

**Aislamiento de mitocondrias de *Rhodnius prolixus* Stål 1859 (Hemiptera: Reduviidae:  
Triatominae)**

**Gonzalo García Delgado**

**Proyecto de grado para optar por el título de Químico**

**Directora:**

**Dra. Stelia Carolina Méndez Sánchez**

**Doctora en Ciencias bioquímicas**

**Co-Director:**

**Dr. Jonny Edward Duque Luna**

**Doctor en Ciencias biológicas**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Química**

**Bucaramanga**

**2017**

*A ellos, que ya no están a mi lado, pero siempre vivirán en mi corazón*

## Contenido

	Pág.
Índice de Tablas .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Introducción .....	14
1. Objetivos .....	16
1.1 Objetivos generales. ....	16
1.2 Objetivos específicos. ....	16
2. Marco teórico y estado del arte. ....	17
2.1 Enfermedad de Chagas. ....	17
2.2 <i>Rhodnius prolixus</i> . ....	19
2.3 Ciclo de vida del <i>Rhodnius prolixus</i> . ....	20
2.4 Mitocondria. ....	22
2.5 Fosforilación oxidativa. ....	22
2.5.1 Complejo I .....	23
2.5.2 Complejo II. ....	24
2.5.3 Complejo III.....	24
2.5.4 Complejo IV.....	25
2.5.5 ATP sintasa. ....	25
2.5.6 Inhibidores de la respiración celular. ....	26
2.6 Inhibidores de la cadena respiratoria. ....	26
2.6.1 Inhibidores del complejo I .....	26

2.6.2 Inhibidores del complejo II.....	26
2.6.3 Inhibidores del complejo III.....	27
2.6.4 Inhibidores del Complejo IV. ....	27
2.6.5 Inhibidores de la síntesis del ATP. ....	27
2.6.6 Desacopladores. ....	27
2.7 Extracción de mitocondrias en insectos y estudio de la cadena respiratoria. ....	28
2.7.1 Extracción de mitocondrias en <i>Rhodnius prolixus</i> . ....	29
2.7.2 Extracción de mitocondrias de <i>Aedes aegypti</i> . ....	30
2.7.3 Extracción de mitocondrias en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	32
3. Metodología.....	33
3.1 Cría y manejo del material biológico.....	33
3.2 Extracción de mitocondrias.....	33
3.3 Determinación de la concentración de proteínas mitocondriales. ....	34
3.4 Ensayo de respiración mitocondrial.....	34
3.5 Preparación de la suspensión de mitocondrias para la determinación de la actividad de las enzimas mitocondriales.....	35
3.6 Determinación de la actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial. ....	35
3.6.1 NADH Oxidasa.....	35
3.6.2 NADH deshidrogenasa ....	36
3.6.3 NADH Citocromo c reductasa.....	36
3.6.4 Succinato Oxidasa.....	36
3.6.5 Succinato deshidrogenasa ....	37

---

3.6.6 Succinato citocromo c reductasa.....	37
3.6.7 Citocromo c oxidasa .....	37
3.6.8 ATPasa .....	38
3.6.9 Análisis estadístico.....	38
4. Resultados y Discusión .....	39
4.1 Extracción de mitocondrias de <i>Rhodnius prolixus</i> y evaluación de la respiración mitocondrial .....	39
Extracción de mitocondrias de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	50
Evaluación de la respiración mitocondrial.....	51
4.2 Determinación de la actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial. ....	52
4.2.1 NADH Oxidasa, NADH deshidrogenasa y NADH citocromo c reductasa .....	53
4.2.2 Succinato oxidasa, Succinato deshidrogenasa y Succinato citocromo c reductasa. ....	56
4.2.3 Citocromo c Oxidasa.....	59
4.2.4 ATPasa. ....	60
5. Conclusiones .....	62
6. Recomendaciones .....	63
7. Divulgación de resultados.....	63
Referencias Bibliográficas .....	64

## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Ciclo de transmisión de la enfermedad de chagas en el ser humano.....	18
Figura 2. Insecto <i>Rhodnius prolixus</i> hembra. Fuente: Autor.....	20
Figura 3. Ciclo de vida del <i>Rhodnius prolixus</i> . (Fuente: Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, CINTROP). .....	21
Figura 4. Representación del transporte de electrones en la mitocondria .....	23
Figura 5. Sitios de actuación de los inhibidores de la respiración celular .....	28
Figura 6. Polarograma representativo de los 3 experimentos independientes realizadas para la medición del control respiratorio usando glutamato de sodio como sustrato. (Proteína mitocondrial 0,5 mg, Pi 3 mM, glutamato de sodio 3 mM, ADP 1,6 mM).....	40
Figura 7. Polarograma representativo de los 3 experimentos independientes realizadas para la medición del control respiratorio usando succinato de sodio. (Proteína mitocondrial 0,5 mg, Pi 3 mM, succinato de sodio 5 mM, ADP 1,6 mM) .....	42
Figura 8. Polarograma representativo de los 3 experimentos independientes realizadas para la medición del control respiratorio usando glutamato de sodio como sustrato. (Proteína mitocondrial 0,5 mg, Pi 3 mM, glutamato de sodio 3 mM, ADP 1,6 mM, oligomicina 6,8 $\mu$ M, BSA 0,05%, FCCP 10 $\mu$ M).....	45
Figura 9. Polarograma representativo de los 3 experimentos independientes realizadas para la medición del control respiratorio usando glutamato de sodio como sustrato. (Proteína	

mitocondrial 0,5 mg, Pi 3 mM, glutamato de sodio 3 mM, ADP 1,6 mM, oligomicina 6,8  $\mu$ M, BSA 0,05%, FCCP 10  $\mu$ M..... 47

Figura 10. Polarograma representativo de los 3 experimentos independientes realizadas para la medición del control respiratorio usando glutamato de sodio como sustrato. (Proteína

mitocondrial 0,5 mg, Pi 3 mM, succinato de sodio 5 mM, ADP 1,6 mM, oligomicina 6,8  $\mu$ M, BSA 0,05%, FCCP 10  $\mu$ M..... 49

Figura 11. Polarograma representativo de los 3 experimentos independientes realizadas para la medición del control respiratorio usando glutamato de sodio como sustrato. (Proteína

mitocondrial 0,5 mg, Pi 3 mM, glutamato de sodio 3 mM, ADP 1,6 mM, oligomicina 6,8  $\mu$ M, BSA 0,05%, FCCP 10  $\mu$ M..... 51

Figura 12. Comparativo de la actividad de las enzimas NADH oxidasa, NADH deshidrogenasa y NADH citocromo c reductasa entre *Rhodnius prolixus*, *Rattus norvegicus* y *Aedes aegypti*.

Para NADH deshidrogenasa se muestra la actividad en  $\mu$ mol de ferricianato reducido/min\*mg de proteína y para NADH citocromo c reductasa se muestra en  $\mu$ mol de citocromo c reducido/min\*mg de proteína. \*  $p > 0,05$  respecto a rata, ‡  $p > 0,001$  respecto a mosquito..... 54

Figura 13. Comparativo de actividad de succinato oxidasa, succinato deshidrogenasa y succinato citocromo c reductasa entre *Rhodnius prolixus*, *Rattus norvegicus* y larvas de *Aedes aegypti*.

Para la succinato deshidrogenasa la actividad se muestra en  $\mu$ mol de DCPIP reducido/min\*mg de proteína, para succinato citocromo c reductasa, se muestra la actividad en  $\mu$ mol de citocromo c reducido / min\*mg de proteína. \*  $p > 0,001$  respecto a rata; ‡  $p > 0,001$  respecto a mosquito..... 57

Figura 14. Comparativo de actividad de citocromo c oxidasa entre <i>Rhodnius prolixus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> y larvas de <i>Aedes aegypti</i> expresado en $\mu$ moles de citocromo c oxidado/min*mg de proteína. * $p > 0,05$ .....	59
Figura 15 Comparativo de actividad de ATPasa entre <i>Rhodnius prolixus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> y larvas de <i>Aedes aegypti</i> expresado en $\mu$ moles de citocromo c oxidado/min*mg de proteína. * $p > 0,001$ ; ‡ $p > 0,001$ respecto a mosquito. ....	61

### Lista de Tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Valores de velocidad de consumo de oxígeno de mitocondrias energizadas con glutamato de sodio aisladas con la primera metodología. ....	41
Tabla 2 Valores obtenidos luego del control realizado usando succinato de sodio como sustrato. ....	42
Tabla 3 Resultados de los controles respiratorios por cada estado presente en el polarograma... ..	46
Tabla 4 Valores obtenidos para cada estado de respiración mitocondrial para la tercera metodología de extracción. ....	48
Tabla 5 Valores obtenidos para el control respiratorio usando succinato de sodio como sustrato. ....	49
Tabla 6 Valores obtenidos de la velocidad de consumo de oxígeno para cada estado de la respiración mitocondrial (media $\pm$ desviación estándar) .....	52

Tabla 7 Actividades de las diferentes enzimas participantes en la cadena de transporte de  
electrones. .... 52

## Resumen

**Título:** Aislamiento de mitocondrias de *Rhodnius prolixus* Stål 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae)\*

**Autor:** Gonzalo García Delgado\*\*

**Palabras Clave:** Mitocondria, extracción de mitocondrias, *Rhodnius prolixus*, enzimas mitocondriales, cadena de transporte de electrones.

**Descripción:** El insecto *Rhodnius prolixus* es un triatomino vector de la enfermedad del Chagas transmitida por el protozooario *Trypanosoma cruzi*. Un modelo de evaluación de la acción de nuevos compuestos con actividad insecticida puede ser estudiado en los complejos de la cadena respiratoria de la mitocondria en insectos. De acuerdo a esto, en este trabajo se estableció un método de aislamiento de mitocondrias de *R. prolixus* usando un método de centrifugación diferencial y la estimación de la respiración celular por medio de técnicas polarográficas y de espectrofotometría. Se obtuvo mitocondrias con un rendimiento de  $7,11 \pm 0,11$  mg de proteína/g de insecto. Los controles respiratorios realizados mostraron los siguientes valores en  $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína: Estado 1 de  $0,142 \pm 0,008$ , estado 2  $2,508 \pm 0,337$ , estado 3  $2,839 \pm 0,752$ , estado 4 inducido por oligomicina  $1,214 \pm 0,749$ , estado 4 inducido por BSA  $1,443 \pm 0,154$ , estado desacoplado  $1,616 \pm 0,385$ . Se midió las actividades de las enzimas mitocondriales, donde se obtuvo valores para la NADH oxidasa  $28,955 \pm 4,445$   $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína, NADH deshidrogenasa  $0,3344 \pm 0,0760$   $\mu\text{moles Ferricianuro reducido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína, NADH citocromo *c* reductasa  $0,2801 \pm 0,048$   $\mu\text{moles citocromo } c \text{ reducido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{min} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína, succinato oxidasa  $3,29 \pm 0,613$   $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína, succinato deshidrogenasa  $0,83 \pm 0,234$   $\mu\text{moles DCPIP reducido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína, succinato citocromo *c* reductasa  $437,8 \pm 2,56$   $\text{nmoles citocromo } c \text{ reducido} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{min} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína, citocromo *c* oxidasa  $2,11 \pm 0,278$   $\text{nmoles citocromo } c \text{ oxidado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{min} \cdot \text{mg}^{-1}$  y ATPasa  $0,609 \pm 0,067$   $\mu\text{moles Fosfato hidrolizado} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{min} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína. De esta manera se estableció un protocolo de extracción de mitocondrias fragmentadas que podrá ser utilizado como metodología de extracción de mitocondrias útil en estudios donde se evalué la actividad insecticida en las proteínas de la membrana interna de las mitocondrias de *Rhodnius prolixus*.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Grupo de Investigación de Bioquímica y Microbiología. Directora: Stelia Carolina Méndez Sánchez, *Ph.D.* Co-director: Jonny Edward Duque Luna, *Ph.D.*

## Abstract

**Title:** *Rhodnius prolixus* Stål 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) mitochondria isolation \*

**Author:** Gonzalo García Delgado \*\*

**Key words:** Mitochondria, mitochondria isolation, *Rhodnius prolixus*, mitochondria enzymes, electron transport chain.

### Description:

The *Rhodnius prolixus* insect is a triatomine vector of the Chagas disease transmitted by the *Trypanosoma cruzi* protozoan. A model for the evaluation of new compounds with insecticidal activity action can be studied in insect mitochondrial respiratory chain complexes. According to this, in this work a method of *R. prolixus* mitochondria isolation using a differential centrifugation method and the estimation of cellular respiration was established by polarographic and spectrophotometric techniques. Mitochondria were obtained with a yield of  $7,11 \pm 0,11$  mg protein / g insect. Respiratory controls performed showed the following values in  $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein: State 1 of  $0,142 \pm 0,008$ , state 2  $2,508 \pm 0,337$ , state 3  $2,839 \pm 0,752$ , state 4 induced by oligomycin  $1,214 \pm 0,749$ , State 4 induced by BSA  $1,443 \pm 0,154$ , uncoupled state  $1,616 \pm 0,385$ . The mitochondrial enzyme activities were measured showing the following values: NADH oxidase  $28,955 \pm 4,445$   $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein, NADH dehydrogenase  $0,3434 \pm 0,0760$   $\mu\text{mol Ferricyanide reduced} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein, NADH cytochrome c reductase  $0,2801 \pm 0,048$   $\mu\text{moles cytochrome c reduced} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein, succinate oxidase  $3,29 \pm 0,613$   $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein, succinate dehydrogenase  $0,83 \pm 0,234$   $\mu\text{moles reduced DCPIP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein, succinate cytochrome c reductase  $437,8 \pm 2,56$   $\text{nmoles cytochrome c reduced} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein, cytochrome c oxidase  $2,11 \pm 0,278$   $\text{nmoles oxidized cytochrome c} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  and ATPase  $0,609 \pm 0,067$   $\mu\text{mol Hydrolyzed phosphate} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  protein. In this way, a protocol for fragmented mitochondria extraction was established, which could be used in studies evaluating the insecticidal activity of the internal membrane proteins of *Rhodnius prolixus* mitochondria.

---

\* Degree work

\*\* Science Faculty. Chemistry Department. Grupo de Investigación de Bioquímica y Microbiología. Director: Stelia Carolina Méndez Sánchez, *Ph.D.* Co-director: Jonny Edward Duque Luna, *Ph.D.*

## Introducción

La enfermedad del Chagas es un mal que se presenta en diferentes países tropicales. En Colombia la cantidad de afectados oscila entre 700.000 a 1'200.000 personas, según datos del año 2012 (Ministerio de la Protección Social, 2013), presentando una tasa de mortalidad en la fase aguda del 10% al 15% (Guhl, 1999) y donde los departamentos de Santander y Boyacá tienen el mayor porcentaje de aumento de infecciones con un 85,8% (Instituto Nacional de Salud, 2016). Los costos generados por esta enfermedad al estado colombiano alcanzan la cifra de US\$267 millones (OMS, 2017). Esta enfermedad hace parte de las denominadas “enfermedades tropicales desatendidas” (OMS, 2008) y a pesar de que en un principio el mal del Chagas se presentaba únicamente en la población de América del Sur, en las últimas décadas se han reportado casos en Europa y Norteamérica (OMS, 2017).

El mal de Chagas es causado por el parásito *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido por los insectos pertenecientes al orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. El principal vector en Colombia es el triatomo *Rhodnius prolixus* (Stål 1859) (Ministerio de la Protección Social & Salud, 2012; Molina et al., 2000) debido a su corto ciclo de vida, su adaptabilidad a los cambios de ambiente y la alta capacidad de defecación durante la ingesta de alimento (Arévalo, Carranza, Guhl, Clavijo, & Vallejo, 2007a, 2007b; P.A. Buxton, 1930; Service, 2012). A pesar de que la enfermedad del Chagas fue descubierta en el año 1909, aún no existe una cura para su fase crónica. Ya que el control del vector es la principal forma de

combatir esta dolencia (OMS, 2017), el uso de insecticidas selectivos de la proliferación de este vector sigue siendo estratégico.

El estudio de la bioenergética en este triatomino, permitirá conocer mejor su metabolismo y adicionalmente, probar en un futuro compuestos con potencial insecticida que permita un mayor control de este vector. Para estudios de efectos de dichos metabolitos en insectos vectores de enfermedades de importancia local como lo es por ejemplo el *Aedes aegypti* (Borrero Landazábal, 2014), la mitocondria ha sido un modelo de estudio desde que se incursionó con su extracción en el año 1956, además de que otros estudios de este organelo ha permitido grandes avances como la descripción de eventos apoptóticos y de necrosis (Baines, 2010; Galluzzi, Kepp, Trojel-Hansen, & Kroemer, 2012; Picard, Taivassalo, Gousspillou, & Hepple, 2011; Yu, Robotham, & Yoon, 2006), cambios en la mitocondria debido a la metamorfosis del insecto (Chamberlin & Chamberlin, 2012), estudios sobre las adaptaciones evolutivas en insectos hematófagos (Gonçalves et al., 2009; Rocco-machado, Gondim, & Meyer-fernandes, 2014; Slocinska, Antos-Krzeminska, Rosinski, & Jarmuszkiewicz, 2011), mayor conocimiento del estrés oxidativo (Bosco et al., 2015; Indo et al., 2007). Por estas razones se realizó este trabajo de investigación tiene como objetivo el lograr un protocolo de extracción de mitocondrias de *Rhodnius prolixus* que permita la evaluación de la actividad enzimática de los diferentes complejos mitocondriales involucrados en la respiración celular.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivos generales.

- Establecer un protocolo de aislamiento de mitocondrias de *R. prolixus* útiles como modelo de evaluación de moléculas con potencial insecticida.

### 1.2 Objetivos específicos.

- Establecer un protocolo de aislamiento de mitocondrias integras y fragmentadas de *R. prolixus*.
- Evaluar los parámetros bioenergéticos en el estado 3, estado 4 y relación ADP/O en mitocondrias de *R. prolixus*.
- Evaluar la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria I, II, III, IV y V.

## 2. Marco teórico y estado del arte.

### 2.1 Enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi* (Nunes, Dones, Morillo, Encina, & Ribeiro, 2013; Salamanca, Londoño Soto, Urquijo Velasquez, Díaz Gómez, & Padilla Rodriguez, 2011). La enfermedad fue descrita por el Brasileño Carlos Chagas en 1909 (Chagas, 1909) y muestra entre sus principales síntomas, cardiopatía dilatada, falla cardiaca, arritmias ventriculares, bloqueos cardíacos, fenómenos trombo embólicos entre otros (Ribeiro, Nunes, Teixeira, & Rocha, 2012).

Estos insectos que actúan como vectores se distribuyen en zonas de sabanas y piedemontes de Suramérica y Centroamérica. Esta dolencia también puede ser transmitida por trasplante de órganos, transfusiones de sangre infectada y contagio vertical madre-hijo (Bern, Kjos, Yabsley, & Montgomery, 2011; Chagas, 1909; Nunes et al., 2013; Salamanca et al., 2011). Esta enfermedad cumple un ciclo biológico que inicia desde la picadura de un triatomino previamente infectado y el depósito de heces cerca de la zona afectada, estas heces contienen grandes cantidades de tripomastigotos metacíclicos que pueden entrar en el ser humano por medio de la herida causada o por el cruce de membranas mucosas (1). A continuación, estos tripomastigotos metacíclicos entran en las células donde comienzan su transformación a amastigotos (2) y su multiplicación (3), al transformarse en tripomastigotos, infectas células aledañas y la infección entra a la circulación sanguínea del afectado (4), es en este instante que se puede repetir el ciclo si el afectado es picado por otro triatomino (5). Luego la ingestión de tripomastigotos por parte

del insecto permite la reproducción del mismo dentro de su sistema digestivo, transformándose en epimastigoto (6) y eventualmente en tripomastigoto (8) dando continuidad al ciclo de infección (Figura 1.)

La enfermedad de Chagas actualmente catalogada como una de las enfermedades tropicales descuidadas por la organización mundial de la salud (OMS, 2008), es objeto de búsqueda de una cura, ya que en estos momentos solo es tratable cuando se realiza un diagnóstico en su fase aguda (OPS, 2009; Ribeiro et al., 2012). Actualmente, se desarrollan nuevos insecticidas a partir de extractos vegetales para el control químico del vector *Rhodnius prolixus* (Parra-Henao, Garcia, & Cotes, 2007), los cuales son probados *in vivo*, arrojando resultados poco promisorios debido a la baja concentración de los componentes que se cree tienen acción insecticida.

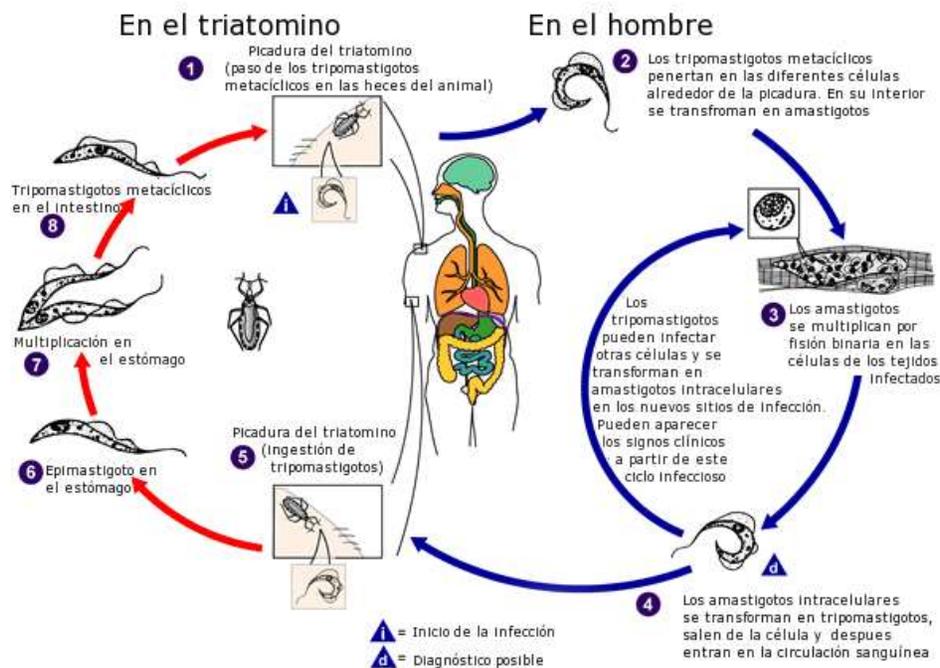


Figura 1. Ciclo de transmisión de la enfermedad de chagas en el ser humano(Basquetteur, 2008)

## 2.2 *Rhodnius prolixus*.

Es una especie de triatomino llamado comunmente como pito, chipo o barbeiro (Verissimo Junqueira, Monte Gonçalves, & de Carvalho Moreira, 2006), es considerado entre el *Triatoma dimidiata*, *Triatoma maculata*, *Rhodnius robustus*, *Rhodnius brethesi*, *Triatoma venosa* y *Rhodnius pallescens* uno de los principales vectores del mal de Chagas en Colombia (Molina et al., 2000; OPS, 2009; Salamanca et al., 2011). Este insecto es de color marrón amarillado con diversas manchas color marrón en su cuerpo, apariencia achatada, cabeza alargada con sus antenas en la región media antecular con apatación en sus patas que le permiten escalar superficies lisas (figura 2), se desarrolla mediante la metamorfosis incompleta, comprendiendo la fase de huevo y cinco diferentes estadios de ninfa hasta llegar a adulto (Ministerio de la Protección Social & Salud, 2012; Verissimo Junqueira et al., 2006).

Al haberse adaptado eficientemente a los domicilios humanos tanto rurales como urbanos, invadir domicilios de diferentes animales domesticos tales como perros, gallinas, gatos entre otros, hace de esta especie un vector eficaz del *Trypanosoma cruzi* (Ministerio de la Protección Social & Salud, 2012; Molina et al., 2000; OPS, 2009). Tiene preferencia domiciliaria exactamente en lugares donde puedan encontrar facilmente roedores o pequeñas aves con las cuales pueda alimentarse, como por ejemplo los sitios donde se almacenan hojas secas o paja, objetos guardados, libros viejos, gallineros, establos entre otros (Verissimo Junqueira et al., 2006). Añadiendo su corto periodo de incubación de dos semanas (OPS, 2009; Verissimo Junqueira et al., 2006), hace del *Rhodnius prolixus* un insecto de difícil control.



Figura 2. Insecto *Rhodnius prolixus* hembra.

### 2.3 Ciclo de vida del *Rhodnius prolixus*.

El insecto *R. prolixus* presenta tres fases de crecimiento: huevo, ninfa y adulto (Figura 3). Las ninfas se diferencian a los adultos en su tamaño y no presentan forma genital definida hasta el 5 estadio (Verissimo Junqueira et al., 2006). El triatomino tiene un periodo de incubación de dos semanas aproximadamente. Al nacer, tiene una coloración rosada debido a la presencia de nitroforina y luego pasa a tener la coloración marrón característica de la especie (Verissimo Junqueira et al., 2006).

Los periodos comprendidos entre cada cambio del organismo se denomina estadio. La duración del ciclo de crecimiento desde ninfa de primer estadio a adulto tiene una duración promedio de 117 días que puede variar de acuerdo a las condiciones ambientales (Arévalo et al., 2007b). El tiempo de incubación del huevo es en promedio de 15 días, la duración del estadio N I

es de 12 días en promedio, N II de 15 días, N III 19 días, N IV 15 días y el paso a adulto 29 días en promedio (Arévalo et al., 2007b). La longevidad del adulto es de 226 días en promedio (Arévalo et al., 2007b; Service, 2012).



*Figura 3.* Ciclo de vida del *Rhodnius prolixus*.

Nota: Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, CINTROP)

## 2.4 Mitocondria.

La mitocondria es el organelo donde se realiza el metabolismo oxidativo en eucariontes. Es considerada la central energética de la célula por contener enzimas y proteínas que son cruciales en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (Voet, Voet, & Pratt, 2006). Adicionalmente, la mitocondria participa en las respuestas celulares del estrés, la autofagia y el control de rutas no apoptóticas de la célula como por ejemplo la necrosis regulada (Galluzzi et al., 2012).

En su morfología, las mitocondrias constan de una membrana externa permeable a moléculas con peso molecular menor a 10.000 Da y una membrana interna menos permeable (Lodish et al., 2004). En esta última membrana ocurre el transporte de electrones que facilita la fosforilación oxidativa y divide a la mitocondria en dos compartimientos, el espacio intermembrana y la matriz (Berg, Tymoczko, & Stryver, 2002; Freya & Mannellab, 2000; Hatefi, 1985; Lodish et al., 2004; Nicholls & Ferguson, 2013).

## 2.5 Fosforilación oxidativa.

La fosforilación oxidativa es un proceso metabólico que aprovecha diferentes sustratos producidos a partir de la degradación de glúcidos, grasas y aminoácidos para la síntesis de ATP. La oxidación del NADH y el FADH<sub>2</sub> en el complejo I y el complejo II respectivamente, permite la reducción del O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O en el complejo IV (Lodish et al., 2004; Melo Ruiz, 2005; Voet et al., 2006).

La figura 4 muestra un esquema representativo de una mitocondria de mamífero, en donde la oxidación del NADH se lleva a cabo en el complejo I y la conversión de Succinato a Fumarato se da en el complejo II. Los electrones producidos por la oxidación del glicerol-3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato que se da en la parte externa de la membrana interna mitocondrial y los generados por la oxidación del acil-CoA a  $\text{trans}\Delta^2$ -enoil-CoA por medio de la flavoproteína transportadora de electrones son donados a la proteína ubiquinona mostrada como Q junto con los obtenidos por el complejo I y complejo II, para que esta transporte los electrones hasta el complejo III, quien oxida esta quinona y reduce el citocromo *c* (cit *c*). Posteriormente, el citocromo *c* es oxidado por el complejo IV, el cual usa estos electrones para sintetizar agua a partir de oxígeno molecular y dos protones (David, Cox, & Lehninger, 2008; Lodish et al., 2004; Murray, 2013).

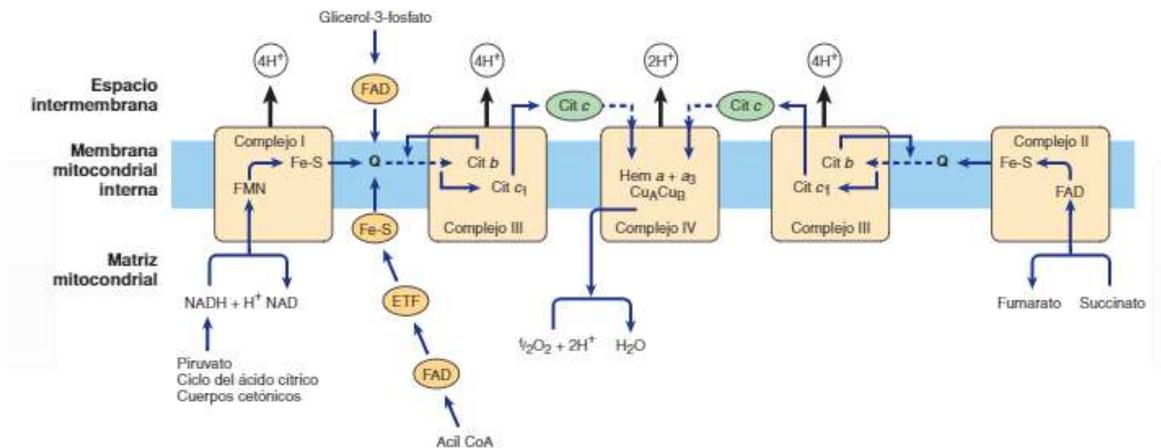
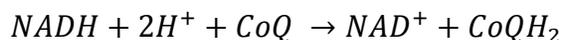


Figura 4. Representación del transporte de electrones en la mitocondria (Murray, 2013).

**2.5.1 Complejo I.** También llamado NADH deshidrogenasa o NADH reductasa, es una enzima compuesta por 46 cadenas polipeptídicas (Carroll, Fearnley, Shannon, Hirst, & Walker,

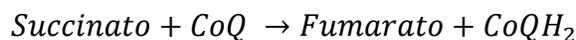
2005). Su función es la oxidación del NADH y transferir 2 electrones al grupo ubiquinona, como se muestra en la reacción a continuación (David et al., 2008):



Reacción 1

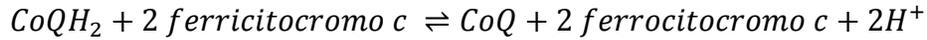
Paralelo a este proceso, se da la transferencia de cuatro protones hacia el espacio intermembranal, por lo tanto el complejo I es una bomba de protones impulsada por la energía de oxidación del NADH y contribuye con la generación de la gradiente de potencial para la respiración celular (David et al., 2008; Lodish et al., 2004).

**2.5.2 Complejo II.** También llamado Succinato deshidrogenasa o succinato reductasa, es un complejo mitocondrial ligado al ciclo de Krebs (Lodish et al., 2004; Voet et al., 2006), su función es la de oxidar una molécula de succinato a fumarato (David et al., 2008; Melo Ruiz, 2005) catalizado por la reducción de la ubiquinona, siguiendo la siguiente reacción:



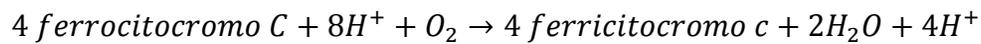
Reacción 2

**2.5.3 Complejo III** Conocido como citocromo *c*-oxidoreductasa, es el tercer complejo participante en la cadena respiratoria mitocondrial. Su función es reducir el citocromo *c* usando los electrones provenientes del complejo I o el complejo II que son transportados por la ubiquinona, liberando en el proceso 4 protones en el espacio intermembranal por cada 2 electrones transportados, contribuyendo así al gradiente de protones y permitiendo el flujo de electrones hacia el complejo IV por medio del citocromo *c* reducido (Nicholls & Ferguson, 2013; Voet et al., 2006). La reacción que sigue este complejo se muestra a continuación:



Reacción 3

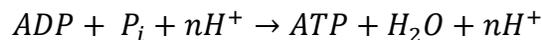
**2.5.4 Complejo IV** También conocido como citocromo *c* oxidasa, es la última enzima de la cadena de transporte de electrones. Su función es la de oxidar cada molécula de citocromo *c* proveniente del complejo III y de esta manera usa los electrones para reducir el oxígeno molecular a agua, siguiendo la reacción a continuación (David et al., 2008; Nicholls & Ferguson, 2013; Voet et al., 2006):



Reacción 4

Los protones mostrados en los productos de la reacción 4, son bombeados al espacio intermembrana al oxidarse 2 moles de agua, lo cual muestra que son introducidos 2 protones por cada 2 electrones cedidos por el citocromo *c* (Melo Ruiz, 2005)

**2.5.5 ATP sintasa.** También conocida como complejo V, es una enzima transmembranal que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y el fosfato presente en la matriz mitocondrial usando la energía generada por la gradiente de protones en la respiración mitocondrial (David et al., 2008; Nicholls & Ferguson, 2013). Esta enzima es la culminación del proceso de fosforilación oxidativa y cataliza la siguiente reacción:



Reacción 5

**2.5.6 Inhibidores de la respiración celular.** Se conocen como inhibidores de la respiración celular a aquellos compuestos que tienen la capacidad de impedir que la respiración se lleve a cabo ya sea por tener acción en la cadena respiratoria, en la síntesis de ATP o por ser un desacoplador de la fosforilación oxidativa (David et al., 2008; Lodish et al., 2004; Murray, 2013; Voet et al., 2006).

## **2.6 Inhibidores de la cadena respiratoria.**

**2.6.1 Inhibidores del complejo I** El inhibidor más conocido del complejo I es la rotenona, la cual se une al sitio activo donde la ubiquinona se une a este; de manera similar actúa el inhibidor piercidina A y el amobarbital evitando el transporte de electrones hacia la ubiquinona. Las acetogeninas son inhibidores más fuertes del complejo I, las cuales se presume bloquean el sitio de unión del complejo con la ubiquinona (Nakamaru-Ogiso et al., 2010). El complejo I también se ve bloqueado por la adenosin difosfato ribosa, el cual es un inhibidor competitivo de la NADH debido a que ocupa su sitio de enlace con el complejo (Zharova & Vinogradov, 1997). A pesar de conocerse diversos inhibidores, la rotenona aún es la más usada.

**2.6.2 Inhibidores del complejo II** Los compuestos inhibidores del complejo II pueden ser agrupados en dos grupos, el primero son aquellos compuestos que ocupan el sitio de unión de la ubiquinona, donde se encuentra la carboxina y la tenoiltrifluoroacetona y los que ocupan el sitio de unión del succinato, donde están las moléculas malonato y algunos intermediarios del ciclo de Krebs como lo son el malato y el oxaloacetato, siendo este último el inhibidor más fuerte (Muller et al., 2007).

**2.6.3 Inhibidores del complejo III** En el grupo de inhibidores del complejo III se encuentra la antimicina A y el dimercapol, quienes inhiben la transferencia de electrones hacia la ubiquinona oxidada (Murray, 2013). Se encuentran también el Mixotiazol y la estigmatellina, los cuales evitan la transferencia de electrones desde los centros ferrosos hacia la ubiquinona.

**2.6.4 Inhibidores del Complejo IV.** El grupo de inhibidores del complejo IV está conformado por los iones cianuro y el monóxido de carbono, los cuales ocupan el sitio de unión del O<sub>2</sub> en el complejo IV, evitando de esta manera el paso de electrones a este para la obtención de H<sub>2</sub>O. Otros compuestos como el ácido sulfhídrico y el óxido nítrico se unen a sitios regulatorios del complejo IV induciendo de esta manera una reducción en la respiración de la mitocondria.

**2.6.5 Inhibidores de la síntesis del ATP.** Los inhibidores de la síntesis del ATP actúan sobre el complejo enzimático ATP-sintasa (Nicholls & Ferguson, 2013) , la oligomicina es un inhibidor del flujo de protones a través de este complejo debido al bloqueo que provoca en el canal de protones de la enzima, evitando de esta manera la síntesis del ATP (Murray, 2013; Nicholls & Ferguson, 2013). El atractilósido es un inhibidor del transportador de ADP hacia la mitocondria, provocando de esta manera una disminución de la disponibilidad de ADP en la matriz mitocondrial para que sea usado por la ATP sintasa en la formación de ATP (Murray, 2013; Nicholls & Ferguson, 2013; Voet et al., 2006).

**2.6.6 Desacopladores.** Estos compuestos actúan bloqueando la síntesis del ATP pero sin afectar el transporte de electrones en la mitocondria (David et al., 2008; Melo Ruiz, 2005;

Murray, 2013). El más usado es el 2,4-dinitrofenol, el cual debido a su carácter anfipático aumenta la permeabilidad mitocondrial que genera una reducción del potencial electroquímico, evitando de esta manera que la síntesis de ATP (Nicholls & Ferguson, 2013). Otros desacopladores conocidos son el carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) (Nicholls & Ferguson, 2013; Voet et al., 2006), el FCCP y la termogenina (Murray, 2013).

En la figura 5 se muestran el sitio de acción de cada inhibidor de la respiratoria, de la síntesis de ATP y desacopladores de la fosforilación oxidativa.

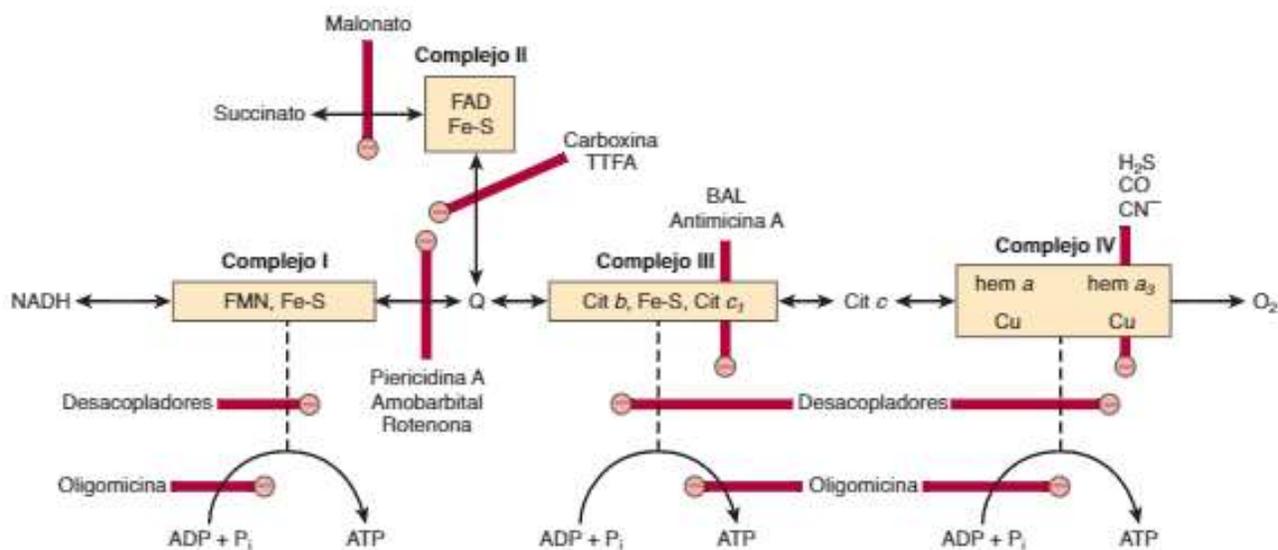


Figura 5. Sitios de actuación de los inhibidores de la respiración celular (Murray, 2013).

## 2.7 Extracción de mitocondrias en insectos y estudio de la cadena respiratoria.

La extracción de mitocondrias en algunas subespecies *Triatomae* es un campo poco explorado, debido a esto se presenta a continuación la extracción de mitocondrias de diferentes especies de insectos:

**2.7.1 Extracción de mitocondrias en *Rhodnius prolixus*.** En el año 2014, Alves-Bezerra y colaboradores realizaron un estudio del efecto de las proteínas desacopladoras 4 y 5 (UCP4, UCP5) en la protección contra el estrés oxidativo en el insecto *Rhodnius prolixus* (Roccomachado et al., 2014). En este estudio se aislaron mitocondrias a partir de 60 insectos adultos sin alimentar, a los cuales se les extrajo el intestino y posteriormente fueron lavados con solución 0,15 M de NaCl y homogeneizados en un homogeneizador Van Potter-Evehjem en medio de aislamiento (0,25 mM de sacarosa, 1 mM de EDTA, 5 mM Tris-HCl, 1 % BSA, pH 7,4) y centrifugados a 800 gravedades ( x g) por 10 min. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 12.000 g por 10 min. El precipitado se resuspendió en medio de lavado (0,25 mM de sacarosa, 1 mM de EDTA, 5 mM de Tris-HCl, pH 7,4) y fue centrifugado a 8.000 g por 10 min. El precipitado final se resuspendió en 100 µL de medio de lavado y todas las centrifugaciones se realizaron a 4 °C.

Esta investigación mostró el efecto que tienen las purinas di-fosforiladas y trifosforiladas en la inhibición de las proteínas desacopladoras. Para la verificación de la presencia de proteínas desacopladoras se usó la mitocondria aislada, en presencia de 1 µM de ácido palmático, lo que causó un decrecimiento significativo en el potencial de membrana, indicando a su vez la activación de las proteínas desacopladoras; al agregar concentraciones altas de guanosin difosfato (GDP), se inhibió la activación dependiente de ácido palmítico, generando que el potencial de membrana volviera al su estado basal. La adición subsecuente de 0,05% BSA, libre de ácidos grasos evitando la activación de las UCP y la adición de FCCP mostró una disipación total del potencial de membrana, demostrando la presencia de proteínas desacopladoras en las mitocondrias. Estas proteínas fueron activadas usando ácido palmático, donde se observó un aumento en el potencial de membrana y, al añadir BSA 0,05% y GDP 0,5 mM este efecto fue

disipado, confirmando la presencia de proteínas desacopladoras en la mitocondria y además mostrando e efecto inhibitorio del BSA y el GDP en ellas.

Las proteínas desacopladoras son descritas como trasportadores que catalizan el paso de protones provenientes a través de la membrana mitocondrial interna, generando de esta manera un efecto desacoplador del transporte de electrones y la síntesis de ATP.

Las proteínas desacopladoras actúan, en este caso, como un protector antioxidante de la célula, ya que la generación de especies reactivas de oxígeno se da principalmente cuando hay abundancia de electrones reflejado en un alto potencial de membrana. En ese momento las proteínas desacopladoras usan su habilidad de disminuir el potencial de membrana permitiendo el paso de protones por la membrana interna incrementando los rangos de respiración y con esto el tiempo de vida de la ubiquinona y la probabilidad de la formación de los aniones superoxido. En este estudio se midió la formación de  $H_2O_2$  con la activación y la inhibición de las UCP, al activarse las proteínas desacopladoras se midió una concentración de  $H_2O_2$  similar a la mostrada en presencia de FCCP, donde los rangos de respiración son máximos y la producción de ROS son mínimos, al desactivar las UCP, la generación de estas especies reactivas bajaron a niveles similares a la inhibición de la cadena de respiración con oligomicina, esto puede explicar la función de las proteínas desacopladoras, que podría ser la prevención de daños en la célula debido a la presencia de componentes altamente oxidantes.

**2.7.22 Extracción de mitocondrias de *Aedes aegypti*.** En el año 2009, Gonçalves y colaboradores establecieron un protocolo de extracción de mitocondrias para *Aedes aegypti* (Gonçalves et al., 2009). En este método se refrigeraron 150 mosquitos hembras en hielo para inmovilizarlos, luego se diseccionó para aislar el tórax del resto del cuerpo del insecto para ser

homogeneizado en un homogeneizador Potter-Elvehjem con 10 mL de solución de aislamiento (250 mM de sacarosa, 5 mM de Tris-HCl, 2mM de EGTA, 1% de BSA a pH 7,4), posteriormente esta solución se filtró a través de gasa de algodón para retirar remanentes del cuerpo del mosquito y se centrifugó a 300 g por 5 min, el sobrenadante se centrifugó a 10000 g por 10 min. El precipitado se resuspendió en medio de respiración (120 mM KCl, 5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3 mM de HEPES, 1 mM de EGTA, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  y 0,1% de BSA, pH 7,2), todo el proceso se realizó a 4 °C. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry dando un promedio de concentración de 8,62 mg de proteína/ g de tórax de mosquito (Gonçalves et al., 2009). Este método de extracción fue extrapolado por Olivera y colaboradores para la extracción de mitocondrias en *Anopheles gambiae* (Oliveira et al., 2011).

En este trabajo, Gonçalves y colaboradores mostraron que la mitocondria obtenida del músculo de vuelo, independiente si el mosquito es alimentado con azúcar o con sangre, pueden oxidar sustratos enlazados a  $\text{NAD}^+$ , piruvato y prolina (pyr+pro) o enlazados a  $\text{FAD}^+$ , glicerol-3-fosfato (G3P). Al comparar los diferentes estados de la respiración mitocondrial en mosquitos alimentados con azúcar usando pyr-pro o G3P, se observaron que hay diferencias significativas en estado 4 inducido con oligomicina, ya que al usar G3P como sustrato, se obtiene un valor más alto ( $93,97 \pm 13,8 \text{ nm O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteina}^{-1}$ ) respecto a la respiración inducida por pyr+pro ( $14,58 \pm 1,18 \text{ nm O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteina}^{-1}$ ). De igual manera la relación de control respiratorio es mayor en las mitocondrias donde se usó pyr+pro.

De igual manera se mostraron diferencias en el consumo de oxígeno entre mosquitos alimentados con azúcar (SF) y alimentados con sangre (BF), al usar pyr+pro se evidenció una variación significativa entre los valores de respiración de mosquitos alimentados con azúcar y los mosquitos alimentados con sangre en los 4 estados metabólicos de respiración. También se

mostró que al usar pyr+pro se obtienen mejores controles de respiración (relación estado 3/estado 4), donde con pyr+pro se obtuvo una relación en SF de  $9,53 \pm 1,06$  y en BF de  $6,6 \pm 0,78$  y usando G3P en SF  $1,87 \pm 0,38$  y en BF  $1,73 \pm 0,37$ , esto intuye adicionalmente un daño en la membrana mitocondrial a nivel de membrana cuando el insecto se alimenta con sangre, ya que, en ambas opciones de sustrato, hay disminución en la integridad de membrana.

**2.7.3 Extracción de mitocondrias en *Drosophila melanogaster*.** Bosco y colaboradores establecieron un método de aislamiento de mitocondria en la mosca de la fruta (Bosco et al., 2015). A partir de 200 ejemplares de mosca completas, se obtuvo un homogeneizado usando un homogeneizador tipo Dounce empleando como medio de aislamiento un buffer de manitol-sacarosa (pH 7,4) al 2% de BSA. El homogeneizado se centrifugó a  $1.500 \times g$  por 6 min a  $4^\circ C$ . El aglomerado se descartó por medio de una filtración usando una malla fina y el sobrenadante se centrifugó a  $7.000 \times g$  durante 6 min a  $4^\circ C$ . El sobrenadante obtenido se descartó y se resuspendió el aglomerado en medio buffer de manitol-sacarosa (pH 7,4) hasta lograr 20 mL, posteriormente se centrifugó a  $7.000 \times g$  por 6 min a  $4^\circ C$ . El sobrenadante se descartó de nuevo y se resuspendió las mitocondrias aisladas en un volumen de 10  $\mu L$  a 50  $\mu L$  de buffer.

En esta investigación se estudió la relación entre la hipoxia y la hiperoxia en la masa de la mitocondria de manera indirecta usando la actividad de la citrato sintasa. Al ser sometidas a hiperoxia, las mitocondrias de las moscas tuvieron un aumento significativo de tamaño, ya que la actividad de la enzima citrato sintasa fue mayor comparado al control, caso contrario sucedió en la hipoxia y en el ambiente hiperbárico, ya que se presentó una disminución de la actividad de la citrato sintasa y por ende una disminución de la masa mitocondrial (Control: 1,4, hiperoxia: 1,8, hipoxia e hiperbárico: 1,3, valores en  $nm O_2 \cdot min^{-1} \cdot mg\ proteina^{-1}$ ).

### 3. Metodología

#### 3.1 Cría y manejo del material biológico.

Las colonias de *Rhodnius prolixus* que se usaron durante esta investigación fueron tomados del insectario del centro de investigaciones en enfermedades tropicales CINTROP de la Universidad Industrial de Santander. Los insectos se mantienen en condiciones controladas de humedad y de temperatura (% de humedad entre 60% y 80%, temperatura de ambiente entre 23 °C y 25 °C), además de ser alimentados con sangre de gallinas semanalmente. Los especímenes usados para las extracciones de mitocondria fueron adultos expuestos a un ayuno de mínimo una semana para evitar el daño en la mitocondria provocado por la presencia de hierro en la sangre ingerida.

#### 3.2 Extracción de mitocondrias.

Para la extracción de las mitocondrias, se usaron técnicas de centrifugación diferenciada, haciendo modificaciones al protocolo de extracción de mitocondrias de *Aedes aegypti* usado de manera interna en el laboratorio (Borrero Landazábal, 2014). Una masa de individuos adultos con un ayuno de mínimo 8 días se incapacitaron por medio de frio, se homogeneizaron usando un homogeneizador tipo Van-Potter junto con medio de aislamiento, compuesto de sacarosa como isotónico del medio, EGTA como agente quelante, el cual captura los iones de Calcio presentes en el medio para prevenir daño mitocondrial y HEPES como buffer, manteniendo el

pH a 7,4. El proceso de extracción se realizó a 4 °C, variando las centrifugaciones entre 800 x g y 10 000 x g.

### **3.3 Determinación de la concentración de proteínas mitocondriales.**

La determinación de la concentración de proteína mitocondrial se realizó por medio del método de Bradford (Kruger, 1994) modificado a microplacas. Se preparó una serie de estándares de BSA a diferentes concentraciones, se tomó una alícuota de 20 µL de cada solución a la cual se le agregó 180 µL de azul de Coomassie. Se dejó reposar por 5 minutos, se mide la absorbancia a 595 nm usando la agitación del equipo por 5 segundos, con estas absorbancias se realizó una curva de calibración. Se diluyó alícuota de suspensión de proteínas mitocondriales en relaciones 1:50, 1:100 y 1:150, se midió su absorbancia y utilizando la curva de calibración previamente realizada, se determinó la concentración de proteína mitocondrial extraída.

### **3.4 Ensayo de respiración mitocondrial.**

El consumo de oxígeno de las mitocondrias asiladas fue acompañado polarográficamente usando un oxígrafo tipo Clark Hansatech Instruments, donde se midió el consumo de O<sub>2</sub> expresado en nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>. Las mitocondrias aisladas por el método descrito anteriormente se incubaron en medio compuesto de: HEPES 10 mM (pH 7,4), EGTA 0,1 mM, manitol 125 mM, KCl 65 mM. Para evaluar cada estado de respiración mitocondrial se agregó 5 mM de succinato de sodio, 3 mM Pi y 1,6 mM de ADP.

### **3.5 Preparación de la suspensión de mitocondrias para la determinación de la actividad de las enzimas mitocondriales.**

Las mitocondrias aisladas de acuerdo a ítem 3.4 se congelaron en nitrógeno líquido hasta el momento de su uso. Para la medición de la actividad de las diferentes enzimas de la cadena de transporte de electrones, estas mitocondrias se fragmentaron por choque térmico (congelamiento y descongelamiento en nitrógeno líquido, 3 veces) y se mantuvieron en baño de hielo hasta la realización de las pruebas enzimáticas. Los fragmentos de membrana obtenidos fueron usados como fuente de enzimas.

### **3.6 Determinación de la actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial.**

La actividad de las enzimas mitocondriales fue medida con un espectrofotómetro UV-VIS con lector de microplacas Multiscan go y usando un oxígrafo Hansatech.

A continuación, se describe la metodología de la medición de las actividades de las enzimas que intervienen en la respiración mitocondrial.

**3.6.1 NADH Oxidasa** La actividad de la NADH oxidasa se determinó por el método de Singer (Glick & Singer, 2006). La velocidad de oxidación del NADH se traduce en la velocidad de consumo de oxígeno, acompañado polarográficamente.

El sistema de reacción estaba formado por tampón fosfato 80 mM (pH 7,4), EDTA 50  $\mu$ M, NADH 0,17 mM y 0,5 mg de proteína mitocondrial. La medición se realizó a 28°C y fue iniciada por la adición de NADH.

**3.6.2 NADH deshidrogenasa** La actividad de la enzima fue cuantificada por el método espectrofotométrico de Singer (Glick & Singer, 2006), usando ferrocianuro como receptor artificial de electrones en la presencia de rotenona, la reacción se monitoreó a 420 nm por 1 minuto.

El sistema de reacción contenía: tampón fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2,0 mM, NADH 0,15 mM, ferrocianuro 600  $\mu$ M, rotenona 1mM, NaCN 1 mM y 0,5 mg de proteína mitocondrial.

**3.6.3 NADH Citocromo c reductasa** La actividad de esta enzima se determinó espectrofotométricamente por el método descrito por Somlo (Slonimski, Archer, Péré, Sels, & Somlo, 1965) a través del monitoreo de la velocidad de reducción del citocromo *c* a 550nm. El sistema de reacción estaba conformado por: tampón fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, NADH 50  $\mu$ M, citocromo *c* (oxidado) 40  $\mu$ M, KCN 1 mM y 0,5 mg de proteína mitocondrial. Todos los reactivos excepto el citocromo *c*, se incubaron ser incubados por 10 min a 28°C, la reacción fue iniciada por la adición del citocromo *c* y se llevó a cabo por 1 minuto.

**3.6.4 Succinato Oxidasa** La actividad de la succinato oxidasa se determinó por el método de Singer (Glick & Singer, 2006). La velocidad de oxidación del succinato se traduce en la velocidad de consumo de oxígeno, acompañado polarográficamente.

El sistema de reacción estaba formado por tampón fosfato 80 mM (pH 7,4), EDTA 50  $\mu$ M, succinato de sodio 10 mM y 0,5 mg de proteína mitocondrial. La medición se realizó a 28°C y fue iniciada por la adición de succinato de sodio.

**3.6.5 Succinato deshidrogenasa** La actividad de la succinato deshidrogenasa se cuantificó usando el método de Singer (Glick & Singer, 2006), utilizando DCPIP y PMS como receptores artificiales de electrones. La velocidad de reducción del DCPIP se midió a 600 nm en un sistema de reacción compuesto por: tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7,4), succinato de sodio 20 mM, EDTA 2 mM, NaCN 1mM, rotenona 1  $\mu$ M, PMS 1 mM y 0,5 mg de proteína mitocondrial.

Los reactivos presentes en el sistema, excepto el PMS y el DCPIP se incubaron por 10 minutos a 28°C, la reacción se inició por la adición de DCPIP 60  $\mu$ M.

**3.6.6 Succinato citocromo c reductasa** La actividad de esta enzima fue determinada por el método descrito por Somlo (Slonimski et al., 1965) midiendo la reducción del citocromo *c* después de bloquear la cadena respiratoria con NaCN 1 mM y rotenona 1  $\mu$ M, la velocidad de reducción del citocromo *c* fue medida a una longitud de onda de 550 nm, usando un sistema de reacción compuesto por: tampón fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, NaCN 1 mM, succinato de sodio 5 mM, rotenona 1  $\mu$ M y 0,5 mg de proteína mitocondrial. La reacción se inició por la adición de 40 $\mu$ M de citocromo *c*.

**3.6.7 Citocromo c oxidasa** La actividad de esta enzima fue medida usando método descrito por Mason *et al* (1973). Acompañando la velocidad de oxidación del citocromo *c* a 550 nm, en un sistema de reacción constituido de: tampón fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM,

citocromo *c* reducido 30  $\mu$ M y 0,5 mg de proteína mitocondrial, la reacción fue iniciada por la adición de citocromo *c* reducido.

**3.6.8 ATPasa** La medición de la actividad de la ATPasa fue medida de acuerdo a la metodología descrita por Pullman (Pullman, Penefsky, Datta, & E., 1960). Se incubó por 10 minutos un sistema de reacción compuesto de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), MgSO<sub>4</sub> 3 mM, 1 mg de proteína mitocondrial, fosfoenolpiruvato 2,5 mM (PEP 2,5 mM) y 10 unidades (10 U) de piruvato quinasa (1 U de piruvato quinasa convierte 1  $\mu$ mol de PEP a piruvato en 1 minuto). La reacción fue iniciada por la agregación de ATP 4 mM y se interrumpió al agregar ácido tricloroacético (TCA) a 5% 10 minutos después de iniciada la reacción. La solución resultante se centrifugó a 10.000 x g por 1 minuto y se tomó el sobrenadante, al cual se le midió la absorbancia del complejo fosfomolibdato a 820 nm para evaluar la concentración de fosfato en el medio utilizando una curva de calibración previamente realizada.

**3.6.9 Análisis estadístico** El análisis de los datos se muestran con la media  $\pm$  desviación estándar y fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Turkey para la comparación de medias y variaciones significativas.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Extracción de mitocondrias de *Rhodnius prolixus* y evaluación de la respiración mitocondrial

Para la extracción de mitocondrias de *R. prolixus* se partió de la metodología usada para larvas de *A. aegypti* (Borrero Landazábal, 2014), 6 gramos de individuos adultos con ayuno mínimo de 8 días fueron incapacitados por frío ( -20 °C, 5 min), se dispuso de ellos en 15 mL medio de extracción compuesto de 100 mM de Sacarosa, 1 mM de EGTA, 2 mg/mL de BSA, 20 mM de HEPES a un pH de 7,4 y se homogeneizó la muestra usando un homogeneizador tipo Van Potter Elvehjem. El material obtenido se filtró usando lana de vidrio y se centrifugó a 800 x g por 5 min, el sobrenadante fue centrifugado a 10000 x g por 10 minutos. El precipitado que se obtuvo se resuspendió en medio de extracción y fue centrifugado a 800 x g por 5 min, se descartó el sedimento y se centrifugó a 10000 x g por 10 min, el sobrenadante fue re suspendido en medio de lavado compuesto de de 100 mM de Sacarosa, 1 mM de EGTA, 20 mM de HEPES a un pH de 7,4, todo el proceso se realizó a 4°C. Esta metodología de extracción dio un rendimiento de  $0,58 \pm 0,18$  mg de proteína/ g de individuos utilizados. Este bajo rendimiento en la extracción es debido a que se usa todos los tejidos presenten en el triatomino, los cuales varían en resistencia generando un rendimiento menor de extracción menor al aumentar la resistencia del tejido por lo cual se debe disminuir el tamaño de los órganos resistentes como músculos por métodos de cortado o licuado(Nicholls & Ferguson, 2013).

Al realizar el control respiratorio de las mitocondrias extraídas, se observó un efecto de desacople en ellas, lo cual indica que la metodología tampoco permitía la obtención de mitocondrias integras. En la figura 6, se presenta el consumo de oxígeno de mitocondrias energizadas con glutamato de sodio como sustrato para la evaluación de la respiración vía complejo I. El polarograma muestra una actividad al introducir la mitocondria en el medio de incubación (estado 1) lo que confirma la presencia de organelas consumidoras de oxígeno, ya que el estado 1 debe presentar una leve caída en el consumo de oxígeno debido a los sustratos endógenos de la mitocondria(Wieckowski, Giorgi, Lebiezinska, Duszynski, & Pinton, 2009). Se observa un consumo de oxígeno en el estado 2 de 4,918 nmol/ml\*mg proteína que al compararse con el estado 3, donde hubo un consumo de 4,609 nmol/ml\*mg proteína es ligeramente mayor, lo cual no concuerda con el comportamiento de una mitocondria integra, ya que el estado 3 al tener la presencia de una mayor concentración de ADP debe presentar un consumo mayor de oxígeno(Nicholls & Ferguson, 2013; Wieckowski et al., 2009). Por último, el coeficiente de control respiratorio (CCR; estado 3/estado4) obtenido es de 1,6 y el aceptado para mitocondrias obtenidas de tejido debe ser mayor a 3(Nicholls & Ferguson, 2013; Wieckowski et al., 2009).

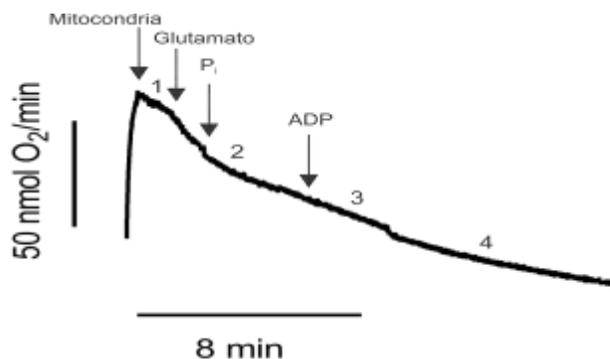


Figura 6. Polarograma representativo de los 3 experimentos independientes realizadas para la medición del control respiratorio usando glutamato de sodio como sustrato. (Proteína mitocondrial 0,5 mg, Pi 3 mM, glutamato de sodio 3 mM, ADP 1,6 mM).

Se hizo la repetición de la medición del control de respiración mitocondrial con glutamato de sodio en un segundo experimento independiente, en la tabla 1 se muestran los valores obtenidos para los controles, presentando el mismo fenómeno de desacoplamiento, ya que, si bien el estado 1 no presentó respiración acelerada a diferencia del primer control, si se evidenció un estado 2 similar al estado 4, lo cual indica desacoplamiento en la mitocondria (Wieckowski et al., 2009), de igual manera, el coeficiente de respiración obtenido fue de 1,69, similar al obtenido en el control 1 con glutamato.

Tabla 1. *Valores de velocidad de consumo de oxígeno de mitocondrias energizadas con glutamato de sodio aisladas con la primera metodología.*

<b>Estado</b>	<b>Experimento 1</b>		<b>Experimento 2</b>	
	Oxígeno consumido (nmol/ml*mg proteína)		Oxígeno consumido (nmol/ml*mg proteína)	
<b>Estado 1</b>	11,29		0,730	
<b>Estado 2</b>	4,918		1,538	
<b>Estado 3</b>	4,609		2,047	
<b>Estado 4</b>	2,885		1,211	
<b>CCR</b>	1,6		1,69	

De igual manera se realizó el control de respiración usando succinato de sodio como sustrato. En este control, se observó un comportamiento similar al obtenido en los controles con glutamato de sodio, ya que los estados 1 y 2 presentaron una respiración acelerada (2,539 nmol/ml\*mg proteína y 9,758 nmol/ml\*mg proteína respectivamente), pero se observó un cambio considerable en la caída de la concentración de oxígeno en el estado 3 (13,40 nmol/ml\*mg proteína) al llegar al estado 4 (7,266 nmol/ml\*mg proteína). En la figura 7 se muestra el polarograma obtenido, donde se aprecia visualmente que a pesar de que la mitocondria llega a un estado 4, el CCR obtenido fue de 1,84 indicando un daño en la mitocondria obtenida.

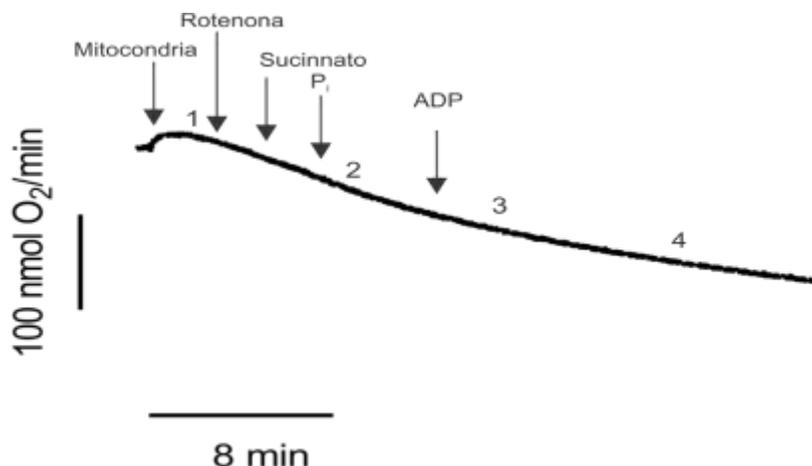


Figura 7. Polarograma representativo de los 3 experimentos independientes realizadas para la medición del control respiratorio usando succinato de sodio. (Proteína mitocondrial 0,5 mg, Pi 3 mM, succinato de sodio 5 mM, ADP 1,6 mM)

Al igual que con el control con glutamato, se realizó una repetición del control respiratorio con una extracción diferente, donde se evidenció que el estado 2 tenía un valor de consumo de oxígeno similar al estado 4, lo cual es un indicio de mitocondria acoplada, pero el CCR obtenido para la repetición fue de 1,49. En la tabla 2 se muestran los valores de cada estado obtenido en los diferentes controles realizados usando succinato de sodio como sustrato.

Tabla 2 Valores obtenidos luego del control realizado usando succinato de sodio como sustrato.

Estado	Experimento 1		Experimento 2	
	Oxígeno consumido (nmol/ml*mg proteína)			
Estado 1	2,539		0,218	
Estado 2	9,758		6,935	
Estado 3	13,40		9,686	
Estado 4	7,266		6,996	
CCR	1,84		1,49	

En búsqueda de mejorar el rendimiento de la extracción y la calidad de las mitocondrias extraídas, se realizaron cambios en el método de extracción. Se añadió un proceso de

homogeneizado fuerte por licuado basándose en lo reportado por Slocinska y colaboradores (Slocinska et al., 2011) y lo mostrado en literatura con respecto al tratamiento de tejidos resistentes (Nicholls & Ferguson, 2013), donde se cortan en pequeños fragmentos el tejido para la extracción de mitocondrias. Se licuaron 6 g de individuos adultos con 8 días de ayuno, adicionalmente, se cambió el tiempo de homogeneizado usando el método de Van Potter Elvehjem por 25 golpes en total, ya que durante el largo periodo de homogeneizado se podría estar presentando rozamiento entre el pistilo del homogeneizador y la pared del tubo, lo cual podría generar un exceso de homogeneizado provocando daño en la estructura de la mitocondria (Wieckowski et al., 2009).

De esta manera, la segunda metodología probada fue: 6 gramos de individuos adultos con ayuno mínimo de 8 días fueron incapacitados por frío ( -20 °C, 5 min), se transfirieron a 100 mL medio de extracción compuesto de 100 mM de Sacarosa, 1 mM de EGTA, 2 mg/mL de BSA, 20 mM de HEPES a un pH de 7,4 (relación peso/volumen 1:6) y se homogeneizó la muestra usando una licuadora de inmersión (15 pulsos) se licuó la muestra. Posteriormente se filtró usando una malla fina para eliminar los restos de exoesqueleto del insecto. El filtrado obtenido se homogeneizó usando un homogeneizador tipo Van Potter Elvehjem con 25 golpes. El material obtenido se filtró usando lana de vidrio y se centrifugó a 800 x g por 5 min, el sobrenadante fue centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos. El precipitado que se obtuvo se resuspendió en medio de extracción y fue centrifugado a 800 x g por 5 min, se descartó el sedimento y se centrifugó a 10.000 x g por 10 min, el sobrenadante fue re suspendido en medio de lavado compuesto de de 100 mM de Sacarosa, 1 mM de EGTA, 20 mM de HEPES a un pH de 7,4, todo el proceso se realizó a 4°C. Esta metodología de extracción dio un rendimiento de  $5,84 \pm 0,06$  mg de proteína/g de individuos utilizados. El método utilizado generó un rendimiento de extracción 10 veces

mayor al anterior, debido a que el proceso de homogeneización fuerte permite aprovechar todos los tejidos del triatomino y de esta manera se aprovecha de mejor manera el cuerpo del insecto.

Al igual que en el método anterior, se realizaron controles con glutamato de sodio pero se realizaron unos cambios. Según lo reportado por Rocco-machado y colaboradores (Rocco-machado et al., 2014), la mitocondria de *Rhodnius prolixus* contiene en su estructura 2 proteínas desacopladoras (UCP), las cuales se inhiben añadiendo GDP 0,5 mM y BSA 0,05% en el medio de incubación, teniendo en cuenta esto, se añadió además de los sustratos necesarios como lo son glutamato de sodio, fosfato, ADP y oligomicina 3,4  $\mu$ M. Se añadió BSA 0,05% para evaluar la obtención de un estado 4 inducido y FCCP 10  $\mu$ M para evaluar el estado 3 desacoplado. En una mitocondria integra, el estado 3 desacoplado debe ser igual o mayor al estado 3 producido por el ADP (Nicholls & Ferguson, 2013). Al evaluar el consumo de oxígeno se obtuvo un estado 4 inducido por la oligomicina con un valor de consumo de oxígeno muy similar al estado 2 y al estado 3, lo que indica que la mitocondria se encuentra desacoplada, al agregar BSA, el consumo disminuye cerca de un 54%, mostrando que este desacoplamiento es debido a la presencia de proteínas desacopladoras dentro de la mitocondria. Lo que hace que esta actúe de manera desacoplada permitiendo la entrada de protones a el espacio intermembrana y favoreciendo el consumo de O<sub>2</sub> dentro de la cámara de reacción. Este consumo de oxígeno es posible debido a que las UCP disminuyen la síntesis de ATP al introducir protones a la matriz mitocondrial y de esta manera evitar la generación de especies reactivas de oxígeno (Nicholls & Ferguson, 2013), particularmente, en el insecto *Rhodnius prolixus* al ser un hematófago, es susceptible a eventos oxidativos debido a la presencia de grupos hemo, por lo cual las UCP 4 y UCP5 actúan como antioxidantes evitando la formación de ROS en la mitocondria (Rocco-machado et al., 2014). Al comparar el estado 3 desacoplado obtenido con el estado 3 en presencia de ADP, se observa que

el valor del primero no es mayor, lo cual es otro indicio de que la mitocondria esta desacoplada. En la figura 8 se muestra el polarograma obtenido durante este control.

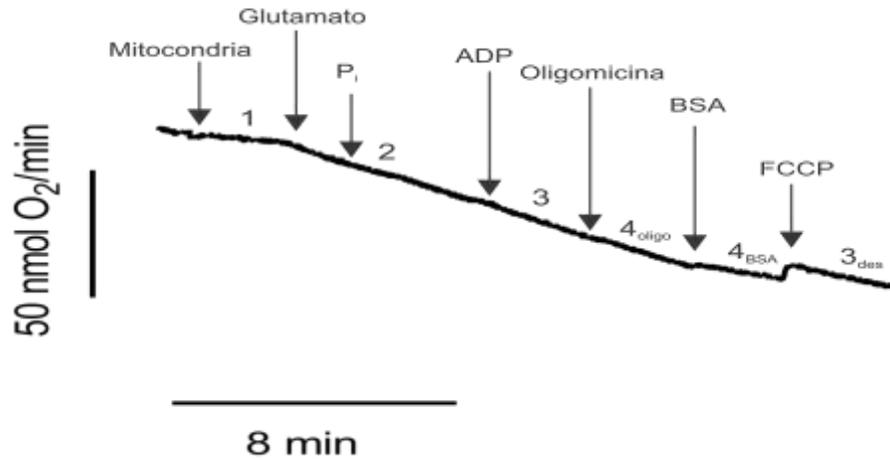


Figura 8. Polarograma representativo de los 3 experimentos independientes realizadas para la medición del control respiratorio usando glutamato de sodio como sustrato. (Proteína mitocondrial 0,5 mg, Pi 3 mM, glutamato de sodio 3 mM, ADP 1,6 mM, oligomicina 6,8  $\mu$ M, BSA 0,05%, FCCP 10  $\mu$ M)

En un segundo experimento independiente, se obtuvo un comportamiento similar al obtenido inicialmente, el estado 3 aumenta levemente con respecto al estado 2; el estado 4 inducido por oligomicina no inhibe fuertemente el consumo de oxígeno y se obtiene una inhibición fuerte al añadir BSA en el medio. Se obtiene un estado 3 desacoplado que no es mayor al estado 3 generado por el ADP. En la tabla 5 se muestran los valores de los estados obtenidos en cada uno de los experimentos independientes.

Tabla 3 *Resultados de los controles respiratorios por cada estado presente en el polarograma.*

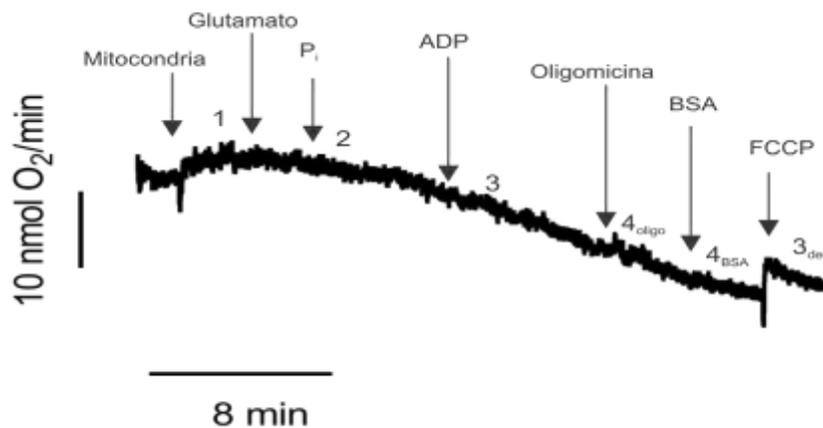
Estado	Experimento 1		Experimento 2	
	Oxígeno (nmol/ml*mg proteína)	consumido	Oxígeno (nmol/ml*mg proteína)	consumido
Estado 1	0,923		0,309	
Estado 2	3,980		1,909	
Estado 3	4,431		1,998	
Estado 4 oligomicina	4,094		1,228	
Estado 4 BSA	2,206		0,090	
Estado 3 desacoplado	2,967		0,952	
CCR	2,01		2,22	

En la tabla 3 se observan los coeficientes de control respiratorio, los cuales no cumplen con el requerimiento de ser igual o superior a 3 para considerar que la mitocondria se encuentra acoplada, debido a esto se decide cambiar la metodología variando las velocidades de centrifugación y los tiempos.

Cambiando estas variables, tenemos la siguiente metodología: 6 gramos de individuos adultos con ayuno mínimo de 8 días fueron incapacitados por frío ( -20 °C, 5 min), se transfirieron a un vaso de precipitado con 100 mL medio de extracción compuesto de 100 mM de Sacarosa, 1 mM de EGTA, 2 mg/mL de BSA, 20 mM de HEPES a un pH de 7,4 (relación peso/volumen 1:6) y se homogeneizó la muestra usando una licuadora de inmersión (15 pulsos). Se filtró el homogenato usando una malla fina para eliminar los restos de exoesqueleto del insecto. El filtrado obtenido se homogeneizó usando un homogeneizador tipo Van Potter Elvehjem con 25 golpes. El material obtenido se filtró usando lana de vidrio y se centrifugó a 800 x g por 5 min, el sobrenadante fue centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos. El precipitado que se obtuvo se resuspendió en medio de lavado compuesto de de 100 mM de Sacarosa, 1 mM de EGTA, 20 mM de HEPES a un pH de 7,4 y fue centrifugado a 8.000 x g por 10 min, el sobrenadante fue re suspendido en medio de lavado y centrifugado a 7.000 x g por 10 minutos. El precipitado obtenido fue re suspendido en

medio de lavado, todo el proceso se realizó a 4°C. Esta metodología de extracción dio un rendimiento de  $7,11 \pm 0,11$  mg de proteína/ g de individuos utilizados.

Al igual que en los anteriores métodos de extracción, se realizó un control con glutamato de sodio como sustrato, el cual muestra un comportamiento similar a los mostrados en la segunda metodología de extracción. El estado 2 y el estado 3 tienen velocidades de consumo de  $O_2$  cercanos ( $0,068$  nmol/ml\*mg proteína y  $1,016$  nmol/ml\*mg proteína respectivamente) y el estado 4 inducido por BSA muestra una alta inhibición de la respiración ( $57,35\%$  respecto al estado 3 en presencia de ADP y  $58,76\%$  respecto al estado 4 inducido por oligomicina) y el estado 3 desacoplado no supera la tasa de consumo producido por el estado 3 en presencia de ADP. En la figura 9 se muestra el polarograma obtenido en este control y en la tabla 5 se muestran los valores del consumo de oxígeno en cada uno de los estados medidos en los controles.



*Figura 9.* Polarograma representativo de los 3 experimentos independientes realizadas para la medición del control respiratorio usando glutamato de sodio como sustrato. (Proteína mitocondrial 0,5 mg,  $P_i$  3 mM, glutamato de sodio 3 mM, ADP 1,6 mM, oligomicina 6,8  $\mu$ M, BSA 0,05%, FCCP 10  $\mu$ M).

Tabla 4 Valores obtenidos para cada estado de respiración mitocondrial para la tercera metodología de extracción.

Estado	Experimento 1		Experimento 2	
	Oxígeno consumido (nmol/ml*mg proteína)		Oxígeno consumido (nmol/ml*mg proteína)	
Estado 1	0,068		0,074	
Estado 2	1,016		1,492	
Estado 3	1,163		1,676	
Estado 4 oligomicina	1,135		0,779	
Estado 4 BSA	0,667		0,776	
Estado 3 desacoplado	0,944		0,672	
CCR	1,74		2,16	

En la tabla 4, en el segundo experimento independiente, se ve una inhibición de la respiración en el estado 4 inducido por oligomicina, lo cual es un indicativo de acoplamiento en las mitocondrias obtenidas, debido a esto se realizó un control utilizando succinato de sodio como sustrato para comprobar lo obtenido y descartar un falso positivo.

El control con succinato muestra un consumo de oxígeno en el estado 1 de 0,060 nmol O<sub>2</sub>/mL\*mg proteína lo cual es normal para una mitocondria. Al inducir el estado 2 se ve un aumento en el consumo de oxígeno (13,60 nmol O<sub>2</sub>/mL\*mg proteína), el cual al compararse con el estado 3 en presencia de ADP es muy similar, con un leve aumento debido a la presencia del ADP en el medio (15,21 nmol O<sub>2</sub>/mL\*mg proteína). Al inducir el estado 4 con oligomicina y con BSA no se obtiene una disminución del consumo de oxígeno (15,15 y 15,55 nmol O<sub>2</sub>/mL\*mg proteína respectivamente) lo que muestra un comportamiento de mitocondria desacoplada, comportamiento que es sustentado adicionalmente por el CCR obtenido de 0,97.

La tabla 5 muestra los valores obtenidos en cada uno de los experimentos independientes realizados con este sustrato.

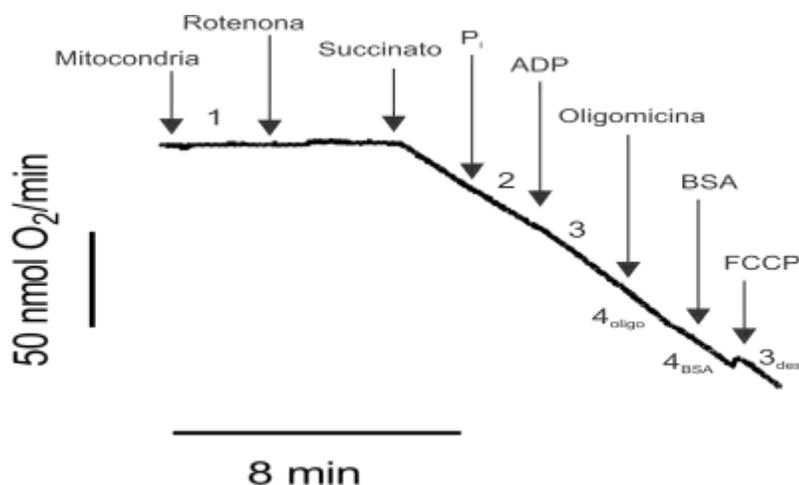


Figura 10. Polarograma representativo de los 3 experimentos independientes realizadas para la medición del control respiratorio usando glutamato de sodio como sustrato. (Proteína mitocondrial 0,5 mg, Pi 3 mM, succinato de sodio 5 mM, ADP 1,6 mM, oligomicina 6,8  $\mu$ M, BSA 0,05%, FCCP 10  $\mu$ M).

Tabla 5 Valores obtenidos para el control respiratorio usando succinato de sodio como sustrato.

Estado	Experimento 1		Experimento 2	
	Oxígeno consumido (nmol/ml*mg proteína)	Oxígeno consumido (nmol/ml*mg proteína)	Oxígeno consumido (nmol/ml*mg proteína)	Oxígeno consumido (nmol/ml*mg proteína)
Estado 1	0,060		0,039	
Estado 2	13,60		9,202	
Estado 3	15,21		11,20	
Estado 4 oligomicina	15,15		12,63	
Estado 4 BSA	15,55		11,33	
Estado 3 desacoplado	13,09		11,29	
CCR	0,97		0,99	

Durante los distintos controles respiratorios reportados anteriormente, se varió el sustrato entre glutamato de sodio y succinato de sodio, mostrando mejores resultados de CCR al usar glutamato de sodio. Esto se debe a la cantidad de protones translocados por electrón, debido a que el succinato de sodio tiene una menor relación de protones translocados por electrón (0 protones traslocados / 2 electrones) ya que es oxidado por el complejo II tendrá un menor valor

de CCR comparado con el control usando glutamato de sodio, el cual actúa vía complejo I translocando 4 H<sup>+</sup> por cada electrón donado.

Teniendo en cuenta los experimentos descritos anteriormente, se escogió como metodología de aislamiento de mitocondria en *Rhodnius prolixus* aquella que mostró un mejor comportamiento cuanto rendimiento de extracción como en los controles respiratorios, esta metodología se describe a continuación:

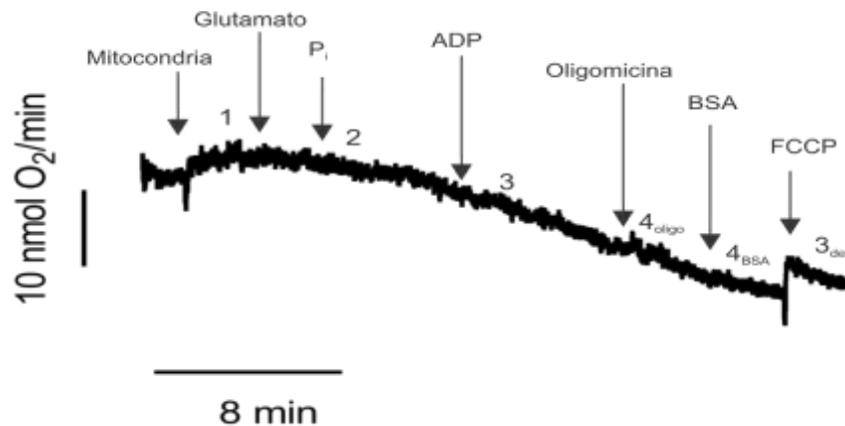
#### **Extracción de mitocondrias de *Rhodnius prolixus***

La metodología obtenida para la extracción de mitocondrias de *R. prolixus* buscando obtener la mayor cantidad de proteína mitocondrial usando la menor cantidad posible de insectos, para ello se escogió la fase adulta de los triatominos, debido a que presentan mayor cantidad de tejido. Para esta metodología se dispuso de 6 gramos de individuos adultos con ayuno mínimo de 8 días, los cuales se incapacitaron por medio de frío (-20 °C, 5 min), luego se dispusieron en 100 mL de medio de extracción compuesto de 100 mM de Sacarosa, 1 mM de EGTA, 2 mg/mL de BSA, 20 mM de HEPES a un pH de 7,4 (relación peso/volumen 1:6) y se realizó un homogeneizado fuerte por licuado (15 pulsaciones), el material obtenido fue filtrado usando una malla fina para luego ser homogeneizado en un homogeneizador tipo Van Potter Elvehjem, el homogeneizado se filtró usando lana de vidrio y se centrifugó a 800 x g por 5 min, el sobrenadante obtenido se centrifugó a 10.000 x g por 10 min, el precipitado obtenido se resuspendió en medio de lavado compuesto de 100 mM de Sacarosa, 1 mM de EGTA, 20 mM de HEPES a un pH de 7,4 y fue centrifugado a 8.000 x g por 10 min, el sedimento obtenido se resuspende usando medio de lavado y se centrifugó a 7.000 x g por 10 min, el aglomerado obtenido son mitocondrias a las cuales se les evaluó su integridad por medio de un control respiratorio. Todo el proceso se

realizó a 4 °C obteniendo una concentración de proteína de  $7,11 \pm 0,11$  mg de proteína / g de material biológico.

### Evaluación de la respiración mitocondrial.

Una vez extraídas las mitocondrias, se realizó un control respiratorio para evaluar su integridad y de esta manera concluir si el método que se usó favorece la extracción de mitocondrias integras. De esta manera se evaluó el estado 1, estado 2, estado 3 y estado 4, adicionalmente se evaluaron los estados 4 inducido por oligomicina, estado 4 producido por BSA y estado 3 desacoplado, para esto se agregó oligomicina  $7,8 \mu\text{M}$ , BSA 0,05 % y FCCP  $10 \mu\text{M}$  respectivamente. A continuación, la figura 11 muestra el polarograma obtenido en la medición:



*Figura 11.* Polarograma representativo de los 3 experimentos independientes realizadas para la medición del control respiratorio usando glutamato de sodio como sustrato. (Proteína mitocondrial 0,5 mg, Pi 3 mM, glutamato de sodio 3 mM, ADP 1,6 mM, oligomicina  $6,8 \mu\text{M}$ , BSA 0,05%, FCCP  $10 \mu\text{M}$ ).

A continuación, la tabla 6 muestra los valores obtenidos para cada estado de respiración obtenidos en 3 experimentos independientes:

Tabla 6 Valores obtenidos de la velocidad de consumo de oxígeno para cada estado de la respiración mitocondrial (media  $\pm$  desviación estándar)

Estado respiratorio	Oxígeno consumido (nmol/mL*mg proteína)
Estado 1	0,142 $\pm$ 0,008
Estado 2	2,508 $\pm$ 0,337
Estado 3	2,839 $\pm$ 0,752
Estado 4 Oligomicina	1,214 $\pm$ 0,749
Estado 4 BSA	1,443 $\pm$ 0,154
Estado 3 desacoplado	1,616 $\pm$ 0,385
Coefficiente de control respiratorio	3,176 $\pm$ 1,594

#### 4.2 Determinación de la actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial.

Las mitocondrias extraídas por el método descrito anteriormente fueron fragmentadas por choque térmico usando nitrógeno líquido. A continuación, en la tabla 7, se relacionan las actividades de cada enzima de la cadena transportadora de electrones:

Tabla 7 Actividades de las diferentes enzimas participantes en la cadena de transporte de electrones.

Enzima	Actividad
NADH Oxidasa	28,955 $\pm$ 4,445 $\frac{\text{nmolesO}_2}{\text{min} \cdot \text{mg proteína}}$
NADH Deshidrogenasa	0,3344 $\pm$ 0,076 $\frac{\mu\text{moles Ferricianuro reducido}}{\text{min} \cdot \text{mg proteína}}$
NADH Citocromo <i>c</i> reductasa	0,2801 $\pm$ 0,048 $\frac{\mu\text{moles citocromo } c \text{ reducido}}{\text{min} \cdot \text{mg proteína}}$
Succinato Oxidasa	3,29 $\pm$ 0,613 $\frac{\text{nmolesO}_2}{\text{min} \cdot \text{mg proteína}}$
Succinato Deshidrogenasa	0,83 $\pm$ 0,234 $\frac{\mu\text{moles DCPIP reducido}}{\text{min} \cdot \text{mg proteína}}$
Succinato Citocromo <i>c</i> reductasa	437,8 $\pm$ 2,56 $\frac{\text{nmoles citocromo } c \text{ reducido}}{\text{min} \cdot \text{mg proteína}}$
Citocromo <i>c</i> Oxidasa	2,11 $\pm$ 0,278 $\frac{\text{nmoles citocromo } c \text{ oxidado}}{\text{min} \cdot \text{mg proteína}}$
ATP asa	0,609 $\pm$ 0,067 $\frac{\mu\text{moles Fosfato hidrolizado}}{\text{min} \cdot \text{mg proteína}}$

**4.2.1 NADH Oxidasa, NADH deshidrogenasa y NADH citocromo c reductasa** El complejo I de la cadena respiratoria realiza la reducción y la oxidación del NADH. En el caso de la NADH oxidasa, se evaluó el paso de los electrones obtenidos por el complejo I a partir del NADH, los cuales son transportados por el citocromo *c* (Complejo III) hacia el complejo IV para la formación de H<sub>2</sub>O a partir de O<sub>2</sub>, los protones del medio y los electrones cedidos por el complejo III, es decir, este ensayo mide la velocidad con que el oxígeno es reducido a agua gracias a los electrones promovidos por el complejo I (Nicholls & Ferguson, 2013).

A continuación, la figura 12 muestra un comparativo entre la actividad de la NADH oxidasa, NADH deshidrogenasa y NADH citocromo *c* reductasa del *Rhodnius prolixus* obtenida con los reportados para *Rattus norvegicus* (rata de laboratorio) (Alvarez Santos, 2017) y larvas de *Aedes aegypti* (Borrero Landazábal, 2014).

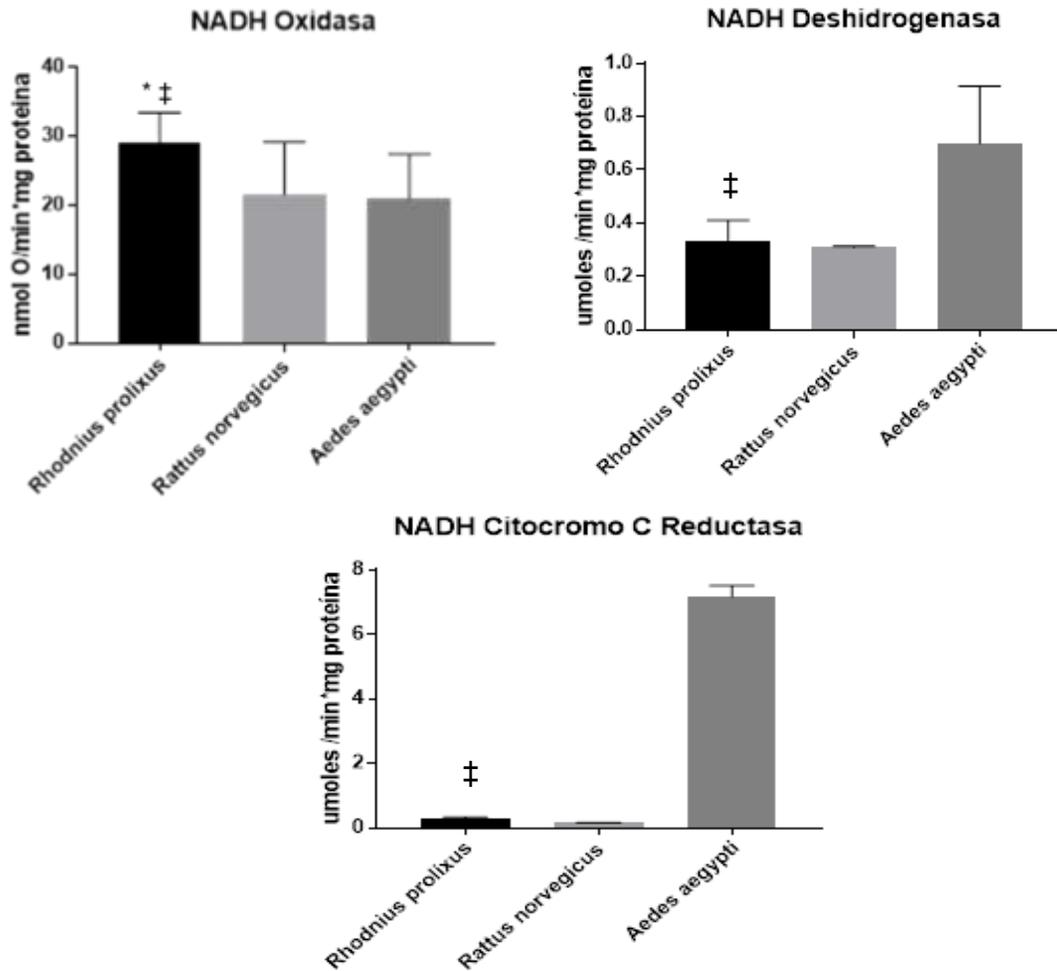


Figura 12. Comparativo de la actividad de las enzimas NADH oxidasa, NADH deshidrogenasa y NADH citocromo c reductasa entre *Rhodnius prolixus*, *Rattus norvegicus* y *Aedes aegypti*. Para NADH deshidrogenasa se muestra la actividad en  $\mu\text{mol}$  de ferricianato reducido/min\*mg de proteína y para NADH citocromo c reductasa se muestra en  $\mu\text{mol}$  de citocromo c reducido/min\*mg de proteína. \*  $p > 0,05$  respecto a rata, ‡  $p > 0,001$  respecto a mosquito.

La actividad de la NADH oxidasa en mitocondria de *Rhodnius prolixus* es mayor a las actividades mostradas para rata y mosquito ( $28,955 \pm 4,445$  nmol O<sub>2</sub>/min\*mg proteína,  $21,5 \pm 7,6$  nmol O<sub>2</sub>/min\*mg proteína y  $20,917 \pm 6,448$  nmol O<sub>2</sub>/min\*mg proteína respectivamente). El complejo I es el complejo principal en la mitocondria, del cual se da el mayor aporte de electrones para la cadena de transporte (Nicholls & Ferguson, 2013), adicionalmente, en insectos que sufren metamorfosis en su ciclo de vida, se ha registrado que el complejo II disminuye su

funcionamiento al comenzar los cambios en el cuerpo (Chamberlin & Chamberlin, 2012), debido a que estos triatomíneos sufren de 5 cambios durante su ciclo de vida, es probable que la mitocondria de estos insectos esté especializada en el transporte de electrones a través del complejo I.

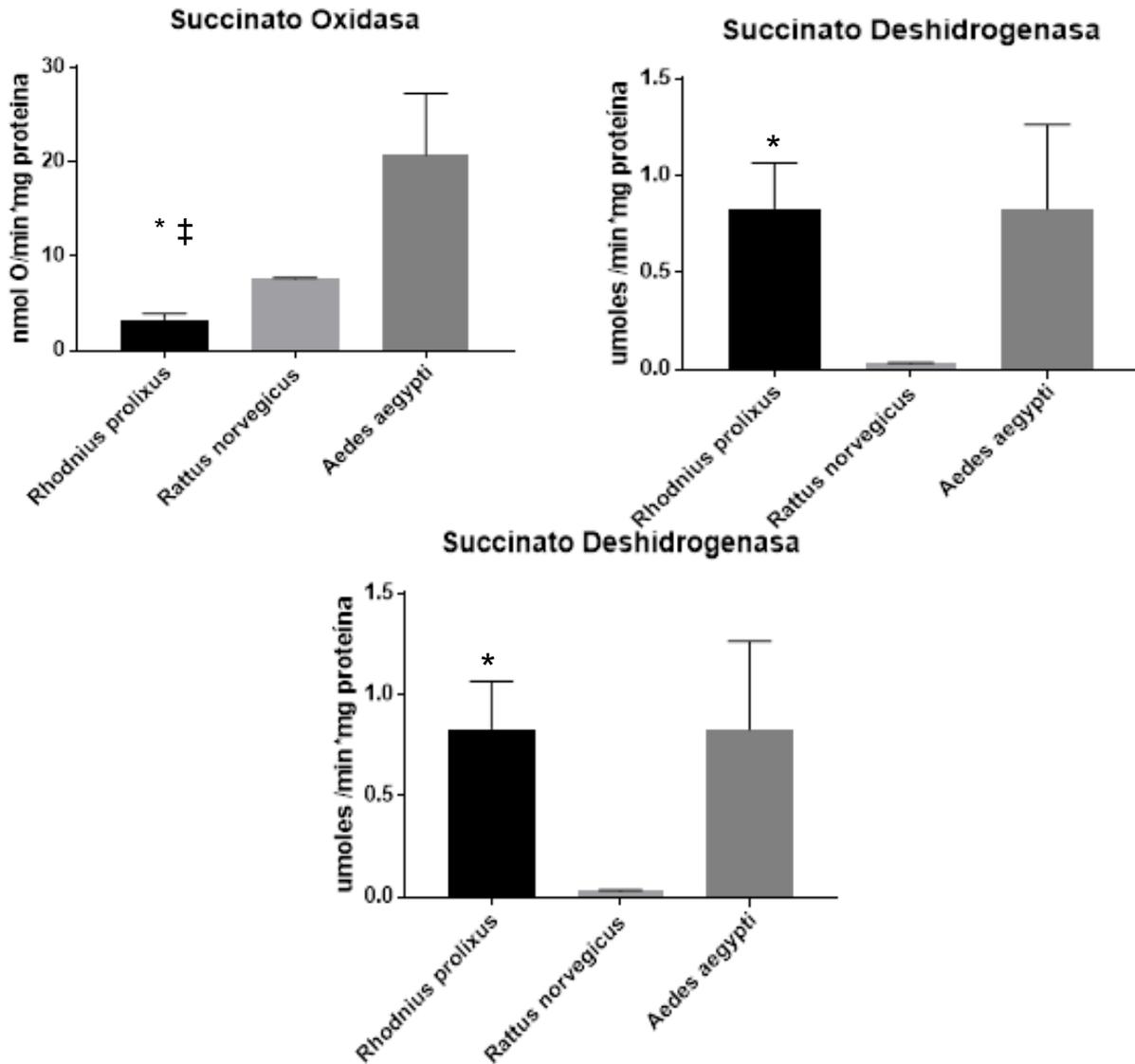
La NADH deshidrogenasa tiene como función la oxidación del NADH a  $\text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$  que son captados por el ferricianuro para oxidarse a ferrocianuro. Esta actividad muestra la capacidad que tiene la mitocondria de oxidar el NADH para obtener electrones que aporten en la cadena transportadora y de esta manera obtener energía eficientemente. En la figura 12 se muestra la comparación de la actividad de esta enzima entre triatomíneos, rata y larva de mosquito con actividades de  $0,3344 \pm 0,076$   $\mu\text{moles de ferricianuro reducido} / \text{min} \cdot \text{mg de proteína}$ ,  $0,309 \pm 0,004$   $\mu\text{moles de ferricianuro reducido} / \text{min} \cdot \text{mg de proteína}$  y  $0,7 \pm 0,214$   $\mu\text{moles de ferricianuro reducido} / \text{min} \cdot \text{mg de proteína}$  respectivamente.

Se muestra mayor actividad en la larva de mosquito, esto es debido a el constante movimiento en la que se encuentra la larva, lo que la hace requerir de una mayor cantidad de energía a comparación de un triatomíneo adulto, los cuales se caracterizan por su escaso movimiento, adicionalmente, debido a que la larva de mosquito está en espera de muda, este necesita ser efectivo en el proceso de adquirir energía, ya que en estado de pupa será incapaz de alimentarse.

La cuantificación de la NADH citocromo *c* reductasa tiene como finalidad evaluar la capacidad que tiene el complejo I de la mitocondria de ceder los electrones obtenidos a partir del NADH hacía el citocromo *c* (complejo III) para que sean posteriormente cedidos por un proceso de oxidación del citocromo *c* al complejo IV y de esta manera continuar con la cadena de transporte electrónico. En la figura 12 se muestra un comparativo en las actividades de esta enzima en triatomíneo ( $0,2801 \pm 0,048$   $\mu\text{mol de citocromo } c \text{ reducido} / \text{min} \cdot \text{mg proteína}$ ), en rata

( $0,16 \pm 0,01$   $\mu\text{mol}$  de citocromo *c* reducido/min\*mg proteína) y en *A. aegypti* ( $7,17 \pm 0,34$   $\mu\text{mol}$  de citocromo *c* reducido/min\*mg proteína). Se evidencia de esta manera una actividad significativamente mayor en las mitocondrias de *R. prolixus* a comparación de la mitocondria de mosquito, lo cual evidencia una vez más una posible especialización en la mitocondria de los triatomíneos en el transporte de electrones en el complejo I.

**4.2.2 Succinato oxidasa, Succinato deshidrogenasa y Succinato citocromo *c* reductasa.** La actividad de la enzima succinato oxidasa muestra el transporte de los electrones desde el complejo II, cediéndolos al complejo III el cual usando el citocromo *c* los lleva al complejo IV, donde se usan para reducir el oxígeno molecular a agua. En la figura 13 se muestra las actividades de las enzimas Succinato oxidasa, Succinato deshidrogenasa y Succinato citocromo *c* reductasa en *Rhodnius prolixus* comparados con *Rattus norvegicus* y larvas de *Aedes aegypti*.



*Figura 13.* Comparativo de actividad de succinato oxidasa, succinato deshidrogenasa y succinato citocromo c reductasa entre *Rhodnius prolixus*, *Rattus norvegicus* y larvas de *Aedes aegypti*. Para la succinato deshidrogenasa la actividad se muestra en  $\mu\text{mol}$  de DCPIP reducido/min\*mg de proteína, para succinato citocromo c reductasa, se muestra la actividad en  $\mu\text{mol}$  de citocromo c reducido / min\*mg de proteína. \*  $p > 0,001$  respecto a rata; ‡  $p > 0,001$  respecto a mosquito

Al comparar los resultados obtenidos de mitocondrias de *Rhodnius prolixus* con los reportados en rata, se ve una disminución significativa en la actividad de la enzima succinato oxidasa, esto se puede explicar a que, según reportes, se ha mostrado que la actividad de la

succinato oxidasa se ve disminuida debido a los cambio fisiológicos que tienen los insectos (Chamberlin & Chamberlin, 2012).

La actividad de la succinato deshidrogenasa muestra la capacidad que tiene el complejo II mitocondrial para transferir los electrones obtenidos a partir de la oxidación del succinato a fumarato, hacia la ubiquinona. La actividad de esta enzima en *Rhodnius prolixus* fue de  $0,83 \pm 0,23$   $\mu\text{moles de DCPIP reducido}/\text{min} \cdot \text{mg de proteína}$ , la cual al compararse con lo reportado para rata  $0,028 \pm 0,006$   $\mu\text{moles de DCPIP reducido}/\text{min} \cdot \text{mg de proteína}$  muestra un aumento significativo en la actividad de la enzima, esto se puede explicar a que en los insectos hay una preferencia a la obtención de energía a partir de la prolina (Chamberlin & Chamberlin, 2012; Gonçalves et al., 2009; Rocco-machado et al., 2014), lo que concuerda con lo reportado en larvas de *A. aegypti* las cuales tienen una actividad de  $0,827 \pm 0,435$   $\mu\text{moles de DCPIP reducido}/\text{min} \cdot \text{mg de proteína}$ . La prolina en su ruta de degradación termina en el sustrato  $\alpha$ -oxoglutarato, el cual es un ácido tricarboxílico que participa en el ciclo de Krebs, por lo cual el complejo II tendrá una mayor actividad comparado con la de un mamífero que no tiene los aportes dados por la prolina en la misma proporción.

La capacidad que tiene la mitocondria de ceder los electrones provenientes del complejo II hacía el complejo III se mide en la enzima Succinato citocromo *c* reductasa. En la figura 15 se muestra la comparación de los valores obtenidos en *R. prolixus*, *Rattus norvegicus* ( $437,8 \pm 2,56$   $\mu\text{moles de citocromo } c \text{ reducido}/\text{min} \cdot \text{mg de proteína}$ ,  $0,028 \pm 0,006$   $\mu\text{moles de citocromo } c \text{ reducido}/\text{min} \cdot \text{mg de proteína}$ ), la actividad de esta enzima en mitocondrias de *Aedes aegypti* no han sido evaluado. Se evidencia un aumento significativo en la actividad de la enzima en las mitocondrias de *R. prolixus* lo cual evidencia una vez más la especialización que tienen estos

insectos en transportar electrones vía complejo II debido a la degradación de la prolina en su metabolismo.

**4.2.3 Citocromo c Oxidasa** La Actividad de la citocromo *c* oxidasa muestra la capacidad que tiene la mitocondria de transportar los electrones desde el complejo III hasta el complejo IV. En la figura 14 se observa la comparación entre los valores obtenidos de la actividad de la enzima citocromo *c* reductasa en triatomino ( $2,11 \pm 0,278$   $\mu$ moles de citocromo *c* oxidado/min\*mg de proteína), en rata ( $8,7 \pm 1,7$   $\mu$ moles de citocromo *c* oxidado/min\*mg de proteína) y en larva de *A. aegypti* ( $2,7 \pm 0,286$   $\mu$ moles de citocromo *c* oxidado/min\*mg de proteína). Se observa una disminución significativa en las actividades tanto en *R. prolixus* como en larvas de mosquito y esto se debe a que en mamíferos, el control de la respiración mitocondrial no se encuentra en el complejo IV, a diferencia de los insectos, principalmente los hematófagos, donde este control al flujo de electrones se encuentra en este complejo (Rocco-machado et al., 2014).

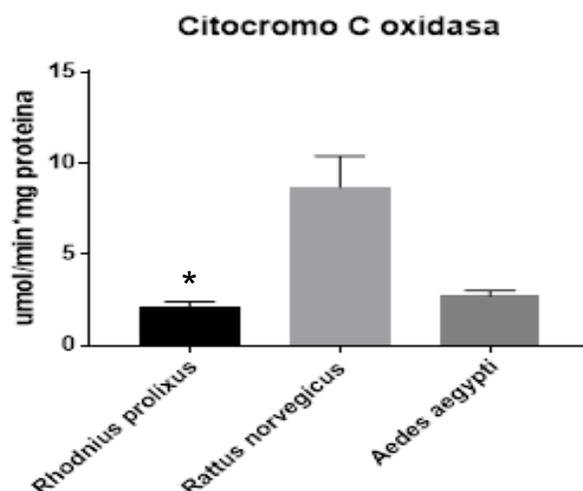


Figura 14. Comparativo de actividad de citocromo *c* oxidasa entre *Rhodnius prolixus*, *Rattus norvegicus* y larvas de *Aedes aegypti* expresado en  $\mu$ moles de citocromo *c* oxidado/min\*mg de proteína. \*  $p > 0,05$

**4.2.4 ATPasa.** La cuantificación de la enzima ATPasa muestra la velocidad con que se transforma ATP en ADP, debido a que, a diferencia de la ATP sintaza, la ATPasa sintetiza ADP a través de la hidrólisis del ATP, transportando de manera inversa los protones que tiene disponibles. La actividad medida para mitocondrias de *R. prolixus* fue de  $0,609 \pm 0,67$   $\mu$ moles de fosfato hidrolizado/min\*mg de proteína, lo reportado para *Rattus norvegicus* es de  $0,030 \pm 0,001$   $\mu$ moles de fosfato hidrolizado/min\*mg de proteína y para larvas de *Aedes aegypti*  $0,17 \pm 0,05$   $\mu$ moles de fosfato hidrolizado/min\*mg de proteína. En la figura 15 se muestra la actividad de la ATPasa en los diferentes organismos, donde se observa un aumento significativo en la actividad de esta enzima en mitocondrias aisladas de triatomino. Esto puede ser provocado por el efecto que tienen las proteínas desacopladoras sobre esta enzima, ya que al momento de comenzar con la entrada de protones, la enzima ATPsintaza cambia su función de introducir protones para sintetizar ATP desde ADP a sacar protones para reestablecer de esta manera el potencial de membrana en la mitocondria, lo que genera que se forme ADP a partir del ATP presente en la mitocondria (Nicholls & Ferguson, 2013). Debido a esto, la actividad de la ATP asa aumenta a comparación de las mitocondrias de un mamífero y a las de larva, las cuales se presume no tienen proteínas desacopladoras.

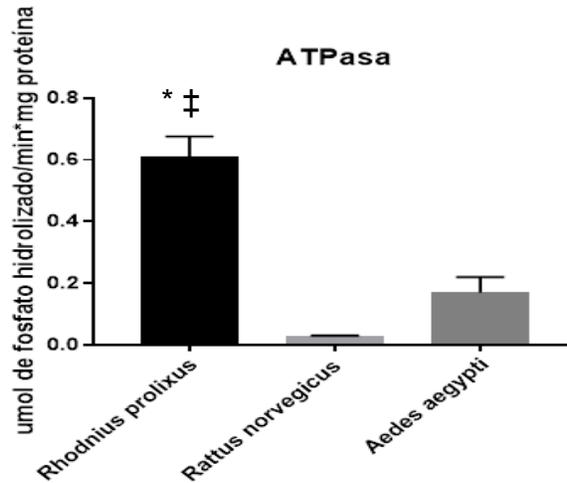


Figura 15 Comparativo de actividad de ATPasa entre *Rhodnius prolixus*, *Rattus norvegicus* y larvas de *Aedes aegypti* expresado en  $\mu$ moles de citocromo c oxidado/min\*mg de proteína. \*  $p > 0,001$ ; ‡  $p > 0,001$  respecto a mosquito.

De acuerdo con los controles de las actividades de las diferentes enzimas de la cadena transportadora de electrones mostrados anteriormente, cuyos valores son congruentes a los encontrados en otros insectos hematófagos como, el *Aedes aegypti*, se pudo demostrar que esta metodología puede ser usada en la evaluación de potenciales insecticidas para el control de este insecto, además de abrir otros campos en la bioenergética mitocondrial de este triatomino, el cual ha sido poco explorado por la ciencia actualmente.

## 5. Conclusiones

De acuerdo a los resultados presentados, se puede concluir que se logró adecuar un método para la extracción de mitocondrias de *Rhodnius prolixus* con rendimiento de extracción ( $7,11 \pm 0,11$  mg de proteína / g de individuos).

Los controles respiratorios realizados arrojaron resultados de mitocondrias fragmentadas.

Al medir la actividad de los complejos involucrados en el transporte de electrones por medio del complejo I, se evidenció un aumento en la actividad de las enzimas involucradas (NADH oxidasa, NADH deshidrogenasa y NADH citocromo *c* reductasa) con respecto a las actividades reportadas para mitocondria de rata.

Las actividades de las enzimas que actúan en la cadena de transporte de electrones desde el complejo II, en mitocondrias de triatomino, tienen cambios significativos al compararlos con la mitocondria de *Rattus norvegicus*, donde la succinato oxidasa tiene una disminución significativa y la succinato deshidrogenasa y la succinato citocromo *c* oxidasa tiene un aumento significativo en la actividad.

La actividad de la citocromo *c* oxidasa en *R. prolixus* tiene una disminución significativa al compararlo con la actividad reportada para mitocondria de rata pero es igual a la obtenida en mitocondria de larva de mosquito.

La actividad de la enzima ATPasa tiene un aumento significativo en mitocondrias de *Rhodnius prolixus* en comparación con la actividad reportada en mitocondria de *R. norvegicus* y larvas de *Aedes aegypti*.

## 6. Recomendaciones

Se recomienda realizar un estudio más exhaustivo para lograr la extracción de mitocondrias integras de este insecto, de esta manera también se podrá evaluar los efectos de futuros compuestos insecticidas.

Ahondar en el estudio del mecanismo de acción de las proteínas desacopladoras y su repercusión en la medición del control respiratorio correlacionadas con el potencial de membrana, ya que estas pueden estar mimetizando los resultados hallados en las mitocondrias de triatominos.

## 7. Divulgación de resultados.

Los resultados obtenidos en esta investigación fueron presentados en el Segundo Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2 realizado en la ciudad de Medellín los días 3,4 y 5 de Noviembre de 2016 en la modalidad de póster, donde se obtuvo el reconocimiento de mejor trabajo en el área temática de animales.

### Referencias Bibliográficas

- Alvarez Santos, M. R. (2017). *evaluación de la actividad de nuevos derivados polifuncionalizados de las 3-aril-tiazolo [3,4-a] pirazin-5,8-dionas y compuestos híbridos de tetrahidroquinolina-isoxazol sobre células de hepatocarcinoma humano Hep-G2*. Universidad Industrial de Santander.
- Arévalo, A., Carranza, J. C., Guhl, F., Clavijo, J. A., & Vallejo, G. A. (2007a). Comparación de los patrones de alimentación y defecación de *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) en condiciones de laboratorio. *Biomédica*, 27(1), 101–9.
- Arévalo, A., Carranza, J., Guhl, F., Clavijo, J., & Vallejo, G. (2007b). Comparación del ciclo de vida de *Rhodnius colombiensis* Moreno, Jurberg & Galvão, 1999 y *Rhodnius prolixus* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) en condiciones de laboratorio. *Biomédica*, 27(1), 119–29.
- Baines, C. P. (2010). Role of the mitochondrion in programmed necrosis. *Frontiers in Physiology*, 1 NOV(November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2010.00156>
- Basquetteur. (2008). Ciclo de vida *Trypanosoma cruzi*. Retrieved April 21, 2016, from <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4133222>
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryver, L. (2002). Biochemistry. In *Biochemistry* (5th ed.). W H Freeman.
- Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M. J., & Montgomery, S. P. (2011). *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 655–681. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-11>
- Borrero Landazábal, M. A. (2014). *ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE ALCALOIDES ANÁLOGOS A LA GIRGENSOHNINA SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO MITOCONDRIAL DE LARVAS DE Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*.

- Bosco, G., Clamer, M., Messulam, E., Dare, C., Yang, Z., Zordan, M., ... Meghian, A. (2015). EFFECTS OF OXYGEN CONCENTRATION AND PRESSURE ON *Drosophila melanogaster*: OXIDATIVE STRESS, MITOCHONDRIAL ACTIVITY, AND SURVIVORSHIP. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 88(4), 222–234. <https://doi.org/10.1002/arch.21217>
- Carroll, J., Fearnley, I. M., Shannon, R. J., Hirst, J., & Walker, J. E. (2005). Analysis of the Subunit Composition of Complex I from Bovine Heart Mitochondria. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(5), 117–126. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500014-MCP200>
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiasse humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>
- Chamberlin, M. E., & Chamberlin, M. E. (2012). Changes in mitochondrial electron transport chain activity during insect metamorphosis. *Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292, 1016–1022.
- David, N. L., Cox, M., & Lehninger. (2008). *Principles of Biochemistry* (5<sup>a</sup> Edición). New York: W.H. Freeman and Company.
- Freya, T. G., & Mannellab, C. a. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(7), 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01609-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01609-1)
- Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., & Kroemer, G. (2012). Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.268946>
- Glick, D., & Singer, T. (2006). *Determination of the Activity of Succinate, NADH, Choline and  $\alpha$ -Glyceriphosphate Dehydrogenases*.
- Gonçalves, R., Machado, A., Paiva-Silva, G., Sorgine, M., Momoli, M., Oliveira, J. H., ... Oliveira, M. (2009). Blood-feeding induces reversible functional changes in flight muscle mitochondria of *Aedes aegypti* mosquito. *PLoS ONE*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007854>

- Guhl, F. (1999). Estado Actual del Control de la Enfermedad de Chagas en Colombia. *Simposio Internacional Academia de Medicina*, 59, 103–116. Retrieved from [http://medicinabuenaosaires.com/revistas/vol59-99/supl2/v59\\_s2\\_103\\_116.pdf](http://medicinabuenaosaires.com/revistas/vol59-99/supl2/v59_s2_103_116.pdf)
- Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual Review of Biochemistry*, 54, 1015–1069. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.54.070185.005055>
- Indo, H. P., Davidson, M., Yen, H. C., Suenaga, S., Tomita, K., Nishii, T., ... Majima, H. J. (2007). Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. *Mitochondrion*, 7(1–2), 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2006.11.026>
- Instituto Nacional de Salud. (2016). *Boletín epidemiológico 17 Enero 2016* (Vol. 2016).
- Kruger, N. (1994). *Basic Protein and Peptide protocols*.
- Lodish, H., Kaiser, C. A., Berk, A., Krieger, M., Matsudaira, P., & Scott, M. (2004). *Molecular cell biology* (5th ed., pp. 171–184). W.H. Freeman and Company.
- Melo Ruiz, V. (2005). *Bioquímica de los procesos metabólicos* (1ra ed.). Reverté ediciones.
- Ministerio de la Protección Social. (2013). *Enfermedad de Chagas. Enfermedad del Chagas - memorias* -. Bogotá, D.C. Retrieved from <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html>
- Ministerio de la Protección Social, & Salud, I. N. de S. O. P. de la. (2012). *Protocolo para la vigilancia en salud pública de chagas*.
- Molina, J., Gualdrón, L., Brochero, H., Olano, V., Barrios, D., Guhl, F., ... Boatá, D. S. (2000). Distribución actual e importancia epidemiológica de las especies de triatominos ( Reduviidae : Triatominae ) en Colombia. *Biomédica*, 20, 344–360.
- Muller, F., Liu, Y., Absul-Ghani, M., Lustgarten, M., Bhattacharya, A., Janq, Y., & Van Remmen, H. (2007). High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates. *Biochemical Journal*,

409(2), 491–499.

Murray, R. K. (2013). *Bioquímica ilustrada* (29th ed.). McGraw-Hill Interamericana.

Nakamaru-Ogiso, E., Han, H., Matsuno-Yagi, A., Kainan, E., Sinha, S. C., Yagi, T., & Ohnishi, T. (2010). The ND2 Subunit Was Labeled by a Photoaffinity Analogue of Asimicin, a Potent Complex I Inhibitor. *FEBS Letters*, 584(5), 883–888.

Nicholls, D. G., & Ferguson, S. J. (2013). *Bioenergetics* (4<sup>o</sup>). Academic Press.

Nunes, M., Dones, W., Morillo, C., Encina, J., & Ribeiro, A. (2013). Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(9), 767–776. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>

Oliveira, J. H., Gonçalves, R., Oliveira, G., Oliveira, P., Oliveira, M., & Barillas-Mury, C. (2011). Energy metabolism affects susceptibility of *Anopheles gambiae* mosquitoes to *Plasmodium* infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(6), 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.001>

OMS. (2008). *Abordar las Enfermedades Tropicales Desatendidas con el Enfoque de los Derechos Humanos*. Organización Mundial de la Salud.

OMS. (2017). OMS | La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Retrieved April 19, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>

OPS. (2009). *Guía Para Vigilancia, Prevencion, Control Y Manejo Clínico De La Enfermedad De Chagas Aguda Transmitida Por Alimentos*. Retrieved from [www.sbcomunicacao.com.br](http://www.sbcomunicacao.com.br)

P.A. Buxton, M. . (1930). THE BIOLOGY OF A BLOOD-SUCKING BUG, RHODNIUS PROLIXUS. *London School of Hygiene and Tropical Medicine*.

Parra-Henao, G., Garcia, C. M., & Cotes, J. M. (2007). Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae). *Boletín de Malariología Y Salud Ambiental*, XLVII(1), 125–137.

- Picard, M., Taivassalo, T., Gouspillou, G., & Hepple, R. T. (2011). Mitochondria: isolation, structure and function. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 18), 4413–4421. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.212712>
- Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datta, A., & E., R. (1960). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *Biol. Chem.*, 235, 3322–3329.
- Ribeiro, A., Nunes, M., Teixeira, M., & Rocha, M. (2012). Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Natural Reviews of Cardiology*, 9, 576–589. Retrieved from <http://www.nature.com/sci-hub.io/nrcardio/journal/v9/n10/full/nrcardio.2012.109.html>
- Rocco-machado, N., Gondim, K. C., & Meyer-fernandes, J. R. (2014). Identification of uncoupling protein 4 from the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus* and its possible role on protection against oxidative stress. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, (April), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.011>
- Salamanca, M., Londoño Soto, B., Urquijo Velasquez, L., Díaz Gómez, A., & Padilla Rodriguez, J. (2011). Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de la enfermedad de Chagas. *Ministerio de La Protección Social, Colombia*, 19. Retrieved from <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Paginas/chagas.aspx>
- Service, M. (2012). Triatomine bugs (Triatominae). *Medical Entomology*, 210–218.
- Slocinska, M., Antos-Krzeminska, N., Rosinski, G., & Jarmuszkiewicz, W. (2011). Identification and characterization of uncoupling protein 4 in fat body and muscle mitochondria from the cockroach *Gromphadorhina cocquereliana*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 43(6), 717–727. <https://doi.org/10.1007/s10863-011-9385-0>
- Slonimski, P. ., Archer, R., Péré, G., Sels, A., & Somlo, M. (1965). *Mécanismes de régulation des activités cellulaires chez les microorganismes*. Paris: Editions du Centre National de la Recherche Scientifique.
- Verissimo Junqueira, A., Monte Gonçalves, C., & de Carvalho Moreira, C. (2006). Curso de capacitação dos microscopistas de malária e dos laboratoristas da rede pública na detecção do *Trypanosoma cruzi*, Modulo III. In *Curso de capacitação dos microscopistas de malária e dos laboratoristas da rede pública na detecção do Trypanosoma cruzi*.

- Voet, D., Voet, J., & Pratt, C. W. (2006). *Fundamentals of biochemistry* (Second Edi, pp. 546–589). W.H. Freeman and Company.
- Wieckowski, M. R., Giorgi, C., Lebiezinska, M., Duszynski, J., & Pinton, P. (2009). Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nature Protocols*, *4*(11), 1582–1590. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.151>
- Yu, T., Robotham, J. L., & Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(8), 2653–2658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511154103>
- Zharova, T. V, & Vinogradov, A. D. (1997). A competitive inhibition of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) by ADP-ribose. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1320*(3), 256–264.