



XVIII Simposio Internacional Sobre Enfermedades Desatendidas

“Implicancias del neuropéptido CCH amida en la diuresis postprandial en el insecto *Rhodnius prolixus*, vector de la enfermedad de Chagas”

Autores: Capriotti Natalia¹, Ianowski Juan², Ons Sheila¹

Institución: (1) Laboratorio de Neurobiología de Insectos, Centro Regional de Estudios Genómicos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. (2) Department of Physiology, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada

Autor de contacto: Capriotti Natalia E-mail: nataliacapriotti@gmail.com

I. Introducción

- Los insectos triatominos pueden ingerir en pocos minutos una cantidad de sangre que supera hasta doce veces su propio peso corporal inicial, lo que hace necesaria una diuresis postprandial rápida y efectiva
- Simon Maddrell estableció que la diuresis postprandial del insecto hematófago *Rhodnius prolixus* es regulada y coordinada con precisión a través de procesos de transporte en el intestino medio anterior y los segmentos proximal y distal de los túbulos de Malpighi. El volumen de hemolinfa debe ser regulado de forma autónoma por factores que estimulan la secreción de los túbulos de Malpighi y la absorción en el intestino anterior [1]. Se sabe que estos procesos involucran la participación de serotonina (5 HT) y hormonas peptídicas.
- En el área de la endocrinología de insectos, existe consenso científico en que los neuropéptidos y sus receptores son una vía promisoriosa en la búsqueda de blancos de insecticidas de nueva generación.
- El neuropéptido CCH-amida fue descrito por primera vez en insectos en *Bombyx mori*. Hasta el momento, los estudios publicados para estudiar su función han sido escasos; se ha establecido una posible acción reguladora sobre la alimentación en *B. mori* [2] y en *Drosophila melanogaster* [3].

II. Materiales y métodos

- Silenciamiento del gen *RhopCCHa*:** Se silenció el gen *RhopCCHa* con ARN doble cadena. Se amplificó una secuencia por PCR, usando *primers* específicos para el gen a interferir, conjugados en su extremo 5' con 23 bases de la secuencia del promotor de la enzima T7 RNA polimerasa (RNA Pol T7). El producto de PCR fue utilizado como molde para la síntesis de RNA doble cadena (dsRNA) con RNA Pol T7. Los insectos (ninfas 4° estadio) recibieron una inyección intra abdominal conteniendo 2 µg de dsRNA específico para CCH amida. Los insectos fueron alimentados 5 días post inyección de manera *ad libitum* durante 20 minutos. Se midió el volumen excretado a distintos tiempos post alimentación.
- Tasa de transporte de fluidos:** Se aisló el intestino anterior de insectos de 5to estadio y se lavo en solución salina por 5 min. Se ligo el extremo posterior de la estructura con un hilo de seda y se inyectaron 50 µl de solución salina conteniendo azul de metileno en el lumen, a fin de descartar filtraciones. Posteriormente se ligo el extremo anterior, generando de esta manera un saco cerrado por sus dos extremos. El preparado fue pesado en una balanza de precisión y posteriormente incubado en solución salina bajo diferentes condiciones experimentales (salina/5 HT/CCHa/5 HT y CCHa). Luego de 1h se volvieron a pesar los preparados. La diferencia entre ambos pesos fue utilizada para calcular el volumen de solución salina transportada
- Técnica de Ramsay:** Mediante la utilización de un ensayo *in vitro* se puso a prueba el efecto del péptido de interés sobre la diuresis. Se diseccionaron los túbulos de Malpighi y se colocaron en una gota de 90 µl de solución salina rodeada por aceite mineral saturado de agua. El extremo abierto del túbulo se sujeto a un alfiler en contacto con el aceite, a unos 2 mm. del borde de la gota de solución salina.

III. Resultados

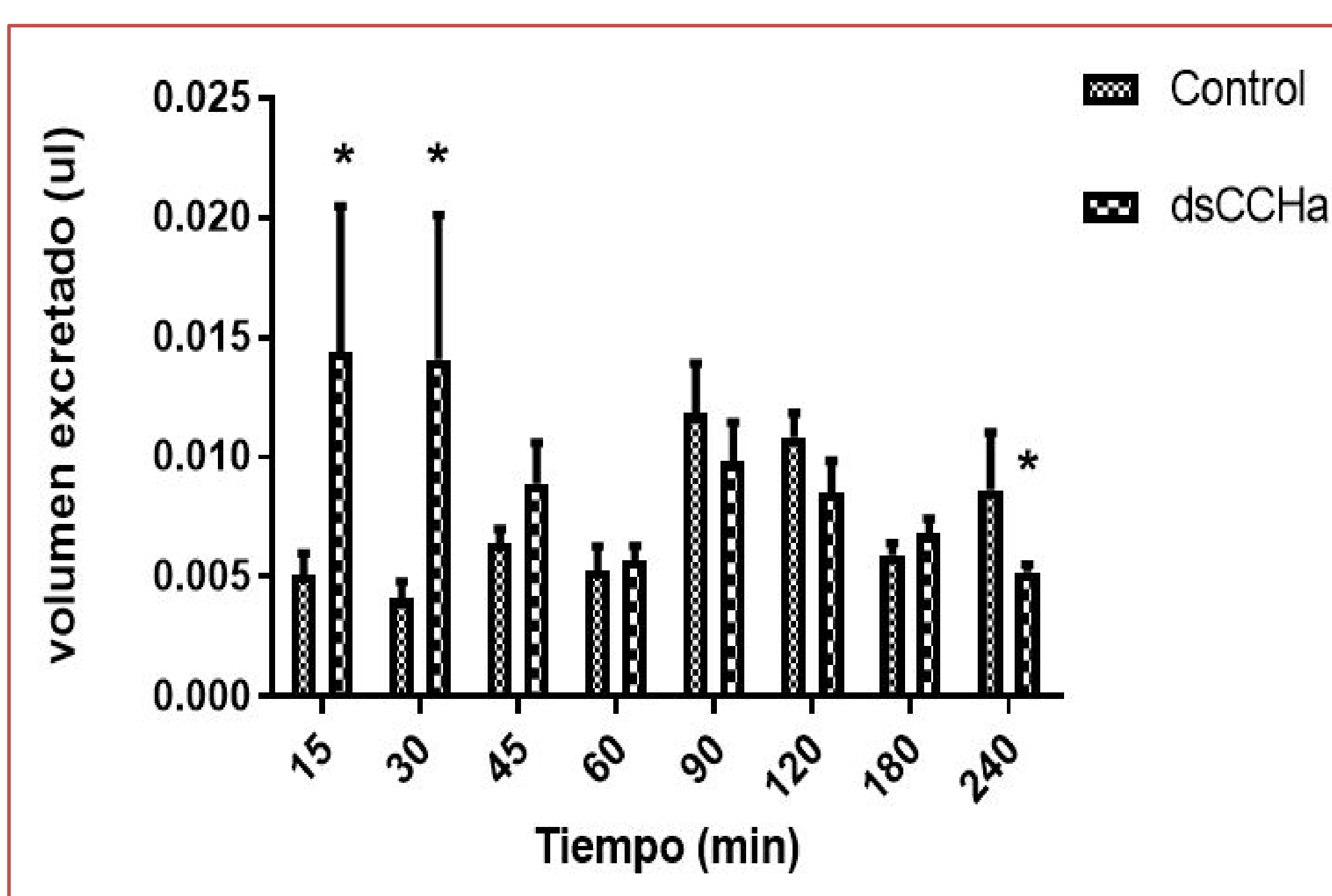


Figura [1] Efecto del silenciamiento del gen CCH amida en ninfas 4° estadio de *R. prolixus* y diuresis a distintos tiempos post ingesta de sangre. *, indica diferencias significativas. (p<0,05, n=10)

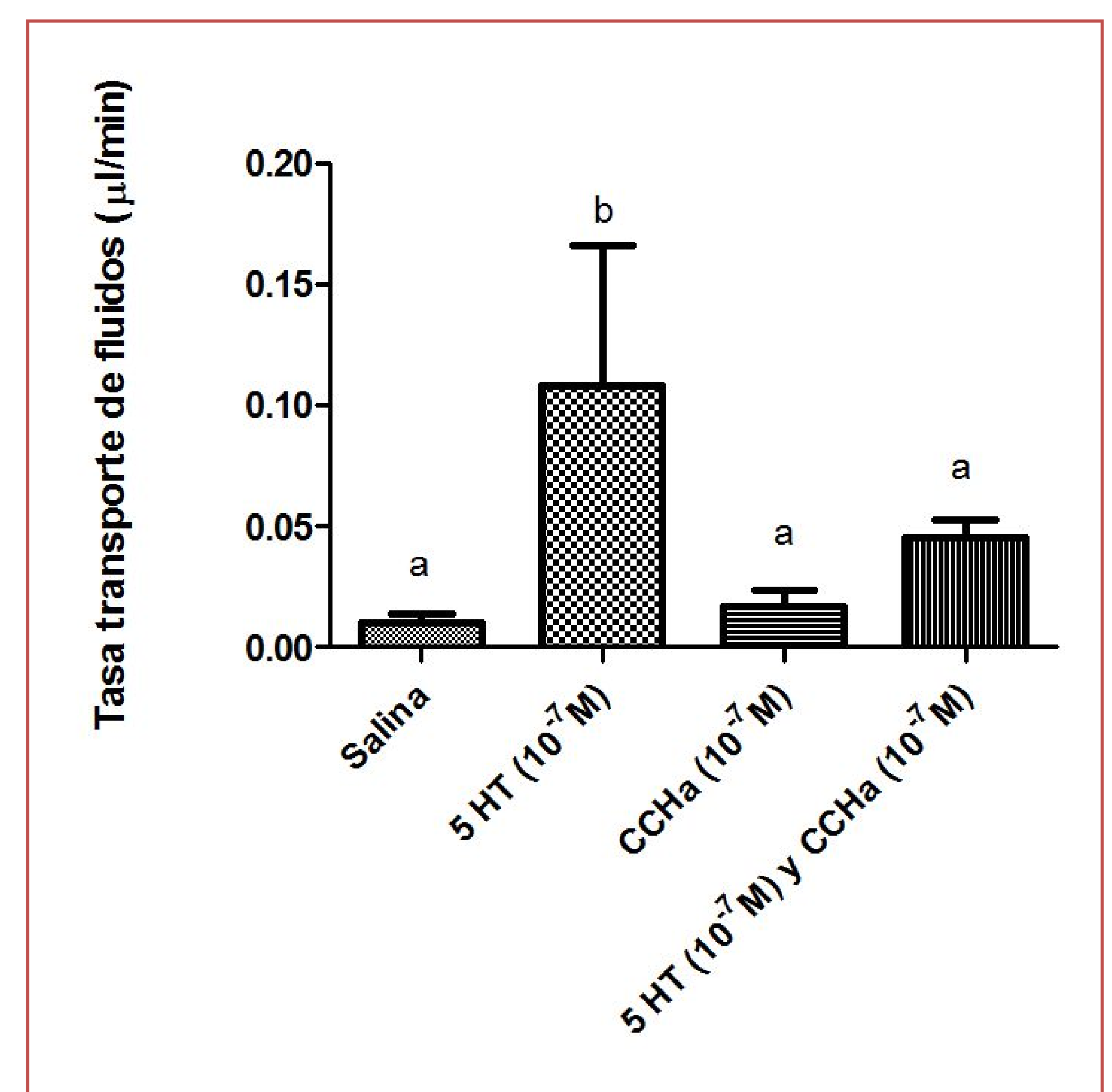


Figura [3] Efecto de CCH amida en la tasa de transporte de fluidos del intestino anterior de ninfas 5° estadio. ANOVA de un factor (p <0.05, n=10) (b) indica diferencias significativas

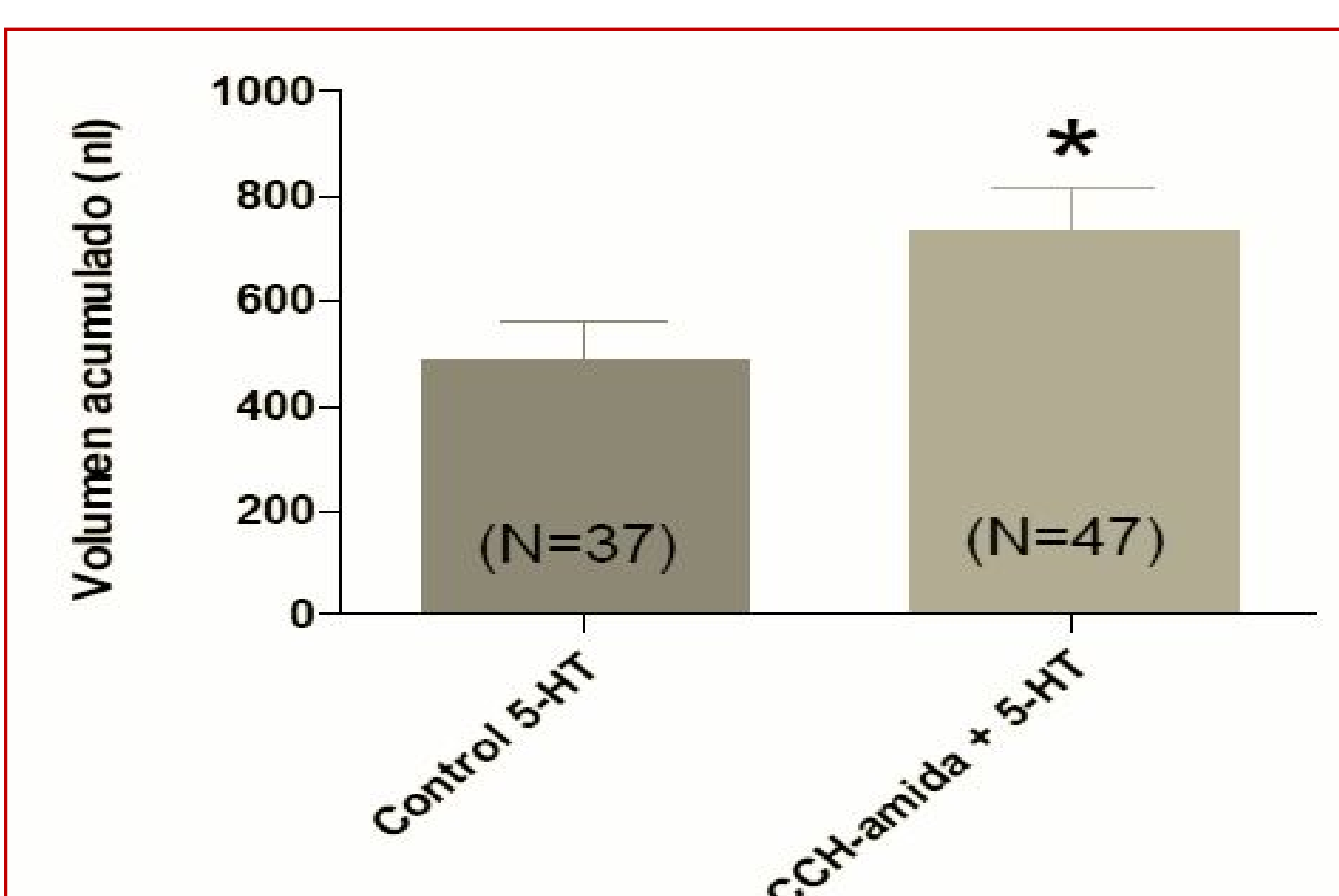


Figura [2] Ensayo de Ramsay. Análisis del volumen acumulado a los 40 min post estimulación con 5 HT (control) ó CCH amida + 5 HT (tratamiento). Student t test, p <0.05, * indica diferencias significativas

IV. Conclusiones

- Nuestros resultados sugieren que el neuropéptido CCH amida tendría un efecto dual a distintos tiempos post ingesta de sangre, al actuar inhibiendo la diuresis inmediata, y estimulándola hacia el final del proceso. Estos resultados fueron confirmados con ensayos *in vitro*, donde observamos una inhibición de la absorción por parte del intestino medio anterior y una estimulación de la excreción por túbulos de Malpighi.

V. Referencias

- [1] Coast GM. Neuroendocrine control of ionic homeostasis in blood-sucking insects. *J Exp Biol.* 2009;212(Pt 3):378-86. Epub 2009/01/20. doi: 10.1242/jeb.024109. PubMed PMID: 19151213.
- [2] Roller L, Yamanaka N, Watanabe K, Daubnerova I, Zitnan D, Kataoka H, et al. The unique evolution of neuropeptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology.* 2008;38(12):1147-57. PubMed PMID: 19280707.
- [3] Hansen KK, Staffinger E, Schneider M, Hauser F, Cazzamali G, Williamson M, et al. Discovery of a novel insect neuropeptide signaling system closely related to the insect adipokinetic hormone and corazonin hormonal systems. *The Journal of biological chemistry.* 2010;285(14):10736-47. doi: 10.1074/jbc.M109.045369. PubMed PMID: 20068045; PubMed Central PMCID: PMC2856281