

## Tesis de Posgrado

# Factores que afectan la distribución espacial de la vinchuca *Triatoma infestans* y búsqueda de nuevas herramientas para su control

Lorenzo, Marcelo G.

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Lorenzo, Marcelo G.. (1997). Factores que afectan la distribución espacial de la vinchuca *Triatoma infestans* y búsqueda de nuevas herramientas para su control. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2906\\_Lorenzo.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2906_Lorenzo.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Lorenzo, Marcelo G.. "Factores que afectan la distribución espacial de la vinchuca *Triatoma infestans* y búsqueda de nuevas herramientas para su control". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2906\\_Lorenzo.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2906_Lorenzo.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

*Factores que afectan la distribución espacial de  
la vinchuca Triatoma infestans y búsqueda de  
nuevas herramientas para su control*

Autor: Lic. Marcelo G. Lorenzo

Director: Dr. Claudio R. Lazzari

Laboratorio de Fisiología de Insectos  
Departamento de Ciencias Biológicas

Tesis para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

1997

J. G.

A mis viejos

A Debi y Florencia

## Resumen

Autor: Lic. Marcelo G. Lorenzo

Director: Dr. Claudio R. Lazzari

Se utilizó un modelo artificial de refugio para estudiar diversos aspectos de su uso por *T. infestans*. Estos insectos salen de sus refugios al comienzo de la escotofase para procurar alimento. Se muestra que la búsqueda de refugio ocurre al final de la fase oscura. El nivel de ayuno tiene una relación directamente proporcional con la actividad de búsqueda del hospedador entre la salida de refugio y la vuelta al mismo. Esto implica que los insectos ayunados se mantienen activos durante toda la fase oscura. Se describe un comportamiento de defecación, mediante el cual las vinchucas abandonan los refugios para eliminar sus deyecciones en proximidad de éstos. Como consecuencia, se observa la acumulación de deyecciones en los accesos a refugios. Se demuestra que las heces actúan como marcas químicas de las inmediaciones del refugio, orientando a los insectos hacia éste. Explotando este comportamiento, se desarrolló un diseño muy sencillo de refugio artificial cebado, que es capaz de reclutar vinchucas a su interior. Pudo determinarse que la temperatura, y en particular la humedad relativa, son factores que afectan la elección de un refugio por parte de las vinchucas. Se presenta la primera trampa para vinchucas, asociada con cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* como cebos atrayentes. Dicha trampa cebada resultó altamente efectiva en ensayos de laboratorio, capturando al 50 % de los insectos presentes en una noche. En ensayos a campo se determinó la efectividad de la trampa, capturándose números significativos de vinchucas en periodos breves de tiempo.

### Palabras claves:

*Triatoma* - refugios - actividad - heces - termopreferencia - higropreferencia -  
trampas - atrayentes - sensores

## Abstract

Author: Marcelo Lorenzo  
Supervisor: DR. Claudio Lazzari

A model of artificial refuge was used to study different aspects of its exploitation by *T. infestans*. These insects get out from shelters at the beginning of the dark phase in order to find a host. We show that the search for refuges occurs at the end of the scotophase. The fasten interval has a direct relationship to the level of host searching activity during the interval between refuge outgoing and incoming. This means that fastened insects keep active during the whole night. A behaviour is described, by means of which the *vinchucas* go out from shelters in order to defecate in their vicinity. As a consequence, an accumulation of faecal droppings is observed at the refuge entrance. It is shown that dry faeces act as a chemical mark of the surroundings of the shelter orienting the insects toward the refuge. A simple baited artificial refuge capable to draw triatomines inside was developed. It was demonstrated that the temperature and specially the relative humidity at the refuge, affect the selection of a shelter by the bugs. The first trap for triatomine bugs is presented, associated with cultures of *Saccharomyces cerevisiae* that act as a bait improving dramatically the captures of bugs. That trap showed to be highly effective in laboratory assays, capturing 50 % of the present bugs in single night assays. In field trials, this trap captured significant numbers of bugs in one night assays.

### Key words:

*Triatoma* - refuge - activity - faeces - thermopreference - hygropreference - traps - attractants - sensors

**Los resultados presentados en este trabajo de Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones en Reuniones Científicas**

**Trabajos completos**

Guerenstein, P. G.; Lorenzo, M.G.; Núñez, J.A. & Lazzari, C.R. Baker's yeast, an attractant for baiting traps for Chagas' disease vectors. *Experientia* 51(8): 834-837.

Lorenzo, M. G. & Lazzari, C. R. (1996). The spatial pattern of defecation in *Triatoma infestans* and the role of faeces as a chemical mark of the refuge. *J. Insect Physiol* 42(9): 903-907.

Lorenzo, M.G. & Lazzari, C.R. Activity pattern with relation to refuge exploitation in *Triatoma infestans* in the absence and in the presence of a host. En preparación.

Lorenzo, M. G. & Lazzari, C. R. Temperature and relative humidity affect the choice for refuges in the bug *Triatoma infestans* Klug. En preparación.

Lorenzo, M. G.; Reisenman, C. E. & Lazzari, C. R. Trials of baited traps for *Triatoma infestans* under natural conditions. En preparación.

**Resúmenes publicados correspondientes a presentaciones en Reuniones Científicas**

Guerenstein, P.; Lorenzo F, A.; Lorenzo, M.; Nuñez, J. & Lazzari, C. (1993). Atractantes naturales de vectores del Mal de Chagas. *Medicina*, Vol. 53, Suplemento I, pag.66.

Lorenzo, M. & Lazzari, C. (1993). Patrón de distribución de deyecciones asociadas a refugios en *T. infestans*. *Medicina*, Vol. 53, Suplemento I, pag.67.

Lazzari, C.; Lorenzo F., A.; Lorenzo, M.; Guerenstein, P.; Manrique, G.; Flores, G.; & Nuñez, J. (1993). Desarrollo de cebos químicos y trampas para vectores del Mal de Chagas. *Medicina*, Vol. 53, Suplemento I, pag.67.

Lorenzo, M. & Lazzari, C. (1993). Dynamics of the use of refuges by *Triatoma infestans*. *Memorias do Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 88 - Suppl. page 265.

Lorenzo, M. & Lazzari, C. (1994). Faecal marks affect refuge selection in *Triatoma infestans*. *Memorias do Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 89 - Suppl. page 198.

Lorenzo, M.; Guerenstein, P. & Lazzari, C. (1994). A baited trap for Chagas' Disease vectors. *Memorias do Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 89 - Suppl. page 198.

Lorenzo, M. G. & Lazzari, C.R. (1995). Uso de refugios en la vinchuca *Triatoma infestans*. Marcas químicas y dinámica de explotación. Actas del III Congreso Argentino de Entomología. Mendoza.

Lorenzo, M. G. & Lazzari, C.R. (1996). Motivation for feeding in unrestrained *Triatoma infestans* varies with time during the night hours. *Memorias do Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 91, - Suppl. page 137.

Lorenzo, M. G. & Lazzari, C.R. Temperature and Relative humidity affect the choice for shelters in *Triatoma infestans*. *Memorias do Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 91 - Suppl. page 138.

**Agradecimientos:**



A Claudio, mi Director de Tesis, por todo su sacrificio para enseñarme como investigar, y por ayudarme siempre frente a las dificultades. A Josué, por mostrarme lo divertido que es investigar, y por enseñarme a ser crítico.

A Flavio, Martín y Walter por todos sus comentarios y apoyo durante estos años. A Pablito, Gabo, Alicia, Graciela, Linus, Roxi, Pablo, Gabi, Tere, Juan, Caro, Verónica, Luciano, Fernando y Héctor, por BANCARME, y por las largas horas de discusiones e innumerables manos.

Al Dr. Patrick Guerin por sus comentarios y correcciones en parte de este trabajo.

A la Dra. Liléia Diotaiuti por su apoyo e interés en el presente trabajo.

A la Dra. Delmi Canale por su colaboración y por facilitarme el uso de los gallineros e insectos, y al personal del Centro de Reservorios y Vectores del Servicio Nacional de Chagas por la colaboración recibida durante la campaña de octubre de 1996.

Al Dr. Ricardo Gürtler por fructíferas discusiones y por su interés en mi trabajo.

A Carla Céccre por permitirme utilizar sus nidos para las mediciones de variables climáticas.

Al Dr. Miguel Ángel Basombrio por facilitarnos insectos y permitirnos realizar ensayos preliminares en sus cuyeras.

A mis amigos Chico, Silvia, Gaita, Santi, Gaba, Pato, Pablo, Dodo, Fabi, Olguita y Nionios, por los innumerables asados.

A tantos compañeros que tuve y quiero mucho, y que prefiero no enumerar (a ver si me olvido alguno!).

Al Club San Lorenzo de Almagro, de corazón.

A mis viejos por toda la entrega y el apoyo, que fueron indispensables para que esta Tesis existiera. A mi hermano Claudio. A Tita por todo su cariño y apoyo. A Naón por su apoyo.

A Debi, por tu amor y apoyo. A Flopi.

A Marce, a quien extraño mucho.

Al CONICET y a la Universidad de Buenos Aires por becas, cargos y subsidios recibidos durante el trabajo experimental y de redacción de esta Tesis.

A la Organización Mundial de la Salud [UNDP/World Bank/WHO, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)] por el apoyo financiero al proyecto.

Entonces dio otro salto para anticiparse a las predicciones y averiguar la fecha y las circunstancias de su muerte. Sin embargo, antes de llegar al verso final ya había comprendido que no saldría jamás de ese cuarto, pues estaba previsto que la ciudad de los espejos (o de los espejismos) sería arrasada por el viento y desterrada de la memoria de los hombres en el instante en que Aureliano Babilonia acabara de descifrar los pergaminos, y que todo lo escrito en ellos era irreplicable desde siempre y para siempre, porque las estirpes condenadas a cien años de soledad no tenían una segunda oportunidad sobre la tierra.

G. García Márquez (*Cien Años de Soledad*, 1967)

Por la noche, hube de sostener una lucha, y no es exageración, con una *Benchuca*, especie de *Reduvius*, la gran chinche negra de las pampas. ¿Qué asco no experimentará uno cuando nota que le recorre el cuerpo un insecto blando que tiene, por lo menos una pulgada de largo? Antes de que comience a chupar, ese insecto es completamente plano, pero a medida que absorbe sangre se redondea, y en este estado se aplasta fácilmente. Una de esas chinches, de que me apoderé en Iquique, porque se las encuentra también en Chile y en el Perú, se hallaba completamente vacía. Colocado en una mesa y rodeado de gente, ese audaz insecto, si se le presenta el dedo, se abalanza en seguida a él, y si se le deja, empieza a chupar. Su picadura no causa ningún dolor y es muy curioso ver como se va hinchando de sangre su cuerpo; en menos de diez minutos, de plano que es se convierte en una bola. Esa comida que uno de los oficiales del navío tuvo a bien ofrecerle a la *benchuca*, bastó para conservarla en una decente gordura durante cuatro meses enteros; pero al cabo de quince días se hallaba ya dispuesta a efectuar una segunda comida.

Charles Darwin (*Viaje de un naturalista alrededor del mundo*, 1845)

**CONTENIDO**

<b>CAPITULO 1. Introducción</b>	16
1.1 Introducción general	16
1.2 Introducción al comportamiento de Triatominae	18
1.3 Factores relacionados con la distribución en el ambiente en <i>Triatoma infestans</i>	21
1.4 Semioquímicos. El concepto de comunicación	26
1.5 Comunicación química. Definiciones	27
1.6 Feromonas	28
1.7 Comunicación química en Triatominae	29
1.8 Estado de la posible transferencia al control de los vectores de la enfermedad de Chagas	31
1.9 Objetivos del trabajo	34
<b>CAPITULO 2. Estudios preliminares del comportamiento de <i>T. infestans</i> en relación con refugios. Desarrollo de un refugio artificial.</b>	
2.1 Introducción	35
2.2 Materiales y Métodos	35
2.3 Resultados	37
2.4 Discusión	39
<b>CAPITULO 3. Dinámica del uso de refugios en <i>T. infestans</i>.</b>	
3.1 Introducción	40
3.2 Materiales y Métodos	41
3.3 Resultados	43
3.4 Discusión	46

**CAPITULO 4. Variación de la motivación para la búsqueda de alimento en distintas horas de la noche.**

4.1 Introducción	50
4.2 Materiales y Métodos	50
4.3 Resultados	51
4.4 Discusión	52

**CAPITULO 5. Efecto de la termopreferencia sobre la elección de refugios en *T. infestans*.**

5.1 Introducción	54
5.2 Materiales y Métodos	55
5.3 Resultados	58
5.4 Discusión	59

**CAPITULO 6. Efecto de la higropreferencia sobre la elección de refugios en *T. infestans*.**

6.1 Introducción	62
6.2 Materiales y Métodos	63
6.3 Resultados	64
6.4 Discusión	65

**CAPITULO 7. Comportamiento de defecación en *T. infestans*. Distribución de deyecciones en relación con refugios.**

7.1 Introducción	67
7.2 Materiales y Métodos	67

7.3 Resultados	69
7.4 Discusión	73

## **CAPITULO 8. Las heces como marca del refugio.**

8.1 Introducción	75
8.2 Materiales y Métodos	75
8.3 Resultados	76
8.4 Discusión	77

## **CAPITULO 9. Características de refugios naturales: T°, H.R., materiales.**

### **Distribución de heces.**

9.1 Introducción	79
9.2 Materiales y Métodos	80
9.3 Resultados	81
9.4 Discusión	82

## **CAPITULO 10. Trampas cebadas con atrayentes naturales. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* Hansen y las heces como cebos potenciales para capturar vinchucas.**

10.1 Introducción	85
10.2 Materiales y Métodos	87
10.3 Resultados	89
10.4 Discusión	90

**CAPITULO 11. Ensayos a campo de trampas cebadas con levadura y refugios con heces.**

11.1	Introducción	93
11.2	Materiales y Métodos	93
11.3	Resultados	97
11.4	Discusión	99

**CAPITULO 12. Conclusiones**

12.1	Actividad relacionada con el refugio	102
12.2	Ternopreferencia y elección de refugio	102
12.3	Higropreferencia y elección de refugio	103
12.4	Patrón espacial de defecación de <i>T. infestans</i>	104
12.5	Las heces como marca del refugio para <i>T. infestans</i>	104
12.6	El refugio natural: características físicas	105
12.7	Ensayos con trampas cebadas con cultivos de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen	105

**CAPÍTULO 13.**

	Bibliografía	107
--	--------------	-----

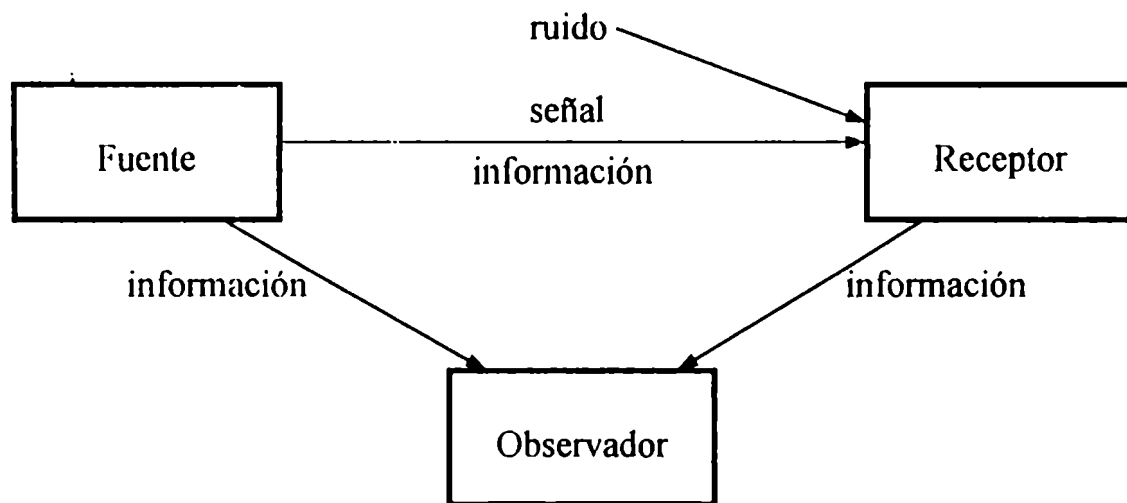


## Capítulo 1. Introducción

### 1.1-Introducción general

En un entorno no homogéneo, esto es, sujeto a cambios físicos y químicos en el espacio y en el tiempo, los organismos deben extraer **información** relevante para su supervivencia. Según Shannon & Weaver (1949), y Wiener (1948), "la transmisión de información implica una pérdida de incertidumbre". La obtención y el procesamiento de la información presente en el medio ambiente resultan vitales para la subsistencia de los seres vivos, ya que se podría definir a la información como la capacidad de organizar un sistema (Stonier, 1990, citado por Dusenbery, 1992). La adquisición de información ocurre a través de órganos sensoriales especializados que la obtienen de manera selectiva del ambiente (recepción), para luego ser procesada en el sistema nervioso central (percepción), generando una respuesta acorde.

La transmisión de información se puede representar según el siguiente esquema:



donde se la presenta como una interacción entre una **fuentes** (o transmisor) y un **receptor**. Entre éstos, existe un **canal** de transmisión que involucra el movimiento de energía o material desde la fuente hacia el receptor. En biología, el receptor es un organismo y la fuente es parte de su ambiente (circunstancialmente

otro organismo), y el canal incluye al estímulo, junto con los factores ambientales que lo afectan. El **estímulo**, es un patrón específico de actividad dentro del canal sensorial que adquiere un significado por estar asociado con algún estado del ambiente relevante para el receptor. Los estímulos pueden ser divididos en dos categorías: **claves y señales**, las segundas habiendo sido modeladas por selección natural para mejorar su capacidad de transmitir información, mientras que las primeras no (Seeley, 1989, citado por Dusenbery 1992).

Se puede poner a prueba la existencia de transmisión de información, retirando o modificando la fuente y luego observando si este cambio afecta la conducta del receptor. Las interacciones diferentes de la transmisión de información involucran la transferencia de materiales o energía (interacciones tróficas), o se dan a través de fuerzas físicas. Si éstas pueden ser excluidas, normalmente por la cantidad de energía o material involucrado, entonces se puede afirmar que ha habido transferencia de información. Una característica de las interacciones informacionales es el ser mediadas normalmente por estímulos que involucran cantidades muy pequeñas de sustancias químicas o energía. Normalmente el receptor posee mecanismos especializados para amplificar la respuesta al estímulo. Finalmente, una propiedad fundamental de la información es que puede ser fácilmente ignorada, mientras que los factores físicos o tróficos no.

Los organismos utilizan una amplia gama de tipos de información disponible en su entorno, y esto les permite mantenerse en un medio ambiente apropiado, ajustar temporalmente sus actividades, hallar recursos y detectar amenazas potenciales. Además, muchos organismos transmiten información a otros individuos para persuadirlos de que realicen alguna conducta.

El problema más crítico que enfrentan los seres vivos es el de mantener las condiciones apropiadas para su existencia y mantenimiento continuado, incluyendo su homeostasis. Ésta abarca a los procesos a través de los cuales la

información de retroalimentación es utilizada para mantener un estado estable en ciertas condiciones básicas tales como temperatura, balance hídrico o posición espacial. En muchos casos la información sensorial utilizada se origina en el entorno del organismo.

Las estrategias empleadas por los seres vivos para localizar recursos, el tipo de información involucrada, y cómo ésta es obtenida, es el objeto de estudio de la Ecología Sensorial (Dusenbery, 1992). La Fisiología del Comportamiento analiza las relaciones funcionales entre los elementos que median entre una entrada sensorial y la salida de comportamiento. En ambos casos, se considera al organismo como una "caja negra" (o un sistema constituido por cajas negras cuya función y conexiones deben deducirse del análisis de las relaciones entrada-salida). De acuerdo con este criterio, el animal debe permanecer intacto y en condiciones tan naturales como sea posible, respondiendo con su comportamiento a las preguntas del experimentador, sin notar que es parte de un experimento. Esta Tesis se desarrolla dentro del citado marco teórico-experimental.

En este primer capítulo introductorio se realiza una breve revisión del comportamiento de la chinche hematófaga *Triatoma infestans* para luego hacer hincapié en aspectos generales del uso de refugios, la comunicación química y la importancia de variables ambientales en la distribución de las vinchucas. Además, se realiza una actualización de lo realizado hasta el presente respecto de la transferencia de dichos conocimientos a estrategias de control de vinchucas.

## **1.2-Introducción al comportamiento de los triatominae**

La vinchuca, *Triatoma infestans*, es el principal vector del parásito flagelado *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica (Zeledón & Rabinovich, 1981).

Durante el día estos insectos casi no desarrollan actividad y suele encontrárselos en un estado de inmovilidad denominado *akinesis*. Los insectos permanecen de esta manera, agregados con otros miembros de la población y en

estrecho contacto con el sustrato (*tigmotaxis*) en el interior de grietas y techos de materia vegetal (jarilla, simbol, etc.). Además de estos refugios típicos, *T. infestans* es un insecto que elige diversos sitios y objetos como refugios, *e.g.*, cajas de cartón, cúmulos de ropa, catres, etc. Este comportamiento le permite aumentar la probabilidad de permanecer protegido de depredadores potenciales. Durante la noche, estos insectos despliegan la mayor actividad, *i.e.*, alimentación, búsqueda de refugio, etc. (Wiesinger, 1956; Espínola, 1973; Núñez, 1987; Lazzari, 1992; Lorenzo & Lazzari, 1993; Lorenzo & Lazzari, 1996). Al igual que otros triatomíneos, *T. infestans* está adaptado a alimentarse de sangre de vertebrados endotermos. Para orientarse hacia la fuente de alimento utiliza, entre otras claves, corrientes de aire que transportan olores del hospedador (Núñez, 1982; 1987), y el calor emitido por éste. El calor resulta fundamental a las vinchucas para orientarse en proximidad del hospedador (Núñez 1987; Lazzari & Núñez 1989a; Flores & Lazzari 1996). Una vez en contacto con el hospedador las chinchas perforan la epidermis por medio del par de estiletes mandibulares, mientras que con los delgados estiletes maxilares horadan los vasos sanguíneos subyacentes (Schofield, 1994). Luego de esto, las vinchucas inyectan una saliva que posee efecto vasodilatador, inhibidor de la hemostasis, y al menos en el caso de *Rhodnius prolixus*, tiene un efecto anticoagulante (Ribeiro, 1987; citado por Schofield, 1994). El comienzo del proceso de ingesta es afectado por la presencia de determinadas sales y nutrientes (Friend & Smith, 1977; Guerenstein & Núñez, 1994). Mientras que en el caso de *R. prolixus* es necesaria la presencia de nucleótidos fagoestimulantes en la dieta, *T. infestans* ingiere soluciones de NaCl de la misma concentración que la sangre de vertebrados (Guerenstein & Núñez, 1994). La ingesta de sangre en las larvas de vinchuca involucra un peso varias veces mayor al del propio insecto, llegando los *Rhodnius prolixus* del 5<sup>o</sup> estadio a ingerir 10 veces su propio peso en sangre. Luego de alimentarse, estos insectos realizan un proceso de diuresis intenso, a través del que eliminan ca. 40 o 50 % del volumen de sangre ingerido como exceso de agua (Wigglesworth, 1931). Luego

de la ingesta las vinchucas están expuestas a depredación debido a su limitada capacidad de movimiento, por lo que deben buscar sitios reparados donde refugiarse. En el refugio, además de encontrar protección y otros individuos de la misma especie, les es posible hallar simbiosis y, en el caso de los adultos, pareja sexual.

Entre las claves informacionales descritas en la bibliografía como modificadoras del comportamiento de los triatomíneos y que son explotadas por éstos para orientarse en el ambiente, se encuentran las olfativas, térmicas, visuales y vibratorias.

Ejemplos de estímulos olfativos son las feromonas, que actúan como mensajeros en la comunicación química intraespecífica, y las kairomonas que permiten al organismo detectar la presencia de una fuente de alimento. Ambos tipos de compuestos químicos contribuyen a hacer posible la orientación del animal hacia un objetivo determinado. En el caso de las vinchucas se conocen diversas sustancias que modifican su comportamiento, detallándose en una sección posterior sus características biológicas.

La clave térmica representa, según la bibliografía existente, un estímulo muy poderoso para las vinchucas, ya que se lo describe como necesario y suficiente para desencadenar el comportamiento de picado en estos insectos (Lazzari, 1990; Flores & Lazzari, 1996). Las vinchucas se orientan espacialmente de manera precisa hacia fuentes térmicas que presenten la temperatura de un hospedador. La misma clave es utilizada para la selección de sitios donde permanecer, mudar y eclosionar (Lazzari, 1991), y para sincronizar el reloj circadiano (Lazzari, 1992). Llamativamente, no está involucrada en el reconocimiento del alimento (Lazzari & Núñez, 1989b).

Por su parte, las señales vibratorias constituyen un aspecto de la comunicación animal poco estudiado debido a la considerable dificultad para realizar registros de éstas, y por ello el significado biológico de estas señales ha quedado sujeto a diversas interpretaciones. Pese a esto, en los últimos años se ha

incrementado el estudio de la comunicación vibratoria, incluyendo un trabajo (Roces & Manrique, 1996) sobre comunicación en el contexto sexual a través de señales vibratorias en adultos de *T. infestans*. Además, estos autores muestran un segundo tipo de señal vibratoria descrita como comportamiento de defensa frente a perturbaciones, *i.e.*, cuando los insectos son apretados mediante pinzas.

Como se aclaró al comienzo de esta introducción, el interés central de este trabajo es estudiar los distintos factores, desde comunicación intraespecífica hasta variables ambientales, que afectan la elección de sitios protegidos donde encuentra refugio la vinchuca *T. infestans*.

### **1.3-Factores relacionados con la distribución en el ambiente en *T. infestans***

La distribución geográfica de *T. infestans* es amplísima, siendo encontrada desde las provincias del norte patagónico, hasta Chile, Uruguay, Paraguay, Bolivia, Perú y estados de Brasil hasta el Nordeste (Fig. 1).

En nuestro país, la vinchuca es normalmente hallada en zonas desérticas a semidesérticas, siendo esporádica su aparición en focos en regiones más húmedas. Existe una aparente correlación entre el nivel de infestación de las distintas áreas del país y el nivel de humedad relativa del ambiente (Fig. 2 y 3) (Curto de Casas, 1985).



Figura 1: Área de Distribución de la vinchuca *Triatoma infestans* (según Carcavallo, 1996).

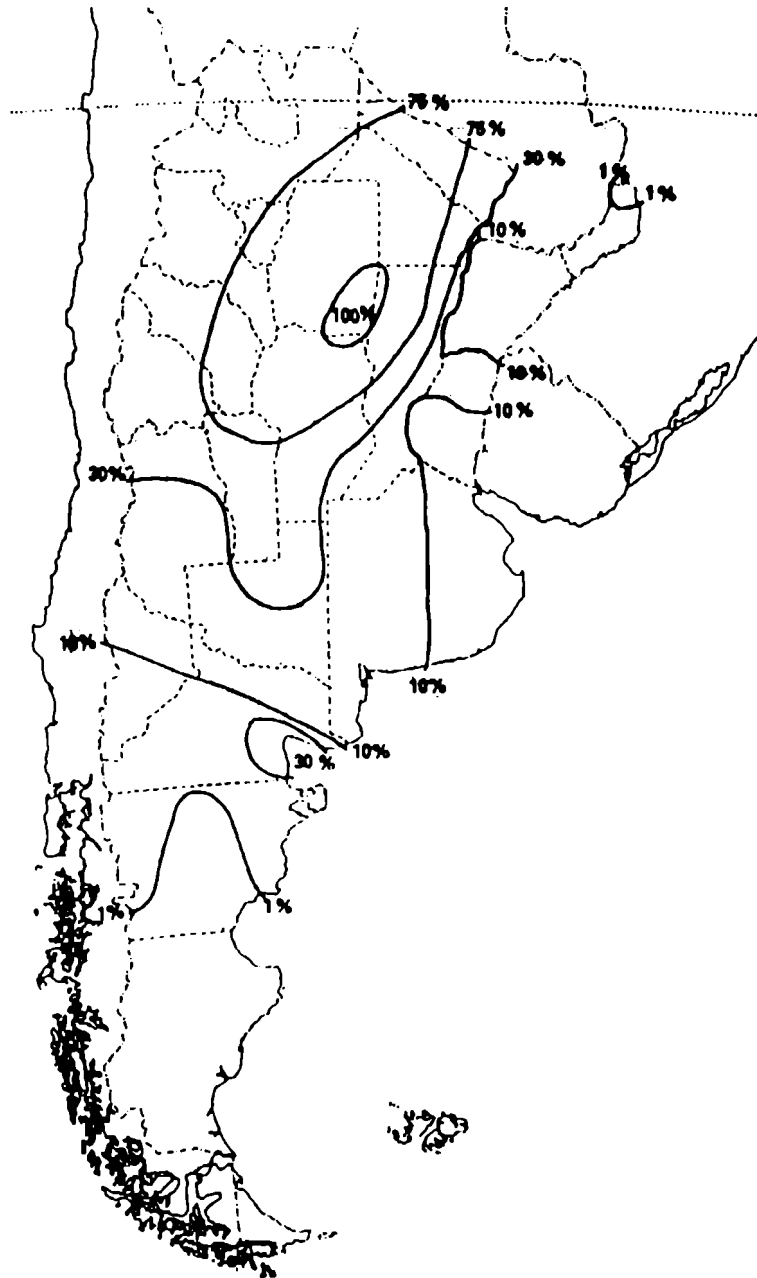


Figura 2: Porcentaje de infestación domiciliaria por *Triatoma infestans*, según datos del año 1968 (Curto de Casas, 1985).



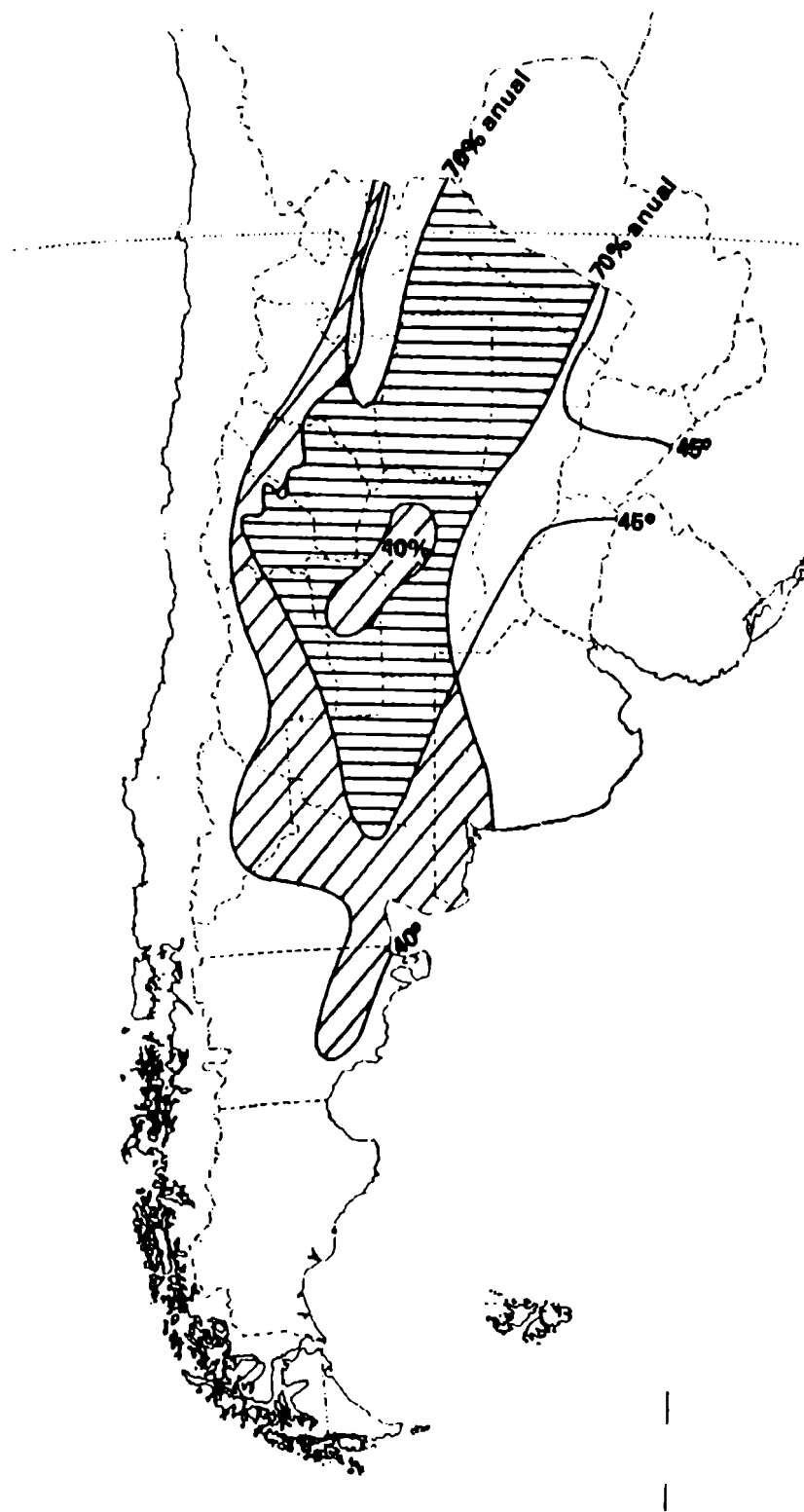


Figura 3: Las zonas rayadas muestran valores de temperaturas máximas absolutas superiores a 40° y 45° C, y humedad relativa anual inferior al 70 % (según Curto de Casas, 1985).

Esto es consistente con los resultados obtenidos por Roca & Lazzari (1994) en experimentos de preferencia por humedad relativa en gradientes. Estos autores observaron en ensayos de laboratorio que los insectos prefieren permanecer, mudar y oviponer en un ambiente cercano al 0 % de H. R. Respecto de la temperatura ambiente, existen resultados de ensayos en gradiente con *T. infestans* adultos, en los que se describió una preferencia por temperaturas de ca. 29 °C para animales alimentados y de ca. 26 °C luego de un ayuno de 12 días (Lazzari, 1991).

Las provincias más afectadas por poblaciones de estos insectos son Santiago del Estero, Chaco y Formosa, pero es importante el impacto de estos vectores en el Norte de Santa Fé, Catamarca, San Juan, y otras provincias centrales (Fig. 2). *T. infestans* es una especie fundamentalmente restringida a ambientes domésticos y peridomésticos de zonas rurales. Sólo se conocen en la actualidad focos silvestres de esta especie en el área de Cochabamba, en Bolivia.

Normalmente, es característica la aparición de estos insectos en viviendas de adobe y techos compuestos de materia vegetal y tierra. Pero aparentemente, no es solamente esta condición la que define el riesgo de infestación de una vivienda. Gürtler *et al.* (1992) han realizado un estudio en el que demuestran que los ranchos construidos con materiales apropiados (normalmente definido por el nivel económico-social de sus ocupantes), y que presentan un mantenimiento frecuente, son poco infestados por vinchucas. Es por lo tanto, una condición importante para el desarrollo de poblaciones de vinchucas la presencia de grietas en paredes y materiales poco apropiados, así como una gran acumulación de trastos, latas, cajas y ropa (Lchane, 1991; Kettle, 1995). Dentro de las viviendas, es característica la aparición de los insectos cerca de sitios donde pernoctan los hospedadores (Zeledón & Rabinovich, 1981). El tipo de hospedador sobre el que se alimenta *T. infestans* es muy variable, y va desde el ser humano hasta las gallinas y perros con los que éste cohabita (Gürtler *et al.*, 1996 a). Estos últimos actúan característicamente como reservorios del parásito *T. cruzi*, presentando normalmente niveles altos de parasitemia (Gürtler *et al.*, 1996 b). Además de

aparecer en el interior de las viviendas, estos insectos suelen presentar poblaciones con alta frecuencia en el peridomicilio, *i.e.*, en gallineros, galpones, corrales, etc. Se considera que muy probablemente sean estas poblaciones las que actúan como focos de reinfestación luego de campañas de control, siendo muy difícil su detección y eliminación (Cécere *et al.*, 1996).

#### **1.4-Semioquímicos. El concepto de comunicación**

Previamente al análisis de los canales de comunicación involucrados en el comportamiento de *T. infestans* es necesario discutir brevemente el concepto de comunicación. En primer lugar, al menos dos individuos deben participar, como emisor y receptor, respectivamente, para que la comunicación biológica sea posible y reconocible. Según Hawkins & Myrberg (1983), comunicación se define como "la transferencia de información entre un individuo emisor y otro receptor, en donde ambos concuerdan y cooperan con el significado del mensaje transmitido". Según Wilson (1975), la comunicación ocurre "cuando la acción o clave dada por un organismo es percibida, alterando la probabilidad de ocurrencia de un patrón de comportamiento en otro individuo de manera adaptativa a uno o ambos participantes". Otra característica de importancia de la comunicación biológica es que debe estar "mediada por señales, *i.e.*, información sensorial, más que por factores físicos o tróficos o por información genética" (Dusenbery, 1992). Otte (1974) define señales como características comportamentales, fisiológicas o morfológicas modeladas o mantenidas por selección natural debido a que llevan información a otros organismos. Y a las características que llevan información pero que no se encuentran bajo selección o a las características del ambiente físico que pueden ser percibidas, el mismo autor indica la conveniencia de referirlas con expresiones más neutrales como información, claves, signos o estímulos disparadores. Como ya ha sido mencionado, la transmisión de información resulta de la interacción entre una fuente (o emisor) y un receptor a través de un canal de comunicación determinado. Esta interacción puede ser el resultado de la

comunicación entre miembros de la misma especie, *i.e.*, comunicación intraespecífica, la cual se distingue de la comunicación entre miembros de especies diferentes, *e.g.*, planta-polinizador.

### **1.5-Comunicación química. Definiciones**

Hablamos de comunicación química cuando la transmisión de información entre la fuente y el receptor es realizada a través de la modalidad química, esto es, utilizando como símbolos compuestos químicos a través de lo que denominamos el canal de comunicación químico.

La clasificación **tradicional** define a los estímulos químicos de acuerdo a si el emisor o el receptor es el que se beneficia con la transferencia de los mismos. Recientemente, Dicke & Sabelis (1988) proponen una clasificación de clases de interacción química, basada en los costos y beneficios de la interacción para ambos interactuantes.

La comunicación química entre individuos de una misma especie se realiza a través de compuestos, o mezclas de varios compuestos, denominados feromonas. Karlson & Luscher (1959) definieron feromona como una sustancia química emitida al medio ambiente y que ejerce su acción sobre otros individuos de la misma especie modificando su comportamiento. Dicke & Sabelis (1988) redefinen la terminología de la comunicación química, incluido el concepto de feromona. Aquí se presenta una breve reseña de esta clasificación:

**Infoquímico:** compuesto químico que, en un contexto natural, transporta

información en una interacción entre dos individuos, evocando en el receptor una respuesta fisiológica o comportamental que es adaptativa para uno de los interactuantes o para ambos.

**feromona:** infoquímico que media en una interacción entre organismos de la misma especie.

**Aleloquímico:** infoquímico que media en una interacción entre dos organismos pertenecientes a especies diferentes

**alomona:** aleloquímico que es pertinente a la biología de un organismo (organismo 1) y que, cuando contacta a un individuo de otra especie (organismo 2), evoca en el receptor una respuesta fisiológica o comportamental que resulta adaptativamente favorable para el organismo 1 pero no para el organismo 2.

**kairomona:** aleloquímico que es pertinente a la biología de un organismo (organismo 1) y que, cuando contacta a un individuo de otra especie (organismo 2), evoca en el receptor una respuesta fisiológica o comportamental que resulta adaptativamente favorable para el organismo 2 pero no para el organismo 1.

**synomona:** aleloquímico que es pertinente a la biología de un organismo (organismo 1) y que, cuando contacta a un individuo de otra especie (organismo 2), evoca en el receptor una respuesta fisiológica o comportamental que resulta adaptativamente favorable para ambos organismos (1 y 2).

### 1.6-Feromonas

Como hemos visto, cuando hablamos de feromonas nos estamos refiriendo a la comunicación química intraespecífica, *i.e.*, son liberadas por y afectan a individuos de la misma especie. Actúan como verdaderos mensajeros químicos y son utilizadas por los organismos para modificar distintos comportamientos, como por ejemplo, la probabilidad de apareamiento, la búsqueda de alimento, agregación y alarma o defensa, entre otros. La composición química de las feromonas puede

consistir de una o varias sustancias, conformando un *bouquet* en el que los distintos constituyentes tienen un efecto modulador entre sí (Kaisling, 1987). Son producidas por glándulas exócrinas, y su producción y síntesis es regulada por factores exógenos y endógenos. Aunque es muy difícil conocer la composición química de las feromonas, en diversos insectos ha sido revelada su estructura química (Tamaki, 1985; Borden, 1985). Las feromonas pueden ser producidas por la larva, la hembra, el macho o por ambos sexos, y pueden actuar en un intervalo amplio de distancias.

### 1.7-Comunicación química en Triatominae

La evidencia existente sobre comunicación química en Triatominae está referida a la presencia de sustancias volátiles que actúan promoviendo distintos comportamientos, *i.e.*, búsqueda de pareja, agregación, alarma. Schofield & Patterson (1977) sugirieron la existencia de una feromona juvenil de agregación presente en las heces de larvas de *T. infestans* y *R. prolixus*. Según estos autores, esta feromona promueve la atracción de ninfas ayunadas hacia las heces recién depositadas, mientras que no ocurre este comportamiento en ninfas alimentadas. Ondarza *et al.* (1986) sugirieron la existencia de al menos dos feromonas de agregación en *T. mazzottii*, una presente en las heces de larvas y hembras que actuaría en hembras y larvas ayunadas, y otra presente en las heces de machos que afectaría el comportamiento de machos tanto alimentados como ayunados. Cruz-López *et al.* (1993) estudiaron la respuesta de agregación frente a productos volátiles presentes en las heces en *T. barberi*, *R. prolixus* y en tres especies del complejo *T. phyllosoma*. Estos autores concluyeron que dichas sustancias tendrían un efecto interespecífico, lo cual sugiere que la feromona de agregación presente en las heces sería similar en las distintas especies. En otro trabajo, Lorenzo F. *et al.* (1994) estudiaron la respuesta de *T. infestans* a sustancias volátiles presentes en las heces, así como la dinámica del comportamiento de agregación inducido por las mismas. En experimentos realizados en una arena

experimental, las larvas de esta especie se agregaron alrededor de papeles impregnados con heces secas. El mismo resultado fue obtenido cuando estos autores utilizaron un olfatómetro de discriminación simultánea. En este caso, cuando una corriente de aire pasaba por un papel impregnado con heces secas, las larvas fueron atraídas, mientras que las heces húmedas fueron rechazadas. Estos autores también encontraron que el cambio en la respuesta de la indiferencia a la atracción se observó dentro de las 8 hs. después de la alimentación, pero no inmediatamente luego de alimentarse. Este último resultado permitió explicar aquellos de Schofield & Patterson (1977), relativos a la respuesta diferencial de insectos ayunados y alimentados.

La aparición en el estado adulto de los Triatominae de glándulas metatorácicas y de Brindley trae aparejada la aparición de sustancias con aparentes funciones defensivas y de alarma, ausentes en las larvas. Cuando los adultos son perturbados emiten una secreción, liberada por las glándulas de Brindley, cuyo principal componente es el ácido isobutírico (Games *et al.*, 1974). Esta sustancia es corrosiva y actuaría como repelente de posibles depredadores (Schofield, 1979). Por otra parte, a bajas concentraciones, el ácido isobutírico parecería actuar en la comunicación intraespecífica, *i.e.*, como feromona de alarma para otros miembros de la población (Ward, 1981). Otro componente activo, identificado como 3-metil-2-hexanona, también secretado por las glándulas metatorácicas de la chinche *Dipetalogaster maximus*, podría actuar como una segunda sustancia de alarma, útil para repeler depredadores (*e.g.*, hormigas) o para la comunicación intraespecífica (Rossiter & Staddon, 1983).

La posible existencia de feromonas sexuales y la atracción a distancia entre sexos en *T. infestans*, *R. prolixus*, *Panstrongylus megistus* y *T. mazzottii* ha sido analizada por diversos autores (Velázquez Antich, 1968; Baldwin *et al.*, 1971; Schofield & Moreman, 1976; Schofield & Patterson, 1977; Neves & Paulini, 1981; Ondarza *et al.*, 1986; Rojas *et al.*, 1991; Manrique & Lazzari, 1995; de Brito Sanchez *et al.*, 1995). Sin embargo, la fuente de dicha feromona permanece

desconocida en todos los casos. En algunos trabajos las evidencias aportadas no son concluyentes, y llegan a ser contradictorias (*e.g.*, Ondarza *et al.*, 1986; Rojas *et al.*, 1991). Según Manrique & Lazzari (1995), existen evidencias comportamentales sobre la existencia de una señal sexual química producida durante la cópula, que promueve la agregación de machos alrededor de la pareja. Por medio de ensayos electrofisiológicos, de Brito Sanchez *et al.* (1995) obtuvieron registros de actividad eléctrica en antenas de machos estimuladas por medio de una corriente de aire que previamente había entrado en contacto con una pareja en cópula. En el citado trabajo, se describe una respuesta en forma de aumento de la tasa de impulsos compuestos bifásicos en asociación con la presentación del mencionado estímulo.

### **1.8-Estado de la posible transferencia al control de los vectores de la enfermedad de Chagas**

Debido a su amplia distribución geográfica y al número de personas expuestas a la infección por *T. cruzi*, la enfermedad de Chagas puede ser considerada como una de las más importantes enfermedades tropicales. Lamentablemente, los medicamentos disponibles sólo actúan en la fase inicial de la enfermedad y no existen hasta el presente posibilidades concretas de desarrollo, en el corto plazo, de una vacuna efectiva, debido a la complejidad antigénica del *T. cruzi*. Por estas razones, el control de la enfermedad de Chagas se realiza fundamentalmente a través de la interrupción de la transmisión vectorial y transfusional (Moncayo, 1991).

Los métodos mayormente utilizados en el control de las poblaciones de vinchucas son el uso de insecticidas de rociado y fumigantes, junto con la vigilancia post-intervención y el mejoramiento de las viviendas. La vigilancia actualmente es realizada por los mismos habitantes de la vivienda entrenados por agentes comunitarios o por personal de los servicios de control, y en el caso de



Argentina, esto es llevado a cabo a través de la colocación de sensores “María” en el interior de viviendas luego del rociado (Schofield, 1994; Segura *et al.*, 1994).

Estos sensores están compuestos por una caja de cartón de 40 x 22 x 2 cm. En su interior están rellenos con papel plegado agujereado de manera tal de generar una estructura en forma de laberinto (Wisnivesky-Colli *et al.*, 1987). La caja presenta dos ranuras largas de 1 cm de altura a los lados y una tercera en su cara inferior. Las ranuras permiten la libre entrada y salida de los insectos que caminan sobre las paredes en las que se colocan los sensores. Los sensores son colocados normalmente en dormitorios y otras áreas donde duermen personas (*e.g.*, galerías), cerca de camas, nidos de gallinas o sitios de descanso de perros dentro de la vivienda. Normalmente se colocan a 1,5 mt. de altura procurando lugares que presenten marcas fecales anteriores.

En este tipo de sensores se obtiene detecciones positivas de infestación tanto por la presencia de insectos, como por la de exuvias, deyecciones o restos de huevos (Wisnivesky-Colli *et al.*, 1987).

De acuerdo a lo anteriormente descrito, no se ha intentado la transferencia de los conocimientos existentes sobre la ecología sensorial de triatominos a las estrategias de control. Existen innumerables ejemplos de la utilización de infoquímicos como cebos de captura en estrategias de control de otros insectos tanto de interés sanitario, como agropecuario (Shorey & Mc Elvey, 1977; Vale *et al.*, 1986, 1988; Green, 1993; Van Essen *et al.*, 1994). En el caso de dípteros transmisores de enfermedades, se han desarrollado diferentes tipos de trampas con cebos (Vale *et al.*, 1988; Van Essen *et al.*, 1994). En el caso de los triatominos existe la ventaja de contar con zonas de muestreo reducidas, donde puede verse aumentada la probabilidad de detección respecto de los casos de insectos que deben ser capturados en el campo. Es posible entonces, ensayar los distintos atrayentes conocidos para *T. infestans* como cebos en trampas que capturen efectivamente a los insectos. Estas trampas permitirían realizar muestreos de manera rápida, inclusive en casos donde el nivel de infestación no fuera elevado.

### 1.9-Objetivos

La intención de esta Tesis es contribuir al conocimiento de los factores que afectan la distribución de *Triatoma infestans*, principal insecto vector de la enfermedad de Chagas. Se intenta realizar un aporte para la posterior transferencia de los conocimientos existentes sobre la ecología sensorial de estos insectos a estrategias de control.

## Capítulo 2. Estudios preliminares del comportamiento de *T. infestans* en relación con refugios. Desarrollo de un refugio artificial.

### 2.1-Introducción

La vinchuca *Triatoma infestans* presenta un comportamiento tigmotáctico característico que provoca que los insectos se mantengan en estrecho contacto con el sustrato y sus conespecíficos. Esta tendencia, sumada a una marcada fototaxia negativa (Reisenman & Lazzari, 1996), tiene como consecuencia que las vinchucas se refugien dentro de grietas, techos de materia vegetal, cajas y otros sitios que ofrezcan espacios reducidos no accesibles a la luz, disponibles en los ambientes que habitan (viviendas humanas, corrales, etc.). Con el objeto de obtener un diseño de refugio artificial que permitiera analizar cuantitativamente cómo las vinchucas lo utilizan y qué factores afectan su elección, se realizó una serie de ensayos preliminares. Para esto se tomaron en cuenta varios criterios: 1) el refugio en cuestión debía presentar espacios reducidos, 2) debía permitir su utilización por un número apreciable de insectos simultáneamente, 3) debía estar confeccionado en un material económico que permitiera descartarlo luego de su utilización en un ensayo, y 4) debía ser aceptado por un alto porcentaje de insectos al ser ofrecido a un conjunto de vinchucas en una arena experimental.

### 2.2-Materiales y Métodos

Para realizar experimentos de análisis de distribución de vinchucas considerando las distintas condiciones previamente mencionadas, fue necesario definir ciertas características del diseño experimental a utilizar. Una de fundamental importancia, fue el tipo de sustrato a ofrecer como refugio a las vinchucas. Luego de ensayar con algunos materiales, tamaños y diseños diferentes, e. g., porciones de envases descartables (PVC) combinados con divisiones de cartón corrugado, se optó por un dispositivo muy sencillo. Este modelo de refugio se construyó utilizando trozos de cartón corrugado de 10x20

cm., plegados en su línea media de manera tal que la superficie del potencial refugio era de 10x10 cm. Esta disposición plegada se mantenía por medio de broches metálicos que unían los bordes.

Al comienzo del ensayo se liberaba un grupo de larvas del 5<sup>to</sup> estadio de *T. infestans* en el centro de una carpa de tul de 1,5 x 1,5 x 2,0 m. en la que previamente se habían dispuesto varios refugios potenciales ubicados en distintas posiciones. El número de animales utilizados variaba de acuerdo a la disponibilidad del insectario en el momento de realizarse el ensayo. Todos los ensayos se realizaron con luz natural, proveniente de una ventana adyacente. Se tomaron para todos los ensayos los valores de temperatura máxima y mínima, con el fin de correlacionar cualquier cambio de estos parámetros con cambios en el comportamiento de los insectos.

Los insectos se liberaban antes de la caída del sol, ya que se consideró este momento como el comienzo de su fase de actividad. Los animales eran ubicados en una caja de Petri en el centro del piso de la carpa. Dentro del recipiente, se colocaba un trozo del mismo cartón que el utilizado para los refugios potenciales, a fin de que los animales no se encontraran sobre un sustrato liso como es el vidrio. El recipiente se colocaba tapado, para evitar que las vinchucas salieran. Esta tapa se retiraba desde el exterior de la carpa 15 min. después de depositar los animales, tiempo suficiente para que los insectos entren en akinesis, a fin de evitar alarmarlos. Debido a su altura externa, de la caja de Petri los animales podían salir, pero no entrar. De esta manera, si se encontraba una vinchuca dentro de la caja de Petri al finalizar el ensayo, se sabía que ese individuo no había salido durante el experimento.

El recuento de los insectos se efectuaba en la mañana siguiente, varias horas después del amanecer. Debido a la hora, se esperaba encontrar un porcentaje máximo de insectos en estado de inactividad en los lugares elegidos por éstos como refugio para pasar el día. Así, se obtuvo simultáneamente información sobre el número de animales dentro y fuera de los refugios artificiales, y sobre la

distribución de los insectos en los refugios ofrecidos en las distintas posiciones. Esto último, se analizó con la intención de determinar si la posición del refugio dentro de la carpa modificaba la probabilidad de elección que de éste hacían los insectos. Lo antedicho se consideró de importancia, ya que a la vez se buscaba una distribución de refugios que sirviera en posteriores ensayos de actividad y preferencia.

### 2.3-Resultados

#### Serie 1: Ensayos con refugios en 4 esquinas en el piso

Se realizaron cuatro ensayos de la manera previamente descrita. En todos los casos, el porcentaje de animales dentro de los refugios artificiales al finalizar el ensayo fue cercana al 100% (Tabla 1). Por ésta razón, en el resto del trabajo éstos fueron utilizados considerándolos como refugios efectivos. En tres de los cuatro ensayos se observó una distribución de los insectos que según la prueba de G de bondad de ajuste difería significativamente del azar (g.l.= 3;  $P < 0,001$ ;  $P < 0,001$ ;  $P < 0,05$ ). En el cuarto ensayo, la distribución de los animales no mostró ser significativamente diferente del azar.

**Tabla 1.** Número de insectos hallados en los refugios artificiales ubicados en cada una de las cuatro esquinas del piso de la carpa.

Ensayo	Refugio 1 v.	Refugio 2 v.	Refugio 3 i.	Refugio 4 i.	Par Ventana	Par Interno	Total en refugios	Total Ensayo
1	2	9	5	7	11	12	23	23
2	4	0	12	5	4	17	21	23
3	8	0	11	12	8	23	31	31
4	9	17	27	22	26	47	75	75

En el caso de los datos de los cuatro ensayos agrupados por refugio se obtuvo una diferencia significativamente distinta del azar (g.l.=3;  $G_p=19$ ,  $P < 0,001$ ). Con el objeto de determinar si estas diferencias se debían a asimetrías de la arena

experimental, se compararon los distintos pares de refugios con la misma prueba. Sólo en el caso de los pares de refugios ubicados cercanos o alejados de la fuente de iluminación, existía una distribución distinta del azar ( $g.l.=1$ ;  $G_p=18$ ,  $P<0,001$ ). Es decir, que existió una tendencia significativa en los insectos a ubicarse alejados de la fuente de iluminación, en nuestro caso, la ventana del laboratorio.

Con el objeto de determinar si las proporciones de animales encontrados en los distintos refugios diferían entre ensayos, se realizó una prueba de G de Heterogeneidad. El valor de  $G_h$  obtenido ( $g.l.=3$ ;  $G_h=32$ ,  $P<0,001$ ) habla de una diferencia significativa respecto del azar, que se debería a una tendencia de agrupamiento de los animales, sin importar el refugio elegido por éstos.

**Serie 2:** Ensayos con refugios en piso (4) y techo (4).

En una segunda serie de ensayos ( $k=2$  repeticiones), se liberaron animales en la misma carpa, en la cual se habían colocado previamente cuatro refugios en el piso (en la misma posición que en los ensayos anteriores) y otros cuatro en igual posición, en el techo. Al final del experimento, se contabilizó un mayor porcentaje de insectos en los refugios del techo, en comparación con los ubicados en el piso (Tabla 2) ( $g.l.=1$ ;  $G_p=7$ ,  $P<0.01$ ).

**Tabla 2.** Número de insectos hallados en los refugios artificiales ubicados en el techo y en el piso.

<b>Ensayo</b>	<b>Piso</b>	<b>Techo</b>	<b>Total en refugios</b>	<b>Total Ensayo</b>
1	16	26	42	42
2	29	47	76	77

#### 2.4-Discusión

El primer objetivo de los ensayos realizados en la carpa de tul fue encontrar un refugio artificial simple y descartable que se pudiera ofrecer a las vinchucas y que presentara un máximo de aceptación por parte de estos insectos. La ventaja

que presenta un refugio con estas características estriba en el hecho de que se evita utilizarlo en más de un ensayo. De esta manera se descarta toda posibilidad de presencia de marcas de cualquier tipo depositadas por los insectos.

El diseño utilizado en todos los ensayos demostró ser altamente efectivo, ya que el porcentaje de insectos encontrados en refugios nunca fue menor del 80%. Este porcentaje disminuyó con una temperatura ambiente menor a 20°C. Lazzari (1992) determinó que la actividad espontánea de las vinchucas se ve fuertemente afectada en varios parámetros, *e.g.*, ritmicidad, intensidad, etc., a una temperatura ambiente de 20°C. A 25°C, sin embargo, la actividad locomotora espontánea de *T. infestans* es máxima (Lazzari, 1992).

Los ensayos presentados en las series 1 y 2 demuestran que los animales prefirieron refugios en posiciones particulares, y que las condiciones de iluminación y la altura a la que estaban ubicados estos eran parámetros a tener en cuenta. Respecto de la altura, es importante aclarar que el número de animales que se ubicó en los refugios del piso en los ensayos de la serie 2 fue importante, aunque menor a la cantidad de insectos que prefirieron ubicarse en el techo. Además, se determinó que si no se ofrecen refugios en el techo a las vinchucas (serie 1), éstas se ubican masivamente en aquellos refugios que encuentran en el piso. Es posible, entonces, obtener un elevado índice de agregación (90-100%) en refugios distribuidos en el piso de la carpa. Este resultado es de fundamental importancia para ensayos posteriores porque permite la utilización de arenas experimentales bidimensionales, las que brindan considerables ventajas para la preparación de ensayos y para realizar registros en video del comportamiento de las vinchucas.

### Capítulo 3. Dinámica del uso de refugios en *T. infestans*

#### 3.1-Introducción

La actividad espontánea de las chinches de la familia Triatominae ha sido estudiada por diversos autores (Wiesinger, 1956; Núñez, 1982; Setembrini, 1984; Lazzari, 1992). Dichos autores analizaron la actividad locomotora de las vinchucas registrada en actómetros, bajo ciclos artificiales discretos de luz/oscuridad y temperatura constante. Particularmente para *Triatoma infestans*, se describió un ritmo circadiano de actividad con dos picos controlados en forma endógena, uno al comienzo de la escotofase y otro al comienzo de la fotofase. Ambos picos fueron relacionados con actividad de búsqueda del hospedador y del refugio, respectivamente (Lazzari, 1992), hipótesis que debe ser estudiada bajo condiciones menos restringidas que en los actómetros. Por un lado, el patrón de actividad de *T. infestans* descrito en los diseños utilizados previamente puede haber sido afectado por las condiciones experimentales, *e.g.*, confinamiento, ciclo de luz artificial y ausencia de sitios que ofrezcan protección. Además, el efecto del ayuno sobre el patrón de actividad de *T. infestans* es conspicuo tanto sobre la actividad general como en la expresión de la ritmicidad (Núñez, 1982; Lazzari, 1992). Por lo tanto, es necesario determinar si el nivel de ayuno afecta la actividad en relación con los refugios.

En el presente capítulo se utiliza una arena experimental con un refugio artificial del tipo puesto a prueba en el capítulo anterior, con el fin de estudiar la expresión de la actividad de las vinchucas en relación con sus refugios, con el objeto de determinar si existe una “ventana temporal” en las que los animales se dirigen a sus refugios. Además, se estudia el efecto del nivel de ayuno sobre la actividad locomotora y la dinámica de explotación de los refugios.



### 3.2-Materiales y Métodos

Los animales experimentales fueron larvas del 5<sup>to</sup> estadio de *Triatoma infestans* de la colonia de nuestro laboratorio, mantenidas a 28°C y alimentadas con sangre de cabra heparinizada a través de un alimentador artificial (Núñez & Lazzari, 1990).

#### *Actividad relacionada con refugios*

Se estudió el efecto de diferentes niveles de ayuno sobre la actividad locomotora de las vinchucas, a través de dos series de ensayos. Cada serie consistió de dos réplicas. En la primera serie se utilizaron animales con un ayuno postecdisis de una semana. En la segunda serie los animales presentaban un ayuno postecdisis de seis semanas. Se registró el comportamiento de 40 insectos en cada réplica de cada serie experimental.

Los experimentos fueron desarrollados en una arena experimental de 80 x 100 cm. Ésta consistía de un piso de madera, rodeado de paredes de vidrio que evitaban que los insectos pudieran trepar. La superficie de la arena fue cubierta con papel de embalaje común, de color marrón claro que era cambiado en cada ensayo. En el centro de la arena se ofreció a los insectos un refugio artificial. Éste consistía de una pieza de cartón corrugado común de 10 x 20 cm, doblado en su línea central de manera tal de ofrecer un refugio de 10 x 10 cm con dos accesos laterales. La temperatura ambiente durante los ensayos fue mantenida en 24° ± 2°C. La arena experimental fue ubicada a un metro de una ventana de aproximadamente 400 x 200 cm para exponer a los animales a un ciclo de iluminación natural.

El comportamiento de los insectos fue registrado por medio de una cámara de video (Sony, 8 mm.CCD TR50). La imagen representada en el monitor de televisión presentaba el refugio en el centro, y sus alrededores (10 cm a cada lado aproximadamente), de manera tal que se registraba la actividad de los insectos en un área de aproximadamente 9 veces la del refugio. Durante la noche, una luz roja

de baja intensidad ubicada en el cenit proveyó la luz mínima necesaria para registrar el comportamiento de los insectos. El valor adecuado de intensidad se determinó mediante ensayos preliminares, y fue establecido un nivel de iluminación de aproximadamente  $14 \pm 1$  lux (medido en el centro de la arena).

Los insectos eran liberados en el centro de la arena, y se les dejaba habituarse al ambiente durante tres días. Al finalizar este período, más de un 90 % de los animales se hallaban durante las horas de luz dentro del refugio. El registro de actividad comenzaba al final del tercer día, aproximadamente una hora antes del anochecer, y finalizaba en la mañana siguiente, por lo menos tres horas luego del amanecer. El periodo de registro de cerca de 16 horas fue establecido por medio de ensayos preliminares.

Las filmaciones fueron analizadas y los siguientes parámetros cuantificados: a- actividad locomotora espontánea, b- número de insectos que salían del refugio, c- número de insectos que entraban al refugio.

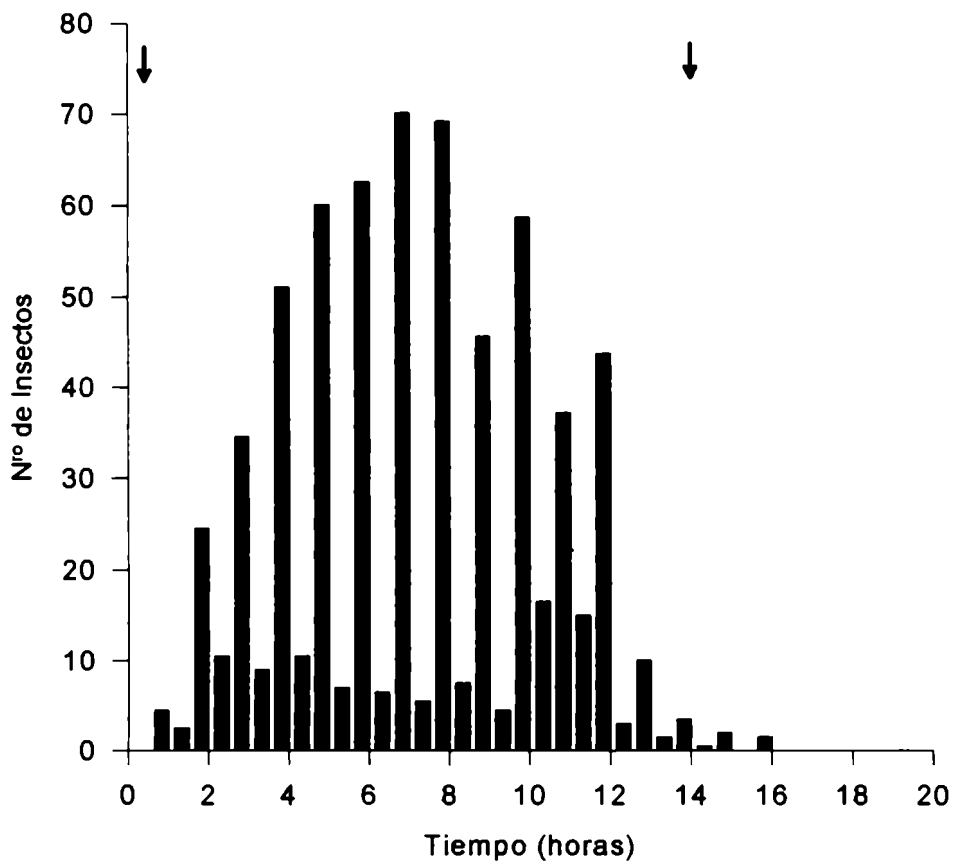
Todos estos parámetros fueron registrados continuamente y agrupados para cada hora del ensayo, de manera de cuantificar variaciones en la actividad durante el periodo estudiado. La actividad espontánea se midió trazando sobre la imagen del monitor de TV un par de ejes ortogonales centrados en la pantalla, y contando cada vez que un animal cruzaba cualesquiera de ambas líneas.

Se realizaron registros continuos de iluminación con un fotómetro digital (TES 1330) durante el intervalo completo en que transcurrieron los experimentos, a partir de los que se determinó que no existían cambios de iluminación significativos ( $\pm 0.5$  lux) durante la noche, *i.e.*, entre lo que en adelante llamaremos anochecer y amanecer.

### 3.3-Resultados

#### *Primera serie experimental: insectos con un ayuno breve*

En ambos ensayos llevados a cabo con insectos ayunados una semana postecdisis, la actividad locomotora registrada fue baja (Fig. 1). Aunque los insectos estuvieron moderadamente activos durante toda la noche, pudo observarse la ocurrencia de picos de actividad pequeños cerca del anochecer y del amanecer. Respecto del uso del refugio, la tendencia de los insectos a salir o entrar a éste estuvo restringida a ventanas temporales definidas. Los insectos salieron del refugio fundamentalmente durante las primeras cuatro horas de la noche, mientras que la principal actividad de entrada al refugio fue observada durante las últimas horas de la noche. Esto último ocurría precediendo al amanecer, *i.e.*, antes de que hubiera algún cambio detectable en la iluminación del ambiente. Un balance calculando el número de insectos que salieron y entraron al refugio para cada hora de ensayo ( $N$  de salidas de insectos -  $N$  de entradas de insectos), resultó positivo para la primera mitad de la noche y negativo para la segunda (Fig. 2).

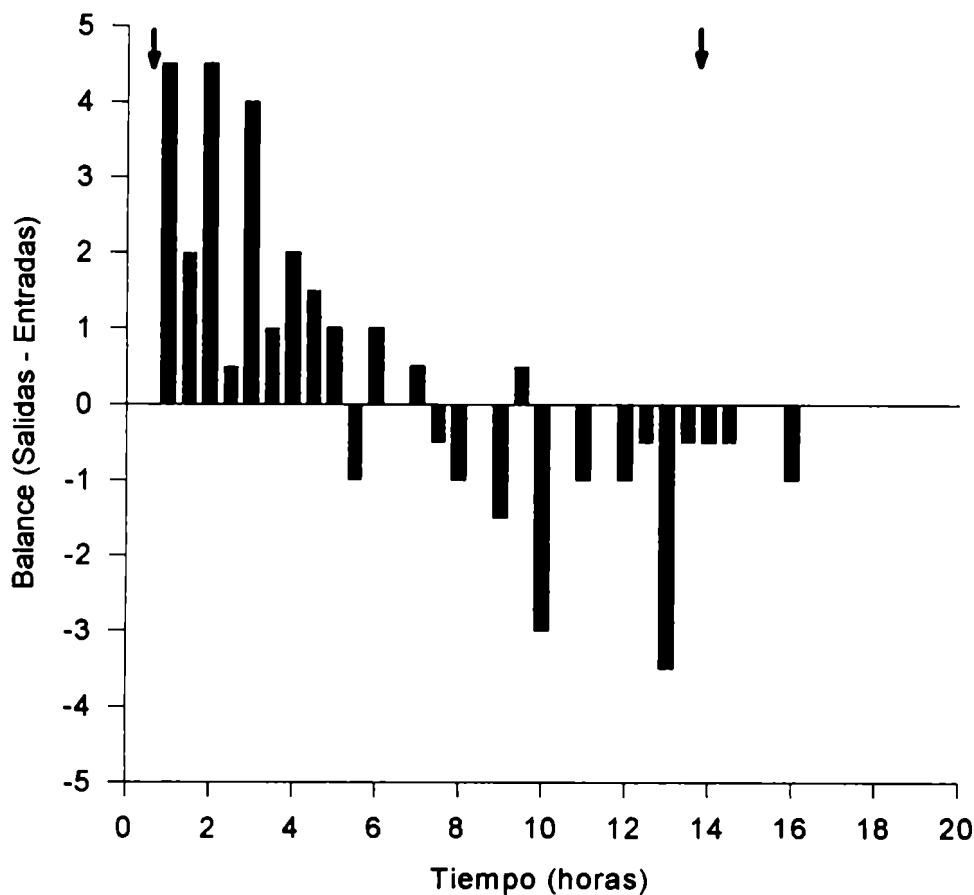


**Figura 1:** Actividad Locomotora Media registrada con insectos que presentaban un ayuno breve (una semana postecdisis) o prolongado (seis semanas postecdisis). Los valores graficados representan el número de vinchucas que cruzó alguno de los ejes arbitrarios por hora de ensayo, y corresponden al valor medio/hora de dos ensayos para cada nivel de ayuno. Las barras grises corresponden a insectos con ayuno de una semana. Las barras verdes corresponden a insectos con un ayuno de seis semanas. Las flechas en la parte superior indican el comienzo y final de la noche.

*Segunda serie: insectos con un ayuno prolongado*

En ambos ensayos desarrollados con insectos ayunados durante seis semanas, se observó una actividad locomotora mayor que en los ensayos de la primera serie (Fig. 1). En estos ensayos, la actividad persistió durante toda la noche, sin existir una división discernible en picos. En cambio, la actividad relacionada con el refugio presentó un patrón similar al observado en la primera serie de ensayos,

pero aparentemente menos insectos permanecieron dentro del refugio (Fig. 2). Los insectos salieron del refugio en las primeras horas de la noche, y luego, en las horas previas al amanecer regresaron al mismo. El balance entre el número de insectos que salieron del refugio y que entraron a éste mostró un perfil semejante al de la primera serie, *i.e.*, fue positivo para la primera mitad de la noche y negativo para la segunda (Fig. 2). Sin embargo, la magnitud de la actividad relacionada con el refugio, tanto como la de locomoción en general, fue notablemente mayor que en la primera serie.



**Figura 2:** Balance Medio de actividad relacionada con el refugio. Se computa el número de insectos que salen del refugio por hora, menos el número de insectos que entran a éste ( $N^{\text{ro}}$  de salidas -  $N^{\text{ro}}$  de entradas). Los valores graficados representan valores medios de dos ensayos por cada nivel de ayuno. El resto como en la figura 1.

### 3.4-Discusión

El patrón de actividad de *T. infestans* fue drásticamente afectado por el nivel de ayuno de los insectos, como había sido descrito por los autores previos. El ayuno prolongado generó tanto modificaciones en el patrón de actividad, como un aumento en el nivel de actividad locomotora general (Fig. 1). Los insectos poco ayunados mostraron un patrón de actividad aparentemente bimodal, mientras que los ayunados por seis semanas se mantuvieron activos durante todo el ensayo.

Los resultados muestran que las vinchucas salen de sus refugios fundamentalmente durante las primeras horas de la noche, y que existe una importante actividad de entrada al refugio hacia el final de la escotofase. Durante las horas intermedias, los insectos se mantendrían fuera de los refugios. La actividad relacionada con el refugio, *i.e.*, movimientos de salida y entrada, fue desplegada durante las mismas ventanas temporales en ambos grupos experimentales, independientemente del nivel de ayuno. Sin embargo, sí existió una diferencia en el número de individuos que salieron y entraron al refugio, dado que ambos parámetros aumentan en los animales más ayunados.

El diseño experimental utilizado permitió ofrecer a los insectos condiciones de iluminación, disponibilidad de refugios y dimensiones espaciales diferentes que las de los actómetros. De esta manera se registró el comportamiento de los insectos en un contexto algo menos restringido y un poco más parecido al ambiente real, dando una idea del sentido funcional del patrón de actividad conocido hasta el momento.

Al comparar los registros de actividad obtenidos con los previos originados en actómetros (Lazzari, 1992), se evidencia que en nuestros experimentos no se observa un patrón bimodal claramente definido que se restrinja al anochecer y el amanecer. Es importante mencionar que el patrón bimodal de actividad observado en actómetros desaparece con el aumento del ayuno (Lazzari, 1992). En ambas series experimentales presentadas en este capítulo, la actividad locomotora espontánea se mantuvo a lo largo de toda la noche. En la primera serie se

observan leves aumentos en la actividad locomotora de las vinchucas luego de la caída del sol y antes del amanecer. Esto no fue observado en la segunda serie, en la que los insectos se mantuvieron activos durante toda la noche. Un nivel de ayuno prolongado podría enmascarar la expresión de picos definidos de actividad, de la misma manera en que ocurría en los experimentos en actómetros.

Sin embargo, para el mismo ayuno prolongado, la dinámica de explotación del refugio mostró que durante la noche existen dos tipos de actividad separados temporalmente, *i.e.*, la salida y entrada del refugio, durante la primera y segunda mitad de la noche, respectivamente (Fig. 2). El patrón de actividad es consistente con la hipótesis planteada por Lazzari (1992) sobre el papel funcional de los picos de actividad observados en actómetros en las mismas ventanas temporales.

Es importante destacar que, en nuestros experimentos, la actividad de entrada a los refugios ocurre antes del amanecer, previo a que se produzca algún cambio en la intensidad de la iluminación. Este resultado, obtenido bajo condiciones de iluminación natural, se diferencia de aquel derivado de los experimentos con ciclos discretos de iluminación/oscuridad (*e.g.*, 12 hs. luz: 12 hs. oscuridad), en que se registra un segundo pico de actividad que ocurre al encenderse la luz. Sin embargo, es consistente con el hecho de que esta segunda fase activa está bajo control del reloj circadiano endógeno de las vinchucas y no resulta de una respuesta de espanto frente a la luz repentina (Lazzari, 1992). La capacidad de predecir el amanecer y anticiparse al mismo para ir a refugiarse tiene un evidente valor adaptativo, ya que le permite escapar a eventuales depredadores.

Por otra parte, estos resultados son consistentes y permiten explicar el hecho observado por diversos autores, que los insectos recién alimentados no responden a la señal de agregación presente en las heces de estos insectos (Schofield & Patterson, 1977; Lorenzo F. & Lazzari, 1993a; Lorenzo F. *et al.*, 1994). Lorenzo F. & Lazzari (1993b) establecieron que la respuesta a la señal de agregación sólo se produce al cabo de transcurridas al menos 8 horas desde la alimentación. Este intervalo parece semejante al que existe entre la expresión de los picos de

actividad relacionada con el refugio descritos en este capítulo. Por otra parte, en el capítulo 8 del presente trabajo de Tesis se presenta evidencia que indica que los excrementos de las vinchucas sirven como marcas químicas que asisten a la orientación hacia refugios. Aunque no se ha determinado experimentalmente, se puede especular con que la ingesta de sangre se realice al comienzo de la actividad nocturna diaria luego de que el insecto abandona el refugio. Es decir, los insectos se alimentarían al comienzo de la noche y no regresarían a los refugios sino hasta el amanecer. El valor adaptativo de esta respuesta podría residir en permanecer inmóvil por el mayor tiempo posible luego de alimentarse, *i.e.*, en condiciones de escasa capacidad de movimiento, y en que la diuresis tenga lugar fuera del refugio. Es válido mencionar que durante la diuresis, que en *Rhodnius prolixus* dura entre 2 y 4 horas, los triatominae eliminan en forma de exceso de agua cerca del 40-50% del fluido ingerido (Wigglesworth, 1931). Como consecuencia de esto, una gran cantidad de orina con derivados del amoníaco se eliminaría fuera de los lugares donde los insectos se refugian. Luego de este intervalo, *T. infestans* comenzaría a buscar claves de orientación que le guíen hacia un refugio, pudiendo actuar sus heces como una marca química del refugio (Lorenzo F. *et al.*, 1994). Esta hipótesis, además de ser consistente con los resultados discutidos precedentemente, lo es con observaciones realizadas en ensayos preliminares, en los que se presentaba en la arena durante la noche un hospedador (cobayo), al que los insectos tenían libre acceso para alimentarse. En las videofilmaciones de larga duración (16 horas) pudo observarse que los insectos, una vez alimentados, permanecían fuera del refugio hasta el amanecer (Lorenzo, obs. no publ.).

Nuestros resultados agregan información adicional sobre la organización circadiana del comportamiento de estos insectos. Esta información podría ser útil para ajustar temporalmente las estrategias de control de vinchucas. La información existente revela que existen ventanas temporales en las que las vinchucas podrían estar más expuestas a un ataque externo. De hecho: 1) la ecdisis y la eclosión de huevos ocurren fundamentalmente al amanecer



(Ampleford & Steel, 1982; Lazzari, 1991), siendo los insectos recién emergidos más vulnerables; 2) los insectos se alimentan a la noche, volviéndose su cutícula más permeable a ciertos insecticidas (Fontán & Zerba, 1992); 3) las vinchucas permanecen fuera de sus refugios durante la mayor parte de la noche (este reporte); 4) muestran un nivel máximo de actividad al anochecer y al amanecer, *i.e.*, muestran una tasa metabólica máxima y consecuentemente, su sensibilidad a xenobióticos podría estar aumentada. Aunque no se ha considerado hasta el momento, el ajuste de los métodos de control a los periodos de máxima sensibilidad de las vinchucas podría mejorar sensiblemente el control de los vectores de la Enfermedad de Chagas en el futuro.

## **Capítulo 4. Variación de la motivación para la búsqueda de alimento en distintas horas de la noche.**

### **4.1-Introducción**

La bibliografía existente acepta normalmente que *Triatoma infestans* sale de sus refugios para alimentarse durante las horas de la noche. En el capítulo previo se muestra que la actividad de estos insectos en relación con los refugios está mayormente acotada a las primeras horas de la noche y aquellas previas al amanecer. Más aún, en dicho capítulo se sugiere que el primer pico de actividad relacionada a refugios corresponde a la búsqueda del hospedador, mientras que el segundo correspondería a la búsqueda de refugio. Con el objeto de analizar esta hipótesis, se registró la actividad de alimentación de las chinches frente a la oferta de sangre. De este modo se intenta determinar si existen variaciones en la disposición para procurar alimento en *T. infestans* libres, a los que se les ofreció sangre en dos intervalos de tiempo distintos durante la fase oscura.

### **4.2-Materiales y Métodos**

Cada ensayo comenzó al liberar a un grupo de larvas del 4<sup>to</sup> estadio de *T. infestans* con 15 días de ayuno postecdisis, a las que se les permitió habituarse durante tres días a una arena iluminada naturalmente en la que podían encontrar un refugio artificial en uno de los extremos de la misma. En la tarde previa a la tercer noche, se ubicó un alimentador artificial (Núñez & Segura, 1987) en el extremo opuesto al refugio. El alimentador era encendido por medio de un temporizador durante tres horas, y esto se realizó a distintas horas de la noche dependiendo de la serie experimental. En la primera serie de ensayos el alimentador se encendió luego de transcurrida una hora del anochecer, y en la segunda serie tres horas antes del amanecer. La sangre se dispuso en los recipientes del alimentador por intervalos previos al encendido de igual duración. En todos los casos la sangre fue colocada en el alimentador 9 horas antes del

encendido del mismo para evitar diferencias en el tiempo de exposición de ésta a la temperatura del ambiente.

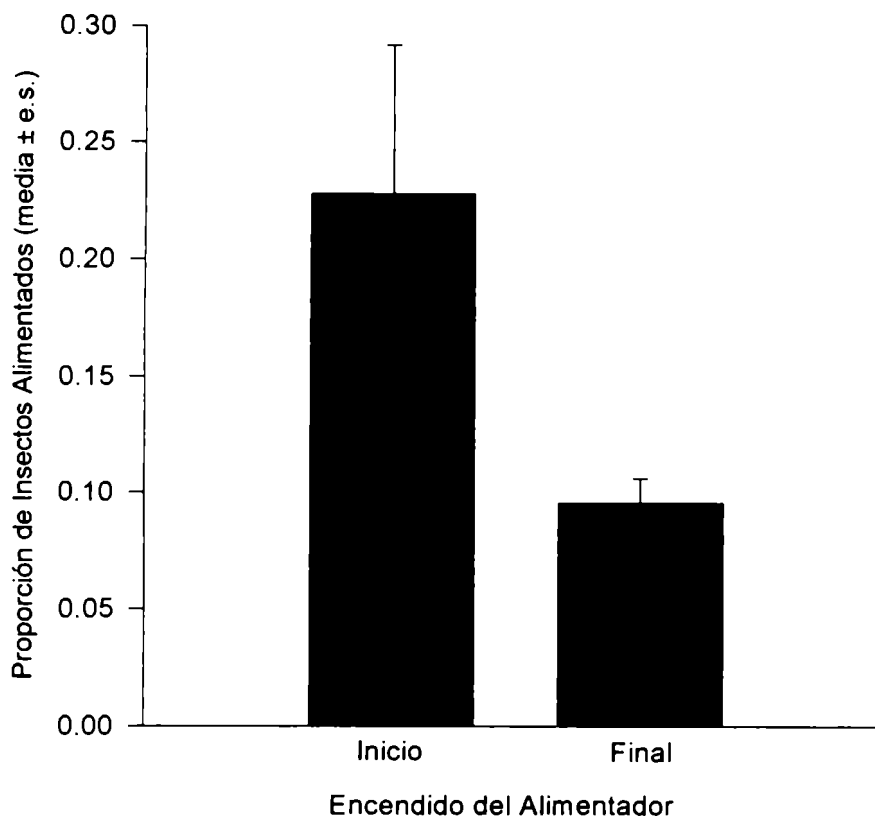
La alimentación de los insectos se monitoreó mediante el empleo de una cámara de video sensible a luz infrarroja (CCD blanco y negro; objetivo  $f=4,48$  mm./ $F=1,8$ ; sensibilidad= 0,2 lux), bajo iluminación con luz de 900 nm. de longitud de onda. La cámara fue enfocada sobre el alimentador y se activó desde 15 min. antes del encendido, hasta 15 min. después del apagado del alimentador. Al finalizar cada ensayo se contó en la arena el número de insectos que evidenciaban indudablemente haberse alimentado. Aquellos insectos que exhibían un estado dudoso fueron descartados.

Se realizaron 3 réplicas para cada horario de oferta de alimento, utilizando un total de 250 vinchucas.

#### **4.3-Resultados**

En los experimentos en los que el alimentador se encendió una hora luego del anochecer, las vinchucas se alimentaron activamente durante las tres horas en que el alimentador estuvo encendido. En esta serie, aproximadamente el 27,5 % de los insectos presentes se alimentó. En los experimentos correspondientes a la segunda serie, en los que el alimentador fue encendido durante las últimas tres horas de la noche, sólo el 8,75 % de los insectos presentes se alimentaron. La Figura 1 muestra los resultados obtenidos para los ensayos correspondientes a ambas series experimentales (prueba de  $t$  para muestras independientes, sobre datos transformados,  $P=0,043$ , g.l.= 4).

En todos los ensayos, pudo constatar en las videofilmaciones que los insectos se acercaban espontáneamente al alimentador artificial y no tenían dificultades para alimentarse. Es decir, que las diferencias en las proporciones de insectos que ingirieron sangre no se debe a variaciones en las condiciones experimentales entre ensayo y ensayo, sino a algún otro factor.



**Figura 1:** Proporción de insectos alimentados respecto del total de insectos presentes en la arena, en relación con el período de la noche en el que se ofreció alimento.

#### 4.4-Discusión

Los resultados presentados aquí muestran que las vinchucas exhiben una motivación variable para la búsqueda de alimento a largo de noche. Si se considera estos resultados y los del capítulo 3 correspondientes a la actividad de *T. infestans* en relación con refugios, podemos sugerir que estos insectos presentan diferentes picos de actividad que corresponden a ventanas temporales en las cuales la motivación por buscar hospedador y refugio están separadas.

Esto es, el patrón bimodal endógeno de actividad circadiana exhibido por *T. infestans* tendría un componente que se corresponde con la búsqueda de alimento, al comienzo de la noche, y otro, precediendo al amanecer dedicado

fundamentalmente a la búsqueda de refugios donde permanecer protegidos durante las horas de luz.

En ensayos preliminares realizados utilizando un hospedador vivo, fue observada la misma tendencia a alimentarse durante el comienzo de la noche (Lorenzo, obs. no publ.). Sin embargo, dado que en aquellos ensayos el hospedador permanecía en la arena durante toda la noche, no era posible restringir la oferta de alimento a ciertos intervalos de tiempo. Por otra parte, la actividad variable del hospedador restringió las posibilidades de repetibilidad de los ensayos. Estos inconvenientes pudieron ser salvados en este estudio mediante la utilización de un alimentador artificial, que, a pesar de constituir una opción empobrecida, permitió un mejor control de las variables experimentales.

## Capítulo 5. Efecto de la termopreferencia sobre la elección de refugios en *T. infestans*.

### 5.1-Introducción

La distribución de los triatominos en su ambiente natural no parece azarosa, sino que presenta un alto grado de agrupamiento de los insectos en rajaduras en paredes que generalmente son de adobe, y techos compuestos principalmente de material vegetal. Estos microhabitats no han sido estudiados en detalle, y sus características respecto de variables ambientales tales como temperatura y humedad relativa aún deben analizarse.

En relación con la termopreferencia, la misma ha sido estudiada experimentalmente en *T. infestans* en arenas experimentales donde se establecieron gradientes de temperatura. Di Luciano (1983) analizó la termopreferencia de larvas de 1<sup>er</sup> estadio en ensayos de corta duración, estableciendo un valor de preferencia de 26°-27°C, la que no varió con el ayuno. Por su parte, Lazzari (1991) estudió la distribución de insectos adultos que fueron expuestos a un gradiente de temperatura por un periodo prolongado. En el trabajo citado, se concluye que *T. infestans* prefiere una temperatura ambiente de 28-29 °C inmediatamente luego de alimentado; pero esta preferencia cae a 25-26 °C al cabo de 12 días de ayuno. En esos experimentos la preferencia por valores de temperatura mayores se restauraba cuando los insectos eran alimentados nuevamente. Es de destacar que *T. infestans* no exhibe un valor único de temperatura preferida. Los registros a intervalos en experimentos de larga duración permitieron determinar que a la mencionada variación con el ayuno se le agrega una variación de la termopreferencia con el ciclo diario. Las implicancias de dicha variación, relacionada con algún mecanismo de termorregulación comportamental, no serán discutidas en el marco de esta Tesis. Sólo destacaremos que la vinchuca es el primer insecto en que se describió un patrón complejo de

termopreferencia que depende del estado fisiológico (Lazzari, 1991). Este hecho resalta la importancia de analizar cómo puede influir este comportamiento en la elección de un refugio.

Los anteriores estudios fueron realizados en condiciones muy empobrecidas, *i.e.*, un gradiente de temperatura que no presentaba sitios donde los insectos pudieran refugiarse. Por lo tanto, la única variable evaluada por los insectos para elegir donde permanecer era la temperatura. Para comprender mejor las interacciones que determinan la distribución espacial de las vinchucas es necesario realizar experimentos que evalúen la importancia relativa de la temperatura del refugio en la elección de éste por parte de las vinchucas. Se presentan en este capítulo dos series de experimentos en los que se estudió la preferencia de las vinchucas por refugios que presentaban distintas temperaturas.

## **5.2-Materiales y Métodos**

### *Animales*

Los insectos utilizados durante todos los experimentos fueron larvas de *Triatoma infestans* de la colonia de nuestro laboratorio. Los animales fueron criados a 28 °C, y alimentados durante los estadios previos al de experimentación con sangre de bovino heparinizada ofrecida en un alimentador artificial.

### *Arena experimental y refugios*

Todos los ensayos se realizaron en una arena experimental de 100 x 80 cm. Esta arena estaba rodeada por paredes de vidrio para evitar que los insectos pudieran escapar. La arena fue colocada al lado de una ventana con el objeto de proveer a los insectos con luz natural. El sustrato fue cubierto con papel velado blanco, el que era reemplazado frecuentemente para evitar la acumulación de marcas dejadas por los insectos.

En la arena se ubicaron dos refugios artificiales de cartón corrugado, de 10 x 10 cm, uno en cada extremo, a 20 cm del lado más corto de la arena. La temperatura en el interior de los refugios fue establecida por medio de placas de aluminio de 10 x 10 cm. asociadas a resistencias calefactoras laminares, cuya temperatura podía ser controlada por medio de termostatos electrónicos. Las placas de aluminio eran colocadas debajo del papel que servía de sustrato en el sitio donde se ubicaban los refugios. Los sensores de temperatura, responsables del control de la misma fueron ubicados en las placas de aluminio, y el valor de referencia fue establecido midiendo la temperatura en el interior de los refugios con un termómetro electrónico.

#### *Primera serie de ensayos*

Esta serie se realizó utilizando 30 larvas del 5<sup>o</sup> estadio de *T. infestans* por ensayo, con un ayuno de 15 días postecdisis (k= 11 réplicas, N= 330). Los insectos fueron liberados en la arena, donde se ofrecieron dos refugios que presentaban distintas temperaturas en su interior. Un refugio presentaba la misma temperatura que el ambiente, *i.e.*,  $22 \pm 2$  °C, mientras que el otro presentaba una temperatura de  $32 \pm 1$  °C. Los valores de temperatura se eligieron tomando en consideración la temperatura de la superficie corporal de un mamífero (*i.e.*, ca. 32°C) y la temperatura ambiente. La posición del refugio calefaccionado era variada de un ensayo al siguiente a través de conectar alternativamente una de dos placas distintas sobre las que se ubicaban ambos refugios. Esto permitió descartar cualquier efecto debido a asimetrías del ambiente. Los insectos eran liberados en el centro de la arena al anochecer mediante el dispositivo indicado en el capítulo 1 (caja de Petri con cartón), y en la mañana siguiente se los colectaba y se contaba el número de vinchucas ubicadas dentro de cada refugio.



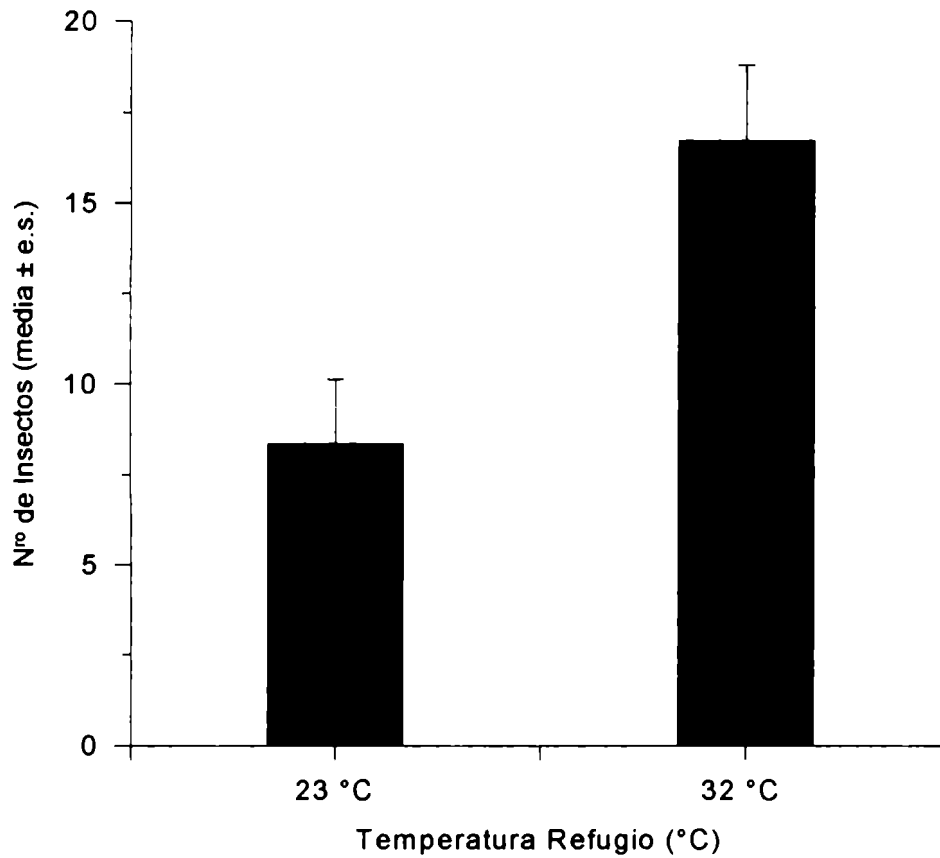
*Segunda serie de ensayos*

En los ensayos correspondientes a esta serie la temperatura de ambos refugios fue controlada. Uno de los refugios presentaba una temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , mientras que el restante tenía una temperatura interna de  $34 \pm 1^\circ\text{C}$ . La manera en que se controló la temperatura de los refugios fue la misma utilizada para los ensayos de la primera serie. La posición de ambos refugios era alternada entre ensayos. Se realizaron 6 ensayos, utilizando 40 larvas del 4<sup>to</sup> estadio con 15 días de ayuno postecdisis, en cada uno (N= 240). Los insectos eran colocados en la arena al anochecer, y en la mañana siguiente se los colectaba, contándose entonces el número de insectos ubicados dentro de cada refugio. Los valores de temperatura fueron seleccionados en virtud de los resultados obtenidos en la primera serie experimental y los antecedentes bibliográficos (ver luego). La temperatura ambiente durante los ensayos fue de  $23^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ .

Los datos obtenidos en ambas series experimentales fueron transformados y analizados estadísticamente mediante una prueba de *t* para muestras pareadas.

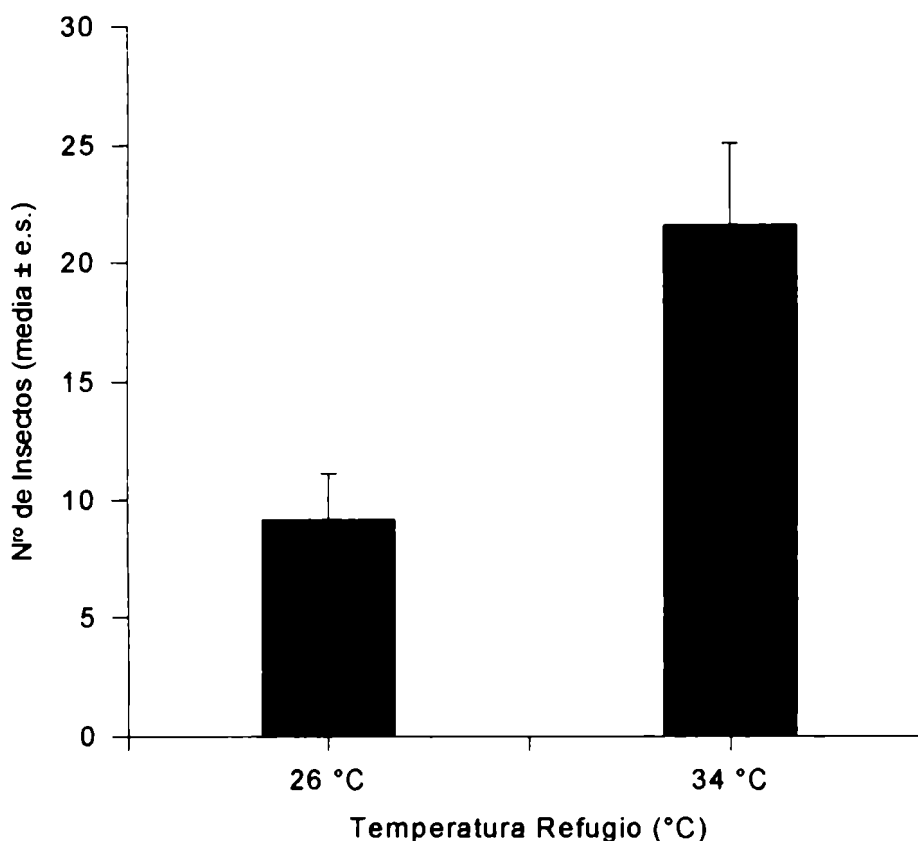
### 5.3-Resultados

En la primera serie de ensayos los insectos prefirieron significativamente el refugio que presentaba una temperatura de  $32 \pm 1$  °C ( $P= 0,023$ ;  $k=11$ ).



**Figura 1:** Número de insectos que eligieron el refugio a temperatura ambiente y el calefaccionado, respectivamente. Los valores representados son medias  $\pm$  e. s. ( $n= 30$ ;  $k=11$ ).

En la segunda serie de ensayos los insectos prefirieron significativamente el refugio que presentaba una temperatura de  $34 \pm 1$  °C ( $P= 0,029$ ;  $k= 6$ ).



**Figura 2:** Número de insectos que eligieron cada uno de los refugios a distintas temperaturas. Los valores representados son medias  $\pm$  e. s. ( $n=40$ ;  $k=6$ ).

#### 5.4-Discusión

Los resultados aquí presentados, revelan que la temperatura de los refugios potenciales afecta la elección de los mismos por las vinchucas.

*T. infestans* muestra una preferencia por refugios que presentan una temperatura mayor que la del ambiente cuando éstos son ofrecidos como alternativa a refugios a una temperatura ambiente de ca. 22°C. Cuando se estudió la elección de estos insectos frente a refugios que presentaban temperaturas de 26°C y 34°C, ambas por encima de la temperatura ambiente, los insectos prefirieron los refugios a 34°C.

Llamativamente, en su elección de refugios las chinches no revelaron la misma termopreferencia medida en gradientes de temperatura, sino que prefirieron en todos los casos el valor más alto ofrecido.

Estos resultados no son coincidentes con los obtenidos en los trabajos previamente citados (Di Luciano, 1983; Lazzari, 1991), pero sin embargo esto podría deberse a diferencias en los diseños experimentales. Los insectos utilizados en los ensayos correspondientes a este trabajo eran larvas de *T. infestans* que no habían recibido alimentación alguna durante el estadio en que fueron ensayadas. Es razonable esperar entonces que la preferencia y actividad de los insectos varíe con su estado nutricional, ya que la alimentación en los hematófagos, especialmente adultos, desencadena procesos fisiológicos que pueden afectar de manera drástica el comportamiento, *i.e.*, vitelogénesis, producción de huevos, etc. De hecho, la comparación de los resultados de Di Luciano (1983) y de Lazzari (1991) sugiere que la termopreferencia de *T. infestans* puede variar a lo largo del desarrollo ontogenético.

En nuestros experimentos se ofrecieron a las vinchucas refugios que exhibían temperaturas que, en algunos casos se correspondían con los valores preferidos indicados en la bibliografía (*i.e.*, 26°C) y cercanos al valor de adaptación en la cría, en otros, temperaturas cercanas a la de la superficie corporal de un hospedador (32° - 34°C), *i.e.*, un valor que resulta atractivo para las vinchucas en otros contextos. Si bien los ensayos de laboratorio no revelan una preferencia de las vinchucas por permanecer a estas últimas temperaturas, algunos informes y observaciones casuales destacan la tendencia de estos insectos a permanecer en proximidad de sus hospedadores en sus refugios naturales (Zeledón & Rabinovich, 1981; Basombrío, com. pers.).

Por lo tanto, la elección de un refugio a una dada temperatura donde permanecer podría estar determinada por la confluencia de distintos factores. Por un lado la termopreferencia, producto de la termorregulación comportamental en un animal ectotérmico (Lazzari, 1991) y, por el otro, el calor como clave

indicadora de la proximidad de un hospedador, al que se puede acceder fácilmente. En este caso particular, una interpretación posible de los resultados sería que los insectos ayunados procuran refugios cercanos a claves del hospedador.

## Capítulo 6. Efecto de la higropreferencia sobre la elección de refugios en *T. infestans*.

### 6.1-Introducción

Como fue indicado en el capítulo anterior, la vinchuca *Triatoma infestans* se refugia normalmente en sitio protegidos dentro de viviendas humanas. En las casas, la distribución de los insectos no es azarosa, sino que se presentan agrupados y normalmente en techos y grietas de paredes. No es frecuente que estas chinches se ubiquen en refugios en contacto con el suelo (Basombrío, com. pers.). Esta distribución podría deberse en parte a variaciones en los factores ambientales tales como temperatura y humedad relativa. Ya se ha presentado una descripción de cómo la temperatura del refugio puede afectar su elección por parte de las vinchucas. Es el turno ahora de analizar el posible efecto de la humedad relativa ambiente sobre dicha elección.

Al igual que la termopreferencia, la distribución de *T. infestans* en gradientes de humedad relativa ha sido analizada en el laboratorio. Roca & Lazzari (1994) estudiaron la distribución de estos insectos en una arena experimental que presentaba un gradiente de humedad relativa (en adelante HR). Estos autores determinaron que *T. infestans* prefiere permanecer en ambientes extremadamente secos, *i.e.*, aproximadamente 0 %. Más aún, las vinchucas prefirieron oviponer en un ambiente con un nivel igualmente bajo de HR y, llamativamente, el mayor número de exuvias fue encontrado en el sector con menor HR, indicando una preferencia de estos insectos por realizar la ecdisis en un ambiente seco. Se han postulado diversas hipótesis respecto al valor adaptativo de la xeropreferencia de *T. infestans*, las que aún no se han puesto a prueba experimentalmente. Las mismas se relacionan con defensa contra hongos patógenos, eliminación rápida de desechos metabólicos hidrosolubles que podrían resultar tóxicos para los insectos y con incrementar el contraste de los hospedadores con el ambiente, los que constituyen fuentes de humedad (Roca & Lazzari, 1994).

En el presente capítulo estudiaremos cómo la higropreferencia afecta la elección de refugios artificiales por *T. infestans*.

## 6.2-Materiales y Métodos

Los experimentos correspondientes a este capítulo fueron realizados utilizando larvas del 5<sup>o</sup> estadio de *T. infestans*. Los refugios artificiales utilizados en los experimentos de HR fueron levemente modificados respecto de los utilizados en los capítulos previos. Los nuevos refugios presentaban una abertura de 3 x 7 cm en su cara inferior, ubicada paralela a las entradas. Los refugios fueron montados sobre cajas de PVC cuadradas (10 x 10 x 2,5 cm) que eran llenadas con agua destilada o con ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 97%), las que establecían atmósferas de diferente HR sobre su superficie, esto es, en el interior de los refugios. Por lo tanto, un refugio completo consistía del pliegue de cartón corrugado más su correspondiente recipiente asociado. Los laterales de cada caja de PVC fueron cubiertos con cinta de papel con el objeto de permitir que los insectos alcanzaran los refugios de cartón en el momento en que buscaran un lugar protegido. Los recipientes de PVC presentaban su cara superior cerrada solamente por un tejido plástico de malla abierta (2 mm. de lado) para evitar que los insectos pudieran caer en su interior. Por lo tanto, la HR dentro de cada refugio dependía del recipiente con el que estuviera asociado.

Los ensayos duraban tres días y los animales podían elegir durante todo ese lapso resguardarse dentro de uno de dos refugios que presentaban un valor diferente de HR. Los refugios eran ofrecidos en los extremos opuestos de una arena de 100 x 80 cm. Los animales eran liberados suavemente desde el centro de la arena al anochecer del primer día. Luego de tres noches, el número de vinchucas halladas dentro de cada refugio fue determinado en la mañana siguiente. Posteriormente, el nivel de humedad relativa en el centro de cada refugio era medido con un termohigrómetro electrónico. Este parámetro era medido al finalizar cada ensayo, con el objeto de determinar la última opción respecto de HR

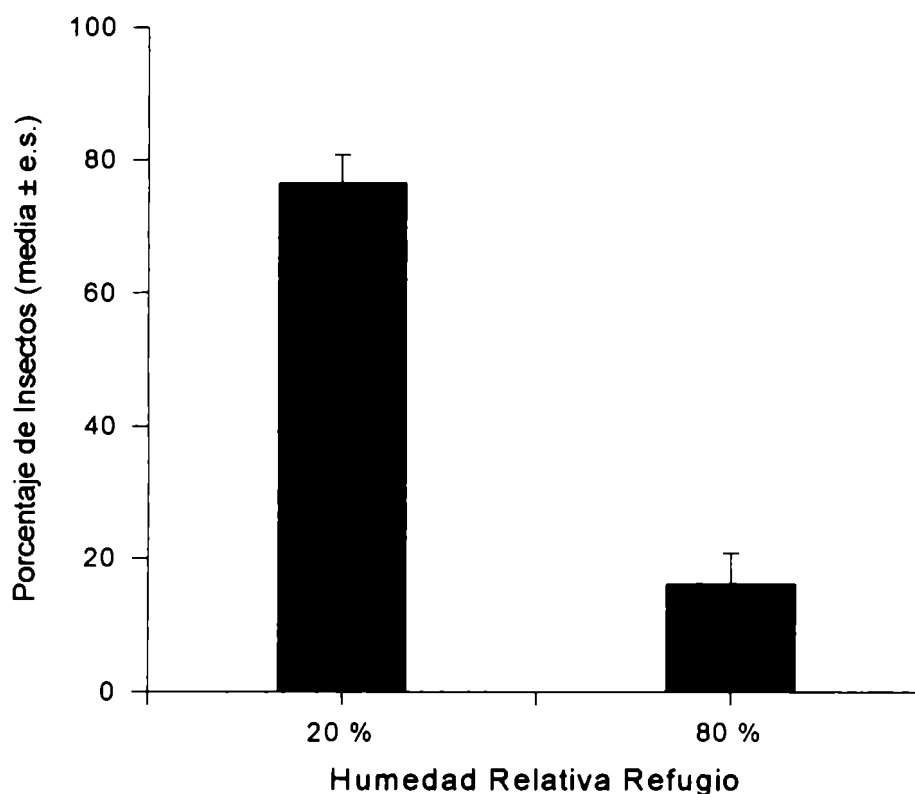
que los insectos pudieran haber elegido. El refugio asociado a agua destilada presentó una HR de  $75,8 \pm 6,4$  %. El otro, asociado a  $H_2SO_4$  presentó una media de  $24 \pm 4,1$  %. Se realizaron cuatro ensayos como parte de esta serie experimental, y el número de insectos presentes en cada ensayo varió entre 36 y 42 larvas del 5<sup>to</sup> estadio (N= 153).

### 6.3-Resultados

En la presente serie de ensayos los insectos mostraron una fuerte preferencia por los refugios con baja HR (prueba de *t* para muestras pareadas sobre datos transformados,  $P=0,0045$ ,  $k=4$ ).

Además, es válido mencionar que los insectos fueron encontrados principalmente en el centro del refugio seco, agrupados en un contacto intenso en las proximidades de la ventana que comunicaba al interior del refugio con el recipiente que contenía  $H_2SO_4$ , *i.e.*, en la parte del refugio donde el valor de HR es mínimo. El número de insectos hallado en el interior de los refugios secos fue notablemente mayor en todos los ensayos. El número de vinchucas hallado en el interior de refugios húmedos fue similar al de insectos hallados en lugares abiertos de la arena.





**Figura 1:** Porcentaje de insectos que eligieron cada uno de los refugios presentando diferentes niveles de humedad relativa en su interior. Los valores representados son medias  $\pm$  e. s. ( $k=4$ ;  $N=153$ ).

#### 6.4-Discusión

Cuando se ofreció a los insectos refugios que presentaban diferentes valores de HR, éstos prefirieron aquellos refugios que tenían una HR de 20 %. Este resultado es consistente con aquellos de Roca & Lazzari (1994) relacionados con la elección respecto de diferentes parámetros biológicos de valores cercanos al 0 % en un gradiente de HR. Esta tendencia fue constante en todos los ensayos, siendo el número de insectos hallados en refugios con alta HR casi igual a aquel de vinchucas fuera de refugios. Esto indicaría que para las vinchucas buscar protección en un lugar húmedo es semejante en calidad a hacerlo en rincones abiertos o bordes de la arena.

Estos experimentos refuerzan los resultados previos respecto de los ensayos en gradiente de HR, los que resultaron sorprendentes frente al concepto general de criar las vinchucas en el laboratorio a 70 -80 % HR (ver Curto de Casas, 1983; Núñez & Segura, 1987). Es de destacar que, a diferencia de la termopreferencia, la elección de ciertos valores de HR para permanecer no es afectada por la presencia o ausencia de refugios, enfatizando la importancia biológica de esta clave para estos insectos. Llamativamente, en la mayoría de los trabajos que intentan comprender la distribución y abundancia de las vinchucas en relación con factores climáticos, se intenta establecer correlaciones con la temperatura (máxima, mínima o algún índice térmico), sólo raramente se ha intentado involucrar a la humedad relativa o al déficit de saturación, un parámetro relacionado (Curto de Casas, 1985). Los estudios de laboratorio nos indican la necesidad de considerar a este parámetro como un factor determinante potencial de la distribución espacial de *T. infestans*. Por otra parte, resta aún estudiar el efecto de la HR sobre parámetros biológicos tales como velocidad de desarrollo, fecundidad, longevidad y desarrollo de enfermedades en estos insectos.

## Capítulo 7. Comportamiento de defecación en *T. infestans*. Distribución de deyecciones en relación con refugios\*

### 7.1-Introducción

El comportamiento de agregación de varias especies de vectores del Mal de Chagas es mediado en parte por sustancias volátiles que se encuentran presentes en sus heces (Schofield & Patterson, 1977; Lorenzo F. *et al.*, 1994). El patrón temporal de defecación fue analizado en varias especies de triatomíneos, pero sólo con la intención de estudiar el potencial de dichas especies como vectores de *Trypanosoma cruzi* (Zeledón *et al.*, 1977; Zeledón, 1981; Zárate *et al.*, 1984).

Aunque la señal de agregación presente en las heces ha sido analizada en diversos aspectos, su papel funcional no está aún aclarado. En este capítulo se describe el comportamiento estereotipado de defecación en estos insectos, y se analiza la relación espacial existente entre las deyecciones y los refugios.

### 7.2-Materiales y Métodos

#### *Animales*

Los insectos experimentales fueron larvas de *Triatoma infestans* obtenidas de la colonia del laboratorio, criadas a 28°C y alimentadas con sangre de chivo heparinizada ofrecida por medio de un alimentador artificial.

#### *Primera serie de ensayos: Descripción del comportamiento de defecación*

Se estudió la actividad asociada a refugios de larvas del 5<sup>o</sup> estadio con una semana de ayuno, mediante técnicas de videofilmación por períodos prolongados (Lorenzo & Lazzari, 1993). Se realizaron 2 ensayos, en los que se liberaron 40

---

\* Estos resultados han sido publicados en Lorenzo & Lazzari (1996)

insectos en la arena experimental en cada uno de ellos. Subsecuentemente, el comportamiento de defecación de los insectos se analizó cuadro a cuadro.

*Segunda serie de experimentos: Distribución de marcas fecales en relación con el refugio*

Cuatro bandejas de plástico blanco de 50 x 40 cm. fueron utilizadas como arenas experimentales. El piso de cada arena fue cubierto completamente con una hoja de papel de filtro a manera de sustrato. En el centro de cada arena, se colocó un refugio artificial de cartón corrugado de 10 x 20 cm plegado en su parte media, cuya superficie final resultó de aproximadamente 10 x 10 cm. Todas las arenas se colocaron cerca de una ventana, de manera tal que recibían iluminación natural.

En estas condiciones, se liberó en cada arena 40 larvas de *T. infestans* del 4<sup>to</sup> estadio recientemente alimentadas con una pequeña cantidad de sangre (N=160). El objeto de la alimentación parcial fue evitar que los insectos depositaran una cantidad muy alta de deyecciones, que hubieran hecho imposible una cuantificación de su distribución. Los insectos permanecieron en esta situación durante 30 días. Luego de este periodo, se retiró a los animales, se registró la posición de las manchas fecales en cada bandeja, almacenando en una computadora las coordenadas *x*- e *y*- de cada marca fecal, mediante el empleo de un dispositivo de digitalización desarrollado en nuestro laboratorio (Flores & Lazzari, 1996). Posteriormente, se dividió la superficie de cada arena en cuadrados de 5 x 5 cm. de lado, y se consideró a los 4 cuadrados centrales como la ubicación del refugio. Se contabilizó luego el número de deyecciones depositadas por las vinchucas en cada cuadrado. Finalmente, se analizó la variación de estos valores en relación con la posición del refugio, con el objeto de determinar la existencia de un patrón espacial de defecación en estos insectos.

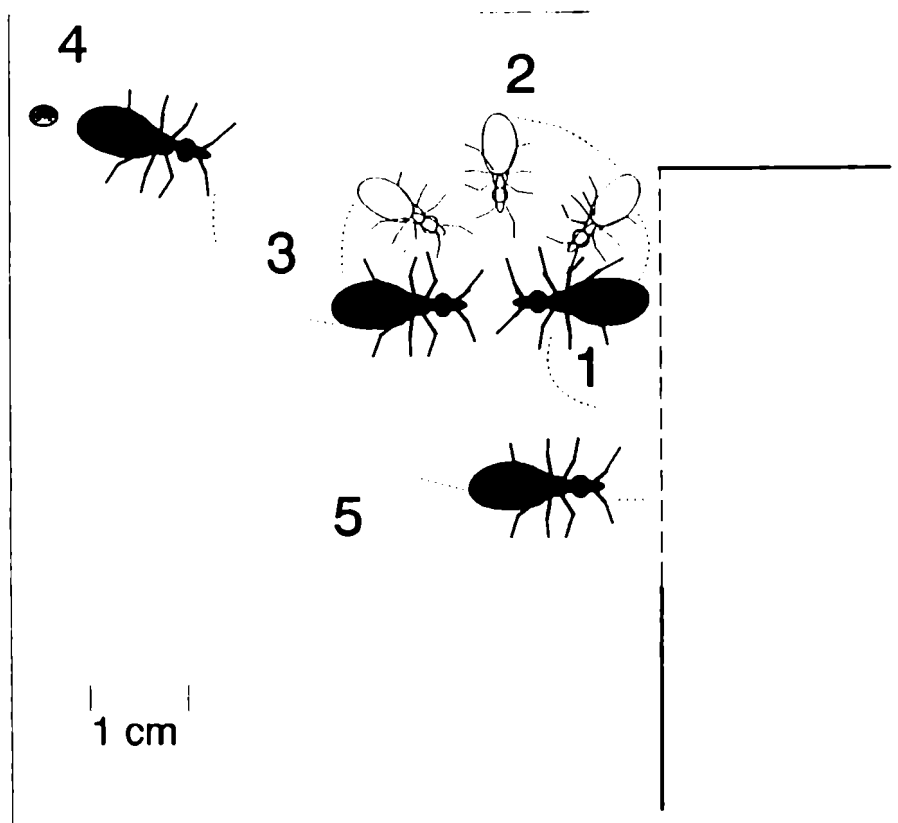
### 7.3-Resultados

#### *Descripción del comportamiento de defecación*

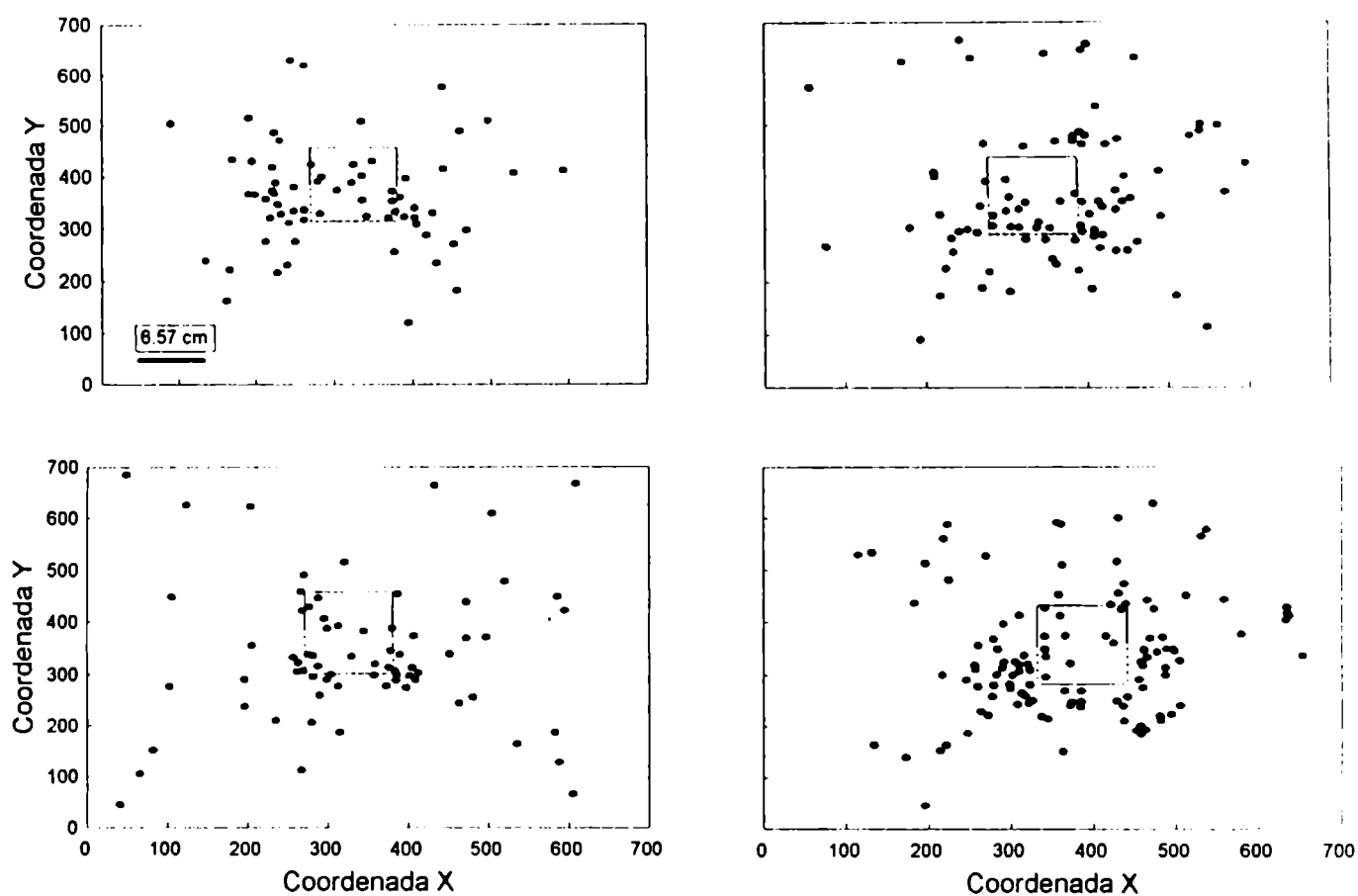
En los registros de video se observó repetidamente que los insectos salen de sus refugios para defecar, un comportamiento que resultó altamente estereotipado. Este comportamiento (Fig. 1) puede ser dividido en cinco etapas (N= 6 casos analizados): I- el insecto sale del refugio, II- una vez afuera, gira sobre sí mismo (ca. 180°), III- camina hacia atrás (entre 5 a 10 cm.), IV- luego defeca, y V- vuelve inmediatamente al interior del refugio. En otros casos, se observó insectos que al activarse defecaron en las cercanías del refugio, y luego continuaron su actividad locomotora no volviendo a entrar al mismo.

#### *Distribución de marcas fecales en relación con la posición del refugio*

Las marcas fecales se presentaron con una densidad máxima en el exterior y no en el interior de los refugios. La distribución externa, a su vez, no fue homogénea, ya que se observó una mayor concentración de excrementos cerca de los accesos del refugio (Fig. 2).

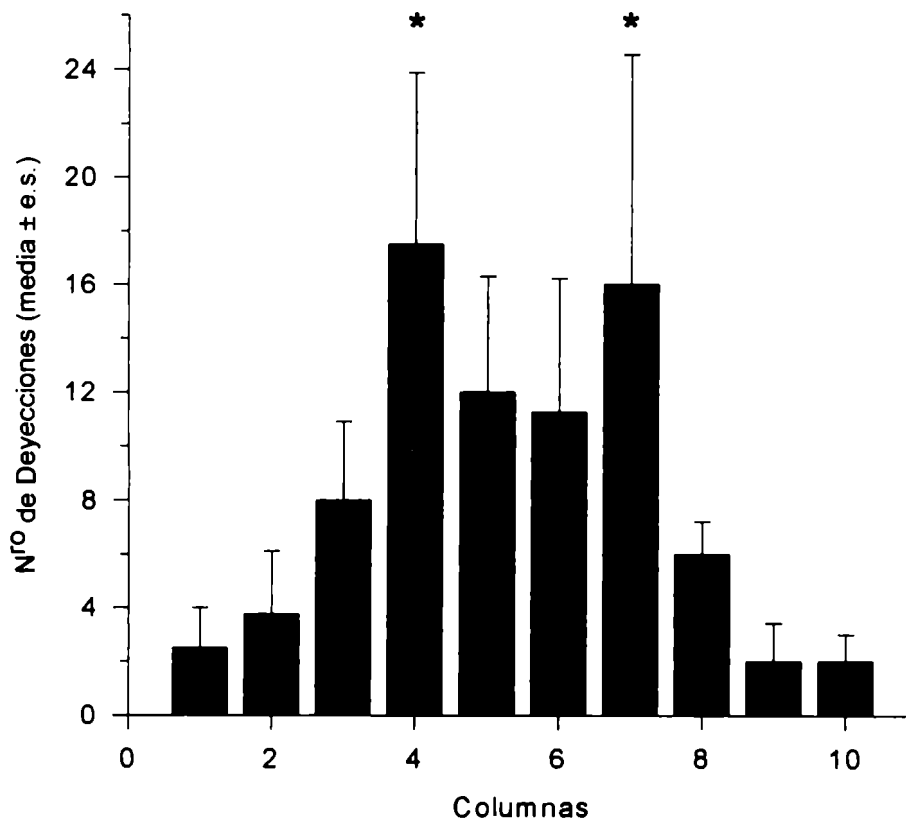


**Figura 1:** Comportamiento de defecación de *Triatoma infestans* en relación con el refugio, reconstruido de una cinta de video. El insecto abandona el refugio (1), gira 180° (2), y camina hacia atrás varios cm. (3), se detiene, defeca (4), y luego vuelve al interior del refugio(5). El comportamiento completo dura alrededor de 20 segundos.



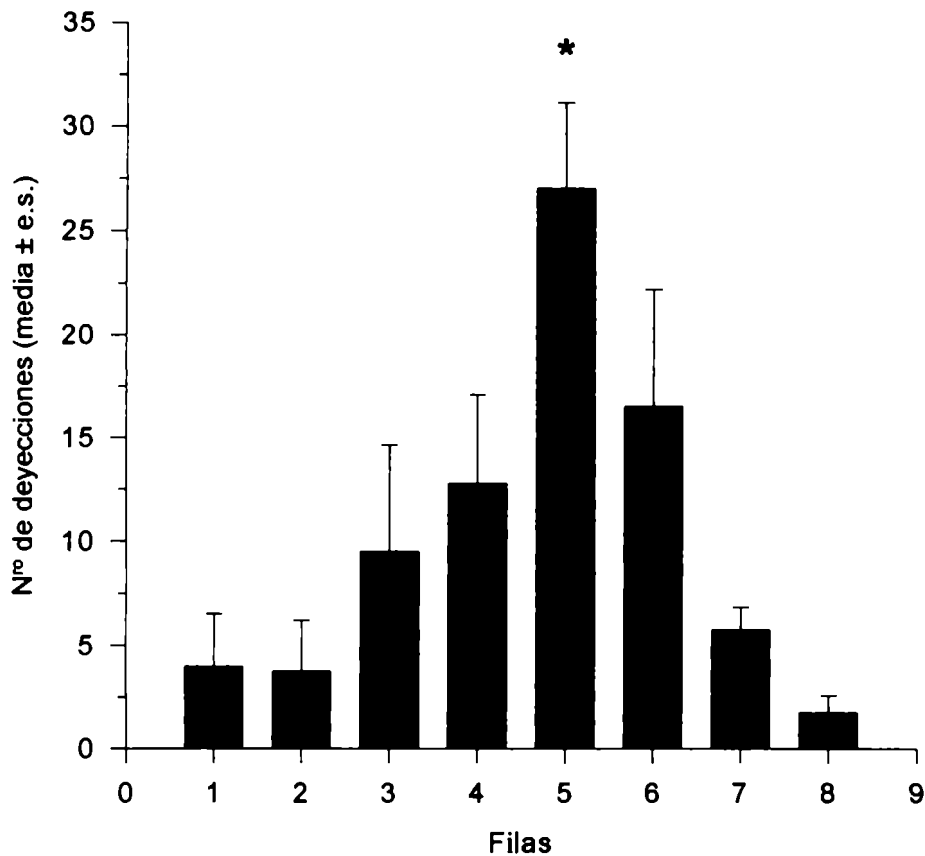
**Figura 2:** Distribución de deyecciones de 40 vinchucas en relación con el refugio (cuatro réplicas). Los cuadrados en el centro corresponden al refugio. Las líneas punteadas en los lados del refugio indican los accesos. Las abcisas y ordenadas corresponden a las coordenadas espaciales  $X$  (la más corta) e  $Y$  (la más larga), de la arena experimental.

Las Figs. 3 y 4 muestran la densidad de deyecciones por cuadro sumadas en la dirección del eje  $x$ - y del eje  $y$ -. Es destacable el hecho de que las más altas densidades correspondieron siempre a las sumas de cuadros que incluyen los accesos al refugio, pero no a las que incluyen el interior del mismo.



**Figura 3:** Número de deyecciones por cuadro sumado en la dirección del eje Y. Los asteriscos indican las columnas que incluyen los cuadros considerados accesos a los refugios.





**Figura 4:** Número de deyecciones por cuadro sumado en la dirección del eje  $x$ -. El asterisco indica la columna que incluye los cuadros considerados accesos a los refugios.

#### 7.4-Discusión

El comportamiento de defecación mostrado por *T. infestans* y el patrón resultante en la distribución espacial de las deyecciones es coincidente con observaciones de campo (Lorenzo, obs. no publ.) sobre la distribución de las heces, *i.e.*, la máxima densidad ocurre en las cercanías de rajaduras en las paredes y de otros refugios naturales, mientras que el interior de los refugios permanece comparativamente limpio.

Distintos autores han demostrado que los triatominos son atraídos y que se agregan cerca de sus propias heces (Schofield & Patterson, 1977; Lorenzo F. *et al.*, 1994). Sumando esto a la información ahora disponible, podemos plantear

una hipótesis de trabajo contrastable sobre el papel funcional de este efecto atractivo de las heces. Sugerimos que éstas actuarían como marcas químicas que podrían asistir a la orientación de las vinchucas hacia sus refugios.

Además, estos resultados aportan información útil para el mejoramiento de los sensores existentes, los cuales se basan en la detección en su interior de signos de la presencia de vinchucas (*e.g.*, deyecciones, exhuvias, etc.). Los experimentos presentados en este capítulo demuestran que el interior de refugios artificiales acumula menos marcas fecales que sus alrededores. Por tanto, considerar sólo la presencia de deposiciones dentro de un sensor puede disminuir la sensibilidad del mismo y hacer que se subestime el nivel de infestación del ambiente evaluado.

## Capítulo 8. Las heces como marca del refugio\*

### 8.1-Introducción

En el capítulo anterior se estudió el comportamiento que estos insectos despliegan al defecar cuando se encuentran en un refugio, y además se analizó la distribución que, como consecuencia de dicho comportamiento, presentan las heces en relación con el refugio. En este capítulo se estudia la posible función de la respuesta de agregación alrededor de las heces que presentan las vinchucas (Schofield & Patterson, 1977; Lorenzo F. *et al.*, 1994) basándose en los resultados obtenidos en la sección previa. Se analiza aquí la posibilidad de que las heces funcionen como una marca química asociada al refugio. Además, se estudia si la ubicación de las heces en el interior o el exterior del refugio modifica la elección de éste por parte de los insectos.

### 8.2-Materiales y Métodos

*Primera serie de experimentos: refugios con heces en su interior.*

Se utilizaron larvas del 5<sup>o</sup> estadio de *T. infestans* criadas en la colonia de nuestro laboratorio con sangre de bovino heparinizada mediante el uso de un alimentador artificial. Los experimentos tuvieron una duración de una noche completa, y se realizaron en una arena experimental de 100x 40 cm. que presentaba dos refugios del tipo utilizado en el capítulo anterior. Cada refugio fue ubicado a 10 cm del borde menor, en lados opuestos de la arena. Se ofrecieron dos tipos de refugio: a) un refugio con una pieza de papel de filtro de 5,5 x 5,5 cm. en su interior, impregnada con heces secas, y b) otro con una pieza de papel de filtro limpio del mismo tamaño, como control. En ambos tipos de ensayos, se utilizaron heces depositadas con tres días de anticipación. Los insectos fueron liberados al anochecer desde una cápsula de Petri ubicada en el centro de la arena

---

\* Estos resultados han sido publicados en Lorenzo & Lazzari (1996)

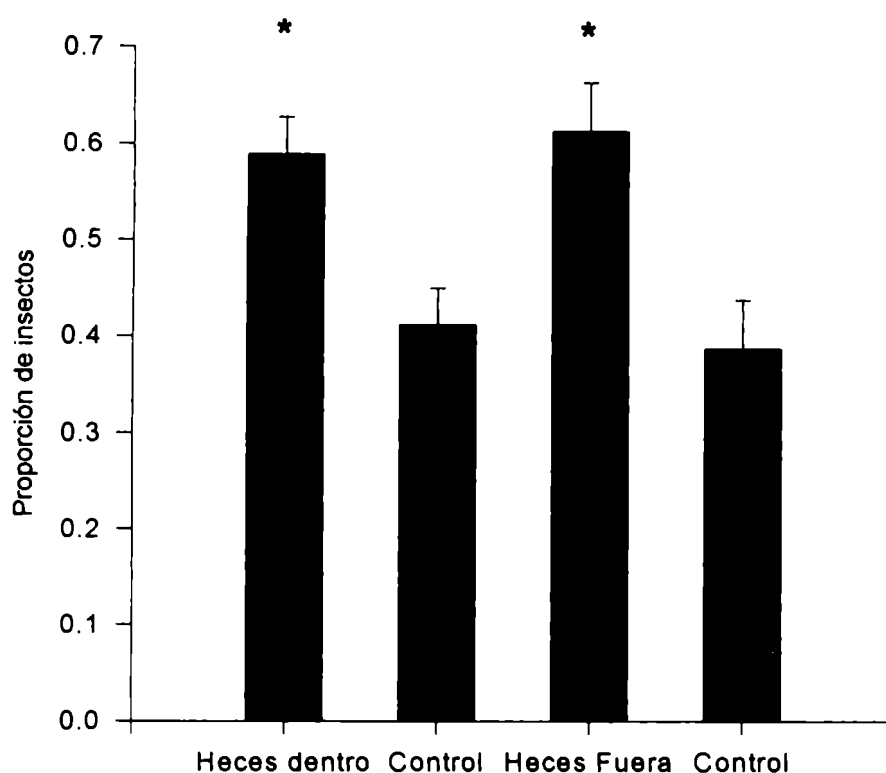
utilizando el mismo método del Capítulo 2 de la presente Tesis. En la mañana siguiente se contó la cantidad de vinchucas presentes en el refugio experimental y en el control.

### *Segunda serie de experimentos*

También se utilizaron larvas del 5<sup>o</sup> estadio de *T. infestans* ensayadas en la misma arena experimental durante una noche. Dos refugios fueron ubicados en lados opuestos de la arena. Se ofrecieron dos tipos de refugio: a) un refugio ubicado sobre una pieza de papel de filtro de 20 x 20 cm contaminado con excrementos, de manera tal que las heces rodeaban el refugio, y b) otro sobre una pieza de papel de filtro limpio como control. El resto de los procedimientos se repitieron del mismo modo que en la primera serie.

### **8.3-Resultados**

Los refugios que presentaban un papel impregnado en su interior fueron preferidos significativamente respecto de los controles (Fig. 1). La prueba de *t* para muestras pareadas sobre datos transformados calculando el arcoseno de la raíz cuadrada de cada proporción (Zar, 1984) reveló una diferencia estadísticamente significativa (N=130, k=6, P=0,043). También los refugios rodeados por heces fueron preferidos significativamente respecto de los controles (Fig. 1: prueba de *t* para muestras pareadas sobre datos transformados, N=152, k=6, P=0,048). La preferencia por los distintos refugios experimentales no presentó diferencia significativa (Prueba de *t* de Independencia, P=0,71)



**Figura 1:** Proporción de insectos que eligieron el refugio asociado a heces (dentro o solamente alrededor), y su respectivo refugio control, en relación con el total de insectos hallados en refugios. Los valores representados son medias  $\pm$  e. s. ( $k=6$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del correspondiente control.

#### 8.4-Discusión

En el capítulo anterior se determinó que el comportamiento de defecación de *T. infestans* y el patrón espacial de deyecciones que éste genera son concordantes con observaciones de campo de la distribución de heces.

Se ha demostrado que los triatominos son atraídos hacia sus propias heces secas, y que además, se agregan en su proximidad (Schofield & Patterson, 1977; Lorenzo F. *et al.*, 1994). A partir de la información mencionada, pusimos a prueba la hipótesis de que las heces secas sirven como marca de los accesos a refugios permitiendo a los insectos que se encuentran en su búsqueda, orientarse

en sus proximidades. Los resultados presentados en este capítulo demuestran que los insectos prefieren significativamente refugios que presentan heces en su interior. Más aún, los insectos prefirieron significativamente refugios que sólo presentaban heces en sus accesos aunque el interior estuviese limpio. Este último resultado es relevante, ya que demuestra que no es necesaria la presencia de heces en el sitio donde se agregan los insectos para que éstos lo prefieran, sino que es suficiente con que las heces se encuentren en el acceso. Sugerimos entonces que las heces actuarían como marcas de terreno olfativas que ofrecerían información a las vinchucas sobre la proximidad de un refugio que está siendo utilizado en la actualidad, y las guiarían a su acceso. La persistencia de la marca hasta 12 días (Lorenzo F., com. pers.) de depositadas las heces, evitaría la orientación de los insectos hacia refugios que no se encuentran en uso. De esta manera, un refugio con heces atractivas resultaría una señal indirecta de la disponibilidad presente de alimento en las cercanías del mismo.

Estos resultados pueden resultar de utilidad para el desarrollo de nuevas herramientas de control. Dado que no sólo contamos con un atrayente, sino que conocemos el contexto comportamental en el cuál éste afecta el comportamiento de las vinchucas, la utilización de las heces en prototipos de trampas/sensores para el monitoreo de poblaciones de vinchuca merece ser considerada. De hecho, en este trabajo se ha presentado un diseño muy sencillo y de bajo costo que es capaz de reclutar activamente vinchucas a su interior, constituyendo un primer paso en este sentido.

## Capítulo 9. Condiciones microclimáticas y distribución de deyecciones en refugios seminaturales.

### 9.1-Introducción

Como se ha señalado en los capítulos precedentes, la elección de refugios por parte de las vinchucas se ve afectada por factores ambientales (*i.e.*, temperatura y humedad relativa), así como por señales de comunicación intraespecífica (*i.e.*, marcas fecales). Para comprender cómo estos factores podrían afectar la distribución espacial de las vinchucas, es necesario contrastar estos resultados con datos obtenidos en el campo. La mayoría de los estudios de distribución de vinchucas en su ambiente natural se basan, como hemos señalado con anterioridad, en correlaciones con factores climáticos a nivel regional, siendo escasas las referencias a las condiciones microambientales ocupadas por las vinchucas. Por su parte, Rabinovich (1985) señala: *"...el hecho que utilizan abrigos y refugios generalmente muy cercanos a los habitáculos de sus hospedadores, les provee de un microclima que amortigua radicalmente los factores macroclimáticos con los cuales los trabajos arriba mencionados hacen su análisis en términos de distribución geográfica"*. Schofield (1984), presenta un gráfico extraído de un informe previo (Gorla, 1983, Informe técnico CONICET, Buenos Aires, 75 pp.), en el que se muestra la correlación entre los valores de temperatura interna y externa de un gallinero experimental. En el mismo puede apreciarse una cierta amortiguación del intervalo más bajo de temperaturas. Sin embargo, dada la preferencia de *T. infestans* por ubicarse en el interior de grietas en paredes o techos de viviendas y sus comportamientos de termo- e higropreferencia activa, es necesario investigar las condiciones microclimáticas del interior de los refugios. Hasta el presente no se han publicado estudios de esta naturaleza, a pesar del interés que reviste tanto por su importancia ecológica, como por sus implicancias para el control (*e.g.*, persistencia y efectividad de insecticidas).

Por otra parte, se ha discutido en los capítulos anteriores el comportamiento de defecación de las vinchucas y la función de los excrementos como marcas de refugio. Resulta de interés, entonces, conocer si dicho comportamiento da lugar a algún patrón particular de distribución de marcas fecales en refugios naturales.

En este capítulo se presentarán algunos datos descriptivos sobre la relación entre variaciones de temperatura y humedad relativa en sitios que simulan los lugares que naturalmente ocupan las vinchucas y su relación con variaciones climáticas locales. Se relatan, además, algunas observaciones sobre la distribución de excrementos en dichos ambientes.

## 9.2-Materiales y Métodos

Los estudios se realizaron en el Centro de Reservorios y Vectores del Servicio Nacional de Chagas, sito en la localidad de Santa María de Punilla, Córdoba. En el mencionado Centro, sito en una zona perteneciente al área de distribución natural de *T. infestans*, se han establecido colonias de vinchucas en gallineros contruidos utilizando los mismos materiales empleados en las viviendas que colonizan estos insectos naturalmente. En estos gallineros se mantienen de manera exitosa y sostenida colonias de *T. infestans*, bajo condiciones climáticas naturales (Cécere *et al.*, 1995). En dichos gallineros, de paredes de adobe y techos de material vegetal (jarilla) se realizaron mediciones de temperatura y humedad relativa en refugios, así como en el exterior.

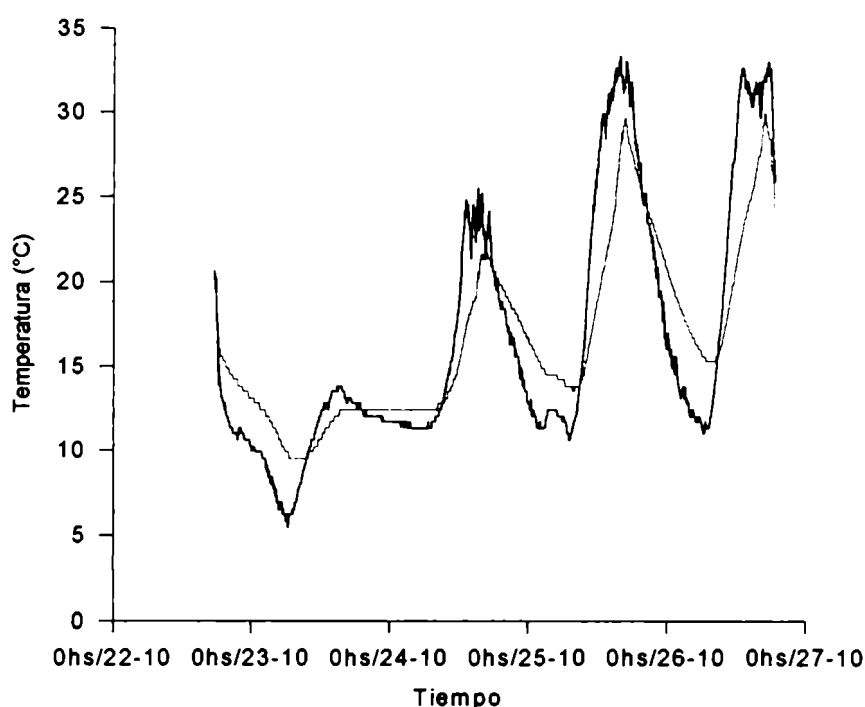
Los registros se realizaron utilizando sensores de temperatura programables (Tinytalk II, Gemini Dataloggers LTD, UK) que permitieron registrar simultáneamente, cada 3 minutos, la temperatura de un refugio entre adobes y la de un sitio externo al gallinero, ubicado a la sombra que se consideró como referencia. Por otra parte, se registró de la misma manera la humedad relativa, utilizando sensores para esta variable (Tinytalk II, Gemini Dataloggers LTD, UK) ubicados en el techo de jarilla de un gallinero, que simula un techo de rancho típico, y en un sitio a la sombra que se tomó como referencia. Todas las



mediciones se realizaron entre los días 22 al 27 de octubre de 1996 de manera continua.

### 9.3-Resultados

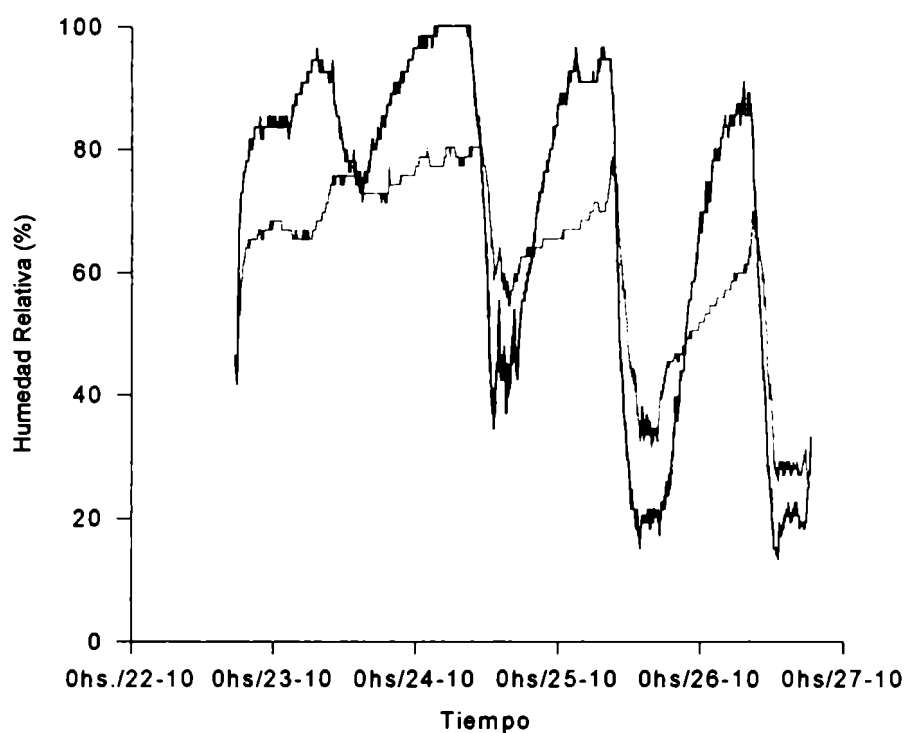
La figura 1 muestra los registros de temperatura obtenidos. Respecto de estas mediciones es posible observar que las temperaturas máximas y mínimas se hallan sensiblemente amortiguadas en el refugio, además de presentar un cierto desfase que las retrasó respecto de las externas. El periodo de muestreo permite comparar diferentes situaciones climáticas dado que ocurrieron tanto días fríos como cálidos en forma consecutiva.



**Figura 1:** Registros de temperatura realizados entre los adobes de una pared de un gallinero experimental (línea roja) y en el ambiente (línea azul). Los registros se realizaron durante cinco días, tomándose medidas cada 3 minutos.

La figura 2 presenta los resultados de las mediciones de humedad relativa. Las mismas muestran también una importante amortiguación, y como en el caso de la temperatura, un cierto retraso en la ocurrencia de los valores extremos.

En relación con la distribución de deyecciones, el patrón observado fue el corriente, de chorreaduras en las paredes, cercanas a las rajaduras de las paredes donde estaban refugiados los insectos.



**Figura 2:** Registros de humedad relativa realizados en el techo de jarilla de un gallinero experimental (línea roja) y en el ambiente (línea azul). Los registros se realizaron durante cinco días, tomándose medidas cada 3 minutos.

#### 9.4-Discusión

Una característica ambiental relevante de los sitios donde se encuentran vinchucas es una importante capacidad de amortiguación de la temperatura y humedad relativa extremas. A esto se agrega, además, la falta de iluminación de los refugios, que se corresponde bien con la marcada escotopreferencia que manifiestan las vinchucas (Reisenman & Lazzari, 1996).

A pesar de ciertas limitaciones técnicas y de tiempo en campaña, pudieron realizarse medidas preliminares que nos dan una idea de que los refugios preferidos por las vinchucas presentan características microclimáticas diferentes del ambiente externo. La comparación de los experimentos realizados en laboratorio presentados en los capítulos 5 y 6, con los mapas de distribución de *T. infestans* y del clima de esas regiones (Curto de Casas, 1985) sugiere que los parámetros aquí estudiados representan un aspecto relevante para comprender el desarrollo y distribución de poblaciones de estos triatominos. Por otra parte, ayudan a comprender ciertos aspectos del comportamiento de las vinchucas que pueden ser afectados por dichas variables. Por ejemplo, ha sido demostrado experimentalmente que la actividad de las vinchucas depende de la temperatura ambiente, sufriendo ésta una gran reducción a valores menores a 20°C (Lazzari, 1992). La amortiguación y el desfasaje de los valores extremos de temperatura externa, que ocurre en el interior de los refugios, les permitiría a las vinchucas mantenerse activas, aún en momentos en que los valores de temperatura exterior caen por debajo de aquel valor umbral. Por ejemplo, en noches frías que siguen a días cálidos, los refugios tendrán, al comienzo de la fase oscura, una temperatura suficientemente alta como para permitir la activación (eventualmente alimentación) de los insectos.

En los sitios donde se encuentran vinchucas dentro de gallineros de cría de triatominos, se observa que el interior de estos refugios se mantiene relativamente limpio. En la parte externa de los mismos, especialmente debajo de los accesos, se acumula una gran cantidad de marcas fecales. Esto ha sido observado no sólo en los gallineros utilizados en el presente estudio, sino en cuyeras experimentales construidas con ladrillos, ubicadas en la localidad de Cobos, Pcia. de Salta (Lorenzo & Lazzari, obs. no publ.). Esta distribución particular es consistente con el comportamiento de defecación descrito en la presente Tesis, así como con la distribución de deyecciones observada en los experimentos del mismo capítulo.

Nuevamente, los resultados obtenidos en el campo se corresponden con aquellos colectados en el laboratorio bajo condiciones controladas experimentalmente.

## Capítulo 10. Trampas cebadas con atrayentes naturales. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* Hansen y las heces como cebos potenciales para capturar vinchucas\*

### 10.1-Introducción

El conocimiento de diversas sustancias atrayentes para *Triatoma infestans* constituye el primer paso para su potencial utilización como cebos en trampas para capturar vinchucas. En los capítulos 7 y 8 de este trabajo de Tesis se determinó la efectividad de las heces de vinchuca para atraer a estos insectos hacia refugios artificiales. Es un hecho conocido que durante la búsqueda de alimento las vinchucas son atraídas por calor y olores liberados por hospedadores de sangre caliente, *e.g.*, CO<sub>2</sub>, ácido láctico (Lazzari & Núñez, 1989 a; Núñez, 1987). Sin embargo, hasta el momento no se ha intentado aplicar tales conocimientos al desarrollo de métodos de control de triatominos.

Actualmente, se utilizan cajas de cartón que ofrecen refugio a los insectos, para monitorear poblaciones de triatominos (Gómez Núñez, 1965; Wisnivesky-Colli *et al.*, 1987). Éstas representan una herramienta muy útil para la detección temprana de vinchucas (TDR News, 1992), lo cual es un requerimiento fundamental de los programas de control de vectores del Mal de Chagas. En estas cajas, los insectos pueden entrar y salir libremente, aunque esto último se vería dificultado por lo intrincado de su interior (Wisnivesky-Colli *et al.*, 1987). Estos sensores están diseñados con el objeto de permitir la detección de cualquier signo de la presencia de vectores (*e.g.*, insectos, huevos, excrementos, exuvias, etc.), pero no específicamente para atrapar insectos. Por otra parte, estas cajas sólo ofrecen refugio a los insectos que las encuentran accidentalmente, ya que no son capaces de atraer activamente a las vinchucas a su interior. Una trampa que presente una sustancia atrayente para vinchucas, que reúna insectos en su interior

---

\* Estos resultados han sido publicados parcialmente en Guerenstein *et al.* (1995)

y los capture, constituiría un detector de la presencia de vinchucas más sensible, y más aún, podría ser utilizado para reducir el número de insectos presentes en el ambiente.

Las heces de los triatominos representan una sustancia que podría ser empleada en trampas de captura, ya que reclutan activamente a las vinchucas. Por otra parte, se acepta generalmente que el dióxido de carbono sirve como clave olfativa de orientación al hospedador en virtualmente todos los insectos hematófagos (Lehane, 1991). Éste ha sido utilizado como cebo en trampas para dípteros (Vale & Hall, 1985; Hayes *et al.*, 1993; Van Essen *et al.*, 1994). Sin embargo, dados los métodos usuales de liberación de CO<sub>2</sub>, éste es considerado como poco práctico y costoso para propósitos de control a campo (Vale & Hall, 1985; Green, 1993; Vale, 1980; 1986).

El CO<sub>2</sub> es uno de los productos principales que liberan los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* Hansen en aerobiosis. Por esa razón y, dadas las ventajas que presenta la levadura en cuanto a disponibilidad y bajo costo, tales cultivos fueron ensayados en su capacidad para atraer a *T. infestans*. En ensayos olfatométricos, Guerenstein *et al.* (1995) demostraron que las vinchucas responden orientándose hacia corrientes de aire que transportan volátiles liberados por cultivos de levadura de pan. Esta respuesta fue de una intensidad no discriminable estadísticamente de la respuesta obtenida frente a olores liberados por un ratón.

En este capítulo se presenta un dispositivo (Fig. 1) que fue desarrollado en nuestro laboratorio, el que permite capturar insectos una vez que éstos se arrojan en su interior. Este dispositivo se basa en el hecho que las vinchucas se dejan caer ante signos de la presencia del hospedador, si éstos las alcanzan desde abajo. De hecho la voz quechua “vinchuca”, significa “lo que cae” (Schofield, 1994). En este capítulo se presentan los resultados obtenidos al ensayar diversos productos naturales, *i.e.*, cultivos de levadura y heces, incorporados como cebos a las trampas.

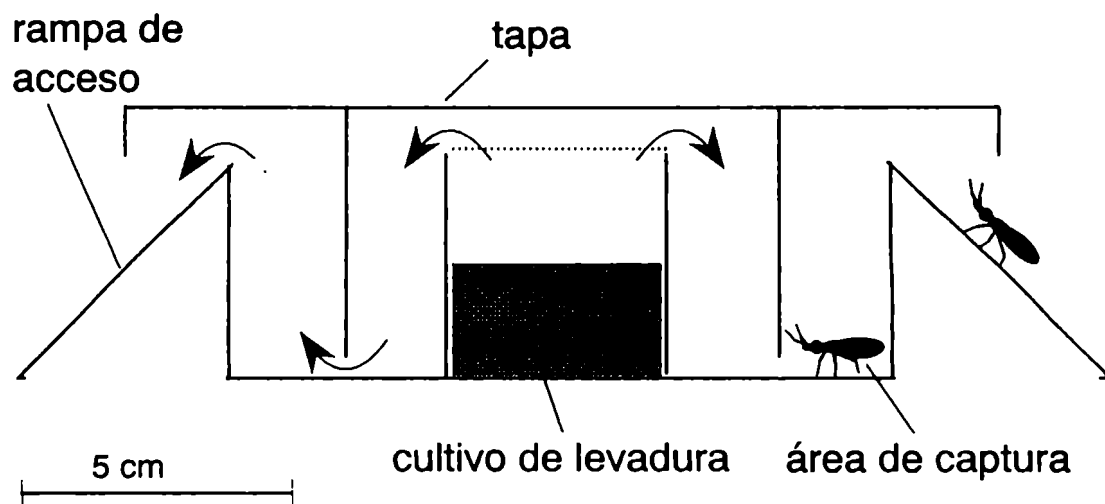
## 10.2-Materiales y Métodos

Los animales experimentales fueron larvas de *T. infestans* criadas en nuestro laboratorio, y alimentadas con sangre de bovino (serie 1) o de chivo (serie 2) heparinizada, por medio de un alimentador artificial (Núñez & Lazzari, 1990). El nivel de ayuno de los insectos utilizados para los ensayos fue de entre 15 a 60 días postecdisis. Respecto de los parámetros comportamentales medidos en este trabajo, no se encontraron diferencias en las respuestas de los insectos dentro del mencionado intervalo de ayunos (Guerenstein *et al.*, 1995).

Luego de los resultados obtenidos con la levadura en olfatómetros (Guerenstein *et al.*, 1995), y con las heces en refugios artificiales, se ensayaron estas sustancias para su potencial utilización como cebos para las trampas antes mencionadas. La trampa se desarrolló basándose en el principio aplicado en los olfatómetros diseñados por Guerenstein *et al.* (1995), esto es, los insectos podían arrojarse en su interior, pero no podían escapar.

Los experimentos de la serie 1 fueron realizados en una arena experimental de 40x100 cm, cuyo piso fue cubierto con papel velado blanco a manera de sustrato. En la serie 2 se utilizó una arena de 100 x 80 cm., cuyo piso fue cubierto del mismo modo. Ambas arenas estaban rodeadas por paredes de vidrio que impedían que los insectos treparan los laterales. Los cultivos de levadura utilizados como cebos se prepararon del siguiente modo: 1) 6 gr. de levadura fresca + 4 gr. de sacarosa + 30 ml. de H<sub>2</sub>O, ó 2) 1 gr. de levadura deshidratada + 4 gr. de sacarosa + 10 ml. de H<sub>2</sub>O.

En ambas series, dos trampas fueron colocadas en los extremos opuestos de la arena (alejadas a 10 cm. de los bordes cortos de la misma). Una trampa contenía el cebo a ensayar (serie 1: cultivo de levadura en sacarosa preparado a



**Fig. 1** Trampa cebada para vinchucas. El dispositivo consiste de una rampa de acceso de forma circular, desde la cual los insectos pueden arrojarse al interior de un recipiente de plástico del cual no pueden escapar. En el centro de la misma se ubicó o un recipiente menor, que contenía un cultivo de levadura o trozos de papel de filtro impregnados con ca. 40 mg. de heces, o su correspondiente control. Desde este lugar, las sustancias volátiles descendían al piso de la trampa, donde alcanzaban una serie de aberturas en el borde de un recipiente invertido. Desde allí, estas sustancias difundían hacia arriba, alcanzando el borde superior de la rampa (flechas). Una tapa oscura evitaba la dilución en el ambiente de las sustancias ascendentes. Cuando los insectos alcanzaban el borde superior de la rampa, podían percibir los olores que los alcanzaban desde abajo. Experimentos preliminares revelaron que las vinchucas sólo se arrojan al interior de la trampa cuando los volátiles las alcanzan desde abajo.



partir de levadura fresca o deshidratada, serie 2: trozos de papel de filtro con ca. 40 mg. de heces secas de *T. infestans*) y la otra el correspondiente control (serie 1: la solución de sacarosa utilizada como medio de cultivo; serie 2: papeles de filtro limpios).

Los ensayos comenzaban al ser liberadas las larvas de *T. infestans* en el centro de la arena dentro de una caja de Petri cerrada. En la serie 1 se utilizaron 20 larvas del 4<sup>o</sup> estadio (ensayos con levadura fresca) o 28 del 5<sup>o</sup> estadio (ensayos con levadura deshidratada). En la serie 2 se utilizaron 40 larvas del 4<sup>o</sup> estadio por ensayo. Luego de 15 min., la tapa que cubría la caja con los insectos era abierta suavemente, a partir de lo cual los insectos se encontraban libres para recorrer la arena. Los experimentos duraban toda la noche, comenzando con la caída del sol. En la mañana siguiente se contaba el número de insectos capturado por cada trampa.

La arena experimental se ubicó a un metro de una ventana amplia con el objetivo de proveer al ensayo de iluminación natural. Para compensar posibles asimetrías externas, la posición de las trampas control y experimental se cambió en los ensayos sucesivos. La significación estadística de los resultados fue analizada sobre datos transformados (arcoseno de la raíz cuadrada de las proporciones; Zar, 1984). Se utilizó la prueba de *t* para muestras pareadas con el objeto de comparar la atracción ejercida por las trampas experimental y control. La comparación entre la eficiencia de captura de la levadura fresca y la deshidratada se realizó por medio de la prueba de *t* para muestras independientes.

### 10.3-Resultados

La trampa resultó efectiva para capturar vinchucas en una arena experimental. El agregado de levadura mejoró considerablemente la capacidad de capturar vinchucas del dispositivo, mientras que el agregado de papeles con heces resultó inefectivo para reclutar a los insectos al interior de las trampas ( $t = n.s.$ ). En promedio, más del 50 % de los insectos presentes en la arena en los ensayos con

levadura fueron capturados en una sola noche. (Tabla I). El número de insectos capturados por la trampa cebada con ambos tipos de levadura fue significativamente mayor que el capturado por la trampa control (Tabla I). No se observó un efecto significativo debido a la posición de las trampas experimental y control en la arena. La levadura fresca y la deshidratada no mostraron diferencias respecto de su atractividad ( $t= 0.1$ , n.s.).

**Tabla I.** Resultados obtenidos con trampas cebadas con levadura. **Capturas:** proporción del total de insectos presentes en cada ensayo de una noche de duración, que fueron atrapados por ambas trampas. **Atracción:** proporción de insectos atrapados en la trampa cebada, respecto del total capturado en el ensayo correspondiente. Número de réplicas entre paréntesis.

	<b>CAPTURAS</b>	<b>ATRACCIÓN</b>
Levadura Fresca	51.7 ± 9.5 % (6)	86.4 ± 5.5 % * (6) [ $t= 4.52$ , $P= 0.003$ ]
Levadura	66.1 ± 4.2 % (2)	89.2 ± 0.3 % * (2) [ $t= 95.6$ , $P= 0.003$ ]
Deshidratada		

#### 10.4-Discusión

Estos experimentos constituyen el primer informe sobre la utilización de un atrayente natural como cebo para atrapar vinchucas. En la serie 1 se determinó la eficacia de la levadura como cebo para trampas donde los insectos se deben arrojar. La levadura es un material muy barato y fácil de obtener, que puede ser manipulado y preparado en el campo sin problemas. La forma deshidratada es especialmente útil, ya que no requiere refrigeración. Por lo expuesto, la levadura puede representar una herramienta de utilidad para ser usada en estrategias de control de vectores del Mal de Chagas. Este efecto atrayente merece ser estudiado en otros insectos hematófagos.

Aquí se describe, además, una trampa para triatominos, la que demostró ser efectiva en el laboratorio. En la arena experimental fue capaz de capturar más del 50 % de los insectos presentes en una única noche. Su efectividad en el campo debe ser estudiada y comparada con la de las cajas de monitoreo normalmente utilizadas como sensores. Estos ensayos de campo permitirán adaptar la trampa a las necesidades particulares de las distintas especies de triatominos, tanto como a los diversos lugares que habitan estos insectos (domésticos, peridomésticos, corrales y gallineros).

Los resultados previos obtenidos en experimentos de olfatometría (Guerenstein *et al.*, 1995) demuestran que las sustancias volátiles liberadas por la levadura en crecimiento aeróbico constituyen un atrayente poderoso para *Triatoma infestans*. Los ensayos realizados con trampas ubicadas en una arena en la cual los insectos se movieron libremente confirmaron el efecto de dichas sustancias. En los ensayos olfatométricos presentados por los autores mencionados se demostró que dicho efecto fue de la misma intensidad que el ejercido por el olor liberado por un ratón.

Guerenstein *et al.* (1995) pusieron en evidencia que la respuesta de los insectos es debida al efecto de una o varias sustancias volátiles liberadas por el cultivo de levadura. Aquellos estudios incluyen una serie de experimentos en los cuales se utilizó KOH en el tubo por el que salían los volátiles generados por los cultivos con el objeto de eliminar el CO<sub>2</sub> liberado por la levadura. En dicha serie de experimentos la distribución de insectos en ambas ramas del olfatómetro, con y sin levadura, no presentó diferencias significativas. Estos resultados muestran que algún volátil liberado por la levadura, probablemente el CO<sub>2</sub>, tiene un papel importante como atrayente para las vinchucas. Por otra parte, la comparación de la lista de volátiles producidos por el crecimiento aeróbico de *S. cerevisiae* (Drawert & Klisch, 1987) con el grupo de compuestos conocidos como atrayentes de triatominos, muestra que el CO<sub>2</sub> es el único factor en común para el cual las

vinchucas presentan una alta sensibilidad. En virtud de la evidencia disponible se postula que el CO<sub>2</sub> es la sustancia responsable de la atractividad de la levadura.

Las sustancias presentes en las heces con efecto agregador sobre los insectos podrían ser explotadas como cebos para trampas de muestreo. Más allá de su bien establecida atractividad para *T. infestans*, los excrementos no lograron inducir a los insectos a saltar dentro de las trampas. Es importante resaltar que estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron que los insectos sólo se dejan caer cuando se hallan en el contexto de la búsqueda del hospedador. Las heces, sin embargo, actúan como una señal durante la orientación hacia refugios. La incapacidad de las heces de aumentar la eficiencia de las trampas evidencia la importancia de ajustar el diseño del dispositivo al contexto comportamental en el que actúa cada atrayente.

A partir de estos resultados, se requiere la realización de ensayos a campo para permitir mejorar este diseño de trampa hasta lograr desarrollar una efectiva, que pueda ser utilizada para monitoreo de zonas endémicas. Además, es deseable el desarrollo de nuevos diseños de trampas adaptados a la biología de otros triatomíneos vectores secundarios de la Enfermedad de Chagas.

## **Capítulo 11. Ensayos a campo de trampas cebadas con levadura y refugios con heces.**

### **Introducción**

A partir de los ensayos realizados en laboratorio en los que se demostró la eficacia de refugios marcados con heces y trampas cebadas con levadura para reclutar y capturar vinchucas, es necesario ensayar en condiciones de campo la efectividad de los distintos diseños. Por esto se realizaron dos tipos de experimentos, en el primero se estudio la capacidad de reclutar insectos de refugios artificiales asociados a heces. En el segundo experimento se utilizó trampas con levadura en dos series de ensayos en los que se estudió la eficacia de trampas para pared y piso, respectivamente. Los gallineros experimentales en los que se desarrollaron los ensayos fueron los mismos descritos en el capítulo 9. Estos experimentos permiten estimar la capacidad de los diseños ensayados de capturar insectos en un ambiente muy semejante al que normalmente alberga vinchucas en las zonas endémicas.

### **Materiales y Métodos**

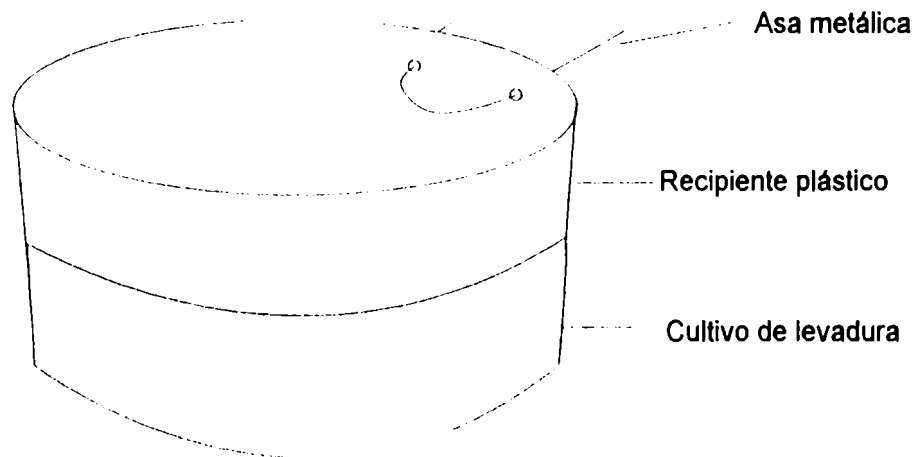
#### *Gallineros experimentales*

Se realizaron dos experimentos en gallineros experimentales colonizados con ca. 1000 larvas de *T. infestans* colocadas 6 meses antes de los ensayos. Dichos nidos de vinchuca presentaban insectos de todos los estadios larvales, pero debido a que no se realizó un desarme posterior no se pudo confirmar la presencia de adultos. Los experimentos transcurrieron durante la semana del 22 al 27 de octubre de 1996. Los gallineros experimentales en los que se desarrollaron los ensayos pertenecen Centro de Reservorios y Vectores, del Servicio Nacional de Chagas, y están ubicados en la localidad de Santa María de Punilla, Córdoba. Estos nidos estaban formados por cuatro paredes de ladrillos sueltos elevándose sobre el piso de tierra unos 80 cm. La pared del frente presentaba una apertura lateral de unos 35 x 70 cm. que permitía introducir las trampas y refugios al

interior del gallinero. El techo del nido consistía de rollos de papel y cartón sostenidos por un tejido de alambre de trama amplia que cubría la totalidad de su cara inferior. La cara superior del mismo consistía de una membrana de polietileno negro cubierta totalmente por tierra. De esta forma existía aislación en caso de lluvias (polietileno), y de excesiva insolación (tierra). Todo el conjunto estaba rodeado por una jaula de malla plástica de trama cerrada separada unos 10 cm. de las paredes. El borde inferior de la malla estaba enterrado con el objeto de evitar la salida de las vinchucas. El acceso a través de la jaula se realizaba levantando una puerta deslizable de aluminio que corría a lo largo de sendos perfiles del mismo material ubicados en el frente de la jaula. Esta puerta corrediza era del mismo tamaño que la apertura de la pared.

Por medio de un control visual se constató que los insectos se refugiaban mayormente en las paredes, las que además presentaban gran cantidad de deyecciones en las caras internas del gallinero. De todos modos, se observó un número considerable de insectos en los bordes del techo. En estos gallineros, los insectos obtienen su alimentación de dos gallinas que se introducen al nido todas las noches y son retiradas al comienzo de la mañana. Durante los días en que se realizaron los ensayos no se introdujeron las gallinas en los nidos, para evitar que éstas interactuaran con las trampas y refugios, dada la imposibilidad de proteger estos dispositivos de las aves.

Durante la semana en que se realizaron los ensayos se registró una variación de temperatura y humedad relativa ambiente muy amplia. Estas fluctuaciones entre distintos días pueden haber afectado la actividad de los insectos ya que en algunos casos la temperatura mínima rondó los 10 °C. Como fue indicado precedentemente, la actividad de *T. infestans* es mínima por debajo de los 20 °C. Se registró la temperatura y humedad relativa al comienzo y al final de cada ensayo, así como las máximas y mínimas.



**Figura 1:** Trampa cebada con cultivos de levadura que permite su asociación a fisuras en paredes.

*Ensayos con refugios asociados a heces.*

Se realizó una serie de dos ensayos en los que se ofreció a los insectos refugios artificiales asociados a papeles con heces secas y los respectivos refugios control. En cada gallinero se ubicó un refugio experimental y uno control. Los pares de refugios control y experimental fueron ubicados en contacto con la cara interna de la misma pared por medio de una asa de alambre de hierro. Luego de ser colocados, los refugios permanecieron en el mismo sitio durante 5 noches. En la mañana siguiente de la quinta noche se los retiró, contándose el número de insectos presentes en el interior de cada uno.

*Ensayos con trampas cebadas con levadura.**Serie 1: Trampas colocadas en el piso.*

Se realizaron 10 ensayos en los que se ofreció a los insectos una trampa (Cap. 10: Fig. 1) cebada con un cultivo de levadura deshidratada (2,5 gr. de levadura deshidratada + 8 gr. sacarosa + 20 ml. de agua), y simultáneamente otra con la correspondiente solución de sacarosa. Las trampas fueron colocadas al anochecer en los rincones opuestos de la pared enfrentada con la apertura del nido. A la mañana siguiente se retiraron ambas trampas y se contó el número de insectos capturados.

*Serie 2: Trampas colocadas en la pared.*

Se realizaron 10 ensayos en los que se presentó a los insectos una trampa (Fig. 1) cebada con un cultivo de levadura deshidratada preparado de la misma manera que en la serie previa, y simultáneamente otra con la correspondiente solución de sacarosa. Las trampas fueron colocadas al anochecer, suspendidas de las caras internas de una de las paredes del nido mediante un asa de alambre de hierro que se insertaba entre los ladrillos. A la mañana siguiente se retiraron ambas trampas y se contó el número de insectos capturados.



## Resultados

### *Ensayos con refugios artificiales asociados a heces.*

Debido al requerimiento de realizar ensayos de larga duración sólo se realizaron tres ensayos preliminares. En la tabla 1 se observa la cantidad de insectos hallados en cada tipo de refugio. Los refugios asociados a heces presentaban un número de insectos mayor a los controles.

**Tabla 1.** Número de insectos hallados en los refugios experimental y control ubicados en la pared.

<b>Ensayo</b>	<b>Refugio Control</b>	<b>Refugio con Heces</b>
1	0	1
2	0	6
<i>Total</i>	0	7

### *Ensayos con trampas cebadas con levadura.*

#### *Trampas colocadas en el piso.*

En esta serie de ensayos se observa una marcada tendencia de los insectos a arrojarse en las trampas cebadas con levadura (Prueba de  $t$ ,  $P=0,0008$ ,  $k=10$ ) (Tabla 2). En la misma tabla se presentan las temperaturas mínimas y máximas registradas en cada ensayo. En los ensayos realizados durante las noches en las que la temperatura máxima superó los 18 °C la cantidad de insectos capturados por las trampas experimentales fue sensiblemente mayor.

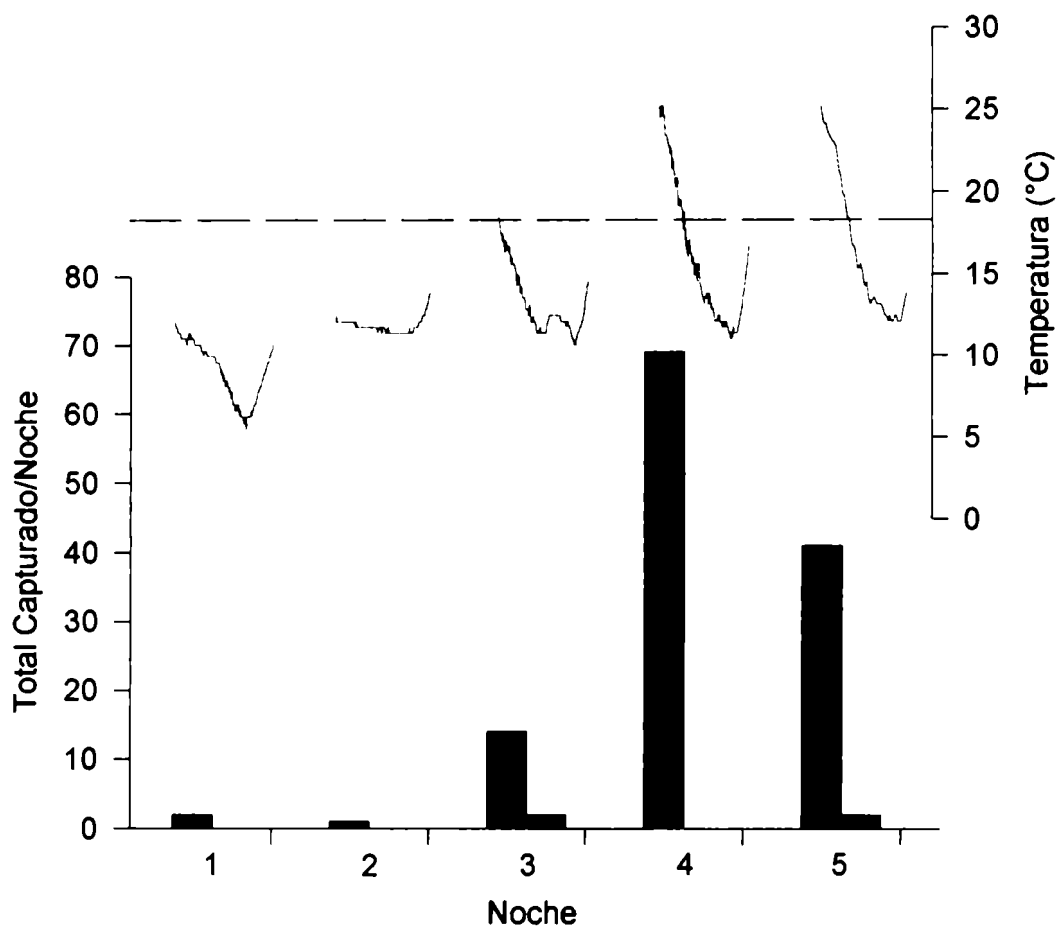
#### *Trampas colocadas en la pared.*

En dicha serie de ensayos se observa una clara tendencia de los insectos a arrojarse preferentemente en las trampas cebadas con levadura (Prueba de  $t$ ,  $P=0,011$ ,  $k=10$ ) (Tabla 2). Las temperaturas máxima y mínima para cada ensayo se presentan en la misma tabla. Al igual que en la primera serie, se observa un

marcado aumento del número de vinchucas capturadas durante los ensayos en que la temperatura máxima supero los 18 °C.

**Tabla 2.** Número de insectos capturados en cada noche de ensayo, en cada gallinero, por las trampas ubicadas en el piso o en la pared, experimental y control. Se indican, asimismo, las temperaturas máximas y mínimas registradas en el interior de una pared de adobes durante cada ensayo.

<b>Gallinero/ Día</b>	<b>Control pared</b>	<b>Exp. pared</b>	<b>Control piso</b>	<b>Exp. piso</b>	<b>T ° Máx.</b>	<b>T ° Mín.</b>
1/1	0	0	0	0	13,2 °C	8,1 °C
2/1	0	2	0	0	13,2 °C	8,1 °C
1/2	0	0	0	1	13,2 °C	12,6 °C
2/2	0	0	0	0	13,2 °C	12,6 °C
1/3	0	2	0	1	18,5 °C	12 °C
2/3	1	1	1	9	18,5 °C	12 °C
1/4	0	5	0	14	22,8 °C	12,4 °C
2/4	0	11	0	39	22,8 °C	12,4 °C
1/5	0	18	2	22	24,5 °C	13,8 °C
2/5	0	0	0	1	24,5 °C	13,8 °C
<i>Total</i>	1	39	3	87	T <sub>media</sub> =18,4°C	T <sub>media</sub> =11,8°C



**Figura 2:** Total de insectos capturados por ambos tipos de trampa cebada con cultivos de levadura rehidratada, sumados por noche. Las columnas verdes representan los datos de captura de trampas experimentales, las columnas grises corresponden a las capturas de las trampas control. Las curvas corresponden a registros de temperatura del ambiente durante cada noche. La línea cortada representa el nivel umbral de temperatura a partir del cual se registran capturas apreciables.

## Discusión

Los resultados obtenidos en los ensayos con trampas cebadas con levadura muestran que en ambos casos, trampas colocadas en el piso o en la pared, se capturó un número significativo de insectos (hasta 39 en única trampa) en solamente una noche. Es importante destacar que el sitio donde se ubicó las trampas no parece afectar la capacidad de capturar insectos de éstas. En cambio,

la temperatura del ambiente sí parece afectar drásticamente el número de capturas, aparentemente a través de una disminución en la actividad de los insectos con temperaturas bajas (Fig. 2 y 3) (Lazzari, 1992). Hasta el presente, no existe ningún dispositivo capaz de capturar un número importante de insectos en una sola noche. Los dispositivos utilizados en la actualidad detectan la presencia de insectos luego de periodos prolongados de tiempo (Wisnivesky-Colli *et al.*, 1987). No es posible en el contexto actual realizar una detección inmediata de infestación sin la utilización del método de búsqueda manual. Esto implica una limitación en la cantidad de viviendas y peridomicilios que pueden ser controlados en cada campaña.

En el experimento con refugios artificiales asociados con heces de vinchuca, el número de réplicas es muy bajo y por lo tanto no permite afirmar que las heces ejerzan un efecto potenciador en la capacidad de reclutar insectos de dichos refugios. Sin embargo, esos datos preliminares muestran una tendencia positiva, y si se los considera en conjunto con los resultados obtenidos en el laboratorio, es de esperar que con un mayor número de ensayos se evidencie su capacidad de reclutamiento de insectos. Esto es fundamental si se desea contar con una sustancia atrayente para utilizarla como cebo en los dispositivos de muestreo de triatomíneos.

El conjunto de datos presentados en este capítulo sugiere que las trampas cebadas con levadura y los refugios asociados a heces deben ser considerados para una prueba comparativa a campo con los distintos métodos de detección de vinchucas utilizados hasta el presente. Estos diseños ofrecen nuevas alternativas que permitirían una detección más rápida y económica de vinchucas, dado que el costo de ambos es extremadamente bajo. Es importante destacar que el aislamiento de sustancias atrayentes de triatomíneos debe ser intensificado, dado que en el caso de la vinchuca es posible colocar sensores cebados en ambientes restringidos. Este enfoque ha sido utilizado con éxito en insectos vectores que

habitan ambientes mucho menos restringidos, *e.g.*, trampas y *targets* para moscas tse-tse (Shorey & Mc Elvey, 1977; Vale & Hall, 1985; Vale *et al.*, 1986; 1988).

## Capítulo 12. Conclusiones

Esta Tesis intenta realizar una contribución al conocimiento de los factores que afectan la distribución de *Triatoma infestans*, principal insecto vector de la enfermedad de Chagas. Como tal, se ha utilizado con éxito un modelo extremadamente simple de refugio artificial para vinchucas que permite poner a prueba diversas hipótesis relacionadas con la elección de sitios reparados en estos insectos. En la presente Tesis dicho diseño ha sido utilizado para diversos estudios.

### Actividad relacionada con el refugio

Los ensayos sobre actividad relacionada con refugios evidencian que estos insectos poseen una marcada diferenciación en cuanto al momento en que procuran su alimento y su refugio, siendo el comienzo de la escotofase el intervalo de máxima actividad en procura de alimento, y por lo tanto, el momento en que el número de insectos activos en la proximidad del hospedador sería máximo. Por otra parte, la máxima actividad en las proximidades de los refugios, en el caso de *T. infestans* en las zonas superiores de la vivienda, sería en el comienzo y en el final de la escotofase. Consistentemente con los resultados obtenidos en ensayos previos realizados en actómetros (Lazzari, 1992), en los ensayos presentados en esta Tesis se observa un marcado incremento en el nivel de actividad de estos insectos con el aumento del ayuno, lo que se corresponde con una mayor tendencia a permanecer expuestos.

### Termopreferencia y elección de refugio

Los ensayos en que se estudió el efecto de la termopreferencia de las vinchucas sobre la elección del refugio muestran que los refugios que presentan una temperatura semejante a la del hospedador son preferidos por estos insectos. Llamativamente, la presencia de refugio modula la termopreferencia, ya que la

temperatura elegida por las vinchucas para permanecer varía drásticamente en presencia y en ausencia de refugios. Esta variación no parece tener antecedentes en insectos. Esto está en concordancia con ciertas observaciones sobre la tendencia de *T. infestans* a refugiarse en sitios cercanos al hospedador (Zeledón & Rabinovich, 1981). Por otra parte, la elección de un refugio de temperatura elevada podría permitir a los insectos activarse inclusive en épocas en que la temperatura ambiente está debajo de los 20 °C. Esto podría resultar importante si se toma en cuenta que la actividad de las vinchucas por debajo de esa temperatura es casi nula (Lazzari, 1991; Capítulo 11, esta Tesis). Los datos de trampeo de vinchucas del capítulo anterior sugieren que la actividad de estos insectos en un ambiente con bajas temperaturas es muy baja. Por lo que refugiarse en un microclima más cálido presenta claras ventajas para los insectos. Aparentemente, solo es necesario que al comienzo de la escotofase las vinchucas se encuentren en un ambiente con más de 20 °C, ya que la temperatura en las noches en que se capturó un alto número de insectos fue alta al comienzo de los ensayos, alcanzando luego niveles muy bajos. Esto indicaría que los insectos salen de sus refugios a procurar alimento, a pesar de que el ambiente se torne frío rápidamente (Fig. 3, capítulo 11).

### **Higropreferencia y elección de refugio**

En contraste con lo que ocurre con la termopreferencia, la presencia de refugios no afectó la preferencia espontánea de las vinchucas por ciertos valores de humedad relativa. Las vinchucas mostraron una marcada preferencia por refugios con humedad relativa (HR) extremadamente baja. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Roca & Lazzari (1994) en gradientes de humedad relativa. A través de esto, se confirma una conclusión que resulta relevante si se considera que la bibliografía sobre cría de *T. infestans* en laboratorio incluye numerosas citas sobre mantenimiento de un nivel de HR de 75 % (e.g, Curto de Casas, 1983;

Núñez & Segura, 1987). Los datos aquí obtenidos son coherentes por otra parte, con la distribución geográfica que presenta *T. infestans* (Fig. 2 y 3, Capítulo 1).

### **Patrón espacial de defecación de *T. infestans***

En los ensayos donde se registró la actividad de las vinchucas en relación con refugios se observó repetidamente un comportamiento específico de estos insectos mediante el cual depositan sus heces en los accesos de sus refugios. A través de la repetición de este comportamiento por el conjunto de los insectos que explotan un refugio, se genera una acumulación de deyecciones en las inmediaciones del mismo. Normalmente, el número de deyecciones en el interior del refugio es sensiblemente inferior. Esto es coincidente con las observaciones realizadas en gallineros y cuyeras (corrales de cría de cobayos), donde se presenta una gran cantidad de marcas fecales en la cara vertical de los ladrillos, siendo mínima la presencia de heces entre los mismos, en los sitios donde se hallan grupos de vinchucas.

### **Las heces como marca del refugio para *T. infestans*.**

En el capítulo 8 se presentan dos series de ensayos en los que se demuestra que las heces de *T. infestans* asociadas a refugios afectan de manera significativa la elección de los mismos por parte de estos insectos. Más aún, la mera presencia de deyecciones en los accesos al refugio afecta significativamente la elección de los insectos. Esto indicaría que la marca química presente en las deyecciones de las vinchucas actuaría orientando a los insectos en las proximidades del refugio y no sería una mera señal arrestadora de los insectos, consistentemente con los resultados obtenidos por Lorenzo Figueiras *et al.* (1994), en los que se demuestra que la señal actúa a distancia transportada por corrientes de aire. Existiría otra sustancia con efecto agregador en las vinchucas, que sería depositada desde la superficie del cuerpo de los insectos (o de partes específicas del mismo), y que



sólo actuaría por contacto, *i.e.*, no actuaría por la vía olfativa, sino por quimiorrecepción de contacto (Lorenzo Figueiras & Lazzari, 1996).

### **El refugio natural: características físicas.**

Los refugios naturales son muy variados, distando de ser posible la caracterización de un tipo específico. Sin embargo, existen características en común que deben ser destacadas. La característica principal es que el espacio requerido por estos insectos de cuerpo achatado es muy reducido, ya que presentan una fuerte tigmotaxis, que determina la necesidad de refugios angostos. Las grietas en paredes y los espacios reducidos entre el material vegetal utilizado en los techos típicos de las viviendas rurales de zonas endémicas, son los sitios donde es más frecuente hallar a *T. infestans* (Zeledón & Rabinovich, 1981; Lehane, 1991; Kettle, 1995). Aparentemente, estos microhabitats poseen características ambientales algo diferentes del hábitat general, ya que como es posible observar en las figuras del capítulo 9 tanto su HR como su temperatura presentan máximas y mínimas bastante atenuadas y desplazadas en el tiempo respecto de las condiciones externas. Como se expresó en el ítem anterior, los accesos a los refugios naturales presentan típicamente acumulaciones de marcas fecales.

### **Ensayos con trampas cebadas con cultivos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* Hansen.**

Se diseñó una trampa para triatominos que es efectiva en capturar estos insectos. Dicha trampa presenta un aumento drástico en el número de capturas cuando es cebada con cultivos de levadura en ensayos de laboratorio. Este es el primer informe sobre un dispositivo específico para captura de vinchucas. Más aún, estos ensayos representan la primera utilización exitosa de cebos atrayentes para capturar estos insectos. La utilización de sensores para detección de presencia de vinchucas es un aspecto importante en estrategias de control de estos insectos vectores. Las trampas cebadas con levadura podrían representar

herramientas prácticas, y de bajo costo, que permitirían detectar la presencia de vinchucas en muestreos de corta duración. Para determinar la factibilidad de su empleo, deben realizarse pruebas comparativas a campo, con el objeto de evaluar su efectividad y delinear la manera de utilizarlas que presentaría mayores ventajas. Los ensayos realizados en gallineros experimentales muestran que las trampas son altamente eficaces para capturar insectos que habitan refugios de manera estable y que se podrían considerar “salvajes”.

La utilización de la levadura del pan como cebo de captura de otros triatomíneos aún no ha sido ensayada, y representa una posibilidad alternativa de aplicación. Por otra parte, su empleo como atrayente para otros insectos hematófagos merece ser puesto a prueba.

Este trabajo de Tesis intenta realizar un aporte para la posterior transferencia de los conocimientos existentes sobre la ecología sensorial de estos insectos a estrategias de control.

**Capítulo 13. Bibliografía**

- Ampleford, E. J. & Steel, C. G. H. (1982). Circadian control of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Comp. Physiol. A* **147**: 281-286.
- Baldwin, W. F.; Knight, A. G. & Lynn, K. R. (1971). A sex pheromone in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Can. Entomol.* **103**: 18-22.
- Borden, J. H. (1985). Aggregation pheromones. En: Kerkut G.A. & Gilbert L.I. (eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. IX, pp. 257-285.
- Carcavallo R. U. (1996). Factores Climáticos. Su modificación en el microhabitat y las posibilidades en relación con el cambio climático global. *Resúmenes de la Reunión sobre Vectores de Chagas y Cambio Climático Global*. Buenos Aires, Argentina. 11-13 de junio de 1996.
- Cécere, M. C.; Canale, D. & Gürtler, R. E. (1995). Population dynamics of small populations of *Triatoma infestans*. *Parasitología al Día* **19**: 222.
- Cécere, M. C.; Gürtler, R. E.; Canale, D.; Chuit, R. & Cohen, J. E. (1996). El Papel del Peridomicilio en la Eliminación de *Triatoma infestans* de Comunidades Rurales Argentinas. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* **121(1)**:1-10.
- Cruz-López, L.; Malo, E. A.; & Rojas, J. C. (1993). Aggregation pheromone in five species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **88**: 535-539.
- Curto de Casas, S. I. (1983). Análisis geográfico de la endemia Chagas. Indicadores climáticos. *Chagas* **1(1)**: 73-79.

- Curto de Casas, S. I. (1985). Problemática Geográfica de la Enfermedad de Chagas y Técnicas para su Estudio. En: *Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas*. Tomo I. Eds. Carcavallo, R. U.; Rabinovich, J. E. & Tonn, R. J. *Chagas* (Supl.), pp. 31-52.
- de Brito Sánchez, M. G., Manrique, G. & Lazzari, C. R. (1995). Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): II. Electrophysiological correlates. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **90**: 649-651.
- Di Luciano V.S. (1983). Orientation of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to environmental temperatures. *J. Med. Entomol.* **20**: 446-454.
- Dicke M. & Sabelis M. W. (1988). Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds?. *Functional Ecology* **2**: 131-139.
- Drawert, F., and Klisch, W. (1987). En: *Fundamentals of biotechnology*, p. 382. Eds. Präve, P., Faust, V., Sittig, W. and Sukatsch, D. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Dusenbery D. B. (1992). *Sensory Ecology: how organisms acquire and respond to information*. Freeman W.H. (ed.), New York, USA, + 558p.
- Espínola, H. N. (1973). Aspectos do comportamento do *Triatoma infestans* (Klug, 1834), em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae). Tesis de Doctorado, Universidad Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Flores G. B. & Lazzari C. R. (1996). The role of the antennae in *Triatoma infestans*: orientation toward thermal sources. *J. Insect Physiol.* **42**: 433-440.

- Flores, G. B. & Lazzari, C. R. (1993). Bilateral integration of antennal inputs during thermal orientation in *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **88** Suppl.: 250.
- Fontán, A. & Zerba, E. (1992). Influence of the nutritional state of *Triatoma infestans* over the insecticidal activity of DDT. *Comp. Biochem. Physiol.* **101 C**: 589-591.
- Friend, W. G. & Smith, J. J. B. (1977). Factors affecting feeding by bloodsucking insects. *Ann. Rev. Entomol.* **22**: 309-331.
- Games D. E., Schofield C. J. & Staddon B. W. (1974). The secretion from Brindley's scent gland in Triatominae. *Ann. ent. Soc. Am.* **67**: 820.
- Gómez Núñez, J. C. (1965). Desarrollo de un nuevo método para evaluar la infestación intradomiciliaria por *Rhodnius prolixus*. *Acta Cientif. Venezolana* **16**: 26-31.
- Green, C. H. (1993). The effects of odours and target colour on landing responses of *Glossina morsitans morsitans* and *G. pallidipes* (Diptera: Glossinidae). *Bull. Ent. Res.* **83**: 553-562.
- Guerenstein, P. G.; Lorenzo, M.G.; Núñez, J. A. & Lazzari, C. R. (1995). Baker's yeast, an attractant for baiting traps for Chagas' disease vectors. *Experientia* **51**: 834-837.
- Guerenstein, P. G. & Núñez, J. A. (1994). Feeding response of the haematophagous bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* to saline solution: a comparative study. *J. Insect Physiol.* **40**: 747-752
- Gürtler, R. E.; Cécere, M. C.; Castañera, M. B.; Canale, D.; Lauricella, M. A.; Chuit, R.; Cohen, J. E. & Segura, E. L. (1996). Probability of Infection with *Trypanosoma cruzi* of the Vector *Triatoma infestans* Fed on Infected

- Humans and Dogs in Northwest Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hig.* **55**: 24-31.
- Gürtler, R. E.; Cécere, M. C.; Rubel, D. N. & Schweigmann, N. J. (1992). Determinants of the domiciliary density of *Triatoma infestans*, vector of Chagas Disease. *Med. Vet. Entomol.* **6**: 75-83.
- Gürtler, R. E.; Cécere, M. C.; Vázquez, D. P.; Chuit, R. & Cohen, J. E. (1996). Host-Feeding Patterns of Domiciliary *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Northwest Argentina: Seasonal and Instar Variation. *J. Med. Entomol.* **33**: 15-26.
- Hawkins A. D. & Myrberg A. A. (1983). Hearing and sound communication under water. En: Lewis B. (ed.) *Bioacustics*, Academic Press, New York, pp. 347-405.
- Hayes, R. O.; Doane, JR., O. W.; Sakolsky, G. & Berrick, S. (1993). Evaluation of attractants in traps for greenhead fly (Diptera: Tabanidae) collections on a Cape Cod, Massachusetts, salt marsh. *J. Am. Mosquito Control Assoc.* **9**: 436-440.
- Kaissling K. E. (1987). *R.H. Wright lectures on Insect Olfaction*. En: Colbow K. (ed), Simon Fraser University, Burnaby, B.C., Canada,. + 75p.
- Karlson P. & Luscher M. (1959). "Pheromones" a new term for a class of biologically active substances. *Nature* **183**: 155-156.
- Kettle, D. S. (1995). *Medical and Veterinary Entomology*. CAB International. University Press, Cambridge. viii +725 pp.
- Lazzari, C. R. (1990). Fisiología del Comportamiento de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae), Orientación Térmica. Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

- Lazzari, C. R. (1991). Temperature preference in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. entomol. Res.* **81**: 273-276.
- Lazzari, C. R. (1992). Circadian organisation of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Insect Physiol.* **38**: 895-903.
- Lazzari, C. R. & Núñez, J. A. (1989 a). The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distant sources in *Triatoma infestans*. *J. Insect Physiol.* **35**: 525- 529.
- Lazzari, C. R. & Núñez, J. A. (1989 b). Blood temperature and feeding behavior in *Triatoma infestans* (Heteroptera:Reduviidae). *Entomol. Gener.* **14**: 183-188.
- Lehane, M. J. (1991). *Biology of blood-sucking insects*. Harper Collins Academic. The University Press, Cambridge.
- Lorenzo F., A. N. & Lazzari, C. R. (1996). Spatial pattern of defecation in *Triatoma infestans* and the role of faeces as a chemical mark of the refuge. *J. Insect Physiol.* **42(9)**: 903-907.
- Lorenzo F., A. N. & Lazzari, C. R. (1993a). Comportamiento de agregación en *Triatoma infestans*. *Actas V Congreso Latinoamericano de Entomología*. Isla Margarita, Venezuela.
- Lorenzo F., A. N. & Lazzari, C. R. (1993b). Postfeeding change in the response to aggregation signals in *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **88** (Suppl.): 253.
- Lorenzo F., A. N.; Kenigsten, A. & Lazzari, C. R. (1994). Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: Chemical signals and temporal pattern. *J. Insect Physiol.* **40**: 311-316.

- Lorenzo F. A. N. & Lazzari, C. R. (1996). Un factor novedoso de agregación en *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Memorias del VI Latinoamericano Congreso de Entomología*. Mérida, México. pp. 46-47.
- Lorenzo, M. G. & Lazzari, C. R. (1993). Dynamics of the use of refuges in *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **88** (Suppl.): 265.
- Lorenzo, M. G. & Lazzari, C. R. (1996). Motivation for feeding in unrestrained *Triatoma infestans* varies with time during the night hours. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **91** (Suppl.): 137.
- Manrique, G. & Lazzari, C. R. (1995). Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): I. Behavioural evidence. *Mem. Inst. O. Cruz* **90**: 645-648.
- Moncayo, A. (1991). En: Eleventh Programme Report of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Neves, D. P.; Paulini, E. (1981). Atração sexual em *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) por feromônio. *Rev. bras. Ent.* **25**: 301-306.
- Núñez, J. A. (1982). Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. Ent. Res.* **72**: 252-262.
- Núñez, J. A. (1987). Behaviour of Triatominae bugs, p.1-28. In RR Brenner, AM Stoka (eds) *Chagas' Disease Vectors*, Vol II, pp.1-28. CRC Press, Florida.
- Núñez J. A. & Segura E. L. (1987). Rearing of Triatominae. En: Brenner & Stoka (eds.) *Chagas' Disease Vectors*, CRC Press, Florida, vol II, pp. 29-40.



- Núñez, J. A. & Lazzari, C. R. (1990). Rearing of *Triatoma infestans* Klug (Het., Reduviidae) in the absence of a live host. 1. Some factors affecting the artificial feeding. *J. Appl. Ent.* **109**: 87-92.
- Ondarza, R. N.; Gutierrez-Martinez, A. & Malo, E. A. (1986). Evidence for the presence of sex and aggregation pheromones from *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Econom. Entomol.* **79**: 688-692.
- Otte D. (1974). Effects and functions in the evolution of signalling systems. *Annual Review of Ecology and Systematics.* **5**: 385-417.
- Rabinovich, J. E. (1985). Ecología poblacional de los triatomíneos. En: *Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas*. Tomo I. Eds. Carcavallo, R. U.; Rabinovich, J. E. & Tonn, R. J. *Chagas* (Supl.), pp. 121-147.
- Reisenman C. E. & Lazzari C. R. (1996). The phototactic response of *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **91** (Supl.): 138.
- Ribeiro, J. M. C. (1987) (citado por Schofield, C. J., 1994). Role of saliva in blood-feeding arthropods. *Annual Review of Entomology* **32**: 463-478.
- Roca, M. & Lazzari, C. R. (1994). Effects of the relative humidity on the haematophagous bug *Triatoma infestans*. Higr preference and eclosion success. *J. Insect Physiol.* **40**: 901-907.
- Roces, F. and Manrique, G. (1996). Different stridulatory vibrations during sexual behaviour and disturbance in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Insect Physiol.* **42**: 231-238.
- Rojas, J. C.; Ramirez-Rovelo, A. & Cruz-López, L. (1991). Search for a sex pheromone in *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* **28**: 469-470.

- Rossiter M. & Staddon B. W. (1983). 3-Methyl-2 hexanone from the triatominae bug *Dipetalogaster maximus* (Uhler) (Heteroptera; Reduviidae). *Experientia* **39**: 380-381.
- Schaub, G. A.; Reduth, D. & Pudney, M. (1990). The peculiarities of *Blastocrithidia triatoma*. *Parasitology Today* **6**: 361-363.
- Schofield, C. J. (1979). The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): A review. *Bull. Entomol. Res.* **69**: 363-379.
- Schofield, C. J. (1984). Population dynamics and control of *Triatoma infestans*. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* **65**(Suppl. 1): 149-164.
- Schofield, C. J. (1994). *Triatominae. Biología y Control.* Eurocommunica Publications. West Sussex, U.K.
- Schofield, C. J. & Moreman, K. (1976). Apparent absence of a sex attractant in adult *Triatoma infestans* (Klug), vector of Chagas' Disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **70**: 165-166.
- Schofield, C. J. & Patterson, J. W. (1977). Assembly pheromone of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* nymphs (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* **13**: 727-734.
- Seeley, T. D. (1989) (citado por Dusenbery, 1992). "The honey bee colony as a superorganism." *Am. Scientist* **77**: 546-553.
- Segura, E.; Esquivel, M.; Salomón, O.; Sosa Estani, S.; Gómez, A.; Ibarra, F & Chuit, R. (1994). Alternativas de Control de la Transmisión de *Trypanosoma cruzi*. En: *Enfermedad de Chagas*. Eds. Storino, R. & Milei, J. Mosby, Dyoma Argentina.

- Setembrini, B. P. (1984). Circadian rhythms of locomotion activity in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* **21**: 204-212.
- Shannon C.E. & Weaver W. (1949) (citado por Dusenbery 1992). The mathematical theory of communication. Univ. of Illinois Press, Urbana.
- Shorey & McElvey (1977). *Chemical Control of Insect Behavior*. Wiley.
- Stonier, T. (1990) (citado por Dusenbery, 1992). Information and the Internal Structure of the Universe. New York: Springer -Verlag.
- Tamaki, Y. (1985). Sex pheromones. En: Kerkut G.A. & Gilbert L.I. (eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. IX, pp. 145-191.
- Taneja, J. & Guerin, P. M. (1995). Oriented responses of the triatomine bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* to vertebrate odours on a servosphere. *J. Comp. Physiol. A* **176**: 455-464.
- Vale, G. A. & Hall, D. R. (1985). The use of 1-octen-3-ol, acetone and carbon dioxide to improve baits for tsetse flies, *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae). *Bull. ent. Res.* **75**: 219-231.
- Vale, G. A.; Hargrove, J. W.; Cockbill, G. F. & Phelps, R. J. (1986). Field trials of baits to control populations of *Glossina morsitans morsitans* Westwood and *G. pallidipes* Austen (Diptera: Glossinidae). *Bull. Ent. Res.* **76**: 685.
- Vale, G. A.; Lovemore, D. F.; Flint, S. & Cockbill, G. F. (1988). Odour baited targets to control tse-tse flies *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae), in Zimbabwe. *Bull. Ent. Res.* **78**: 31-49.
- Van Essen, P. H. A.; Kemme, J. A.; Ritchie, S.A. & Kay, B. H. (1994). Differential responses of *Aedes* and *Culex* mosquitoes to octenol or light in

combination with carbon dioxide in Queensland, Australia. *Med. Vet. Entomol.* **8**: 63-67.

Velásquez Antich, A. V. (1968). Atracción por olor en ninfas e adultos de *Rhodnius prolixus*. *Rev. Inst. Med. Trop. y Parasitol.* **10**: 242-246.

Ward J. P. (1981). A comparison of the behavioural responses of the hematophagous bug, *Triatoma infestans* to synthetic homologues of two naturally occurring chemicals (n- and isobutyric acid). *Physiol. Ent.* **6**: 325-329.

Wiener N. (1948) (citado por Dusenbery 1992). *Cybernetics*. Wiley, New York..

Wiesinger, D. (1956). Die Bedeutung der Umweltfaktoren für der Saugakt von *Triatoma infestans*. *Acta Tropica* **13**: 97-141.

Wigglesworth, V. B. (1931). The physiology of excretion in a blood sucking insect, *Rhodnius prolixus*. I. Composition of the urine. *J. Exp. Biol.* **8**: 411-427.

Wilson E. O. (1975). *Sociobiology: the new synthesis*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass., USA, + 366 p.

Wisnivesky-Colli, C.; Paulone, I.; Perez, A.; Chuit, R.; Gualtieri, J.; Solarz, N.; Smith, A. & Segura, E. (1987). A new tool for continuous detection of the presence of triatomine bugs, vectors of Chagas' disease, in rural households. *Medicina* (Buenos Aires) **47**: 45-50.

Zar, J. H. (1984). *Bioestatistical analysis*. Prentice-Hall, xiv +718 pp.

Zárate, L.; Morales López, G.; Cabrera Ozuna, M.; Garcia Santiago, G. & Zárate, R. (1984). The Biology and Behavior of *Triatoma barberi* (Hemiptera:

Reduviidae) in Mexico. IV. Feeding and defecation patterns. *J. Med. Entomol.* **21**: 548-560.

Zeledón, R. & Rabinovich, J. E. (1981). Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *A. Rev. Ent.* **26**: 101-133.

Zeledón, R.; Alvarado, R. & Jirón, L. F. (1977). Observations on the feeding and defecation patterns of three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Trop.* **34**: 65-77.