)	n.d.	Intestino medio
<i>R. prolixus; T. infestans</i>	Catepsina D (a,b)	3.5	Intestino medio (c)
<i>R. prolixus; T. infestans</i>	Catepsina B (d)	5.5	Intestino medio
<i>R. prolixus; T. infestans</i>	Catepsina L (d,e)	5.5	Intestino medio
<i>R. prolixus; T. infestans</i>	Lipasas (f)	7.0-7.5	Estómago, intestino medio



La mayoría de las enzimas son reseñadas en Terra y Ferreira (1994) excepto por (a) Borges et al. (2006), (b) Balzczun et al. (2012), (d) Kollien et al. (2004), (e) Lopez et al. (2001), (f) Rimoldi et al. (1985) y Grillo et al. (2007), (g) Houseman y Downe (1981b), (h) Garcia y Guimarães (1978), (i) Waniek et al. (2014), (c) Transcritos de genes de catepsina D presentes en el tejido del estómago. (nd) no determinado.

2.6 Inhibidores

Los inhibidores de proteasas se utilizan ampliamente para prevenir la degradación de las proteínas durante su aislamiento y purificación, otra aplicación es su potencial uso para el control de insectos, porque las proteasas digestivas de insectos se distribuyen ampliamente entre diferentes órdenes. Se pueden clasificar en dos grupos basados en el mecanismo de acción: uno que facilitan la inhibición por fuerza de unión sobre el sitio activo de las proteasas a través de interacciones no covalentes, tales como aprotinina, leupeptina o Inhibidor 2 de quimiotripsina (C12); y la otra clase que incluye a los grupos que se unen de forma covalente al sitio activo de las proteasas serínicas por lo tanto la modificación es irreversible del sitio activo de la enzima, por lo tanto pierden su actividad. PMSF y AEBSF (4 - (2-aminoetil) benceno sulfonilo fluoruro) son ejemplos de la segunda clase de inhibidores de proteasas que se unen de forma covalente en el residuo del sitio activo de la enzima por sulfonilación (Sharma et al., 2011; Napoleão et al., 2019) El PMSF es un inhibidor general de las proteasas serínicas (Turini et al., 1969), como la quimotripsina, la tripsina y la trombina (Sigma, 2018). PMSF inhibe las proteasas serínicas sulfonando los grupos hidroxilo de los residuos de serina del sitio reactivo (Gold & Fahrney, 1964; Gold, 1967; Hedstrom, 2002; Powers et al., 2002).

Las proteasas serínicas participan en una amplia variedad de procesos celulares y fisiológicos que incluyen la digestión (Gutschmidt et al., 1984), la coagulación (Morrissey et al., 1987), la presentación de antígenos (Goldberg et al., 1992), la transducción de señales (Solomon et al., 1985) y la destrucción celular (Quan et al., 1982). Además, los inhibidores de las proteasas serínicas tienen profundos efectos supresores sobre las respuestas inmunes celulares y humorales (Ghilchik & Morris, 1971; Bleackley et al., 1988), el inhibidor de las proteasas serínicas del tipo tripsina, TLCK, tiene un peso molecular bajo, es derivado del aminoácido que inhibe irreversiblemente las proteasas serínicas y es inmunosupresor in vitro (Pasternack et al., 1983). TLCK actúa en el residuo de histidina-46 ubicado en el sitio activo de la enzima el cual es alquilado por TLCK (Shaw et al., 1965; Shaw & Glover 1970).

Aunque el compuesto TPCK fue diseñado originalmente como una etiqueta de afinidad del sitio activo de la quimiotripsina (Schoellmann & Shaw, 1962), en las últimas décadas también se ha utilizado ampliamente en la investigación de la apoptosis. Dependiendo de las condiciones experimentales, TPCK puede ya sea inducir o inhibir la apoptosis (Zhu et al., 1997; Huang et al. 1999; Rokhlin et al., 2004). TPCK inhibe irreversiblemente la proteasa serínica α -quimotripsina (Schoellmann & Shaw, 1963; Hara et al., 1996; Pong et al., 1975; Bond & Butler, 1987). Se ha demostrado que TPCK alquila específicamente el resto histidina-57 en el centro activo de quimotripsina y serina proteasas similares a la quimotripsina (Schoellmann & Shaw 1963; Ong et al., 1965; Shaw & Glover 1970).





Los inhibidores de proteasas aspárticas son relativamente poco frecuentes y se encuentran en lugares especializados. Ejemplos incluyen proteínas de las plantas tales como patata, calabaza, y un inhibidor pleuripotente de la anémona de mar, que es un polipéptido de 8 kDa que inhibe la levadura por la inhibición de la sacaropepsina (Christeller et al., 1998; Kreft et al., 1997; Lenarcic & Turk, 1999). Pepstatin A, es un inhibidor de bajo peso molecular aislado de diversas especies de *Streptomyces*, es un inhibidor universal de proteasas aspárticas (Umezawa et al. 1970; Umezawa et al. 1978). Pepstatin A forma un complejo 1:1 con proteasas tales como pepsina, renina, catepsina D, quimosina bovina, y la proteasa B (*Aspergillus niger*) (Umezawa, 1976; Marcinişzyn, 1977; takahashi & Chang, 1976). El inhibidor es altamente selectivo y no inhibe las tiol proteasas neutras o proteasas serínicas. (Dunn, 1989; Sigma-aldrich, 2001).

El E-64 es un inhibidor irreversible de las proteasas cisteínicas. Este es producido por el hongo *Aspergillus japonicus* y su actividad como un inhibidor de las proteasas cisteínicas se ha descrito y caracterizado (Barrett et al, 1982). El E-64 ha sido ampliamente utilizado como un inhibidor específico de las proteasas cisteínicas tanto in vitro como in vivo. (Govrin & Levine, 1999). Dos conclusiones básicas han sido extraídas de las estructuras primarias y secundarias del inhibidor E-64 y su asociación con las proteasas cisteínicas. En primer lugar, la actividad inhibidora es el resultado de la unión de hidrógeno y de las interacciones hidrófobas entre el inhibidor y la proteasa. En segundo lugar, la irreversibilidad de la acción inhibidor es debido a la reacción del grupo epoxi en la posición C-2 en la molécula de inhibidor con el residuo de cisteína del sitio catalítico de la proteasa (Matsumoto et al. 1989). El grupo trans-epoxisuccinilo (resto o fracción activo) de E-64 se une irreversiblemente a un grupo tiol activo de muchas proteasas cisteínicas como papaína, actinidasa y catepsinas B, H y L para formar un enlace tioéter (Katunama & Kominami, 1995; Sreedharan et al., 1996).

El EDTA es un ácido orgánico tetracarboxílico derivado del etano por aminación de sus dos grupos metilo y posterior diacetilación de cada uno de los grupos amino. La principal propiedad química del EDTA es su capacidad de actuar como agente quelante de iones metálicos (Segura et al., 1997). Las sales de EDTA son muy utilizadas como anticoagulantes. La concentración óptima es de 1,5 mg por ml de sangre. El EDTA previene la agregación plaquetaria y, por lo tanto, es el anticoagulante preferido para el recuento de plaquetas (Lotspeich et al., 1992). El EDTA también es un inhibidor de metaloproteasas y actúa como un quelante del ion zinc en el sitio activo de éstas (Beynon & Bond, 2001).

2.7 Importancia de la caracterización de proteasas en insectos y animales

Definir el perfil proteico intestinal en insectos y animales sigue siendo una técnica muy utilizada en la actualidad, ya sea para generar conocimiento, para utilizar las enzimas presentes en el intestino a nivel industrial o generar nuevos productos para controlar plagas. Un estudio realizado en *Plutella xylostella* L. que es una peste de plantas crucíferas, indico que todas las proteasas presentes en el intestino medio de esta plaga son inhibidas por STI (Inhibidor de la tripsina de soya), por lo cual este inhibidor puede ser utilizado como potencial control efectivo contra esta plaga (Zhao et al., 2019). Otro ejemplo, es la determinación del perfil proteolítico digestivo de *Apodiphus amygdali* utilizando varios sustratos e inhibidores específicos, también se estableció



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



el pH y temperatura óptimos, mostrando una actividad enzimática más alta en el intervalo de pH de 6-7 y temperatura de 40°C cuando se usó azocaseína como sustrato. Los resultados indicaron que la determinación de la actividad proteolítica digestiva podría ser útil para esclarecer el proceso de digestión en estos insectos. Además, la comprensión de la naturaleza de las proteasas digestivas se puede utilizar para desarrollar varios inhibidores para proporcionar variedades de cultivos resistentes contra las plagas (Ramzi & Zibae, 2014). Otro ejemplo es la determinación de las enzimas digestivas de *Apolygus lucorum* en el complejo de glándulas salivales y el intestino medio y el efecto del sexo, la edad y la fuente de alimento en la actividad de estas enzimas. La amilasa y la proteasa estaban presentes en el complejo de las glándulas salivales y el intestino medio, pero eran más abundantes en el complejo de las glándulas salivales. La enzima tipo tripsina también estaba presente en ambos órganos, pero la enzima de tipo quimotripsina estaba presente sólo en el intestino medio. El insecto *A. lucorum*, una especie omnívora que se alimenta de plantas y animales, se ha convertido en una plaga importante en China, para cultivos de algodón. Es probable que su omnivorismo sea crítico para su éxito, pero el mecanismo o mecanismos digestivos subyacentes al procesamiento y la absorción de alimentos tan diversos es relativamente desconocida. Los resultados de los experimentos de cambio en el tipo de alimento confirmaron que la actividad de amilasa podría ser inducida por fuentes vegetales, y las fuentes animales indujeron actividad de proteasas. Así, los tipos y las actividades de las enzimas digestivas en *A. lucorum* proporcionan la base fisiológica del omnivorismo de la plaga. (Li et al., 2016). También se realizó un trabajo de la caracterización bioquímica y proteómica comparativa de las proteasas y nucleasas del intestino, la glándula salivar y la saliva del insecto denominado chinche verde del sur, *Nezara viridula*. El pH óptimo para la actividad de las proteasas en el intestino era ácido (5 a 6), siendo las proteasas cisteínicas las principales y para la saliva y la glándula salivar el pH óptimo fue alcalino (8 a 9), siendo las proteasas serínicas las más importantes. Las proteasas serínicas en la saliva difieren bioquímicamente de la tripsina y la quimotripsina, y las catepsinas en el intestino y la saliva mostraron propiedades distintas en ensayos de inhibidores. La comprensión de la fisiología digestiva de *N. viridula* facilitará el diseño de nuevas estrategias para el manejo de esta plaga significativa. (Lomate & Bonning, 2016). Un estudio de importancia económica es el desarrollado sobre *Diaprepes abbreviatus* que es una plaga importante que causa daños extensos a los cítricos en los Estados Unidos. El análisis de una biblioteca de etiqueta de secuencia expresada (EST) del tracto digestivo de larvas y adultos de *D. abbreviatus* identificó catepsinas como las enzimas digestivas putativas principales. Una de estas catepsinas comparte la identidad de la secuencia de aminoácidos con la catepsina L, y fue la más abundante en el conjunto de datos EST representando 14,4% y 3,6% de las secuencias totales en larvas de alimentación y adultos, respectivamente. (Ben-Mahmoud et al., 2014). Otro estudio que destaca la utilización de los perfiles proteicos en el intestino de insectos es el realizado en *Rhynchophorus ferrugineus*, ya que este gorgojo rojo de la palma es una plaga grave de palmeras datileras en muchos países de Oriente Medio. El objetivo del estudio fue obtener una buena comprensión de la actividad proteolítica intestinal de *R. ferrugineus*. Por lo tanto, se aislaron las enzimas en el tracto alimentario y se investigaron sus propiedades usando sustratos generales de proteasa (azocaseína y hemoglobina) así como sustratos específicos de tripsina, quimotripsina, elastasa, catepsina L y catepsina B. Los resultados mostraron que en el intestino *R. ferrugineus* tanto las proteasas serínicas como las cisteínicas están presentes, aunque con diferentes actividades.





Entre las proteasas activas, la tripsina fue la más activa en el intestino seguido de quimotripsina y elastasa (Darvishzadeh et al., 2015).

Los perfiles proteicos en el intestino son utilizados adicionalmente en insectos para ver comportamientos evolutivos, es el caso del estudio realizado en *Periplaneta americana* donde se investiga la fisiología de la digestión y se caracteriza molecularmente las principales enzimas digestivas, las cucarachas están entre los primeros insectos que aparecen en el registro fósil y este trabajo es parte de la investigación en curso sobre los insectos en puntos críticos en el árbol evolutivo para revelar tendencias evolutivas en las características digestivas de los insectos. Los datos cromatográficos y enzimológicos identificaron 4 tripsinas, una quimotripsina (también encontrada en el transcriptoma) y una proteinasa no identificada. (Tamaki et al., 2014).

Estudios con transcriptómica y proteómica del tracto digestivo de triatominos han determinado proteasas intestinales, y algunos componentes que son importantes en la relación de triatominos y *T. cruzi*, por ejemplo, en *R. prolixus* se reportó una expresión alta de todas las proteasas digestivas, con una preponderancia de proteasas cisteínicas y aspárticas, también se encontraron transcritos de proteasas en el intestino medio anterior con una posible activación de los mismos en el intestino medio posterior (Ribeiro et al., 2014). Otro trabajo basado en construcción y análisis de librerías de cDNA a partir de RNA aislado del intestino medio de *T. infestans* infectado y no infectado con *T. cruzi* sugiere el aumento de lisozima, la catepsina D y una proteína similar a la nitroforina después de la infección, mientras que la tiorredoxina reductasa disminuyó, lo que indica que la expresión de algunas enzimas dependen de factores externos, actualmente desconocidos y que requieren ser investigados (Buarque et al., 2013), también se han reportado aumentos en la velocidad de desarrollo de *T. cruzi* y de su metacicloogénesis con la secreción de catepsina D (Borges et al., 2006; Waniek, 2014).

En animales también se ha realizado el perfil de proteasas intestinales como el caso del estudio que describe la caracterización de un extracto de proteasa cruda de rayas espinosas (*Raja clavata*) y su evaluación en detergente líquido y en la desproteínización de residuos de camarón. Se observaron al menos cinco bandas caseinolíticas claras en un zimograma. La proteasa bruta mostró una actividad óptima a pH 8,0 y 50 °C, y fue altamente estable en un intervalo de pH de 8,0 a 11,0. Las enzimas proteolíticas fueron muy estables en tensoactivos no iónicos y en presencia de agentes oxidantes, manteniendo el 70% de su actividad después de incubación durante 1 h a 30 °C en presencia de perborato sódico al 1%. Los resultados sugieren que la desproteínización enzimática de residuos de camarón por proteasas alcalinas endógenas de peces podría ser aplicable al proceso de producción de quitina. (Lassoued et al., 2015). Otra investigación que se puede destacar en animales es en la que se identifica y se caracteriza un homólogo de la catepsina D en *Lampetra japonica*, los resultados revelaron que la catepsina D de lamprea puede desempeñar papeles clave en la respuesta inmune a patógenos exógenos y podría servir como agente antibacteriano potencial en un futuro próximo. La catepsina D recombinante de lamprea podría degradar la hemoglobina, el fibrinógeno y la albúmina sérica, que son los principales componentes de la sangre, sugiriendo que la catepsina D de la lamprea también puede actuar como una enzima digestiva durante la adaptación a un estilo de vida de alimentación de sangre (Xiao et al., 2014). También se ha desarrollado un estudio en el pepino de mar *Stichopus japonicus* donde se purifica y se caracteriza parcialmente una proteasa del tipo catepsina L (CPL) y se establece su distribución en el cuerpo, la enzima mostró una actividad óptima a pH 5,0-5,5 y 50°C, y mostró una termoestabilidad de hasta 40°C. La actividad enzimática





ACREDITACIÓN INSTITUCIONAL

Avanzamos... ¡Es nuestro objetivo!



fue inhibida por Zn^{2+} , Fe^{2+} y Cu^{2+} , drásticamente reducida por los inhibidores de proteasas cisteínicas, pero ligeramente reforzada por los agentes activadores de tiol. La enzima hidrolizó eficientemente el sustrato específico de la catepsina L, pero apenas hidrolizó los sustratos específicos para la catepsina B, la catepsina H y la catepsina K. Los estudios inmunohistoquímicos indicaron que el CLP era más abundante en la epidermis que en la dermis de la pared del cuerpo de *S. japonicus* (Zhou et al., 2014). Un estudio de importancia industrial fue el realizado en *Lophiosilurus Alexandri*, donde se purifica y caracteriza una tripsina, la purificación se hizo usando sólo dos procesos: precipitación con sulfato de amonio y cromatografía líquida de cambio aniónico en DEAE-sefarosa. La masa de tripsina se estimó como 24 kD a través de SDS-PAGE. Se considera a la tripsina como una prometedora enzima para procesos industriales, debido a su estabilidad en una amplia gama de pH y temperatura y actividad incluso bajo inmovilización (Dos Santos et al., 2016).



SC-CER96940



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



CAPÍTULO III

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Muestras de insectos

Todos los ensayos se hicieron con ninfas de 5 estadio de *B. herreri*, *B. corredori* y *B. ferroae* alimentadas con cucaracha (hemolinfagia) y ratón (hematofagia), estos insectos fueron aportados por el laboratorio de entomología médica de la universidad de Pamplona de colonias ya establecidas.

En el grupo alimentado con sangre, las ninfas fueron expuestas a un roedor sedado con Ketalar® 75 mg/Kg por un periodo de dos horas, estos ratones albinos pertenecen a la especie *Mus musculus* (Rodentia: Muridae) y proceden del bioterio de la Universidad de Pamplona. En el grupo alimentado con cucaracha, las ninfas se expusieron a dos adultos atrapados por separado en una celda de cartulina con orificios por un lapso de 4 horas, las cucarachas adultas (Blattodea) pertenecientes a la especie *Blaberus giganteus* fueron aportadas por el laboratorio de entomología médica de la Universidad de Pamplona, las ninfas de *Belminus spp* fueron alimentadas con ratón y cucaracha cuando fue necesario basados en su distensión abdominal.

3.2 Reactivos

La azocaseína, E-64 (*trans*-(epoxysuccinyl)-L-leucylamino-4-guanidinobutane), PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride), TLCK (*N*- α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone), TPCK (*N*- α -tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone), EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate), tripsina, cloruro de sodio, tris base, acetato de sodio, ácido tricloroacético son productos de la casa comercial Sigma-aldrich, el Pepstatin A se es de la marca Fisher Scientific, el hidróxido de sodio, y el ácido acético glacial y el ácido clorhídrico son productos Mallincrod, todos de grado molecular.

3.3 Extracción de proteasas del intestino de *Belminus spp.*

Se tomaron el número de ninfas indicado para cada ensayo por especie y por tipo de alimentación (12 para determinar el pH óptimo y para caracterizar las proteasas y 3 ninfas para la actividad proteolítica posingesta por día analizado), las ninfas utilizadas para determinar el pH óptimo se mantuvieron en ayunas hasta su almacenamiento 8 días después de su muda, las utilizadas en actividad proteolítica posingesta y caracterización de proteasas se alimentaron a repleción 8 días después de la muda, todas fueron congelados en un freezer a -80°C (IU1786A-Thermo Fisher Scientific) en viales eppendorf hasta su procesamiento. Posteriormente, sobre una base fría, se





extrajo el contenido intestinal a cada ninfa, y el total de los intestinos se almacenaron en un vial de 1.5 ml, para conformar un pool. Estas muestras se congelaron y maceraron tres veces para obtener la mayor cantidad de proteasas, finalmente se les adiciono un volumen de 100 μ L de solución salina (0,9%). Una vez terminado este paso, se centrifugó la muestra en centrifuga refrigerada (Universal 320R, Hettcich Zentrifugen) a 13.000 RPM (revoluciones por minuto) a 4°C por 10 minutos, inmediatamente se extrajo el sobrenadante y se midió el volumen del sobrenadante, el cual se dividió en el número de intestinos que conformaron el pool, para obtener la medida exacta que corresponde al volumen de medio intestino. (Sarath et al., 1989). (Ver flujograma en apéndice K).

3.4 pH óptimo de acción de las proteasas

Para medir el pH óptimo de la actividad proteolítica se utilizaron buffers con un rango de 3.5 a 9.5. Buffers Acetato de Na pH 3,5, 4.5, 5,5 y 6.5 100 mM. Buffers Tris – HCL pH 7.5, 8,5 y 9,5 100mM. Se realizaron ensayos por separado para cada uno de los buffers y para cada una de las especies alimentadas por hematofagia y hemolinfagia de la siguiente manera: En un tubo eppendorf se dispense 54 μ L de azocaseína a la cual se le adiciono 136 μ L de los diferentes buffers y posteriormente el extracto de proteasas (equivalente medio intestino) de ninfas de las tres especies alimentadas por hematofagia y hemolinfagia, para un volumen final de 200 μ L. Esta mezcla se incubó durante cinco horas a 37°C, una vez culminada la incubación, se adicionó 200 μ L de ATC frío (Ácido tricoloro acético, 10%), luego se colocaron en hielo por 15 minutos, posteriormente los tubos fueron centrifugados a 10000 RPM por 5 minutos. Inmediatamente, se extrajo el sobrenadante (aprox. 350 μ L), al cual se le adicionaron 150 μ L de NaOH 1M y se pasaron 200 μ L de la mezcla final a una placa de Terasaki de 96 pozos fondo plano y se midió la absorbancia a 440 nm en un espectrofotómetro (Epoch, Biotek Instruments, Inc). Los controles positivos fueron preparados sustituyendo el extracto intestinal de los insectos por tripsina comercial y en los controles negativos el extracto de proteasas por solución salina. Todos los ensayos se hicieron por triplicado. (Sarath et al., 1989). (Ver flujograma en apéndice L)

3.5 Actividad proteolítica a diferentes tiempos pos ingesta

La actividad proteolítica total posingesta fue determinada usando el mismo procedimiento descrito para establecer el pH óptimo, con la diferencia que solo se utilizó el pH óptimo (5.5) seleccionado previamente para cada especie de *Belminus spp* y los picos más significativos de actividad proteolítica pos ingesta, el homogenato contenía 3 ninfas alimentadas a repleción máxima el primer día y mantenidas en ayuno hasta su procesamiento. En este caso se evaluaron los homogenatos de intestinos que contienen una dieta sanguínea del día 1 al 22 y en la dieta de hemolinfa del día 1 al 15, en las tres especies. La cantidad de extracto que se adicionó en cada prueba equivalía a medio (1/2) intestino Todas las pruebas se realizarán por triplicado, junto con los controles negativos y positivos. (Ver flujograma en apéndice M). Además, se pesaron





diariamente las muestras de los tres insectos vivos hasta el día de su almacenamiento a -80°C , para establecer porcentaje de pérdida de peso diario.

3.6 Caracterización de proteasas

La caracterización de las proteasas presentes en el intestino de las tres especies de *Belminus spp* se realizó utilizando inhibidores específicos para las distintas proteasas (E-64, Pepstatin A, PMSF, TLCK, TPCK y EDTA) y se midió con el mismo procedimiento utilizado para determinar el pH óptimo de la actividad proteolítica con la diferencia que al realizar el ensayo se incubó previamente el volumen del extracto intestinal equivalente a 1/2 intestino con cada inhibidor 10 μL (durante 15 minutos a 30°C); y luego si se agregó el buffer y el sustrato azocaseína, posteriormente se incubó por 5 horas a 37°C y se determinó el porcentaje de inhibición. La caracterización de las proteasas se realizó en el pH óptimo (5.5) y en los dos picos de mayor actividad proteolítica posingesta para cada especie y cada alimentación. Las concentraciones de los inhibidores utilizadas fueron elegidas para caer dentro de sus rangos efectivos (Beynon & Bond, 2001). (Ver flujograma en apéndice N). Todos los ensayos se hicieron por triplicado, junto a controles positivos y negativos y una muestra control sin inhibidores, pero con extracto intestinal. Las soluciones de inhibidores que fueron analizados se describen a continuación:

Tabla 4. Soluciones de inhibidores

INHIBIDOR	MEDIO DE DISOLUCIÓN	CONCENTRACIÓN
E-64	Agua desionizada	50 μM
Pepstatin A	Agua desionizada	1 μM
PMSF	Etano absoluto (100% etanol)	3 mM
TPCK	Metanol	100 μM
TLCK	Agua desionizada	100 μM
EDTA	Agua destilada pH 8.5	40 μM

3.7 Análisis estadístico

Para determinar diferencia entre los resultados de las absorbancias en los diferentes pH de una misma especie y de una misma alimentación, se utilizó el programa R donde se corrió la prueba de ANOVA de una vía y el test de Tukey, luego se corrieron las mismas pruebas con el pH que tenía diferencias significativas frente a los demás, para determinar diferencias significativas en cuanto a tipo de alimentación y especie.

Se utilizó el programa estadístico R para establecer comparaciones entre las absorbancias obtenidas en los diferentes días en la actividad proteolítica pos ingesta en una misma especie y en un tipo de alimentación específica, donde se uso el Test de ANOVA de una vía y prueba de Tukey, esto con el fin de establecer diferencias entre los distintos días pos ingesta en una misma especie y un mismo tipo de alimentación hemolinfagia ó hematofagia. También se compararon



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
 Pamplona - Norte de Santander - Colombia
 Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



ACREDITACIÓN INSTITUCIONAL

Avanzamos... ¡Es nuestro objetivo!



las absorbancias de las tres especies bajo un mismo tipo de alimentación, empleando el mismo paquete estadístico, la prueba de ANOVA y el test de Student-Newman-Keuls con el objeto de observar diferencias entre los diferentes días analizados, bajo un mismo tipo de alimentación en las tres especies de *Belminus*.

Para establecer diferencias significativas entre las absorbancias obtenidas al utilizar diferentes inhibidores frente a la muestra control, por especie y tipo de alimentación en los días con los picos de mayor actividad proteolítica pos ingesta, se empleó el paquete estadístico R, en el cual se usaron las pruebas de ANOVA de una vía y el test de Tukey.



SC-CER96940



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750

CAPÍTULO IV

4. PRESENTACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Determinación de pH óptimo

Los valores máximos de absorbancias en los diferentes pH se obtuvieron en el pH 5.5 y los menores en los pH 3.5 y 9.5. El valor máximo se obtuvo en *B. ferroae* en pH 5.5 alimentado con hemolinfa con una absorbancia de 0.0393 y el valor mínimo se presentó en *B. herreri* alimentado con hemolinfa en pH 3.5, 4.5 y 9,5 con una absorbancia de 0.0010.

Se determinó que el pH óptimo de acción de las proteasas presentes en el intestino de *B. herreri*, *B. ferroae* y *B. corredori* alimentadas con hemolinfa y sangre es el de 5.5 (Tabla 5, figura 3), en *B. herreri* y *B. corredori* comparando la sumatoria de absorbancias de todos los pH se nota que son mejores los resultados de hidrólisis de la azocaseína en el grupo alimentado con sangre 0,0513 y 0,1113 respectivamente, en *B. ferroae* se ve que son mayores las absorbancias totales en el grupo alimentado con hemolinfa con una sumatoria de absorbancia total de 0,1086.

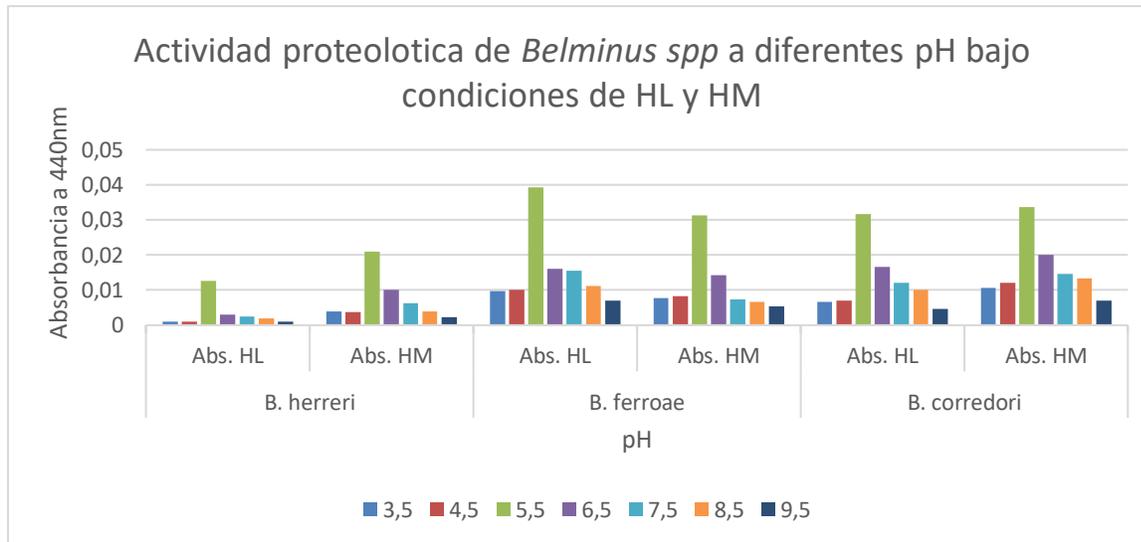
Analizando específicamente los resultados en el pH 5.5 *B. ferroae* es el que presenta las absorbancias más altas en el grupo alimentado con hemolinfa (0,0393), seguido por *B. corredori* con el grupo alimentado con sangre (0,0336), *B. herreri* en este pH (5.5) presenta las absorbancias más bajas de las tres especies bajo los dos tipos de alimentación 0,0126 bajo condiciones de hemolinfagia y 0,0210 con hematofagia.

TABLA 5. Promedios de absorbancias de actividad proteolítica de *Belminus spp* a diferentes pH.

pH	<i>B. herreri</i>		<i>B. ferroae</i>		<i>B. corredori</i>	
	Abs. HL	Abs. HM	Abs. HL	Abs. HM	Abs. HL	Abs. HM
3,5	0,0010 (DS 0,0010)	0,0040 (DS 0,0020)	0,0096 (DS 0,0058)	0,0076 (DS 0,0005)	0,0066 (DS 0,0010)	0,0106 DS (0,0032)
4,5	0,0010 (DS 0,0042)	0,0036 (DS 0,0006)	0,0100 (DS 0,0034)	0,0083 (DS 0,0005)	0,0070 (DS 0,0026)	0,0120 (DS 0,0005)
5,5	0,0126 (DS 0,0015)	0,0210 (DS 0,0010)	0,0393 (DS 0,0030)	0,0313 (DS 0,0005)	0,0316 (DS 0,0063)	0,0336 (DS 0,0011)
6,5	0,0030 (DS 0,0045)	0,0100 (DS 0,0010)	0,0160 (DS 0,0020)	0,0143 (DS 0,0015)	0,0166 (DS 0,0068)	0,0200 (DS 0,0049)
7,5	0,0025 (DS 0,0063)	0,0063 (DS 0,0006)	0,0155 (DS 0,0051)	0,0073 (DS 0,0010)	0,0120 (DS 0,0026)	0,0146 (DS 0,0028)
8,5	0,0020 (DS 0,0037)	0,0040 (DS 0,0010)	0,0111 (DS 0,0015)	0,0066 (DS 0,0005)	0,0100 (DS 0,0056)	0,0133 (DS 0,0010)
9,5	0,0010 (DS 0,0028)	0,0023 (DS 0,0006)	0,0070 (DS 0,0007)	0,0053 (DS 0,0005)	0,0046 (DS 0000)	0,0070 (DS 0,0015)
Total Abs. a 440nm	0,0231	0,0513	0,1086	0,0810	0,0886	0,1113

Abs. (absorbancia), HL (hemolinfagia), HM (hematofagia). DS (desviación estándar). Fuente: Elaboración propia.

Figura 3. Promedios de absorbancias de actividad proteolítica de *Belminus spp* a diferentes pH



Abs. (absorbancia), HL (hemolinfagia), HM (hematofagia). Fuente: Elaboración propia

4.2 Actividad proteolítica pos ingesta

En las tres especies de *Belminus* bajo los dos tipos de alimentación, se presentan 2 picos de hidrólisis de la azocaseína (tabla 6, figura 4), pero en diferentes tiempos, en las tres especies alimentadas con hemolinfa el primer pico se da en el día 2 y el segundo en *B. hererri* y *B. ferroae* en el día 11, en *B. corredori* este pico se observa en el día 8. En el grupo alimentado con sangre el primer pico se observa en el día 7 tanto en *B. herreri* como en *B. ferroae*, en *B. corredori* este pico se observa en el día 14, el segundo pico se observa en *B. hererri* en el día 13, en *B. ferroae* en el día 19 y en *B. corredori* en el día 20. Lo anterior demuestra que la hemolinfa es digerida mas rápidamente que la sangre.

La mayor actividad proteolítica pos ingesta en un día específico se observa en *B. ferroae* aliementado con hemolinfa en el día 11 con una absorbancia de 0,799 a 440 nm, seguido por el día 2 de esta misma especie y bajo las mismas condiciones de alimentación con una absorbancia de 0,522. La mayor absorbancia en el grupo alimentado con sangre en un día específico se da en *B. ferroae* en el día 7 (0,462), seguido por *B. herreri* en el mismo día con una absorbancia de 0,458.

Basados en los promedios por día, la mejor actividad proteolítica de las tres especies bajo los dos tipos de alimentación la obtiene *B. ferroae* alimentado con hemolinfa, con un promedio de absorbancia diaria de 0,299, seguido por *B. herreri* alimentado con sangre con un promedio diario de 0,205.



Tabla 6. Promedios de absorbancias de actividad proteolítica de *Belminus* spp pos ingesta

Día	<i>B. herreri</i>		<i>B. ferroae</i>		<i>B. corredori</i>	
	Abs. 440 nm HL	Abs. 440 nm HM	Abs. 440 nm HL	Abs. 440 nm HM	Abs. 440 nm HL	Abs. 440 nm HM
1	0,232 (DS 0,040)	0,069 (DS 0,027)	0,375 (DS 0,019)	0,003 (DS 0,004)	0,239 (DS 0,053)	0,052 (DS 0,003)
2	0,263 (DS 0,022)	0,137 (DS 0,029)	0,522 (DS 0,110)	0,042 (DS 0,012)	0,28 (DS 0,006)	0,049 (DS 0,017)
3	0,132 (DS 0,012)	0,119 (DS 0,007)	0,272 (DS 0,036)	0,082 (DS 0,008)	0,201 (DS 0,006)	0,045 (DS 0,011)
4	0,179 (DS 0,024)	0,145 (DS 0,008)	0,199 (DS 0,028)	0,050 (DS 0,011)	0,159 (DS 0,019)	0,087 (DS 0,026)
5	0,182 (DS 0,016)	0,258 (DS 0,040)	0,173 (DS 0,040)	0,040 (DS 0,020)	0,178 (DS 0,056)	0,126 (DS 0,011)
6	0,242 (DS 0,007)	0,263 (DS 0,043)	0,159 (DS 0,010)	0,189 (DS 0,015)	0,14 (DS 0,017)	0,101 (DS 0,004)
7	0,158 (DS 0,021)	0,458 (DS 0,041)	0,197 (DS 0,014)	0,462 (DS 0,048)	0,142 (DS 0,020)	0,117 (DS 0,015)
8	0,218 (DS 0,008)	0,153 (DS 0,038)	0,266 (DS 0,006)	0,163 (DS 0,025)	0,349 (DS 0,012)	0,125 (DS 0,019)
9	0,201 (DS 0,008)	0,283 (DS 0,052)	0,379 (DS 0,024)	0,193 (DS 0,018)	0,254 (DS 0,009)	0,147 (DS 0,012)
10	0,216 (DS 0,019)	0,259 (DS 0,022)	0,398 (DS 0,010)	0,172 (DS 0,016)	0,211 (DS 0,031)	0,152 (DS 0,006)
11	0,406 (DS 0,082)	0,246 (DS 0,011)	0,799 (DS 0,023)	0,162 (DS 0,035)	0,195 (DS 0,004)	0,156 (DS 0,021)
12	0,191 (DS 0,008)	0,258 (DS 0,007)	0,401 (DS 0,010)	0,201 (DS 0,014)	0,201 (DS 0,031)	0,174 (DS 0,017)
13	0,163 (DS 0,014)	0,335 (DS 0,001)	0,192 (DS 0,007)	0,205 (DS 0,060)	0,091 (DS 0,019)	0,205 (DS 0,011)
14	0,140 (DS 0,006)	0,265 (DS 0,008)	0,106 (DS 0,005)	0,161 (DS 0,021)	0,106 (DS 0,006)	0,244 (DS 0,053)
15	0,148 (DS 0,006)	0,159 (DS 0,010)	0,061 (DS 0,009)	0,162 (DS 0,046)	0,103 (DS 0,007)	0,172 (DS 0,006)
16	0	0,201 (DS 0,028)	0	0,171 (DS 0,030)	0	0,192 (DS 0,037)
17	0	0,189 (DS 0,007)	0	0,203 (DS 0,019)	0	0,172 (DS 0,053)
18	0	0,158 (DS 0,006)	0	0,198 (DS 0,075)	0	0,231 (DS 0,042)
19	0	0,146 (DS 0,021)	0	0,216 (DS 0,041)	0	0,257 (DS 0,010)
20	0	0,130 (DS 0,001)	0	0,140 (DS 0,009)	0	0,277 (DS 0,038)
21	0	0,136 (DS 0,005)	0	0,15 (DS 0,032)	0	0,183 (DS 0,060)
22	0	0,144 (DS 0,0005)	0	0,163 (DS 0,011)	0	0,192 (DS 0,008)
Total Abs.	3,071	4,511	4,499	3,528	2,849	3,456
Prom Abs./día	0,20473333	0,20504545	0,29993333	0,16036364	0,18993333	0,15709091

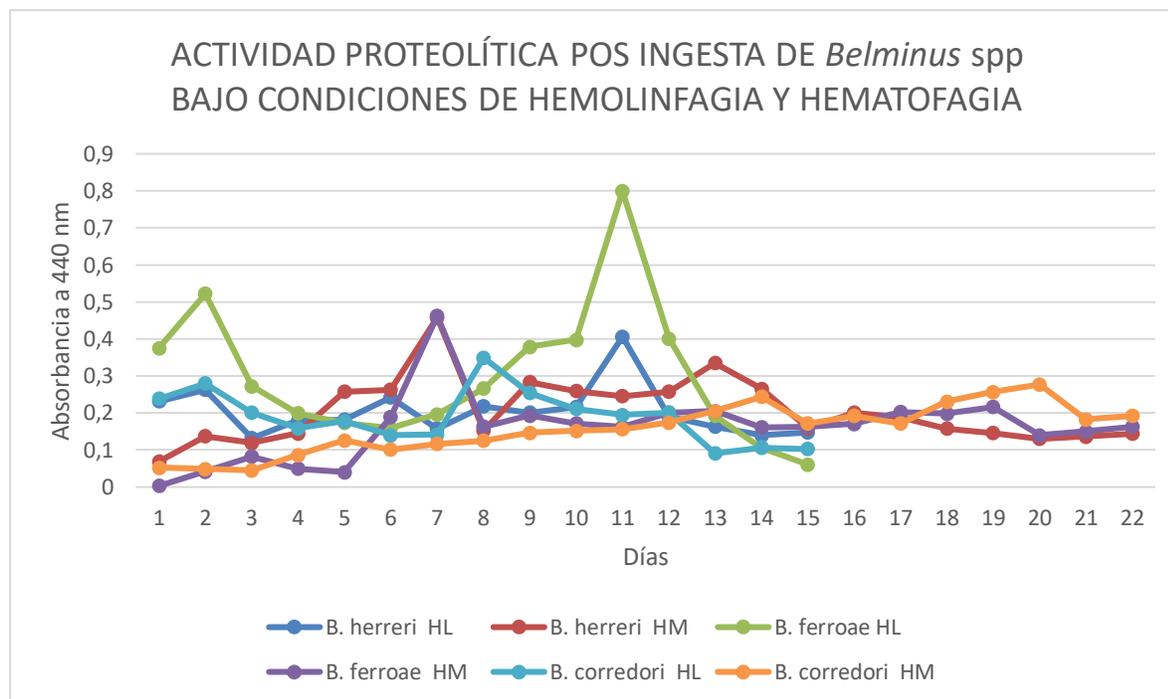
Fuente: Elaboración propia. DS (desviación estándar)



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750

Figura 4. Promedios de absorbancias de actividad proteolítica de *Belminus* spp pos ingesta bajo condiciones de hemolinfagia y hematofagia.



Fuente: Elaboración propia.

4.3 Caracterización de las proteasas en *Belminus* spp

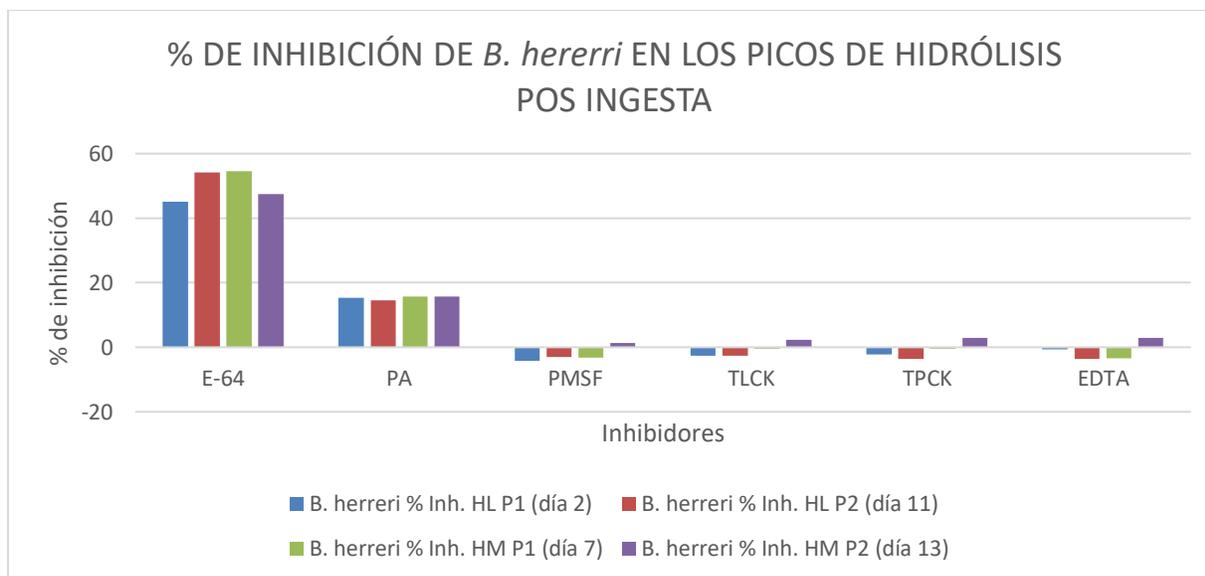
Se observa que en las tres especies de *Belminus* y bajo los dos tipos de alimentación hemolinfagia y hematofagia los mayores porcentajes de inhibición los produce E-64 con un porcentaje mínimo de inhibición de 30 y un máximo de 62, comparándolo frente a la muestra control, lo cual nos indica que las proteasas con las que se desarrolla la digestión de hemolinfa y sangre en estas tres especies son en su gran mayoría proteasas cisteínicas. El otro inhibidor que presenta porcentaje de inhibición de proteasas es Pepstatin A, tanto en las tres especies como en los dos tipos de alimentación, pero con porcentaje de inhibición menores a los registrados con E-64, Pepstatin A tiene un porcentaje mínimo de inhibición de 13 y uno máximo de 28. Los demás inhibidores PMSF, TLCK, TPCK y EDTA no presentan porcentajes de inhibición frente a la muestra control, lo anterior nos denota que proteasas serínicas y metaloproteasas posiblemente tengan menor relevancia en la digestión en *Belminus* spp, bajo condiciones de alimentación de hemolinfagia y hematofagia, aunque cabe destacar que nunca se alcanzó una inhibición de 100% en ninguno de los ensayos, por lo cual queda abierta la discusión si hay otras proteasas además de las cisteínicas y aspárticas.

Tabla 7. % de inhibición de *Belminus spp* para caracterizar las proteasas frente a muestra control.

INHIBIDOR	<i>B. herrerri</i>				<i>B. ferroae</i>				<i>B. corredori</i>			
	% Inh. HL P1 (día 2)	% Inh. HL P2 (día 11)	% Inh. HM P1 (día 7)	% Inh. HM P2 (día 13)	% Inh. HL P1 (día 2)	% Inh. HL P2 (día 11)	% Inh. HM P1 (día 7)	% Inh. HM P2 (día 19)	% Inh. HL P1 (día 2)	% Inh. HL P2 (día 8)	% Inh. HM P1 (día 14)	% Inh. HM P2 (día 20)
E-64	45,18	54,12	54,57	47,49	30,08	62,63	56,32	33,81	45,62	55,91	36,43	55,48
PA	15,41	14,51	15,68	15,64	13,97	28,05	17,04	11,79	18,31	25,22	13,00	21,36
PMSF	-4,12	-2,98	-3,20	1,25	2,34	-1,62	0,82	2,67	0,34	0,60	-0,71	0,11
TLCK	-2,59	-2,59	-0,38	2,22	1,69	0,88	0,67	-0,31	-0,22	1,39	-3,86	-1,24
TPCK	-2,24	-3,61	-0,53	2,90	1,43	2,32	1,34	-1,26	0,00	1,09	-1,43	-1,58
EDTA	-0,59	-3,53	-3,35	2,99	1,04	0,79	-2,16	-3,30	1,35	-2,28	2,71	0,23

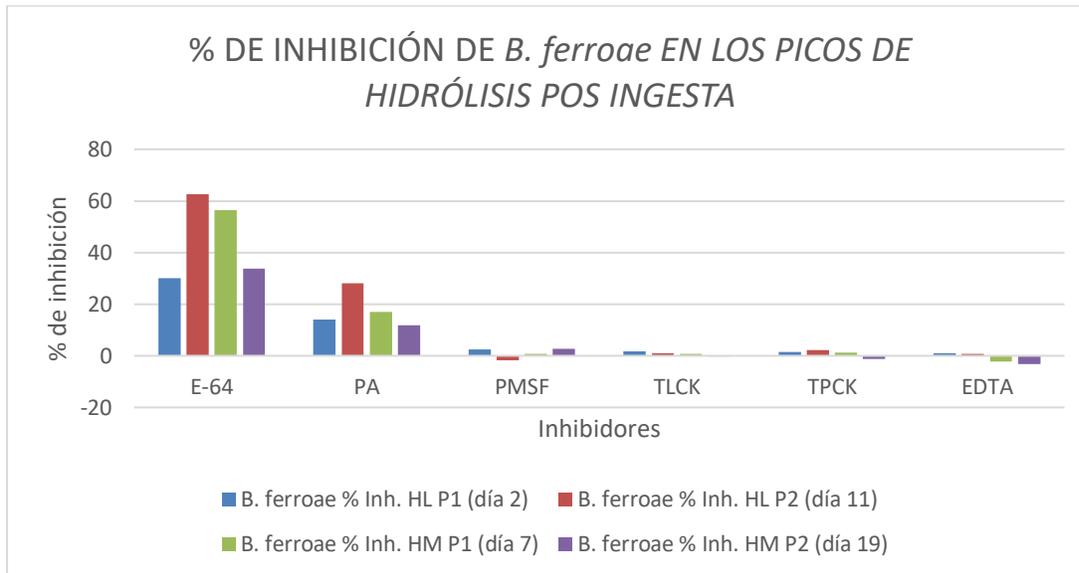
Inh. (inhibición), HL (hemolinfagia), HM (hematofagia), P (pico). Fuente: Elaboración propia.

Figura 5. % de inhibición en *B. herrerri* para caracterizar proteasas



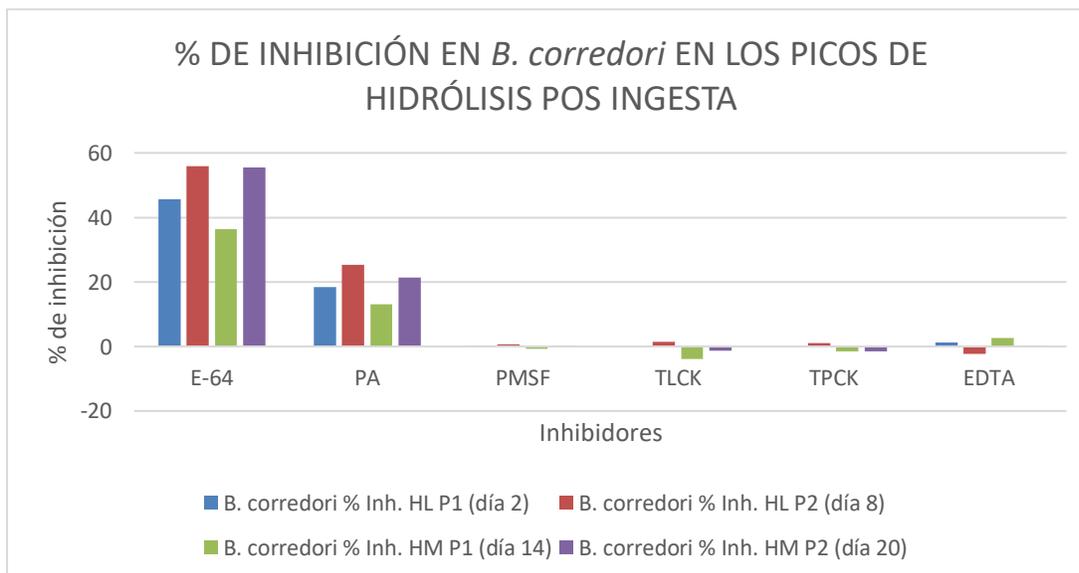
Fuente: Elaboración propia.

Figura 6. % de inhibición en *B. ferroae* para caracterizar proteasas



Fuente: Elaboración propia.

Figura 7. % de inhibición en *B. corredori* para caracterizar proteasas



Fuente: Elaboración propia.



4.4 Interpretación de análisis estadístico

4.4.1 Determinación de pH óptimo de acción de las proteasas

Según el análisis realizado en R con la prueba de ANOVA por especie y por tipo de alimentación por separado, en *B. hereri*, *B. ferroae* y *B. corredori* alimentados con hemolinfa y sangre, hay diferencias significativas entre los distintos pH de 3.5 a 9.5 con un p de (5.203 E^{-5}), (1.641 E^{-12}) y (2.839 E^{-08}) respectivamente, los valores anteriores de p son < 0.001 , esto se comprueba con el análisis de Tukey $< 0,05$, donde se observa que hay diferencias significativas en el pH 5.5 respecto a los demás pH en las tres especies y en los dos tipos de alimentación.

Comparando los valores del pH 5.5 de las tres especies bajo los dos tipos de alimentación, el análisis de ANOVA revela que hay diferencias significativas p de 0,0001391, lo cual se comprueba con la prueba de Tukey, donde se observa que hay diferencias significativas en la actividad proteolítica de *B. ferroae* y *B. corredori* frente a *B. herreri*, con valores menores a 0.05, lo que indica que al pH de 5.5 son más eficientes estas dos especies tanto en la alimentación con hemolinfa como con sangre frente a *B. herreri*.

4.4.2 Actividad proteolítica pos ingesta

Según test de ANOVA analizando por separado las tres especies de *Belminus* bajo las dos fuentes de alimentación hemolinfagia y hematofagia también por separado, presentan diferencias significativas entre los días analizados en la actividad proteolítica pos ingesta con un $p < 0.001$. Basados en la prueba de Tukey $p < 0.05$ *B. herreri* alimentado con hemolinfa presenta diferencias significativas en los siguientes días: El día 11 presenta diferencias significativas frente a los otros 14 días, el día 2 presenta diferencias significativas frente a 4 días. Por cual se sugiere que hay una tendencia con dos picos de actividad proteolítica en el proceso de digestión de la hemolinfa en *B. herreri* uno al comienzo en el día 2 y otro en el día 11. La misma especie alimentada con sangre basados en el test de Tukey $p < 0.05$, arroja diferencias significativas en los siguientes días: El día 7 presenta diferencias significativas frente a los otros 21 días y el día 13 frente a 14 días. Por lo cual se sugiere que hay una tendencia con dos picos de actividad proteolítica en el proceso de digestión de la sangre en *B. herreri*, uno al en el día 7 y otro entre el día 13.

B. ferroae alimentado con hemolinfa y basado en los resultados del test de Tukey $p < 0.05$ muestra diferencias significativas en el día 11 frente a los otros 14 días, el día 2 presenta diferencias significativas frente a 13 días, los días 9, 10, 12 frente a 9 días y el día 1 frente a 8 días. Por cual se sugiere que hay una tendencia con dos picos de actividad proteolítica en el proceso de digestión de la hemolinfa en *B. ferroae* uno al comienzo en los días 1 y 2 y otro entre el día 9 al 12. Esta especie alimentada con sangre y aplicando la misma prueba estadística mencionada anteriormente exhibe diferencias $p < 0.05$ significativas en los siguientes días: El día 7 presenta diferencias significativas frente a los otros 21 días, y el día 19 frente a 5 días. Por cual se sugiere que hay una tendencia con dos picos de actividad proteolítica en el proceso de digestión de la sangre en *B. ferroae* uno en el día 7 y otro entre el día 19.





B. corredori bajo condiciones de alimentación de hemolinfagia de acuerdo a la prueba de Tukey $p < 0.05$, presenta diferencias significativas en los siguientes días: El día 8 presenta diferencias significativas frente a los otros 13 días, el día 2 presenta diferencias significativas frente a 10 días, los días 9 y el día 1 frente a 6 días. Por cual se sugiere que hay una tendencia con dos picos de actividad proteolítica en el proceso de digestión de la hemolinfa en *B. corredori* uno al comienzo en los días 1 y 2 y otro entre el día 8 y 9. Esta especie bajo condiciones de hematofagia y aplicando la prueba de Tukey $p < 0.05$, se encuentran diferencias significativas en los siguientes días: El día 20 presenta diferencias significativas frente a 14 días, el día 19 frente a 11 días, el día 14 frente a 10 días, día 13 frente a 5 días. Por cual se sugiere que hay una tendencia con dos picos de actividad proteolítica en el proceso de digestión de la sangre en *B. corredori* uno entre los días 13 y 14 y otro entre el día 19 al 20. Se nota en las tres especies de *Belminus* que el proceso de digestión de la sangre es más lento que el de la hemolinfa.

Comparación de absorbancias pos ingesta de las tres especies de *Belminus* alimentadas bajo condiciones de hemolinfagia

Basados en test de ANOVA, si hay diferencias significativas entre las tres especies de *Belminus* alimentadas bajo condiciones de hemolinfagia con $p < 0.001$ y utilizando el test de Student-Newman-Keuls donde se compara día por día las absorbancias de las tres especies, se observa que *B. ferroae* obtiene los mejores resultados y tiene diferencias significativas frente a *B. hereri* y *B. corredori* en 8 de los 15 días medidos, lo cual nos muestra una tendencia a que *B. ferroae* podría estar más adaptado y digiere más fácilmente la hemolinfa.

Comparación de absorbancias pos ingesta de las tres especies de *Belminus* alimentadas bajo condiciones de hematofagia

Basados en test de ANOVA, si hay diferencias significativas entre las tres especies de *Belminus* alimentadas bajo condiciones de hematofagia con $p < 0.001$ y utilizando el test de Student-Newman-Keuls donde se compara día por día las absorbancias de las tres especies, se observa que *B. hereri*, obtiene los mejores resultados y tiene diferencias significativas frente a *B. ferroae* y *B. corredori* en 12 de los 22 días medidos, lo cual nos muestra una tendencia a que *B. hereri* podría estar más adaptado y digiere más fácilmente la sangre.



4.4.3 Caracterización de proteasas

De acuerdo a la prueba de ANOVA hay diferencias significativas entre los seis inhibidores utilizados para caracterizar las proteasas presentes en el intestino de las tres especies de *Belminus* bajo condiciones de alimentación de hemolinfagia y hematofagia con un $p < 0.001$ en los dos picos de mayor actividad proteolítica evaluados.

El inhibidor E-64 tiene diferencias significativas según el test de Tukey $p < 0.05$, frente a los otros cinco inhibidores (PA, PMSF, TLCK, TPCK y EDTA) y frente a la muestra control (tabla 8) en las tres especies bajo los dos tipos de alimentación hemolinfagia y hematofagia en los dos picos de actividad proteolítica analizados, lo anterior nos sugiere que la mayoría de proteasas son cisteínicas.

El PA presenta diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey $p < 0.05$, frente a la muestra control y frente a 2, 3 ó 4 inhibidores (PMSF, TLCK, TPCK y EDTA), en las tres especies de *Belminus* y bajo condiciones de alimentación de hemolinfagia y hematofagia en los dos picos de actividad proteolítica evaluados (tabla 8), excepto en el pico uno de *B. corredori* alimentado con sangre donde no hubo diferencias significativas ni frente a la muestra control, ni frente a los demás inhibidores. Los hallazgos tanto del inhibidor E-64 y PA se comprueban con los porcentajes de inhibición que causan.

Los porcentajes de inhibición de PA son más bajos comparados con los de E-64 (30 a 62% de inhibición), desde un 13% hasta un 28%, lo que nos indicaría que, sí hay presencia de proteasas aspárticas, pero en una cantidad menor a las cisteínicas

Tabla 8. Valores de significancia de los inhibidores comparados entre ellos y frente a la muestra control en el test de Tukey.

Inh.	M. control	<i>B. herreri</i>				<i>B. ferroae</i>				<i>B. corredori</i>			
		P1HI	P2HL	P1HM	P2HM	P1HI	P2HL	P1HM	P2HM	P1HI	P2HL	P1HM	P2HM
E-64	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05
PA	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	Sig. <0.05	No Sig. >0.05	Sig. <0.05
PMSF	No sig. >0.05	No sig. >0.05	No sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05
TLCK	No sig. >0.05	No sig. >0.05	No sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05
TPCK	No sig. >0.05	No sig. >0.05	No sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05
EDTA	No sig. >0.05	No sig. >0.05	No sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05	No Sig. >0.05

Inh. (inhibidor), M (muestra), Sig. (significativo), No sig. (No significativo). Fuente: Elaboración propia.





5. DISCUSIÓN

5.1 pH óptimo de acción de las proteasas

Se observa que el pH óptimo de acción de las proteasas para las tres especies de *Belminus* es 5.5 tanto para el grupo alimentado en condiciones de hemolinfagia como de hematofagia (Tabla. 5, figura 3), lo que concuerda con estudios previos realizados en triatominos donde el pH del lumen del intestino medio es ácido (Schaub, 2009). Además, se han reportado la disminución del pH en ninfas de *R. prolixus*, inicialmente después de la alimentación con sangre el pH aumenta a 7.4 y luego de una semana disminuye a 6.5 y en el intestino medio cambia de 7.2 a 5.55 (Balczun et al. 2012b). En las ninfas de *T. brasiliensis* de quinto estadio no alimentadas, el valor del pH del estómago y el intestino delgado era de aproximadamente 7 y 5,5, respectivamente, (Waniek et al., 2012). En una investigación más exhaustiva, los valores de pH del estómago y las tres secciones morfológicamente distinguibles del intestino delgado de *Triatoma infestans* se determinaron por separado mediante microelectrodos hasta 20 días después de la alimentación. En las ninfas de quinto estadio no alimentadas, los valores de pH fueron aproximadamente 6.3 para el estómago y la región posterior del intestino delgado y 6.7 y 6.6 para la región anterior y media del intestino delgado, respectivamente (Balczun et al., 2012a). Los contenidos del estómago y las diferentes regiones del intestino delgado se acidificaron continuamente hasta 8 y 10 días después de la alimentación, alcanzando valores mínimos de aproximadamente pH 5.2. Después de 15 días después de la alimentación, los valores de pH del estómago y el contenido del intestino delgado aumentaron, pero a los 20 días después de la alimentación, estaban considerablemente por debajo de los valores de los insectos no alimentados (Balczun., et al 2012 b).

De las tres especies de *Belminus* quien obtuvo los valores más altos de actividad proteolítica medida sobre azocaseína con ingesta de hemolinfa a pH 5,5 fue *B. ferroae* con una absorbancia a 440 nm de 0,0393, seguido por *B. corredori* con valores de 0,0316 y *B. herreri* de 0,0126, en cuanto a la actividad proteolítica con ingesta de sangre bajo las mismas condiciones *B. corredori* obtuvo la absorbancia más alta con 0,0336, seguido por *B. ferroae* con 0,0313 y *B. herreri* con 0,021, estos datos sugieren la gran versatilidad en cuanto a fuentes de alimentación que posee el género *Belminus* y que las tres especies no se comportan de la misma manera al realizar hidrólisis de la azocaseína con proteasas extraídas de su sistema digestivo en condiciones de alimentación de hemolinfa y sangre, lo que parece indicar que la digestión de hemolinfa y sangre es muy diferente en estas especies.

Comparando la suma total de absorbancia a 440 nm de los diferentes pH de 3.5 a 9.5 utilizados para determinar el pH óptimo de acción en las tres especies de *Belminus* bajo dos tipos de alimentación se nota que la mayor hidrólisis de azocaseína la realiza *B. corredori* alimentado con sangre con una absorbancia total de 0,111, seguido muy de cerca por *B. ferroae* alimentado con hemolinfa con una absorbancia total de 0,108 (absorbancia total de 0,081 alimentado con sangre)



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



y en tercer lugar nuevamente *B. corredori* alimentado con hemolinfa con una absorbancia de 0,0886 por lo cual se propone que *B. corredori* está adaptado tanto a la ingesta de sangre como a la hemolinfa y que *B. ferroae* tiene la tendencia a ser mucho más eficiente al digerir hemolinfa que sangre, un estudio previo estableció que estadísticas vitales como longevidad, tasa de eclosión de huevos y mortalidad en estadios ninfales fue mucho mejor en *B. ferroae* alimentados con hemolinfa de cucaracha comparado con alimentación con sangre de ratón y con *R. prolixus* (Sandoval et al., 2013). Por su parte *B. herreri* muestra los valores de actividad proteolítica más bajos al digerir sangre y hemolinfa a diferentes pH pero se nota una clara diferencia a favor de la hidrólisis de sangre con un absorbancia total de 0,0513 comparado con un absorbancia total de 0,0231 con hemolinfa, lo que sugeriría que tiene la tendencia a estar más adaptado a alimentarse con sangre, un estudio previo propone que *B. herreri* puede extraer sangre directamente de vertebrados (Sandoval et al., 2004), otras observaciones en laboratorio y en campo de *B. peruvianus* y *B. herreri* han indicado una dieta basada en una amplia gama de huéspedes, incluyendo los artrópodos, reptiles, aves y mamíferos. Por otra parte, el comportamiento de alimentación de estas especies es variable e incluye la práctica de canibalismo, cleptohematofagia, hemolinfagia y hematofagia (Herrer et al., 1954, Gaunt & Miles 2000, Sandoval et al., 2000, 2004). Cabe resaltar que las tres especies de *Belminus* utilizadas en este estudio provienen de colonias establecidas hace varios años en el laboratorio de entomología médica de la Universidad de Pamplona, lo cual puede establecer alguna diferencia en cuanto a comportamiento alimenticio con especies silvestres.

5.2 Actividad proteolítica pos ingesta

Las tres especies de *Belminus* bajo condiciones de alimentación con hemolinfagia ya presentan actividad proteolítica el primer día posingesta (tabla 6, figura 4) y se observa un primer pico en la digestión de la azocaseína entre el día 1 y 2 (*B. ferroae* absorbancia 440 nm primer día 0,375, segundo día 0,522, *B. corredori* 0,239 y 0,28 y *B. herreri* 0,232 y 0,263 respectivamente), muy diferente a lo observado en las tres especies alimentadas bajo condiciones de hematofagia donde la actividad proteolítica es notoria solo a partir del 5 día en *B. herreri* con una absorbancia a 440nm de 0,258 y *B. corredori* 0,126, *B. ferroae* en este día presenta una actividad proteolítica baja con una absorbancia de tan solo 0,04 y el primer pico de digestión de la azocaseína en las tres especies se observa hasta el día 7 en *B. ferroae* con un absorbancia de 0,462 y *B. herreri* de 0,458, el primer pico de *B. corredori* solo se observa hasta el día 14 con una absorbancia de 0,244, lo cual sugiere facilidad en la digestión de la hemolinfa por parte de las tres especies de *Belminus* y una digestión más lenta de la sangre. Esta facilidad en la digestión de la hemolinfa por parte de las tres especies de *Belminus* se puede explicar desde varios tópicos uno de ellos es la alimentación de *Belminus* con artrópodos especialmente cucarachas en vida silvestre, específicamente *B. ferroae* parece estar más adaptado a alimentarse de hemolinfa debido a que su ciclo de vida presenta mejores parámetros reproductivos comparado con ingesta de sangre y predación de otro triatomino, además análisis de su contenido intestinal en especímenes colectados en domicilios demuestran su predilección por la hemolinfa de cucaracha (Sandoval et al., 2010, 2013). Otra explicación es el pH de la hemolinfa y de la sangre, el pH de la hemolinfa



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



y la sangre es diferente, para la hemolinfa varios estudios comprueban su pH ácido, como el reportado en algunos estadios del gusano de seda con valores entre 6.38 a 6.6 (Wyatt et al., 1955), otros dos estudios ratifican estos hallazgos, el primero con una media de pH de 6,77 (Heimpel, 1955) y el segundo valores en el rango de 6.69 a 6.87 (Numone et al., 1955), aunque se ha reportado un pH de 7,27 en larvas maduras de *R. americana* (Terra et al. 1974), que sigue siendo inferior al pH de la sangre. La sangre tiene un pH básico y después de la ingestión por parte de triatomino determina las condiciones en el estómago, es decir, pH 7.4 (Billker et al., 2000), sí el pH óptimo de acción del genero *Belminus* es de 5,5 es más sencillo y rápido procesar un alimento que esté más cerca a este pH que es el caso de la hemolinfa. Además, la composición físico-química de la hemolinfa y de la sangre es muy diferente, la hemolinfa tiene un porcentaje de proteína de 6,9 (Terra et al., 1974), agua 90% (Buck, 1953) y gran cantidad de aminoácidos libres, muy diferente al 20% de proteína, 80 % de agua que contiene la sangre (Albritton, 1952, Almant et al., 1971), lo anterior sugiere que para las tres especies de *Belminus* es más fácil y rápido digerir la hemolinfa. Otro hallazgo significativo que el género *Belminus* digiere de una manera diferente la hemolinfa y la sangre es el porcentaje de pérdida de peso diaria pos ingesta, donde se observa que entre el día 1 y 2 posingesta la pérdida de peso es mucho mayor en las tres especies de *Belminus* alimentadas con hemolinfa, *B. ferroae* pierde un 32.9 %, *B. corredori* 30,6 % y *B. hererri* un 29.25 %, contra un 12 %, 6.3 % y 8.7% respectivamente en ninfas de quinto estadio alimentadas con sangre (apéndices H, I, J). También se puede observar que la sangre tiene una digestión más lenta probablemente por la cantidad mayor de ingesta inicial, muy superior a la ingesta inicial de hemolinfa, en promedio del peso después de la alimentación con sangre de las ninfas de quinto estadio de las tres especies de *Belminus* es de 0,0464 gr, con alimentación de hemolinfa es de 0,0271 gr (apéndice G).

El mayor pico de actividad proteolítica posingesta en un día específico fue encontrado en el día 11 en *B. ferroae* alimentado con hemolinfa con una absorbancia a 440 nm de 0,799, seguido por el día 2 de la misma especie con el mismo tipo de alimentación con una absorbancia a 440 nm de 0,522 (tabla 6, figura 4), lo que comprueba una vez más su adaptación a la ingesta y posterior digestión de hemolinfa.

En las tres especies de *Belminus* bajo los dos tipos de alimentación se presentan dos picos de actividad proteolítica, sin embargo el tiempo de aparición de actividad proteolítica es muy diferente en el grupo alimentado con hemolinfa que en el alimentado con sangre, en el grupo alimentado con hemolinfa ya hay actividad el primer día posingeta y el primer pico de actividad proteolítica se observa en las tres especies de *Belminus* el segundo día, esto podría ser por la presencia de aminopeptidasas que actúan sobre la hemolinfa, anteriormente se ha reportado en triatominos una ligera actividad de aminopeptidasa en el estómago que es mucho más débil que en el intestino delgado (Kollien et al., 2000), aunque altas tasas de expresión de genes similares a la catepsina, sugeridos para codificar enzimas digestivas, también son evidentes en el tejido del estómago (Balczun et al., 2012), adicionalmente se ha reportado actividad proteolítica temprana en *R. prolixus* en el estomago mediada por proteasas asparticas (Ouali et al., 2020) o por la lisis de hemocitos. En los grupos alimentados por hematofagia la actividad proteolítica se inicia en el día 5 posingeta (*B. hererri*) y el primer pico significativo se observa en el día 7 (*B.*





herri y *B. ferroae*), se han reportado altas actividades en *R. prolixus* para la catepsina B, D y la carboxipeptidasa lisosómica B, en el día 6 después de la alimentación con sangre, (Billingsley y Downe 1988; Houseman y Downe 1983b) o puede ser por lisis de hematies.

El segundo pico si correspondería a la digestión de la proteína que llega al intestino delgado y probablemente a la lisis de simbioses, en este pico también hay diferencias en los tiempos de aparición en los grupos alimentados con hemolinfa y con sangre; en el grupo de *Belminus* alimentado con hemolinfa el segundo pico de actividad proteolítica se observa en el día 8 en *B. corredori* y en el día 11 para *B. ferroae* y *B. herreri*, muy diferente a lo observado en el grupo alimentado con sangre donde el segundo pico se observa en el día 13 en *B. herreri*, día 19 para *B. ferroae* y día 20 para *B. corredori*, estas diferencias en la aparición del segundo pico de actividad proteolítica entre los grupos alimentados con hemolinfa y sangre podrían ser por las diferencias en la composición de estas dos fuentes de alimentación y por la cantidad de alimento ingerido, ya que la cantidad ingesta de hemolinfa (0,0271 gr promedio de las tres especies) es muy inferior a la cantidad de ingesta de sangre (0.0464 gr promedio de las tres especies), por lo cual el grupo alimentado con sangre realiza una digestión mucho más lenta que el grupo alimentado con hemolinfa; similares resultados han sido descritos anteriormente donde la digestión de la sangre en triatomos se produce en el transcurso de varios días (Lehane, M.J. 1991). Otro punto de vista en cuanto al segundo pico de actividad que se aprecia en *B. corredori* (día 20) y *B. ferroae* (día 19) alimentados con sangre es que están próximos a la ecdisis y la actividad proteolítica se incrementa antes de la ecdisis y a diferencia del grupo alimentado con hemolinfa que requiere en la mayoría de los casos varias alimentaciones para realizar el proceso de muda el grupo alimentado con sangre solo necesita una ingesta grande; estudios previos han reportado en *R. prolixus* un segundo pico de actividad de catepsina B en el momento de la ecdisis (Houseman y Downe, 1983b).

5.3 Caracterización de proteasas

Las proteasas caracterizadas con inhibidores específicos en las tres especies del género *Belminus* y bajo condiciones de alimentación de hemolinfagia y hematofagia son proteasas cisteínicas y asparticas, lo cual coincide con reportes previos como el realizado en *R. prolixus* donde se hallaron proteasas cisteínicas llamada catepsina B y proteasas aspárticas denominada catepsina D, estas proteasas se identificaron en los contenidos lumbales del intestino delgado por su pH óptimo y utilizando sustratos específicos (Houseman y Downe, 1983a, b). Otro reporte de Catepsina B fue descrito en el intestino medio de *R. prolixus* usando un activador tiol (Houseman, 1978). La catepsina B también se ha descrito en el intestino medio de *T. pallidipennis* y *T. infestans* utilizando activadores e inhibidores específicos (Houseman & Downe, 1981 b; Kollien et al., 2004). Niveles de Catepsina D fueron descritos utilizando tres inhibidores 5-fluorouracilo, cordicepina y cicloheximida en el intestino *R. prolixus* (Houseman y Downe, 1983a).

La mayoría de proteasas descritas en las tres especies de *Belminus* bajo alimentación de hemolinfa y sangre corresponden a proteasas cisteínicas y en menor cantidad proteasas





aspárticas, lo cual es similar a reportes hechos anteriormente donde se sugirió a la catepsina B como la proteasa digestiva principal, mientras que la catepsina D debería contribuir solo en menor medida a la actividad proteolítica general en el intestino de *R. prolixus* (Terra et al., 1988). Aunque falta dilucidar con más estudios, si las proteasas citseinicas halladas son catepsina B y las aspárticas catepsina D.

En los triatomíneos se han descrito otras proteasas como La carboxipeptidasa A y B (metaloproteasas) y la carboxipeptidasa lisosómica B (catepsina X ó catepsina B2 una carboxipeptidasa cisteínica), Catepsin L y una carboxipeptidasa serinica entre otras, lo que nos indica la gran variedad de proteasas que intervienen en la digestión de estos insectos, lo anterior unido a los resultados obtenidos en nuestra caracterización en la cual el % de inhibición no alcanza el 100% en ningún ensayo nos indicaría que posiblemente aún quedan proteasas por describir en *Belminus* spp bajo condiciones de alimentación de hemolinfagia y hematofagia.

6. CONCLUSIONES

Se establece que el pH óptimo de acción de las proteasas es 5.5 para las tres especies de *Belminus*, bajo condiciones de alimentación de hemolinfagia y hematofagia.

Los tiempos de digestión de la hemolinfa y la sangre, en las tres especies de *Belminus* es muy diferente, ya que la hidrólisis de la hemolinfa empieza el primer día de alimentación y se halla el primer pico de actividad proteolítica el segundo día, mientras en las tres especies alimentadas con sangre el primer pico solo se encuentra el séptimo día. La digestión de la de la hemolinfa es más rápida que la digestión de la sangre.

Basados en los datos obtenidos de las absorbancias en los ensayos de determinación de pH óptimo y de actividad proteolítica pos ingesta se sugiere la tendencia que tiene *B. ferroae* a estar más adaptado a la alimentación con hemolinfa, *B. herreri* tiene la tendencia a estar más adaptado a la sangre y *B. corredori* tiene resultado muy parecidos con los dos tipos de alimentación.

Las proteasas presentes en las tres especies de *Belminus* bajo condiciones de alimentación de hemolinfagia y hematofagia son las cisteínicas y aspárticas, pero las más abundantes son las proteasas cisteínicas. Se recomienda hacer más investigaciones sobre las proteasas presentes en estos insectos bajo estos dos tipos de alimentación, porque en ningún ensayo de caracterización de proteasas con inhibidores específicos se logró el 100% de inhibición y para caracterizar específicamente estas proteasas.



7. RECOMENDACIONES

Es fundamental medir el pH con microelectrodos o soluciones indicadoras universales del intestino completo y de las diferentes secciones del intestino para establecer si son ácidas, neutras o básicas, en insectos de las tres especies de *Belminus* alimentados y no alimentados con hemolinfa y sangre.

Sería importantísimo medir la actividad proteolítica pos ingesta en las diferentes partes del tracto digestivo por separado: intestino anterior, intestino medio (estómago y el intestino delgado con sus diferentes secciones) y el intestino posterior, para cuantificarla.

Es necesario hacer pruebas más específicas y con procedimientos más actuales, como secuenciación, cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión, electroforesis (Western Blot y SDS PAGE) e inmunodifusión en las diferentes partes del tracto digestivo por separado, para detectar que proteasas además de las reportadas en este estudio existen en los intestinos de las tres especies de *Belminus* alimentados con hemolinfa y sangre, ya que en todas las pruebas de caracterización nunca se alcanzó un porcentaje de inhibición del 100% lo que nos sugeriría que puede haber proteasas que no fueron detectadas, también es necesario realizar más ensayos para determinar específicamente que proteasas cisteínicas y asparticas son las que están presentes en las tres especies de *Belminus*.

Realizar pruebas de caracterización de proteasas utilizando una gama más amplia de inhibidores que puedan detectar otras proteasas diferentes a las halladas en el presente estudio.



8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albritton, E.C. (1952). Standard Values in Blood. Prepared under the direction of the Committee on the Handbook of Biological Data, American Institute of Biological Sciences, the National Research Council. W. B. Saunders Co., West Washington Square, Philadelphia 5.

Almant, P.L. & Dittmer, D.S. (1971). Blood and other body fluids. In respiration and circulation. Bethesda, MDI: Federation of American Societies of Experimental Biology. Pag. 540.

Alvarenga, E. S. L., Mansur, J. F., Justi, S. A., Figueira-Mansur, J., Dos Santos, V. M., Lopez, S. G., Masuda, H., Lara, F. A., Melo, A. C. A., & Moreira, M. F. (2015). Chitin is a component of the *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 69, 61–70.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.04.003>

Amino, R., Tanaka, A.S., & Schenkman, S. (2001). Triapsin, an unusual activable serine protease from the saliva of the hematophagous vector of Chagas' disease *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 465–472.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S09651748000151X>

Azambuja, P., Guimaraes, J.A., & Garcia, E.S. (1983). Haemolytic factor from the crop of *Rhodnius prolixus*: evidence and partial characterization. *J Insect Physiol* 29:833–837.
[https://doi.org/10.1016/0022-1910\(83\)90149-X](https://doi.org/10.1016/0022-1910(83)90149-X)

Balczun, C., Siemanowski, J., Pausch, J.K., Helling, S., Marcus, K., Stephan, C., Meyer, H.E., Schneider, T., Cizmowski, C., Oldenburg, M., Höhn, S., Meiser, C.K., Schuhmann, W., Schaub, G.A. (2012a). Intestinal aspartate proteases TiCatD and TiCatD2 of the hematophagous bug *Triatoma infestans* (Reduviidae): sequence characterisation, expression pattern and characterisation of proteolytic activity. *Insect Biochem Mol Biol.*
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.12.006>

Balczun, C., Meiser, C.K., & Schaub, G.A. (2012b). Chapter 12, Triatomines as Vectors of American Tripanosomiasis. *Arthropods as Vectors of Emerging Diseases. Parasitology Research Monograph 3.* Heinz Mehlhorn Editor. Springer. Pag.275-300.

Barrett, A. J., Kembhavi, A. A., Brown M. A., Kirschke, H., Knight, C. G., Tamai, M., & Hanada, K. (1982). L-trans-epoxysuccinylleucylamido (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* 201, 189-198.
<https://portlandpress.com/biochemj/article/201/1/189/13523/L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido-4-guanidino>

Barros, V.C., Assumpcao, J.G., Cadete, A.M., Santos, V.C., Cavalcante, R.R., Araújo, R.N., Pereira, M.H., & Gontijo, N.F. (2009) The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes. *PLoS One* 4(6): e6047





Ben-Mahmoud, S., Ramos, J., Shatters Jr, R., Rougé, P., Powell, C., Smagghe, G., & Borovsky, D. (2014). Cloning and characterization of a basic cysteine-like protease (cathepsin L1) expressed in the gut of larval *Diaprepes abbreviatus* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Insect Physiology*. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.11.001>

Beyond, R. & Bond, J.S. (2001). *Proteolytic Enzymes*, second edition. Oxford University press. p. 322.

Billingsley, P.F., & Downe, A.E.R. (1988). Ultrastructural localization of cathepsin B in the midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Reduviidae) during blood digestion. *Int J Insect Morphol Embryol* 17:295–302. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(88\)90010-4](https://doi.org/10.1016/0020-7322(88)90010-4)

Billker, O., Miller, A. J. & Sinden, R. E. (2000). Determination of mosquito bloodmeal pH in situ by ion-selective microelectrode measurement: implications for the regulation of malarial gametogenesis. *Parasitology* 120, 547–551.

Bleackley, R. C., Lobe, C. G., Duggan, B., Ehrman, N., Fregeau, C., Meier, M., Letellier, M., Havele, C., Shaw, J., & Paetkau, V. (1988). The isolation and characterization of a family of serine protease genes expressed in activated cytotoxic T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 103: 5. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1988.tb00746.x>

Blow, F., & Douglas, A. E. (2019). The hemolymph microbiome of insects. *Journal of Insect Physiology*, 115(April), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.04.002>

Bond, J.S. & Butler, P.E. (1987). Intracellular proteases. *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 333. <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.bi.56.070187.002001>

Borges, E.C., Machado E.M.M., Garcia E.S., & Azambuja, P. (2006) *Trypanosoma cruzi*: effects of infection on cathepsin D activity in the midgut of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol* 112:130–133. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.09.008>

Brown, J. J., Rodríguez-Ruano, S. M., Poosakkannu, A., Batani, G., Schmidt, J. O., Roachel, W., Zima, J. J., Hypša, V., & Nováková, E. (2020). Ontogeny, species identity and environment dominate microbiome dynamics in wild populations of kissing bugs (Triatominae). *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.06.05.135871>

Buarque, D. S., Braz, G. R. C., Martins, R. M., Tanaka-Azevedo, A. M., Gomes, C. M., Oliveira, F. A. A., Schenkman, S., & Tanaka, A. S. (2013). Differential Expression Profiles in the Midgut of *Triatoma infestans* Infected with *Trypanosoma cruzi*. *PLOS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061203>

Burgos, M.H., Gutierrez, L.S., Lammuel, E., & Isola, E.L. (1989). Midgut extract rich in peritrophic membrane from *Triatoma infestans* induces differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc. electr_on. Biol. Cel.* 13, 151e166.

Buck, J. B. (1953). Physical properties and chemical composition of insect blood, in *Insect Physiology*, (K. D. Roeder, editor), New York, John Wiley and Sons, Inc., , 147.





Calderón Arguedas, O., Chinchilla, M., García, F., & Vargas, M. (2003). Variaciones biológicas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) asociadas con la ingestión de diferentes tipos de sangre por el vector (Hemiptera: Reduviidae). *Parasitol. Latinoam.* 58 (2), 3–10. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122003000100001>

Carcavallo, R.U., Rocha da Silva, D., Galíndez, G., Itamar, Sherlock I., Galvão, C., Martínez, A., & Tonn, R.J. Cortón E (1998). Feeding sources and patterns. In: Carcavallo R, Galíndez I, Jurberg J, Lent H (eds). *Atlas Of Chagas Disease Vectors in the Americas*. Fiocruz, Rio de Janeiro.

Castillo Neyra, R., Chou, C. L., Quispe Machaca, V., Ancca Juarez, J., Malaga Chavez, F.S., Bastos Mazuelos, M., Naquira, C., Bern, C., Gilman, R.H., & Levy, M. Z. (2015). The potential of canine sentinels for reemerging *Trypanosoma cruzi* transmission. *Prev. Met. Med.* 120, 349-356 <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.04.014>

Chapman, R.F. (1998). *The insects: structure and function*. New York: Cambridge University Press. Pag.53-55. ISBN-13 978-0-521-57890-5.

Christeller, J.T., Farley, P.C., Ramsay, R.J., Sullivan, P.A., & Laing, W.A. (1998). Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudates, *Eur. J. Biochem.* 254. 160–167. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1432-1327.1998.2540160.x>

Christensen, H.A., Sousa, O.E., & de Vasquez, A.M. (1988). Host feeding profiles of *Triatoma dimidiata* in peridomestic habitats of western Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38, 477–479. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.38.477>

Cobben, R. H. (1978). *Evolutionary trends in Heteroptera Part II: Mouthpart-structures and feeding strategies*. Wageningen, Mededelingen Landbouwhogeschool 78-5. H. Veenman & Zonen B.V., v+407 p <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/294330>

Cohen, A.C. (1993). Organization of digestion and preliminary characterization of salivary trypsin-like enzymes in a predaceous Heteropteran, *Zelus renardii*. *Journal of Insect Physiology* 39, 823–829. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(93\)90114-7](https://doi.org/10.1016/0022-1910(93)90114-7)

Colebatch, Gillian., Eats, Peter., & Cooper, Paul. (2001). Preliminary characterization of digestive proteases of the green mirid *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochemistry and molecular biology.* 31. Pag. 415-423. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00136-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00136-3)

Darvishzadeh, A., Bandani, A., Amiri, A., & Mousavi, S. (2015). Serine and cysteine proteases of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) larvae raised on date palms (*Phoenix dactylifera*). *Journal of Asia-Pacific Entomology.* <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2015.07.008>

De Fuentes-Vicente, J. A., Gutiérrez-Cabrera, A. E., Flores-Villegas, A. L., Lowenberger, C., Benelli, G., Salazar-Schettino, P. M., & Córdoba-Aguilar, A. (2018). What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. *Acta Tropica*, 183, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.04.008>





Deu, E., Verdoes M., & Bogyo, M. (2012). New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery. *Nat Struct Mol Biol* 19, 9-16. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2203>

Dorn, P.L., Justi, S.A., Dale, C., Stevens, L., Galvão, C., Lima-Cordón, & R., Monroy, C. (2018). Description of *Triatoma mopan* sp. n. from a cave in Belize (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys* 775, 69–95. <https://doi.org/10.3897/zookeys.775.22553>.

Dos Santos, C., Da costa Marques, M., Tenorio, H., Carvalho, E., & Vieira, H. (2016). Purification and characterization of trypsin from *Luphiosilurus alexandri* pyloric cecum. *Biochemistry and Biophysics Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.08.003>

Dunn, B.M. (1989) In *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*, R.J. Beynon and J.S. Bond, eds. (IRL Press,), p. 63.

Ferreira, C., Ribeiro, A.F., Garcia, E.S., & Terra, W.R. (1988) Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. *Insect Biochem* 18:521–530. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(88\)90003-0](https://doi.org/10.1016/0020-1790(88)90003-0)

Florkin, M., & Jeuniaux, C. (1964). Hemolymph: composition. In *The Physiology of Insecta* (Edited by Rockstein, M.), Vol. 3, pp. 109-152. Academic Press, New York.

Foissac, X., Edwards, M.G., Du, J.P., Gatehouse, A.M.R., & Gatehouse, J.A. (2002). Putative protein digestion in a sap-sucking homopteran plant pest (rice brown plant hopper; *Nilaparvata lugens*: Delphacidae) identification of trypsin like and cathepsin B-like proteases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 967–978. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00033-4)

Galvão, C., & Angulo, V.M. (2006). *Belminus corredori*, a new species of *Bolboderini* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. *Zootaxa* 1241: 61-68. https://www.researchgate.net/profile/Cleber_Galvao/publication/279893840_Belminus_Corredori_A_New_Species_Of_Bolboderini_Hemiptera_Reduviidae_Triatominae_From_Santander_Colombia/links/5d3e0350a6fdcc370a694741/Belminus-Corredori-A-New-Species-Of-Bolboderini-Hemiptera-Reduviidae-Triatominae-From-Santander-Colombia.pdf

Garcia, E.S., & Guimarães, J.A. (1979). Proteolytic enzymes in the *Rhodnius prolixus* midgut. *Experientia* 35, 305–306. <https://doi.org/10.1007/BF01964315>

Garcia, E.S., & Garcia, M.L.M. (1977). Control of protease secretion in intestine of fifth instar larvae of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 23, 247e251. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(77\)90038-5](https://doi.org/10.1016/0022-1910(77)90038-5)

Gaunt, M., & Miles, M. (2000). The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 557-565. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762000000400019>

Ghilchik, M. W., & Morris, A. S. (1971). Modification of hyperacute rejection of sheep kidney heterografts in the dog using a trypsin inhibitor. *Nature* 233: 557. <https://doi.org/10.1038/233557a0>





Gold, A. (1967) Sulfonylation with sulfonyl halides *Methods in Enzymology*, vol. 11, 706 (1967).

Gold, A. & Fahrney, D. (1964). Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. II. Formation and Reactions of Phenylmethanesulfonyl α -Chymotrypsin *Biochemistry*, vol. 3, 783. <https://doi.org/10.1021/bi00894a009>

Goldberg, A. L., & Rock, K. L. (1992) Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 357: 375. <https://doi.org/10.1038/357375a0>

Gomis-Rüth, F.X. (2003). Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol. Biotechnol.* 24:157–202. <https://doi.org/10.1385/MB:24:2:157>

González, A.E. (2010). *Histología y biología celular*, Teresa Fortoul y Andrés Castell. Editorial McGraw Hill, primera edición. Pag. 147-149. ISBN: 978-607-15-0340-4.

Gonzalez, M.S., Nogueira, N.F., Mello, C.B., De Souza, W., Schaub, G.A., Azambuja, P., & Garcia, E.S. (1999). Influence of brain and azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol.* 92, 100e108. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4387>

Gonzales, M.S., Azambuja, P., de Souza, W., Feder, D., Nogueira, N.F., & Garcia, E.S. (1998). Role of the head in the ultrastructural midgut organization in *Rhodnius prolixus* larvae: evidence from head transplantation experiments and ecdysone therapy. *J. Insect Physiol.* 44, 553e560. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00048-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00048-1)

Goodchild, A.J.P. (1952). A study of the digestive system of the West African cacao capsid bugs (Hemiptera Miridae). *Proceedings of the Zoological Society of London* 122, 543–572.

Goodchild, A.J.P. (1966). Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. *Biological Reviews* 41, 97–140. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1966.tb01540.x>

Gorchakov, R., Trosclair, L. P., Wozniak, E. J., Fera, P. T., Garcia, M. N., Gunter, S. M., & Murray, K.O. (2016). *Trypanosoma cruzi* Infection Prevalence and Bloodmeal Analysis in Triatomine Vectors of Chagas Disease from Rural Peridomestic Locations in Texas, 2013-2014. *Journal of Medical Entomology*, 53(4), 911–918. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw040>

Govrin, E., & Levine, A. (1999). Purification of Active Cysteine Proteases by Affinity Chromatography with Attached E-64 Inhibitor. *Protein Expression and Purification* 15, 247–250. <https://doi.org/10.1006/prep.1999.1033>

Grillo, L.A.M., Majerowicz, D., & Gondim, K.C. (2007). Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): role of a midgut triacylglycerol-lipase. *Insect Biochem Mol Biol* 37:579–588. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.03.002>

Gutschmidt, S., Hoper, R., & Gossrau, R. (1984). Kinetic characterization of brush border membrane proteases in relationship to mucosal architecture by section biochemistry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 167: 209. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9355-3_16

Hara, S., Halicka, D., Bruno, S., Gong, J., Traganos, F., & Darzynkiewicz, Z. (1996). Effect of Protease Inhibitors on Early Events of Apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 223, 372. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0092>.



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



Hedstrom, L. (2002). Serine Protease Mechanism and Specificity *Chem. Rev.*, 102(12), 4501-4524. <https://doi.org/10.1021/cr000033x>

Heimpel, A. M. (1955). *Canad. J. Zool.*, 33, 99.

Herrer, A., Lent, H., & Wygodzinsky, P. (1954). Contribución al conocimiento del género *Belminus* Stål, 1859 (Triatominae, Reduviidae, Hemiptera). *An Inst Med Reg Tucumán* 4: 85-106.

Herrer, A. (1955). Tripanosomiasis americana en el Perú. V. Triatominos del valle interandino del Marañón. *Rev Perú Med Exp Salud Publica* 9: 69-81. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v9n1-2/a09v9n1-2.pdf>

Hori, K. (1970). Some variations in the activities of salivary amylase and protease of *Lygus disponsi* Linnavuori (Hemiptera: Miridae). *Applied Entomology and Zoology* 5, 51–61. <https://doi.org/10.1303/aez.5.51>

Houseman, J.G., Morrison, P.E., & Downe, A.E.R. (1985). Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of *Phymata wolffii* Stål (Hemiptera: Phymatidae). *Canadian Journal of Zoology* 63, 1288–1291. <https://doi.org/10.1139/z85-193>

Houseman, J.G., Macnaughton, W.K., & Downe, A.E.R. (1984). Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of *Euschistis euschistoides* (Hemiptera: Pentatomidae). *Canadian Journal of Entomology* 116, 1393–1396. <https://doi.org/10.4039/Ent1161393-10>

Houseman, J.G., & Downe, A.E.R. (1983b). Activity cycles and the control of four digestive proteinases in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Reduviidae). *J Insect Physiol* 29:141–148. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(83\)90137-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(83)90137-3)

Houseman, J.G., & Downe, A.E.R. (1983a). Activity cycles and the control of four digestive proteinases in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *J. Insect Physiol.* 29, 141–148. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(83\)90137-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(83)90137-3)

Houseman, J.G., & Downe, A.E.R. (1982b). Identification and partial characterization of digestive proteases from two species of bedbug (Hemiptera: Cimicidae). *Canadian Journal of Zoology* 60, 1837– 1840. <https://doi.org/10.1139/z82-238>

Houseman, J.G., & Downe, A.E.R. (1982a). Characterisation of an acidic protease from the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry* 12, 651–655. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(82\)90052-X](https://doi.org/10.1016/0020-1790(82)90052-X)

Houseman, J.G., & Downe, A.E.R. (1981b). Identification and partial characterization of digestive proteinases from *Triatoma phyllosoma pallidipennis* Stål (Hemiptera:Reduviidae). *Comp. Biochem. Physiol.* B70, 713–717. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(81\)90006-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(81)90006-7)





Houseman, J.G., & Downe, A.E.R. (1981a). Exoproteinase activity in posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem.* 11, 579–582. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(81\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0020-1790(81)90026-3)

Houseman, J.G., & Downe, A.E.R. (1980). Endoproteinase activity in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera, Reduviidae). *Insect Biochem.* 10, 363e366. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(80\)90004-9](https://doi.org/10.1016/0020-1790(80)90004-9)

Houseman, J. (1978). A thiol-activated digestive protease from adults of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Canadian Journal of Zoology* 56, 1140–1143. <https://doi.org/10.1139/z78-157>

Huang, Y., Sheikh, M.S., Fornace Jr. A.J., & Holbrook, N.J. (1999). Serine protease inhibitor TPCK prevents taxol-induced cell death and blocks c-Raf-1 and Bcl-2 phosphorylation in human breast carcinoma cells, *Oncogene* 18. 3431–3439. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202685>

Isola, E.L., Lammel, E.M., & Gonzalez Cappa, S.M. (1986). *Trypanosoma cruzi*: differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate. *Exp. Parasitol.* 62, 329e335. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(86\)90039-1](https://doi.org/10.1016/0014-4894(86)90039-1)

Isola, E.L., Lammel, E.M., Katzin, V.J., & Gonzalez Cappa, S.M., (1981). Influence of organ extracts of *Triatoma infestans* on differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 67, 53e58. <https://www.jstor.org/stable/3280778>

Jansen, A.M., Roque, A.L.R., & Xavier, S.C.C. (2017). *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: general aspects, domestic and synanthropic hosts and reservoirs. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. *American Trypanosomiasis*. 2nd ed. London: Elsevier. p. 243–64 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00012-5>

Jung, G., Ueno, H., & Hayashi, R. (1998). Proton-relay system of carboxypeptidase Y as a sole catalytic site: studies on mutagenic replacement of His 397. *J. Biochem.* 124, 446–450. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022133>

Jurberg, J., Rocha, D.S., & Galvão, C. (2009). *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota Neotrop* 9: 123-128. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032009000100014>

Katunuma, N. & Kominami, E. (1995). Structure, Properties, Mechanisms, and Assays of Cysteine Protease Inhibitors: Cystatins and E-64 Derivatives *Methods Enzymol.*, 251, 382. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687995511423>

Kollien, A.H., Waniek, P.J., Nisbet, A.J., Billingsley, P.F., & Schaub, G.A. (2004). Activity and sequence characterization of two cysteine proteases in the digestive tract of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Insect Mol. Biol.* 13, 569e579. <https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00504.x>

Kollien, A.H., & Schaub, G.A. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol Today* 16:381–387. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01724-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01724-5)





Kollien, A.H., Schmidt, J., & Schaub, G.A. (1998). Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta Trop.* 70, 127e141. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00117-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00117-4)

Kreft, S., Ravnkar, M., Mesko, P., Pungercar, J., Umek, A., Kregar, I., & Strukelj, B. (1997). Jasmonic acid inducible aspartic proteinase inhibitors from potato, *Phytochemistry* 44 (1997) 1001–1006. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00668-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00668-1)

Lassoued, I., Hajji, S., Mhamdi, S., Jridi, M., Bayouhd, A., Barkia, A. & Nasri, M. (2015). Digestive alkaline proteases from thornback ray (*Raja clavata*): Characteristics and applications Laboratory. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.038>

Lehane, M.J. (2005). Managing the blood meal. In: Lehane, M.J. (Ed.), *Biology of Blood-Sucking Insects*, second ed. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 84-115.

Lehane, M.J. (1994). Digestive enzymes, hemolysins and symbionts in the search for vaccines against blood sucking insects. *Int. J. Parasitol.* 24, 27e32. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)90056-6)

Lehane, M.J. (1991). Managing the blood meal. In: Lehane MJ (ed) *Biology of blood-sucking insects*. Harper Collins, London, pp 79–110.

Lenarcic, B., & Turk, V. (1999). Thyroglobulin Type-1 domains in equistatin inhibit both papain-like cysteine proteinases and cathepsin D, *J. Biol. Chem.* 274. 563–566. Doi: 10.1074/jbc.274.2.563 o <https://www.jbc.org/content/274/2/563.short>

Lent, H., Jurberg, J. & Carcavallo, R.U. (1995) *Belminus laportei* sp. n. da Região Amazônica. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90, 33–39. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02761995000100008>.

Lent, H., & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 123-520. <http://hdl.handle.net/2246/1282> o <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19822902845>

Li, W., Zhao, X., Yuan, W., & Wu, K. (2016). Activities of Digestive Enzymes in the Omnivorous Pest *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Economic Entomology*, 1–10, doi: 10.1093/jee/tow263. <https://doi.org/10.1093/jee/tow263>

Lima-Cordón, R.A., Monroy, M.C., Stevens, L., Rodas, A., Rodas, G.A., Dorn, P.L., & Justi, S.A., (2019). Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys*. 820, 51–70. <https://doi.org/10.3897/zookeys.820.27258>.

Lomate, P.R., & Bonning, B.C. (2016). Distinct properties of proteases and nucleases in the gut, salivary gland and saliva of southern green stink bug, *Nezara viridula*. *Scientific Reports* | 6:27587. <https://doi.org/10.1038/srep27587>





Lopez Ordoñez, T., Rodríguez, M.H., & Hernandez-Hernandez, F.D. (2001). Characterization of a cDNA encoding a cathepsin L-like protein of *Rhodnius prolixus*. *Insect Mol. Biol.* 10, 505e511. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1075.2001.00290.x>

Lotspeich-Steininger; C.A.; Stiene-Martin, E.A.; & Koepke, J.A. (1992). *Clinical Hematology: Principles, Procedures, Correlations*. Lippincott (Philadelphia, PA) p. 18.

Marciniszyn, J. (1977), *Adv. Exp. Med. Biol.* 95, 199.

Matsumoto, K., Yamamoto, D., Ohishi, H., Tomoo, K., Ishida, T., Inoue, M., Sadatome, T., Kitamura, K., & Mizuno, H. (1989). Mode of binding of E-64-c, a potent thiol protease inhibitor, to papain as determined by X-ray crystal analysis of the complex. *FEBS Lett.* 245, 177–180.

Meiser, C.K., Piechura, H., Meyer, H.E., Warscheid, B., Schaub, G.A., & Balczun, C. (2010). A salivary serine protease of the haematophagous reduviid *Panstrongylus megistus*: sequence characterization, expression pattern and characterization of proteolytic activity. *Insect Mol. Biol.* 19, 409–421.

Monteiro, F. A., Weirauch, C., Felix, M., Lazoski, C., & Abad-Franch, F. (2018). Evolution, Systematics, and Biogeography of the Triatominae, Vectors of Chagas Disease. *Advances in Parasitology*, 99, 265–344. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2017.12.002>

Morrissey, J. H., Fakhrai, H., & Edgington, T. S. (1987). Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. *Cell* 50: 129. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90669-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90669-6)

Murdock, L.L.; Brookhart, G.; Dunn, P.E.; Foard, D.E., & Kelley, S. (1987). Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology-B*. vol. 87, p. 783-787. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(87\)90388-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(87)90388-9)

NC-IUBMB, (2020). Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse. Available at: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC34/>

Nandan, A., & Nampoothiri, K. M. (2020). Therapeutic and biotechnological applications of substrate specific microbial aminopeptidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104 (12), 5243–5257. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10641-9>

Napoleão, T. H., Albuquerque, L. P., Santos, N. D. L., Nova, I. C. V., Lima, T. A., Paiva, P. M. G., & Pontual, E. V. (2019). Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. *Pest Management Science*, 75(5), 1212–1222. <https://doi.org/10.1002/ps.5233>

Nascimento, J.D., Ravazi, A., Alevi, K.C.C., Pardo-Diaz, C., Salgado-Roa, F.C., da Rosa, J.A., de Azeredo Oliveira, M.T.V., de Oliveira, J., Hernández, C., Salazar, C., & Ramírez, J.D. (2019). Taxonomical over splitting in the *Rhodnius prolixus* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) clade: are *R. taquarussuensis* (da Rosa et al., 2017) and *R. neglectus* (Lent, 1954) the same species? *PLoS One* 14, e0211285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211285>



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



Nogueira, N.F., González, M., Garcia, E.M., & de Souza, W. (1997). Effect of azadirachtin A on the fine structure of the midgut of *Rhodnius prolixus*. *J. Invertebr. Pathol.* 69, 58e63.
<https://doi.org/10.1006/jipa.1996.4635>

Noireau, F., & Dujardin, J.P. (2010). Biology of Triatominae. In: Telleria J, Tibayrenc M (eds) *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research*. Elsevier insights, London.

Nunome, J., & Horiba, M. (1955). *J. Sericult. Sc. Japan*, 24, 35.

Oliveira, J., Ayala, J.M., Justi, S.A., Rosa, J.A., & Galvão, C. (2018). Description of a new species of *Nesotriatoma* Usinger, 1944 from Cuba and revalidation of synonymy between *Nesotriatoma bruneri* (Usinger, 1944) and *N. flavida* (Neiva, 1911) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *J. Vector Ecol.* 43, 148–157. <https://doi.org/10.1111/jvec.12294>.

Oliveira, J. & Alevi, K.C.C. (2017). Taxonomic status of *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 and the number of Chagas disease vectors. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 50, 434–435.
<https://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v50n3/0037-8682-rsbmt-50-03-00434.pdf>

Ong, E.B., Shaw, E., & Schoellmann, G. (1965). The Identification of the Histidine Residue at the Active Center of Chymotrypsin. *J. Biol. Chem.*, 240, 694.
<https://pdfs.semanticscholar.org/9915/004cd1bbbc0b1e8497625a84cf8f75ac38bd.pdf>

Osuna, E. & Ayala, J.M. (1993). *Belminus pittieri*, nueva especie de *Bolboderini* (Triatominae: Reduviidae: Heteroptera). *Boletín de Entomología Venezolana*, 8, 147–150.

Ouali, R., de Brito, K. C. V., Salmon, D., & Bousbata, S. (2020). High-throughput identification of the *Rhodnius prolixus* midgut proteome unravels a sophisticated hematophagic machinery. *Proteomes*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/PROTEOMES8030016>

Patel, S., Siroya, H., & Upadhyay, D. (2020). Study on Proteases: A Review. *Studies in Indian Place Names (UGC care journal)*, 71, 216–223.

Pasternack, M. S., Sitkovsky, M. V., & Eisen, H. N. (1983). The site of action of N-a-tosyl-L-lysyl-chloromethyl-ketone (TLCK) on cloned cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* 131: 2477.

Poinar, G. (2019). A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. *Cretac. Res.* 93, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2018.09.004>.

Pong, S.S., Nuss, D.L., & Koch, G. (1975). Inhibition of Initiation of Protein Synthesis in Mammalian Tissue Culture Cells by L-1-Tosylamido-2-phenylethyl Chloromethyl Ketone. *J. Biol. Chem.*, 250, 240. <https://www.jbc.org/content/250/1/240.full.pdf>

Powers, J.C., Asgian, J.L., Erci O.D., & James, K.E. (2002). Irreversible inhibitors of serine, cysteine and threonine proteases. *Chem. Rev.*, 102(12), 4639-4750.
<https://doi.org/10.1021/cr010182v>





Quan, P. C., Ishizaka, T., & Bloom, B. R. (1982). Studies on the mechanism of NK cell lysis. *J. Immunol.* 128: 1786. <https://www.jimmunol.org/content/128/4/1786.short>

Quintal, R.E., & Polanco, G.G. (1977). Feeding preferences of *Triatoma dimidiata maculipennis* in Yucatan, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*; 26:176–178. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1977.26.176>

Ramzi, S., & Zibae, A. (2014). Digestive proteolytic activity in *Apodiphus amygdali* Germar (Hemiptera: Pentatomidae): effect of endogenous inhibitors. *Journal of Entomological And Acarological Research*. Volume 46:1868. <https://doi.org/10.4081/jear.2014.1868>

Rawlings, N.D., Barrett, A.J., & Bateman, A., (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 38, D227–D233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp971>

Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Mehta, D.P., & Freeze, H.N. (1998). “Handbook of proteolytic Enzymes”, *Handb. Proteolytic Enzym.*, Vol 1, pp. 1983-1941.

Ribeiro, J. M. C., Genta, F. A., Sorgine, M. H. F., Logullo, R., Mesquita, R. D., Paiva-Silva, G. O., Majerowicz, D., Medeiros, M., Koerich, L., Terra, W. R., Ferreira, C., Pimentel, A. C., Bisch, P. M., Leite, D. C., Diniz, M. M. P., da Junior, J. L. S. G. V., Da Silva, M. L., Araujo, R. N., Gandara, A. C. P., & Oliveira, P. L. (2014). An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug, *Rhodnius prolixus*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), 27. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002594>

Rimoldi, O.J., Peluffo, R.O., González, S.M., & Brenner, R.R. (1985). Lipid digestion, absorption and transport in *Triatoma infestans*. *Comp Biochem Physiol B* 82:187–190. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(85\)90150-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(85)90150-6)

Rosa, J.A., Solano, R.C., Gardim, S., Pinto, M.R., Mendonça, V.G., Ferreira Filho, J.C., Carvalho, E.O., Camargo, L.M., Oliveira, J., Nascimento, J.D., Cilense, M., & Almeida, C.E. (2012). Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa* 3472: 62-76. <https://www.mapress.com/j/zt/article/view/zootaxa.3478.1.8/23650>

Rokhlin, O.W., Guseva, N.V., Taghiyev, A.F., Glover, R.A., & Cohen, M.B. (2004). Multiple effects of N-alpha-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK) on apoptotic pathways in human prostatic carcinoma cell lines, *Cancer Biol. Ther.* 3., 761–768. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.8.970>

Salvatella, R., Basmadjian, Y., Rosa, R., & Puime, A. (1993). *Triatoma delpontei* Romaña & Abalos, 1947 (Hemiptera, Triatominae) en el estado brasileño de Rio Grande do Sul. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 35:73-6 <https://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v35n1/a10v35n1.pdf>

Sandoval, C.M., Nieves Blanco, E.E., Gutiérrez, R., Jaimes, D.A., Ortiz, N., Otarola, F., & Aldana, J. (2015). Morphometric Analysis of the Host Effect on Phenotypical Variation of *Belminus ferroae* (Hemiptera: Triatominae). *Psyche*, ID 613614, 12 pages. <https://doi.org/10.1155/2015/613614>

Sandoval, C.M., Medone, P., Nieves, E.E., Jaimes, D.A., Ortiz, N., & Rabinovich, J.E. (2013). Demographic fitness of *Belminus ferroae* (Hemiptera: Triatominae) on three different host under



“Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz”

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



laboratory conditions. *Memories institute Oswaldo Cruz*, Vol. 108(7), p: 854-864.
<https://doi.org/10.1590/0074-0276130211>

Sandoval, C.M., Ortiz, N., Jaimes, D., Lorosa, E., Galvão, C., Rodriguez, O., Scorza, J.V., & Gutiérrez, R. (2010). Feeding behaviour of *Belminus ferroae* (Hemiptera: Reduviidae), a predaceous Triatominae colonizing rural houses in Norte de Santander, Colombia. *Medical and Veterinary Entomology* 24: 124-131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00868.x>

Sandoval, C.M., Pabón, E., Jurberg, J., & Galvão, C. (2007). *Belminus ferroae* sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1443: 55-64. <https://www.mapress.com/j/zt/article/view/3295>

Sandoval, C.M., Duarte, R., Gutiérrez, R., Rocha, D.S., Angulo, V.M., Esteban, L., Reyes, M., Jurberg, J., & Galvão, C. (2004). Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 137-140. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000200004>

Sandoval, C.M., Joya, M.I., Gutiérrez, R., & Angulo, V.M. (2000). Cleptohaematophagy of the Triatomine bug *Belminus herreri*. *Med Vet Entomol* 14: 100-101. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00210.x>

Sarath, G., De La Motte, R., & Wagner, F. (1989). Protease assay methods. In: Beynon, R.J., Bond, J.S. (Eds.), *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, pp. 25–55.

Schaub, G.A., Meiser, C.K., & Balczun, C. (2011) Interactions of *Trypanosoma cruzi* and triatomines. In: Mehlhorn H (ed) *Progress in parasitology*, vol 2, Parasitology research monographs. Springer, Berlin, pp 155–178.

Schaub, G.A. (2009). Interactions of trypanosomatids and triatomines. *Adv. Insect Physiol.* 37, 177e242. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(09\)37004-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(09)37004-6)

Schaub, G.A. (2008). Kissing bugs. In: Mehlhorn H (ed) *Encyclopedia of parasitology*, vol 1, 3rd edn. Springer, Heidelberg, pp 684–686.

Schechter, I., & Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157–162.

Schoellmann, G., & Shaw, E. (1963). Direct Evidence for the Presence of Histidine in the Active Center of Chymotrypsin. *Biochem.*, 2, 252. <https://doi.org/10.1021/bi00902a008>.

Schoellmann, G., & Shaw, E. (1962). A new method for labelling the active center of chymotrypsin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7. 36–40. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(62\)90140-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(62)90140-7)

Schofield, C.J., & Galvão, C. (2009). Classification, evolution and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110: 88-100. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.010>





Schofield, C.J. (1996). Overview – biosystematics of the Reduviidae. In: Schofield, C.J., Dujardin, J.P., Jurberg, J. (Eds.), Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae. Santo Domingo de Los Colorados, Ecuador Mexico City, INDRE, pp. 483–516.

Segura Egea, J.J., Jiménez Rubio-Manzanares, A., Llamas Cadaval, R., & Jiménez Planas, A. (1997). El ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) y su uso en endodoncia. ENDODONCIA Volumen 15 Número 2 Abril-Junio 1997- <https://personal.us.es/segurajj/documentos/CV-Art-Sin%20JCR/Endodoncia-Edta-1997.pdf>

Sharma, A., & Radha Kishan, K.V. (2011). Serine protease inhibitor mediated peptide band re-synthesis in diverse protein molecules. FEBS Letters 585. 3465-3470. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.004>

Shaw, E., & Glover, G. (1970). Further observations on substrate-derived chloromethyl ketones that inactivate trypsin Arch. Biochem. Biophys., 139, 298. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90481-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90481-9)

Shaw, E., Mares-guia, M., & Cohen, W. (1965) Evidence for an Active-Center Histidine in Trypsin through Use of a Specific Reagent, 1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone, the Chloromethyl Ketone Derived from N^α-Tosyl-L-lysine *Biochem.*, 4, 2219. <https://doi.org/10.1021/bi00886a039>

Sigma-Aldrich. (2018). PMSF. Recuperado de https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p7626pis.pdf

Sigma.Aldrich. (2001). Pepstatin A. Recuperado de http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p5318pis.pdf

Silva, C.P., & Terra, W.R. (1994). Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Insect Biochemistry and Molecular Biology 24, 493–505. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(94\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)90044-2)

Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Caffrey, C.R., Mareš, M., & Kopáček, P. (2013). New insights into the machinery of blood digestion by ticks. Trends Parasitol.;29(6): 276–85. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.04.002>

Solomon, D. H., O'Brian, C. A., & Weinstein, I. B. (1985). N-a-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone and N-a-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone inhibit protein kinase C. *FEBS Lett.* 190:342. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)81315-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)81315-6)

Sreedharan, S.K., Verma, C., Caves, L.S.D., Brocklehurs, S.M., Gharbias, S.E., Shars, H.N., & Brocklehurs, K. (1996). Demonstration that 1-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64) is one of the most effective low Mr inhibitors of trypsin-catalysed hydrolysis. Characterization by kinetic analysis and by energy minimization and molecular dynamics simulation of the E-64-β-trypsin complex. *Biochem. J.*, 316, 777.





<https://portlandpress.com/biochemj/article/316/3/777/32656/Demonstration-that-1-trans-epoxysuccinyl-l>

Stål, C. (1859). Monographie der Gattung *Conorhinus* and Verwandten. Berliner Entomologische Zeitschrift, 3, 99–117. <https://doi.org/10.1002/mmnd.18590030202>

Tamaki, F., Pimentel, A., Dias, A., Cardoso, A., Ribeiro, A., Ferreira, C., & Terra, W. (2014). Physiology of digestion and the molecular characterization of the major digestive enzymes from *Periplaneta Americana*. Journal of Insect Physiology. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.08.007>

Takahashi, K., & Chang, W. J. (1976). The Structure and Function of Acid Proteases J. Biochem.(Tokyo), 80, 497. https://www.jstage.jst.go.jp/article/biochemistry1922/80/3/80_3_497/pdf/-char/ja

Takanona, T., & Hori, K. (1974). Digestive enzymes in the salivary gland and midgut of the bug *Stenotus binotatus*. Comparative Biochemistry and Physiology 47A, 521–528. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(74\)90015-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(74)90015-2)

Terra, W.R., & Ferreira, C. (2005). Biochemistry of digestion. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), Comprehensive Molecular Insect Science, vol. 4. Elsevier, Oxford, pp. 171–224.

Terra, W.R., Ferreira, C., Jordão, B.P., & Dillon, R.J. (1996). Digestive enzymes. In: Lehane, M.J., Billingsley, P.F. (Eds.), Biology of the Insect Midgut. Chapman & Hall, London, pp. 153–194.

Terra, W.R., & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comparative Biochemistry and Physiology 109B, 1–62. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90141-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90141-4)

Terra, W.R. (1988). Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 21, 675–734.

Terra, W.R., Ferreira, C., & Garcia, E.S. (1988). Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. Insect Biochem 18:423–434. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(88\)90058-3](https://doi.org/10.1016/0020-1790(88)90058-3)

Terra, W. R., De Bianchi, G. & Lara, F. J. S. (1974). Physical properties and chemical composition of the haemolymph of *Rhynchosociara americana* (Diptera) larvae. Comp. Biochem. Physiol. 47B, 117-129.

Turini, P., Kurooka, S., Steer, M., Corbascio, A., & Singer T.P. (1969). The action of phenylmethylsulfonyl Fluoride on human acetylcholinesterase, chymotrypsin and trypsin. J. Pharmacol. Exp. Ther., vol. 167, 98. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.864.7652&rep=rep1&type=pdf>

Umezawa, H., Takita, T., & Shiba, T. (1978). Bioactive Peptides Produced by Microorganisms, Halsted, New York.

Umezawa, H. (1976). *Methods in Enzymology*, **45**, 689



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



Umezawa, H., Ayogi, T., Morishima, H., Matsuzaki, M., Hamada, M., & Takeuchi, T. (1970). Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes, *J. Antibiot.* 23. 259–262. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.23.259>

van der Hoorn, R.A. (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu Rev Plant Biol.* 59:191-223. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092835>

Vaseva, I., Sabotic, J., Sustar-Vozlic, J., Meglic, V., Kidric, M., Demirevska, K., & Simova-Stoilova L. (2012). The response of plants to drought stress: the role of dehydrins, chaperones, proteases and protease inhibitors in maintaining cellular protein function. In: Droughts: New Research. Neves DF and Sanz JD. (Eds.) 1-45. https://www.researchgate.net/profile/Irina_Vaseva/publication/309201201_The_response_of_plants_to_drought_stress_the_role_of_dehydrins_chaperones_proteases_and_protease_inhibitors_in_maintaining_cellular_protein_function/links/58330cb308ae138f1c0a7b27/The-response-of-plants-to-drought-stress-the-role-of-dehydrins-chaperones-proteases-and-protease-inhibitors-in-maintaining-cellular-protein-function.pdf

Waniek, P.J. (2014). Pathways of insect protein digestion: Triatominae (kissing bugs). *Entomol. Ornithol. Herpetol.* 3, e109

Waniek, P.J., Araujo, A.C., Momoli, M.M., Azambuja, P., Jansen, A.M., & Genta, F.A. (2014). Serine carboxypeptidases of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae): Sequence characterization, expression pattern and activity localization. *Journal of insect physiology* 63, 9-20. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.02.003>

Waniek, P.J., Pacheco Costa, J.E., Jansen, A.M., & Araújo, C.A.C. (2012). Cathepsin L of *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): sequence characterization, expression pattern and zymography. *J. Insect Physiol.* 58, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.11.008>

Wenk, P., Lucic, S., & Betz, O. (2010). Functional anatomy of the hypopharynx and the salivary pump in the feeding apparatus of the assassin bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae, Heteroptera). *Zoomorphology* 129:225–234. <https://doi.org/10.1007/s00435-010-0115-7>

Xiao, R., Zhang, Z., Wang, H., Han, Y., Gou, M., Li, B., Duan, D., Wang, J., Liu, X., & Li, Q. (2014). Identification and characterization of a cathepsin D homologue from lampreys (*Lampetra japonica*). *Developmental and Comparative Immunology.* <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.10.014>

WHO (World Health Organization), 2020. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). World Health Organization. <https://www.who.int/chagas/disease/en/>, Accessed date: 03-july-2020.

Wyatt, G. R. (1961). The biochemistry of insect hemolymph. *A. Rev. Ent.* 6, 75-102.

Wyatt, G. R., Loughheed, T. C., & Wyatt, S. S. (1956) The chemistry of insect hemolymph. Organic components of the hemolymph of the silk-worm, *Bombyx mori*, and two other species, *ft. gen. Physiol.* 39, 853-868.

Wyatt, G. R., Loughheed, T. C., & Wyatt, S. S. (1956). *J. Gen. Physiol.* 39, 853–868.





ACREDITACIÓN INSTITUCIONAL
Avanzamos... ¡Es nuestro objetivo!



Zhao, A., Li, Y., Leng, C., Wang, P., & Li, Y. (2019). Inhibitory effect of protease inhibitors on larval midgut protease activities and the performance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Frontiers in Physiology*, 10(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01963>

Zhou, D., Chang, X., Bao, S., Song, L., Zhu, B., Dong, X., Zong, Y., Li, D., Zhang, M., Liu, Y., & Murata, Y. (2014). Purification and partial characterisation of a cathepsin L-like proteinase from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) and its tissue distribution in body wall. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.105>

Zhu, H., Dinsdale, D., Alnemri, E.S., & Cohen, G.M. (1997). Apoptosis in human monocytic THP.1 cells involves several distinct targets of N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK), *Cell Death Differ.* 4. 590–599. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400284>



SC-CER96940



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750

9. APÉNDICES

Apéndices A. *B. herreri* sin alimentar, alimentado con hemolinfa y alimentado con sangre.

B. herreri, sin alimentar (alto 1 mm, largo 6.3 mm, ancho 2,3 mm, peso 0,0065 gr).



B. herreri, alimentado con hemolinfa (alto 2 mm, largo 7.8 mm, ancho 2,9 mm, peso 0,0236 gr).



B. herreri, alimentado con sangre (alto 2,8 mm, largo 9 mm, ancho 3,8 mm, peso 0,0429 gr).



Apendice B. *B. ferroae* sin alimentar, alimentado con hemolinfagia y alimentado con sangre.

B. ferroae, sin alimentar (alto 1 mm, largo 7.1 mm, ancho 2 mm, peso 0,0078 gr).



B. ferroae, alimentado con hemolinfagia (alto 2,2 mm, largo 8,2 mm, ancho 3,5 mm, peso 0,0315 gr).



B. ferroae, alimentado con sangre (alto 3 mm, largo 9,8 mm, ancho 4,2 mm, peso 0,0498 gr).



Apendice C. *B. corredori* sin alimentar, alimentado con hemolinfagia y alimentado con sangre.

B. corredori, sin alimentar (alto 1 mm, largo 7.3 mm, ancho 2 mm, peso 0,0074 gr).



B. corredori, alimentado con hemolinfa (alto 2 mm, largo 8,2 mm, ancho 3 mm, peso 0,0264 gr).



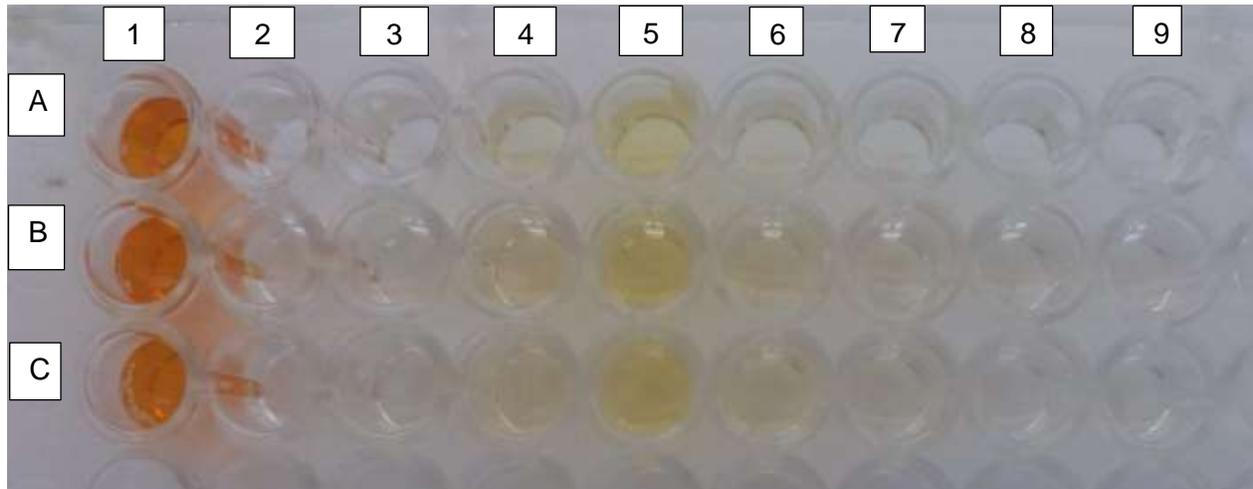
B. corredori, alimentado con sangre (alto 3 mm, largo 9,9 mm, ancho 4,3 mm, peso 0,0467 gr).





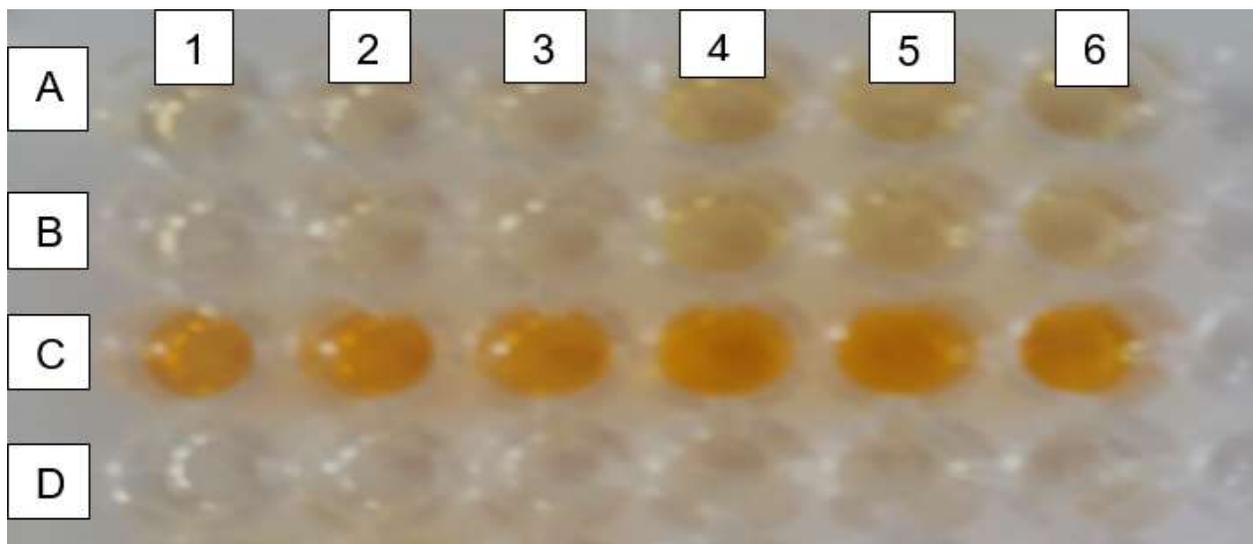
Apéndice D. Prueba de actividad proteolítica pH.

Columna 1. (Control positivo); Columna 2 (Control negativo); Columna 3 (pH 3.5); Columna 4 (pH 4.5), Columna 5 (pH 5.5), Columna 6 (pH 6.5), Columna 7 (pH 7.5), Columna 8 (pH 8.5), Columna 9 (pH 9.5).



Apéndice E. Prueba de actividad proteolítica pos ingesta.

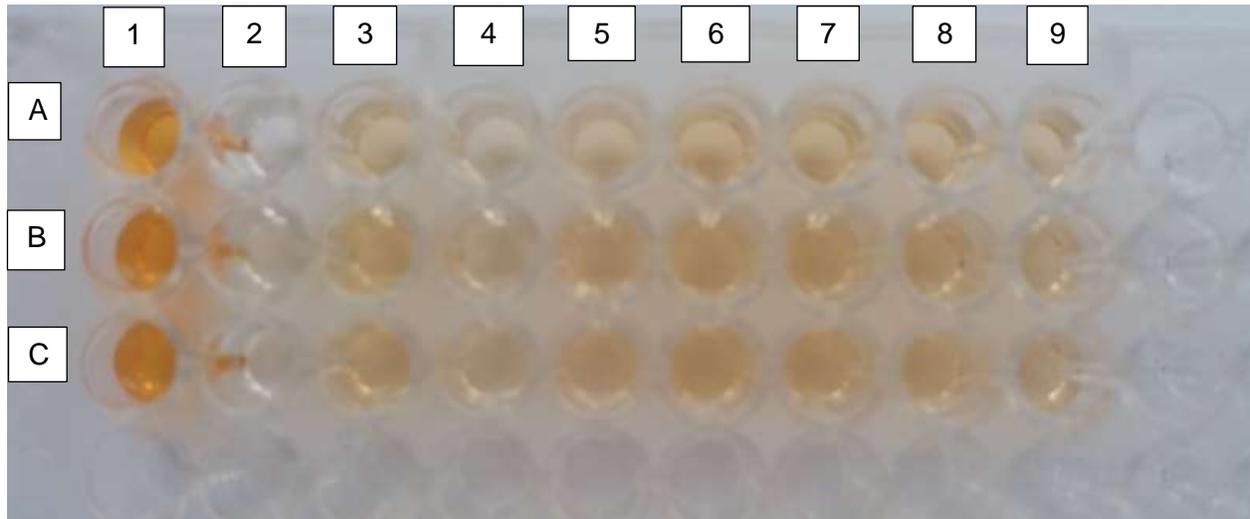
Fila C. Control positivo; fila D. Control negativo; A1-3. Muestra X; A4-6. Muestra X. B1-3. Muestra X, B4-6. Muestra X.





Apéndice F. Prueba de inhibidores

Columna 1A-C (Control positivo); Columna 2 A-C (Control negativo); Columna 3 A-C (Muestra control, sin inhibidores y con extracto intestinal); Columna 4 A-C (E-64); Columna 5 A-C (PA), Columna 6 A-C (PMSF), Columna 7 A-C (TLCK), Columna 8 A-C (TPCK), Columna 9 (EDTA).



Apéndice G. Pesos totales y en promedio por ninfa al inicio de la actividad proteolítica pos ingesta.

Especie	Peso total HL/45n inicial gr	Prom peso HL/ninfa gr	Peso Total HM/66n inicial gr	Prom peso HM/ninfa gr
<i>B. corredori</i>	1,1895	0,0264	3,1464	0,0476
<i>B. ferroae</i>	1,4212	0,0315	3,2891	0,0498
<i>B. herreri</i>	1,0636	0,0236	2,8365	0,0429
Peso Total:	3,6743	0,0815	9,272	0,1403
Promedio por ninfa:		0,027166667		0,046766667

HL: hemolinfagia, HM: hematofagia, n: ninfa.





Apéndice H. % de peso perdido de *B. herreri* bajo condiciones de hemolinfagia y hematofagia

Días	% pérdida de peso Hemolinfagia	% pérdida de peso Hematofagia
1_2	-29,2522513	-8,7893864
2_3	-11,4263323	-5,67450914
3_4	-7,52051918	-5,07860303
4_5	-4,86883059	-2,99649013
5_6	-3,23834197	-2,80983153
6_7	-2,29537904	-2,15619907
7_8	-2,65551109	-2,11987809
8_9	-2,58255715	-1,18887393
9_10	-2,00445434	-2,20195547
10_11	-1,90664037	-1,94693471
11_12	-1,34281201	-2,0321073
12_13	-1,83673469	-0,75488963
13_14	-2,60586319	-3,15518352
14_15		-1,27596439
15_16		-1,55475824
16_17		-1,41557128
17_18		-1,13093742
18_19		-0,62833805
19_20		-0,53696819
20_21		-0,30902349
21_22		0



Apéndice I. % de peso perdido de *B. ferroae* bajo condiciones de hemolinfagia y hematofagia

Días	% pérdida de peso Hemolinfagia	% pérdida de peso hematofagia
1_2	-32,9623223	-12,0179458
2_3	-11,4115604	-6,20101955
3_4	-5,52663809	-3,55934381
4_5	-8,17675713	-2,80035709
5_6	-5,46907005	-3,83230453
6_7	-4,34993925	-1,72219085
7_8	-5,13269175	-1,48067237
8_9	-5,01089325	-1,80239878
9_10	-3,04164717	-1,39212828
10_11	-4,11036036	-1,20462576
11_12	-4,02046784	-2,73496659
12_13	-2,93542074	-1,27792312
13_14	-3,81231672	-2,30829862
14_15	0,0356	-1,6831556
15_16		-1,44295806
16_17		-1,04017217
17_18		-1,07739666
18_19		-1,19577308
19_20		-0,63813814
20_21		-0,67873303
21_22		-2,29357798



"Formando líderes para la construcción de un nuevo país en paz"

Universidad de Pamplona
Pamplona - Norte de Santander - Colombia
Tels: (7) 5685303 - 5685304 - 5685305 - Fax: 5682750



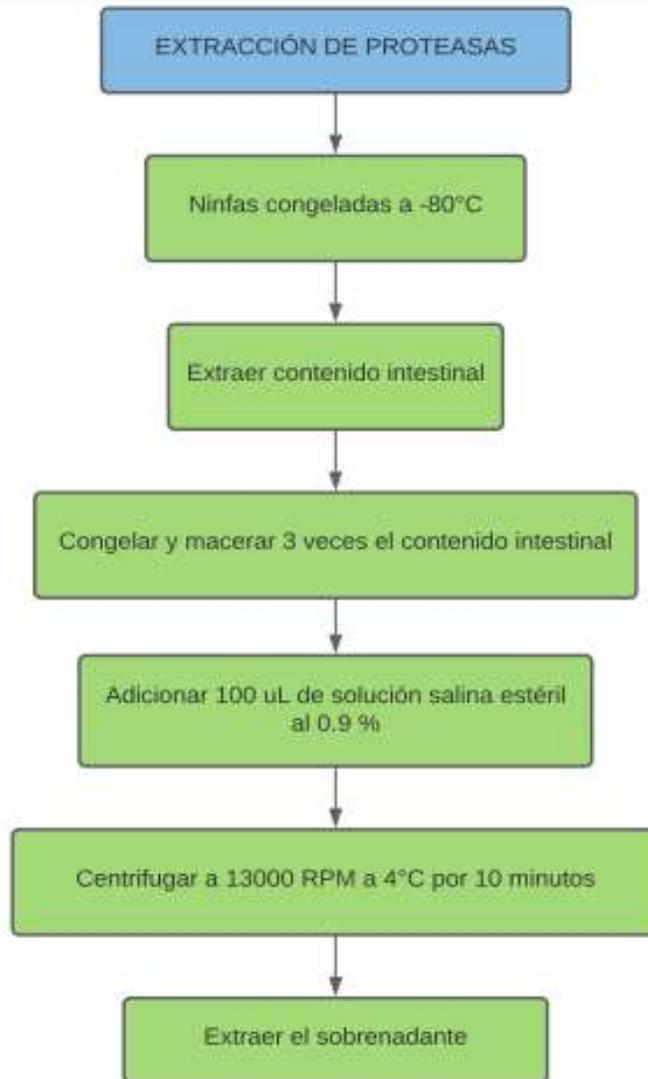
Apéndice J. % de peso perdido *B. corredori* bajo condiciones de hemolinfagia y hematofagia

Días	% pérdida de peso Hemolinfagia	% pérdida de peso Hematofagia
1_2	-30,6731374	-6,35063207
2_3	-11,4531846	-4,89035657
3_4	-8,32893115	-4,93038965
4_5	-3,60729658	-3,75548618
5_6	-2,70655271	-2,07458632
6_7	-2,59914255	-2,19425621
7_8	-2,15711526	-1,8034424
8_9	-3,56195529	-1,57115261
9_10	-2,14614205	-2,04900718
10_11	-4,25937699	-2,29181383
11_12	-2,5261324	-1,44606104
12_13	-1,77935943	-2,46359465
13_14	-1,42095915	-1,78450418
14_15	-1,3559322	-1,33122446
15_16		-2,62062587
16_17		-1,54562384
17_18		-1,21225984
18_19		-0,34722222
19_20		-0,80353556
20_21		-0,81812461
21_22		-2,37797247



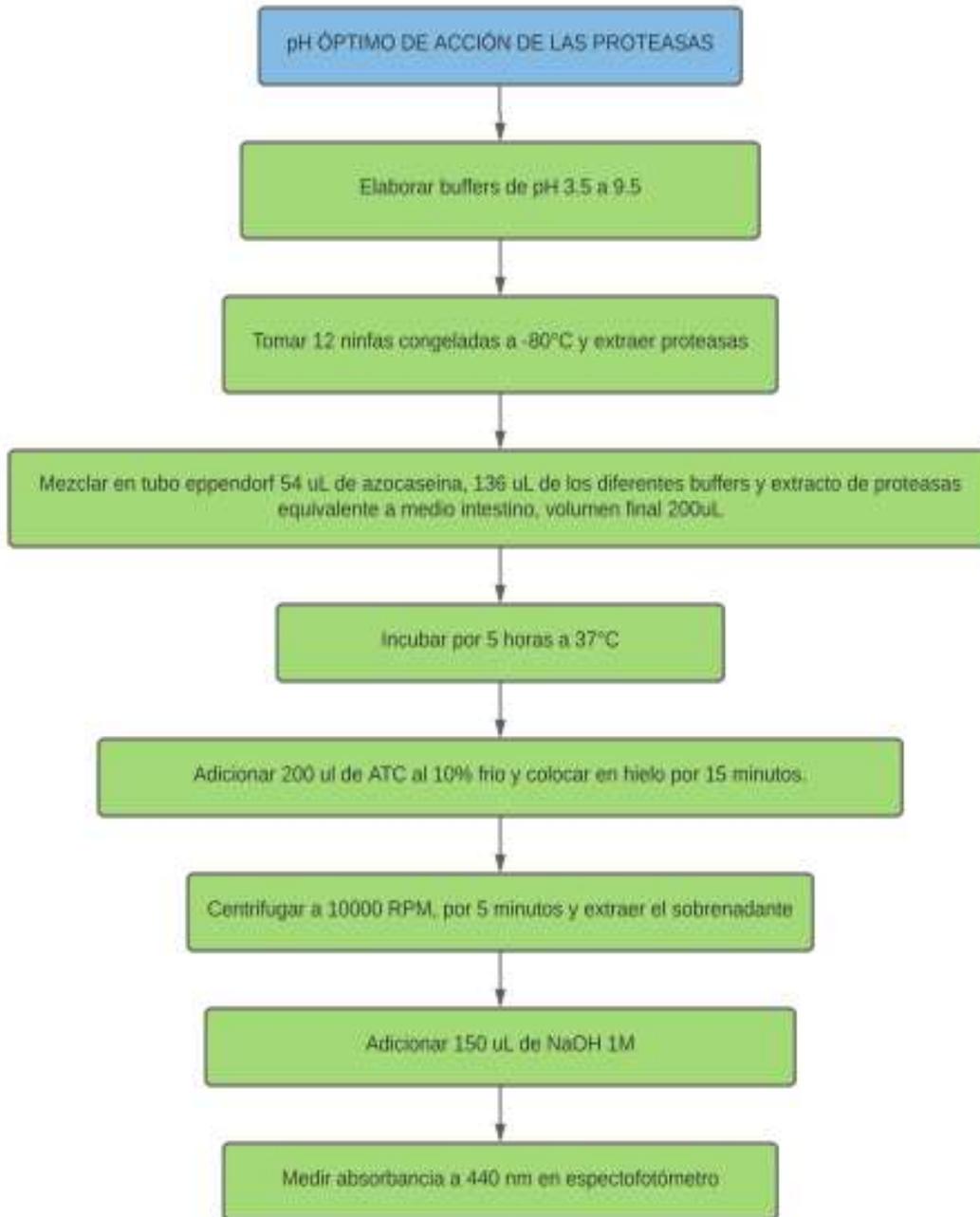


Apéndice K. Flujo de metodología de extracción de proteasas



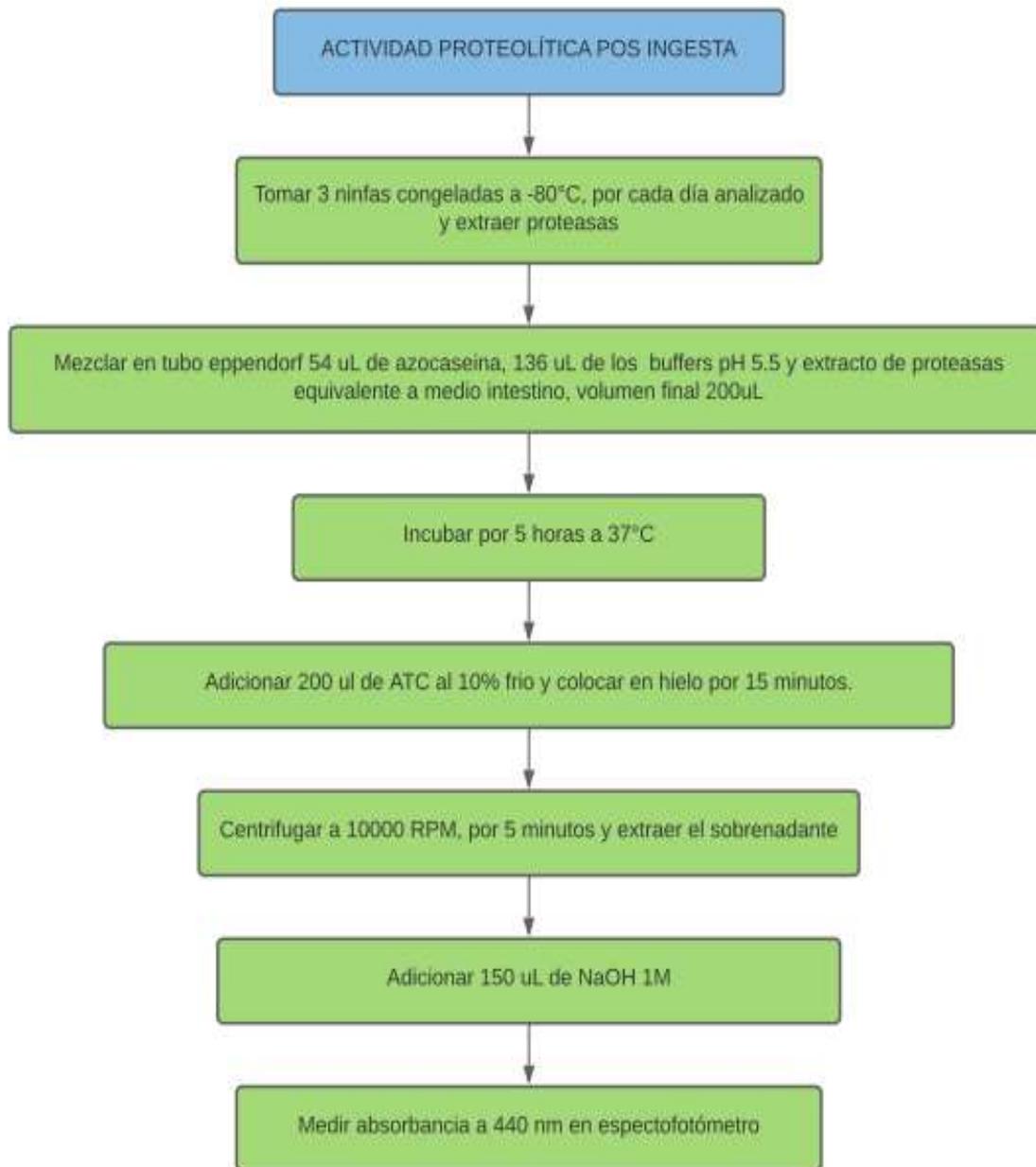


Apéndice L. Flujograma de metodología pH óptimo de acción de las proteasas.





Apéndice M. Flujoograma de metodología de actividad proteolítica pos ingesta.





Apéndice N. Flujoograma de metodología de caracterización de proteasas

