

**MODELO PARA LA FORMACIÓN DE ORINA EN EL SEGMENTO SUPERIOR DE LOS TÚBULOS DE MALPIGHI (UMT) DE *RHODNIUS PROLIXUS* STAL (HEMIPTERA, REDUVIIDAE). HOMENAJE AL GRAN ESTUDIOSO DEL *RHODNIUS PROLIXUS* SIR VINCENT B. WIGGLESWORTH CBE, FRS (1899-1994).**

**MODEL FOR THE URINE FORMATION IN THE UPPER MALPIGHIAN TUBULES SEGMENT (UMT) OF *RHODNIUS PROLIXUS* STAL (HEMIPTERA, REDUVIIDAE). HOMAGE TO THE GREAT RESEARCHER OF *RHODNIUS PROLIXUS* SIR VINCENT B. WIGGLESWORTH CBE, FRS (1899-1994).**

*A. M. Gutiérrez\**, *A. D. Gámez\*\**, *R. García\*\** y *G. Whittembury\*\**

---

RESUMEN

Rendimos homenaje a Sir Vincent B. Wigglesworth, fundador de la fisiología de insectos, quien desde 1930 estudió el *Rhodnius prolixus* (insecto triatomino chupador de sangre, en Venezuela llamado chipo; insectos relacionados en el continente americano se denominan chirimachas, vinchucas, barbeiros, etc). Se revisa el mecanismo de producción de orina en el segmento inicial, ciego (UMT) de sus túbulos de Malpighi. Hemos usado tres métodos para construir un modelo de cómo forman la secreción u orina las células epiteliales de los (UMT). (I) En el primero, se usaron perfusiones dobles de los UMT del 5° estadio de ninfas de *Rhodnius* para medir su velocidad de secreción. Los UMT fueron estimulados a secretar con 5-HT. Con perfusiones dobles se tuvo acceso separadamente a las membranas basolaterales y apicales de las células de los UMTs con fármacos que bloquean diferentes funciones de transporte como ATPasas, cotransportadores, y /o contratransportadores y canales iónicos y de agua: ouabaína, bafilomycin A1, furosemida, bumetanida, SITS, acetazolamida, amilorida, DPC, BaCl<sub>2</sub>, pCMBS y DTT. La suposición básica es que cambios en la velocidad de secreción reflejan cambios en los mecanismos de transporte iónico. (II) Con el segundo, usando un método fluorométrico, se midieron concentraciones intracelulares de Na<sup>+</sup> en los UMT, en varias condiciones experimentales. (III) Con el tercero se midieron actividades de las ATPasas en los UMT de *Rhodnius* y en cultivos celulares de *Aedes albopictus* C6/36, que usamos como modelo experimental. Nuestros estudios permiten idear un modelo de cómo es la función de las células del UMT. En el que (a) en la membrana celular basolateral es fundamental un cotransportador de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>; de importancia intermedia son la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa sensible a ouabaína y la Na<sup>+</sup>-ATPasa insensible a ouabaína, canales iónicos y de agua (Rp-MIP). (b) En la membrana celular apical, son muy importantes una V-H<sup>+</sup>-ATPasa; e intercambiadores K<sup>+</sup> y /o Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>.

ABSTRACT:

We homage Sir V B Wigglesworth, founder of Insect physiology who since 1930 studied the Venezuelan blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. Three different methods have been used to improve a model for fluid secretion in upper malpighian tubules (UMT) of the blood sucking insect *Rhodnius prolixus* and insect epithelial cells. (I) In the first, UMT double perfusions in 5th instar *Rhodnius* were used to measure their fluid secretion rate. They were stimulated to secrete with 5-HT. Double

---

\*Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela, Caracas, (IBE, UCV), e \*\*Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, (IVIC), Caracas, Venezuela. AMG: amanuelgutierrez@gmail.com; ADG: adrianadinorahgamez@gmail.com; RG: rafgar1976@hotmail.com; GW: guillermo.whittembury@gmail.com

perfusiones allowed access separately to the basolateral and the apical cell membranes with pharmacological agents known to block different ion transport functions, namely ATPases, co- and/or counter- transporters and ion and water channels: ouabain, bafilomycin A1, furosemide, bumetanide, SITS, acetazolamide, amiloride, DPC, BaCl<sub>2</sub>, pCMBS and DTT. The basic assumption is that changes in water movement reflect changes in ion transport mechanisms. (II) Intracellular Na<sup>+</sup> concentrations were measured with a fluorometric method in dissected *Rhodnius prolixus* UMT, under several experimental conditions. (III) ATPase activities were measured in *Rhodnius prolixus* UMT and in *Aedes albopictus* C6/36 cultured cells, which were used as a model system. A tentative model for the function of the UMT cell is presented. We find that (a) at the basolateral cell membrane, fundamental is a Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> - cotransporter; of intermediate importance are the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and the ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-ATPase, ion channels and Rp-MIP water channels. (b) At the apical cell membrane, most important are a V-H<sup>+</sup>-ATPase; and a K<sup>+</sup> and/or Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger.

**Palabras clave:** Secreción en Insectos; Transporte iónico epitelial; Transporte iónico en insectos; *Rhodnius prolixus*; Túbulos de Malpighi

**Keywords:** Secretion in Insects; Epithelial ion transport; Insect ion transport; *Rhodnius prolixus*; Malpighiantubules;

"Se tiene que ser feliz cuando se investiga para poder mantener la intensa motivación que se necesita para hacerla por un largo tiempo". Sir VB Wigglesworth.

## INTRODUCCIÓN

El *Rhodnius prolixus*, como otros insectos hematófagos parecidos, es una especie adaptada a largos períodos de ayuno seguidos de oportunidades en las que el insecto ingiere grandes volúmenes de sangre de los que se libera rápidamente (Wigglesworth, 1931, Te Brugge *et al.*, 2009, 2011). De eso se encargan sus 4 túbulos de Malpighi (TM). Los TM en el 5° estadio (instar) de mudas (son seis en total), miden unos 40 mm de largo y unas 100 μm de diámetro exterior y una la de unas 50 μm de diámetro. Están formados por una parte ciega, superior que abreviaremos UMT y una inferior que desemboca en la ampolla rectal. Después de una ingestión abundante de sangre, un *Rhodnius*, en 15 a 30 minutos, pierde la mayor parte del volumen ingerido, porque los UMT secretan abundantemente un líquido quasi-isosmótico con su hemolinfa (Wigglesworth, 1931a,b; 1972; Ramsay, 1952; Maddrell, 1963, 1980). Luego este líquido es modificado por la parte inferior. Por ejemplo, un *Rhodnius* del 5° estadio que haya

estado un mes en ayunas, pesa 20 mg; puede ingerir unos 300 μl de sangre en 10-20 minutos y excretar la mitad de ese volumen en 15 a 30 minutos por un mecanismo regulado por dos hormonas, la 5-Hydroxy-tryptamine, 5-HT, (serotonina) y la Rhopr-DH49 (Maddrell *et al.*, 1991; Te Brugge *et al.*, 2009, 2011) a velocidades de ~ 50 nl/s.cm<sup>2</sup> de la superficie del UMT (Whittembury *et al.*, 1986; Maddrell, 1991). La secreción isosmótica se forma en los UMT (que como ya se dijo son ciegos) por la acción combinada de varios canales de las membranas basolateral y apical, transportadores, bombas y moléculas que lanzan señales intracelulares (Maddrell, 1963; 1980; Maddrell y Overton, 1988; 1992; Te Brugge *et al.*, 2009, 2011). Luego el segmento distal reabsorbe y cambia la composición de esa secreción y la elimina a la ampolla rectal (Wigglesworth, 1931a).

En este trabajo tratamos de localizar los elementos de las células del UMT que intervienen en la secreción (Beyenbach, 2001; 2003; Hegarty *et al.*, 1991; Ianowski *et al.*, 2001; 2004;

Leysens *et al.*, 1994; Linton y O'Donnell, 1999; Scott *et al.*, 2004; Wiczorek *et al.*, 2000). La secreción de los UMT de *Rhodnius* está formada usualmente por unos 90 mM de NaCl y de KCl (Wigglesworth, 1931a; Ramsay, 1952; Maddrell, 1980; Phillips 1981). Se ha propuesto que en el UMT de *Rhodnius* y *Aedes* la secreción se debe a que en la membrana apical del UMT funciona una H<sup>+</sup> ATPasa de tipo vacuolar, que transporta H<sup>+</sup> de la célula a la luz tubular. Esto permitiría un intercambio de H<sup>+</sup> luminal por K<sup>+</sup> y/o Na<sup>+</sup> citoplásmico (Beyenbach, 2001; Maddrell y O'Donnell, 1992; Wiczorek *et al.*, 2000). En la membrana celular basolateral, se ha propuesto un cotransportador Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> en los UMT de *Rhodnius* por el efecto en la secreción de la bumetanida, de líquidos libres de Na<sup>+</sup> y de Cl<sup>-</sup> y por medidas del potencial eléctrico trans-epitelial (Ianowski *et al.*, 2001, 2002, 2004, 2006; O'Donnell and Maddrell, 1984). Cotransportadores similares se han propuesto para explicar la entrada basolateral de iones en los túbulos de Malpighi de *Aedes* (Hegarty *et al.*, 1991), *Drosophila* (Linton y O'Donnell, 1999) y *Formica* (Leysens *et al.*, 1994). Además se ha propuesto que el agua sigue pasivamente los movimientos iónicos en insectos (Maddrell, 2004; Ramsay, 1954) como ocurre en otros epitelios (Whittembury y Hill, 2000).

En este trabajo aproximamos un modelo para la secreción en los UMT de *Rhodnius*, basados en tres tipos de experimentos: (I) Perfusiones dobles en UMT del 5° estadio entre mudas (5° instar) de *Rhodnius* (Gutiérrez *et al.*, 2004, 2005), para investigar en la secreción de los UMT el efecto de varios fármacos que se sabe alteran la función de canales, cotransportadores, intercambiadores y ATPasas. Con este propósito, estos agentes se añadieron ó al líquido de perfusión peritubular, o al líquido de perfusión luminal, respectivamente, para averiguar si estos agentes actúan ó en la membrana celular basolateral, luminal ó en ambas membranas celulares. En este enfoque seguimos el modelo de la doble membrana celular (Koefoed-Johnsen y Ussing, 1958; Larsen *et al.*, 2000). El presupuesto fun-

damental es que la secreción refleja la acción de los agentes farmacológicos que se usan, aunque estamos conscientes que muchas drogas cruzan el epitelio, como por ejemplo la bafilomycina y la ouabaína (Torrie *et al.*, 2004) y que se necesitan experimentos más precisos para hacer una localización más exacta.

(II). También medimos concentraciones intracelulares de Na<sup>+</sup>, usando un método fluorométrico, en UMT de *Rhodnius prolixus*, bajo varias condiciones experimentales. Este método da información a corto tiempo de los cambios en la concentraciones de Na en los UMT en reposo y estimulados.

(III) En tercer lugar se midieron en UMT de *Rhodnius prolixus* actividades de las ATPasas dependientes de Na<sup>+</sup>. Se sabe que ATPasas tipo P, que comparten un residuo Asp. ácido estable y que es fosforilado durante el funcionamiento de la bomba, permiten a las células mantener concentraciones intracelulares iónicas estables.

Las concentraciones intracelulares de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> son mantenidas por la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase que transporta 3 Na<sup>+</sup> hacia fuera y 2 K<sup>+</sup> hacia adentro de las células, balanceando las pérdidas pasivas de esos iones. La ATPasa tipo P sensible a la ouabaína, la segunda bomba de Na<sup>+</sup> (Whittembury, 1968; Whittembury, Proverbio, 1970; Proverbio *et al.*, 1975) es otra ATPasa (Proverbio *et al.*, 1975) que participa en el transporte de Na<sup>+</sup> a través de la membrana; es insensible a la ouabaína, sensible a la bumetanida y a la furosemida; su secuencia molecular se acaba de publicar (Rocafull *et al.*, 2011).

La Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa se encuentra en túbulos de Malpighi de *Rhodnius*, de *Aedes* y *Drosophila melanogaster*. La Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa se ha co-localizado con un sistema de transporte activo de ouabaína, lo que explica la “aparente insensibilidad” a la ouabaína de algunos órganos de insectos (Torrie *et al.*, 2004). Como los estudios sobre la Na<sup>+</sup> ATPas son escasos, como un paso preliminar estudiamos las ATPasas en el UMT

de *Rhodnius prolixus*. Nuestro modelo agrupa muchas observaciones sobre la secreción en los UMT de *Rhodnius prolixus*. La 5-HT y la Rhopr-DH49 disparan una cascada de cAMP activando varias funciones celulares. Esto activaría la V-H<sup>+</sup>-ATPasa apical; protein kinasas activarían una conductancia apical de Cl<sup>-</sup> (Ianovski y O'Donnell, 2001) y el cotransportador basolateral de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> (Ianowski y O'Donnell, 2006). Para estudiar la importancia de la actividad de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa y de la Na<sup>+</sup> ATPasa, comparamos las actividades de ATPase en UMT de *Rhodnius* UMT en presencia de Mg<sup>2+</sup> más Na<sup>+</sup> más K<sup>+</sup> con la acción diferencial de la ouabaína y la furosemida (o bumetanida). Estudios preliminares de las actividades de ATPasas en cultivos celulares C6/36 de *Aedes albopictus*, que usamos como modelo, muestran que ambas bombas de Na<sup>+</sup> existen en esta preparación (Gamez *et al.*, 2011).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Usamos ejemplares de *Rhodnius prolixus* del 5º estadio, 1-4 semanas después de la muda (Hernández *et al.*, 1995, 2001; Whittembury *et al.*, 1986).

**Soluciones (Baños):** La solución básica fué Ringer de Insecto (IR) cuya composición era (en mM), NaCl, 129; KCl, 8,6; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,3; NaHCO<sub>3</sub>, 10,2; CaCl<sub>2</sub>, 2,0; glucosa, 34; alanina, 3; pH, 7,35-7,45; osmolalidad, 340 mOsm/kg (determinada midiendo el punto de congelación), esto es, isosmótica con la hemolinfa del insecto (Maddrell, 1980) El IR y las otras soluciones de perfusión se usaron inmediatamente después de haber sido burbujeadas con 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. La secreción de los UMT se inició y mantuvo con 5-HT a una concentración 2 µmolar que se añadió al baño (Maddrell, 1980). El IR se usó tanto como baño y como líquido de perfusión luminal.

**(I). Perfusiones dobles UMT y medidas de la velocidad de secreción.** Como el método

de perfusión se ha descrito en detalle (Gutiérrez *et al.*, 2004), sólo presentaremos una breve descripción. Después de disecado, se transfirió un UMT a una gota de 75-100 µl de IR oxigenado y mantenido a 25 °C, en una cámara especial. Su extremo ciego se sostuvo con pinzas sobre una superficie de Sylgard bajo parafina líquida. Para perfundir la luz, la pared tubular se canuló con una pipeta afilada que contenía IR; el IR se inyectó en la luz con una pipeta Hampel (Deetjen, 1978) a 10 nl/min. El líquido perfundido junto con la secreción producida por el UMT se colectaron en el orificio de apertura del túbulo con una segunda pipeta Hampel. Para perfundir el lado basolateral, la región tubular externa que estaba bañada con IR, se perfundió a una velocidad fija, usando pipetas previamente alineadas perpendiculares a la longitud del túbulo, lo que garantizaba que había suficiente mezcla de las soluciones luminal y peritubular. Después de sustraer el volumen de la perfusión luminal, la velocidad de secreción (Jv) se expresó por segundo y por cm<sup>2</sup> de la superficie de la membrana basal presente en la región del UMT perfundida desde fuera, que se calculó de la longitud y diámetro del segmento de UMT perfundido, que se consideró como un cilindro (Whittembury *et al.*, 1986).

**(II). Concentraciones intracelulares de Na<sup>+</sup>.** Se midieron con una cámara especial, un microscopio invertido Zeiss de epifluorescencia y un sistema de adquisición Ionoptix® (Ionoptix Milton, MA, USA). Un UMT se cargó en una solución de 4 ml de IR con 5µmolar del fluoroforo radiométrico SBF1-AM sensible al Na<sup>+</sup> y 4 µl de ácido Plurónico en 20% DMSO durante 60 a 90 minutos. Las longitudes de onda de excitación fueron 340y 380 nm; la emisión se obtuvo a 515 nm. El programa de acquisition dividía la emisión a 340 entre la emisión a 380 y graficaba esta razón R "on line". La disociación de Kd para Na era 11,3 mM (Negulescu y Machen, 1990). Se tuvo cuidado de intercambiar las soluciones al máximo (García-Pérez, 2010). Los resultados se expresan como razones de fluorescencia normalizadas ( $\Delta R/R_{control}$ ), donde

$\Delta R$  es el cambio en la razón de fluorescencia debida a la nueva condición experimental y  $R_{control}$  es la razón inicial.

**(III). Medidas de las actividades de ATPasas dependientes de  $Na^+$ .** Se homogenizaron UMT de 30 *Rhodnius prolixus* dos veces, porque la doble homogenización dió resultados más homogéneos: primero (1) por 5 minutos con un homogenizador de teflón en una solución conteniendo 100 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, y 0,5 mM del inhibidor de proteasa de serina PMSF; luego (2) con microesferas de vidrio (22  $\mu m$ , Sigma Aldrich) por 5 minutos. Se usaron interfaces de hielo para evitar sobrecalentamiento. Las membranas se trataron con 0,1 mg/ml del detergente iónico C12E9 (Rocafull *et al.*, 2011). Se midieron actividades de ATPasa en micromuestras, como Cariani *et al.* (2004) han descrito. Todas las actividades de ATPasas se midieron en presencia de  $Mg^{2+}$ ; esto se consideró la actividad de ATPasa basal.

El medio de incubación siempre contuvo 50 mM Tris-HCl, 5mM  $MgCl_2$ ; a esto se añadieron varias concentraciones de NaCl, KCl, ouabaína, ouabaína más furosemida, ouabaína más bumetanida, ó vanadato, según se requería; pH se mantuvo a 7,2. Los experimentos se hicieron a 37 °C. 10  $\mu g$  de proteína total de UMT y 25  $\mu l$  de iones se incubaron por 5 minutos a 37 °C. Las proteínas se determinaron siguiendo a Cariani *et al.*, (2004).

Se inició la reacción de la ATPasa añadiendo 2,0 mM de Tris-ATP. La reacción se detuvo después de 10 minutos añadiendo 100  $\mu l$  de una solución de 1.5 g de ácido ascórbico en 22,5 ml de agua, HCl 1N 25 ml, 2.5 ml de molibdato de Na al 10%, 2,5 ml de SDS al 20%, y los tubos se pusieron en hielo. Después de 10 min, se añadieron 150  $\mu l$  de una solución conteniendo 2% de citrate de Na, 2% de citrate de bismuto, 2% de ácido acético y la incubación siguió por otros 10 minutos a 37°C. La absorbancia se midió a 710 nm. Las actividades de ATPasa se expresan en nmoles de  $PO_4$  (Pi) liberado/

miligramo de proteína/minuto. Las actividades de ATPasas se definieron como sigue. La actividad de la  $Na^+/K^+$  ATPasa se tomó como la fracción de la actividad observada en presencia de  $Na^+$  más  $K^+$  que es inhibida por ouabaína; esto es la diferencia en actividad de la ATPasa en presencia de  $Mg^{2+}$ , más  $Na^+$ , más  $K^+$  y la observada en presencia de  $Mg^{2+}$ , más  $Na^+$ , más  $K^+$ , más ouabaína. La actividad de la  $Na^+$  ATPasa se tomó como la diferencia en actividad de ATPasa en presencia de  $Mg^{2+}$ , más  $Na^+$ , más  $K^+$ , más ouabaína y la observada en presencia de  $Mg^{2+}$ , más  $Na^+$ , más  $K^+$ , más ouabaína, más bumetanida (ver la Figura 3).

**Símbolos y abreviaciones:** ACTZ, Acetazolamida; cAMP, Adenosina-mono-fosfato cíclica; DPC, difenilamina-2-carboxilato; DTT, ditioneitol; EDTA, ácido ethylene diamino-tetraacético; 5-HT, 5-hidroxi-triptamina; IR, Ringer de Insectos; Jv, velocidad de secreción [nl/cm<sup>2</sup>.s]; pCMBS, paracloro-mercuri-benzene-sulfonate; PMSF, fenilmetanosulfonilfluorido; Rhpro-DH, hormona diurética de *Rhodnius prolixus*; Rp-MIP, Canales para agua de *Rhodnius prolixus*; SITS, 4- acetamido-4'-isotiocianatostilbeno -2,2'-ácido disulfónico; UMT, segmento inicial ó ciego de los Túbulos de Malpighi.

Todos los productos químicos eran de Sigma Chemical (St. Louis, MO).

## RESULTADOS

**(I) Efecto de agentes farmacológicos añadidos o al baño o a la luz tubular sobre la velocidad de secreción, Jv, de los UMT.** En la Tabla 1 sólo resumimos los resultados más pertinentes, desde que se han publicado previamente (Gutiérrez *et al.*, 2004). Cada UMT era su propio control: Cada UMT se montó en la cámara y se estimuló con 5-HT. Jv se midió cada 5 minutos por un período inicial de control de 20 minutos. Después de añadir los fármacos al baño, Jv se midió por un período adicional de 30-40 minutos (período experimental). Los valores

**Tabla 1.** Efecto (en % del valor control) de varios agentes farmacológicos añadidos por perfusión ó al baño (membrana basolateral) ó a la luz (membrana apical). Incrementos son (+); decrementos (-) . Detalles en Gutiérrez *et al.*, (2004).

Agente	Función afectada	Baño (%)	Luz (%)
Ouabaína (0,2 mM)	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPasa	+29	+46
Furosemida (10 µM)	cotransportador Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup>	-43	-79
Bumetanida (50 µM)	cotransportador Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup>	-80	-82
SITS (1 mM)	Intercambiador Cl <sup>-</sup> -HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-90	NS
ACTZ (1 mM)	Anhidrasa Carbónica	NS	+38
Amilorido (0,4 mM)	Intercambiador Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup>	NS	-77
DPC (100 µM)	Canal de Cl <sup>-</sup>	+39	NS
BaCl <sub>2</sub> (2-20 mM)	Canal de K <sup>+</sup>	NS	+70
PCMBs (500 µM)	Canal de agua	-54	*
DTT (5 mM)	Canal de agua	NS	NS

NS, acción no significativa. \* El pCMBS no se pudo usar en la luz porque producía descamación celular.

de Jv durante los 2 períodos se analizaron como datos pareados. Cuando los fármacos se añadieron a la luz, to se hizo después de comprobar que en el período control la perfusión luminal no alteraba Jv.

Añadida al baño, la ouabaína (200 µM) el inhibidor de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa (Skou, 1992), estimuló la secreción en 29%, y en la luz, 1mM de ouabaína la incrementó en 46%. 0,5 mM furosemida, en el baño, el inhibidor del cotransportador Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> (Velasquez y Wright, 1986) inhibió Jv en 43%. 1 mM furosemida no tuvo mayor efecto inhibitorio. 50µM bumetanida inhibió Jv en 80%. Concentraciones más altas no tuvieron mayor efecto. 100 µM de furosemida luminal inhibió Jv en 79%, 50 µM de bumetanida en el baño inhibió Jv en 82%. En el baño, 1 mM de SITS, el inhibidor del intercambiador Cl<sup>-</sup>- HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Chen y Boron, 1995) inhibió Jv en 90%, mientras que no tuvo efecto desde la luz. Desde

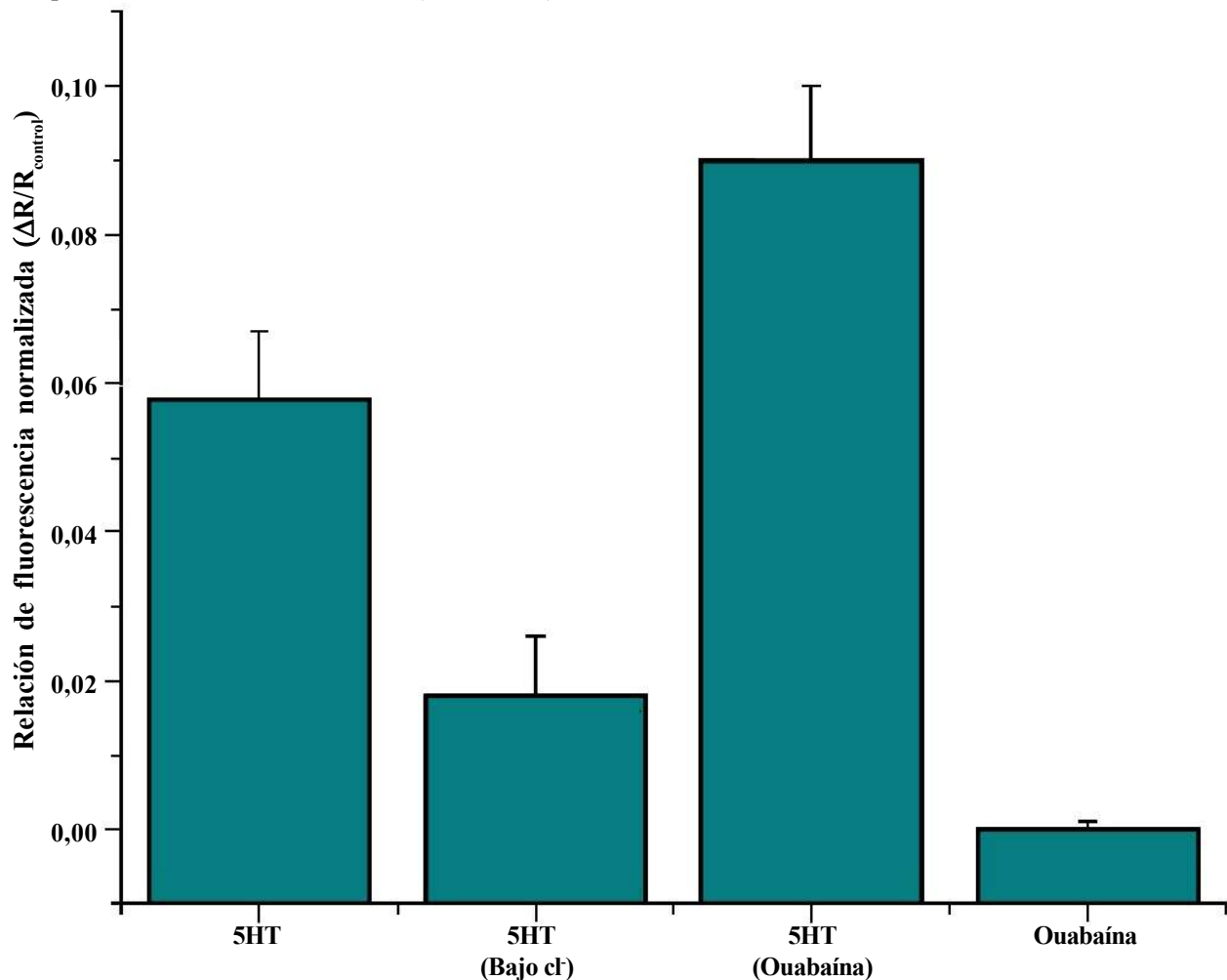
el baño, 1 mM del inhibidor de la anhidrasa carbónica ACTZ (Maren, 1967) no tuvo efecto, pero desde la luz aumentó la secreción en 38%. Desde el baño, 0,4 mM de amilorido, el inhibidor del intercambiador Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> (Cragoe *et al.*, 1992) no tuvo efecto; desde la luz inhibió Jv en 77%. Desde el baño, 0,1 mM de DPC el inhibidor de canales de Cl<sup>-</sup> (Greger, 1990 ) aumentó Jv en 39%. Pero no se observó acción desde la luz. Para estudiar el posible papel de canales de K<sup>+</sup>, se usó el bloqueador de esos canales, el Bario, a varias concentraciones. No se observó ningún efecto del lado del baño. Pero desde el lado luminal, BaCl<sub>2</sub> a concentraciones de 2 a 20 mM estimularon Jv en 70%. Desde el baño, 500 µM pCMBS, el bloqueador de las aquaporinas (Whittembury, *et al.*, 1984), inhibió Jv en in 54%, efecto que 5 mM DTT (que contrarresta la acción de los mercuriales como el pCMBS) revirtió (Echevarría *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2001; Whittembury, *et al.*, 1984). DTT no

afectó  $J_v$  desde la luz. No se pudo probar pCMBS desde la luz porque producía descalcificación y daño celular.

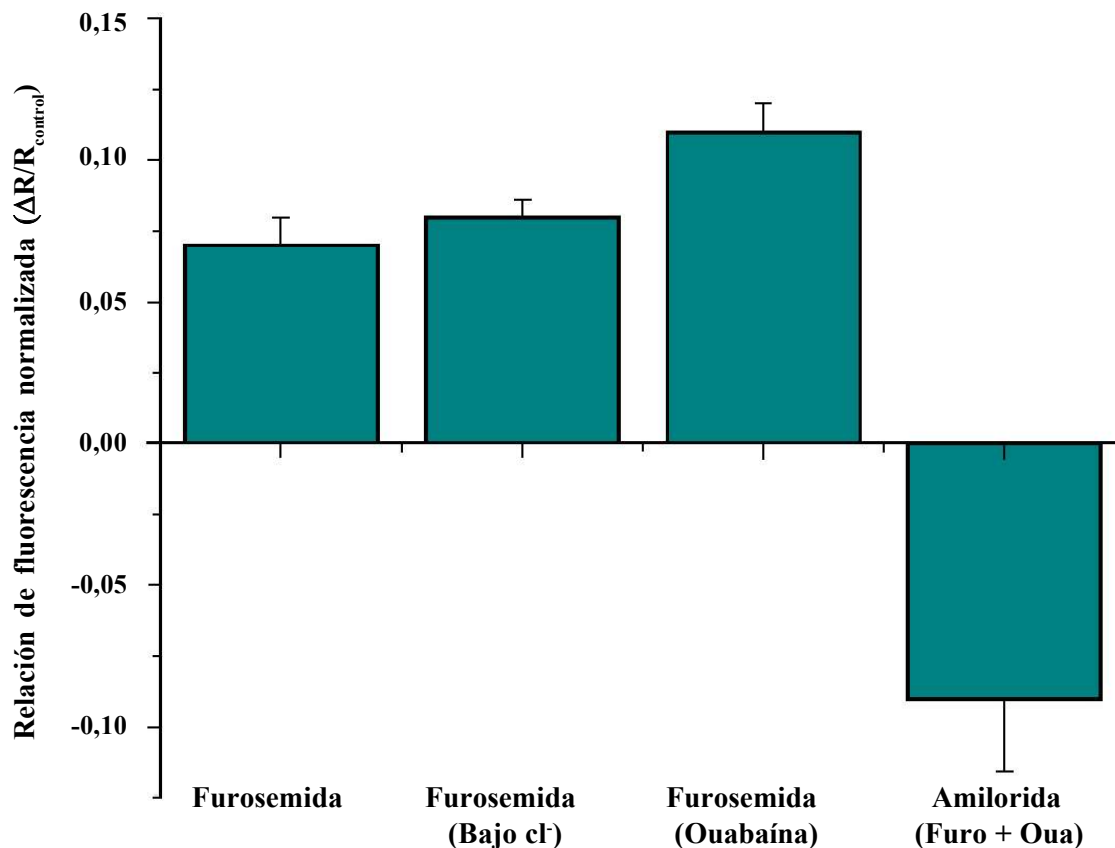
### (II). Concentraciones intracelulares de $\text{Na}^+$ .

Se ve en la Figura 1 que 5-HT incrementa  $[\text{Na}^+]_i$ . Esto posiblemente es debido a activación del cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  en la membrana basolateral, porque el incremento es menor en una solución con bajo  $\text{Cl}^-$  (reemplazado por  $\text{NO}_3^-$ ) que inhibe el cotransportador. La columna 4 de la Figura 1 muestra que la ouabaína no tiene efecto en UMT no estimulados pero en los estimulados ouabaína sí incrementa  $[\text{Na}^+]_i$  por sobre lo que se observa sólo con 5-HT (columna 3).

Por contraste, (Figura 2) en UMT en reposo, furosemida incrementó  $[\text{Na}^+]_i$  contra lo esperado si inhibía el cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ . Este incremento no se puede explicar por cambios en la actividad del cotransportador de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ , porque se obtuvo el mismo efecto en soluciones con bajo  $\text{Cl}^-$  (columna 2). En la sección III, se muestra que la bomba de  $\text{Na}^+$  insensible a ouabaína (bomba II de  $\text{Na}^+$  está presente en la membrana basolateral, Proverbio *et al.*, 1975; Rocafull *et al.*, 2011). De acuerdo con esto, tanto la furosemida como la ouabaína (inhibidores de las bombas de  $\text{Na}^+$  II y I, respectivamente incrementan la concentración basal de  $[\text{Na}^+]_i$ . Estos resultados nos llevan a la conclusión que



**Figura 1.** Relaciones de fluorescencia normalizadas (concentraciones relativas intracelulares de  $\text{Na}^+$ ) en UMT de *Rhodnius prolixus* bajo diferentes condiciones experimentales. Columna 1, UMT estimulados con 5-HT en IR normal. Columna 2, UMT estimulados con 5-HT en IR con bajo  $\text{Cl}^-$ . Columna 3, efecto de ouabaína en UMT estimulados. Columna 4, efecto de ouabaína en UMT no estimulados. Detalles en el texto



**Figura 2.** Relaciones de fluorescencia normalizadas (concentraciones relativas intracelulares de  $Na^+$ ) en UMT de *Rhodnius prolixus* bajo diferentes condiciones experimentales. Columna 1, efecto de furosemida en IR normal. Columna 2, efecto de furosemida en IR con bajo  $Cl^-$ . Columna 3, efecto de furosemida y ouabaína. Columna 4, efecto de amilorido en presencia de furosemida y ouabaína. Detalles en el texto

junto a la inhibición de la bomba de  $Na^+$  insensible a ouabaína (bomba II) con la furosemida, debe haber una entrada importante de  $Na^+$  (ver la Figura 4). Esto se confirmó cuando probamos amilorido, que a la concentración usada es un bloqueador de canales de  $Na^+$  (Garty y Palmer, 1997; Kleyman y Cragoe, 1988). 100  $\mu$ molar amilorido, abolió completamente el incremento en el  $[Na^+]$  i basal (Figura 2, columna 4).

**(III). Actividad de la ATPasa dependiente de  $Na^+$ , insensible a Ouabaina.** La primera columna de la Figura 3 muestra la actividad de ATPasa sólo en presencia de  $Mg^{2+}$ . En la columna 2, en presencia de  $Na^+$ ; en la columna 3, en presencia de  $Na^+$  y  $K^+$ ; en la columna 4, en presencia de  $Na^+$  y  $K^+$  y bumetanida. En la

columna 5, en presencia de  $Na^+$  y  $K^+$  y ouabaína. En otras palabras, las columnas 5 y 6 muestran la acción de ouabaína y bumetanida. La última columna muestra que el vanadato bloquea toda la actividad estimulada por  $Na^+$  and  $K^+$ , confirmando que estas actividades se deben a la función de una ATPasa tipo P. La Tabla 2 muestra que la actividad de la ATPasa es progresivamente estimulada por  $Na^+$  (controles); y que 1 mM ouabaína bloquea parcialmente esta actividad. Asociamos la actividad restante a la bomba de  $Na^+$  II. En la Tabla 3 se ve que aún una concentración de 1 mM ouabaína no bloquea la ATPasa estimulada por  $Na^+$ , actividad que asociamos con la función de la bomba de  $Na^+$  II. La inhibición parcial que se observa en presencia de ouabaína debe corresponder a la  $Na^+/K^+$  ATPasa.



**Tabla 2.** Efecto de 1 mM ouabaína en las ATPasas estimuladas por distintas concentraciones de Na<sup>+</sup>. (pmoles of PO<sub>4</sub> liberados/mg prot/min). UMT de *Rhodnius prolixus*. Se muestran las concentraciones de Na<sup>+</sup> que se usaron. Todos los experimentos tenían 10 mM K<sup>+</sup>.

Concentración de Na <sup>+</sup> (mM)	Control	Con 1 mM ouabaína
1	50 ± 3	33 ± 2
5	59 ± 4	33 ± 3
20	66 ± 3	53 ± 4
50	91 ± 2	76 ± 3
100	126 ± 5	91 ± 4

**Tabla 3.** Efecto de diferentes concentraciones de ouabaína sobre las actividades de las ATPasas estimuladas por Na<sup>+</sup> (pmoles of PO<sub>4</sub> liberados/mg prot/min) en UMT de *Rhodnius prolixus*. Se usó una concentración de 100 mM Na<sup>+</sup> y 10 mM K<sup>+</sup>.

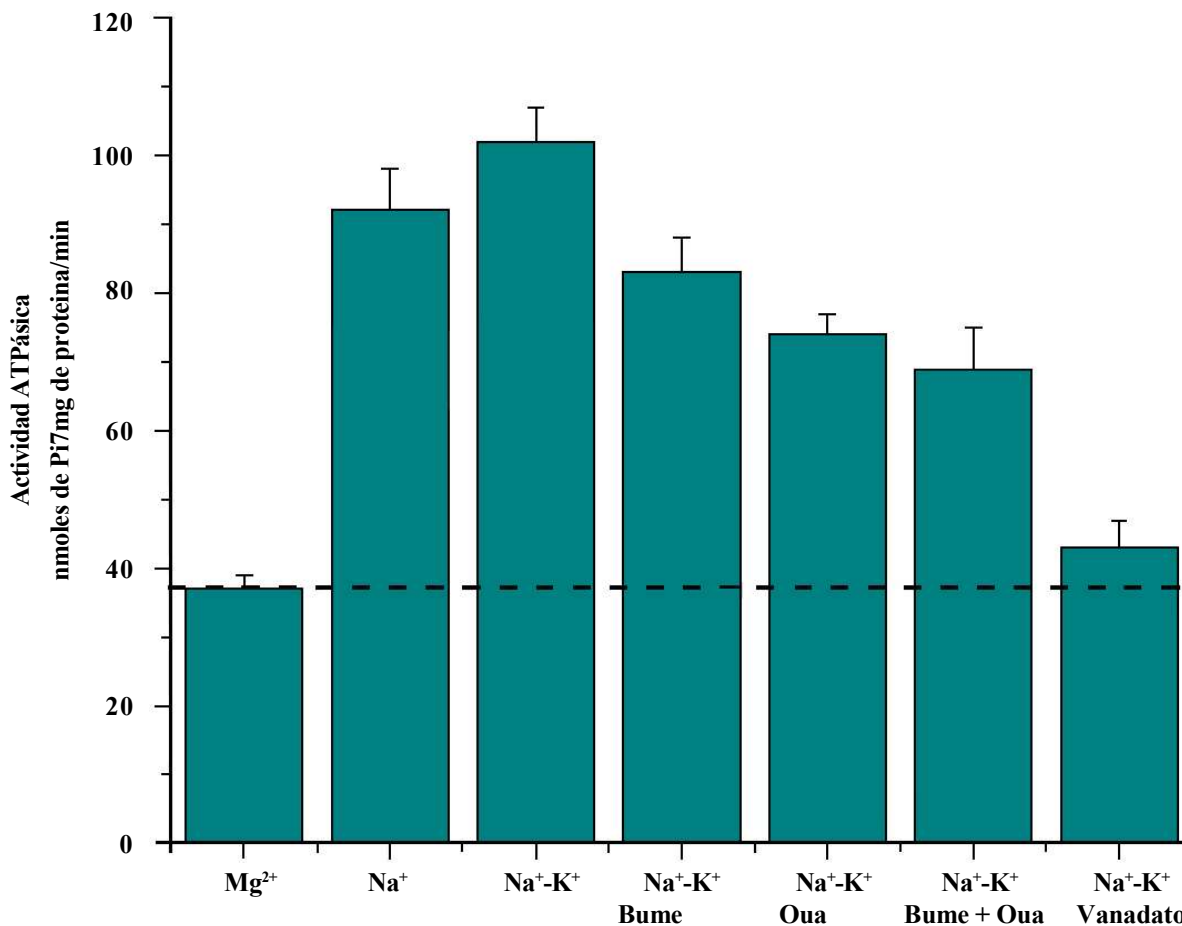
Concentración de Ouabaína (µmolar)	Actividad de las ATPasas
0	122 ± 5
1	90 ± 5
5	83 ± 4
10	75 ± 2
1000	76 ± 3

## DISCUSIÓN

Como se mencionó en la introducción, los *Rhodnius* toleran largos períodos de ayuno y sus UMT casi no segregan espontáneamente. Después de una comida, por acción de las hormonas 5-HT y Rhopr-DH, y otros factores que son segregados a la hemolinfa, estimulan la secreción de los UMT. Se eleva la concentración intracelular de cAMP (Maddrell, 1980; Maddrell et al., 1981; Te Brugge *et al.*, 2011) y se activan varios mecanismos que llevan a grandes volúmenes de secreción. Los modelos que se han propuesto para explicar estos fenómenos consideran en la membrana basolateral celular, canales

para K<sup>+</sup> y un cotransportador para Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> y en la membrana apical una V-H<sup>+</sup>-ATPasa, un intercambiador de cationes (Na<sup>+</sup> y/o K<sup>+</sup>) por H<sup>+</sup> y un canal de Cl<sup>-</sup> (Ianovski et al., 2001, 2004, 2006). Estos modelos se basan fundamentalmente en experimentos que cambian las soluciones de la membrana basolateral (Ianowski y O'Donnell, 2001; Maddrell y O'Donnell, 1992). En la Tabla 1 comparamos la acción de varios fármacos en Jv, en UMT estimulados. Es claro que algunos de esos agentes actúan desde ambas membranas, mientras que otros sólo desde un lado. Se sabe que los UMT transportan sustancias desde el lado basolateral al apical y viceversa (Gutiérrez *et al.*, 2004, 2005; Ianowski y O'Donnell, 2004; Maddrell, 1980; Torrie *et al.*, 2004; Wigglesworth, 1972). Por consiguiente la localización de la acción de estos agentes no puede ser absoluta. Examinemos los diferentes elementos de transporte y sus funciones.

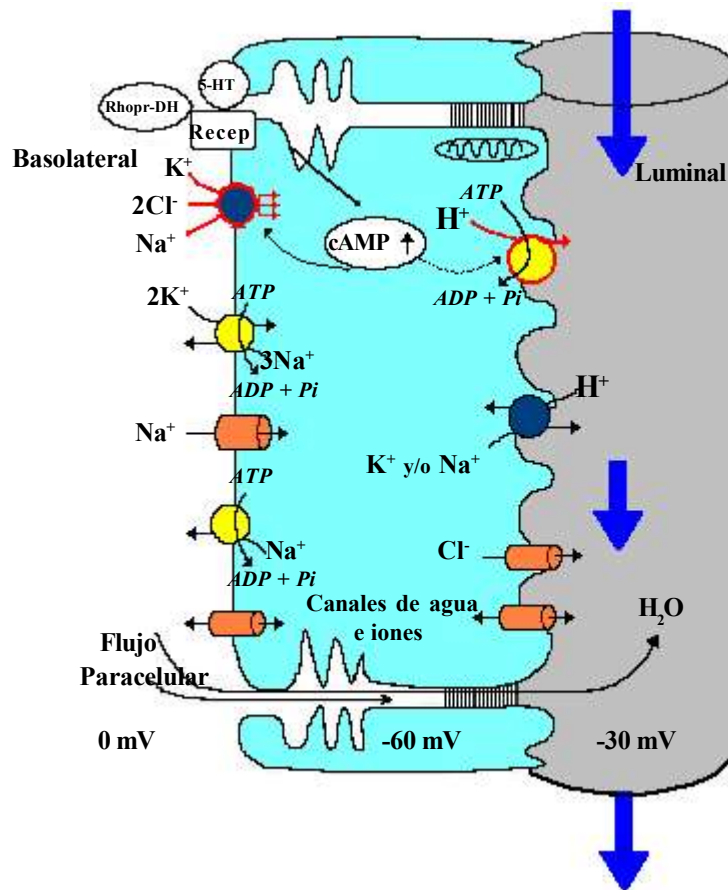
**ATPasas.** Las ATPasas transportadoras al hidrolizar ATP, mantienen las concentraciones intracelulares iónicas: las concentraciones de Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, por la operación de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, que transporta 3 Na<sup>+</sup> hacia afuera de la célula y mete 2 K<sup>+</sup> por ATP hidrolizado, compensando la entrada de Na<sup>+</sup> desde el espacio peritubular y la pérdida de K<sup>+</sup> desde el espacio intracelular hacia fuera (Skou, 1992). Es una ATPasa sensible a la ouabaína. Está localizada en la membrana basolateral de los epitelios, como en el UMT de *Rhodnius* (Maddrell and Overton, 1988), *Aedes* y



**Figura 3.** Actividades de ATPasas (nmoles of Pi/mg de proteína/min) medidas en diferentes condiciones experimentales. Todos los experimentos en presencia de Mg<sup>2+</sup>. Columna 1, sólo Mg-ATP. Esto se marca en las otras columnas con la línea interrumpida. Las otras columnas muestran actividades cuando se añadieron además de Mg<sup>2+</sup>: Na<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, 50 µM bumetanida, 1 mM ouabaína, bumetanida con ouabaína, y 100 µM vanadato. Las actividades de interés son las diferencias de altura entre esas columnas y la línea interrumpida.

*Drosophila melanogaster*. Al mover Na<sup>+</sup> desde la célula al espacio peritubular, actúa en dirección opuesta a la secreción: “disminuye” la secreción. Es lógico pensar que al ser este movimiento iónico bloqueado por la ouabaína, la ouabaína facilite la secreción incrementando Jv (Maddrell y Overton, 1988). De acuerdo con esto, se ve en la Tabla 1 que la ouabaína del lado basolateral estimuló Jv en 29%. Su acción desde la luz se puede atribuir a que la ouabaína cruza de la luz al lado basolateral (Torrie *et al.*, 2004). La segunda bomba de Na<sup>+</sup>, que ha sido aislada y clonada, es otra ATPasa que participa en el

transporte de Na<sup>+</sup> a través de la membrana celular; es insensible a la ouabaína, pero sensible a bumetanida y furosemida (Whittembury y Proverbio, 1970; Proverbio *et al.*, 1975; Caruso-Neves, 1998; Rocafull *et al.*, 2011). Es difícil estudiarla en insectos por la cantidad limitada de material que se puede conseguir. Como se muestra en la Tabla 2, su actividad es estimulada por Na<sup>+</sup> (controles) y 1 mM ouabaína sólo inhibe parte de su actividad que en la Tabla 2 es la parte de la actividad que se debe a la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa. Asociamos la actividad no inhibida por ouabaína con la segunda bomba de Na<sup>+</sup>. Como



**Figura. 4.** Modelo simplificado de la secreción en una célula de UMT de *Rhodnius prolixus*. La secreción va de izquierda a derecha: del lado basolateral (peritubular, hemolinfa) al apical (membrana luminal). Las bombas iónicas se muestran como círculos amarillos; los cotransportadores ó intercambiadores como círculos azules; los canales, como cilindros; las flechas indican posibles direcciones en el flujo. El perfil de potencial eléctrico está en la parte de abajo. Por simplicidad sólo se muestran algunos canales. (I) En la membrana basolateral, se muestran las hormonas diuréticas 5-HT y Rhopr-DH que activan un receptor que mediante una cascada de cAMP activa varios mecanismos como el cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ . No se indica que el  $\text{Cl}^-$  debe pasar de la célula al lado basolateral, y luego volver a la célula llevado por el cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ . Se muestra tanto la  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasa sensible a ouabaína, como la  $\text{Na}^+$ -ATPasa resistente a ouabaína, y el canal de  $\text{Na}^+$ . Estas 3 estructuras y el cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  deben producir recirculación de  $\text{Na}^+$ . Los canales de  $\text{K}^+$  intervienen en la generación del potencial eléctrico celular. También se muestran los canales de agua, RP-Mip. (II) En la membrana apical: aunque la bafilomicina A1 actúa desde el lado peritubular, en la membrana apical debe haber una  $\text{V-H}^+\text{-ATPasa}$ . Se muestra un intercambiador  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  sensible a amilorido, y canales de agua RP-Mip. Se muestra un canal de  $\text{Cl}^-$  para enfatizar su importancia. (III). La vía paracelular, con un ancho de 11.8 Å permite que el agua arrastre solutos extracelulares (Hernández *et al.*, 1995; Whittembury *et al.*, 1986). El  $\text{Cl}^-$  se podría mover por esta vía en los minutos iniciales de la depolarización (Ianovski y O'Donnell, 2001) y otros solutos (Beyenbach, 2003 a, b).

el cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  y la segunda bomba de  $\text{Na}^+$  tienen los mismos inhibidores, es difícil mostrar el papel de la bomba II en experimentos en los UMT. Sin embargo, nuestros experimentos (Figura 2) muestran aumento de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  después de usar furosemida, confirmando posible inhibición de la bomba II de  $\text{Na}^+$ . Esta observación nos lleva a proponer que la bomba II de  $\text{Na}^+$  debe estar en la membrana basolateral de los UMT. Desafortunadamente la bumetanida es fluorescente y no puede usarse en estos experimentos. Obviamente se necesitan más estudios para aclarar este punto. Gutiérrez *et al.* (2004) han analizado la acción de bafilomycina y de SITS. Se considera que la secreción en UMT de *Rhodnius* obtiene energía de una  $\text{V-H}^+\text{-ATPase}$  apical (Maddrell y O'Donnell, 1992). En los UMT de *Rhodnius* la superficie de la membrana apical está enormemente aumentada por microvilli (que contienen mitocondrias (Berthelet *et al.*, 1987; Wigglesworth y Salpeter, 1962). Por consiguiente se espera que esta región debe tener una alta concentración de ATP y una densidad importante de  $\text{V-H}^+\text{-ATPase}$  en su membrana plasmática (Brown y Breton, 1996; Wiczorek *et al.*, 2000); esto crearía un ambiente rico en ATP que estimularía la actividad de esta  $\text{H}^+\text{-ATPase}$ . Encontramos que SITS, que bloquea el intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (Chen y Boron, 1995), inhibe Jv en 90% sólo desde el lado basolateral y no desde la luz. Este efecto no se debería a que el SITS interviene en la entrada de  $\text{Cl}^-$  basolateral, porque el  $\text{Cl}^-$  se mueve fundamentalmente por el cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ . Más bien SITS produciría acumulación intracelular de  $\text{HCO}_3^-$  actuando en relación a la  $\text{V-H}^+\text{-ATPase}$  apical. ACTZ luminal aumentó Jv en 39%. Se esperaría el efecto opuesto porque ACTZ debería reducir la concentración intracelular de  $\text{HCO}_3^-$  a partir del  $\text{CO}_2$  (Maren, 1967). ACTZ en el baño no produjo efectos. Probablemente no penetra la membrana celular basolateral.

**Cotransportadores.** Si el cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  estuviera presente en la membrana celular basolateral, su inhibición debería reducir

Jv, al reducir el movimiento de varios iones del baño a la célula (Tabla 1). El uso basolateral de los inhibidores furosemida y bumetanida del cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  inhibió Jv en 80%. En epitelios secretorios, Haas and Forbush (2000) han descrito que el cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  es activado por fosforilación cuando se incrementa el cAMP. Esto produce entrada de iones del baño a la célula, seguido de entrada de agua, lo que incrementa el volumen celular. Por consiguiente debe haber un cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ , actuando en la dirección baño-célula (Ianovski and O'Donnell, 2006; Maddrell and O'Donnell, 1992) como ya se ha publicado en UMT de *Rhodnius* y en *Drosophila* (Bertram *et al.*, 1991). Furosemida y bumetanida también inhibieron Jv desde la luz, indicando que estos fármacos cruzan la célula desde la luz a la membrana basolateral donde inhiben el cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ . Hay que recalcar que las bombas de sodio I y II actúan en sentido opuesto al cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ . El efecto neto de todos estos factores dependerá de su balance y del de los inhibidores.

**Intercambiadores iónicos.** Como ya se mencionó, se ha propuesto la existencia de intercambiadores apicales de  $\text{Na}^+$  y/o  $\text{K}^+$  o  $\text{H}^+$  en *Rhodnius* UMT (Ianowski and O'Donnell, 2001; 2006; Maddrell and O'Donnell, 1992) y *Aedes* (Scott *et al.*, 2004). Para explorar esta posibilidad usamos amilorido a las concentraciones apropiadas. Aunque el amilorido interactúa con muchas proteínas como otros transportadores y canales y el amilorido discrimina mal entre isoformas del intercambiador  $\text{H}^+\text{-Na}^+$  (Cragoe *et al.*, 1992; Kleyman y Cragoe, 1988), lo usamos porque no sabemos qué isoforma es la del UMT de *Rhodnius*. Encontramos que 400  $\mu\text{molar}$  amilorido en la luz y no en el baño inhibe Jv (Tabla 1). Medidas eléctricas no han producido evidencia de la existencia de canales de  $\text{Na}^+$  en la membrana apical (Rodríguez, 1993), por lo que nuestros resultados concuerdan con la proposición de que existe un intercambiador  $\text{H}^+\text{-Na}^+$  apical como una vía importante para la excreción de  $\text{Na}^+$ .

**Canales iónicos y de agua.** Estudios con microelectrodos en UMT estimulados muestran que un 25% de la permeabilidad total basolateral se debe al Cl<sup>-</sup>, que fue bloqueado por DPC (Gutiérrez *et al.*, 2004, Rodríguez, 1993). Estos hallazgos están en conflicto con los de O'Donnell and Maddrell (1984); se necesitan más estudios para aclarar esta discrepancia. La Tabla 1 muestra que el DPC peritubular incrementa J<sub>v</sub> en 39%, sugiriendo que hay retorno de Cl<sup>-</sup> de la célula a la hemolinfa, que podría ser inhibido por DPC. Esta inhibición incrementaría el Cl<sup>-</sup> celular favoreciendo la secreción transepitelial de Cl<sup>-</sup>. La Figura 4 muestra un canal apical de Cl<sup>-</sup> para enfatizar su importancia. Rodríguez (1993) encontró que el potencial eléctrico de la membrana celular basolateral es en gran parte un potencial de difusión de K<sup>+</sup> que era bloqueado por 2 mM BaCl<sub>2</sub> añadido al baño. En nuestros experimentos de perfusión no observamos acción de BaCl<sub>2</sub> en J<sub>v</sub>. Esto indica que la permeabilidad al K<sup>+</sup> de esta membrana no contribuye fundamentalmente a la secreción directamente (Ianowski *et al.* 2002). Rodríguez (1993) encontró una pequeña permeabilidad al K<sup>+</sup>. En nuestros estudios de perfusión encontramos que el BaCl<sub>2</sub> apical estimulaba la secreción en 70% sugiriendo que durante la secreción puede haber un retorno de K<sup>+</sup> de la luz a la célula, lo que reduciría el flujo neto de K<sup>+</sup> hacia la luz. Hasta ahora hemos mencionado movimientos iónicos y su inhibición. La Figura 4 muestra un canal de Na<sup>+</sup> basolateral, cuya existencia se refuerza por la acción de 100 μmolar amilorido (Figura 2). Este canal representaría una vía de entrada de iones del lado basolateral a la célula junto al cotransportador Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>, mientras que las dos bombas de sodio tenderían a actuar en dirección opuesta.

Consideraremos ahora el papel de los canales de agua en la secreción de los UMT. Canales de agua Rp-MIP se expresan en los UMT de *Rhodnius* (Echevarría *et al.*, 2001), donde contribuyen a regular el volumen celular (Hernandez *et al.*, 2001). Los canales Rp-MIP se bloquean con mercuriales como el pCMBS, agente que inhibe la permeabilidad osmótica

celular de los UMT (Hernandez *et al.*, 2001; Whitttembury *et al.*, 1984; Echevarría *et al.*, 2001). pCMBS en el baño inhibió J<sub>v</sub> en 54%, efecto que se revirtió con DTT, confirmando que sí hay canales de agua en la membrana celular basolateral como ya se ha descrito (Echevarría *et al.*, 2001; Hernandez *et al.*, 2001). Como la adición de pCMBS a la luz produce descamación y daño celular, los experimentos en los que se añadió el pCMBS a la luz no son suficientemente limpios para permitir una clara interpretación.

**Modelo de secreción del UMT.** Los resultados experimentales que presentamos nos llevan a proponer el modelo para la secreción de los UMT que se muestra en la Figura 4. La localización basolateral de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa, del cotransportador Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> y la localización apical de la V-H<sup>+</sup>-ATPasa coinciden con proposiciones previas en *Rhodnius*, *Drosophila* (Ianowski y O'Donnell, 2001; 2006), *Aedes* (Beyenbach, 2003) y *Formica* (Leyssens *et al.*, 1994), basados en cambios en las soluciones basolaterales. Las perfusiones lumbales permiten completar el modelo de la Figura 4 que mantiene el concepto que la V-H<sup>+</sup>-ATPasa provee la fuerza para el transporte iónico apical. Nuestro modelo agrupa observaciones sobre la secreción en *Rhodnius prolixus* UMT. 5-HT y Rhopr DH (Maddrell, 1980; Maddrell *et al.*, 1981; Te Brugge *et al.*, 2011) disparan una cascada de cAMP que activa varias funciones celulares. El aumento del metabolismo y la baja del pH activa la V-H<sup>+</sup>-ATPasa apical y kinasas proteicas (proteinkinásas) que activarían el cotransportador Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> basolateral. Como ya se mencionó, la secreción en la membrana apical se basa en un gradiente de H<sup>+</sup> de la luz a la célula que mantiene la función del intercambiador de Na<sup>+</sup> y/ o K<sup>+</sup> por H<sup>+</sup> y otras funciones de transporte. Cuando luego de la estimulación inicial, la secreción llega a un estado estacionario, la velocidad del transporte apical tendería a ser mayor que la basolateral, lo que produciría una zona de discreta hiperosmolalidad. De hecho, Hernández *et al.*, (2001) han observado decremento del volumen celular; y Maddrell (1980)

constató la presencia de un líquido ligeramente hiperosmótico en relación a la hemolinfa durante la secreción. Se ha demostrado que existe flujo paracelular de agua (Figura 4), porque durante la secreción el agua arrastra, monotónicamente, marcadores extracelulares (Beyenbach, 2003a,b; Hernández *et al.*, 2001, Whittembury *et al.*, 1986). Recientemente se ha observado regulación rápida de la permeabilidad de las uniones intercelulares (Beyenbach, 2003). El área de la superficie real de las vías transcelulares es muy diferente de la de las vías paracelulares (Hernández *et al.*, 1995, 2001), pero todavía hay controversias en cuanto a la relativa relación de estas áreas (O'Donnell y Maddrell, 1983; Whittembury *et al.*, 1986; Whittembury y Hill, 2000). Habrá que esperar que en el futuro se desarrollen métodos más precisos que resuelvan estas incógnitas.

***Sir Vincent B. Wigglesworth CBE, FRS (1899-1994), gran estudioso del *Rhodnius prolixus*, fundador de la Fisiología de Insectos.***

Dedicamos este artículo al Profesor Sir Vincent B. Wigglesworth CBE, FRS (1899-1994), gran estudioso de “nuestro” *Rhodnius prolixus* y fundador de la Fisiología de Insectos. Nació 1899, estudió medicina; trabajó y publicó hasta los 91 años, en la Universidad de Cambridge, Inglaterra. GW tuvo la suerte de conocerlo en el “piso de más arriba” del Departamento de Zoología de esa Universidad. Conversamos largo por última vez en la biblioteca del Departamento, cuando teniendo 90 años, preparaba la última de sus 264 publicaciones; de ellas 63 aparecieron después de su jubilación a los 65 años. Publicó 8 libros; entre ellos *Insect Physiology* (en 1934, de 134 pags.) que llegó a la 8ª. edición (de 191 pags.) y que hizo que la comunidad científica considerara a Sir Vincent el fundador de la fisiología de insectos; *Principles of Insect Physiology* (en 1939, de 546 pags.), tratado completísimo, de consulta obligada, cuya 7ª. edición es de 1972 (de 827 pags.), toda con dibujos de Sir Vincent; *The control of growth and form* (en 1959 de 140 pags.) y *The Life of*

*Insects* (en 1964 de 360 pags, con ilustraciones de su esposa). Cuando GW trabajaba en Boston en micropunción y microanálisis de túbulos renales entre 1957 y 1960 para estudiar directamente la fisiología de la formación de la orina, los ejemplos a seguir eran A. N. Richards, J. T. Wearn y P. A. Bott en Filadelfia (porque C. W. Gottschalk recién comenzaba sus trabajos); y de hecho, en 1957, con Schatzmann y Windhager viajamos a Filadelfia para visitar, conversar y pedir consejos a la doctora Phyllis A. Bott, entonces profesora en la Escuela de Medicina de la Universidad de Temple y para conseguir los capilares de vidrio, para preparar las micropipetas necesarias en las micropunciones, del señor Graham (el soplador de vidrio de la Universidad de Pennsylvania en Filadelfia) quien era el único que los fabricaba entonces (Shipp *et al.*, 1958; Windhager *et al.*, 1959; Whittembury, 1960; Whittembury *et al.*, 1961). Los otros notables trabajaban en la Universidad de Cambridge en Inglaterra (Reino Unido). Eran V. B. Wigglesworth (Locke, 1996) y J. A. Ramsay (Maddrell, 1990), fisiólogos de insectos que habían diseñado ultramicro-métodos para analizar las muestras microscópicas obtenidas de los insectos y que nosotros necesitábamos (Ramsay, 1952; Ramsay y Brown, 1955; Ramsay, *et al.*, 1955). Perfeccionamos esas técnicas para nuestras necesidades. Carl W. Cottchalk nos ayudó con los planos del aparato para las determinaciones del punto de congelación; Solomon tenía los amplificadores necesarios para la fotometría de llama y GW la experiencia para las determinaciones de Cl<sup>-</sup> (Whittembury *et al.*, 1957). Volviendo a Wigglesworth, él estudió prácticamente todos los aspectos de la fisiología de insectos.

Para poner sólo ejemplos de *Rhodnius prolixus*, cuando estudió su metamorfosis, descubrió la importancia de las células neurosecretoras de las glándulas protorácicas del *Rhodnius*, que secretan una hormona de crecimiento que llamó protoracicotrópica (PTTH), que regula la metamorfosis. También descubrió la hormona juvenil, que impide el desarrollo de las

características adultas en el *Rhodnius*. Sus tres trabajos pioneros de 1931 sobre la orina del *Rhodnius*, que ocupan 40 páginas del *Journal of experimental biology* (Wigglesworth, 1931 a, b y c); se titulan “*The physiology of excretion in a blood sucking insect, Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae)*”.

## AGRADECIMIENTOS:

A los doctores J. Teresa Tiffert, Virgilio L. Lew y Simon H. P. Maddrell de la Universidad de Cambridge por su gran ayuda entre muchas cosas, con las referencias históricas de este trabajo.

---

## LITERATURA CITADA

---

- BELLO-REUSS, E.**  
1986. Cell membrane and paracellular resistances in isolated proximal tubules from rabbit and *Ambystoma*. *Journal of Physiology* (London) 370: 25-38.
- BERTHELET, F., M. BEAUDRY-LONERGAN, H. LINARES, G. WHITTEMBURY, y M. BERGERON**  
1987. Polimorphic organization of the endoplasmic reticulum of the Malpighian tubule. Evidence for a transcellular route. *La Cellule*, 74: 281-293.
- BEYENBACH, K.**  
2001. Energizing epithelial transport with the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *News in Physiological Sciences*, 16: 145-151.  
2003a. Regulation of tight junction permeability with switch-like speed. *Current Opinions in Nephrology and Hypertension*, 12: 543-550.  
2003b. Transport mechanisms of diuresis in Malpighian tubules of insects. *Journal of Experimental Biology*, 206: 3845-3856.
- CARIANI, L., L. THOMAS, J. BRITO y J. R. DEL CASTILLO**  
2004. Bismuth citrate in the quantification of inorganic phosphate and its utility in the determination of membrane-bound phosphatases. *Analytical Biochemistry*, 324: 79-83.
- CARUSO-NEVES, C., J. R. MEYER-FERNANDES, J. SAAD-NEHME, F. PROVERBIO, R. MARIN y A. G. LOPES**  
1998. Ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>-ATPase activity of Malpighian tubules from *Rhodnius prolixus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, B 119: 807-811.
- CHEN, L. K. y W. F. BORON**  
1995. Acid extrusion in the S3 segment of the rabbit proximal tubule. II. Effect of basolateral CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub>. *American Journal of Physiology*, 268: F193-203.
- CRAGOE, E. J., T. R. KLEYMAN y L. SIMCHOWITZ**  
1992. *Amiloride and its analogs: unique cation transport inhibitors*. VCH publishers. New York.
- DEETJEN, P.**  
1978. Microperfusion of superficial tubules and peritubular capillaries (208-218). En: Andreucci, V. E., *Manual of Renal Micropuncture*. Idelson, Naples.
- DEL CASTILLO, J. R. y J. W. ROBINSON**  
1982. Na<sup>+</sup>-stimulated ATPase activities in basolateral plasma membranes from guinea-pig small intestinal epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 812: 413-422.
- ECHEVARRÍA, M., R. RAMÍREZ-LORCA, C. S. HERNÁNDEZ, A. M. GUTIÉRREZ, S. MÉNDEZ-FERRER, E. GONZÁLEZ, J. J. TOLEDO-ARAL, A. A. ILUNDÁIN y G. WHITTEMBURY**  
2001. Identification of a new water channel (RP-mip) in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. *Pflügers Archiv.*, 442: 27-34.
- GÁMEZ, A. D.**  
2011. Identification of P-Type ATPases in a Cell Line of *Aedes albopictus* C6/36. *Biophysical Journ.*, 100: 243a.
- GARCÍA-PÉREZ, R. D.**  
2010. Estudio de la homeostasis del ion Na en células epiteliales de *Rhodnius prolixus* y otros insectos. Tesis de Mg. Sc. en Fisiología y Biofísica. Centro de Estudios Avanzados, IVIC, Caracas.
- GARTY, H. y L. PALMER**  
1997. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiological Reviews*, 77: 359-396.
- GREGER, R.**  
1990. Chloride Channel blockers. *Methods in Enzymology*, 191: 793-810.
- GUTIÉRREZ, A. M., C. S. HERNÁNDEZ y G. WHITTEMBURY**  
2004. A Model for Fluid Secretion in *Rhodnius* Upper Malpighian Tubules (UMT). *Journal of Membrane Biology*, 202: 105-14.
- GUTIÉRREZ, A. M., R. D. GARCÍA, A. GÁMEZ, C. S. HERNÁNDEZ, y G. WHITTEMBURY**  
2005. Estudio de los mecanismos de transporte iónico involucrados en la secreción en túbulos de Malpighi de chipó (*Rhodnius prolixus*). *Acta Científica Venezolana*, 56: 149-158.

- HAAS, M. y B. FORBUSH III  
2000. The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. *Annual Reviews of Physiology*, 62: 515-534.
- HEGARTY, J. L., B. ZHANG, T. T. PENNABECKER, D. H. PETZEL, M. D. BAUSTIAN y K. W. BEYENBACH  
1991. Dibutyl cAMP activates bumetanide-sensitive electrolyte transport in Malpighian tubules. *American Journal of Physiology*, 261: C521-C529.
- HERNÁNDEZ, C. S., E. GONZÁLEZ y G. WHITTEMBURY  
1995. The paracellular channel for water secretion in the upper segment of the Malpighian tubule of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Membrane Biology*, 148: 233-242.
- HERNÁNDEZ, C.S., A. M. GUTIERREZ, A. VARGAS-JANZEN, F. NORIA, E. GONZALEZ, V. RUIZ V y G. WHITTEMBURY  
2001. Fluid secretion in *Rhodnius* upper Malpighian tubules (UMT): water osmotic permeabilities and morphometric studies. *Journal of Membrane Biology*, 184: 283-290.
- IANOWSKI, J. P., R. J. CHRISTENSEN y M. J. O'DONNELL  
2002. Intracellular ion activities in Malpighian tubule cells of *Rhodnius prolixus*: evaluation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransport across the basolateral membrane. *Journal of Experimental Biology*, 205: 1645-1655.
- IANOWSKI, J. P. y M. J. O'DONNELL  
2001. Transepithelial potential in Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*: lumen-negative voltages and the triphasic response to serotonin. *Journal of Insect Physiology*, 47: 411-421.  
2004. Basolateral ion transport mechanisms during fluid secretion by *Drosophila* Malpighian tubules: Na<sup>+</sup> recycling, Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup>:2Cl<sup>-</sup> cotransport and Cl<sup>-</sup> conductance. *Journal of Experimental Biology*, 207: 2599-2609.  
2006. Electrochemical gradients for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and H<sup>+</sup> across the apical membrane in Malpighian (renal) tubule cells of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Experimental Biology*, 209: 1964-1975.
- KLEYMAN, T. R. y E. J. CRAGOE  
1988. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *Journal of Membrane Biology*, 105: 1-21.
- KOEFOD-JOHNSEN, V. y H. H. USSING  
1958. The nature of the frog skin potential. *Acta Physiologica Scandinavica*, 42: 298-308.
- LARSEN E. H., S. NEDERGAARD y H. H. USSING  
2000. Role of lateral intercellular space and sodium recirculation for isotonic transport in leaky epithelia. *Reviews in Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 141: 153-212.
- LEYSENS, A., S. DIJKSTRA, E. VAN KERKHOVE y P. STEELS  
1994. Mechanisms of K<sup>+</sup> uptake across the basal membrane of Malpighian tubules of *Formica polyctena*: the effect of ions and inhibitors. *Journal of Experimental Biology*, 195:123-45.
- LINTON S. M. y M. J. O'DONNELL  
1999. Contributions of K<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup> cotransport and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to basolateral ion transport in Malpighian Tubules of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 202: 1561-1570.
- LOCKE, M.  
1996. Sir Vincent Brian Wigglesworth, CBE. 17 April 1899-12 February 1994. *Biographical memoirs of fellows of the Royal Society*, 42: 540-553.
- MADDELL, S. H. P.  
1963. Excretion in the blood sucking insect *Rhodnius prolixus* Stål. I. The control of diuresis. *Journal of Experimental Biology*, 40: 247-256.  
1980. Characteristics of Epithelial Transport in Insect Malpighian Tubules. *Current Topics in Membrane and Transport*, 14: 427-463.  
1990. James Arthur Ramsay. 6 Sept 1904-5 Feb. 1988. *Biographical memoirs of fellows of the Royal Society*, 36: 420-433.  
1991. The fastest fluid-secreting cell-known: the upper Malpighian tubule of *Rhodnius*. *Bio Essays*, 13: 357-362.  
2004. Active transport of water by insect Malpighian tubules. *Journal of Experimental Biology*, 207: 894-896.
- MADDELL, S. H. P., W. S. HERMAN, R. L. MOONEY y J. A. OVERTON  
1991. 5-Hydroxytryptamine: a second diuretic hormone in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Experimental Biology*, 156: 557-566.
- MADDELL S. H. P. y M. J. O'DONNELL  
1992. Insect Malpighian tubules: V-ATPase action in ion and fluid transport. *Journal of Experimental Biology*, 172: 417-429
- MADDELL, S. H. P. y J. A. OVERTON  
1988. Stimulation of sodium transport and fluid secretion by ouabain in an insect Malpighian tubule. *Journal of Experimental Biology*, 137: 265-276.
- MADDELL, S. H. P., G. WHITTEMBURY, R. L. MOONEY, J. B. HARRISON, J. A. OVERTON y B. RODRÍGUEZ  
1991. The fate of calcium in the diet of *Rhodnius prolixus*: storage in concretion bodies in the Malpighian tubules. *Journal of Experimental Biology*, 157: 483-502.



- MAREN, T. H.  
1967. Carbonic anhydrase: chemistry, physiology and inhibition. *American Journal of Physiology*, 47: 595-642.
- NEGULESCU, P. A. y T. E. MACHEN  
1990. Intracellular ion activities and membrane transport of parietal cells measured with fluorescent dyes. *Methods in Enzymology*, 192: 38-81.
- O'DONNELL, M. J., S. K. ALDIS y S. H. P. MADDRELL  
1982. Measurements of osmotic permeability in the Malpighian tubules of an insect, *Rhodnius prolixus* Stal. *Proceedings of the Royal Society*, B. 216: 267-277.
- O'DONNELL, M. J. y S. H. P. MADDRELL  
1983. Paracellular and transcellular routes for water and solute movements across insect epithelia. *Journal of Experimental Biology*, 106: 231-253.
1984. Secretion by the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* Stal: electrical events. *Journal of Experimental Biology*, 110: 275-290.
- O'DONNELL, M. J., S. H. P. MADDRELL y B. O. C. GARDINER  
1983. Transport of uric acid by the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* and other insects. *Journal of Experimental Biology*, 54: 779-804.
- PHILLIPS, J. E.  
1981. Comparative physiology of insect renal function. *American Journal of Physiology*, 241: R241- R257.
- PIERMARINI, P. M., R. M. HINE, M. SCHEPEL, J. T. MIYAUCHI y K. W. BEYENBACH  
2011. Role of an apical K<sub>2</sub>Cl cotransporter in urine formation by renal tubules of the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *American Journal of Physiology. Regulation, Integrative and Comparative Physiology* Aug 3. (Epub ahead of print)
- PROVERBIO, F., M. CONDRESCU-GUIDI y G. WHITTEMBURY  
1975. Ouabain-insensitive Na<sup>+</sup> stimulation of an Mg-2<sup>+</sup>-dependent ATPase in kidney tissue. *Biochimica et Biophysica Acta*, 394: 281-292.
- RAMSAY, J. A.  
1952. The excretion of sodium and potassium by the Malpighian tubules of *Rhodnius*. *Journal of Experimental Biology*, 29: 110-126.
1954. Active transport of water by the Malpighian tubules of the stick insect *Dixippus morosus* (Orthoptera Plasmidae). *Journal of Experimental Biology*, 31: 104-113.
- RAMSAY, J. A. y R. H. J. BROWN  
1955. Simple apparatus and procedure for freezing point determination upon small volumes of fluid. *Journal of Scientific Instruments*, 32: 372-375.
- RAMSAY, J. A., R. H. J. BROWN y P. C. CROGHAN  
1955. Electrometric titration of chloride in small volumes. *Journal of Experimental Biology*, 32: 822-829.
- ROCAFULL, M. A., F. J. ROMERO, L. E. THOMAS y J. R. DELCASTILLO  
2011. Isolation and cloning of the K<sup>+</sup>-independent, ouabain-insensitive Na<sup>+</sup>ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1808: 1684-1700.
- RODRÍGUEZ, B.  
1993. Caracterización eléctrica del primer segmento de los túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus* y su relación con la secreción de iones y agua. 1993, Tesis de Philosophus Scientiarum. CEA. I.V.I.C.
- SCOTT, B. N., M. J. YU, L. W. LEE, y K. W. BEYENBACH  
2004. Mechanisms of K<sup>+</sup> transport across basolateral membranes of principal cells in Malpighian tubules of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Experimental Biology*, 207: 1655-1663.
- SHIPP, J. C., I. B. HANENSON, E. WINDHAGER, H. J. SCHATZMANN, G. WHITTEMBURY, H. YOSHIMURA y A. K. SOLOMON  
1958. Single proximal tubules of *Necturus* kidney. Methods for micropuncture and microperfusion. *American Journal of Physiology*, 195: 563-574.
- SKOU, J. C.  
1992. The Na-K pump. *News in Physiological Sciences*, 7: 95-100.
- TE BRUGGE, V., J. P. IANOWSKI E I. ORCHARD  
2009. Biological activity of diuretic factors on the anterior midgut of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *General and Comparative Endocrinology*, 162: 105-112.
- TE BRUGGE, V., J. P. PALUZZI, D. A. SCHOOLEY E I. ORCHARD  
2011. Identification of the elusive peptidergic diuretic hormone in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*: a CRF-related peptide. *Journal of Experimental Biology*, 214: 371-81.
- TORRIE, L. S., J. C. RADFORD, T. D. SOUTHALL, L. KEAN, A. J. DINSMORE, S. A. DAVIES y J. A. DOW  
2004. Resolution of the insect ouabain paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 13689-13693.
- VELÁSQUEZ, H. y F. S. WRIGHT  
1986. Effect of diuretic drugs on Na, Cl, and K transport by rat renal distal tubule. *American Journal of Physiology*, 250: F1013-1023.
- WHITTEMBURY, G.  
1960. Ion and water transport in the proximal tubules of the kidney of *Necturus maculosus*. *Journal of General Physiology*, 43: 43s-56s.

WHITTEMBURY, G.

1968. Sodium and water transport in kidney proximal tubular cells. *Journal of General Physiology*, 51: 303-314.

WHITTEMBURY, G., A. C. BIONDI, A. PAZ-ALIAGA, H.

LINARES, V. PARTHE y N. LINARES

1986. Transcellular and paracellular flow of water during secretion in the upper segment of the Malpighian tubule of *Rhodnius prolixus*: solvent drag of molecules of graded size. *Journal of Experimental Biology*, 123: 71-92.

WHITTEMBURY, G., P. CARPI-MEDINA, E. GONZÁLEZ y

H. LINARES

1984. Effect of parachoro-mercuri-benzenesulfonic acid and temperature on cell water osmotic permeability of proximal straight tubules. *Biochimica et Biophysica Acta*, 775: 365-373.

WHITTEMBURY, G. y A. HILL

2000. Coupled transport of water and solutes across epithelia (341-362). En: D. Seldin, G. Giebisch, eds. *The Kidney, Physiology and Pathophysiology*, 3rd edition, Lippincott Williams & Wilkins, New York. Chapter 14.

WHITTEMBURY, G., D. E. OKEN, E. E. WINDHAGER y A. K.

SOLOMON

1959. Single proximal tubules of *Necturus* kidney. IV. Dependence of H<sub>2</sub>O movement on osmotic gradients. *American Journal of Physiology*, 197: 1121-1127.

WHITTEMBURY, G. y F. PROVERBIO

1970. Two modes of Na extrusion in cells from Guinea-pig cortex slices. *Pflügers Archiv.*, 316: 1-25.

WHITTEMBURY, G., M. RAMÍREZ, J. FERNÁNDEZ y C.

MONGE

1957. The use of high resistance voltmeters in the determination of biological Cl. *Acta Physiologica Latinoamericana*, 7: 76-85.

WHITTEMBURY, G., N. SUGINO y A. K. SOLOMON

1961. Ionic permeability and electrical potential differences in *Necturus* kidney cells. *Journal of General Physiology*, 44: 689-712.

WIGGLESWORTH, V. B.

- 1931a. The physiology of the excretion in a blood sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). I. Composition of the Urine Anatomy and histology of the excretory system. *Journal of Experimental Biology*, 8: 411-427.

- 1931b. The physiology of the excretion in a blood sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). II. Anatomy and histology of the excretory system. *Journal of Experimental Biology*, 8: 428-442.

- 1931c. The physiology of the excretion in a blood sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). III. The mechanics of uric acid excretion. *Journal of Experimental Biology*, 8: 443-451.

1972. *The principles of Insect Physiology*. 7th. Edition. Chapman & Hall, London.

WIGGLESWORTH, V.B. y M. M. SALPETER

1962. Histology of the Malpighian tubules in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera). *Journal of Insect Physiology*, 8: 299-307.

WU, D. S. y K. W. BEYENBACH

2003. The dependence of electrical transport pathways in Malpighian tubules on ATP. *Journal of Experimental Biology*, 206: 233-243.