

COMUNICACIÓN BREVE

Patrones electroforéticos de hemoproteínas salivares (nitroforinas) de *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)

Andrea Arévalo ¹, Julio César Carranza ¹, Felipe Guhl ², Gustavo Adolfo Vallejo ¹

¹ Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia.

² Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical, Universidad de los Andes, Bogotá D.C., Colombia.

Introducción. La electroforesis de hemoproteínas salivares en geles de almidón es una técnica de reciente aplicación para diferenciar especies del género *Rhodnius* que poseen gran similitud fenotípica o para diferenciar subpoblaciones de la misma especie, separadas geográficamente. De las 15 especies de *Rhodnius* descritas en latinoamérica, por lo menos ocho han sido reportadas en el territorio colombiano.

Objetivo. Utilizar la electroforesis de hemoproteínas salivares para diferenciar *R. prolixus* de *R. colombiensis*, dos especies con similitud fenotípica cuyos ciclos doméstico y selvático se superponen en la cuenca alta del río Magdalena en la región Central de Colombia.

Materiales y Métodos. El contenido de las glándulas salivares de cada insecto se sometió a electroforesis en gel de almidón utilizando buffer de glicina y revelado de las bandas con 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. Los patrones de bandeos fueron registrados fotográficamente.

Resultados. Usando esta técnica se observaron los perfiles electroforéticos de las hemoproteínas salivares de *R. prolixus* y *R. colombiensis* los cuales permitieron su inequívoca diferenciación.

Conclusión. Estos resultados demuestran la utilidad de la técnica para la diferenciación entre *R. prolixus* y *R. colombiensis* en adición a métodos morfométricos y moleculares previamente utilizados para diferenciar estas dos especies.

Palabras clave: *Rhodnius*, Triatominae, saliva, Colombia.

Electrophoretic patterns of salivary hemeproteins (nitrophorines) of *Rhodnius colombiensis* and *R. prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)

Introduction. Salivary hemeprotein electrophoresis in starch gels is a recent technique used for differentiation of *Rhodnius* species with great phenotypic similarity. Furthermore, populations of the same species can be differentiated from geographically separated locales. Of the 15 described *Rhodnius* species in Latin America, at least eight have been reported in Colombia.

Objective. To use the salivary hemeproteins electrophoresis for *R. prolixus* and *R. colombiensis* identification. These two species are phenotypically similar and have overlapping domestic and sylvatic cycles where they occur in the upper basin of the Magdalena river, Central Colombia.

Material and methods. The content of salivary glands of each insect was subjected to starch gel electrophoresis using glycine buffer, and the bands were revealed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. Band patterns were photographically recorded.

Results. Electrophoretic patterns of salivary hemeproteins of *R. prolixus* and *R. colombiensis* were able to unequivocally differentiate the two species.

Conclusion. The usefulness of the starch gel technique for distinguishing between *R. prolixus* and *R. colombiensis* was demonstrated as an additional tool to the morphometric and molecular methods already in use for differentiation of these two species.

Key words: *Rhodnius*, Triatominae, saliva, Colombia.

La saliva de los insectos hematófagos presenta sustancias anticoagulantes, antihistamínicas, vasodilatorias y antiplaquetarias que facilitan el proceso de alimentación sobre el huésped vertebrado (1-4). En los triatominos se han encontrado varias sustancias relacionadas con estas funciones. En el caso del género *Rhodnius*, hasta el momento se han reportado ocho proteínas salivares: tres factores que contrarrestan la agregación plaquetaria, llamados inhibidores de agregación de *R. prolixus* (RPAI 1-3) (proteínas lipocalinas) (4,5); una apirasa que se encarga de hidrolizar el ADP bloqueando la agregación plaquetaria (4,6), y, por último, las nitroforinas (NPs), un grupo de cuatro hemoproteínas denominadas NP1 a NP4 según su relativa abundancia en las glándulas salivares (7). Las nitroforinas se pueden agrupar en dos conjuntos con base en las relaciones de sus secuencias de aminoácidos; es así como NP1 y NP4 son idénticas en un 90%, y NP2 y NP3 son idénticas en un 80% (4,7,8). Para *Cimex lectularius* de la familia Cimicidae se ha reportado otra nitroforina que, aun cuando no es significativamente similar a las de *R. prolixus* (familia Reduviidae), revelaría una evolución convergente entre estas hemoproteínas (9,10). En *Rhodnius*, las NP transportan óxido nítrico e histamina a través de su grupo hemo (Fe III), el cual es el sitio de enlace para ambas moléculas (4,11-14). El óxido nítrico permite la vasodilatación e inhibe la agregación plaquetaria (4,11,15). Por su parte, la unión de la histamina a las NP impide la respuesta de inflamación en el huésped vertebrado (4,12,13). La NP2 o prolixin-S se encarga de bloquear la cascada de coagulación, ya que evita que el factor X se convierta en el factor Xa (4,13,16). Por otro lado, se ha comprobado que las NP en *R. prolixus* son estadio específicas, es decir, que puede presentarse una o faltar otra de un estadio a otro. Es así como la NP2 está presente desde el primer

estadio ninfal (N1) hasta el adulto. En el primer estadio se han purificado, además, dos hemoproteínas salivares, la NP5 y la NP6, cuya cantidad va disminuyendo en las glándulas salivares con las mudas sucesivas hasta ausentarse en la fase adulta. En el segundo estadio (N2) aparece la NP4. En el tercer estadio ninfal (N3) se presenta la NP1. Por último, en el quinto estadio ninfal (N5) aparece la NP3, y a partir de este momento ya están presentes las cuatro nitroforinas, NP1 a NP4, que perduran en el adulto (17).

En el género *Rhodnius* existen varias especies epidemiológicamente importantes para la transmisión de los parásitos *T. cruzi* y *T. rangeli*. Según las características biológicas, ecológicas y etológicas de estos vectores, que suelen variar de una zona geográfica a otra, pueden considerarse como vectores primarios o secundarios, o estar en proceso de alcanzar este último nivel. Algunas especies del género *Rhodnius* suelen ser fenotípicamente similares y, además, ser simpátricas en algunas zonas geográficas. En los estudios de la epidemiología y la biología de los vectores y de los ciclos de transmisión de los parásitos *T. cruzi* y *T. rangeli*, así como en las encuestas entomológicas y en las campañas de control y prevención vectorial, se han utilizado diferentes tipos de técnicas que han permitido distinguir la mayoría de las especies pertenecientes a este género, entre ellos la morfología (18-20), las isoenzimas (21-23), la morfometría cuantitativa (23), el análisis cuantitativo de patrones de sensilias antenales (24), el análisis de secuencias de ADN mitocondrial (25,26) y el análisis de genitalia masculina (20,27); sin embargo, algunas veces no suelen ser muy efectivas, ya que no generan diferencias y, además, algunas son dispendiosas y muy costosas.

Mediante la electroforesis de hemoproteínas salivares es posible diferenciar especies fenotípicamente similares o poblaciones de una misma especie separadas por áreas geográficas (28,29). Además, los perfiles electroforéticos de las hemoproteínas pueden reflejar distancias biogeográficas entre poblaciones y revelar relaciones filogenéticas entre las especies (28).

Correspondencia:

Gustavo Adolfo Vallejo, Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia.

Fax (+57-8) 2669176.

gvallejo@ut.edu.co

Recibido: 23/03/06; aceptado: 08/09/06

Estas diferencias son considerablemente importantes para la epidemiología de los vectores de *T. cruzi* (30) y *T. rangeli*, y ayudan a identificar las especies relacionadas en el ciclo de transmisión de un área geográfica específica. Trabajos previos han mostrado que la diferenciación morfológica de *R. colombiensis* y *R. prolixus* no es fácil, tanto así que durante varios años a la especie *R. colombiensis* se le denominó *R. prolixus* "forma Tolima" (31); posteriormente, a partir de estudios de isoenzimas, genitalia y genes ribosomales, se concluyó que se trataba de una especie diferente hoy denominada como *R. colombiensis* (20, 32). En el presente trabajo se detectaron diferencias por medio de los patrones electroforéticos de hemoproteínas entre las especies *R. colombiensis* y *R. prolixus*, dos especies fenotípicamente similares y simpátricas, ya que sus ciclos selvático y doméstico se traslapan en la cuenca alta del Río Magdalena. Estas especies se han considerado vectores importantes para la transmisión de *T. cruzi* y *T. rangeli* en esa zona geográfica. *R. colombiensis* presenta prevalencias de *T. cruzi* y *T. rangeli* del 45 y 28,6%, respectivamente (datos no publicados), situación que configura un riesgo para la transmisión de *T. cruzi* por parte de este vector en la región central de Colombia.

Materiales y métodos

Insectos

Los triatominos fueron recolectados en el municipio de Coyaima, departamento del Tolima, Colombia. Los adultos de *R. colombiensis* fueron capturados en siete palmas de vino (*Attalea butyraceae*) y los de *R. prolixus* dentro de 10 viviendas humanas de las veredas Totarco Dinde y Chenche Cucal del municipio de Coyaima. Los insectos se mantuvieron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, con humedad relativa de 75 a 80% y una fotoperiodicidad de 12/12 horas en una incubadora automática B.O.D. Lab-Line, y fueron alimentados semanalmente sobre gallinas.

Para la determinación de las especies se utilizó la clave taxonómica de Lent & Wygodzinsky (1979) (18) y se realizó amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de genes ADN

siguiendo la metodología descrita por Jaramillo *et al.* 2001 (32).

Preparación de la muestra y electroforesis

Se disectaron 13 insectos adultos de *R. prolixus* y 13 de *R. colombiensis* y sus glándulas salivares fueron lavadas en solución salina estéril al 0,9%. Las glándulas salivares de cada insecto se maceraron y homogeneizaron con 10 ml de *buffer* de corrido (glicina 0,15 M/NaOH, pH 9,5). Una vez homogeneizadas, el contenido de las glándulas fue absorbido en hilos de algodón estériles de 0,9 cm y colocados en las canaletas del gel de almidón al 8% preparado con *buffer* de corrido (glicina 0,15M/NaOH, pH 9,5) diluido 1:10. La electroforesis se llevó a cabo a 300 voltios por cuatro horas. Para el revelado, los geles se sumergieron en una solución de 0,3 mg/ml de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina en una mezcla de etanol, ácido acético y agua en proporción 1:1:1. Luego se transfirieron a una solución de peróxido de hidrógeno al 2% hasta la aparición de las bandas (28,29). Con fines comparativos, se examinaron los patrones electroforéticos de las hemoproteínas de dos adultos de *R. pallenscens*.

El número de bandas generado en cada carril del gel fue determinado en el momento inicial en que se desarrolla la coloración, pues a medida que transcurre el tiempo, las bandas pierden resolución. A partir de las fotografías y del número de bandas observadas al inicio de la coloración se obtuvieron diagramas que representan el número de bandas en cada carril.

Análisis de datos

De conformidad con el análisis propuesto por Soares *et al.* (29), se calculó el índice de polimorfismo de hemoproteínas (P) para cada especie, $p = 1 - \frac{\sum(X^2)}{n}$, donde X es igual a la frecuencia absoluta de cada perfil de hemoproteínas en la especie sobre el número total de insectos examinados.

Resultados

El número de perfiles y el patrón de bandeo obtenido a través de la electroforesis de hemoproteínas salivares en geles delgados de almidón para *R. colombiensis* y *R. prolixus*

permitió establecer una clara diferencia entre las dos especies (figura 1 y 2). *R. prolixus* presentó cinco perfiles en el corrido electroforético, designados desde la A hasta la E en las figuras 1 y 2; por otro lado, *R. colombiensis* mostró tres perfiles (A, B y C) (figuras 1 y 2)

R. prolixus presentó un promedio de 3,1 bandas, con un máximo de cinco y un mínimo de dos; en *R. colombiensis* solamente se observaron dos bandas en todos los insectos examinados (figuras 1 y 2). Además, se observó que las hemoproteínas salivares de *R. colombiensis* tienen polaridad negativa, pues corrieron hacia el polo positivo. En *R. prolixus*, las hemoproteínas presentan carga positiva y negativa, pues en el corrido electroforético fue evidente una atracción hacia ambos polos (figura 1 y 2).

El índice de polimorfismo de las hemoproteínas salivares (p) para las dos especies estudiadas fue de $p = 0,7577$ en *R. prolixus* y en *R. colombiensis* de $p = 0,6156$.

Discusión

R. prolixus presentó un índice de polimorfismo de hemoproteínas (p) alto ($p = 0,7577$) con respecto a *R. colombiensis*, que presentó un índice inferior

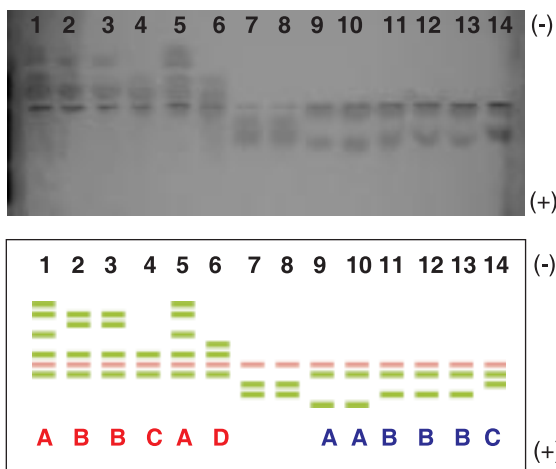


Figura 1. Electroforesis en gel delgado de almidón al 8% de hemoproteínas salivares de *R. prolixus* (canaletas 1 a 6), *R. pallescens* (canaletas 7 y 8) y *R. colombiensis* (canaletas 9 a 14). El panel inferior de la figura corresponde a un diagrama que representa las bandas del panel superior.

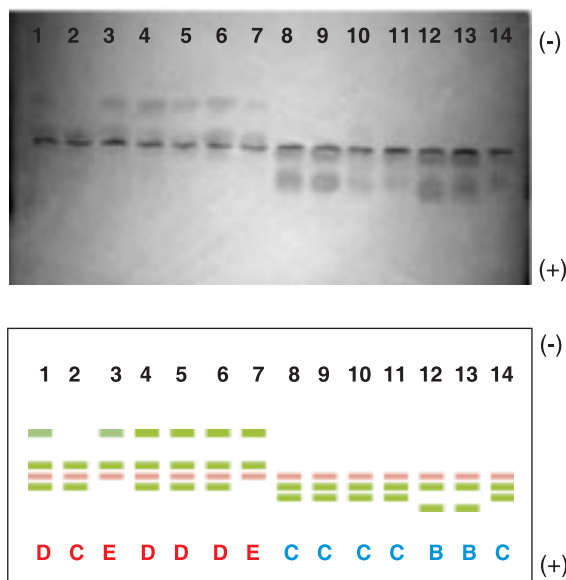


Figura 2. Electroforesis en gel delgado de almidón al 8% de hemoproteínas salivares de *R. prolixus* (canaletas 1 a 7) y *R. colombiensis* (canaletas 8 a 14). El panel inferior de la figura corresponde a un diagrama que representa las bandas del panel superior.

($p = 0,6156$). Para Soares *et al.*, (29) el índice de polimorfismo de *R. prolixus* presentó un valor $p = 0,7300$, inferior en $0,0277$ al valor obtenido para esta especie ($p = 0,7577$) en el presente trabajo. Es probable que esta diferencia se deba a la procedencia de ambas poblaciones, ya que la población utilizada por Soares *et al.* (29) era originaria de Venezuela, mientras que los *R. prolixus* utilizados en el presente estudio se recolectaron en la región central de Colombia. Por otro lado, los perfiles electroforéticos de las hemoproteínas pueden reflejar distancias biogeográficas entre las poblaciones estudiadas (28). El valor (p) de *R. colombiensis* ($p = 0,6156$) se acerca mucho al índice de polimorfismo de *R. pallescens* ($p = 0,6524$) (29), especies éstas morfológicamente similares (20,31). Estos valores estarían reflejando el parentesco filogenético entre estas dos especies pertenecientes al grupo “pallescens”, conformado por *R. pallescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis* que representa un *cline* evolutivo desde el norte de Colombia hasta el sur de la cordillera de los Andes, en donde finalmente se originó *R. ecuadoriensis* en el Ecuador y norte del Perú (31).

La electroforesis de hemoproteínas salivares es una técnica fácil y rápida que permite diferenciar especies del género *Rhodnius*, al cual pertenecen especies epidemiológicamente significativas en la transmisión de los parásitos *T. cruzi* y *T. rangeli* en muchas regiones de Colombia. Además, la técnica podría ser útil en casos en que no se pueda diferenciarlas debido a la similitud morfológica de las especies.

Por otro lado, podría ser una herramienta útil para los trabajos de encuestas entomológicas y en los programas de control y prevención vectorial, pues mediante ella se podrían identificar las especies de una manera fácil y rápida cuando se encuentren circulando en los ciclos de transmisión silvestre o doméstico en una región geográfica específica. Ello también sería útil cuando se van a emplear estrategias de control vectorial, ya que pueden existir especies silvestres que estén invadiendo las viviendas, como en el caso de *R. colombiensis* en la cuenca alta del río Magdalena (región central de Colombia), cuyas ninfas de cuarto, quinto estadio, hembras y machos han sido encontradas durante trabajos previos en viviendas y construcciones peridomiciliares de zonas en donde se adelantan programas de control tendientes a eliminar a *R. prolixus*, el principal vector domiciliado en Colombia (datos no publicados). La técnica de electroforesis de hemoproteínas es una herramienta que permite diferenciar especies de triatomíneos de una forma fácil, sin embargo, es importante durante el procedimiento de coloración registrar inmediatamente el número original de las bandas, pues la intensidad de las mismas va disminuyendo con el tiempo. En conclusión, estos resultados demuestran la utilidad de la técnica para la diferenciación entre *R. prolixus* y *R. colombiensis* y como complemento de métodos morfométricos y moleculares previamente utilizados para diferenciarlas.

Conflicto de intereses

El primer autor y los coautores del presente artículo declaramos que no teníamos conflictos de intereses de orden académico, institucional u operacional en el momento de realización de la investigación.

Financiación

Este trabajo recibió financiación del Instituto Colombiano "Francisco José de Caldas" (Colciencias), proyecto 105-05-279-99, y del Fondo de Investigaciones de la Universidad del Tolima. También recibió apoyo internacional de la Red ECLAT (European Community–Latin-American Network for Research on the Biology and Control of Triatominae).

Referencias

1. **Stark KR, James AA.** The salivary glands of disease vectors. En: Beaty BJ, Marquardt WC, editors. The biology of disease vectors. Colorado: Colorado University Press; 1996. p. 333-48.
2. **Ribeiro JM.** Role of saliva in blood feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol* 1987;32:463-78.
3. **Law JH, Ribeiro JM, Wells MA.** Biochemical insights derived from diversity in insects. *Annu Rev Biochem* 1992;61:87-111.
4. **Montfort WR, Weichsel A, Andersen JF.** Nitroforins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:110-8.
5. **Francischetti IM, Ribeiro JM, Champagne D, Andersen J.** Purification, cloning, expression and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem* 2000;275:12639-50.
6. **Sarkis JJ, Guimarães JA, Ribeiro JM.** Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. Kinetics and purification. *Biochem J* 1986;233:885-91.
7. **Champagne DE, Nussenzveig RH, Ribeiro JM.** Purification, partial characterization and cloning of nitric oxide-carrying hemeproteins (nitroforins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem* 1995;270:8691-5.
8. **Andersen JF, Montfort WR.** The crystal structure of Nitroforin 2. A trifunctional antihemostatic protein from the saliva of *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem* 2000;275:30496-503.
9. **Valenzuela JG, Walker FA, Ribeiro JM.** A salivary nitroforin (nitric-oxide-carrying hemoprotein) in the bedbug *Cimex lectularius*. *J Exp Biol* 1995;198:1519-26.
10. **Valenzuela JG, Ribeiro JM.** Purification and cloning of the salivary nitroforin from the hemipteran *Cimex lectularius*. *J Exp Biol* 1998;201:2659-64.
11. **Ribeiro JM, Hazzard JM, Nussenzveig RH, Champagne DE, Walker FA.** Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science* 1993;260:539-41.

12. **Ribeiro JM, Walker FA.** High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. *J Exp Med* 1994;180:2251-7.
13. **Ascenzi P, Nardini M, Bolognesi M, Montfort WR.** Nitrophorins. Lipocalin-based heme proteins transporting nitric oxide. *Biochem Mol Biol Educ* 2002;30:68-71.
14. **Walker FA.** Nitric oxide interaction with insect nitrophorins and thoughts on the electron configuration of the {FeNO}⁶ complex. *J Inorg Biochem* 2005;99: 216-36.
15. **Moncada S, Radomski MW, Palmer RM.** Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* 1988;37:2495-501.
16. **Ribeiro JM, Schneider M, Guimarães JA.** Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochem J* 1995;308:243-9.
17. **Moreira FM, Coelho HS, Zingali RB, Oliveira PL, Masuda H.** Changes in salivary nitrophorin profile during the life cycle of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol* 2003;33:23-8.
18. **Lent H, Wygodzinsky P.** Revision of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 1979;163:123-520.
19. **Carcavallo R, Galíndez I, Jurberg J, Lent H.** Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas. Río de Janeiro: Editora Fiocruz; 1998. p.53-72.
20. **Moreno J, Galvão C, Jurberg J.** *Rhodnius colombiensis* sp. n. da Colômbia com quadros comparativos entre estruturas fállicas do gênero *Rhodnius* Stal. 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol Vect* 1999;6:601-17.
21. **Harry M, Galíndez I, Cariou ML.** Isoenzyme variability and differentiation between *Rhodnius prolixus*, *R. robustus* and *R. pictipes*, vectors of Chagas disease in Venezuela. *Med Vet Entomol* 1992;6:37-43.
22. **Chavez T, Moreno J, Dujardin JP.** Isoenzyme electrophoresis of *Rhodnius* species: a phenetic approach to relationships within the genus. *Ann Trop Med Parasitol* 1999;93:299-307.
23. **Dujardin JP, Chavez T, Moreno JM, Machane M, Noireau F, Schofield CJ.** Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *J Med Entomol* 1999;36:653-9.
24. **Catalá S, Schofield C.** Antennal sensilla of *Rhodnius*. *J Morphol* 1994;219:193-203.
25. **Stothard JR, Yamamoto Y, Cherchi A, Garcia AL, Valente SA, Schofield CJ, et al.** A preliminary survey of mitochondrial DNA sequence variation in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) using polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing. *Bull Entomol Res* 1998;88:553-60.
26. **Lyman DF, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM, Dujardin JP, et al.** Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:377-86.
27. **Jurberg J.** Uma abordagem filogenética entre os Triatomíneos baseada nas estruturas fállicas. In: Schofield CJ, Dujardin JP, Jurberg J, editors. *Proceedings of the International Workshop on Population Biology and Control of Triatominae*, Santo Domingo de los Colorados, Ecuador. Mexico D.F: INDRE; 1996. p.45-50.
28. **Soares RP, Gontijo NF, Romanha AJ, Diotaiuti L, Pereira MH.** Salivary heme proteins distinguish *Rhodnius prolixus* from *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Acta Trop* 1998;71:285-91.
29. **Soares RP, Sant'Anna MR, Gontijo NF, Romanha AJ, Diotaiuti L, Pereira MH.** Identification of morphologically similar *Rhodnius* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins. *Am J Trop Med Hyg* 2000;62:157-61.
30. **WHO.** Control of Chagas' disease. Geneva: World Health Organ Tech Rep Ser. 811; 1991. p.95.
31. **Schofield CJ, Dujardin JP.** Theories on the evolution of *Rhodnius*. *Actualidades Biológicas* 1999;21:183-97.
32. **Jaramillo C, Montaña MF, Castro LR, Vallejo GA, Guhl F.** Differentiation and genetic analysis of *Rhodnius prolixus* and *Rhodnius colombiensis* by rDNA and RAPD amplification. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:1043-8.