

## Encuentro con *Rhodnius prolixus* y su sistema excretor

Ricardo Montoreano



### RESUMEN

#### Encuentro con *Rhodnius prolixus* y su sistema excretor

El *Rhodnius prolixus* (chipo) es uno de los vectores del *Trypanosoma cruzi* ya que sus deyecciones pueden contener las formas metacíclicas del parásito, transmitiendo la enfermedad de Chagas. Más allá de su relación con la enfermedad, resulta de interés reconocer y admirar la sencillez y eficacia de su sistema excretor que le permite eliminar, en pocas horas, gran parte del agua y las sales contenidas en la sangre succionada. En este artículo se relata el encuentro que tuvo Charles Darwin con las "benchugas" en 1835 y se describe cómo el insecto puede aumentar 10 veces su peso después de ser colocado ante un alimentador con sangre humana heparinizada a 37 °C y cómo la sangre puede ser reemplaza por Ringer + ATP. La excreción está regulada por la acción de las hormonas diurética y serotonina, actuando en forma sinérgica. Estas co-hormonas tiene como segundo mensajero al AMPc y es posible encontrar al péptido en la orina y heces del *R. prolixus* así como en el fluido producido por los túbulos de Malpighi. El AMPc podría ser un factor inductor de la metaciclogénesis del *T. cruzi*, completando el ciclo del parásito. Por su parte, la serotonina también actúa ablandando la unión de las placas cuticulares del insecto, permitiendo la distensión de su abdomen durante la ingestión de sangre o Ringer y su acción puede ser inhibida por antagonistas. En este artículo se describe un método para demostrar en el insecto entero la acción de la serotonina y los antagonistas sobre los túbulos de Mailpighi. El *R. prolixus* inyecta, para facilitar su ingesta de sangre, dadores de óxido nítrico, el que actúa como vasodilatador y antiagregante plaquetario. El *R. prolixus* es, entonces, un excelente modelo que permite, mediante un simple ejercicio de fisiología comparada, comprender mecanismos fisiológicos del hombre y otros animales más evolucionados.

**Palabras clave:** *Rhodnius prolixus*, AMPc, túbulos de Malpighi, *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, 5-hidroxitriptamina.

### ABSTRACT

#### Encounter with *Rhodnius prolixus* and its excretory system

*Rhodnius prolixus* (chipo) is one of *Trypanosoma cruzi*'s vectors since its dejections can contain the metacyclic forms of the parasite and transmit Chagas' disease. Beyond its relationship with the disease, it is interesting to know and to admire the simplicity and efficiency of its excretory system, which is able to excrete, in a few hours, most water and salts from the ingested blood. In this article, we relate Charles Darwin's encounter with the "benchugas" in 1835 and describe how the insect can increase 10 times its body weight after being allowed access to a feeder with heparinised blood at 37°, and how the blood can be replaced by Ringer + ATP. Excretion is regulated by the diuretic and serotonin hormones, which work as co-hormones. They have cAMP as second messenger and the peptide can be found in the *R. prolixus*' faeces and urine and in the fluid secreted by de Malpighian tubules. cAMP could be an inducer of the *T. cruzi* metacyclogenesis, thus completing the parasite cycle. Serotonin also acts by softening the attachment of cuticular plaques to the epidermis, thus permitting abdomen distention during the ingestion of blood or Ringer. Antagonists can inhibit the serotonin action. Here, we describe a method to demonstrate the action of serotonin and its antagonists on Malpighian tubules in the whole insect. In order to facilitate blood intake, the *R. prolixus* injects nitric oxide, which acts as a vasodilator and platelet antiaggregant. According to this, the *R. prolixus* is an excellent model that allows, by a simple exercise of comparative physiology, to gain insight into physiological mechanisms of more evolved animals as well as man's.

**Key words:** *Rhodnius prolixus*, cAMP, Malpighian tubules, *Trypanosoma cruzi*, 5-hydroxytryptamine, Chagas' disease.

Centro de Investigaciones Biomédicas,  
Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo  
BIOMED. Final Calle Cecilio Acosta, La Rinconada  
Maracay, Estado Aragua., Venezuela

e-mail: rmont@net-uno.net

Fax: 58-243-242.5333. - Tel: 58-243-242.5822

**Recibido:** Octubre 2002 • **Aprobado:** Febrero 2003

### Advertencia

Cualquier médico (y yo no fui la excepción) que analice la fisiología del *Rhodnius prolixus* no puede dejar de asombrarse de su simplicidad y eficacia y mucho menos escapar a la seducción de comparar lo que ocurre en el “chipo” con lo que ocurre en los mamíferos y particularmente en el hombre. Es posible en mi caso que haya habido, al inicio al menos, una vinculación pragmática porque el *R. prolixus* es uno de los vectores del *Trypanosoma cruzi* y de la enfermedad de Chagas, pero el interés sobre la fisiología del insecto fue mucho más allá. El hombre usa sus riñones para excretar más o menos agua y solutos y así mantener un medio interno constante y su esfuerzo máximo lo hace evitando la deshidratación. El sistema excretor del *R. prolixus* lucha, al principio, por liberarse de la enorme cantidad de agua y sales que ingiere con cada comida y, más tarde, en las largas temporadas que pasa sin comer, en conservar una cantidad de agua mínima y evitar la deshidratación. Como yo ya hice este ejercicio de fisiología comparada, me parece oportuno compartirlo con los médicos y estudiantes de ciencias de la salud para mostrarles algunos de los hechos maravillosos que ocurren en la naturaleza y que nuestros programas de estudios ni siquiera mencionan. Pido disculpas a los entomólogos y a los verdaderos fisiólogos de insectos por lo que puede ser una visión simplista, pero de ninguna manera mi intención es entrar en sus campos. Debo aclarar también que cuando hable del hombre no sólo me referiré al *Homo sapiens* sino a casi todos los mamíferos y a otras especies evolucionadas que compartan muchos de los aspectos de su fisiología. Del mismo modo, al hablar del *R. prolixus* me estaré refiriendo a los insectos, en especial a los hematófagos.

### El *Rhodnius* como insecto hematófago

Recuerdo dos descripciones muy llamativas sobre la ingesta de sangre en estos insectos. La primera es de Charles Darwin que relata su encuentro con las “**benchugas**” (~~vinchucas~~ *Triatoma infestans*), pariente sureño de nuestro chipo: ... “A la noche experimentamos un ataque (no merece otro nombre) de *Benchuga*, una especie de *Reduvius*, la gran chinche negra de las pampas. Es desagradable sentir a este insecto blando y sin alas, de una pulgada de largo, arrastrándose sobre su propio cuerpo. Antes de chupar es

bastante delgado, pero después se hace redondo y lleno de sangre... Cuando lo colocamos en una mesa y a pesar de estar rodeado de gente, si se le aproxima un dedo, el insecto inmediatamente protruye su “sucker”, realiza un carga y, si se lo permiten, chupa sangre. No hay dolor. Es curioso ver su cuerpo durante el acto de chupar: su cuerpo, plano como una oblea, toma la forma globular. Esta fue una fiesta de la cual la benchuga quedó en deuda con uno de los oficiales, quedando gorda por meses enteros pero, a las 2 semanas, está lista para una nueva chupada”. Charles Darwin en “The voyage of the Baegle” Capítulo 15 (Marzo 25, 1835)(9) En la Fig. 1 se muestra algo parecido a lo que relata Darwin, pero en una fotografía obtenida en el laboratorio

La otra descripción, también muy gráfica, es la que hizo un estudiante sobre cómo pica el chipo: “En el silencio de la noche, el chipo se desliza por el techo de palma del rancho para dejarse caer sobre su víctima, allí comienza a chupar su sangre y a defecar y ¡zap..! se infecta”. (autor anónimo, 1999).



FIGURA 1. A la izquierda, una ninfa del V estadio de *R. prolixus* en ayunas por 45 días. A la derecha, igual pero después de 30 min de alimentación con sangre humana

### Las curvas de peso del *Rhodnius prolixus*

Como las simples descripciones ya no sirven, ahora es cuestión de ver a un *R. prolixus* alimentarse en el laboratorio. La gran avidez del *R. prolixus* hace que sea fácil alimentarlos usando un sencillo equipo: un tubo con sangre heparinizada mantenida a 37 °C y una membrana (látex: un trozo de condón o de plástico: un parafilm estirado) y seguir su peso (en grupos de 10, por ejemplo) con una balanza. Usamos ninfas del V estadio de *R. prolixus* (último estadio no-alado del insecto - ver nota al pie) y su peso, que en ayunas es de unos 30 mg, pasa a casi 400 mg luego de 30 minutos de alimentarse con sangre de

mamífero (que generalmente fue de un sufrido compañero de laboratorio). (Fig. 2)

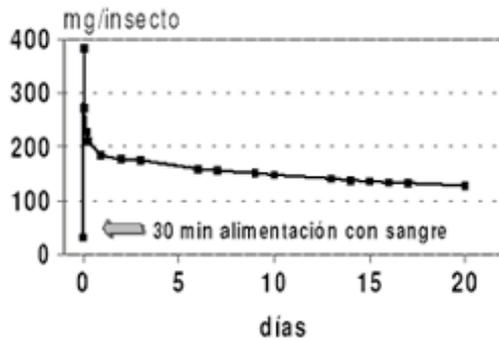


FIGURA 2. Cambio de peso de ninfas del V estadio de *R. prolixus* seguido hasta 20 días después de 30 minutos de alimentación con sangre humana heparinizada

Aumentar 10-12 veces el peso luego de una comida hace que el chipo se convierta en una bola inválida, de modo que la salida de agua y sales sea una necesidad imperiosa. Debe excretarlos y muy rápidamente ya que en ese estado es muy vulnerable, pero deberá conservar la hemoglobina y las proteínas plasmáticas que son su alimento. Lo que el insecto excreta, y que podemos recoger, es el líquido que sale por el ano y que al principio es claro (orina) y más tarde oscuro, en la medida que se mezcla con los productos de digestión (heces). Repetimos el experimento pero viendo el cambio de peso en las primeras horas (Fig. 3).

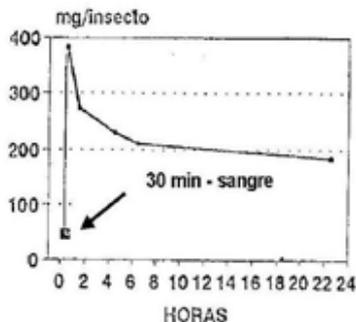


FIGURA 3. Cambios iniciales en el peso de ninfas del V estadio de *R. prolixus* después de alimentarse con sangre por 30 minutos

Nótese que en las primeras 6 horas ya cada insecto ha perdido el 50% del peso ganado: unos 200  $\mu$ L de orina

¿Y por qué permitimos que chupara sangre por 30 minutos y no más allá? Porque pasados los 20-30 minutos los insectos abandonan el alimentador: están "full". Dos preguntas, entonces, 1) ¿qué pasa si lo retiramos del alimentador a los 5 minutos? 2) ¿Cómo es la pérdida de peso, en ese caso, en las primeras horas? En la Fig. 4 se ven estos cambios.

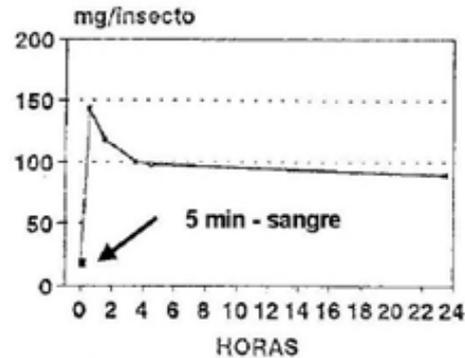


FIGURA 4. Cambios iniciales en el peso de ninfas del V estadio de *R. prolixus* después de alimentarse con sangre por 5 minutos

¿El *R. prolixus*, en su ambiente natural, puede hacer una picada de 30 minutos hasta quedar "full"? Es posible que no, ya que si pica a un humano, por ejemplo, aún de noche y dormido, éste puede moverse y el chipo dejar de picar. Quizás allí está uno de los mecanismos de la transmisión de la enfermedad de Chagas: si el *R. prolixus* hace picadas breves, vuelve a picar y a orinar-defecar y a depositar más parásitos.

Hasta ahora esto poco difiere de la descripción de Darwin, aunque ni Darwin ni el oficial que puso el dedo sabían de la enfermedad de Chagas, que fue descrita en 1909 (ver al final: La enfermedad de Darwin)

En las figuras se pudo ver que pese a la rápida eliminación de agua inicial, a los 24 días el *R. prolixus* aún no ha recuperado su peso inicial. Si bien el chipo está guardando alimento para cuando no lo haya, hay que comprender que se está trabajando con ninfas V y el crecimiento de los insectos es por saltos en cada muda. Las ninfas V después de alimentarse tardan de 3 a 4 semanas hasta la próxima muda que las convertirá en adultos.

**Nota:** Desde el huevo al adulto el *Rhodnius prolixus* pasa por 5 estadios de una llamada metamorfosis incompleta o gradual ya que las ninfas tiene la misma apariencia general que el adulto pero carecen de alas.

## El medio interior del *R. prolixus*, la homeostasis y la cavidad celomática

Cuando Claude Bernard (1813-1878) escribió “*La constancia del medio interno es la condición de la vida libre*” estaba enunciado uno de los conceptos más importantes de la fisiología moderna y “homeostasis” fue la palabra acuñada por Walter B. Cannon (1871-1945) para resumirlo. Es obvio que la homeostasis del *R. prolixus*, el estado estacionario de su medio interno, sufre un tremendo desbalance cuando se alimenta. Pero, ¿cuál es el medio interno, el mar interior del *R. prolixus*? Miremos su cavidad celomática. Bastará decapitar un *R. prolixus* con una pinza y abrir su abdomen para que quede expuesto su celoma: una cavidad donde están inmersos el tubo digestivo, los túbulos de Malpighi (el riñón), los ganglios del sistema nervioso (el sistema nervioso), el sistema propulsor de la hemolinfa (corazón). Al celoma entra y sale aire por difusión a través de las traqueolas (no hay pulmones). Desde las células llegan allí los productos del metabolismo y desde allí es donde inician su viaje al exterior. Y la cavidad celomática estará casi vacía, seca, cuando el *R. prolixus* ha pasado un periodo largo en ayunas y estará llena de un líquido claro (hemolinfa) cuando la alimentación es reciente. Lo que ha ocurrido es que el *R. prolixus* ingiere sangre, el agua y las sales de la sangre salen del tubo digestivo y van a la hemolinfa y de allí, ya veremos cómo, al exterior.

En la evolución la cavidad celomática es el comienzo, el primer paso, hacia la vida independiente. Las células ya no se relacionan con el medio exterior sino con su propio “mar interior”. La cuestión es cómo mantenerlo con un estado estacionario de modo de lograr una composición constante

¿Tiene al hombre cavidad celomática? No, pero la tuvo el embrión. Los órganos del hombre tienen una entrada y una salida de sangre por arterias y venas mientras que el *R. prolixus* todo llega y se va por la hemolinfa de la cavidad celomática: ‘sangre’ pero sin hemoglobina.

### LOS TÚBULOS DE MALPIGHI

Para tratar de compensar este desarreglo del estado estacionario del medio interno del insecto ahora intervienen los túbulos de Malpighi (Fig. 5) el *R.*

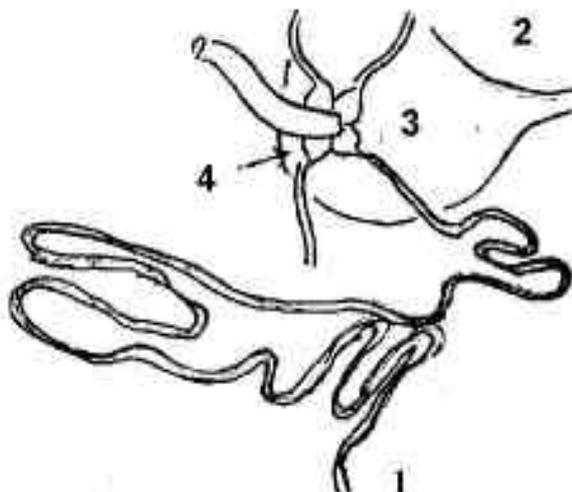


FIGURA 5. Disposición de los túbulos de Malpighi de *R. prolixus*. 1. Túbulos; 2. saco rectal; 3. glándulas rectales; 4. ampollas de los túbulos de Malpighi. Tomado de Zeledon R (33)

*prolixus* hay 4, sumergidos en la hemolinfa y que van a desembocar en la ampolla rectal, la parte final del tubo digestivo. El líquido de la cavidad celomática pasará al exterior a través de los túbulos. ¿Hay túbulos de Malpighi en el hombre? Las glándulas sudoríparas son el ejemplo más claro, pero no cumplen funciones homeostáticas para el agua (regulan calor), papel que sí cumplen los riñones glomerulares. Básicamente un túbulo de Malpighi es un tubo epitelial con un extremo cerrado y otro abierto y donde el agua y las sales son bombeadas por el epitelio, sin intervención de una fuerza hidráulica, como en caso de los nefrones del hombre.

El estudio de los mecanismos de excreción de agua por los túbulos de Malpighi se puede realizar en forma relativamente sencilla usando, por ejemplo, la técnica de Ramsey (24) Los chipos son mantenidos en el laboratorio en un ambiente húmedo (75-85% de humedad relativa). Abierto el abdomen, bajo una solución salina y usando un microscopio estereoscópico (10 - 20 x), se disecan los túbulos que se colocan, en una gota de la solución salina, en una cámara con aceite mineral y el extremo proximal (el abierto y más cercano a la ampolla rectal) se fija en un alfiler. (Fig. 6)

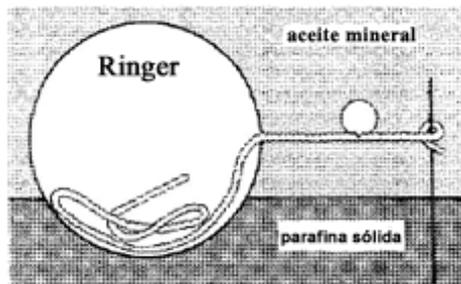


FIGURA 6. Esquema del método de Ramsey utilizado para medir el volumen de fluido tubular producido en un túbulo aislado (Tomado de Maddrell SPH - 19)

Con una tijera de iris se hace una pequeña incisión en el túbulo y la solución comienza a ser transportada desde la solución salina hacia el extremo abierto y el diámetro de la gota formada, y por lo tanto el volumen del líquido segregado, puede ser medido usando un ocular micrométrico o algo similar. Esta preparación de túbulos aislados, con temperatura y oxigenación adecuada, puede funcionar bien un par de horas.

### Estímulos para la secreción de los túbulos de Malpighi

En un *R. prolixus* después de varias semanas de ayuno el volumen producido por sus túbulos aislados es muy bajo (menos de 1 nL/min) pero después de una comida copiosa los túbulos pueden producir entre 50 y 100 nL/min (nanolitros por minuto) ¿Qué hace que los túbulos funcionen de una u otra manera? ¿Cuál es el estímulo? ¿Cuál es la hormona que los despierta? Se la llamó, sin mucho trámite, hormona diurética (DH, en inglés) (15,1,2). La hemolinfa de un *R. prolixus* recién alimentado provoca secreción en los túbulos de un insecto que ha estado en ayunas. Los ganglios mesotorácicos segregan DH, una neurohormona peptídica (1). Para alegría de los fisiólogos, se encontró que la 5-HT (serotonina), una sustancia mucho más fácil de obtener, podía cumplir el papel de la DH. (15, 16, 17) En las Fig. 7 se muestra un experimento en que el flujo de agua ( $J_v$ ) lo medimos luego de la estimulación con serotonina. Un tiempo más tarde se descubrió que la 5-HT no imitaba a la DH sino que existía en el mismo insecto (neurohormona) y que actuaba como una co-hormona y en forma sinérgica con la DH (13,

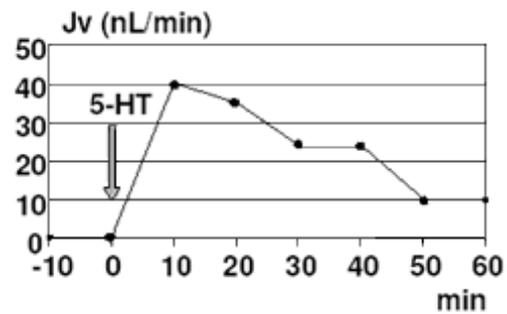


FIGURA 7. Flujo de agua ( $J_v$ ) en un túbulo de Malpighi aislado estimulado por 5-HT  $10^{-5}$  mol/L. Tomado de Montoreano R y col. (21)

14, 18, 20) Este sinergismo también explicaría por qué el volumen urinario en el insecto, con 4 túbulos de Malpighi funcionando, es mayor que la simple suma de los flujos en túbulos aislados estimulados con 5-HT (32)

### Estímulos para la secreción de DH y 5-HT

Para volver a la fisiología comparada tenemos que recordar que en el hombre es la hormona antidiurética (ADH) la que regula la excreción de agua. Los glomérulos “ofertan” a los túbulos gran cantidad de agua y la cuestión ahora es reabsorber más o menos agua, pero siempre reabsorber. Para la ADH el principal estímulo es la osmolaridad extracelular. Para el *R. prolixus* el estímulo principal es la distensión de su abdomen. Pero no nos equivoquemos en las comparaciones: el abdomen de estos insectos está formado por placas de cutícula fijadas a la epidermis que son relativamente rígidas e inelásticas. Para que el abdomen se distienda deba ocurrir una “plastización”, en especial de las membranas intersegmentales y la plastización ocurre cuando el *R. prolixus* come. ¿Que es entonces, salvadas las distancias, lo más parecido a la DH o la 5-HT, que hay en el hombre? Nos parece el péptido natriurético atrial (ANP): una sustancia depositada en gránulos en la aurícula y que promueve la excreción de agua y sales por el riñón (5). ¿Cuándo se libera? Cuando la aurícula se distiende, ante un balance positivo importante de agua, por ejemplo. ¿Son el ANP y la DH la misma sustancia? Sería interesante, pero parece que se parecen en su modo de acción, pero no son iguales (12)

## El adenilmonofosfato cíclico (AMPc) como segundo mensajero

El AMPc actúa como segundo mensajero de muchas hormonas del hombre y de muchos animales y tienen su receptor en la membrana celular. La DH y la 5-HT no escapan a esto (23, 2, 6, 16) y el flujo de agua en un túbulo aislado de *R. prolixus* puede ser estimulado por el agregado de AMPc a la solución. La siguiente pregunta es: el AMPc, como segundo mensajero, aumenta su concentración dentro de las células de los túbulos de Malpighi después de la estimulación, pero, ¿aparece AMPc en el fluido tubular y la orina del *Rhodnius*? Eso ocurre en la orina del hombre, por ejemplo, en respuesta a la PTH (5). La pregunta no es trivial ya que podría tener importancia sobre la evolución del *T. cruzi*.

En la Fig. 8 se ve que sí hay AMPc en el fluido tubular y que hay una relación inversa entre la concentración de AMPc en el fluido tubular producido por la estimulación con 5-HT y el volumen del fluido producido. Lo que se hizo fue recoger las gotas de fluido que salen en un túbulo aislado y medir la concentración de AMPc por radioinmunoensayo (21)\*

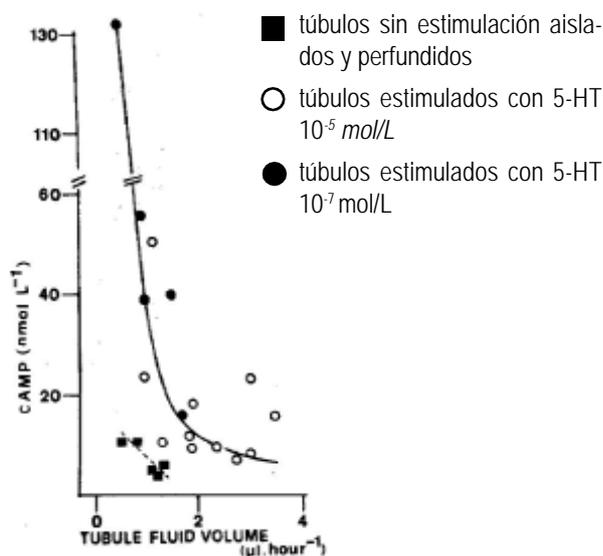


FIGURA 8. Relación entre la concentración de AMPc en el fluido tubular y flujo de volumen en túbulos aislados de *R. prolixus*. Tomado de Montoreano R y col (21)

La siguiente pregunta sería si esta excreción tubular de AMPc se puede ver también en *R. prolixus* enteros alimentados con sangre. Recoger la orina en las primeras horas es relativamente fácil ya que el volumen es grande: se colocan insectos (10 a 12) en una cápsula de Petri y se los deja 1 hora, se pesa antes y después y se recoge la orina para la medición del AMPc. (Fig. 9) Nuevamente una relación inversa (son curvas ajustadas a una hipérbola).

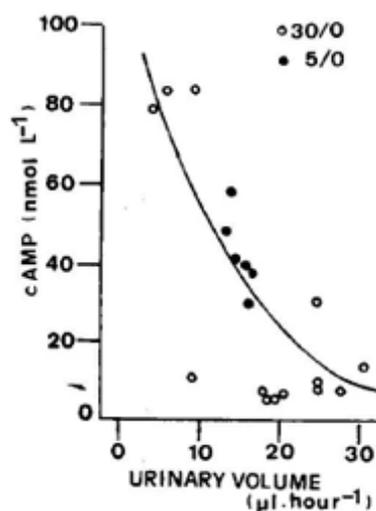


FIGURA 9. Relación entre el volumen urinario y la concentración de AMPc en la orina de ninfas V estadio de *R. prolixus* después de la alimentación con sangre. 5/0 inmediatamente después de 5 minutos de alimentación con sangre. 30/0: inmediatamente después de 30 minutos de alimentación con sangre. Tomado de Montoreano R y col (21)

No hay una explicación clara de esta relación inversa pero uno puede especular que el estímulo induce la aparición en el fluido tubular de una cierta cantidad de AMPc que es diluida por el volumen de fluido.

Como el *R. prolixus* deja de alimentarse por semanas o meses es interesante conocer cómo se modifica la concentración de AMPc en su orina-heces más allá de las primeras horas. Para ello alimentamos *R. prolixus* y los hicimos depositar sus heces en una cámara con aceite mineral (Fig. 10)

• En una visita al BIOMED y viendo estos resultados, Simon H. Maddrell recordó que una vez había puesto 2 túbulos de Malpighi «en serie», con el primero, estimulado con 5-HT, con su fluido tubular cayendo en el Ringer del segundo en la preparación de Ramsey. Encontró que el segundo comenzaba a secretar agua, concluyendo que había «algo» en el fluido tubular que estimulaba la secreción tubular. Quedó claro que ese «algo» era AMPc

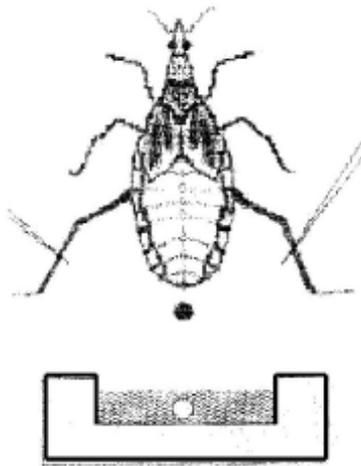


FIGURA 10. Dispositivo utilizado para medir y recoger la orina/heces de un *R. prolixus*. (Esquema realizado con la colaboración del Prof. F. Rodríguez)

Después de medir la concentración el AMPc pudimos construir las curvas de la Fig. 11 que muestran una baja concentración de AMPc al principio (alto volumen de orina) y alta después, cuando la diuresis decae.

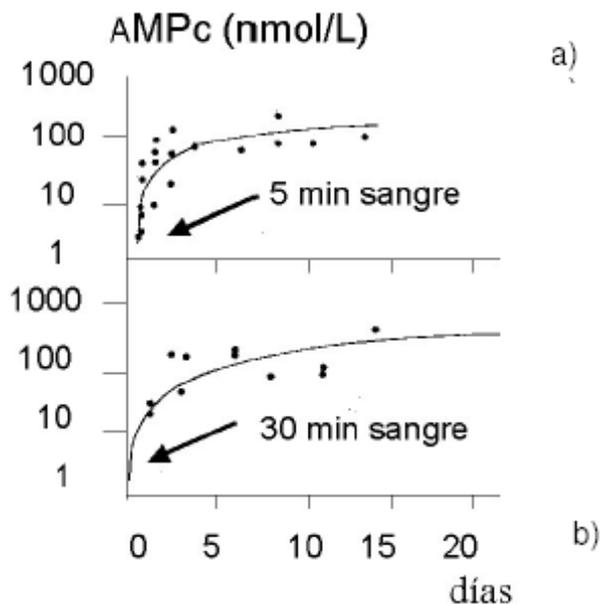


FIGURA 11. Concentración de AMPc en orina-heces de *R. prolixus*. a) después de 5 minutos de alimentación con sangre; b) después de 30 minutos

Con este procedimiento hemos podido seguir la evolución por un poco más de 2 semanas. La siguiente pregunta es ¿cuál es la concentración de AMPc de los chipos que están en el laboratorio en ayunas por meses? No producen orina de modo que lo que hicimos fue tomar el recto entero, exprimirle las heces y medir el AMPc. El resultado fue que en los sacos rectales había alrededor de 2  $\mu\text{mol/L}$  de AMPc: una concentración muy alta, que permite armar una curva como el de la Fig. 12

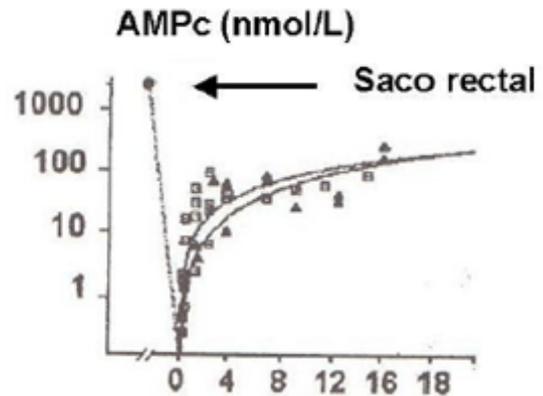


FIGURA 12. Curvas mostrando los cambios en la concentración de AMPc en sacos rectales de *R. prolixus* después de 3 meses sin alimentación y los cambios desde 0 a 16 días de la alimentación con sangre.

Imaginamos ahora un chipo en su hábitat natural. Está en un hueco del rancho de bareque y pica a un hombre con enfermedad de Chagas: los *T. cruzi* van a la glándula rectal (33,34) y allí viven en un ambiente con una concentración de AMPc que aumenta a medida que pasa el tiempo. ¿Podría ser éste un estímulo para que el *T. cruzi* desarrolle la forma metacíclica infectante que saldrá en la próxima picada – deyección? No lo sabemos con certeza, pero esa fue nuestra hipótesis ya que los *T. cruzi* en cultivo desarrollan más formas metacíclicas en presencia de AMPc. (25,26,27,21,8) De lo que sí estamos seguros es de que el flujo de orina inicial es un chorro lo suficientemente fuerte como para desprender los *T. cruzi* fijados en la ampolla rectal y depositarlos en la piel de la “víctima” y que hay un factor en la orina que induce la metaciclogénesis (32)

Un punto pendiente es cómo logra el chipo ablandar su coraza e hinchar su abdomen. La 5-HT tendría también esa función: ablandar la sustancia que une las placas y ésta también es mediada por AMPc. (7, 29,3)

**“Alimentando” *Rhodnius* sin sangre** Si bien el *R. prolixus* es un insecto hematófago, lo que lo atrae hacia el alimentador o la piel del hombre no es la sangre en sí sino su temperatura y su radiación infrarroja: no come muy frío (26 a 37 °C). La prueba está en que se puede reemplazar la sangre por solución Ringer y el *R. prolixus* chupa Ringer. También se demostró que la succión le resulta más fácil si al Ringer se le agrega ATP (28) que en el caso de la sangre entera obtiene de los eritrocitos. Obviamente en el Ringer no hay hemoglobina ni proteínas, el insecto se hincha pero las ninfas no mudan ya que no se alimentaron. Esto facilita aún más nuestro trabajo para estudiar los mecanismos de excreción en el *R. prolixus*.

#### Los inhibidores de la secreción de serotonina

Casi todos los experimentos de fisiología en que se demuestra la acción de un agonista son seguidos por el agregado de un antagonista para probar, más allá de toda duda, que el agonista está bien identificado. En el caso de los túbulos de Malpighi del *R. prolixus* el agonista sería la 5-HT y los antagonistas que usamos fueron el mianserine y el spiperone.(4) que habían ya demostrado su acción en la plastización del tegumento y lo que nosotros hicimos fue ensayarlos en *R. prolixus* enteros, buscando su acción sobre los túbulos de Malpighi. El problema radica en cómo lograr demostrar el efecto de los antagonistas sobre la excreción por túbulos sabiendo que la 5-HT también actúa sobre las plastización de las placas del abdomen. En la Fig. 13 colocamos los insectos en el alimentador durante 5 minutos el primer día y 30 el segundo. A un grupo la solución del alimentador contenía Ringer + ATP y en el otro Ringer + ATP + mianserine.

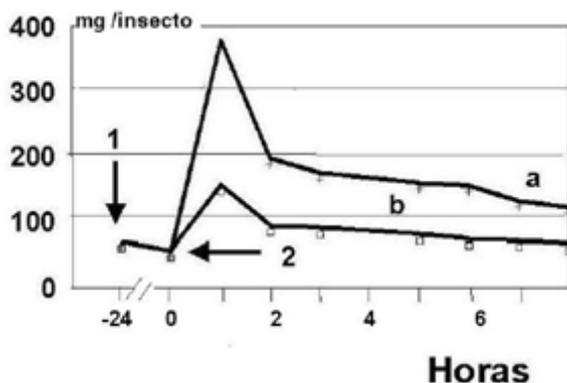


FIGURA 13. Ninfas del V estadio de *R. prolixus*. En el punto 1 el grupo a ingirió Ringer + ATP por 5 min y el grupo b Ringer + ATP + mianserine  $10^{-4}$  mol/L también por 5 min. En el punto 2 ambos grupos tuvieron acceso al alimentador por 30 min

Se ve que las curvas de peso son completamente distintas, demostrando que la dosis previa de mianserine impide al insecto distender su abdomen. En la Fig. 14 se ve cómo logramos distender el abdomen de la misma manera. Ambos grupos ganaron el mismo peso, pero colocando a un grupo por 10 min con Ringer + ATP (curva a) y a otro grupo por 30 minutos con Ringer + ATP + mianserine. (curva b).

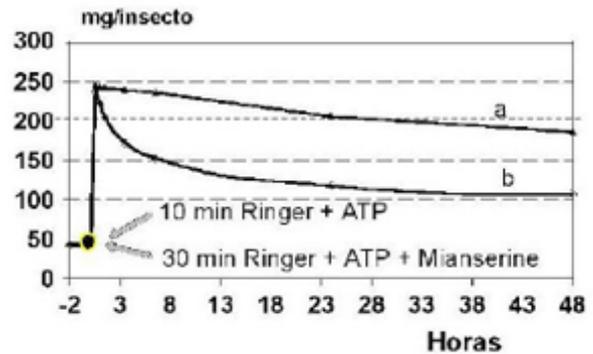


FIGURA 14. Ninfas del V estadio de *R. prolixus*. Grupo a: 10 min Ringer + ATP; Grupo b: 30 min Ringer + ATP + mianserine

Resultados similares se encontraron usando spiperone. Se ve que la pérdida de peso en los insectos que recibieron el antagonista fue más lenta que en la curva control, probando que los antagonistas de la 5-HT actúan sobre los túbulos y que la serotonina tiene un papel preponderante sobre los mecanismos de excreción del *R. prolixus*.

#### De la diuresis a la antidiuresis

Está, entonces, probado que los túbulos de Malpighi del *R. prolixus* responden a la DH y la 5-HT con una acelerada diuresis mediada por AMPc. ¿Cuál es ahora el método que usa el chipo para pasar a la antidiuresis, cerrar todas sus salidas de agua y sobrevivir hasta la próxima comida? La hipótesis original fue que la diuresis caía por el cese de la secreción y/o acción de las hormonas estimulantes. Otra posibilidad es, además, la activación de otras sustancias, como el péptido CAP2b (Cardioacceleratory Peptide 2b) (22) actúan sobre la parte más proximal de los túbulos de Malpighi, aumentando la reabsorción de agua y donde el GMP cíclico sería el segundo mensajero. La cubierta quitinosa evita en parte la deshidratación pero para sobrevivir el insecto necesita, tanto en su hábitat natural como en el laboratorio, de cierta humedad.

## El óxido nítrico y el mecanismo de succión del *Rhodnius*

No hay duda que el aparato succionador del *R. prolixus* es extraordinario: un camello sediento bebe 50 litros de agua cuando llega al oasis, pero el *Rhodnius* "bebe" 10 veces su peso en 30 minutos. Obviamente el *R. prolixus* tiene que hacer algo con la sangre que chupa para que sea más fácil aspirarla. Ribeiro y col. (30,31) encontraron que la saliva del insecto tenía actividad vasodilatadora y antiagregante plaquetaria a través de la liberación de óxido nítrico. También encontraron actividad de una NO-sintasa similar a la de los vertebrados, lo que supondría su conservación en la evolución.

Hemos dejado de lado en esta descripción del sistema excretor del *R. prolixus* algo tan importante como los mecanismos celulares de transporte de agua y sales y para ello quisiera referir a los lectores a dos importantes trabajos: Maddrell (19) y Echeverría y col. (10) donde se describe el Rp-MIP, la acuoporina de estos muy eficaces túbulo.

Como se pudo ver en este relato, el *Rhodnius prolixus* es un laboratorio de fisiología y bioquímica viviente y si bien es necesario combatirlo por su papel en la enfermedad de Chagas, no por eso podemos dejar de admirar y estudiar en profundidad sus mecanismos de vida y de sobrevivencia.

### La enfermedad de Darwin

El «Beagle», con Charles Darwin a bordo, salió de Devonport a fines de 1831 para regresar 5 años más tarde y su encuentro con las «benchugas» ocurrió, según su diario, en marzo de 1835. La del Beagle fue la única expedición de Darwin y hasta su muerte en 1882 vivió en la «Down House», en Downe, Kent, Inglaterra, muy aislado y sintiéndose siempre muy enfermo. Alan Moorehead, en su hermoso libro «Darwin and the Beagle», (Penguin Books Ltd, 1969) hace referencia a que los males de Darwin podrían haberse debido a la enfermedad de Chagas. Aparentemente quien primero señaló esta posibilidad fue Saul Adler, «Darwin's Illness». (Nature 10 Oct. 1959: 1102-03) Carlos Chagas describió la enfermedad, el parásito y su vector en 1909, de modo que los médicos de Darwin no tenían la más mínima posibilidad de pensar que Darwin fuera un «chagásico» crónico. Lamentablemente, hoy en día, a 120 años de su muerte, debemos aceptar que estamos en condiciones de ofrecer un mejor manejo de la miocardiitis y la insuficiencia cardíaca, pero no un tratamiento etiológico efectivo o una cura para la enfermedad de Chagas.

**Participantes:** los experimentos que aquí se relatan fueron realizados en el BIOMED –UC, fueron financiados por subvenciones del CDCH-UC y contaron con la participación de Ricardo Montoreano, Eduardo Bandeira, María Milagros Cortéz, Guillermo Comach, Rafael Rangel-Aldao, Francisco Triana-Alonso. Los experimentos de perfusión de túbulo aislados fueron realizados en el IVIC con la participación de Henry Linares y Beatriz Rodríguez.

**Agradecimientos:** a Simon H. P. Maddrell (Department of Zoology, Cambridge, UK) y Guillermo Whittembury (IVIC) que me brindaron su amistad y asesoría.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aston R, White AF (1974) Isolation and purification of the diuretic hormone from *Rhodnius prolixus*. J Insect Physiol. **20**: 1673-1682.
2. Aston R. (1975) The role of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate in relation to the diuretic hormone of *Rhodnius prolixus*. J Insect Physiol. **21**: 1873-1877
3. Barret M, Orchard I (1990) Serotonin-induced elevation of cAMP levels in the epidermis of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. J Insect Physiol. **36**: 625-633
4. Barret MF, Orchard I, Tebrugge V (1993) Characteristics-induced cyclic AMP elevation in the integument and anterior midgut of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. J insect Physiol. **39**: 581-587
5. Chase LR, Aurbach GD (1962) Parathyroid function and the renal excretion of 3',5' adenylic acid. Proc Natl Acad Sci. USA. **58**: 518-525
6. Coast GM, Cusinato O, Kay I, Goldworthy. (1991) An evaluation of the role of cyclic AMP as intracellular second messenger in Malpighian tubules of the house cricket *Acheta domestica*. J Insect Physiol. **37**: 563-573
7. Cook H, Orchard I (1990) Effects of 5,7-DHT upon feeding and serotonin content of various tissues in *Rhodnius prolixus*. J Insect Physiol. **36**: 361-367

8. Cortéz MM, Comach G, Trujillo M, Montoreano R. (1991) Nuevas evidencias de que el AMPc presente en la orina del *Rhodnius prolixus* es un estímulo para la metacicloogénesis del *Trypanosoma cruzi*. AsoVac, XLI Convención Anual, Maracaibo, 1991. Resumen en Acta Científica Venezolana, **42**: 200
9. Darwin C. "The voyage of the Baegle" Capitulo 15 (Marzo 25, 1835) Disponible en: <http://www.literature.org/authors/darwin-charles/the-voyage-of-the-beagle/chapter-15.html> (gratis)
10. Echevarria M, Ramirez-Lorca R, Hernandez CS, Gutierrez A, Mendez-Ferrer S, Gonzalez E, Toledo-Aral JJ, Ilundain AA, Whittembury G. (2001) Identification of a new water channel (Rp-MIP) in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. *Plufers Arch* **442**: 27-34
11. Graham R, Huesmanna CC, Poh Kheng Loia C., Leeb TD, Kristine M, Swidere KB, Nathan J. (1995) Amino acid sequence of CAP2b, an insect cardioacceleratory peptide from the tobacco hawkmoth *Manduca sexta*, *FEBS Letters*, **371**: 311-314.
12. Kappagoda CT, Knapp MF, Linden RJ, Pearson MJ, Whitaker EM. (1979) Diuresis from left atrial receptors: effect of plasma on the secretion of the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*. *J Physiol*. **291**: 381-391
13. Langue AB, Orchard I, Barret FM (1989) Changes in haemolymph. serotonin levels associated with feeding in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol*. **35**: 393-399
14. Orchard I, Lloyd RJ (1988) Immunochemical and electrochemical detection of serotonin in the nervous system of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol*. **8**: 187-201
15. Maddrell SHP (1964) Excretion in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus* Stal. II. The normal course of diuresis and the effect of temperature. *J Exp Biol*. **41**: 163-176
16. Maddrell SHP, Pilcher DEM, Gardiner BOC (1969) Pharmacology of the Malpighian tubules of *Rhodnius* and *Carausius*: the structure-activity of tryptamine analogues and the role of cyclic AMP (1971) *J Exp Biol*. **54**: 779-804
17. Maddrell SHP, Pilcher DEM, Gardine BOC (1969) Stimulatory effect of 5-hydroxy-tryptamine (serotonin) on Malpighian tubules of insects. *Nature*. **222**: 784-785.
18. Maddrell SPH; Herman WS; Mooney RL; Overton JA. (1991) 5-hydroxytryptamine: a second diuretic hormone in *Rhodnius prolixus*. *J Exp Biol*. **156**: 557-66.
19. Maddrell SHP. (1991) The fastest fluid-secreting cell known: the upper malpighian tubule cell of *Rhodnius*. *Bioessays* **13**: 357-362
20. Maddrell SHP, Herman WS, Farndale RW, Riegel JA (1993) Synergism of hormone controlling epithelial fluid transport in an insect. *J exp Biol*. **174**: 65-80
21. Montoreano R, Triana F, Abate T, Rangel-Aldao R (1990) Cyclic AMP in the Malpighian tubule fluid and in the urine of *Rhodnius prolixus*. *Gen Comp Endocrinol*. **77**: 136-142
22. Qinlan MC, Tublitz NJ, O'Donnell (1997) Antidiuresis in the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* Stal: the peptide CAP2b and cyclic GMP inhibit Malpighian tubule fluid secretion. *J exp Biol*, **200**: 2363-2367..
23. Rafaeli A, Pines M, Stern PS, Applebaum SW (1984) Locust diuretic hormone-stimulated synthesis and excretion of cyclic-AMP: a novel Malpighian tubule bioassay. *Gen Com Endocrinol*. **54**: 35-42
24. Ramsey JA (1958) Excretion by Malpighian tubules of the stick insect, *Dixippus morosus* (*Orthoptera Phasmidae*): aminoacid, sugars and urea. *J exp Biol*. **35**: 871- 891
25. Rangel-Aldao R, Allende O, Triana F, Piras R, Henríquez D, Piras M (1987) Possible role of cAMP as an inducer of the cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. **22**: 39-43
26. Rangel-Aldao R, Triana F, Comach G, Abate T, Fernández V, McMahon Pratt D (1988) Intracellular signaling trasduction in the

- differentiation of *Trypanosoma cruzi*: role of cAMP. Arch Biol Med Exp. **21**: 403-408
27. Rangel-Aldao R, Triana F, Fernández V, Comach G, Abate T, Montoreano R (1988) Cyclic AMP as an inducer of the cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Biochem Int. **17**: 337-344
28. Smith JJB The feeding response of *Rodnius prolixus* to blood fractions, and the role of ATP (1979) . J exp Biol. **78**: 225-232
29. Reynolds SE (1974) Pharmacological induction of plasticization in the abdominal cuticle of *Rhodnius*. J Exp Biol. **114**: 307-328
30. Ribeiro JM, Hazzard JM, Nussenzveig RH, Champagne DE, Walker FA. (1993) Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. Science, **260**: (5107): 539-41
31. Ribeiro JM, Nussenzveig RH (1993) Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. FEBS Lett; **330**: 165-8
32. Te Brugge VA, Schooley DA, Orchard I. (2002) The biological activity of diuretic factors in *Rhodnius prolixus*. Peptides **4**: 671-681
33. Zeledón R. (1987) Life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. En: **“Chagas’ disease vectors”**, Vol II, Anatomic and Physiological Aspects. CRC Press, Inc., Boca Ratón, Fla. USA
34. Zeledón R, Bolaños R, Rojas M (1984) Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. Acta Tropica. **41**: 39-43

