ARTÍCULO ORIGINAL

Determinación del estadio ninfal y la edad reproductiva de la hembra de *Rhodnius prolixus*, Stal 1859 (Heteroptera, Triatominae) por medio de Resonancia Magnética Nuclear

ELIS ALDANA*, MAIRA MORENO-GARCÍA*, SONIA KOTEICH-KHATIB** y ALÍ BAHASAS**

INSTAR AND FEMALE REPRODUCTIVE AGES OF *Rhodnius prolixus* BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE

*The quantitative and qualitative chemical composition of a benzene extract from **Rhodnius prolixus** females at different nymphal state and at different reproductive ages were determined, using uni- and bi-dimensional NMR techniques. The chemical compounds present in the mixture were classified as A, B and C, according to their NMR chemical shifts. Compound A has signals in the range of δ 5.0 and 5.33 ppm, which is attributed to olefinic hydrogen and is found in all nymphal states and reproductive ages, therefore is not of utility as an age marker. Compound C located between δ 2.5 and 3.5 could be attributed to hydrogen over nitrogen-bearing carbons, is very useful as an age marker to differentiate between the nymphal states and the beginning of the adult age. While compound B showing signals between δ 4.0 and 5.0 ppm was identified as tri-acylglycerol, is an important marker to differentiate between non-ovipositor and ovipositor females, since this last age has none of this compound. It is also very useful to use the concentrations ratio of compound A relative to B, which is given by the ratio of their integrals, to establish the age difference of the nymphal states. We propose this technique to determine the nymphal states and the reproductive age of **R. prolixus** females, in a sample of triatomine collected at field conditions, which reveals an important information on the variables related to vector efficiency in Chagas disease.*

Key words: *Rhodnius prolixus*, Enfermedad de Chagas, RMN, HMQC, HMBC.

INTRODUCCIÓN

Rhodnius prolixus Stal 1859, es el vector principal de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. Esta especie aunque predominantemente domiciliaria ha sido encontrada también

en los géneros de palma *Attalea* Spruce and *Acrocomia* Mart, y afecta a la población que vive en condiciones de pobreza en el medio rural venezolano^{1,2}. La importancia del estudio de esta enfermedad reside en que se han reportado 800.000 casos en Latinoamérica, con una

* Laboratorio de Entomología "Herman Lent". Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Núcleo. La Hechicera. Universidad de los Andes. Mérida 5101. Venezuela Fax 58274.2401286. E-mail: aldanala.ve. Correspondencia a Dr. Elis Aldana.

** Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear. Departamento de Química, Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Mérida - Venezuela.

incidencia anual de 22.960³. Según la Organización Mundial de la Salud, si se ataca directamente al vector se podría erradicar esta enfermedad para el 2010⁴.

Uno de los factores que determina el potencial vectorial de los triatominos es la tasa de mortalidad/supervivencia, lo cual es dependiente de la estructura de edades del insecto. La composición química cambia conforme el insecto se desarrolla, por lo que si conocemos dicha composición podríamos entonces conocer el estadio ninfal y la edad reproductiva de las hembras.

Se han empleado varias técnicas para conocer la naturaleza de los compuestos químicos en los triatominos, como cromatografía⁵, espectrometría de masa⁶ y microscopía electrónica⁷. Hasta donde nuestra revisión ha podido encontrar, no se ha empleado la RMN para determinar la naturaleza de los compuestos químicos según la edad de los triatominos, aunque en otros insectos vectores hematófagos como *Aedes aegypti*, se ha propuesto a la abundancia relativa de cosanos para determinar la edad del insecto⁸. Sin embargo, estos autores no describen la técnica de análisis empleada. En el presente trabajo se propone un método simple y novedoso como la RMN 1D y 2D para la identificación de compuestos en los distintos estadios ninfales y edades reproductivas de las hembras.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material entomológico: Los insectos estudiados provenían de una colonia mantenida a 29° C y 50-60% de humedad relativa, alimentados sobre gallina. Se emplearon ninfas en ayunas de I estadio, de hasta una semana después de la eclosión. Se emplearon ninfas también en ayunas del II, III, IV y V estadio de siete a catorce días después de la muda del estadio anterior. Para la obtención de hembras en diferentes edades reproductivas se procedió de la siguiente manera: a partir de un lote de ninfas de V estadio, se separaron machos de hembras según la morfología de la genitalia externa, de tal manera que cuando ocurriera la muda a adulto, se pudieran obtener adultas vírgenes. De un lote de cien hembras vírgenes, cincuenta fueron mantenidas en ayunas sin la presencia de los machos (hembras no ovipositoras HNO) y cincuenta fueron apareadas, dos machos por

hembra (hembras ovipositoras HO), y alimentadas sobre gallina para asegurar que se convirtieran en hembras ovipositoras. Así fueron obtenidas hembras en dos edades reproductivas: no ovipositoras (HNO) y ovipositoras (HO).

2.- Extractos: Los extractos fueron obtenidos a partir de un lote de cien ejemplares en el caso de los estadios ninfales y de cincuenta ejemplares de cada edad reproductiva de las hembras. Los lotes fueron mantenidos separadamente en benceno durante una semana, luego fueron filtrados usando papel de filtro y evaporados en un rotavapor hasta sequedad. El extracto fue disuelto en CDCl₃ para realizar los espectros.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran los espectros ¹H-NMR de los cinco estadios ninfales. En ellos se distinguen tres clases de compuestos que llamaremos A, B y C. Un compuesto A, con características de un alqueno, presenta una señal con un desplazamiento químico de δ 5.33 ppm debido al doble enlace. De este compuesto se revelan otras señales en el espectro, una de ellas aparece a δ 2.00 ppm, y corresponde a los hidrógenos alílicos, y la otra aparece entre δ 1,80 y 0,70 ppm. El compuesto A está presente en todos los estadios ninfales. Un segundo compuesto B que muestra tres señales a: δ 5,30-4,00 ppm, δ 2,30 ppm y a δ 1,80-0,60 ppm. Estas tres señales podrían ser consideradas como un sistema de espines A_2B_2X ($J_{AB} = 12$ Hz, $J_{AX} = J_{BX} = 4,7$ Hz). Hay además una mezcla de varios compuestos con similares características y que presentan unas señales en el intervalo δ 3,2-2,8 ppm, a lo que llamaremos C.

En la región δ 1,8-0,6 ppm aparecen varias señales correspondientes a una mezcla de compuestos que no son de interés para el análisis, puesto que todos los compuestos de la mezcla presentan señales en esa zona.

Por otro lado, podemos observar que para cada uno de los estadios hay una ligera disminución de la intensidad de la señal del compuesto B respecto al A, mientras que la forma de la señal que aparece a δ 2,3 ppm comienza a cambiar a partir del quinto estadio. De esta manera, es posible determinar las diferentes edades basados en las relaciones de concentración de B respecto a A. También se puede diferenciar

Figura 1.

Figura 2.

entre el quinto estadio y la edad reproductiva HNO por la desaparición del compuesto C. Finalmente, las diferentes edades reproductivas pueden ser diferenciadas por la desaparición del compuesto B.

La traza inferior de la Figura 2, muestra el espectro ^{13}C -desacoplado del estadio ninfal I, y la traza superior muestra el espectro DEPT-135. La señal fase-positiva del espectro DEPT-135 corresponde a los carbonos metinos (CH) y

metilos (CH_3), mientras que las señales de las fases-negativas corresponden a los grupos metilenos (CH_2). Las señales correspondientes a los carbonos metinos de la olefina A aparecen alrededor de δ 130 ppm, mientras que las señales correspondientes a los carbonos metilenos del compuesto A aparecen en la región δ 36-22 ppm. Estas señales aparecen solapadas con otras señales de metilenos de otros compuestos presentes en la mezcla. En el mismo espectro aparecen otros tres grupos de señales: uno entre δ 170-175 ppm, correspondientes a tres grupos carbonilos ($\text{C}=\text{O}$), otro aparece con dos señales entre δ 60-70 ppm ($\text{R}-\text{CH}_2\text{O}-$ y $\text{R}_2\text{CH}-\text{O}-$) y el tercero aparece con tres señales correspondientes a los carbonos metilenos α a carbonilos en el intervalo δ 34,2-33,9 ppm. Estos grupos de señales correspondientes al compuesto B están correlacionados con las señales de ^1H en el espectro 2D (HMQC), Figura 3.

El espectro HMQC, Figura 3, está graficado con las proyecciones de los espectros DEPT-135 en el eje vertical y el de ^1H en el eje horizontal, ésto es debido a que ambas técnicas HMQC y DEPT-135 son correlaciones directas

entre carbono e hidrógeno a un enlace. En este espectro podemos apreciar cuatro regiones importantes, clasificadas de acuerdo a los grupos funcionales presentes en los diferentes compuestos de la mezcla. Una región olefínica marcada con (a), de acuerdo a lo descrito anteriormente para el Compuesto A, una segunda región (b) correspondiente a los hidrógenos del sistema ABX que están unidos a carbonos oxigenados del compuesto B, una tercera región

Figura 3.

Figura 4.

(c) para carbonos nitrogenados en la mezcla de los compuestos C, y por último una región alifática (e) que corresponde a señales de todos los compuestos presentes en la mezcla.

El espectro HMBC, Figura 4 es muy útil para establecer las conexiones de todos los fragmentos de las diferentes moléculas que conforman la mezcla. En este espectro es posible apreciar la correlación entre los grupos carbonilos con los hidrógenos del sistema ABX mencionado anteriormente a través de una señal cruzada marcada con b_1 . Estos carbonos carbonílicos simultáneamente se correlacionan con sus respectivos hidrógenos α , ubicados a δ 2,3 ppm a una distancia de dos enlaces, marcada con b_2 y también a los hidrógenos α ubicados a δ 1,6 ppm, marcada con la letra b_3 . De igual manera, podemos correlacionar la señal del grupo metino oxigenado ubicado a δ 76,7 ppm con los cuatro hidrógenos de los dos metilenos marcados como b_4 , que son la parte AB del los dos sistemas de espines ABX. Mientras que los dos carbonos metilénicos oxigenados enlazados a los protones del sistema AB ubicados a δ 62,1 ppm están correlacionados a dos enlaces con el hidrógeno X del sistema ABX, esta correlación cruzada está marcada como b_5 . En este punto es importante resaltar la existencia de dos sistemas AB conectados al protón X en lugar de un simple sistema ABX, esto se puede deducir de la integración de las señales de los protones de los sistemas en el espectro ^1H , y de la correlación cruzada mutua a tres enlaces de los 2 carbonos

Figura 5.

Figura 6.

a δ 62,1 ppm con las señales de A y B marcadas con b_6 .

La combinación de todos los espectros nos permite establecer las conexiones entre los diferentes grupos en cada una de las moléculas presentes en la mezcla. De esta manera, se puede ver que los sistemas ABX del compuesto B forman parte de una cadena hidrocarbonada larga. De igual forma, el compuesto A que posee un doble

enlace es también una cadena larga. Mientras que los compuestos C parecieran ser moléculas cíclicas pequeñas. En este trabajo, sólo presentamos la elucidación de la estructura del compuesto B, la cual corresponde al tri-acilglicerol.

Los compuestos asignados con la letra C tienen varias señales en la región δ 3,20-2,80 ppm, y los desplazamientos químicos correspondientes a los carbonos aparecen entre δ 58,0 y 52,0 ppm. Las correlaciones ^1H - ^{13}C pueden ser observadas en el la ampliación de la zona (c) del espectro HMQC en la Figura 3, y se atribuyen a carbonos metínicos nitrogenados de 4 pares de compuestos de similar estructura, con una relación estequiométrica de 3:4:2:6. Estos compuestos serán usados en este trabajo como marcadores de edad para determinar el fin de la edad ninfal, pero no se elucidarán sus estructuras. Las estructuras de estos compuestos no son relevantes en esta etapa del trabajo, pero si en futuras comunicaciones.

Comparando los espectros ^1H para diferentes estadios ninfales y edades reproductivas en la Figura 5 podemos apreciar la desaparición de los compuestos C después del quinto estadio ninfal. Por lo tanto, la ausencia de estos compuestos es indicativa del comienzo de la edad adulta. Por otro lado, se aprecia una disminución en la relación de la

concentración del compuesto B con respecto al compuesto A, hasta la desaparición del primero en las hembras ovíparas (HO), que es indicativa de una nueva edad reproductiva de la hembra. En el último espectro de la Figura 5 no hay rastro del compuesto B, pero en su lugar aparece una nueva señal, la cual puede ser su derivado y se le asignó la letra D. Este compuesto tiene características de un ácido carboxílico.

En este trabajo se demuestra las modificaciones de la composición química de un compuesto éster a ácido carboxílico a medida que el insecto se desarrolla, lo cual se puede apreciar en la región δ 2,38-2,26 ppm del estadio ninfal I comparado con HNO y HO, esto está representado en la zona expandida del espectro ^1H de la Figura 6 y que corresponde a las señales de los metilenos α a los carbonilos. Considerando que el tri-acilglicerol es una fuente de energía para el triatomo, es razonable suponer que éste es consumido durante la etapa de crecimiento y fecundación. Es importante resaltar que el objetivo de este trabajo es sólo describir la diferencia en la composición química de los compuestos para cada uno de los estadios ninfales y edades reproductivas y no el mecanismo de su formación o su modificación.

La capacidad vectorial de los triatomos en la transmisión de la Enfermedad de Chagas es afectada por varios factores, entre ellos se pueden mencionar la supervivencia y la tasa de picada. La tasa de supervivencia puede ser conocida a través de la estructura de edades. Las edades reproductivas de las hembras son un componente de la estructura de edades. Diferentes estadios ninfales o edades adultas tienen tasa de picadas diferentes; así por ejemplo cuanto más avanzado es el estadio ninfal, el insecto requiere mayor número de ingestas para pasar al siguiente estadio. Dado que la ingesta y la transmisión del agente etiológico de la Enfermedad de Chagas son dos eventos relacionados, el conocimiento de la composición química por estadio ninfal o edad de las adultas, revela información de interés sobre la capacidad vectorial de una población de triatomos en un instante determinado. Podemos concluir que la técnica de RMN es muy útil para la identificación de compuestos que podrían ser usados como marcadores de los estadios ninfales y edad reproductiva de la hembra.

RESUMEN

En este trabajo se determinó cualitativa y cuantitativamente la composición química de un extracto en benceno de ejemplares de *Rhodnius prolixus* en diferentes estadios ninfales y edades reproductivas de las hembras. El análisis fue realizado mediante técnicas uni- y bidimensionales (1D y 2D) de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Se han clasificado los compuestos químicos presentes en el extracto como A, B y C, según sus zonas de desplazamiento químico.

El compuesto A, situado en la zona entre δ 5,0 y 5,33 ppm, puede ser atribuido a hidrógenos olefínicos (alquenos) y está presente en todo los estadios ninfales y edades reproductivas, por lo que no es de utilidad para ser marcador de edades. El Compuesto C, situado en la zona entre 2,5 ppm y 3,5 ppm, representa distintas señales las cuales presumiblemente según sus desplazamientos químicos corresponden a hidrógenos sobre carbonos nitrogenados y sirve como marcador de edad para diferenciar entre los estadios ninfales y el comienzo de la edad adulta. El Compuesto B, presente en la zona entre 4 y 5 ppm, corresponde a un triacilglicerol, y es un marcador importante para diferenciar entre las hembras no ovipositoras (HNO) y ovipositoras (HO), ya que esta última edad carece de este compuesto. También es útil usar la relación de concentraciones de los compuestos A y B, que viene dada por la integral de la señal para determinar la diferencia de edades entre los estadios ninfales. Se proponen estas técnicas para determinar los estadios ninfales y las edades reproductivas de las hembras en una muestra de triatomos colectados en condiciones de campo, lo que revelaría información importante para conocer algunas de las variables de las que depende la capacidad vectorial de estos insectos en la transmisión de la Enfermedad de Chagas.

REFERENCIAS

- 1.- FELICIANGELI D, TORREALBA J W. Observaciones sobre *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) en su biotopo silvestre *Copernicia tectorum*. Bol Dir Mal San Amb 1977; 17: 198-205.
- 2.- GÓMEZ-NÚÑEZ J. Resting places, dispersal and survival of co-tagged adult *Rhodnius prolixus*. J Med Ent 1969; 6: 83-6.
- 3.- SCHOFIELD C, DUJARDIN P. Chagas disease vector control in Central America. Parasitology Today 1997; 13: 141-4.
- 4.- VISSCHEDIJK J, SIMÉANT S. Targets for health for all in the 21st Century. Wld. Hlth. Statil. Quart 1998; 51: 56-67.
- 5.- BERTELLO L, CANAVOSO L, RUBIOLO E, LEDERKREMER R. Fatty acids composition of diacylglycerols and triacylglycerols in the fat body from *Trypanosoma cruzi* vectors at different times of staryation. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91: 138.
- 6.- JUÁREZ P, BLOMQUIST G, SCHOFIELD C. Hydrocarbons of *Rhodnius prolixus*, a Chagas Disease Vector Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2001; 129: 733-46.
- 7.- JEREMY P, CANDY, SMITH N. Lipid storage and changes during flight by Triatomine bugs (*R. prolixus* and *Triatoma infestans*) J Insect Physiol 1982; 28: 527-34.
- 8.- EDMAN J D, CLARK J C, HARRINGTON L C, SCOTT T W. Estimation of mosquito mortality under natural field conditions. 3rd International Congress of Vector Ecology 2001: Barcelona, Spain.

Agradecimientos: A Eliécer Lizano por el mantenimiento de las colonias de triatomos.