



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Efecto anestésico local del extracto glandular salival del hematófago Rhodnius prolixus**

**Juan Jose Velásquez Gutiérrez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de medicina, Departamento de cirugía, Unidad de Anestesiología  
Bogotá, Colombia  
2017

# **Efecto anestésico local del extracto glandular salival del hematófago *Rhodnius prolixus***

**Juan Jose Velásquez Gutiérrez**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
Especialista en Anestesiología y Reanimación

Director:

Doctor, José Ricardo Navarro Vargas

Codirectora:

Doctora, Ligia Inés Moncada Álvarez.

Grupo de Investigación:

Anestesiología y Reanimación

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de medicina, Departamento de cirugía, Unidad de Anestesiología

Bogotá, Colombia

2017

*A mis maestros y mi familia, especialmente a mi amada madre y hermanos, que con su ejemplo, fortaleza, persistencia y apoyo incondicional, he podido lograr cada una de las metas que me he propuesto en la vida.*

## Resumen

Los Triatomíneos son insectos hematófagos, vectores del *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas. Estos insectos secretan una saliva compuesta de sustancias con múltiples propiedades biológicas, entre ellas la capacidad de anestesiarse eficazmente la zona de donde se alimentan. Existe solo un estudio que describe esta propiedad en la saliva de los Triatomíneos, y plantea la posibilidad que este componente anestésico actúe de forma similar a los anestésicos locales conocidos actualmente.

**Objetivos:** Este estudio está diseñado con el objetivo de obtener extracto glandular salival procedente de *Rhodnius prolixus* y evaluar su efecto anestésico local.

**Materiales y métodos:** Se usaron *Rhodnius prolixus*, criados en  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ . y HR>70%. Posteriormente se obtuvo un extracto glandular salival, el cual se utilizó para evaluar el efecto anestésico en un modelo murino. Se estudiaron 9 ratones, en los cuales se infiltró el extracto glandular a nivel subcutáneo en el muslo derecho y una solución control en el muslo izquierdo, evaluando la respuesta al dolor periódicamente.

**Resultados y discusión:** Se observó entre el minuto 15 y 20 el efecto anestésico máximo; con una latencia media del efecto anestésico de 8,6 minutos (Desv. Estándar 5,6 minutos) y una duración máxima media del efecto de 36,7 minutos (Desv. Estándar 12,1 minutos). Adicionalmente se calculó la diferencia de proporción de presentación de dolor, con una diferencia de proporción máxima de -0,75 al minuto 10, IC 95% (-1.05 a -0,44),  $p= 0.02$ , al minuto 15 de -0,75, IC 95% (-1.05 a -0,44),  $p= 0.02$ , y al minuto 20 de -0,75, IC 95% (-1.07 a -0,43),  $p=0,03$ .

**Conclusiones:** En este estudio experimental de laboratorio se comprueba en un modelo murino el efecto anestésico local del extracto glandular salival del hematófago *Rhodnius prolixus*, siendo el primer paso en la posible caracterización y aislamiento de una nueva molécula anestésica local.

**Palabras clave:** *Rhodnius prolixus*, glándulas salivares, anestésico local.

## Abstract

The Triatomines are hematophagous insects hosts and vectors for *Trypanosoma cruzi*. These insects secrete saliva formed by a wide variety of substances with properties that facilitate their feeding process. In addition to these properties, the argument exists that the saliva of this insect may contain a highly effective local anesthetic molecule, because, in spite of being large insects, they produce a painless bite and may last long periods sucking blood without being perceived. Regarding this theoretical approach, there is one study which shows that the saliva of *Triatoma infestans* could have an inhibitory effect on Na<sup>+</sup> channels, which could reduce the generation and duration of the nervous action potential, consequently reducing local sensitivity, a manner similar to currently known local anesthetics. Given the above, and considering that any molecule from these insects having the anesthetic action has been isolated and characterized, it is of great interest to make research on this subject.

**Objective:** To obtain a glandular extract from *Rhodnius prolixus* and check its local anesthetic effect in an animal model.

**Materials and Methods:** *Rhodnius prolixus* insects were used; subsequently the salivary glands were removed and a glandular extract was obtained. To test whether this glandular extract had local anesthetic effect, 9 mice were used, to which the glandular extract was administered subcutaneously in the right leg and control solution was administered in the left leg, making painful stimulus with fine-tipped tweezers periodically in both legs and evaluating the response to pain.

**Results and Discussion:** The maximum anesthetic effect was observed between minute 15 and 20; with a mean latency of the anesthetic effect of 8.6 minutes and a maximum effect duration mean of 36.7 minutes. In addition, the difference in the proportion of pain is calculated, with a maximum ratio difference of -0.75 minute 10, 95% CI (-1.05 to -0.44),  $p = 0.02$ , at minute 15 of -0.75, 95% CI (-1.05 to -0.44),  $p = 0.02$ , and at minute 20 of -0.75, 95% CI (-1.07 to -0.43),  $p = 0.03$ .

Conclusion(s): In this experimental laboratory study, the local anesthetic effect of the salivary glandular extract of the hematophagous *Rhodnius prolixus* is demonstrated in a murine model, being the first step in the possible characterization and isolation of a new local anesthetic molecule.

**Key words:** *Rhodnius prolixus*, salivary glands, local anesthetic

# Contenido

	Pág.
Resumen y Abstract.....	I
Introducción .....	1
<b>1. Justificación .....</b>	<b>3</b>
1.1 Hipótesis .....	3
<b>2. Materiales y métodos .....</b>	<b>4</b>
2.1 Mantenimiento de la colonia de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	4
2.2 Extracción de las glándulas salivales de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	5
2.2.1 Cuantificación de proteínas con el método Bio rad.....	5
2.3 Reconocimiento del efecto anestésico del extracto glandular salival de <i>Rhodnius prolixus</i> en ratones de laboratorio.....	5
<b>3. Consideraciones éticas .....</b>	<b>7</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>8</b>
<b>5. Análisis estadístico.....</b>	<b>9</b>
<b>6. Discusión.....</b>	<b>11</b>
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>13</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>14</b>
<b>A. Anexo: Tablas de resultados 1 a 8</b>	

# Introducción

Los triatomíneos (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae) son insectos hematófagos conocidos en medicina por ser vectores del *Trypanosoma cruzi*, el protozoo causante de la enfermedad de Chagas. Estos insectos secretan saliva compuesta por una amplia variedad de sustancias con propiedades anticoagulantes, antihistamínicas, vasodilatadoras y antiplaquetarias que facilitan su proceso de alimentación (1). Además de estas propiedades, existe el planteamiento de que en la saliva de este insecto puede haber una molécula anestésica local altamente efectiva, ya que, a pesar de ser grandes insectos, producen una picadura indolora y pueden durar hasta casi una hora succionando sangre sin ser percibidos.

Respecto a este planteamiento teórico existe un estudio que demuestra que la saliva de *Triatoma infestans* tiene un efecto inhibitor sobre canales de  $\text{Na}^+$ , lo cual podría disminuir la generación y la duración del potencial de acción del nervio, disminuyendo así la sensibilidad local, de una manera similar a los anestésicos locales conocidos actualmente (2). Esto refleja el potencial que tendría este tipo de insectos en el campo de la anestesiología, por lo cual pretendemos con este estudio evaluar el efecto anestésico del extracto glandular de estos insectos.

Aun no se ha caracterizado ni aislado ninguna molécula anestésica de la saliva de los triatomíneos, pero se han realizado múltiples estudios donde identifican el perfil electroforético de las proteínas presentes en la saliva de diversas especies. En el *Triatoma dimidiata* las bandas más prominentes tienen pesos moleculares menores de 45 KDa (3), en el *T. infestans* están por debajo de los 35 KDa (4) y en *T. brasiliensis* la mayoría de proteínas tienen pesos moleculares entre 18 a 22 KDa (5). Estas proteínas posiblemente pertenezcan a la familia de las lipocalinas, las cuales comprenden un grupo variado de proteínas con una masa molecular promedio de 17-21 KDa; se caracterizan por tener



variados efectos, que en el caso de estos insectos hematófagos son neutralizar eventos del huésped tales como la coagulación, la agregación plaquetaria y la inflamación (6).

Un ejemplo de aislamiento de moléculas provenientes de la saliva de insectos hematófagos es el realizado en *Lutzomya longipalpis*. En este estudio se logró obtener el Maxadilano, una molécula con capacidad vasodilatadora 500 veces mayor al mejor vasodilatador conocido (péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (7), y que actualmente se encuentra en investigación para su uso en múltiples patologías.

La saliva de estos insectos tiene una gran variedad de funcionalidades, y por lo tanto ofrece una gran oportunidad para descubrir moléculas útiles en farmacología, en este caso particular, lo principal es explorar la aplicabilidad de la saliva del *Triatoma* en el campo de la anestesiología.

# 1. Justificación

Luego de observar la característica indolora de la picadura de los insectos de la subfamilia *Triatominae* y con base en los experimentos realizados con la saliva del *Triatoma infestans*, donde se evidencia un posible efecto inhibitorio de la conducción nerviosa mediante el bloqueo de canales de sodio, se puede inferir que en la saliva de estos insectos se encuentra alguna o varias moléculas que tienen un gran potencial como anestésico local. Además, si se tiene en cuenta que no se encontraron antecedentes de aislamiento de compuestos con dicha actividad procedentes de este tipo de insectos, resulta de gran interés el estudio, aislamiento y caracterización de la o las moléculas anestésicas provenientes de la saliva de los triatominos.

Para este estudio se usó el *Rhodnius prolixus*, ya que es uno de los vectores de más fácil manutención y crianza en condiciones de laboratorio (8) y es ampliamente disponible en área domiciliaria, siendo el principal vector junto con el *T. dimidiata* en Colombia (9).

## 1.1 Hipótesis

El extracto glandular salival del *Rhodnius prolixus* tiene efecto anestésico local.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Mantenimiento de la colonia de *Rhodnius prolixus***

La colonia de *Rhodnius prolixus* se inició con 30 individuos de estadio ninfal cuatro, los cuales fueron colocados en un frasco plástico que en su interior contenía un trozo de papel Kraft de 12cm x 8cm doblado en acordeón, en tres partes para que pueda servir como refugio durante su ciclo de vida. Luego, la boca del recipiente plástico se cubrió con una malla de tela y esta se aseguró con una banda elástica, con el fin de evitar la huida de los individuos en su interior. Tanto los adultos como los estadios ninfales fueron alimentados utilizando ratones *Mus musculus Linnaeus* anestesiados (0.25ml de una mezcla de Ketamina 3 partes y Xilazina 1 parte) dejando tanto a los insectos como al mamífero en una caja durante 20-30 minutos y de este modo alimentándolos cada 15 días. Por último, mensualmente se pasaban a estos insectos a otro envase plástico limpio, separando los diferentes instares de los adultos con el fin de optimizar la crianza de los animales. Durante todo el ensayo los individuos se mantuvieron en la colonia del Laboratorio de entomología médica de la Universidad Nacional de Colombia, en condiciones de 24 a 28 °c de temperatura, 50% a 60% de humedad relativa y foto periodo de 12:12 horas.

### **2.2 Extracción de las glándulas salivales de *Rhodnius prolixus***

Se realizó la extracción de las glándulas de un total de 182 individuos, entre los cuales había 140 adultos, 12 de instar cuatro y 30 de instar cinco. Para la extracción de las glándulas salivales se tuvo en cuenta la metodología propuesta por Osorio-Mesa (12), la cual consiste en inmovilizar a los individuos dejándolos 10 minutos a una temperatura de -20°C. Posteriormente se pone a los hemípteros en una caja de petri donde se retiran los tejidos para extraer las glándulas salivales, dejándolas por último en 98 µl de una solución compuesta por 92 µl de buffer más 6 µl de inhibidores de proteasas. Ya estando las

glándulas dentro de la solución mencionada, se realizó una pequeña punción con el fin de extraer solamente el contenido líquido, extrayendo los restos de tejido y poniendo los viales en refrigeración a una temperatura de -80°C para su posterior uso. Cada uno de los viales finalmente contenía el extracto de 5 pares de glándulas salivales de los insectos de estudio.

### **2.2.1 Cuantificación de proteínas con el Método Bio-Rad**

Para cada uno de los viales que tenían el contenido de las glándulas salivales de *Rhodnius prolixus* se llevó a cabo la cuantificación de las proteínas con el método Bio-Rad basado en el método Bradford, según las indicaciones dadas por el fabricante. Se usó el procedimiento de Micro ensayo para placas el cual usa la proteína gammaglobulina bovina como un comparativo para las muestras a evaluar. Este proceso se realizó con el fin de cuantificar la concentración de proteínas en cada uno de los viales y tratar de realizar el experimento con las muestras más concentradas y similares posibles.

## **2.3 Reconocimiento del efecto anestésico del extracto glandular salival de *Rhodnius prolixus* en ratones de laboratorio**

Con el fin de reconocer el efecto anestésico del extracto glandular se utilizaron 9 ratones *Mus musculus*. A cada ratón se rasuró el área del muslo donde se administró el extracto glandular (muslo derecho) y donde se administró la solución control (muslo izquierdo). La solución control fue solución salina estéril al 0,9%, y se realizó una prueba de control inicial con la solución buffer que contiene el extracto glandular, y así verificar que esta no altere la respuesta local al dolor, evitando potenciales factores de confusión.

Previo a la administración del extracto glandular y la solución control en los muslos respectivos, se verificó que el ratón respondiera adecuadamente al estímulo doloroso propuesto que consistía en un breve retorcijón en la piel de los dos muslos con unas pinzas de punta fina. Posteriormente se administró el extracto glandular y solución control a nivel subcutáneo y se realizó el estímulo doloroso descrito periódicamente, evaluando las siguientes manifestaciones de dolor: gesticulación de la cara, movimiento de retirada de las patas, movimiento de cola y chillido, anotando los resultados en una tabla. Se consideró

que el ratón presentaba dolor cuando tenía 3 o más manifestaciones de dolor, si presentaba solo dos manifestaciones se consideraba dolor si una de ellas era chillido.

La persona que realizaba el estímulo doloroso era distinta a la que evaluaba la respuesta al dolor y registraba los resultados.

### **3. Consideraciones éticas**

El estudio se diseñó teniendo en cuenta la Resolución Numero 8430 de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, especialmente el Título V; y adicionalmente teniendo en cuenta el Estatuto Nacional de Protección Animal, ley 84 de 1989 de Colombia, especialmente el capítulo VI, en el cual se regula el uso de animales vivos en experimentos o investigación, teniendo conflictos solamente con el artículo 24, y con el punto g. del artículo 87 de la Resolución Numero 8430, en los cuales hacen referencia a evitar el dolor en los animales sometidos a experimentación, sin embargo, teniendo en cuenta que la única forma de realizar el estudio y obtener resultados es administrando un pequeño estímulo doloroso, en una región pequeña y superficial del animal, bajo un protocolo determinado para evitar el daño y exceso de dolor, y considerando el potencial beneficio de los resultados experimentales para el avance biológico y potencialmente farmacológico, el estudio es justificable, siendo avalado por el comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia. (14)

## 4. Resultados

Se determinó que en el muslo izquierdo se administraría la solución control y en el muslo derecho el extracto glandular de *Rhodnius prolixus* (300 microlitros para cada prueba). En el primer ratón la solución control fue el buffer más los inhibidores de proteasas, verificando así que esta solución no tuviera efecto en la respuesta al dolor del individuo a estudio, en los demás ratones la solución control fue solución salina al 0.9%. De los 9 ratones elegidos inicialmente para el estudio se descartó uno, ya que presentaba movilidad excesiva, impidiendo interpretar la respuesta al dolor con exactitud.

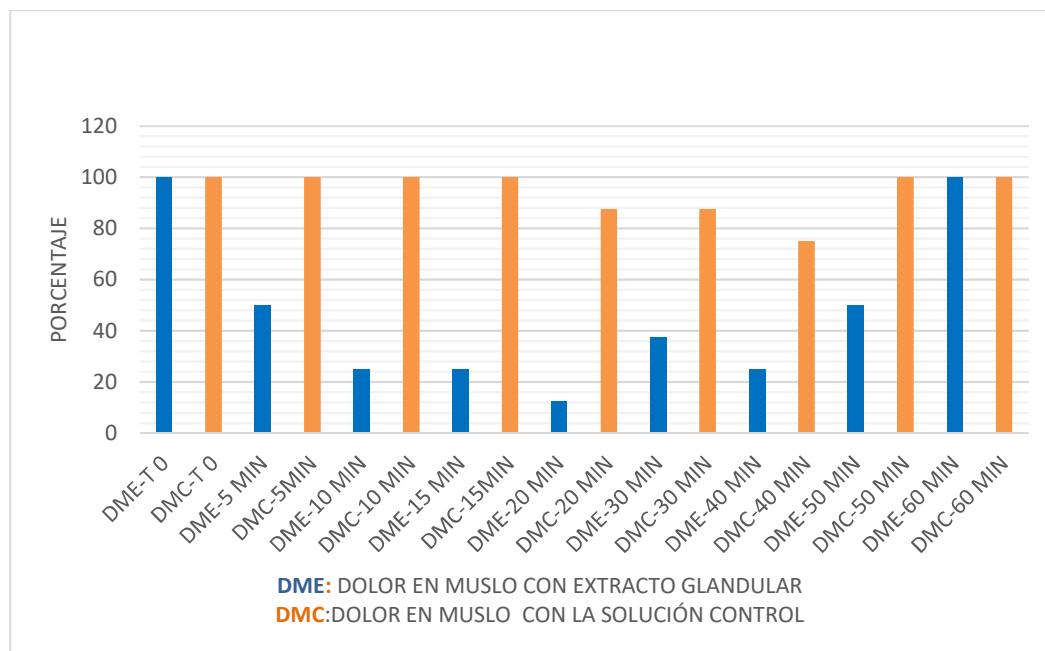
Se presentan los resultados obtenidos en las tablas 1 a 8 en el anexo A, determinando los tiempos en que se realizaban los estímulos dolorosos y la respuesta del ratón en cada uno de los muslos a estudio.

## 5. Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico con el programa Stata. Se resumen los datos en porcentaje de ratones que presentaron dolor en cada uno de los muslos a estudio para cada uno de los tiempos de estímulo (grafico 1). Adicionalmente, se utilizó el método diferencia de proporciones para evaluar el impacto del efecto anestésico del extracto glandular, estableciendo el intervalo de confianza 95% y la significación estadística con valor de P mediante la prueba estadística Z, los cuales se resumen en la tabla 2.

Finalmente se presenta la latencia y duración del efecto del extracto glandular como media con las desviaciones estándar respectivas en la tabla 3.

**Grafico 1.** Porcentaje de ratones que presentaron dolor en cada uno de los muslos a estudio según el tiempo de estímulo.





**Tabla 2.** Proporción y diferencia de proporción de presentación de dolor en los muslos a estudio para cada tiempo de estímulo.

Tiempo (min)	Prop DME	Prop DMC	Dif Prop	IC 95%	P
0	1	1			
5	0,5	1	-0,5	-0,84 a - 0,15	0,021
10	0,25	1	-0,75	-1.05 a - 0,44	0,02
15	0,25	1	-0,75	-1.05 a - 0,44	0,02
20	0,125	0,875	-0,75	-1.07 a - 0,43	0,03
30	0,375	0,875	-0,5	-0,9 a -0,09	0,039
40	0,25	0,75	-0,5	-0,92 a - 0,08	0,046
50	0,5	1	0,5	-0,84 a - 0,15	0,02
60	1	1			

Prop DME: proporción de dolor en muslo con extracto glandular, Prop DMC: proporción de dolor en muslo con solución control. Dif Prop: diferencia de proporción. IC: intervalo de confianza.

**Tabla 3.** Latencia y duración del efecto anestésico

	Media	Des. Estándar
Latencia	8,6 minutos	5,6 minutos
Duración	36,7 minutos	12,1 minutos

## 6. Discusión de resultados

Basado en la plausibilidad biológica y estudios preliminares que muestran un posible efecto anestésico local en la saliva de estos insectos hematófagos, se desarrolló este estudio experimental de laboratorio en modelo murino, evaluando la propiedad anestésica del extracto glandular salival.

En el estudio se puede ver claramente como hay una disminución de la respuesta al dolor en el muslo con extracto glandular en la mayoría de los ratones a estudio, solo en un roedor (ratón número 5) no se observó este efecto, probablemente debido a una inadecuada técnica de infiltración o problemas con el proceso de extracción glandular, sin embargo, estos resultados fueron incluidos en el análisis estadístico.

En el grafico número 1 se muestra mediante porcentajes el comportamiento de la respuesta al dolor a través del tiempo de estudio, observando entre el minuto 15 y 20 el efecto anestésico máximo; se calculó una latencia media del efecto de 8,6 minutos (Desv. Estándar 5,6 minutos) y una duración máxima media de 36,7 minutos (Desv. Estándar 12,1 minutos). Adicionalmente se calculó la diferencia de proporción de presentación de dolor para cada uno de los tiempos de estímulo, evaluando así el impacto del efecto anestésico del extracto glandular, con una diferencia de proporción máxima de -0,75 al minuto 10, IC 95% (-1.05 a -0,44),  $p=0,02$ , al minuto 15 de -0,75, IC 95% (-1.05 a -0,44),  $p=0,02$ , y al minuto 20 de -0,75, IC 95% (-1.07 a -0,43),  $p=0.03$ .

Uno de los planteamientos antes de iniciar el estudio era que la saliva de estos insectos tuviera un compuesto proteolítico o destructor de las estructuras nerviosas sensitivas, siendo este el mecanismo usado para no ser detectados, sin embargo, en el estudio vemos la recuperación de la respuesta al dolor posterior a la administración del extracto glandular,

comprobando así la capacidad de reversibilidad del efecto, asemejándose a los anestésicos locales conocidos actualmente.

## 7. Conclusiones

Teniendo en cuenta la característica indolora de la picadura de los insectos hematófagos Triatominos como una plausibilidad biológica, aunado a los estudios previos, en este estudio experimental se comprueba el efecto anestésico local del extracto glandular salival del hematófago *Rhodnius prolixus*.

No se encontraron reportes de estudios similares en la literatura, lo cual hace de este experimento el paso inicial en la posible caracterización y aislamiento de una nueva molécula anestésica local, incluso, podría ser el inicio de la investigación de otras propiedades farmacológicas de la saliva de estos insectos y su potencial uso en medicina.

# Bibliografía

1. Stark KR, James AA. The salivary glands of disease vectors. In: Beaty BJ, Marquardt WC, editors. The biology of disease vectors. Colorado: Colorado University Press. 1996. p. 333-48
2. Dan A, Pereira MH, Pesquero JL, Diotaiuti L, Beirão PS. Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) on sodium channels. *J Med Entomol.* 1999; 36(6) :875-9.
3. Flórez M, Niño R del P, Torres RG, Muñoz G. Angulo VM. Perfil electroforético de proteínas presentes en la saliva de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae:Triatominae). *Salud UIS* 2009; 41: 121-127
4. Pineda SS, Melgar S, Dorn PL, Agreda E, Rodas A, Monroy C. Salivary protein profiles distinguish triatomine species and populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol* 2008; 45(1): 52-8.
5. Santos A, Ribeiro JM, Lehane M, Figueiredo N, Botelho A, Sant'Anna M, et al. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). *Insect Biochem Mol Biol* 2007; 37:702-12
6. Flower DR, The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J.* 1996; 318 (Pt 1): 1–14.
7. Lerner EA, Ribeiro JM, Nelson RJ, Lerner MR. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem.* 1991; 266 (17): 11234-11236.
8. Arévalo A et al. 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 [online].* 2007; 27 (1). 119-129
9. Guhl F; Aguilera G; Pinto N, Vergara D. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. *Biomédica [online].* 2007; 27 (1): 143-162.
10. Gómez-Núñez JC. Mass rearing of *Rhodnius prolixus*. *Bull World Health Organ.* 1964; 31(4): 565–567.
11. Luz C, argues J, Grunewald J. Development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) under Constant and Cyclic Conditions of Temperature and Humidity . *Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online].* 1999; 94 (3): 403-409.

12. Osorio-Mesa E. Técnica para extraer cantidad apreciable de hemolinfa y sacar fácilmente glándulas salivales en ninfas de quinto estadio y adultos de *Rhodnius Prolixus*. Rev. Fac. Med. 1965; 33 (3): 87-91
13. Amino R, Porto RM, Chammas R, Egami MI, Schenkman S. Identification and characterization of a sialidase released by the salivary gland of the hematophagous insect *Triatoma infestans*. J Biol Chem. 1998; 273 (38): 24575-82.
14. ESTATUTO NACIONAL DE PROTECCIÓN ANIMAL. Ley 84 de 1989 – Colombia.











**Tabla 8-Ratón numero 8:**

T(min)	Glándulas salivales				Solución salina			
	G	C	P	T	G	C	T	P
0	SI	NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI
5	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI
10	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI
15	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI
20	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI
25	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI
30	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI
35	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI
40	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI
45	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI
50	NO	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI
55	SI	NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI
60	SI	NO	SI	SI	SI	SI	SI	SI