

Tesis de Posgrado

Comportamiento de agregación y comunicación Intra- e Interespecífica en triatominae

Lorenzo Figueiras, Alicia Nieves

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lorenzo Figueiras, Alicia Nieves. (1997). Comportamiento de agregación y comunicación Intra- e Interespecífica en triatominae. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2974_LorenzoFigueiras.pdf

Cita tipo Chicago:

Lorenzo Figueiras, Alicia Nieves. "Comportamiento de agregación y comunicación Intra- e Interespecífica en triatominae". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2974_LorenzoFigueiras.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Comportamiento de Agregación y
Comunicación Intra- e Interespecífica
en Triatominae**

**Autor: Lic. Alicia Nieves Lorenzo Figueiras
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

1

A mis padres

A Santi

Comportamiento de Agregación y Comunicación Intra- e Interespecífica en Triatominae

Autor: Lic. Alicia Nieves Lorenzo Figueiras

Director: Dr. Claudio R. Lazzari

RESUMEN

Los triatomíneos activos durante la noche, permanecen durante el día agrupados en sitios protegidos. El comportamiento de agregación está mediado por tigmotaxis y por señales químicas. Experimentos utilizando arenas y olfatómetros muestran que *Triatoma infestans* es atraída a papeles impregnados con sus heces secas. La respuesta de agregación depende del tiempo transcurrido luego de la ingesta: insectos recién alimentados no se agrupan, cambiando su respuesta cambia al cabo de 8-10 horas. Los compuestos activos pudieron ser extraídos de las deyecciones con solventes polares. Los mismos podrían ser productos finales de la digestión de la sangre o secreciones adicionadas al contenido del recto antes de la deposición. El significado biológico de esta señal ha sido relacionado con la orientación hacia los refugios.

Una kairomona de agregación está presente en las heces de *T. infestans*, *T. sordida*, *T. guasayana* y *Rhodnius prolixus*. Los excrementos de *T. infestans* promueven la agregación en *T. sordida* y *T. guasayana*, pero no en *R. prolixus*. Las heces de estas tres especies inducen la agregación en *T. infestans*.

Otro factor de agregación, extraíble por solventes no-polares, está presente en la cutícula de las vinchucas. Esta señal actúa a través de un mecanismo de quimiorrecepción de contacto.

PALABRAS CLAVES

Triatominae - agregación - feromonas - kairomonas - comunicación química- Mal de Chagas

Aggregation Behaviour and Intra- and Interspecific Communication in Triatominae

Author: Lic. Alicia N. Lorenzo Figueiras

Supervisor: Dr. Claudio R. Lazzari

ABSTRACT

Night-active triatomines spend daytime hours assembled in protected places. The aggregation behaviour is mediated by thigmotaxis and by chemical cues. Experiments using arenas and wind-tunnel olfactometers show that *Triatoma infestans* are attracted to papers impregnated with their own dry faeces. The assembling response depends on the time elapsed after feeding: recently fed animals are not attracted, but a switch in the response takes place after 8-10 hours. The active compounds can be extracted from faeces by polar solvents. It may be a product of the final breakdown of the blood meal or could be a secretion added to the contents of the rectum prior to defecation. It has been proposed that the faecal signal help the insects to orientate towards refuges.

An aggregation kairomone is present in the faeces of *T. infestans*, *T. sordida*, *T. guasayana* and *Rhodnius prolixus*. We found that excrements of *T. infestans* elicit assembling in *T. sordida* and *T. guasayana*, but not in *R. prolixus*. The excrement of the last three named species induce aggregation in *T. infestans*.

A novel aggregation factor is described, which can be extracted from the cuticle of the insects by non-polar solvents and acts through contact chemoreception.

KEY WORDS

Triatominae - aggregation - pheromones - kairomones - chemical communication - Chagas disease

Indice

Capítulo 1: Introducción	10
1.1. Introducción general	11
1.2. Comunicación	12
1.2.1. Comunicación química. Definiciones	13
1.3. Comunicación química en Triatominae	15
1.4. Introducción al comportamiento de los Triatominae	17
1.5. Comportamiento de agregación en insectos	21
1.6. Señales de agregación como semioquímicos interespecíficos en insectos	26
1.7. Comportamiento de agregación en Hemiptera	29
1.7.1. Comportamiento de agregación en Triatominae	31
1.8. Señales de agregación como semioquímicos interespecíficos en Triatominae	33
1.9. Quimiorrecepción de contacto	34
1.10. Objetivos del trabajo	37
Capítulo 2: Comportamiento de agregación en <u>Triatoma</u> <u>infestans</u>	38
2.1. Introducción general	39
2.2. Experimentos con larvas de <i>T. infestans</i>	40
2.2.1. Materiales y métodos	40
2.2.2 . Resultados	48
2.3. Experimentos con adultos de <i>T. infestans</i>	51

2.3.1. Materiales y métodos	51
2.3.2 . Resultados	53
2.4. Experimentos con heces depositadas 24 horas luego de la ingesta	55
2.4.1. Materiales y métodos	56
2.4.2. Resultados	56
2.5. Larvas expuestas a corrientes de aire con olores de heces	58
2.5.1. Materiales y métodos	58
2.5.2. Resultados	62
2.6. Dinámica diaria de agregación/dispersión	64
2.6.1. Materiales y métodos	64
2.6.2. Resultados	65
2.7. Factores que afectan la respuesta de agregación	69
2.7.1. Efecto del ayuno	70
2.7.1.1. Materiales y métodos	70
2.7.1.2. Resultados	72
2.7.2. Persistencia de la señal	75
2.7.2.1. Materiales y métodos	75
2.7.2.2. Resultados	76
2.8. Heces Hidratadas	78
2.8.1. Materiales y métodos	78
2.8.2. Resultados	79
2.9. Conclusiones	80

<i>Capítulo 3. Caracterización de la señal de agregación</i>	85
3.1. Origen de la señal de agregación	86
3.1.1. Introducción	86
3.1.2. Materiales y métodos	87
3.1.3. Resultados	89
3.2. Fraccionamiento de la señal de agregación	90
3.2.1. Introducción	90
3.2.2. Materiales y métodos	91
3.2.3. Resultados	94
3.3. Conclusiones	98
<i>Capítulo 4. Comportamiento de agregación en <u>Triatoma</u> <u>sordida</u> y <u>T. quasayana</u></i>	103
4.1. Introducción	103
4.2. Materiales y métodos	105
4.3. Resultados	110
4.4. Conclusiones	114
<i>Capítulo 5. Comportamiento de agregación en <u>Rhodnius</u> <u>prolixus</u></i>	121
5.1. Introducción	122
5.2. Materiales y métodos	122
5.3. Resultados	124

5.4. Conclusiones	126
<i>Capítulo 6. Una nueva señal química de agregación en</i> <i><u>Triatoma infestans</u></i>	128
6.1. Introducción	129
6.2. Materiales y métodos	129
6.2.1. Experimentos con extracto de cutícula	135
6.3. Resultados	136
6.4. Conclusiones	141
<i>Capítulo 7. Conclusiones finales</i>	148
<i>Capítulo 8. Bibliografía</i>	153

CAPÍTULO 1. Introducción

1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El mundo provee una variedad de *información* que permite a los organismos vivos relacionarse con sus respectivos entornos y que es vital para su supervivencia. Según Wiener (1948) y Shannon y Weaver (1949) la transmisión de información implica la "pérdida de incertidumbre". La información es adquirida por medio de órganos sensoriales especializados, que la obtienen de manera selectiva del ambiente. La información puede ser ignorada o es procesada por el sistema nervioso, generando una respuesta específica. La transmisión de información es la interacción entre una *fente* (o emisor) y un *receptor*. Entre ambos existe un canal de transmisión, el cual involucra un movimiento de materia o energía desde la fuente al receptor. En Biología, el receptor es un organismo, la fuente puede ser el ambiente (circunstancialmente otro organismo), y el canal de transmisión incluye al estímulo, junto con los factores ambientales que lo afectan. El *estímulo* es un patrón específico de actividad dentro del canal a través del cual es transmitido, que adquiere un significado por estar asociado con algún estado del ambiente que es relevante para el receptor. Los estímulos pueden ser divididos en dos categorías: *señales* y *claves*. Las primeras se reconocen en los casos en que un estímulo ha sido modelado o mantenido por selección natural, ya que lleva información a otros organismos (Otte, 1974). En cambio claves, signos o estímulos disparadores son aquellos estímulos

que llevan información no modelada o mantenida por selección o características del ambiente. Además, las señales son generadas por el animal en forma deliberada, mientras que las claves no.

La transmisión puede llevarse a cabo mediante la utilización de canales de distinta modalidad, por ejemplo, químico, visual, sonoro, vibratorio, etc. Dentro de la amplia gama de información disponible y utilizable por los organismos se encuentran las claves y las señales olfativas, como por ejemplo el dióxido de carbono emitido por un animal y las feromonas, respectivamente.

En este primer capítulo introductorio se realiza una breve revisión del comportamiento de los triatominos, para luego hacer hincapié en aspectos generales de la comunicación química intraespecífica e interespecífica en los insectos, concentrándonos principalmente en los Triatominae.

1.2. COMUNICACIÓN

El análisis de los canales de comunicación involucrados en el comportamiento de los insectos requiere una definición precisa del concepto de *comunicación*. En primer lugar, al menos dos individuos deben participar, emisor y receptor, para que la comunicación biológica sea posible y reconocible como tal. En segundo lugar, es requisito indispensable la disponibilidad de un medio a través del cual el mensaje es transmitido. Según Hawkins y Myrberg (1983) la

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". 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" (Wilson, 1975). Otra característica importante de la comunicación biológica es que la misma debe estar "mediada por señales o claves, *i.e.*, información sensorial, más que por factores físicos o por información genética" (Dusenbery, 1992).

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 (*comunicación intraespecífica*). En cambio, la *comunicación interespecífica* es la comunicación entre individuos de especies diferentes.

1.2.1. COMUNICACIÓN QUÍMICA. DEFINICIONES

La *comunicación química* es la transmisión de información que es producto de la liberación de compuestos químicos por el emisor, que a su vez son detectados por el receptor. Estos compuestos dan lugar a una variedad de respuestas comportamentales tales como la búsqueda

de alimento o sitios de oviposición, la localización de una pareja sexual, el marcado de un área dada, etc. (Dicke y Sabelis, 1988).

Dicke y Sabelis (1988) definen como *semioquímico* o *infoquímico* a un compuesto químico que, en un contexto natural, transporta información de un individuo a otro. La información transmitida evoca en el receptor una respuesta fisiológica o comportamental que es biológicamente adaptativa para uno de los interactuantes, o para ambos. Los infoquímicos incluyen tanto a los aleloquímicos como a las feromonas.

A continuación se presentan las definiciones de los infoquímicos según Dicke y Sabelis (1988), que incluyen el criterio de costo-beneficio:

Feromona: infoquímico que media una interacción entre organismos de la misma especie, donde el beneficio puede ser del emisor, del receptor o de ambos.

Aleloquímico: infoquímico que media una interacción entre dos organismos que pertenecen a diferentes especies.

Alomona: es un aleloquímico pertinente a la biología del emisor y que evoca en un individuo receptor de otra especie una respuesta comportamental y/o fisiológica que es adaptativamente favorable para el emisor, pero no para el receptor. En general las alomonas son

descriptas como repelentes pero también pueden servir como atractantes de organismos presa.

Kairomona: es un aleloquímico pertinente a la biología del emisor y que, cuando contacta a un individuo receptor de otra especie, evoca una respuesta comportamental y/o fisiológica que es adaptativamente favorable para el receptor, pero no para el emisor. Por ejemplo, la feromona de agregación de los escarabajos de la corteza puede funcionar como kairomona que atrae depredadores (Dicke y Sabelis, 1988).

Synomona: es un aleloquímico pertinente a la biología del emisor que al contactar a un individuo receptor de otra especie, evoca en el mismo una respuesta comportamental y/o fisiológica que es adaptativamente favorable para ambos organismos. Por ejemplo, existen sustancias químicas en las plantas que repelen insectos herbívoros. La planta se beneficia reduciendo el daño y los insectos se favorecen ya que evitan ingerir toxinas (Dicke y Sabelis, 1988).

1.3. COMUNICACIÓN QUÍMICA EN TRIATOMINAE

Los estudios de los infoquímicos en los insectos triatominos se refieren principalmente a feromonas o sustancias volátiles que actúan promoviendo diferentes comportamientos, como por ejemplo, búsqueda de pareja sexual, agregación, alarma, etc..

La posible existencia de feromonas sexuales y la atracción a distancia entre sexos en *T. infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* y *T. mazzottii* ha sido analizada por diversos autores (Velázquez Antich, 1968; Baldwin *et al.*, 1971; Schofield y Moreman, 1976; Schofield y Patterson, 1977; Neves y Paulini, 1981; Ondarza *et al.*, 1986; Rojas *et al.*, 1991; Manrique y Lazzari, 1995; de Brito Sanchez *et al.*, 1995; Manrique, 1997). Sin embargo, la fuente de dicha feromona permanece desconocida en todos los casos. En algunos trabajos las evidencias aportadas a este respecto no son concluyentes, y llegan a ser contradictorias (*e.g.*, Ondarza *et al.*, 1986; Rojas *et al.*, 1991). Según Manrique y 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 en cópula. Por medio de ensayos electrofisiológicos, de Brito Sanchez *et al.* (1995) obtuvieron registros de actividad eléctrica en antenas de machos, que fueron estimuladas con una corriente de aire que previamente había estado en contacto con una pareja en cópula. En el citado trabajo, se describe un aumento de la tasa de impulsos compuestos bifásicos en asociación con la presentación del estímulo.

En los Triatominae, la existencia en el estado adulto de glándulas metatorácicas y de Brindley permite postular la existencia de sustancias con funciones defensivas y de alarma, ausentes en las larvas. Cuando los adultos son perturbados, las glándulas de Brindley

liberan una secreción cuyo principal componente es el ácido isobutírico (Games *et al.*, 1974). Esta sustancia es corrosiva y actuaría como repelente frente a posibles depredadores (Schofield, 1979). Por otra parte, a bajas concentraciones, el ácido isobutírico parecería actuar en la comunicación intraespecífica como feromona de alarma para otros miembros de la población (Ward, 1981). Otro componente,, 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 ser utilizada en la comunicación intraespecífica (Rossiter y Staddon, 1983).

El comportamiento de agregación en los triatominos es el tema de este trabajo de Tesis.

1.4. INTRODUCCIÓN AL COMPORTAMIENTO DE LOS TRIATOMINAE

Los insectos triatominos son una subfamilia del Orden Heteroptera, caracterizados por sus hábitos hematófagos. Se conocen más de 100 especies en el Nuevo Mundo y se ha señalado que más de la mitad podrían infectarse con el flagelado *Trypanosoma cruzi*, agente causativo de la enfermedad de Chagas (Schofield, 1994).

La mayoría de las especies de triatominos ocupan hábitats principalmente selváticos, en asociación estrecha con sus huéspedes vertebrados. Dichos hábitats incluyen diferentes tipos de nidos de

aves, madrigueras de zarigüeyas, rocas, árboles huecos, nidos de pequeños roedores y cuevas con murciélagos (Schofield, 1979). Algunas especies también invaden y colonizan los hábitats peridomésticos tales como los gallineros y corrales de cabras. Algunas de estas especies ya han sido encontradas en las viviendas humanas (Schofield, 1994).

Las especies de mayor importancia epidemiológica son aquellas capaces de colonizar fácilmente las viviendas de los humanos saliendo por la noche para alimentarse de sus hospedadores dormidos. Sin embargo, muchas de las especies principalmente selváticas invaden a veces las casas y pueden contribuir a la transmisión del parásito a los humanos y a otros hospedadores (perros).

Con respecto a su ubicación geográfica, *Triatoma infestans* es la especie más ampliamente distribuida en casi toda América del Sur. *Rhodnius prolixus* es el principal vector en el norte de América del Sur y parte de América Central, mientras a *Triatoma dimidiata* se encuentra en América Central y el sur de México. Además, también en América del Sur, hay otras especies epidemiológicamente importantes como *Pastrongylus megistus*, *T. sordida*, *T. brasiliensis* y *T. guasayana* (Zeledón y Rabinovich, 1981).

Durante las horas del día los insectos triatominos permanecen inactivos e inmóviles (*akinesis*). Además, durante este período los insectos están agregados, buscando estar con la mayor parte de la superficie de su cuerpo en contacto con el sustrato y con otros

conespecíficos (*tigmotaxis*) en esquinas, bordes o grietas. Este comportamiento les permite permanecer protegidos de posibles depredadores. En cambio, durante la noche, despliegan su mayor actividad, *i.e.*, alimentación, búsqueda de pareja y de refugios (Núñez, 1987; Lazzari, 1992; Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994; Lorenzo y Lazzari, 1996). Experimentos realizados por Lazzari (1992) mostraron que la actividad locomotora espontánea en *T. infestans* muestra dos picos de actividad, uno al comienzo de la escotofase y el otro al inicio de la fotofase.

Entre las claves que son explotadas por los triatominos para orientarse en el ambiente que los rodea se encuentran las térmicas, olfativas, vibratorias y visuales .

El comportamiento de búsqueda de alimento por estos insectos está basado en una orientación direccional (*taxias*) e involucra una orientación a corta y a larga distancia. La orientación a larga distancia comprende el uso de claves químicas (*quimiotaxis*) provenientes del hospedador (*e.g.*, CO_2) que son transportadas por el aire. A corta distancia, la *clave térmica* (el calor emitido por un hospedador de sangre caliente) es un estímulo suficiente y necesario que le permite a los insectos orientarse y desencadenar la respuesta de picado (Flores y Lazzari, 1996). Una vez en contacto con el hospedador las chinches perforan la piel utilizando el par de estiletos mandibulares. A continuación, se inyecta saliva, que posee un efecto vasodilatador e inhibidor de la hemostasis, y al menos en el caso de

Rhodnius prolixus, se ha demostrado que tiene un efecto anticoagulante (Ribeiro, 1987; citado por Schofield, 1994).

Cuando los insectos reconocen el alimento como tal comienza el proceso de ingestión. Existen dos fenómenos responsables de la respuesta de ingestión, uno relacionado con la composición iónica (sales) de la dieta y otro con la respuesta a los compuestos fagoestimulantes (*e.g.*, ATP) (Friend y Smith, 1977; Guerenstein y Núñez, 1994). Al terminar la ingesta, los insectos comienzan el proceso de diuresis, a través del cual eliminan en forma de agua entre un 40 y un 50% del volumen de sangre ingerido (Wigglesworth, 1934). Luego de finalizada la alimentación, los insectos buscan un refugio para protegerse de los posibles depredadores, activos durante las horas del día. Además, en el refugio, agregándose unos con otros, pueden encontrar los simbiontes necesarios para su desarrollo y pareja sexual en el caso de los adultos (Lake y Friend, 1968; Eichler *et al.*, 1996).

Las vinchucas también utilizan la clave térmica para la selección de sitios donde mudar, permanecer y eclosionar (Lazzari, 1991), y para sincronizar su reloj circadiano (Lazzari, 1992).

Con respecto a las *señales olfativas*, se conoce en *T. infestans* una feromona sexual producida durante el apareamiento que promueve la agregación de machos en torno a una pareja en cópula. La orientación de los machos hacia la pareja ocurre por un gradiente

químico y no a través de una respuesta anemotáctica (Manrique y Lazzari, 1995; de Brito Sánchez *et al.*, 1995; Manrique, 1997).

El patrón de comportamiento sexual en los triatominos consiste esencialmente en una secuencia estereotipada de siete pasos llevados a cabo por el macho (Manrique y Lazzari, 1995). Se han descrito diferentes tipos de comportamiento de rechazo realizados por la hembra frente a los intentos de cópula del macho. Estos consisten en movimientos abdominales, evasión, achatamiento contra el sustrato y estridulación (Manrique y Lazzari, 1994). Este último, involucrado en la comunicación intraespecífica sexual en *T. infestans*, utiliza la *señal vibratoria*. Por otro lado, existen también estridulaciones defensivas y de rechazo a depredadores, que son diferentes a las estridulaciones de rechazo de la hembra en el contexto sexual (Roces y Manrique, 1996).

Al comienzo de la escotofase, las vinchucas salen de sus refugios en procura de alimento. La intensidad de búsqueda del hospedador está relacionada con el nivel de ayuno. Los insectos ayunados se mantienen activos durante toda la fase oscura, estando por lo tanto expuestos por más tiempo frente a posibles depredadores. Por último, la búsqueda de refugios ocurre al final de la fase oscura (Lorenzo, 1997).

1.5. COMPORTAMIENTO DE AGREGACIÓN EN INSECTOS

Las feromonas de agregación se definen como sustancias producidas por individuos de una especie, que inducen el agrupamiento de otros miembros de la misma. La respuesta comportamental de un insecto estimulado por una feromona de agregación es un movimiento hacia la fuente del estímulo y una vez que llega a la misma, cesa la actividad locomotora.

Las feromonas que median comportamientos de agregación sirven para agrupar a los insectos con el fin de protegerse, defenderse, reproducirse, alimentarse, oviponer, colonizar nuevos hábitats, o combinaciones de ellas (Borden, 1977).

En muchos coleópteros, las feromonas de agregación son utilizadas como indicadores de fuentes potenciales de alimento o hábitats propicios (Shorey, 1973; Borden, J, 1977). Éstas sirven en parte y en algunos casos como feromona sexual. Las hembras de la cucaracha *Periplaneta americana* producen una feromona sexual que atrae a machos, pero también atrae larvas, presumiblemente con función de protección.

En el mosquito, *Culex tarsalis*, las hembras grávidas son atraídas desde una cierta distancia hacia el agua donde otras hembras han depositado previamente sus huevos. La feromona responsable de este comportamiento sería liberada, aparentemente, en el agua durante la puesta (Osgood, 1971, citado por Shorey, 1973). También las hembras

grávidas de *Schistocerca gregaria*, forman agrupamientos densos durante la oviposición. En este caso parece tratarse de un fenómeno olfativo relativamente débil que provoca el acercamiento de otras hembras desde una cierta distancia. Simultáneamente, interviene un fenómeno de quimiorrecepción de contacto que inhibiría la locomoción de las hembras cuando ellas contactan con otros insectos de la misma especie (Norris, 1970).

El comportamiento gregario de las larvas de la cucaracha *Blattella germanica* está mediado por una feromona liberada por otras larvas. Este comportamiento gregario favorece su crecimiento y desarrollo (Ishii, 1970; Ishii y Kuwahara, 1968).

Las glándulas anales del tenebriónido *Blaps sulcata* producen una sustancia que induce a los escarabajos a agregarse bajo las piedras, las que ofrecen protección contra el calor del desierto (Kauffmann, 1966, citado por Borden, 1985).

Las hembras y los machos del escarabajo *Lycus loripes* se agrupan en respuesta a una feromona liberada por los machos (Eisner y Kafatos, 1962, citado por Shorey, 1973). Estos agrupamientos son beneficiosos para la especie. Un depredador que come uno de los escarabajos asociará el mal gusto con la coloración distintiva (aposematismo). Se cree que en este caso, el comportamiento de agregación ayudaría a enfatizar la coloración peligrosa de los escarabajos y también ayudaría a disminuir la depredación (Gagliardo y Guilford, 1993).

Según Shorey (1973) existirían tres categorías de comportamientos que aprovecharían los insectos para agregarse en una fuente de olor.

Quimiotaxis: los animales orientan el eje de su cuerpo en dirección a la fuente de estímulo, debido a que pueden percibir directamente el gradiente de olor.

Kinesis: el insecto no percibe directamente la dirección de la fuente de olor, pero ésta causa que se desplace variando su velocidad (*ortokinesis*) o variando la frecuencia de giro (*klinokinesis*), dependiendo de la concentración del compuesto químico al cual el animal está expuesto.

Anemotaxis: los animales se orientan positivamente hacia corrientes de aire. El olor actúa como liberador, sensibilizando al insecto a algún otro estímulo y causando que éste se oriente hacia aquel olor. o sea

Muchos insectos poseen, probablemente, una considerable flexibilidad en sus mecanismos de agregación, pudiendo utilizar uno o más mecanismos en forma simultánea o sucesiva. Esta integración de los mecanismos depende del contexto comportamental en el que los insectos están expuestos al estímulo.

Existen varios sitios u órganos de liberación al ambiente de compuestos atractivos. Por ejemplo en el escarabajo *Blaps sulcata* se

encuentran las glándulas exócrinas que producen la feromona en sus glándulas anales (Kauffmann, 1966, citado por Borden). En la especie de cucaracha, *Blaberus craniifer*, la feromona de agregación es producida a partir de las glándulas mandibulares (Brossut, 1970; citado por Rust y Appel, 1985).

En la mayoría de los casos las feromonas de agregación son liberadas a través del canal alimentario. En los casos en que no habría alguna ventaja en una liberación rápida, los insectos liberan las sustancias agregantes en forma gradual, con las heces. Este fenómeno fue observado en *Blattella germanica* (Ishii y Kuwahara, 1967, 1968; Ishii, 1970) y en *Tipula simplex* (Hartman, 1978, citado por Borden). Ishii *et al.* (1967, citado por Borden) proponen que el material con actividad atractante se produce, posiblemente, en el recto y es adicionado a las heces cuando son excretadas.

Estudios de interacciones entre insectos y microorganismos sugieren que estos últimos están involucrados en la síntesis feromonal, así como también ciertos hongos como los basidiomicetes (Borden, 1985). Éstos, asociados a, por ejemplo, *Dendroctonus frontalis* pueden producir sulcatol, la feromona de agregación de *Gnathotrichus sulcatus*, un escarabajo escolítido (Byrne *et al.*, 1974; citado por Borden, 1985).

1.6. SEÑALES DE AGREGACIÓN COMO SEMIOQUÍMICOS INTERESPECÍFICOS EN INSECTOS

Como insectos subsociales, los Dermaptera constituyen un modelo original para los estudios comportamentales de las relaciones interespecíficas. Los estadios larvales más avanzados de las especies del género *Forficula* exhiben un comportamiento gregario mediado por feromonas de agregación, activas en todos los estadios de su desarrollo (Sauphanor y Sureau, 1993). La señal se utilizaría para el reconocimiento de los refugios por los individuos de las diferentes especies. En *Forficula auricularia* L., la atracción feromonal se originaría a partir de secreciones de las glándulas tibiales, o de hidratos de carbono cuticulares. La presencia simultánea de diferentes especies encontrada en trampas, podría atribuirse a una asociación activa entre especies, o al uso compartido de los mismos refugios, ligado a la falta de competencia. Sauphanor y Sureau (1993) estudiaron bajo condiciones de laboratorio, la intensidad del comportamiento de agregación de cinco especies de Dermaptera y su nivel de asociación e interactividad. Adultos y larvas de *Forficula* desarrollaron un alto grado de gregarismo. Estos autores hipotetizaron que marcas de refugios similares ocurren en otros insectos sociales o en insectos solitarios. La atractividad interespecífica de las marcas dejadas por miembros de las cinco especies del Orden Dermaptera estudiadas (*Forficula auricularia*, *F.*

decipiens, *F. pubescens*, *Labidura riparia* y *Euborellia*) plantea la pregunta relativa al origen de las sustancias involucradas. La señal común de marcado de los refugios por estas especies sería importante en la cohabitación de refugios, que ha sido observada en el campo (Sauphanor y Sureau, 1993).

Con respecto a las moléculas semioquímicas involucradas, Sauphanor y Sureau (1993) sugirieron que la feromona o señal química de agregación de la especie más numerosa del lugar podría actuar como una kairomona para los individuos de las otras especies.

Otro ejemplo interesante de comunicación interespecífica en los insectos fue estudiado por Appel (1994) en cucarachas. Las larvas del primer estadio de *Periplaneta americana* se agregan tanto sobre superficies contaminadas con heces de conespecíficos como sobre excrementos de *P. fuliginosa*. Se sabe también que las larvas de *P. americana* se agregan sobre papeles contaminados con heces de especies de otras familias de cucarachas como Blaberidae y Blattellidae (Roth y Cohen, 1973). La agregación en este caso ayudaría a acelerar el crecimiento y desarrollo de los estadios tempranos, pero sería de menor importancia en los estadios larvales más avanzados. La acumulación de feromona de agregación podría por otro parte, ser utilizada para marcar sitios de forrajeo y para orientarse hacia ellos (Kitamura *et al.*, 1974, citado por Rust y Appel, 1984).

En el Orden Coleoptera también podemos encontrar feromonas de agregación que provocan respuestas interespecíficas. Tanto los machos como las hembras de cinco especies relacionadas del género *Ips* se agregan como respuesta a una feromona común a todas. Esta sustancia es producida por el macho durante su alimentación sobre el floema de ciertos árboles. La discriminación ocurriría en la respuesta más que en la producción de la feromona. La discriminación olfativa, junto con patrones de vuelo estacionales, comportamiento de ataque, hábitats discontinuos y orientación, contribuyen en el mantenimiento de la especificidad en la colonización entre especies simpátricas (Vité y Renwick, 1971).

Walgenbach *et al.*, (1983) encontraron en otros coleópteros de la familia Curculionidae y del género *Sitophilus* (gorgojos), una atracción cruzada muy fuerte entre los gorgojos del arroz y del maíz, pero más débil con el gorgojo del granero. La liberación de esta feromona de agregación ocurre cuando están presentes sitios de alimentación y de oviposición.

Entre varias especies del género *Dendroctonus* examinadas por Pitman y Vité (1969) y por Pitman *et al.* (1969), *D. brevicomis*, *D. frontalis*, *D. ponderosae* y *D. jeffreyi*, la biosíntesis de la feromona de agregación no parece ser específica de cada especie o de un sexo. Solamente hay diferencias en las cantidades de sus componentes. Estos autores demostraron que estas feromonas están asociadas al canal alimentario pudiendo ser aisladas del intestino posterior de

estos insectos. Se ha postulado que son utilizadas primariamente como mensajeros químicos para facilitar la colonización sobre un hospedador, que incluiría además, encontrar pareja sexual (Vité, 1965; citado por Pitman *et al.*, 1969). En este caso, la integridad de la colonización entre especies simpátricas también está gobernada por un complejo de factores ecológicos y fisiológicos.

Por otra parte, las moléculas semioquímicas de los insectos pueden ser comunes para varias funciones y estar representadas en diferentes ordenes. Por ejemplo, la secreción defensiva de *Polistes fuscatus* contiene metil-palmitato, que es una feromona de dispersión de *Xylocopa virginica texana*, emitida durante su primera visita a la flor. Este éster es también un componente de una feromona de cría en las abejas y de una kairomona involucrada en la atracción de *Varroa jacobsoni* hacia las abejas. Además está presente en la feromona inhibidora de la oviposición en la barrenadora del maíz *Ostrinia nubilalis* (Sauphanor y Sureau, 1993).

1.7. COMPORTAMIENTO DE AGREGACIÓN EN HEMIPTERA

Entre los hemípteros se ha descrito la actividad de una feromona de agregación en *Eurydema rugosa* (Ishiwatari, 1976). En esta especie el agrupamiento de las larvas es inducido tanto por respuestas olfativas como táctiles. El estímulo químico responsable de la agregación es el *trans*-2-hexenal, que es un derivado de

componentes producidos por los mismos insectos. Se sabe que el mismo aldehído tiene también un efecto de alarma sobre las mismas larvas agregadas. Ishiwatari (1976) propuso una explicación para la bifuncionalidad de este compuesto. Cuando son esparcidas altas concentraciones de *trans*-2-hexenal otros miembros de la especie o depredadores se dispersan, mientras que si la secreción es exudada gradualmente y en poca cantidad, este compuesto químico juega un papel importante en la agregación.

Esta bifuncionalidad también existe en la chinche de cama *Cimex lectularius*. El compuesto químico actuaría como attractante y como sustancia de alarma (Levinson y Bar Ilan, 1971).

En las larvas de *Nezara viridula* también fue descrita una feromona bifuncional que induce agregación a bajas concentraciones y rechazo a altas (Lockwood y Story, 1985). Los estímulos necesarios para promover dichos comportamientos son visuales, táctiles y olfativos, siendo los dos primeros más importantes en el mantenimiento de la agregación.

El comportamiento de agregación de las larvas de *Pyrrhocoris apterus* es consecuencia de una atracción interindividual guiada por estímulos visuales y químicos (Schmuck, 1987). Cuando los insectos son dispersados artificialmente las larvas se reagrupan en un corto tiempo, atraídas por señales visuales. Cuando alcanzan a estar en contacto, estímulos químicos específicos son necesarios para establecer y mantener la agregación. Estos estímulos son producidos

por dos glándulas abdominales que contienen n-alquenos. La tendencia a agregarse en estos insectos estaría influenciada por factores abióticos como la temperatura y la humedad relativa, así como también cambios en los requerimientos ecológicos durante el desarrollo postembrionario.

1.7.1. COMPORTAMIENTO DE AGREGACIÓN EN TRIATOMINAE

El fenómeno de agregación pudo observarse tanto en adultos como en larvas de *T. infestans* y de *R. prolixus*, pero sólo en presencia de determinados sustratos. Además, en las larvas una feromona de atracción estaría involucrada en el comportamiento de agregación (Schofield, 1975). En otro trabajo, Schofield y Patterson (1977) sugirieron la existencia de una feromona juvenil de agregación, denominada JAP, presente en las heces de larvas de *T. infestans* y *R. prolixus*. Según estos autores, esta feromona promueve la atracción en larvas ayunadas hacia las deyecciones recién depositadas. En las larvas alimentadas, el JAP (u otro factor de las heces) actuaría como arrestante más que como attractante. Estos mismos autores no encontraron una sustancia de funciones similares en los adultos de estas dos especies.

Ondarza *et al.* (1986) trabajando con *T. mazzottii*, propusieron la existencia de al menos dos feromonas de agregación. Una de ellas, que sería excretada con los excrementos de las larvas y de las

hembras, actuaría sólo sobre hembras y larvas ayunadas. La otra estaría presente en las heces de los machos y funcionaría atrayendo machos, tanto alimentados como ayunados.

Cruz-López *et al.* (1993) trabajando con adultos y larvas de *T. barberi*, *R. prolixus*, *T. mazzottii*, *T. longipennis* y *T. pallidipennis* demostraron que los individuos de cada una de ellas se agregan sobre heces de conespecíficos.

Rojas (1991) trabajó con especies mexicanas de *Triatoma*, mostrando que la feromona de agregación es liberada en las heces por los estadios inmaduros y adultos, sin importar el sexo. Por otro lado Rojas y Cruz-López (1994) demostraron en *Triatoma mazzottii* que la temperatura, el sustrato, la distancia y la cantidad de heces afectarían la conducta de agregación. Otros factores examinados, como la humedad relativa, el color de la luz y la alimentación no parecen jugar un papel importante en limitar la respuesta a la feromona de agregación.

Por otro lado Taneja (1996), identificó al compuesto amoníaco (NH_3) en los excrementos de las vinchucas, demostrando la atractividad de este compuesto sobre un compensador de marcha. La latencia en la atracción al amoníaco dependió de la concentración y se vio influenciada por la humedad relativa. Registros electrofisiológicos sobre sensilias olfativas en larvas de *T. infestans* demostraron la presencia de receptores sensibles al amoníaco. Estos receptores también respondieron a volátiles presentes en las deyecciones.

Con respecto al aislamiento de la posible sustancia que promueve el comportamiento de agregación en los triatominos, Cruz-López y Morgan (1995) mostraron que las larvas de *T. infestans* y *T. mazzottii* son atraídos débilmente hacia extractos de heces fraccionados en solventes polares. Las sustancias aisladas, como por ejemplo la α -aminoacetofenona, no mostraron actividad atractiva en el rango de concentraciones estudiado. Además, no se obtuvieron reacciones positivas frente a las heces, extractos o compuestos puros en experimentos de elección con corrientes de aire.

1.8. SEÑALES DE AGREGACIÓN COMO SEMIOQUÍMICOS INTERESPECÍFICOS EN TRIATOMINAE

Cruz-López *et al.* (1993) estudiaron la respuesta de agregación frente a compuestos volátiles presentes en las heces de *T. barberi*, *R. prolixus*, *T. longipennis*, *T. pallidipennis* y *T. barberi*. Estos autores concluyeron que las sustancias que se encuentran en los excrementos de estas especies tienen un efecto interespecífico, lo cual sugiere que la feromona de agregación presente en las heces sería similar en las distintas especies, y que estos compuestos tendrían un antecesor común. Sugirieron, además, que la feromona de agregación podría ser un producto de la digestión final de la sangre ingerida.

Por otro lado estos mismos autores concluyeron que esta "feromona de agregación interespecífica" es independiente del sexo y del estado nutricional de los insectos.

1.9. QUIMIORRECEPCIÓN DE CONTACTO

Los estímulos gustativos, procesados por quimiorreceptores de contacto, han recibido menos atención en la comunicación química que los estímulos olfativos, pero existe una considerable información acerca de su importancia. Los órganos responsables de la quimiorrecepción de contacto se distribuyen a lo largo de todo el cuerpo, pero están más concentrados en los tarsos y en las piezas bucales (Chapman, 1982).

Aunque los quimiorreceptores de contacto pueden ser estimulados por moléculas disueltas en el aire, ellos son generalmente estimulados por compuestos químicos en solución acuosa o por sustancias químicas distribuidas sobre superficies sólidas (Chapman, 1982).

La quimiorrecepción de contacto es de particular importancia en el control de la alimentación. En *Phormia regina*, por ejemplo, la estimulación del tarso con azúcar provoca la extensión de la proboscis. De este modo, los pelos del labellum entran en contacto con la comida permitiéndole al animal la detectarla, diferenciándola de lo que no es verdadero alimento. Los pelos labelares son más sensibles que los

tarsales, siendo capaces de detectar sustancias presentes en concentraciones tan bajas que no estimularían los pelos tarsales (Dethier, 1976, citado por Chapman, 1982). También se han descrito órganos gustativos en el mosquito *Culiseta inornata* en los tarsos, el labellum, la lígula y también en el cibarium. El agua y varios azúcares provocaron una respuesta en estos receptores. En cambio la sangre no fue capaz de generar una respuesta cuando se contactaron los pelos del labellum o de la lígula con la sangre (Owen, 1963).

Estudios realizados en *P. regina* mostraron que los adultos de esta mosca son capaces de responder a hidrocarburos cuticulares de baja volatilidad, utilizando las sensilias de contacto de sus patas (*i.e.*, en sus tarsos o sus tibias) (Stoffolano *et al.*, 1997). Los hidrocarburos parecen estar involucrados en el comportamiento sexual de *Phormia* y serían los responsables de estimular la cópula en los machos de esta especie.

La quimiorrecepción de contacto también reviste importancia en el control de la oviposición. De este modo *Locusta*, que ovipone en superficies húmedas, cava un agujero con su abdomen y puede detectar varias sales inorgánicas en la arena (Woodrow, 1965, citado por Chapman, 1982). En las mariposas monarcas *Danaus plexippus* el comportamiento de oviposición (búsqueda de superficies aptas para oviponer) también está mediado por quimiorreceptores de contacto (Bauer *et al.*, 1996), que se encuentran en los tarsos y en la antena.

Por otro lado, el comportamiento gregario de las larvas de las langostas *Locusta migratoria* es estimulado por el contacto de los insectos con ciertos hidrocarburos presentes en sus cutículas (Heifetz y Applebaum, 1996).

Trabajando en *Periplaneta americana*, Hansen-Delkeskamp (1992) encontró en las antenas de estos insectos pelos que, de acuerdo a su sensibilidad, están involucrados en la búsqueda de alimento y en el reconocimiento de miembros del mismo grupo.

Con respecto a Heteroptera, el comportamiento de agregación de la chinche de fuego *Pyrrhocoris apterus* está mediado en parte por estímulos químicos (Schmuck, 1987). Este autor demostró que es necesario el contacto de los insectos con una sustancia química específica para que se produzca el arrestamiento y el posterior mantenimiento de la agregación en estas chinches. La percepción de esta sustancia arrestante se realiza en el último segmento antenal que muestra un gran número de "sensilias estilocónicas" (Zdarek, 1970, citado por Schmuck). La/s sustancia/s involucrada/s son producidos por dos glándulas de la parte anterior del abdomen de las larvas.

1.10. OBJETIVOS DEL TRABAJO

El propósito del presente trabajo de Tesis es analizar los siguientes aspectos de la biología de las vinchucas:

1- la existencia de compuestos volátiles en los excrementos de *T. infestans*, capaces de mediar el comportamiento de agregación y su relación con las variaciones dinámicas de la distribución de estos insectos;

2- el comportamiento de agregación en otras especies de triatomíneos, así como sus relaciones interespecíficas;

3- investigar la posible existencia otras señales químicas de agregación, de origen distinto al fecal en *T. infestans*.

CAPÍTULO 2. Comportamiento de agregación en

Triatoma infestans

2.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El estudio de todos los aspectos referidos al comportamiento de agregación en los triatominos y en especial en *Triatoma infestans*, por ser uno de los principales vectores de la enfermedad de Chagas, es de suma trascendencia. La identificación de una sustancia que promueva la agregación es importante para su posible aplicación en el control y censado de vinchucas en el campo. Además, en caso de que exista una "feromona de agregación", la misma podría ser utilizada en trampas.

Es conocido que tanto los adultos como las larvas de las vinchucas tienden a reposar en agrupaciones, esto es, se localizan en grupos de individuos en lugares del ambiente favorables para ellas (como grietas, rajaduras, bordes, esquinas). Todos ellos ofrecen una alta superficie de contacto con el cuerpo de otros insectos (tigmotaxis). Además de la tigmotaxis también existen claves químicas que promueven la agregación. Schofield y Patterson (1977) sugirieron la existencia de una "feromona de agregación juvenil", que denominaron JAP (juvenile assembly pheromone), presente en los excrementos de las larvas de *T. infestans* y de *Rhodnius prolixus*. Esta feromona actuaría sobre las larvas ayunadas de ambas especies. Según estos autores esta feromona sólo existiría en las larvas.

Por otro lado, Ondarza *et al.* (1986) sugirieron la existencia de al menos dos feromonas de agregación en *T. mazzottii*. Una de ellas actuaría sobre larvas y hembras ayunadas y se excretaría con las

heces de ambas. La otra feromona de agregación propuesta, estaría presente en los excrementos de los machos, y afectaría el comportamiento de machos (ayunados o no).

En este capítulo estudiaremos el comportamiento de agregación en larvas y adultos de *T. infestans*. Analizaremos la dinámica de agregación, la fuente del estímulo que promueve dicha agregación y finalmente el significado biológico de la señal química que media dicho comportamiento.

2.2. EXPERIMENTOS CON LARVAS DE *T. INFESTANS*

2.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Se usaron larvas de 1^{er} y 2^{do} estadio de *T. infestans* con una semana de ayuno postecdisis. Estos insectos fueron criados en condiciones controladas en nuestro insectario, a una temperatura de ca. 30°C y 60-70% de humedad relativa. Fueron alimentados con sangre citratada de caprino, utilizando un alimentador artificial diseñado por Núñez y Lazzari (1990).

Recolección de heces. Las deyecciones de las larvas y de los adultos fueron colectadas en papeles de filtro previamente cortados en piezas de 2x3 cm. Los papeles donde se recolectaron las deyecciones se ubicaron a 2 cm por debajo de frascos (10 cm en altura y 8 cm de diámetro) que contenían insectos recién alimentados. Estos papeles impregnados nunca entraban en contacto con los

insectos ya que las heces se deslizaban a través de una malla de acero inoxidable que cierra estos frascos por su base.

Los excrementos recolectados fueron utilizados inmediatamente (heces frescas) o tres días después de depositados (heces secas). En el último caso, los papeles fueron mantenidos en una cámara a ca. 30°C y 60 % de humedad relativa hasta su utilización.

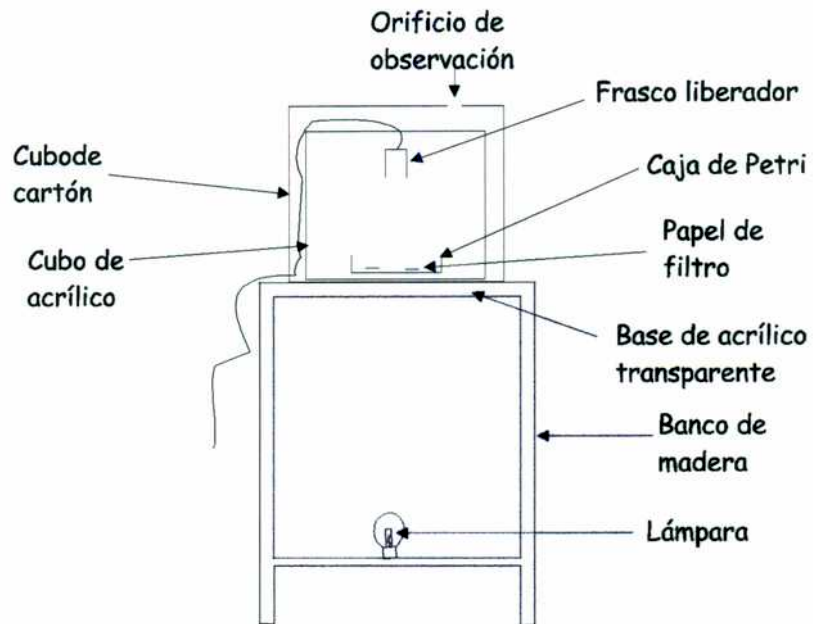
Dispositivo experimental: El fundamento del diseño experimental utilizado para estudiar el fenómeno de agregación, fue ofrecer papeles con fuentes químicas potenciales y registrar la agregación o atracción inducida sobre los insectos por los estímulos. El comportamiento de agregación de la vinchuca *T. infestans* frente a señales provenientes de sus heces fue registrado usando la arena que se muestra en la figura 1. Dispositivos similares fueron empleados por Ishii y Kuwahara (1967) para estudiar el comportamiento de agregación en cucarachas, y por Levinson y Bar Ilan (1971) en chinches de cama. Como arena experimental se usó una caja de Petri de vidrio de 13 cm diámetro y 3 cm de altura. Es importante destacar que ni los adultos ni las larvas de *T. infestans* pueden trepar superficies verticales de vidrio, a diferencia de *R. prolixus*.

La arena utilizada fue dividida con tres rayos marcados en la parte externa de la base. Los mismos determinaban tres sectores angulares de 120° cada uno. La base de la arena se cubrió con un papel de filtro. Además, en cada sector se colocó una pieza rectangular de

papel de filtro de 2x3 cm (figura 1b). En las series controles los tres papeles estaban limpios, mientras que en las series experimentales alguno de ellos estaban impregnados con heces y otros permanecían limpios., .

La arena circular se apoyó sobre un vidrio de 30 cm de lado cubierto con un papel blanco sobre el que se dibujó el contorno de la arena y sus rayos. De este modo fue posible corregir los cambios de posición de la arena entre ensayos.

a)



b)

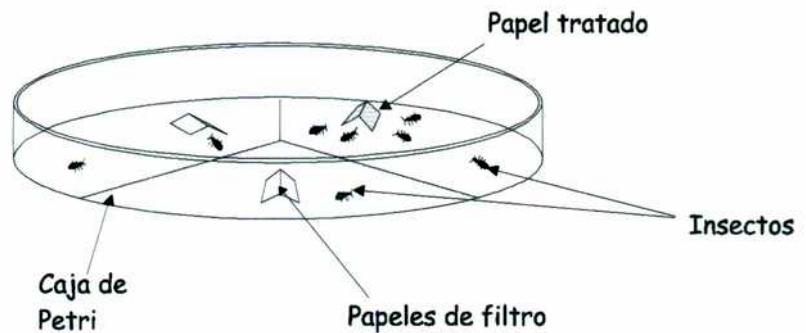


FIGURA 1: Arena experimental utilizada para ensayar la respuesta de agregación de los insectos a piezas de papel de filtro impregnadas con la fuente de estímulo. a) Vista lateral del dispositivo; b) Vista superior mostrando los tres sectores y la distribución de los papeles y los insectos.

Un cubo de acrílico de 20 cm de arista, sin base, encerraba a la caja de Petri, que apoyaba sobre un vidrio translúcido de 30 cm de lado. A la misma se accedía por una de las paredes laterales del cubo que se abría a modo de puerta. Sobre el cubo de acrílico se colocó otro cubo de cartón oscuro de 25 cm de arista. En su cara superior presentaba un orificio de observación de 0,5 cm de diámetro, a través del cual era posible ver todo el campo de la arena. Los individuos a ensayar eran liberados en el centro de la arena., para lo cual se colocaban dentro de un frasco de plástico invertido de 3 cm de diámetro por 5 cm de alto. El frasco estaba unido a un hilo de nylon de 0,01 mm, que atravesaba la cara superior de la caja acrílica, bordeaba luego exteriormente una de sus caras laterales y pasaba por debajo de la cubierta de cartón (Figura 1a). Así era posible, tirando con suavidad del mismo, elevar el frasco desde el exterior del sistema liberando a las vinchucas en la caja de Petri, sin producir perturbaciones.

Todo el sistema se apoyaba sobre un soporte de madera con 4 patas en cuyo fondo se colocó centralmente una lámpara de 15 wats de potencia. Mediante un regulador de voltaje se ajustó la iluminación a 25 lux. Este tipo de soporte permitió la circulación de aire entre la lámpara y el sistema, evitando así que variara la temperatura del vidrio durante los ensayos. La misma se midió con un termómetro-termistor al comienzo y al final de cada repetición. La presencia de

los dos cubos evitó eventuales interferencias provocadas por el observador.

Cada ensayo se estructuró de la siguiente manera:

1. Distribución de las tres piezas de papel en las posiciones correspondientes (figura 1b);
2. medición de la temperatura de la base de la arena, utilizando un termómetro-termistor;
3. ubicación de un lote de insectos en el centro de la caja de Petri con la ayuda de un frasco de plástico invertido (5x3 cm) como se muestra en la figura 1a;
4. cierre de la caja de acrílico y colocación de la caja de cartón sobre la primera;
5. encendido de la lámpara;
6. pasados 10 minutos los insectos son liberados;
7. al finalizar cada ensayo se cuenta el número de vinchucas en cada zona, a través del orificio de observación (Figura 1a) y por transparencia.

Todos los ensayos se realizaron a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ para evitar que los insectos entren en akinesis.

Cada lote de animales fue utilizado una sola vez. Tanto los papeles como la base de la arena se descartaron y se reemplazaron

entre ensayos. Al final de cada ensayo se limpiaron con acetona las pinzas utilizadas y la arena experimental.

La posición del papel tratado era rotada entre repeticiones para compensar eventuales asimetrías espaciales.

Ensayos preliminares: Se realizaron para estimar el tiempo mínimo de duración de los ensayos. El tiempo mínimo para cada ensayo se definió como aquel en el cual los insectos entraban en akinesis y su distribución no variaba al cabo de una hora.

Series experimentales

1^{ra} Serie: Se midió la respuesta de agregación de larvas del 2^{do} estadio frente a un papel impregnado con heces frescas, otro con heces secas (ambos, papeles experimentales), y el tercer papel limpio, como control. Las heces fueron obtenidas de larvas del 3^{er} estadio. Se usaron 9 insectos en cada ensayo y se hicieron un total de veinte repeticiones.

2^{da} Serie: Se midió la respuesta de agregación de larvas del 2^{do} estadio frente a un papel contaminado con heces frescas y dos papeles limpios. Los excrementos se obtuvieron de larvas del 5^{to} estadio. Se realizaron ocho ensayos con 9 individuos cada uno.

3^{ra} Serie: Se analizó la respuesta de agregación frente a dos papeles limpios (controles) y el tercero impregnado con heces secas

(experimental). Las heces se recolectaron de larvas de diferentes estadios. El comportamiento de agregación fue estudiado en:

i. Larvas de 1^{er} estadio con una semana de edad. Se realizaron diez repeticiones con 9 individuos en cada uno.

ii. Larvas del 2^{do} estadio con diez días de ayuno postecdisis. Fueron hechos diez ensayos con 9 insectos cada uno.

Series Control

Los ensayos control se realizaron utilizando tres papeles de filtro limpios. Se realizaron dos series:

I. Larvas del 5^{to} estadio, con tres semanas de ayuno postecdisis. Se llevaron a cabo once ensayos con un número de individuos que osciló entre 5 y 7 insectos por repetición.

II. Larvas del 1^{er} estadio, con dos semanas de ayuno postecdisis. Se hicieron doce ensayos con 9 individuos cada uno.

Análisis estadístico: Para cada serie experimental, la respuesta de agregación fue analizada estadísticamente con una prueba de G de bondad de ajuste para una distribución al azar (*i.e.*, 1/3 para el sector experimental y 2/3 para los sectores control) (Sokal y Rohlf, 1981).

2.2.2. RESULTADOS

Series experimentales

1^{ra} Serie: Cuando en el mismo ensayo se ofrecieron en la arena circular papeles impregnados con heces secas y frescas, la mayoría de las larvas se agregaron en o alrededor de los papeles impregnados con heces secas, mientras que un número reducido se encontraba sobre el de heces frescas (Figura 2). El análisis de frecuencias demostró que esta diferencia es altamente significativa ($G_p = 32,7$, $P < 0,001$).

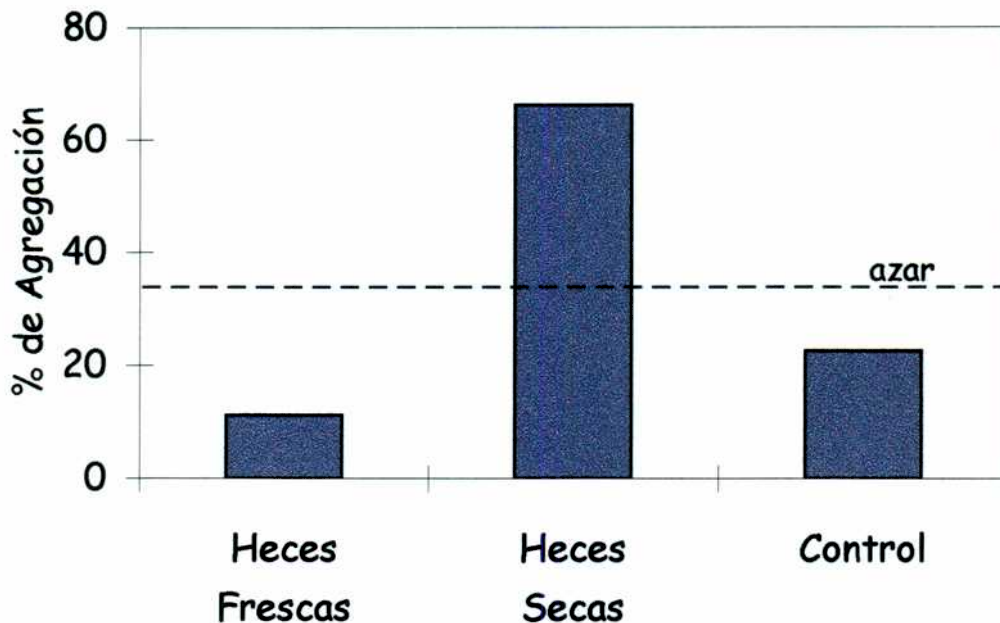


FIGURA 2: Respuesta de las larvas del 2^{do} estadio frente a papeles impregnados con heces secas, heces frescas y un control, ofrecidos simultáneamente. La distribución de los insectos difirió significativamente de una distribución al azar (línea punteada), pero los insectos prefirieron el papel impregnado con heces secas ($P < 0,001$).

2^{da} Serie: Se observa que las vinchucas rechazaron significativamente el papel impregnado con heces frescas (figura 3), prefiriendo los papeles control limpios ($G_p = 10,9$, $P < 0,005$).

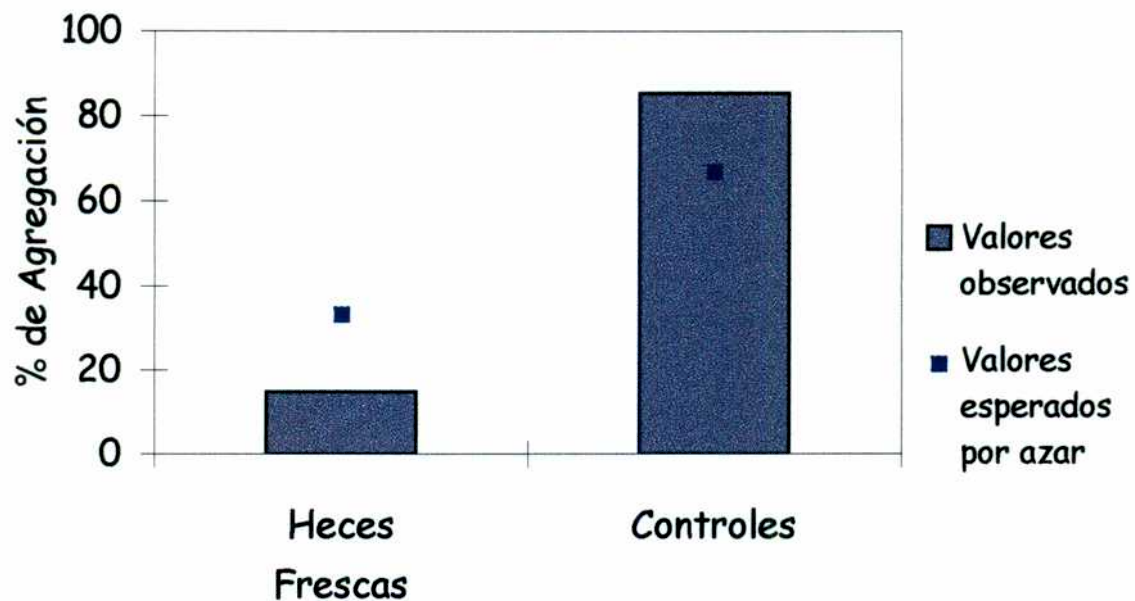


FIGURA 3: Respuesta de las larvas del 2^{do} estadio frente a 2 papeles limpios y a uno impregnado con heces frescas ofrecidos simultáneamente. La distribución de los insectos difirió significativamente del azar, evitando el papel impregnado con las heces frescas y prefiriendo significativamente los controles ($P < 0,005$).

3^{ra} Serie: Los resultados muestran que tanto larvas del 1^{er} estadio (Serie 3i) como las del 2^{do} (Serie 3ii) prefirieron significativamente un papel impregnado con heces secas frente a dos papeles limpios (figura 4 y 5 respectivamente). Los valores estadísticos de esta serie para las larvas del 1^{er} y 2^{do} estadio arrojaron un valor de G_p de 8,01 ($P < 0,005$) y de 15,15 ($P < 0,001$) respectivamente.

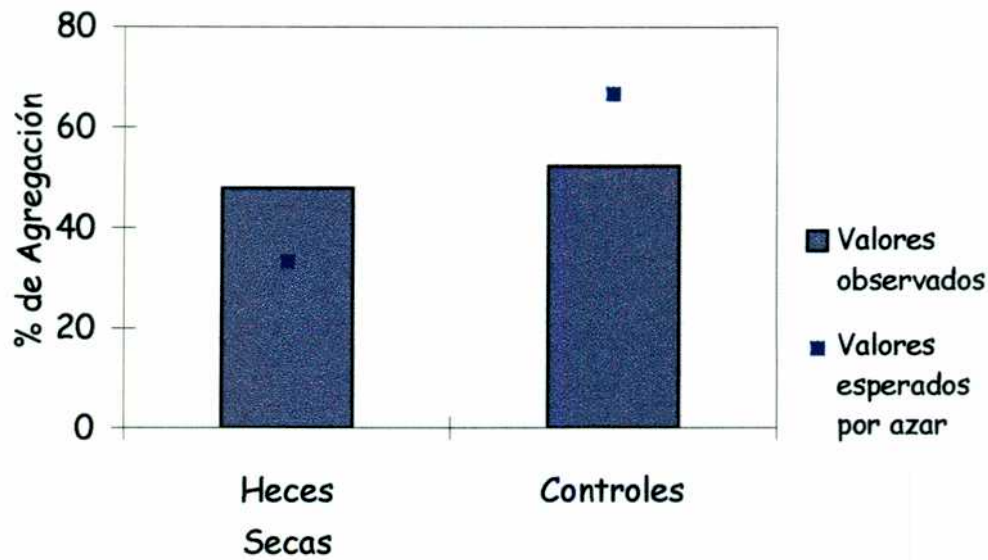


FIGURA 4: Respuesta de larvas del 1^{er} estadio frente a 2 papeles limpios y a uno impregnado con heces secas ofrecidos en la arena simultáneamente. La distribución de los insectos difirió significativamente del azar, prefiriendo el papel impregnado con las heces secas ($P < 0,005$).

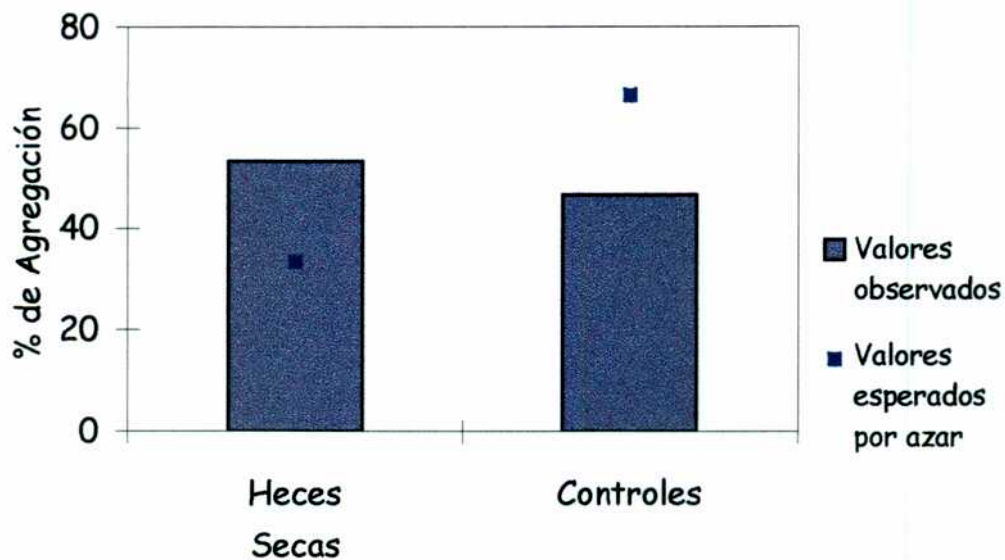


FIGURA 5: Respuesta de las larvas del 2^{do} estadio frente a 2 papeles limpios y a uno impregnado con heces secas ofrecidos al mismo tiempo en la arena. La distribución de los insectos difirió significativamente del azar; prefiriendo el papel impregnado con las heces secas ($P < 0,001$).

Series Control

Tanto las larvas 1^{er} estadio como las del 5^{to} se distribuyeron al azar en la arena circular (*i.e.*, 1/3 de los insectos en cada sector). La prueba de Gp arrojó un valor de 0,66 para las larvas del 5^{to} estadio y de 0,9 para las de 1^{er} estadio ($P > 0.05$).

2.3. EXPERIMENTOS CON ADULTOS DE *T. INFESTANS*

En esta serie de ensayos se estudió la respuesta de agregación de los adultos de *T. infestans* frente a excrementos secos, que ya hemos demostrado que provocan un comportamiento de agregación en las larvas.

2.3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con *hembras y machos* de *T. infestans* que fueron tomados directamente de nuestro criadero. El ayuno de los insectos fue de aproximadamente siete días.

Las *heces* fueron recolectadas de larvas de *T. infestans* durante su alimentación, de la misma forma descrita anteriormente. Los papeles de filtro impregnados con los excrementos se dejaron secar y se utilizaron en los días subsiguientes.

Como dispositivo experimental se utilizó una *arena circular* similar a la utilizada en los experimentos con larvas, pero de 23 cm de

diámetro. En ella se colocaron tres piezas de papel de filtro, plegadas, ubicadas en forma equidistante, delimitando tres sectores. En los ensayos experimentales uno de los papeles estaba impregnado con heces, mientras que los otros dos permanecían limpios. En los ensayos control los tres papeles eran limpios.

Para cada serie experimental, la respuesta de agregación fue analizada con la ayuda de una prueba de G de bondad de ajuste para una distribución al azar (*i.e.*, $1/3$ para el sector experimental y $2/3$ para los sectores control). Para realizar otras comparaciones utilizamos la prueba de t (Sokal y Rohlf, 1981).

Series experimentales

Se realizaron dos series de ensayos experimentales, una de *hembras* y otra de *machos*. Para la primera se realizaron nueve repeticiones con un total de 32 individuos, mientras que para la serie de los *machos* también se hicieron nueve repeticiones con 41 individuos en total.

Series control

Para los ensayos control, el ayuno de los adultos utilizados fue de aproximadamente siete días. Para las *hembras* se realizaron cinco repeticiones con 24 individuos como total, mientras que para los

machos fueron un total de 30 individuos, que se distribuyeron en cinco repeticiones.

2.3.2. RESULTADOS

Series experimentales

En la serie *hembras* se observó una respuesta de agregación muy significativa hacia los papeles contaminados con heces secas frente a los controles limpios con un valor del estadístico de G_p de 23,2 ($P < 0,001$) (figura 6).

Con respecto a la serie *machos*, también la agregación fue significativa, prefiriendo los papeles impregnados con las heces frente a los limpios. La prueba de G_p arrojó el resultado de 8,91 ($P < 0,005$) (figura 6).

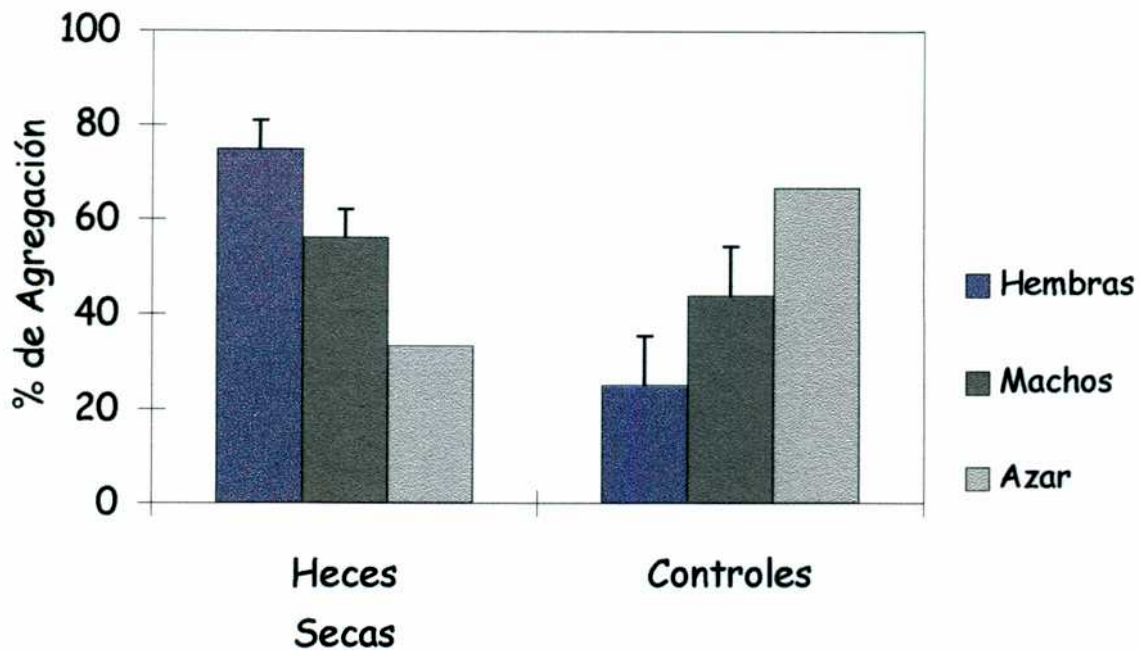


FIGURA 6: Respuesta de agregación de los adultos hacia dos papeles limpios y uno impregnado con heces secas, ofrecidos simultáneamente. Los insectos prefirieron significativamente el papel impregnado con las heces secas ($P < 0,005$).

No hubo diferencias significativas en la respuesta de *machos* y de *hembras* hacia los papeles impregnados con los excrementos secos ($t=0,79$, $gl=16$, $P=0,436$, NS).

Series control

Tanto los *hembras* como los *machos* se distribuyeron al azar, siendo los valores del estadístico G_p de 0,233 y 3,30 respectivamente.

2.4. EXPERIMENTOS CON HECES DEPOSITADAS 24 HORAS LUEGO DE LA INGESTA

Cuando recolectamos las heces para los experimentos descritos anteriormente y los posteriores, éstas se colectaron durante la alimentación o posteriormente a ella. Cuando finaliza la ingesta de sangre, los insectos inician un período de intensa diuresis, que dura alrededor de 4 a 5 horas. Por lo tanto, no es posible discernir si los factores que inducen la agregación de las vinchucas también están aún presentes en los excrementos producidos en etapas posteriores, sin una proporción tan grande de orina.

Formalmente, la excreción consiste en la separación y la eliminación de sustancias no deseadas y la retención o reabsorción de constituyentes útiles, con el objeto de mantener un medio interno constante. La orina producida en los túbulos de Malpighi se descarga dentro del intestino posterior o recto de los insectos, donde se mezcla con los residuos de la ingesta, formándose así la excreta (Wigglesworth, 1972). Los insectos excretan nitrógeno principalmente como ácido úrico. También excretan purinas como xantina, hipoxantina, adenosina y guanina, así como pequeñas cantidades de urea, sales inorgánicas y pigmentos.

En esta sección se describen una serie de ensayos en los que se estudió la respuesta de las vinchucas a sus excrementos producidos en etapas no diuréticas.

2.4.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Para esta serie de ensayos se recolectaron heces de larvas de *T. infestans* durante el 2^{do} día luego de la alimentación, evitando así la recolección de orina junto con las heces, como ocurre durante el primer día luego de la alimentación. La diuresis ocurre en las primeras horas luego de la ingesta, y también durante el primer día. Las heces colectadas se utilizaron a los tres días después de depositadas.

Como insectos experimentales utilizamos larvas del 4^{to} estadio de *T. infestans* con una a dos semanas de ayuno postecdisis.

La arena circular de 13 cm de diámetro fue utilizada como dispositivo experimental. Allí se ubicaron un papel tratado y los dos papeles control limpios. Los tres papeles de filtro, de 2x3 cm estaban plegados a modo de refugios.

Se llevaron a cabo nueve repeticiones con un número de insectos por ensayo que variaba entre 9 y 12. El número total de individuos fue de 85.

2.4.2. RESULTADOS

Los resultados indican que los insectos prefirieron significativamente el papel de filtro impregnado con heces, frente a los dos controles limpios, sin ninguna señal atractiva ($G_p=5,7$, $P<0,025$) (figura 7). Por lo tanto, podemos deducir que la señal de agregación se encuentra en los excrementos secos y no en la orina.

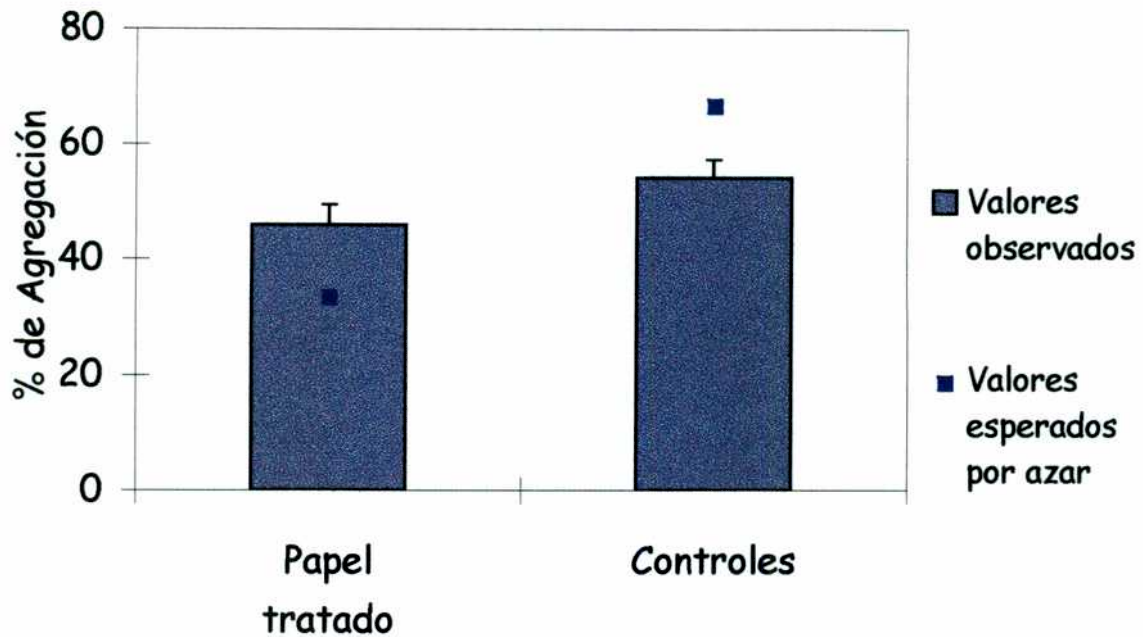


FIGURA 7: Respuesta de agregación de larvas del 4^{to} estadio a 2 papeles limpios y a uno impregnado con heces secas (recolectadas 1 día después de la alimentación), ofrecidos al mismo tiempo en la arena. La distribución de los insectos difirió significativamente del azar, prefiriendo el papel impregnado con las heces secas ($P < 0,025$).

Debemos tener en cuenta la relación que existe entre la orina y las heces en los diferentes momentos luego de la ingestión. Los insectos recién alimentados secretan copiosas cantidades de orina. Pero luego de 24 horas, la excreción de orina es mínima, siendo más abundante, relativamente la excreción de las deyecciones. Los resultados presentados aquí muestran que la deposición de las señales fecales de agregación no ocurre solamente luego de la ingestión, sino que podría estar presente en excrementos producidos en todo momento.

2.5. LARVAS EXPUESTAS A CORRIENTES DE AIRE CON OLORES DE HECES

En los experimentos anteriores realizados en las arenas circulares, se demuestra que tanto las larvas como los adultos de *T. infestans* muestran una tendencia significativa a agruparse en o alrededor de papeles impregnados con deyecciones secas. Las heces provocarían una disminución en la actividad locomotora que hace que los insectos permanezcan en los sectores con heces. Pero con estos ensayos no podemos inferir si la sustancia actúa como un verdadero attractante o si sólo detiene la locomoción espontánea. Esta cuestión la podemos resolver utilizando un olfatómetro.

2.5.1. MATERIALES Y MÉTODOS

El *olfatómetro* de discriminación simultánea utilizado fue diseñado por Núñez (1987). Consistió en un túnel de 20 cm de largo, de 5x1 cm de sección, con una puerta corrediza removible como techo (figura 8). Uno de los extremos del túnel estaba cerrado con una malla metálica, y el otro se conectaba con una bomba de extracción. Cuando la bomba estaba encendida, podía mover una corriente de aire a una velocidad media de 300 ml/min. El túnel se dividió en tres secciones: una proximal donde se encontraba el refugio para los insectos, una media y una distal dividida por una pared media en dos brazos, izquierdo y derecho. El refugio se separaba de la sección media por una puerta de malla metálica (C1), mientras que la puerta C2

separaba la sección media de la distal. Las dos puertas se abrían mediante un dispositivo magnético, permitiendo que los insectos caminasen libremente a lo largo del túnel. Cuando las puertas se cerraban, el túnel quedaba dividido en cuatro compartimientos diferentes: el refugio, la sección media y los dos brazos de la sección distal, derecho e izquierdo. Los estímulos se inyectaron en una corriente de aire en el extremo distal del túnel a un flujo de 100 ml/min en cada uno de los brazos. La bomba de succión extrajo aire a una velocidad de 300 ml/min desde el extremo proximal.

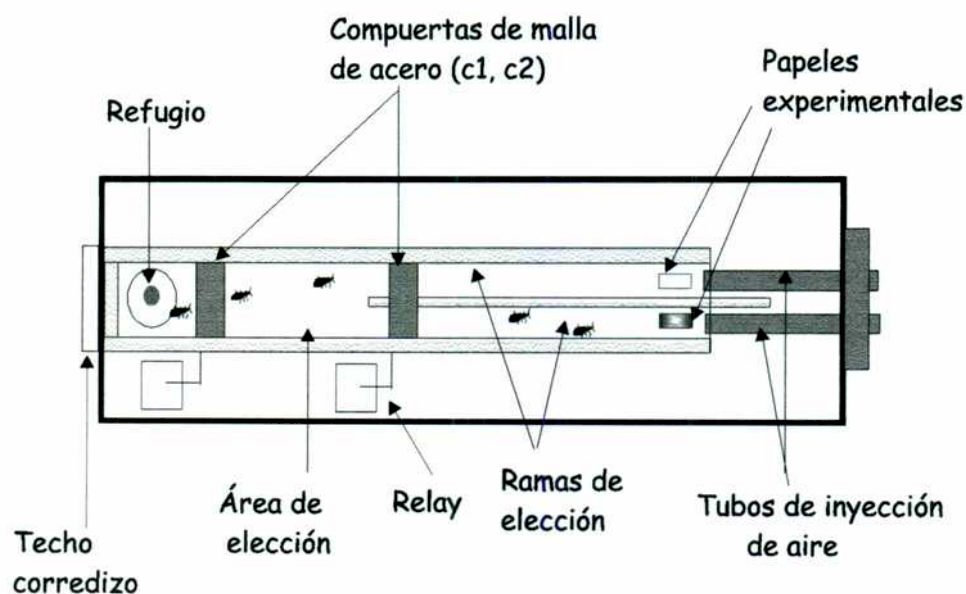


FIGURA 8: Vista en planta del olfatómetro de discriminación simultánea.

La rutina de trabajo incluyó los siguientes pasos:

1. Ubicación de un lote de insectos en el refugio;

2. apagado de la luz;
3. pasados 10 minutos, las bombas de inyección y de succión se encendieron;
4. luego de 5 minutos las puertas C1 y C2 se abrieron;
5. al cabo de 15 minutos las puertas se cerraron, las bombas se apagaron y las luces del cuarto se encendieron;
6. se registró la distribución de los insectos en el refugio, y el área de elección (brazos izquierdo y derecho).

Previo a cada ensayo, los papeles experimental y control se colocaron en el piso, antes de la rejilla terminal (extremo distal), expuestos a dos corrientes de aire limpio. El papel experimental fue impregnado con *heces secas* colectadas de larvas o de adultos, de la misma forma descripta en las secciones anteriores.

Los *insectos* a ensayar fueron larvas del 4^{to} y del 5^{to} estadio de *T. infestans*, alimentadas en el estadio anterior, y utilizadas una semana luego de la ecdisis. Los experimentos fueron hechos con una temperatura ambiente mantenida a 25°C.

Los controles se llevaron a cabo utilizando dos corrientes de aire limpio.

Series experimentales

1^{ra} Serie: La respuesta de agregación se ensayó en larvas del 4^{to} estadio y los excrementos ensayados pertenecían a larvas del 5^{to} estadio. Se realizaron treinta y seis repeticiones con 10 individuos cada una.

2^{da} Serie: Se midió la respuesta de atracción de larvas del 5^{to} estadio a heces secas pertenecientes a larvas del mismo estadio. En este caso se hicieron once repeticiones con 6 insectos por cada uno.

3^{ra} Serie: Las heces se colectaron de adultos y como insectos experimentales se utilizaron larvas del 5^{to} estadio. Se realizaron doce repeticiones con 6 individuos por cada una.

Cada grupo de insectos era reemplazado por uno nuevo en cada repetición, el olfatómetro se limpiaba y los papeles de filtro se reemplazaron por otros.

Para controlar posibles sesgos espaciales, la posición de los papeles, experimental y control, fue alternada en los ensayos sucesivos.

Series control

En estas se ensayó la respuesta de orientación de larvas del 4^{to} y del 5^{to} estadio frente a dos corrientes de aire limpio. Se realizaron diez ensayos para cada estadio con 8 insectos por repetición.

2.5.2. RESULTADOS

Series experimentales

1^{ra} Serie: Cuando las larvas del 4^{to} estadio fueron ensayadas en su respuesta a excrementos de larvas del 5^{to} estadio, éstas se orientaron hacia la corriente de aire que traía olores (71,6% vs 50% esperado por azar, $G_p=29,8$, $P<0,001$) (figura 9).

2^{da} Serie: Las larvas ayunadas del 5^{to} estadio también exhibieron una tendencia significativa a orientarse hacia una corriente de aire que pasaba a través de un papel impregnado con heces secas pertenecientes a larvas del mismo estadio (71,4% vs 50% esperado por azar, $G_p=12,2$, $P<0,001$) (figura 9).

3^{ra} Serie: La misma tendencia significativa fue observada cuando larvas del 5^{to} estadio fueron ensayadas en su respuesta de atracción a heces de adultos (68,4% vs 50% esperado por azar, $G_p=9,7$, $P<0,005$) (figura 9).

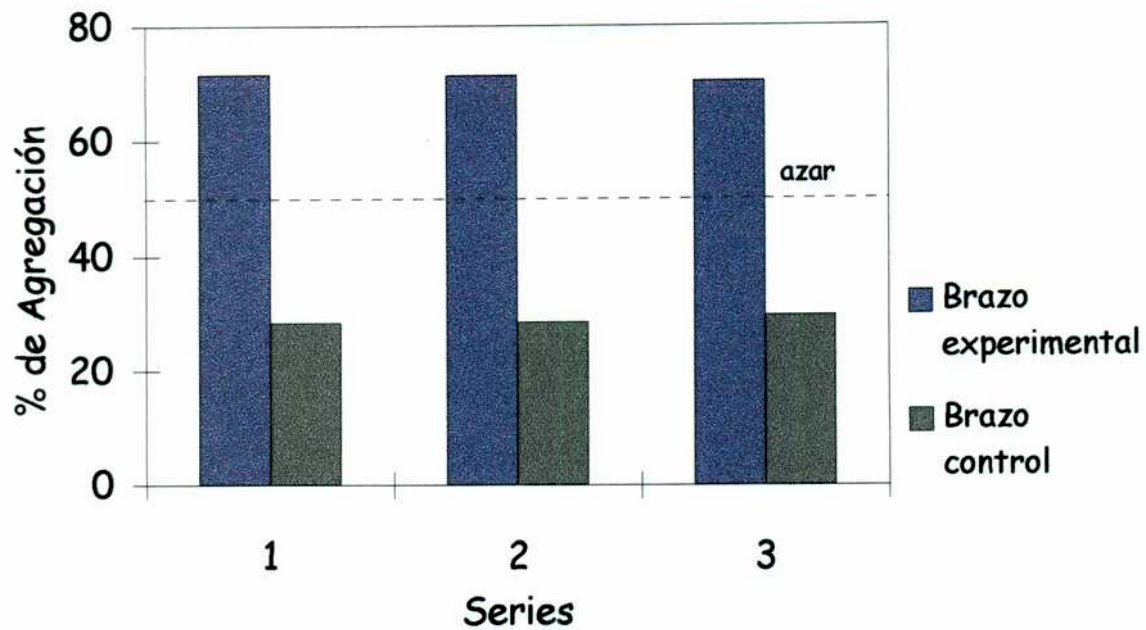


FIGURA 9: Orientación de las vinchucas en el olfatómetro. Serie1) larvas del 4^{to} estadio y heces secas de larvas del 5^{to} estadio; Serie 2) insectos experimentales y heces de larvas del 5^{to} estadio y Serie 3) larvas del 5^{to} estadio como insectos experimentales y heces de adultos. La línea punteada indica valores esperados para una distribución al azar. Las diferencias entre los valores observados y esperados fueron estadísticamente significativas (Serie 1 y 2 $P < 0,001$ y Serie 3 $P < 0,005$).

No se encontraron diferencias en las respuestas de las larvas a corrientes de aire que traían olores de heces pertenecientes al mismo o a otro estadio larval o pertenecientes a adultos ($P = 0,089$, NS).

Series control

En todos los ensayos control, las vinchucas se distribuyeron azarosamente (Prueba de G, NS).

2.6. DINÁMICA DIARIA DE AGREGACIÓN/DISPERSIÓN

La actividad locomotora diaria de los adultos de *Triatoma infestans* exhibe dos componentes principales, uno en la segunda hora de la escotofase y un segundo al comienzo de la fotofase. La ocurrencia de estos picos estarían relacionados con la búsqueda de comida y de refugios, al anochecer y al amanecer respectivamente. Esta actividad está controlada por un sistema circadiano que involucra arreglos jerárquicos de osciladores acoplados (Lazzari, 1992).

En este punto estudiaremos la variación temporal en el comportamiento de agregación/dispersión en adultos de *T. infestans*.

2.6.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objeto de estudiar esta variación temporal en el comportamiento, se midió la distribución de veinte adultos recién alimentados en una arena experimental. Se ubicaron diez hembras marcadas para su identificación con pintura acrílica y diez machos en la arena y se registró, con una videocámara, su comportamiento cada 30 minutos, durante 17 días. El método fue descrito por Lazzari (1991). El ensayo comenzó a los 20 días luego de la muda imaginal de los insectos. Se utilizó una arena de acrílico de 35 x 9 x 3,5 cm con una tapa de vidrio. La base de la arena se cubrió con un papel de filtro. Se impuso un esquema de 14 horas de luz (06:00-20:00, 60 lux) y 10 horas de oscuridad a $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Las coordenadas x -, y - de cada

insecto fueron leídas cuadro a cuadro por un digitalizador de imágenes y luego almacenados en una computadora. Se obtuvo un índice de dispersión, utilizando la expresión:

$$ID = [(\sigma_x^2)^2 + (\sigma_y^2)^2]^{1/2}$$

Donde σ^2 es la desviación estándar de la posición de los insectos a lo largo del eje de coordenadas x - e y - de la arena. Con los datos obtenidos, se calculó el cambio del ID a lo largo del tiempo.

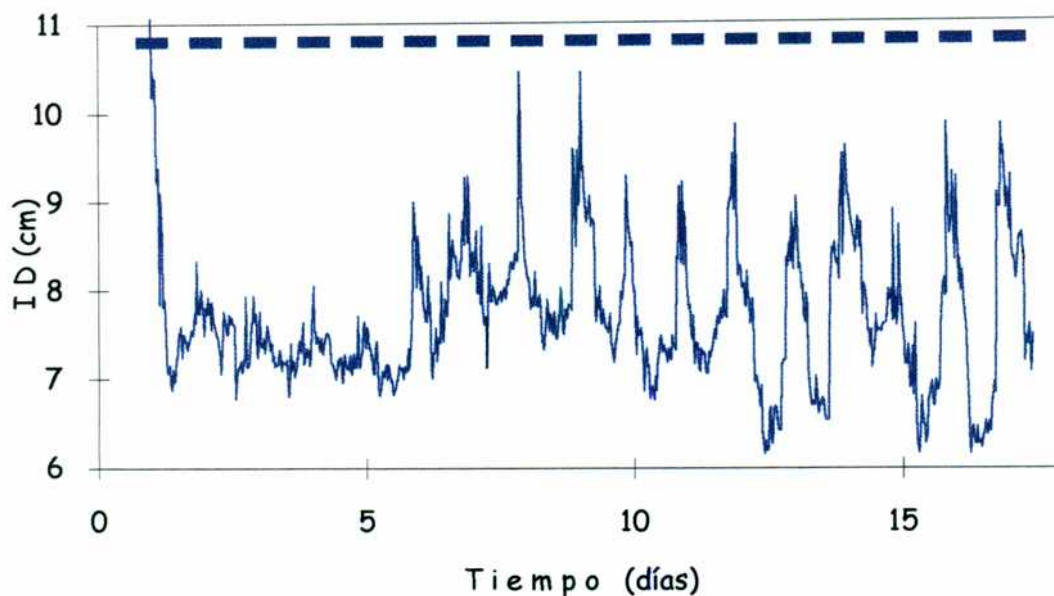
2.6.2. RESULTADOS

Pudimos observar que en la arena rectangular, los adultos se agregaron y dispersaron espontáneamente a lo largo de los días, como se muestra en la figura 10a. Desde el día 1 hasta el 5^{to}, los insectos mostraron una tendencia baja a dispersarse durante la noche, pero en este período los ID medios durante la fotofase y la escotofase no difirieron significativamente entre si (Prueba de Signos, NS). A partir del día 6, se observó un incremento en la tendencia a la dispersión y también se pudo observar un ritmo diario de agregación y dispersión. Durante este período la media del ID en la fotofase y en la escotofase se hizo significativamente diferente (figura 10b, Prueba de los signos, $P < 0,01$). La figura 11 muestra la variación en la distribución de los insectos en función del tiempo en días, promediado para los 17 días. La dispersión máxima ocurre al principio de la

escotofase, mientras que los insectos permanecen agregados durante la fotofase.

Con respecto a los parámetros medidos, no se observaron diferencias entre el comportamiento de los machos y de las hembras.

a)



b)

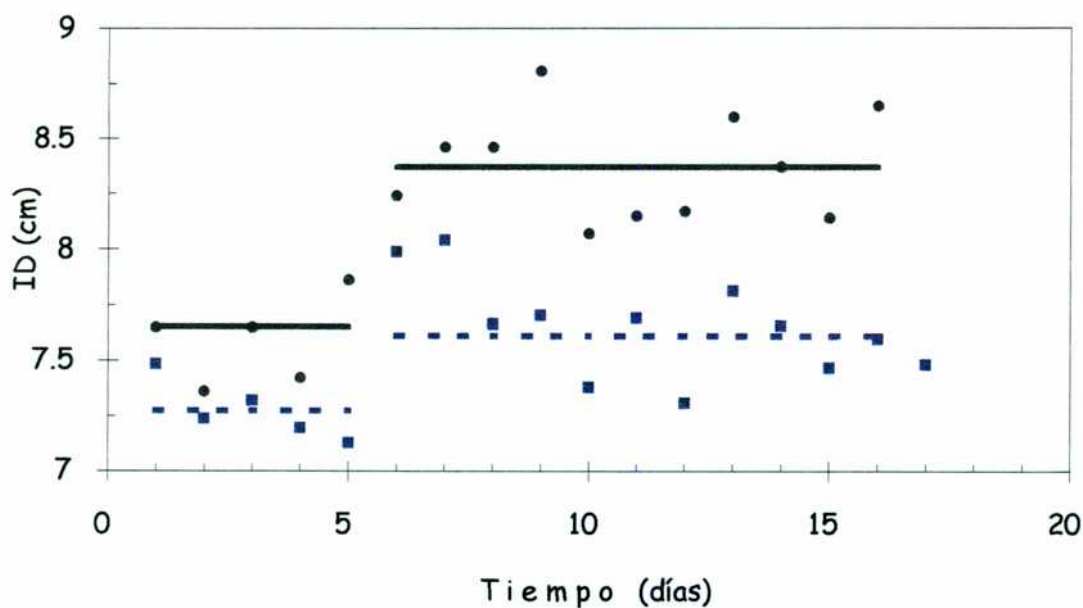


FIGURA 10: Variación del estado de agregación/dispersión como función del período de ayuno. El índice de dispersión fue computado como: $ID = [(\sigma_x^2)^2 + (\sigma_y^2)^2]^{1/2}$, con sd como la desviación estándar de la posición de las 20 vinchucas a lo largo de los ejes de coordenadas x - e y - de la arena. a) Distribución media de

los insectos muestreados cada 30 minutos; las barras en la parte superior del gráfico indican períodos de oscuridad. b) *ID* medio durante la fotofase (●) y la escotofase (■) para cada día. Las líneas punteada y sólida indican el nivel medio de *ID* durante la fotofase y escotofase, respectivamente, durante los primeros 5 días y desde el 6^{to} día en adelante. La media *ID* en la foto y la escotofase no difirieron significativamente durante los primeros 5 días (Prueba de lo signos, NS). A partir del 6^{to} día al día 17 esta diferencia se hace significativa ($P < 0,01$).

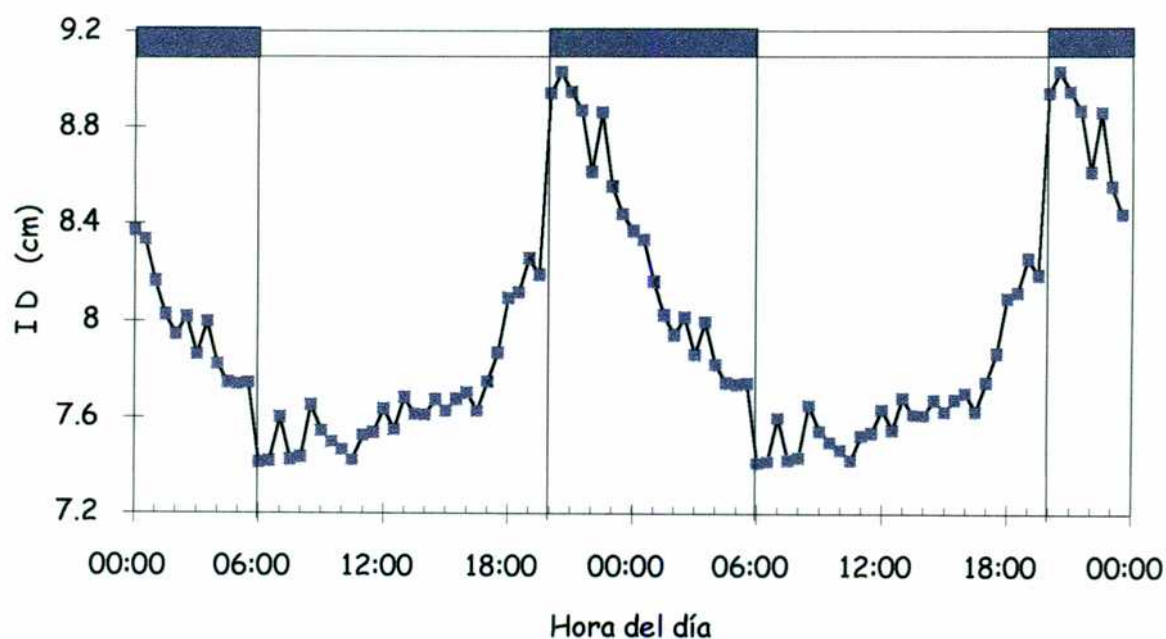


FIGURA 11: Dinámica diaria de la distribución espacial de las vinchucas en la arena rectangular. Los datos corresponden al promedio de las medias *ID* para los 17 días. Las barras indican los períodos de luz/oscuridad. Los datos fueron representados en forma doble para una mejor visualización de los valores máximo y mínimo.

Se concluye que los adultos de *T. infestans* se agregan y dispersan espontáneamente en relación con la hora del día y el ayuno. Esta tendencia es más evidente a partir del día 6 luego de la alimentación. Estos resultados son comparables con el intervalo de alimentación espontánea estimados en 4 días para esta especie (Núñez, 1987). Los triatomíneos muestran una marcada modulación en sus comportamientos. La actividad locomotora (Lazzari, 1992), la oviposición (Ampleford y Davey, 1989, citado por Lazzari, 1992), la fototaxis (Reisenman, comunicación personal), la muda (Ampleford y Steel, 1982, citado por Lazzari, 1992) y la eclosión de los huevos (Lazzari, 1991a) probaron estar bajo un control endógeno. Más aún, se pueden observar ritmos diarios en actividades como el vuelo espontáneo (Lehane y Schofield, 1982), la atracción hacia la luz β (Bertram, 1971, citado por Lazzari, 1992) y la preferencia térmica (Lazzari, 1991b).

2.7. FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA DE AGREGACIÓN

Ya demostramos que tanto los adultos como las larvas de *T. infestans* son atraídos y agregados por una sustancia presente en los excrementos secos de estos insectos. Por otro lado, encontramos que las heces frescas no promueven ninguna agregación, más aún parecen ejercer una acción repelente sobre las vinchucas. Por una parte, Schofield y Patterson (1977) sugirieron que los insectos recién

alimentados no responden a las heces. Por otro lado, Ondarza *et al.* (1986) propusieron la existencia de una feromona de agregación presente en las heces de los machos de *T. mazzottii* que afectaría el comportamiento de machos ayunados o alimentados. Dada la divergencia de resultados obtenidos por ciertos autores en relación al efecto del ayuno sobre la respuesta de agregación frente a las señales fecales, consideramos relevante analizar este aspecto.

Analizaremos, entonces cómo evoluciona este cambio en la respuesta, con respecto al tiempo transcurrido desde la ingesta de sangre hecha por los insectos, y estudiaremos la persistencia de la sustancia atractante a lo largo del tiempo, *i.e.*, el tiempo que transcurrió desde su deposición.

2.7.1. EFECTO DEL AYUNO

2.7.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Como insectos experimentales se utilizaron larvas del 4^{to} y 5^{to} estadio de *T. infestans*. Las heces, de larvas de diferentes estadios, se colectaron en piezas de papel de filtro, de la misma forma descripta anteriormente.

Los ensayos fueron realizados en arenas circulares de vidrio de diferentes diámetros, dependiendo del estadio larval utilizado en cada serie experimental. La base de la arena siempre se cubrió con un papel de filtro, colocándose tres papeles de filtro en forma

equidistante. Uno de los papeles estaba impregnado con heces (experimental), mientras que los otros dos permanecían limpios, como controles.

En cada repetición del ensayo los insectos eran liberados cuidadosamente en el centro de la arena y su distribución en los tres sectores era observada al cabo de 60 minutos.

Series experimentales

Se realizaron dos series experimentales:

Serie 1: Se trabajó con la arena circular de 13 cm, analizándose la respuesta de grupos de larvas del 4^{to} estadio inmediatamente después de la ingesta de sangre y a 1, 2, 4, 6, 8, 16 y 18 horas después de la misma. Se realizaron nueve repeticiones para cada hora ensayada, con 9 a 12 insectos por ensayo.

Serie 2: La arena circular utilizada en esta serie tenía un diámetro de 23 cm. Se estudió la respuesta de larvas del 5^{to} estadio a diferentes días luego de la ingesta, siendo estos de 10, 15, 20, 25 y 30 días. Dependiendo de la serie se realizaron entre diez y trece repeticiones por ensayo, con 6 insectos por réplica.

2.7.1.2. RESULTADOS

Se analizó la respuesta de los insectos con diferentes tiempos de postalimentación frente a las heces secas. Con respecto a la primera Serie 1, los resultados se puede ver en la tabla 1, y en la figura 12.

Se realizó una prueba de G de bondad de ajuste para cada tiempo en horas. Se muestran los resultados en la tabla 1.

TABLA 1

Horas postalimentación	% de agregación	G_p	P
0	28 % (n=82)	1,04	NS
1	34 % (n=85)	0,029	NS
2	42 % (n=87)	3,38	NS
4	41 % (n=83)	2,11	NS
6	34 % (n=83)	0,008	NS
8	61 % (n=83)	19,15	<0,001
16	51 % (n=80)	10,86	<0,001
18	68 % (n=87)	43,01	<0,001

n= número total de insectos.

Se puede ver con claridad que existen dos tipos de repuesta. Entre las 0 y las 6 horas luego de la ingestión de sangre y a partir de las 8 horas postalimentación. A partir de las 8 horas, las vinchucas responden significativamente, agregándose cerca o sobre el papel experimental, mientras que antes de esa hora la distribución de los insectos en la arena es al azar.

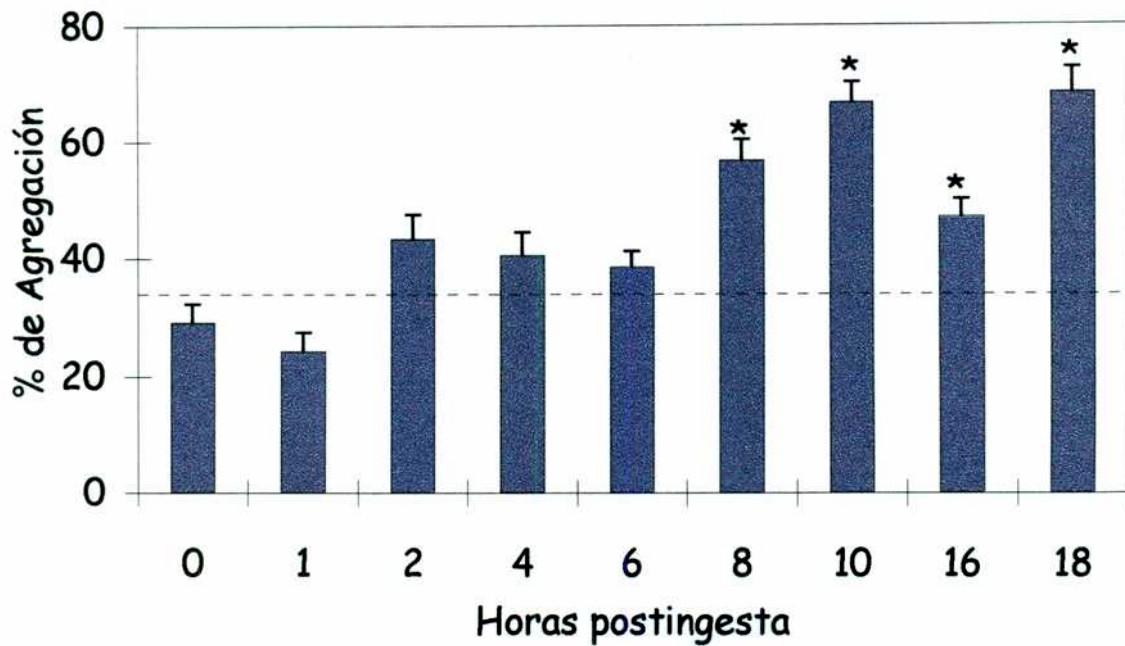


FIGURA 12: Respuesta de larvas del 4^{to} estadio con diferentes tiempos de postalimentación a papeles impregnados con heces secas contra papeles controles limpios. Los asteriscos indican los valores que resultaron significativos ($P < 0.001$). La línea horizontal indica el azar (*i.e.*, 33%).

Tomando los tiempos donde se observó una respuesta significativa de agregación, realizamos un ANOVA de un factor (horas) y los resultados indicaron que la respuesta tenía una magnitud similar ($F=0,426$; $gl= 23, 2$; $P=0,658$, NS).

Con respecto a la serie 2, los resultados se ven en la tabla 2 y en la figura 13.

TABLA 2

Días postalimentación	% de agregación	Gp	P
10	57 % (n=80)	19,54	<0,001
15	67 % (n=72)	33,26	<0,001
20	53 % (n=70)	11,25	<0,001
25	48 % (n=71)	6,41	<0,025
30	66 % (n=62)	27,7	<0,001

n= número total de insectos

Se observa con claridad que las larvas del 5^{to} estadio muestran una agregación significativa en todos los tiempos de ayuno, en días, registrados.

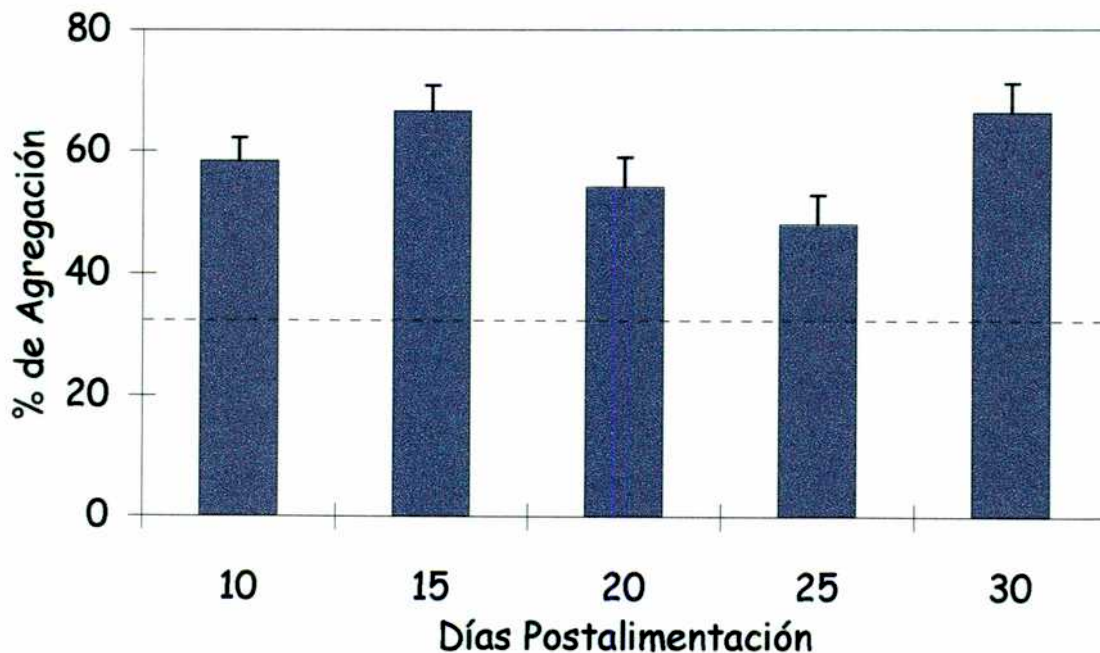


FIGURA 13: Respuesta de larvas del 5^{to} estadio con diferentes días de postalimentación a papeles impregnados con heces secas contra papeles controles limpios. En todas las series la respuesta fue significativa. Los insectos prefirieron significativamente los papeles tratados con las heces ($P < 0,0025$). La línea horizontal indica el azar (*i.e.*, 33%).

Con el objeto de encontrar posibles diferencias entre las respuestas a estos diferentes tiempos de ayuno, realizamos un ANOVA donde comparamos entre los días postalimentación. Los resultados muestran que no hay diferencias en la intensidad de respuesta de agregación realizada por las larvas ($F=0,9123$; $gl= 4, 54$; $P=0,4635$, NS) a lo largo de este período de tiempo.

2.7.2. PERSISTENCIA DE LA SEÑAL

Esta serie de ensayos se realizó con el objeto de estudiar la respuesta de agregación de las vinchucas hacia excrementos depositados a diferentes tiempos previos a los experimentos. El propósito es explorar y encontrar el momento en que la sustancia responsable de la agregación presente en las heces se activa y promueve este comportamiento entre las vinchucas. Además, se analizará la persistencia de la señal de agregación en el ambiente.

2.7.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron como insectos experimentales larvas del 4^{to} estadio de *T. infestans*, con un mes de ayuno postecdisis. Como dispositivo experimental se empleó la arena circular de 13 cm de diámetro. El procedimiento fue el descrito en puntos anteriores. Para cada ensayo, las heces con las que se impregnaron los papeles eran colectadas a diferentes tiempos desde su deposición (edad de

las heces). Se utilizaron papeles de filtro impregnados con excrementos que tenían una edad de 1, 2, 3 horas postdeposición o 8, 10, 12, 14 o 21 días postdeposición.

Los insectos eran liberados suavemente en el centro de la arena, momento en el cual comenzaba el ensayo. Al cabo de una hora se registraba la distribución de los insectos.

2.7.2.2. RESULTADOS

Los experimentos llevados a cabo en esta sección muestran que los insectos responden agregándose sólo a papeles de filtro impregnados con heces que tienen un tiempo de depositadas que oscila entre 3 horas y 10 días. Los resultados se ven en la figura 14 y en la tabla 3.

TABLA 3

Edad de las heces	% de agregación	Gp	P
1 hora	22 % (n=36)	2,12	NS
2 horas	31 % (n=35)	0,04	NS
3 horas	56 % (n=36)	7,45	<0,01
8 días	54 % (n=42)	4,39	<0,05
10 días	50 % (n=34)	4,24	<0,05
12 días	79 % (n=50)	3,4	NS
14 días	29 % (n=30)	1,83	NS
21 días	30 % (n=30)	0,08	NS

n= número total de insectos

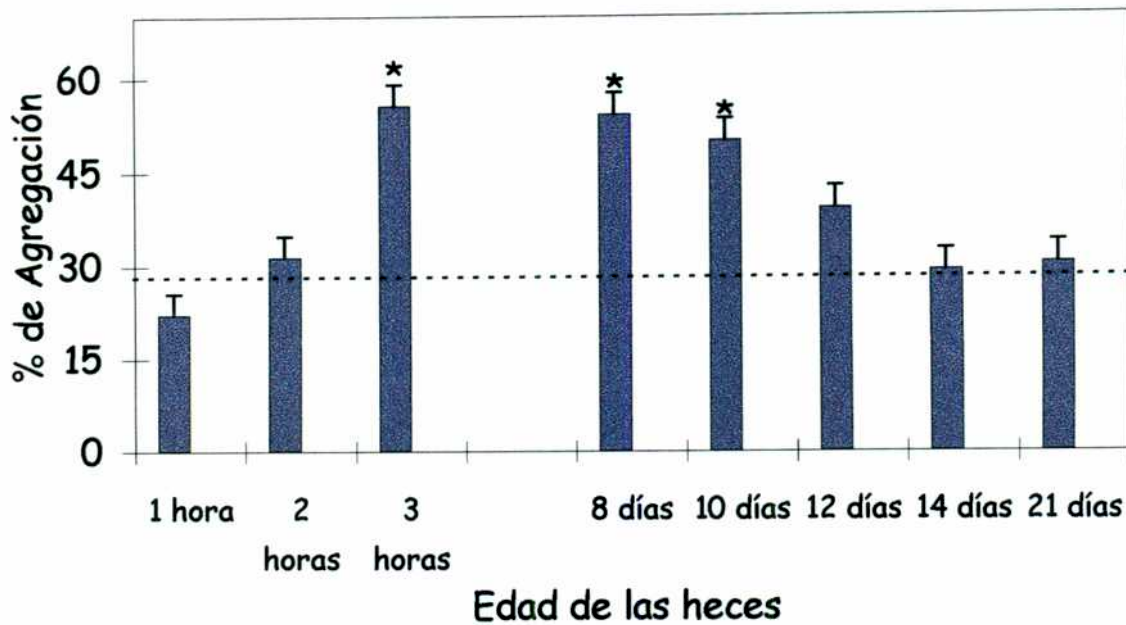


FIGURA 14: Respuesta de larvas ayunadas del 4^{to} estadio a papeles impregnados con excrementos a diferentes tiempos de postdeposición antes de cada ensayo. Entre 3 horas y 10 días los insectos responden significativamente agregándose a los papeles contaminados con heces ($P < 0,05$). En el resto de los tiempos (menos de 3 horas y más de 10 días), la distribución de los animales fue al azar. La línea punteada horizontal indica valores esperados por azar (33,3%). Los asteriscos indican los tiempos que dieron una respuesta significativa.

Tomando los intervalos donde se observó una respuesta significativa de agregación, realizamos un ANOVA de un factor (edad de las heces en horas o en días) y los resultados indicaron que la respuesta era de la misma magnitud ($F=0,1522$; $P=0,8636$, NS) entre todos los tiempos.

2.8. HECES HIDRATADAS

En la sección 2.7. concluimos que a partir de los doce días luego de su deposición, las heces ya no promueven el comportamiento de agregación en las larvas de *T. infestans*. Estudiaremos aquí la posible recuperación de la actividad de los excrementos que inactivos.

2.8.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Las heces para esta serie de ensayos se colectaron de larvas de diferentes estadios en 10 piezas de papeles de filtro de 2x2 cm. Siempre se evitaba el contacto de éstas con los insectos. Los papeles impregnados con los excrementos se mantuvieron en la cámara de cría a 28°C, durante 12 días, tiempo suficiente para inactivar los compuestos que provocan la agregación. Al cabo de este tiempo, los papeles tratados se colocaron en un recipiente de vidrio con 5 ml de agua destilada. Se agitaron durante 10 minutos, retirándose los luego y secándose a temperatura ambiente (24°C), hasta el día siguiente, en que se realizaron los ensayos.

Como controles, para comprobar la inactividad de las heces, se utilizaron papeles de filtro impregnados con deyecciones, no hidratadas, de la misma edad (12 días), que los ensayos experimentales.

Como insectos experimentales fueron utilizadas larvas del 3^{er} estadio de *T. infestans*, con una semana de ayuno postecdisis.

El dispositivo experimental utilizado fue la arena circular de 13 cm de diámetro, ya descrita. Los ensayos se estructuraron de la misma forma descrita en la sección 2.2. Cada repetición tuvo una duración de 45 minutos, al cabo de los cuales se observó la distribución de los insectos en la arena.

Series experimental y control

Se llevaron a cabo dos series de ensayos: *heces hidratadas* y *control*, con ocho repeticiones cada una y con un número de insectos por cada una que osciló entre 9 y 12. Tanto en la serie experimental como en la control el total de insectos fue de 86.

2.8.2. RESULTADOS

En la serie *heces hidratadas*, los insectos prefirieron significativamente los papeles tratados a los controles. La prueba de G de bondad de ajuste mostró que el G_p fue de 73,8 ($P < 0,001$; $gl=1$), extremadamente significativo (figura 15). Mientras que en la serie *control* los insectos se distribuyeron al azar al presentarles un papel impregnado con heces que tenían 12 días de depositadas y dos papeles limpios ($G_p = 3,4$; NS).

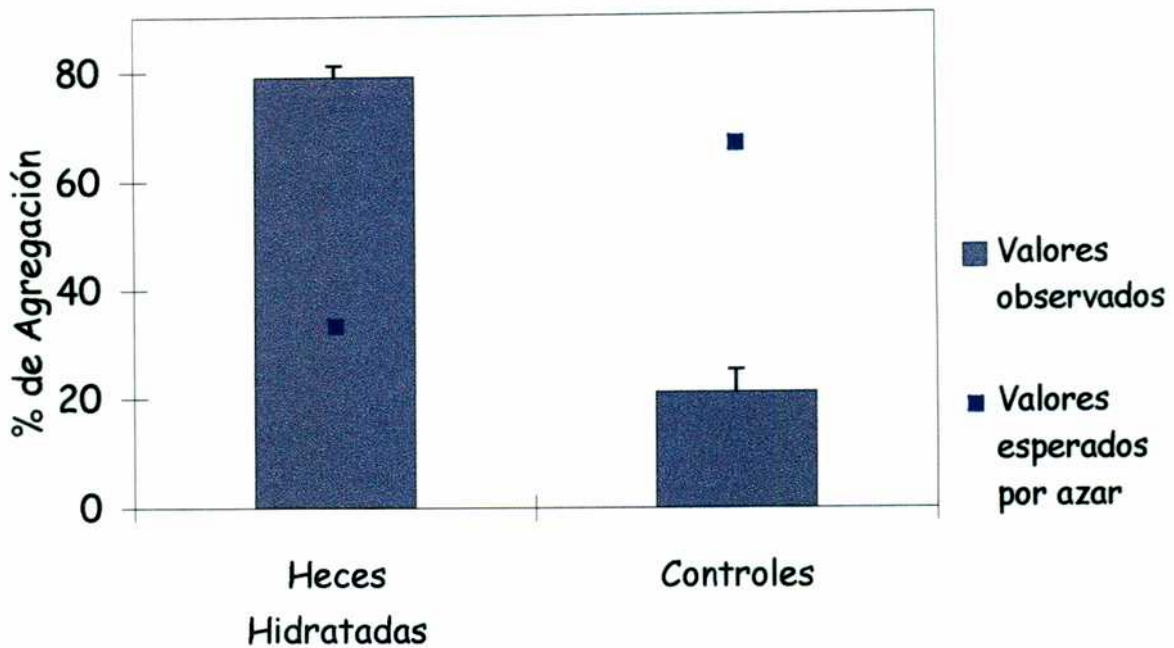


FIGURA 15: Respuesta de las larvas del 3^{er} estadio frente a piezas de papel impregnadas con heces hidratadas frente a papeles limpios. Los insectos prefirieron significativamente el papel tratado a los limpios ($P < 0,001$).

2.9. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este capítulo sugieren la existencia de una sustancia atractante presente en las heces de *Triatoma infestans*, que media el comportamiento de agregación de estos insectos. La misma estaría presente tanto en los excrementos de las larvas, como en el de los adultos. Schofield y Patterson (1977) acuñaron el nombre de JAP ("juvenile assembly pheromone"), feromona de agregación juvenil, para el compuesto activo que atraía solamente larvas ayunadas de *T. infestans* y de *Rhodnius prolixus*. Es

así que estos autores sugirieron que esta sustancia (JAP) sólo se encontraría en las heces frescas de las larvas, ya que no encontraron evidencias de una señal de agregación en los adultos. Por otra parte, Ondarza *et al.* (1986), describieron una feromona de agregación presente en las heces de adultos de *T. mazzottii* que actuaría sólo en hembras y larvas ayunadas y otra feromona presente sólo en las heces de los machos, que ejercería su acción únicamente sobre individuos del mismo sexo.

En nuestros experimentos, los insectos responden de la misma forma tanto a heces de larvas como de adultos y la respuesta de agregación se ve en todos los estadios de desarrollo, incluso en los adultos de ambos sexos. Este hecho, además de los resultados informados por Ondarza *et al.* (1986) hacen que la expresión "JAP", propuesta por Schofield y Patterson (1977) no sea apropiada.

Los experimentos con el olfatómetro muestran que los insectos son atraídos significativamente por sustancias volátiles liberadas desde las heces, un resultado inesperado si la feromona de agregación sólo actuaría arretando la actividad locomotora de las vinchucas. Es decir, la señal química de agregación actúa por la vía de quimiorrecepción olfativa y es capaz de atraer a los insectos al ser transportada por corrientes de aire.

La respuesta de las larvas hacia las heces recién depositadas (frescas) y hacia las heces secas podría ayudar a comprender el

significado biológico de la sustancia agregante y atractante. Los experimentos demuestran fehacientemente que sólo las heces secas promueven el comportamiento de agregación. Las heces frescas, por lo contrario, provocan rechazo. La funcionalidad de la señal puede ser deducida estudiando donde son más abundantes las heces secas. Schofield y Patterson (1977) mencionan que "la materia fecal tiende a concentrarse cerca del hospedador y alrededor de los sitios de descanso". La orientación al hospedador por las chinches hematófagas es asistida por entradas sensoriales de diferentes modalidades, *i.e.* temperatura, ácido láctico, CO_2 , etc. (Núñez, 1987; Lazzari y Núñez, 1989). Sabemos que el comportamiento de defecación de *T. infestans* resulta en una acumulación de marcas fecales cerca de los accesos a los refugios. Más aún, resultados obtenidos con refugios asociados con marcas fecales vs refugios limpios mostraron que estas marcas afectaron la elección del refugio (Lorenzo y Lazzari, 1996). Estos autores sugieren que las deyecciones actúan como una marca química de entrada al refugio, ayudando a las chinches a encontrarlo. Hemos descrito en el presente trabajo que la atractividad de las heces persiste hasta el día 10 luego de su deposición y luego decae. Como consecuencia, la marca que persiste como un residuo conspicuo fuera del refugio debería ser renovada durante el tiempo que el refugio permanezca en uso por las vinchucas. Tomando en cuenta estos hechos y que una alta concentración de

heces secas se acumula permanente y corrientemente en las grietas o rajaduras de las paredes de los ranchos y en sus techos de paja, sugerimos que la señal de agregación podría ser utilizada por los insectos en la orientación hacia los refugios. El efecto de repelencia de las heces frescas podría estar relacionado con la inversión del signo de orientación luego de la ingestión (Jander, 1963). De este modo, los excrementos recién depositados sobre el hospedador podrían asistir al alejamiento del insecto de quien puede convertirse en un depredador potencial.

La falta de respuesta de los insectos recién alimentados parecería contradecir la hipótesis de búsqueda de refugios. Sin embargo, en el ritmo circadiano de actividad, notaremos dos máximos, controlados en forma endógena, uno al comienzo de la escotofase y otro al comienzo de la fotofase (Lazzari, 1992). Ambos picos están relacionados con actividad de búsqueda del hospedador y del refugio, respectivamente (Lorenzo, 1997). Por otro lado, las vinchucas salen de sus refugios fundamentalmente durante las primeras horas de la noche y existe una importante actividad de entrada al refugio hacia el final de la escotofase (Lorenzo, 1997). Durante las horas intermedias, los insectos se mantendrían fuera de los refugios. Por lo tanto, si tomamos en cuenta el patrón bimodal de la actividad circadiana, así como también los movimientos de entrada y salida de refugios artificiales es posible sugerir que las vinchucas buscan

alimento al anochecer y refugios al amanecer; siendo este intervalo de tiempo de 8 a 10 horas aproximadamente. Este intervalo de tiempo se corresponde bien con el cambio en la respuesta de los insectos que tiene lugar 8-9 horas después de la ingesta. Este razonamiento es consistente con la hipótesis de que los insectos recién alimentados no regresarían inmediatamente a los refugios, sino que aguardarían hasta el amanecer. Esta tendencia significativa a agregarse se mantiene en larvas del 5^{to} estadio hasta al menos 30 días de ayuno postalimentación.

Resulta interesante que los insectos responden agregándose sólo cuando han pasado al menos tres horas luego de la deposición de los excrementos. Aún no se conoce que tipo de transformaciones tienen lugar en las heces durante este período de tiempo. El componente activo podría ser producido por fermentación durante este tiempo, o alguna sustancia que enmascare el componente activo podría evaporarse. Pasados los 10 días de la deposición, la sustancia que promueve la agregación deja de actuar. Al hidratar las heces inactivas, *i.e.*, con más de 10 días de edad, éstas recuperan su capacidad de agregar insectos, con lo que la efectividad de la marca podría extenderse en el tiempo y ser reforzada con sucesivas deposiciones.

CAPÍTULO 3. Caracterización de la señal de agregación

3.1. ORIGEN DE LA SEÑAL

3.1.1. INTRODUCCIÓN

Los resultados del capítulo anterior demuestran la existencia de una sustancia volátil presente en las heces de *T. infestans* que promueve la agregación de las vinchucas. Se ha comprobado que dicho factor sólo induce la respuesta luego de transcurridas al menos 3 horas de depositados los excrementos, es decir, sólo las heces secas son efectivas.

La información disponible no permite discernir si se trata de componentes de la sangre de los vertebrados hospedadores, de una secreción glandular del insecto, de un producto de descomposición de los excrementos o de microorganismos asociados a las deyecciones. No se conoce si la sustancia es incorporada a las heces por glándulas especializadas (por ejemplo, glándulas anales) en el momento de la deposición o en el intestino de la vinchuca.

Schofield y Patterson (1977) estudiaron la respuesta de agregación de larvas de *T. infestans* ayunadas hacia papeles sembrados con diferentes factores. Éstos fueron: agua destilada, sangre fresca de conejo, la ingesta de sangre extraída del cuello de los insectos por decapitación y heces "frescas" (sin establecer en que tiempo postdeposición fueron utilizadas). Sólo en este último

tratamiento los insectos mostraron una respuesta significativa de agregación.

Con el objeto de descifrar algunos de los presentes interrogantes, se cuantificó la respuesta de agregación de estos insectos, frente a diferentes estímulos relacionados con los excrementos.

3.1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para estas series de ensayos, las larvas utilizadas pertenecían al 5^o estadio de *T. infestans* y su ayuno fue de dos a tres semanas postecdisis. El dispositivo experimental utilizado es la arena circular de vidrio de 23 cm de diámetro, con su base siempre cubierta por un papel de filtro. En ella se ubicaron a intervalos iguales tres piezas de papel de filtro, plegadas una vez a modo de refugio. Dos de ellas permanecían limpias, los controles y la tercera se impregnaba con el tratamiento correspondiente para cada serie.

Cada ensayo consistió en liberar en el centro de la arena un grupo de insectos. Al cabo de una hora se registró la distribución de los mismos en la arena y en los papeles. Se realizaron 4 series experimentales.

Series experimentales

1. Serie Sangre

Las piezas de papel de filtro se impregnaron directamente con sangre fresca de bovino, tratada con heparina. Se dejaron secar a temperatura ambiente (23-24°C) y luego fueron colocadas en una estufa a 28°C. Los papeles con sangre, ya secos, se utilizaron al día siguiente de su respectivas siembras.

Se realizaron ocho repeticiones con un total de 80 individuos.

2. Serie Buche

Se obtuvieron, mediante disecciones, seis buches enteros de larvas del 5^{to} estadio. Se homogeneizaron en 10 ml de agua destilada. Se sembraron en trozos de papel de filtro, secándose de la misma forma que en la serie anterior y utilizándose los 24 horas después.

Se realizaron seis repeticiones con un total de 41 individuos.

3. Serie Recto

De la misma forma que en la Serie Buche, fueron disecados seis rectos de larvas del 5^{to} estadio, lavándose los en 10 ml de agua destilada. La solución resultante se sembró en piezas de papel de filtro, utilizándose las 1 día después.

Se realizaron ocho repeticiones con 68 insectos en total.

4. Serie heces "exprimidas" mecánicamente

Para la recolección de las heces fueron utilizadas aproximadamente 50 larvas del 5^{to} estadio, siendo su última ingesta de sangre una semana previa a la extracción. Cada insecto era tomado con una pinza del tórax (a modo de sostén) y con otra pinza se le oprimía, delicadamente, el abdomen con la intención de que eliminara una o más gotas de excremento. El volumen total extraído de ca. 0,5 ml era mezclado con 3 ml de agua destilada. Esta solución era sembrada en papeles de filtro, secada a temperatura ambiente y luego en la estufa hasta el día siguiente, en el que se realizaban los ensayos.

Se realizaron ocho repeticiones con un total de 51 individuos.

3.1.3. RESULTADOS

La tabla 4 muestra que los únicos estímulos capaces de inducir una respuesta de agregación en los insectos, fueron aquellos originados en los excrementos presentes en el recto o en los forzados a ser eliminados. El estadístico de G para los datos de todas las repeticiones mostró para ambos casos ser significativo, siendo el valor de G_p de 5,4 ($P < 0,05$) para las dos series.

TABLA 4

Serie Experimental	Insectos en papel:		Gp	P
	Tratado	Controles		
Sangre	20 (25 %)	60 (75 %)	2,6	NS
Buche	14 (13,6 %)	27 (86,3 %)	0,03 (NS)	NS
Recto	30 (44,1 %)	38 (55,9 %)	5,4	<0,05
Heces extraídas mecánicamente	25 (49 %)	26 (51 %)	5,4	<0,05

3.2. FRACCIONAMIENTO DE LA SEÑAL DE AGREGACIÓN

3.2.1. INTRODUCCIÓN

La posibilidad de aislar, identificar y sintetizar feromonas que sirvan a la comunicación de las vinchucas en distintos contextos podría ofrecer un abanico de nuevas herramientas para el control de estos insectos, basadas en la modificación química de su comportamiento..

Estudios de fraccionamiento e identificación de los factores responsables del comportamiento de agregación son escasos. Cruz-López y Morgan (1995) han realizado una investigación química buscando dichas sustancias, obteniendo resultados negativos. Trabajando con larvas de *T. infestans* y *T. mazzottii*, no lograron obtener ningún componente capaz de reproducir la acción biológica de los excrementos, *i.e.*, agregación. Los compuestos volátiles identificados en las heces fueron: σ -aminoacetofenona, 4-

metilquinazolina y 2,4-dimetilquinazolina, pero éstos no indujeron atracción en las concentraciones utilizadas (0,1 a 100 ng).

En este capítulo estudiaremos la respuesta de agregación de *T. infestans* hacia extractos realizados a partir de sus excrementos, a partir del fraccionamiento parcial de las sustancias atractantes.

3.2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los insectos utilizados para estas series experimentales fueron larvas de *T. infestans* del 5^{to} estadio, con dos a cuatro semanas de emergidas.

Las heces utilizadas para los diferentes fraccionamientos provenían de larvas del 5^{to} estadio y se colectaron en piezas de papel de filtro.

Como dispositivo experimental se utilizó la arena circular de vidrio de 23 cm de diámetro, cubierta su base con papel de filtro y dividida en tres sectores. En cada uno se colocó 1 papel de filtro. En las series experimentales se ubicaron dos papeles control, limpios y un papel tratado, experimental. En las series control se colocaron dos papeles limpios y el tercero se impregnó con mezcla de hexanos o con agua destilada, los solventes utilizados en las diferentes extracciones.

El procedimiento para la ubicación, liberación y distribución de los insectos en la arena fue igual al descrito precedentemente.

Series experimentales

Los papeles impregnados con los excrementos se dejaron secar a temperatura ambiente (ca. 25°C) durante un día. Pasado este tiempo, éstos fueron colocados en 10 ml de una mezcla de *Hexanos* (Hexanos-Dorwil) o en 20 ml de *Agua Destilada* y agitados durante 15 minutos en un agitador magnético.

Luego de la agitación en la mezcla de *hexanos* se obtuvieron 2 fases, una disuelta en la solución y la otra retenida en los trozos de papel de filtro:

FASE 1: extracto orgánico

FASE 2: fracción polar retenida en el papel

La fase 1, en solución con el hexano se sembró en papeles de filtro limpios. La fase 2 se presentó directamente en los papeles extraídos.

Para la fase 1 se hicieron cinco repeticiones con un total de 47 individuos. Para la fase 2 se realizaron un total de nueve repeticiones con un número total de 88 insectos. .

Fracciones equivalentes se obtuvieron lavando los papeles contaminados con heces con el *agua destilada*. Se obtuvieron dos fracciones:

FASE 3: fracción no polar retenida en el papel

FASE 4: *extracto acuoso*

La fase 4, en solución con agua destilada se sembró en papeles de filtro limpios.

En la fase 3 se llevaron a cabo de nueve repeticiones, con un total de 104 individuos. Para la fase 4 se realizaron cinco repeticiones con un total de 54 individuos.

Todos los papeles experimentales obtenidos fueron secados, durante un día, en una estufa a 28°C.

Series Control

Las series control fueron hechos con papeles de filtro limpios impregnados con agua destilada o mezcla de hexanos, utilizando el procedimiento descrito anteriormente.

Se hicieron cinco repeticiones con un total de 48 insectos para la serie control del agua destilada, mientras que para la serie control de hexanos se hicieron cuatro repeticiones con un total de 33 insectos.

3.2.3. RESULTADOS

Series control

Los insectos se distribuyeron al azar en la arena circular tanto frente a un papel impregnado con agua destilada como con hexanos y dos papeles control (prueba de G para ambas series, NS).

Series experimentales

Las 4 fracciones o fases obtenidas fueron ensayadas por separado frente a papeles limpios (un papel experimental impregnado con la fracción elegida vs dos papeles control).

FASE 1: *extracto orgánico*

Los resultados se presentan en la figura 16. Las larvas se distribuyeron al azar al presentarles los dos papeles control frente al papel sembrado con la fracción no polar extraída con hexano. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los papeles controles y papel experimental ($G_p = 3,3$, NS).

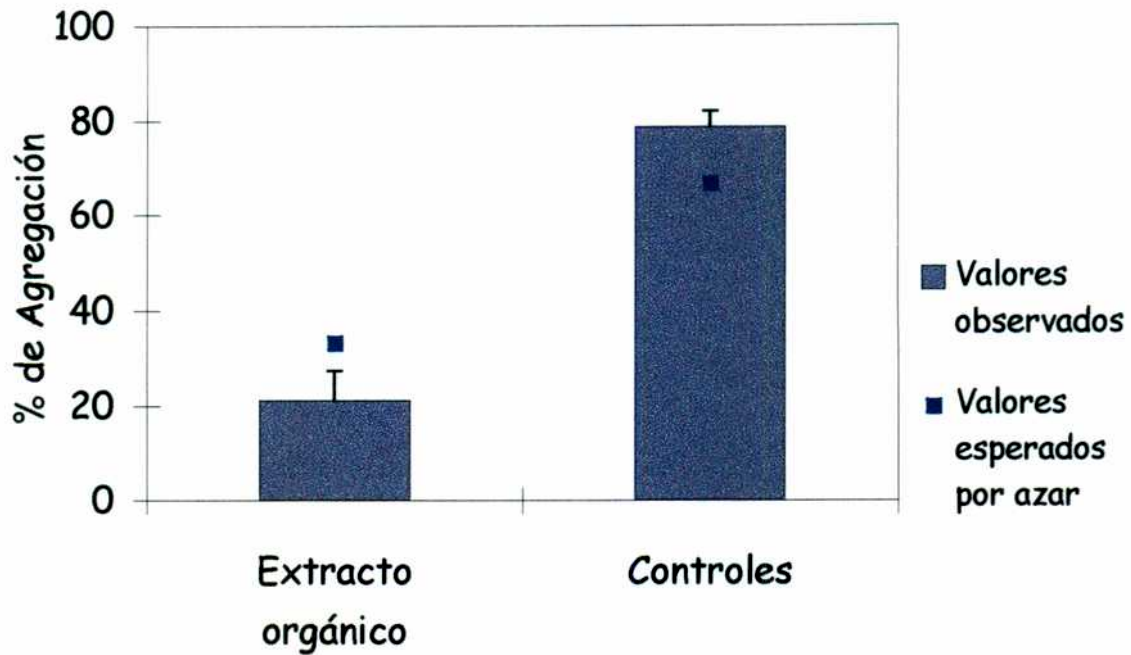


FIGURA 16: Respuesta de las larvas frente a un papel sembrado con el extracto orgánico (fracción no polar) frente a dos controles limpios. Los insectos se distribuyeron en la arena al azar.

FASE 2: *fracción polar retenida en el papel*

Los insectos prefirieron significativamente el papel al cual se le había extraído la fracción no polar con hexano frente a los papeles limpios. Los resultados se presentan en la figura 17. El análisis estadístico con el prueba de G de heterogeneidad mostró diferencias significativas. El valor de G_p fue 11,56 ($P < 0,001$).

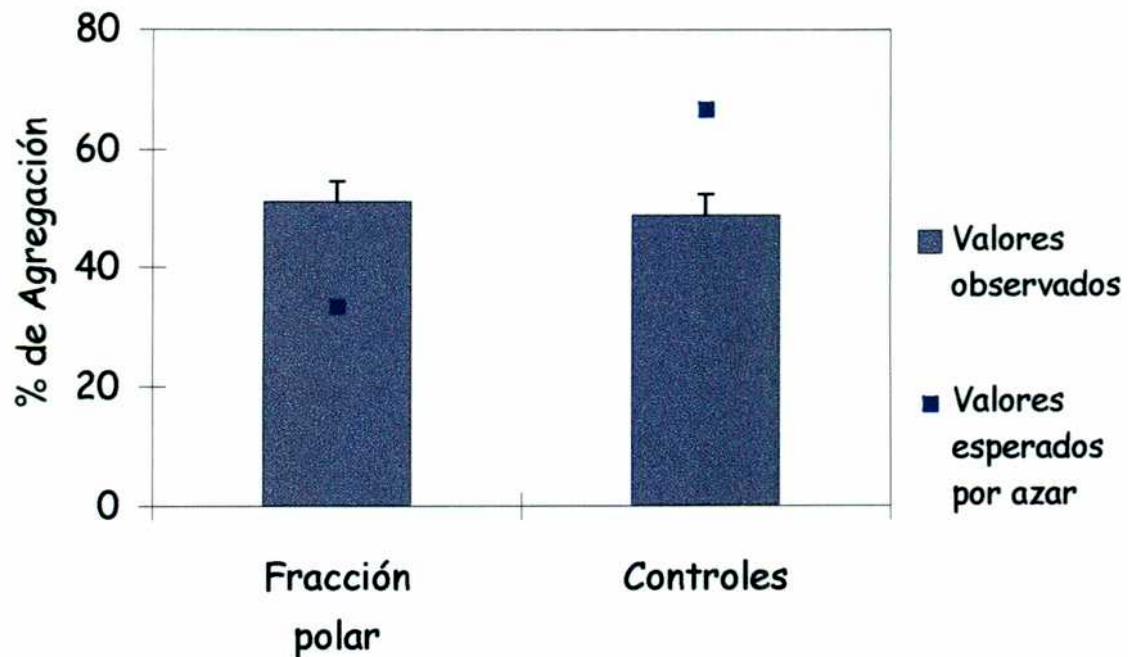


FIGURA 17: Respuesta de los insectos frente a papeles experimentales a los que se les extrajo la fracción no polar con hexano y dos papeles controles. Las vinchucas prefirieron significativamente el papel impregnado con la fracción polar ($P < 0.001$).

FASE 3: *fracción no polar retenida en el papel*

Los resultados se pueden observar en la figura 18, los insectos no mostraron una preferencia entre los papeles controles y papel experimental, siendo el valor de G_p de 0,96 (NS).

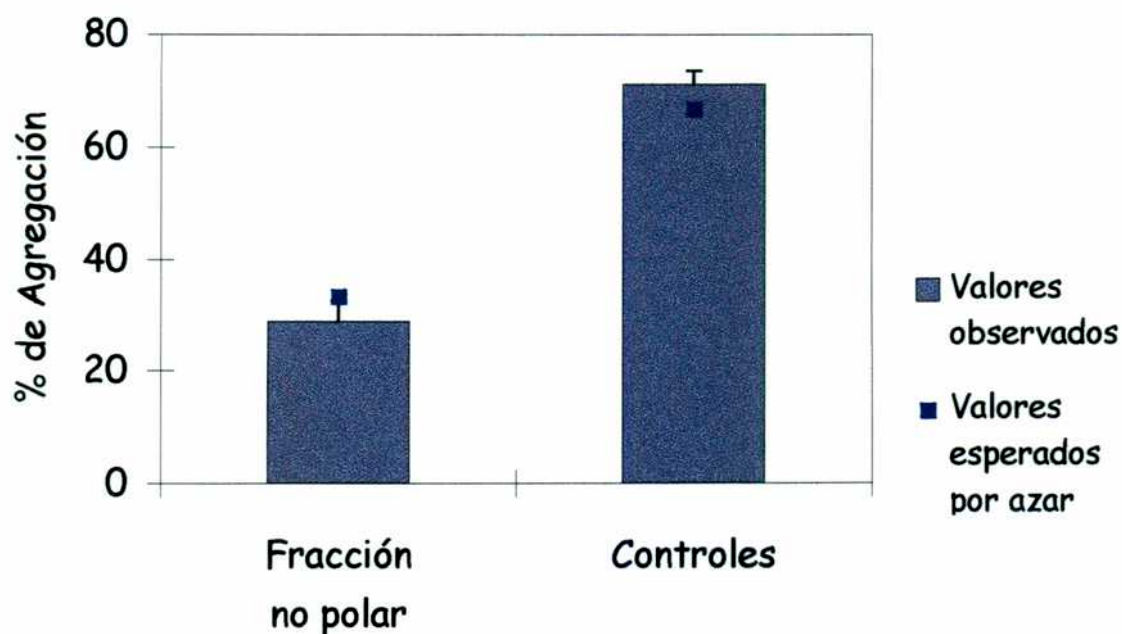


FIGURA 18: Respuesta de las vinchucas frente a papeles tratados con la fracción no polar retenida en el papel luego de la extracción con agua destilada. Se observa que la distribución de los insectos no difirió del azar.

FASE 4: *extracto acuoso*

Los resultados, que se ven en la figura 19 muestran una preferencia significativa de los insectos a agruparse en el sector donde se encuentran los papeles experimentales sembrados con el extracto acuoso. El análisis estadístico mostró diferencias significativas, siendo el valor del estadístico G_p de 7,82 ($P < 0,01$).

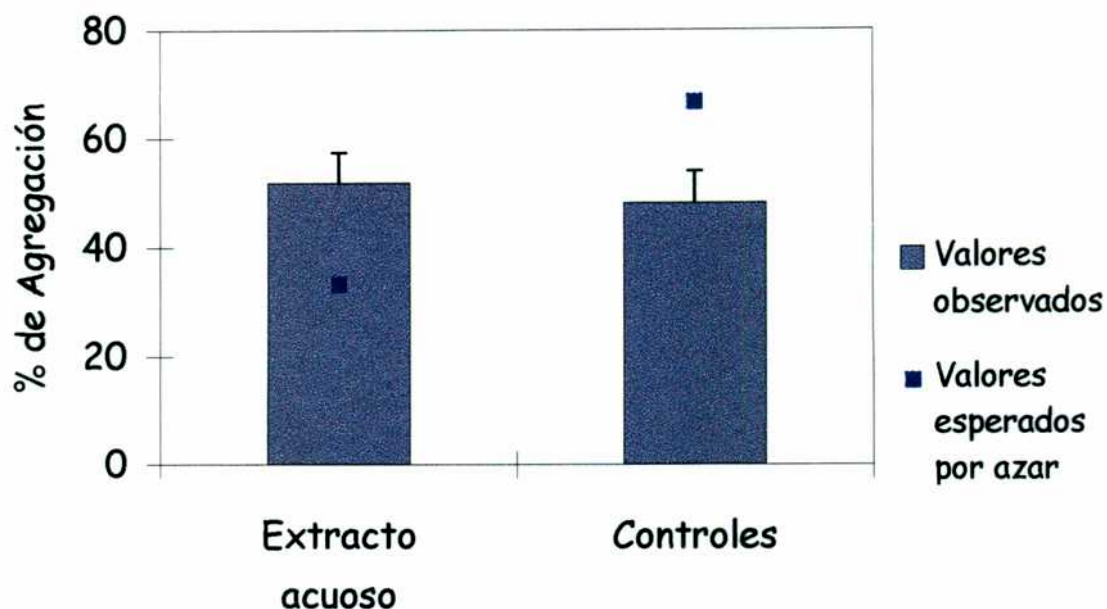


FIGURA 19: Respuesta de las chinches a papeles impregnados con extracto acuoso frente a papeles limpios. Se puede ver que prefirieron significativamente los papeles experimentales ($P < 0.01$).

3.3. CONCLUSIONES

Podemos inferir que el factor de agregación no está presente en la sangre del hospedador, y tampoco es parte del contenido de la región anterior del intestino de la vinchuca. Sugerimos que la sustancia podría ser un producto de la digestión de la sangre ingerida, o que algún agregado a los contenidos del recto intervendría en la formación del compuesto. De tratarse de una secreción glandular, ésta podría tener origen en glándulas rectales o podría ser producida

por microorganismos, y se mezclaría con las heces en el intestino posterior.

Entre los mecanismos de liberación de las señales químicas de agregación de muchos insectos, se encuentran las glándulas exócrinas abiertas directamente al exterior y, en una gran cantidad de casos, las que utilizan la vía del canal alimentario. Las primeras dan lugar a sistemas de liberación rápida de las secreciones. En los casos en que no haya ninguna ventaja en la liberación rápida, los insectos liberan las sustancias gradualmente con las heces. Estas feromonas son producidas en varias especies de insectos, como en *Blattella germanica* (Ishii y Kuwahara, 1967, 1968; Ishii, 1970), en *Tipula simplex* (Hartman, 1978). Ishii *et al.* (1967) proponen que el material con actividad atractante se produciría posiblemente en el recto y sería añadido a las heces cuando son excretadas. En el caso de los triatomíneos, Schofield y Patterson (1977), trabajando con *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, sugirieron que la feromona de agregación podría ser un producto por la descomposición final de la ingesta.

Algunos estudios sobre la interacción entre insectos y microorganismos sugieren que los microbios podrían estar involucrados en la síntesis de las sustancias atractantes. Por ejemplo, se ha determinado que el fenol actúa como feromona sexual en el escarabajo *Costelytra zealandica*. Una bacteria fue aislada de las

glándulas coleteriales de este escarabajo, de la que se aisló un compuesto que en los estudios cromatográficos aparece muy similar al fenol. Estas relaciones entre factores de comunicación en insectos y microorganismos pueden ser relativamente complejas. Por ejemplo, en el escarabajo *Scolytus multistriatus* (vector de una enfermedad causada por el hongo *Ceratocystis ulmi*), la feromona de agregación consiste de 3 compuestos. Dos de ellos son producidos por el insecto mismo, pero el tercero se origina en el árbol donde habita. El nivel de este componente se eleva si el árbol está infestado por *C. ulmi* o si la tasa a la que es biosintetizado por el árbol se incrementa en respuesta a la infestación del hongo. Así, los aleloquímicos microbianos se encuentran funcionando como feromonas de insectos o induciendo en forma indirecta su síntesis. En muchos casos, sin embargo, es difícil establecer el papel que cumplen los microorganismos en la producción de estos semioquímicos (Dicke, 1988).

Las feromonas de agregación se han descripto y estudiado en varios grupos separados de insectos. En el Orden Coleoptera se han descripto químicamente en Curculionidae, Cucujidae, Scolytidae (por ejemplo en varias especies de *Dendroctonus* y también en el género *Ips*), Dictyoptera (en *Periplaneta americana*). En Hemiptera, en la familia Pentatomidae, se ha descripto una feromona de agregación, la *trans-2-hexenal* en *Eurydema rugosa* (Borden, 1985).

Los estudios químicos desarrollados por Cruz-López y Morgan (1995) describen las sustancias volátiles presentes en las heces tanto en extracciones con solventes polares, como no polares. Los bioensayos realizados en una arena similar a la utilizada aquí mostraron que los insectos (larvas de *T. mazzottii* y de *T. infestans*) se agregaron significativamente solamente en papeles impregnados con los compuestos extraídos con solventes polares. Pero estos mismos compuestos aislados y ensayados en un dispositivo olfatométrico (un tubo en Y) no mostraron una actividad atractante en los intervalos de concentración utilizados.

Nosotros podemos concluir, al igual que aquellos autores, que el factor de agregación presente en las heces secas de *Triatoma infestans* es hidrosoluble. La estructura química de esta sustancia debe ser identificada y su procedencia también.

Es interesante destacar que las heces obtenidas forzando mecánicamente a las vinchucas a defecar, fue biológicamente tan activa como la excretada espontáneamente. Este resultado permite utilizar este método de extracción para bioensayos, ya que permite descartar la posibilidad de que alguna señal de alarma podría enmascarar el efecto de las heces como señal de agregación.

CAPÍTULO 4. Comportamiento de Agregación en

Triatoma sordida y *T. guasayana*

4.1. INTRODUCCIÓN

Como ya lo mencionamos, *Triatoma infestans*, *T. sordida* y *T. guasayana* se distribuyen en América del Sur, en Bolivia, Brasil y Argentina. Entre los vectores de la enfermedad de Chagas, *T. infestans* es la especie mejor adaptada a los ambientes domésticos. *T. sordida* se conoce en una variedad de ecotopos selváticos, ocupando árboles huecos, rocas y nidos de roedores, pero se encuentra más frecuentemente en hábitats peridomésticos tales como gallineros. Esta especie invade a menudo las casas y forma, a veces, colonias domésticas. Se ha observado con creciente frecuencia en las casas rurales, en regiones de Brasil donde el vector doméstico predominante, *T. infestans*, ha sido eliminado (Schofield, 1994).

T. sordida y *T. guasayana* son dos especies muy cercanas que, como ya fue mencionado, pueden colonizar habitaciones humanas, del mismo modo que *T. infestans* (Lent y Wygodzinsky, 1979; Gorla *et al.*, 1993). Ambas especies son frecuentemente confundidas entre sí debido a sus similitudes morfológicas y su distribución solapada. Sin embargo, se pueden discriminar una de la otra principalmente por el largo del segundo segmento rostral relativo al primero y también por el largo de la región anteocular. En el caso de *T. sordida*, el segundo segmento rostral es más de dos veces el largo del primer segmento rostral, mientras que en *T. guasayana*, es menos de dos veces tan largo como el primero. Con respecto a la segunda

característica, el largo de la región anteocular en *T. guasayana* es mayor que en *T. sordida*. Es posible observar, además, que en *T. guasayana* el lóbulo posterior del pronoto y el escutelo son uniformemente oscuros, mientras que en *T. sordida* podemos ver marcas claras en esa zona (Lent y Wygodzinsky, 1979).

En virtud de estas características, el conocimiento de los factores que afectan la ecología e interacción de estas especies se vuelve relevante, más aún, conociendo su papeles como vectores de la enfermedad de Chagas.

Varios autores han analizado el comportamiento de agregación frente a señales intraespecíficas en varias especies de la subfamilia Triatominae (Velázquez Antich, 1968; Baldwin *et al.*, 1971; Schofield y Moreman, 1976; Schofield y Patterson, 1979; Ondarza *et al.*, 1986; Rojas *et al.*, 1991; Cruz-López *et al.*, 1993; Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994; Manrique y Lazzari, 1995).

También ha sido estudiada la especificidad de estas señales por Cruz-López *et al.* (1993), quienes analizaron el comportamiento de agregación en 5 especies de vinchucas (*T. barberi*, *T. mazzottii*, *T. longipennis*, *T. pallidipennis* y *R. prolixus*) e informaron la existencia de una "feromona de agregación interespecífica" presente en los excrementos de larvas y de adultos de las especies antes mencionadas.

En la presente sección estudiaremos el comportamiento de *T. sordida* y *T. guasayana*, frente a sus propias heces (respuesta intraespecífica) y a excrementos de otras especies, entre las que incluimos también a *T. infestans* (respuesta interespecífica).

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Se utilizaron como insectos experimentales larvas de *T. infestans* criadas y mantenidas en nuestro laboratorio a 28°C. Éstas eran alimentadas con sangre de bovino heparinizada a través de un alimentador artificial (Núñez y Lazzari, 1990). Por otro lado, los adultos de *T. sordida* y las larvas de *T. sordida* y *T. guasayana*, provenían del "Centro de Reservorios y Vectores", del Servicio Nacional de Chagas, provincia de Córdoba, Argentina. En este caso los insectos se alimentaron sobre gallina, hasta su llegada a nuestro insectario.

Para el caso de *T. sordida*, se ensayó la respuesta de agregación con adultos, machos y hembras, y larvas del 2^{do} y 3^{er} estadio. Para *T. guasayana* utilizamos larvas del 2^{do} y del 4^{to} estadio, mientras que larvas del 4^{to} estadio fueron utilizadas como insectos experimentales en los ensayos que involucraron a *T. infestans*. El ayuno postecdisis de los insectos experimentales fue de aproximadamente de dos a tres semanas.

Recolección de heces. Inmediatamente luego de la alimentación, los insectos fueron ubicados en frascos de plástico, con una malla plástica como base, colocados sobre cajas de Petri del mismo diámetro. Éstas contenían piezas de papel de filtro de 3x2 cm, donde se recolectaron los excrementos durante un intervalo de 3 a 5 horas. Se cuidó especialmente que los insectos y los papeles con heces no estuviesen en contacto unos con otros (Lorenzo Figueiras y Lazzari, 1996). Los insectos utilizados para la recolección de heces eran adultos y larvas de *T. sordida* y larvas de *T. infestans* y *T. guasayana*. Las heces se utilizaron siempre después de un día de depositadas, asegurándonos así la actividad agregante, ya descrita para *T. infestans*.

Experimentos. Las heces se ensayaron con respecto a su habilidad de promover la respuesta de agregación en la arena de vidrio de 13 cm de diámetro, en la que se demarcaron tres sectores iguales (figura 1). Los ensayos se llevaron a cabo usando tres piezas de papel de filtro, una en cada sector, plegados una vez. Una de ellas estaba contaminado con las heces (papel experimental), mientras que las otras dos permanecían limpias (papeles control).

En cada ensayo, un grupo determinado de larvas se ubicaba y liberaba en el centro de la arena. Al cabo de 1 hora, la posición de las vinchucas era examinada, contando el número de insectos en cada sector de la arena.

Respuestas medidas

Respuestas intraespecífica: Se midió la agregación de *T. sordida* y *T. guasayana* frente a sus propios excrementos.

Respuestas interespecíficas: Se analizó la respuesta cruzada de *T. sordida* a heces de *T. guasayana* y viceversa. También se midió la agregación de *T. sordida* y *T. guasayana* frente a las heces de *T. infestans* y de esta última frente a los excrementos de las otras dos especies.

Series experimentales

1^{ra} Serie experimental: Agregación de *T. sordida* y *T. guasayana* frente a sus heces

Serie 1a: Los insectos utilizados fueron adultos de *T. sordida* con un ayuno de una semana aproximadamente. Las heces fueron recolectadas a partir de larvas y adultos de *T. sordida*. Se realizaron un total de once repeticiones, cinco para hembras y seis para machos, y para cada uno se utilizaron entre 4 y 6 individuos.

Serie 1b: Como insectos experimentales se utilizaron larvas del 2^{do} estadio de *T. sordida*, con alrededor de diez días de ayuno postecdisis. Las heces se recolectaron de larvas de todos los estadios de *T. sordida*. Se hicieron seis repeticiones con 9 insectos cada uno.

Serie 1c: Como insectos a ensayar se usaron larvas del 4^{to} estadio de *T. guasayana* con dos semanas de ayuno. Las heces recolectadas fueron de larvas de diferentes estadios de *T. guasayana*. Se realizaron cinco repeticiones con 9 individuos cada uno.

2^{da} Serie experimental: Agregación de *T. sordida* y *T. guasayana* frente a heces de *T. infestans*

Serie 2a: Se emplearon como insectos a ensayar larvas del 3^{er} estadio de *T. sordida* con dos semanas de ayuno postecdisis. Los excrementos se recolectaron de larvas de *T. infestans* del 4^{to} estadio. Se realizaron siete repeticiones con 9 individuos en cada uno.

Serie 2b: Se utilizaron como insectos experimentales larvas de *T. guasayana* del 2^{do} estadio con tres semanas de ayuno postecdisis. Los excrementos se recolectaron a partir de larvas del 5^{to} estadio de *T. infestans*. Se hicieron siete repeticiones, con grupos que oscilaron entre 9 y 12 individuos .

3^{ra} Serie experimental: Agregación de *T. infestans* frente a heces de *T. sordida* y *T. guasayana*

Serie 3a: Se usaron larvas de 4^{to} estadio de *T. infestans* con tres semanas de ayuno postecdisis. Las heces se recolectaron de

larvas de *T. sordida* del 5^{to} estadio. Se realizaron ocho repeticiones con un número de individuos por ensayo que fluctuó entre 9 a 12.

Serie 3b: Se utilizaron larvas del 4^{to} estadio de *T. infestans* con tres semanas de ayuno y los excrementos se recolectaron de larvas del 2^{do} y 3^{er} estadio de *T. guasayana*. Se realizaron seis repeticiones con un número de individuos que osciló entre 9 a 11.

4^{ta} Serie Experimental: Agregación cruzada de *T. sordida* frente a heces de *T. guasayana* y viceversa

Serie 4a: Se usaron larvas de 2^{do} estadio de *T. guasayana* con ocho días de ayuno. Las heces se recolectaron a partir de larvas de *T. sordida* y de adultos. Se realizaron seis repeticiones con una cantidad de 9 a 10 individuos por ensayo.

Serie 4b: Como insectos a ensayar se utilizaron larvas del 3^{er} estadio de *T. sordida* con una semana de ayuno postecdisis. Los excrementos se recolectaron de larvas de *T. guasayana*. Se realizaron seis repeticiones con 6 a 9 individuos por réplica.

Análisis estadístico: Para cada serie experimental, la respuesta de agregación fue analizada con la ayuda de una prueba de *G* de bondad de ajuste para una distribución al azar (*i.e.*, 1/3 para el sector experimental y 2/3 para los sectores control). Las respuestas de

agregación fueron comparadas utilizando un ANOVA de 2 factores y comparaciones de Tukey (Zar, 1984).

4.3. RESULTADOS

1ª Serie experimental

Los resultados de las tres primeras series se presentan en la tabla 5, la que se presenta a continuación:

TABLA 5

Series	Insectos experimentales	N° de insectos sobre el papel:		Gp	p
		Experimental	Controles		
1a	<i>Triatoma sordida</i>	37 (60,7%)	24 (39,3%)	17,8	<0,001
	Hembras	14 (51,8%)	13 (49,2%)	3,9	<0,05
	Machos	23 (67,6%)	11 (32,4%)	15,3	<0,001
1b	<i>Triatoma sordida</i> (larvas)	33 (52,4%)	30 (47,6%)	9,6	<0,005
1c	<i>Triatoma guasayana</i>	23 (49%)	22 (51%)	6,0	<0,025

Los resultados de la 1ª serie experimental indican que las dos especies prefieren el sector de arena donde se encuentra el papel tratado con sus excrementos, de la misma forma que lo hace *T. infestans* ($P < 0,05$). En el caso de *T. sordida*, los resultados se extienden también a los adultos, en cuanto tanto hembras como machos se agregaron significativamente cerca de papeles contaminados con excrementos de su misma especie.

2^{da} Serie experimental

Los resultados se pueden ver en la tabla 6:

TABLA 6

Series	Insectos experimentales	N° de insectos sobre el papel:		Gp	P
		Experimental	Controles		
2a	<i>Triatoma sordida</i>	31 (48,4%)	33 (51,6%)	6,2	<0,025
2b	<i>Triatoma guasayana</i>	43 (51,2%)	41 (48,8%)	11,4	<0,001

Los resultados indican que las dos especies, *T. sordida* y *T. guasayana*, se agregan significativamente frente a heces de *T. infestans* ($P < 0,025$).

3^{ra} Serie experimental

Los resultados se muestran en la tabla 7.

TABLA 7

Series	Heces de:	N° de insectos sobre el papel		Gp	P
		Experimental	Controles		
3a	<i>Triatoma sordida</i>	39 (43,8%)	50 (56,2%)	4,2	<0,05
3b	<i>Triatoma guasayana</i>	41 (69,5%)	18 (30,5%)	32	<0,001

La misma respuesta de agregación a excrementos interespecíficos puede establecerse para larvas de *T. infestans*. Estos insectos se agregan significativamente alrededor o sobre

papeles impregnados con excrementos de *T. sordida* o de *T. guasayana* ($P < 0,05$).

4ª Serie Experimental

Los resultados se pueden ver en la tabla 8.

Tabla 8

Series Insectos experimentales	Heces de:	N° de Insectos sobre el papel		Gp	P
		Experimental	Controles		
4a <i>T. guasayana</i>	<i>T. sordida</i>	18 (31,6%)	39 (68,4%)	0,09	>0,05
4b <i>T. sordida</i>	<i>T. guasayana</i>	34 (82,9%)	7 (17,1%)	42,9	<0,001

Los resultados de la serie 4b muestran claramente que las larvas de *T. sordida* prefieren significativamente los papeles de filtro impregnados con heces de *T. guasayana* ($P < 0,05$). Sin embargo, excrementos pertenecientes a *T. sordida* no son capaces de provocar agregación sobre larvas de *T. guasayana* (serie 4a).

En la figura 20 se resumen los resultados de las distintas series experimentales.

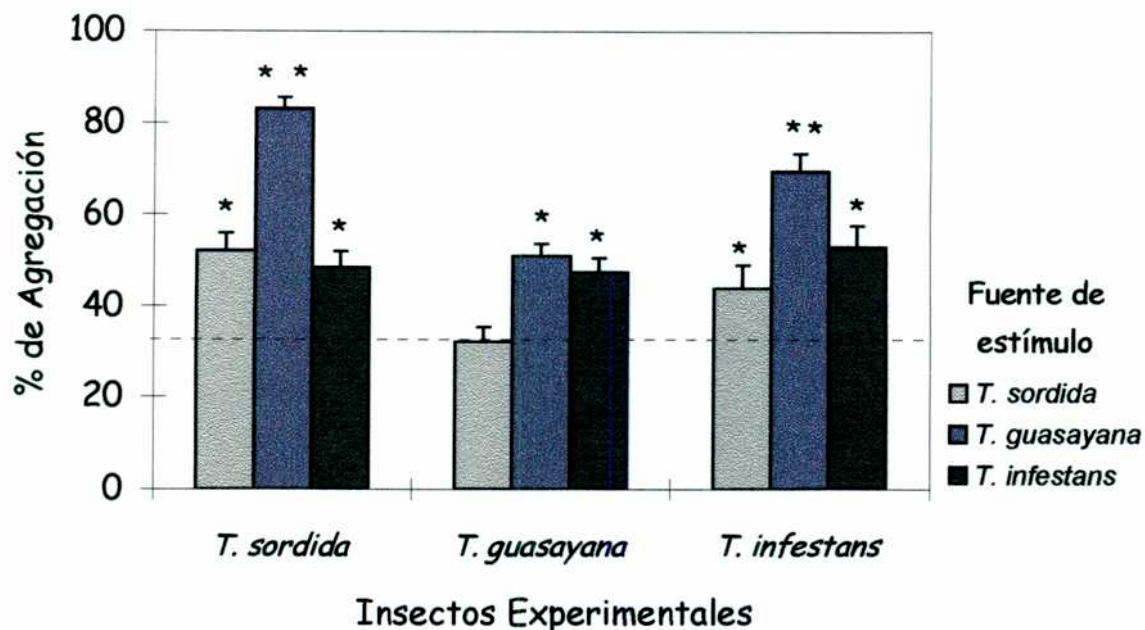


FIGURA 20: Respuesta de agregación de las larvas de Triatominae. La línea horizontal indica el valor esperado para una distribución al azar (*i.e.*, 33%). Los asteriscos indican diferencias significativas (*= $P < 0.05$; **= $P < 0.001$).

El análisis de varianza de dos factores muestra que las tres especies difieren significativamente con respecto a las respuestas de agregación ($F=4,021$; $gl=2, 60$; $P=0,023$). En general, las larvas de *T. guasayana* exhiben una respuesta de agregación más débil que *T. sordida* y *T. infestans* (figura 20). No hubo diferencias entre las dos últimas especies. Con respecto al origen de las heces, ellas revelaron una diferencia significativa de atractividad sobre los insectos ($F=6,604$; $gl=2, 60$; $P=0,003$). Las heces de *T. guasayana* evocaron una respuesta más fuerte que las provenientes de *T. sordida* y *T. infestans* (figura 20). La interacción de los factores especie-heces no resultó significativa ($F=1,224$; $gl=4, 60$; $P=0,31$).

4.4. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este capítulo extienden nuestro conocimiento del comportamiento de agregación en los insectos triatominos. Una sustancia con acción de agregación interespecífica está presente en las heces secas de *T. sordida* y *T. guasayana*, tal como fuera descrita en *T. infestans* en los capítulos precedentes. En estas series de ensayos encontramos que los excrementos de *T. infestans* estimulan un comportamiento de agregación tanto en las larvas de *T. sordida* como de *T. guasayana*. De modo similar, los excrementos de estas últimas dos especies de triatominos inducen atracción y agregación en las larvas de *T. infestans*. Por otro lado, las heces de *T. guasayana* estimulan el comportamiento de agregación en las larvas de *T. sordida*. Sin embargo, los excrementos de *T. sordida* no promueven la agregación de larvas de *T. guasayana*.

Nuestros resultados son comparables con aquellos obtenidos por Cruz-López *et al.* (1993). Estos autores postularon la existencia de una "feromona de agregación interespecífica", que estaría presente en las heces de larvas y adultos de varias especies de la subfamilia Triatominae (*T. mazzottii*, *T. longipennis*, *T. pallidipennis*, *T. barberi* y *Rhodnius prolixus*). Además, encontraron que las larvas de *T. longipennis* mostraban una respuesta más fuerte que las de los otros triatominos estudiados. Sin embargo, no había diferencias de atractividad de las heces de las larvas de las diferentes especies

estudiadas. Por otro lado, nuestros resultados no están de acuerdo con los de Neves y Paulini (1982), quienes postularon la existencia de una "feromona interespecífica de repelencia" entre adultos de *Panstrongylus megistus*, *T. infestans*. y *T. sordida*. Según estos autores, esta señal de repelencia podría explicar la escasa coexistencia de estas especies en el mismo ecotopo.

La acción biológica de esta señal de agregación en los triatomíneos puede ser encuadrada en la clasificación actual de las sustancias químicas, basada en interacciones entre organismos. Como ya dijimos en el capítulo introductorio, los compuestos que estimulan tanto respuestas interespecíficas como intraespecíficas son llamados semioquímicos o infoquímicos (Dicke y Sabelis, 1988). El término feromona se refiere a sustancias que son secretadas por un organismo hacia el exterior y causan una reacción específica en uno o más organismos receptores de la misma especie. Por otro lado, sabemos que los aleloquímicos son sustancias producidas, adquiridas o liberadas como resultado de las actividades de un organismo, las cuales son capaces de evocar una reacción comportamental en un receptor de otra especie (Dicke y Sabelis, 1988). Considerando que los excrementos actúan como una marca química, guiando a los triatomíneos hacia sitios protegidos (Lorenzo y Lazzari, 1996), estas marcas de senderos (y de los refugios) podrían ser explotadas por otras especies, que se beneficiarían con la interacción. Entre los

aleloquímicos, tales sustancias que evocan una respuesta adaptativa en el receptor de otras especies, han sido denominadas kairomonas (Dicke y Sabelis 1988). Nuestros resultados muestran que los factores de agregación presentes en las heces de Triatominae actúan como una feromona para la misma especie, pero actuarían como una kairomona para individuos de otras especies. Este tipo de interacción ha sido descrita entre diferentes especies del Orden Dermaptera (Sauphanor y Sureau 1993). En este último caso, la cohabitación de los refugios-trampa por varias especies pertenecientes al género *Forficula* ha sido confirmada en el campo. La feromona de agregación de la especie mejor representada en un lugar dado podría actuar como kairomona para los individuos de las otras especies. Otros ejemplos conocidos para tal acción dual de las sustancias de agregación se han observado en larvas de 5^{to} estadio de *Periplaneta americana*, las que se agregan preferentemente sobre superficies contaminadas con heces de conoespecíficos, pero también lo hacen sobre superficies contaminadas con excrementos de *P. fuliginosa*, si son forzadas a elegir entre un área contaminada y otra limpia (Appel, 1994). Más aún, en los escarabajos de la corteza, se ha observado en experimentos de campo una atracción interespecífica. Estos hallazgos sostienen el concepto de que estos escarabajos del género *Ips* producen componentes idénticos, pero que la discriminación olfativa ocurriría en la respuesta comportamental más que en la producción de la sustancia

atractiva (Vité y Renwick, 1971). La discriminación olfatoria, junto con los patrones estacionales de vuelo, el comportamiento de ataque, los hábitats separados, y la orientación por medio de estímulos no olfativos, podrían contribuir a mantener la especificidad en la colonización entre especies simpátricas.

Triatoma infestans es la especie más ampliamente distribuida geográficamente y mejor adaptada al ambiente doméstico entre de las vinchucas, siendo las poblaciones selváticas muy raras. *T. sordida* y *T. guasayana* se infectan frecuentemente con *Trypanosoma cruzi*, siendo por lo tanto vectores potenciales del Mal de Chagas, ya que pueden colonizar habitaciones humanas. Esta invasión está facilitada por la frecuente condición peridoméstica de ambas especies (Lent y Wygodzinsky, 1979). En años recientes, se informó en Brasil la presencia de *T. sordida* en viviendas donde otras especies habían sido eliminadas exitosamente mediante campañas de control (Schofield, 1994). En este contexto, la señal química atractante actuando en forma interespecífica se vuelve relevante, ya que chinches de distintas especies pueden encontrar y explotar refugios utilizados por sus conespecíficos, así como también por miembros de las otras especies.

La atractividad interespecífica de las heces de las tres especies aquí estudiadas nos lleva a preguntarnos sobre el origen de las sustancias involucradas en dicho comportamiento. El hecho que la

señal de agregación actúe en forma interespecífica sugiere que la misma o una sustancia química similar están presentes en los excrementos de las tres especies mencionadas. También podría indicar que los componentes poseen un antecesor común o que los insectos tienen una respuesta general a una familia de compuestos. Los insectos podrían identificar un compuesto común de la señal como especialistas, o podrían tener una respuesta generalista a una familia de compuestos. Por ejemplo, la agregación interespecífica producida por los rastros dejados por *Blatella germanica* no es estrictamente una feromona, sino que es debido a la atracción de las cucarachas hacia ácidos grasos (Ishii, 1970). Más aún, en los insectos algunas moléculas semioquímicas pueden ser comunes, utilizadas para funciones distintas y también representativas de diferentes órdenes. Por ejemplo, la secreción defensiva de *Polistes fuscatus* F. contiene metil-palmitato, que también es utilizado como feromona de dispersión en *Xylocopa virginica texana*, la cual emite dicha sustancia en su primera visita a una flor. Este éster es también uno de los componentes de la kairomona involucrada en la atracción de *Varroa jacobsoni* hacia las abejas y también forma parte de la feromona de crianza en las abejas (Sauphanor y Sureau, 1993). Recientemente Taneja (1996) encontró que las heces de ambas especies, *R. prolixus* y *T. infestans* liberan amoníaco, y que este compuesto activa

receptores sensoriales específicos en la antena y evoca una respuesta anemotáctica positiva.

En los párrafos precedentes, nos referimos a las causas próximas de este comportamiento en las vinchucas (*e.g.*, compartiendo las mismas o similares señales de agregación por especies diferentes). Finalmente, especularemos con las causas últimas evolutivas de las respuestas intraespecíficas, ya que estas abren varias cuestiones relevantes. Uno puede preguntarse, por ejemplo, cuál sería el beneficio evolutivo para un individuo transmitir una señal a otros individuos (pertenecientes o no a la misma especie) que representan competidores potenciales. Las vinchucas permanecen durante las horas del día protegidas en grietas, donde ellas se agrupan. Como mencionamos, la función de los excrementos como una marca química que sirve para encontrar los accesos a los refugios en uso (Lorenzo y Lazzari, 1996). Entonces en el caso de individuos de la misma especie, la pregunta podría ser reformulada como cuál sería el beneficio evolutivo de vivir agregados. Un beneficio obvio es que los insectos agrupados pueden encontrar simbioses fácilmente, los cuales son esenciales para el desarrollo normal de los triatominos (Lake y Friend, 1968; Eichler et al., 1996), y en el caso de los adultos pueden encontrar pareja sexual.

El beneficio de la respuesta interespecífica parece no ser tan obvio. Otra vez, la ventaja del receptor podría estar relacionada con

la explotación de los lugares protegidos, que tienen además los simbiontes necesarios para su desarrollo. La necesidad de los simbiontes podría ser explicada también como un beneficio para el emisor. Sin embargo, en este caso, debería tomarse en cuenta que las limitantes evolutivas (por ejemplo, la pérdida de ciertos caminos metabólicos) o el balance entre costo y beneficio en la producción de una señal química específica y más discreta podría favorecer el uso de un producto metabólico natural, como es el amoníaco, que es compartido por diferentes especies.

CAPÍTULO 5. Comportamiento de Agregación en
Rhodnius prolixus

5.1. INTRODUCCIÓN

Rhodnius prolixus es el vector principal de la enfermedad de Chagas en Venezuela y Colombia, y es importante también en algunas regiones de Centroamérica, especialmente en Guatemala, Honduras y El Salvador. En Colombia y Venezuela se encuentra en hábitats selváticos, tales como las cimas de las palmeras, además de las casas, pero en Centroamérica parece ser casi exclusivamente doméstico. Esta especie, también fue encontrada recientemente en áreas del sur del Amazonas, en Brasil (Schofield, 1994).

Schofield y Patterson (1977) describieron un factor, presente en las heces frescas de las larvas de *R. prolixus*, que estimularía la agregación en larvas ayunadas.

Con el objeto de confirmar o rechazar estas observaciones, en este capítulo investigaremos el significado de los excrementos de *R. prolixus* sobre larvas de la misma especie. Por otro lado, ampliaremos los resultados obtenidos en el capítulo 4, estudiando el comportamiento de esta especie con respecto a *T. infestans*.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos. Se utilizaron larvas del 3^{er} estadio de *R. prolixus* y larvas del 4^{to} estadio de *T. infestans*.

Fuente de estímulo: Se usaron heces pertenecientes a larvas de *R. prolixus* o a *T. infestans*. La técnica de recolección de las deyecciones fue la descrita en el capítulo 2.

Dispositivo experimental: Se utilizó la arena circular de 13 cm de diámetro ya descrita en otros capítulos (figura 1) y se siguió el mismo procedimiento, ya explicado en los capítulos anteriores.

Series experimentales

1^{ra} Serie experimental: Se ensayó la respuesta de agregación de larvas de *R. prolixus* frente a sus propias heces. Como insectos experimentales se utilizaron larvas del 3^{er} estadio, con un ayuno de diez días postingesta. Se llevaron a cabo ocho repeticiones con 9 insectos cada una.

2^{da} Serie experimental: Se estudió la respuesta de agregación de larvas del 3^{er} estadio de *R. prolixus* frente a los excrementos pertenecientes a larvas de *T. infestans*. Los insectos ensayados tenían un ayuno postalimentación de dos semanas. Se llevaron a cabo ocho repeticiones con un número de individuos que osciló entre 8 y 12.

3^{ra} Serie experimental: En esta serie se ensayó la respuesta de agregación de larvas del 4^{to} estadio de *T. infestans*, con dos semanas de ayuno postecdisis, frente a papeles con heces pertenecientes a

larvas de *R. prolixus* contra papeles limpios. Se realizaron cinco repeticiones con 9 individuos cada una.

5.3. RESULTADOS

Los resultados de las series 1 y 2 se ven en la figura 21. Se puede observar que las larvas de *R. prolixus* se agregaron significativamente frente a sus heces (prueba de G con $G_p=18,8$, $P<0,001$). Sin embargo cuando se las ensayó frente a excrementos que corresponden a *T. infestans*, las vinchucas se distribuyeron en la arena experimental al azar ($G_p=1,45$, NS).

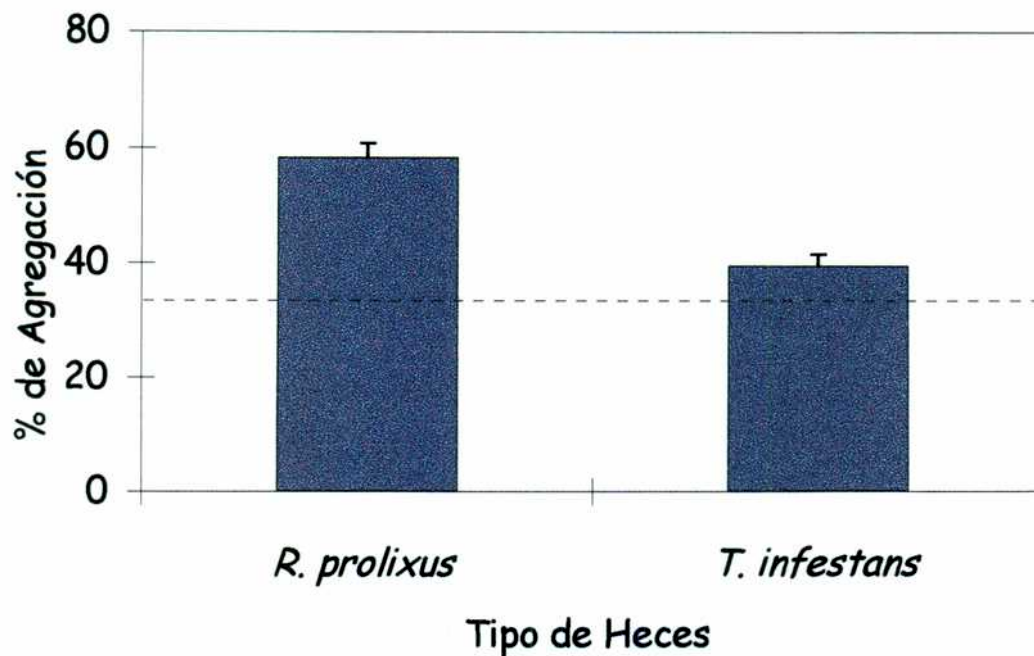


FIGURA 21: Respuesta de larvas del 3^{er} estadio de *R. prolixus* frente a papeles impregnados con heces secas y dos controles, ofrecidos simultáneamente. La distribución de los insectos difirió significativamente del azar (línea punteada) frente a heces de *R. prolixus* ($P < 0,001$). Frente a heces pertenecientes a *T. infestans* los valores no se desviaron del azar

Los resultados de la serie 3, que se observan en la figura 22, muestran que las larvas de *T. infestans* se agregaron significativamente frente a heces que pertenecen a *R. prolixus*. Prueba de *G*, con $G_p = 41,7$, $P < 0,001$.

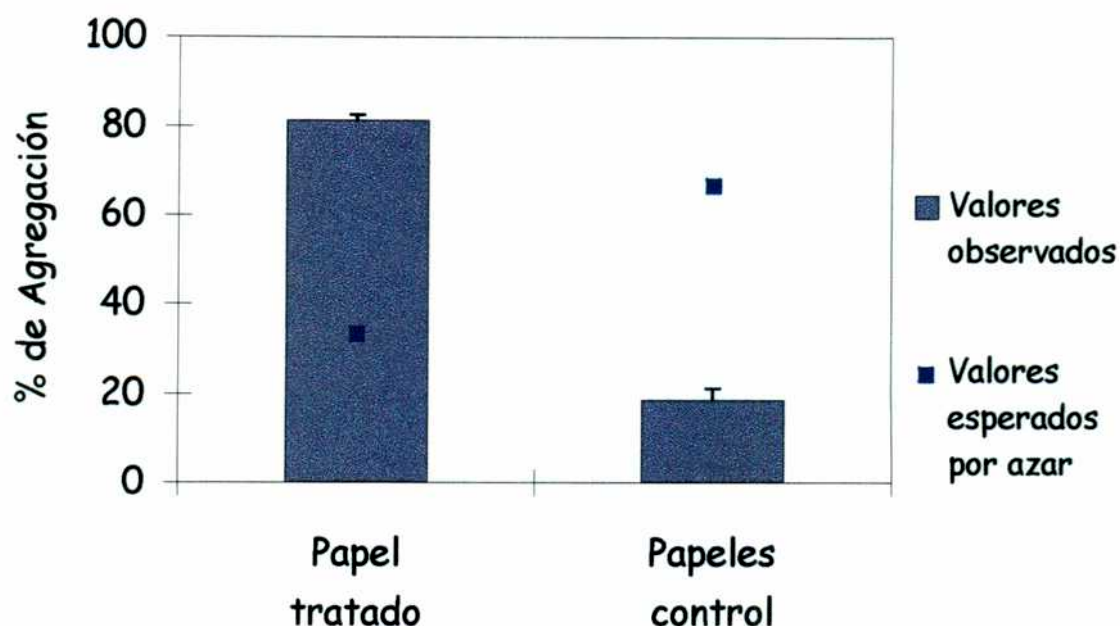


FIGURA 22: Respuesta de larvas del 4^{to} estadio de *T. infestans* frente a papeles impregnados con heces secas pertenecientes a *R. prolixus* y 2 controles ofrecidos simultáneamente. La distribución de los insectos difirió significativamente del azar ($P < 0,001$).

La respuesta de las dos especies (Serie 1 y 3) frente a las heces de *R. prolixus* fue diferente y significativa (Prueba de t , $t=2,78$, $gl=11$ y $P=0,0179$), siendo más fuerte la respuesta de *T. infestans* que la de *R. prolixus*.

5.4. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este capítulo muestran que existe una sustancia en las heces de *Rhodnius prolixus* que promueve la

agregación en las larvas de esta especie. Esta misma señal también promueve la respuesta de agregación en *T. infestans*. La respuesta interespecífica fue, en este caso mayor que la intraespecífica. Esto podría estar relacionado con su modo de vida. Las vinchucas de la especie *R. prolixus* viven en palmeras (en los nidos de las aves), y podría no ser tan importante el uso de esta señal en la orientación hacia sus refugios. Las larvas de *R. prolixus*, por otra parte, no se agregaron frente a las heces de *T. infestans*, lo que se correlaciona con la menor respuesta de esa especie, aún a sus propios excrementos.

Una hipótesis que emerge de este estudio es que las dos especies secretarían una "feromona" de agregación potencial, aunque no todas las especies utilizarían feromonas, *R. prolixus* en nuestro trabajo. Estas chinches no emplearían estas señales químicas para orientarse hacia los refugios.

Nuevamente, el hecho que el factor de agregación actúe en forma interespecífica es relevante, ya que los individuos de *T. infestans* podrían encontrar y explotar refugios utilizados por conespecíficos, así como también por miembros de otras especies.

Queda aún por resolver si las sustancias involucradas en la señal son comunes en estas dos especies, o tienen estructuras similares.

**CAPÍTULO 6. Una nueva señal química de
agregación en *Triatoma infestans***

6.1. INTRODUCCIÓN

En la mayoría de los experimentos llevados a cabo para analizar el significado de las heces en el comportamiento de agregación de los triatominos, se ha ensayado la respuesta de las vinchucas frente a piezas de papel de filtro impregnadas con heces, colectadas en presencia o ausencia de contacto directo de los insectos dadores con los papeles tratados. En los capítulos precedentes se ha demostrado decididamente que los excrementos por si mismos inducen una respuesta de agregación en estos insectos.

En este capítulo, analizaremos la respuesta de *Triatoma infestans* a señales dejadas por los insectos por contacto físico directo sobre un sustrato, papeles de filtro en nuestro caso, pero en ausencia de marcas fecales. En particular, estudiaremos la hipótesis nula de que los insectos eligen azarosamente entre papeles que estuvieron previamente en contacto con otros insectos y papeles limpios. Además, analizaremos la modalidad sensorial involucrada en la respuesta de agregación y la posibilidad de que los componentes activos puedan ser extraídos con solventes.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: Como insectos experimentales se utilizaron larvas de *T. infestans*, criadas en nuestro laboratorio y alimentadas con sangre

de bovino heparinizada, a través de un alimentador artificial (Núñez y Lazzari, 1990).

Fuente de estímulo: Con el objeto de ensayar la respuesta de las vinchucas a olores, en ausencia de señales fecales, los estímulos utilizados fueron obtenidos como sigue: dos grupos de 30 larvas del 5^{to} estadio de *T. infestans* se colocaron en sendos frascos de plástico (8 cm de diámetro, 10 cm de altura), que contenían 10 piezas de papel de filtro (3x3 cm). Para minimizar la deposición, los insectos utilizados en la obtención de los estímulos tenían un ayuno de 40 días postecdisis. Las vinchucas podían caminar libremente sobre los papeles, dentro de ambos frascos. Los insectos de uno de los grupos, tenían sus anos totalmente ocluidos con cera. Esta obstrucción fue realizada y verificada con la ayuda de un estereomicroscopio. Las larvas del segundo grupo permanecían intactas. Transcurridas dos semanas, los papeles fueron inspeccionados cuidadosamente por la presencia de deyecciones. Aquellos que mostraban alguna marca (ca. de un 10% en el grupo intacto y ninguna en el otro grupo) fueron descartados y el resto utilizados para los experimentos.

Dispositivos experimentales: Se utilizaron dos dispositivos experimentales. En uno de ellos, utilizado previamente, los insectos podían contactar físicamente la fuente de olor ensayada (figura 1). En el otro dispositivo, los insectos ensayados podían percibir cualquier

señal olfativa emanada desde la fuente de estímulos, pero no lograban hacer contacto con ella (figura 23).

El primer dispositivo consistió de la arena circular ya descrita, *i.e.*, una caja de Petri (3 cm de alto y 13 cm de diámetro), con su base cubierta con un papel de filtro (figura 1). Los ensayos se llevaron a cabo colocando 3 piezas de papel de filtro (3x3 cm) en la arena, delimitando 3 sectores iguales. Estos papeles se plegaron una vez, con el objeto de ofrecer un refugio a los insectos (Lorenzo F. *et al.*, 1994). Dos de los papeles sirvieron de controles limpios, mientras que el tercero fue tratado (experimental).

El segundo dispositivo fue una arena circular de PVC (13 cm en diámetro y 3 cm de altura). El piso de esta arena era una malla de acero inoxidable. Una segunda arena, con las mismas dimensiones, se colocó por encima de la primera. Una malla de nylon sirvió como piso a esta segunda arena, estableciéndose dos comportamientos horizontales separados por ésta (figura 23). Como en las dos primeras series, un papel tratado con diferentes estímulos y dos controles fueron distribuidos en los tres sectores. En el comportamiento superior, se colocaron 3 piezas plegadas de papel de filtro (3x3 cm) limpias, ofrecidas a modo de refugio.

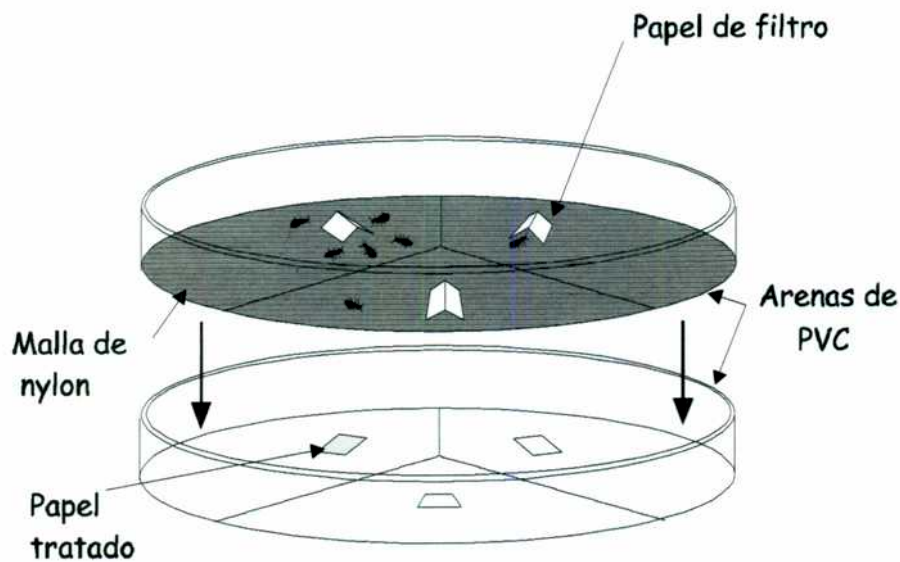


FIGURA 23: Vista lateral del dispositivo de arena doble. En la arena inferior se colocan los papeles o cajas con insectos a ensayar. En la arena superior son liberados los insectos experimentales. En ésta misma se colocan papeles plegados limpios a modo de refugio.

Series experimentales

1^{er} dispositivo

1^{ra} Serie experimental: Fueron utilizados como insectos a ensayar larvas del 4^{to} estadio, a las que se les presentó como fuente de estímulos piezas de papel que habían estado en contacto previamente con insectos que tenían sus anos bloqueados. Se realizaron diez repeticiones con un total de 90 individuos.

2^{da} Serie experimental: Se ensayó la respuesta de larvas del 3^{er} estadio frente a piezas de papel de filtro que habían estado en

contacto con insectos intactos. Se hicieron once repeticiones con 114 individuos en total.

2^{do} dispositivo

En todas las series los insectos experimentales utilizados fueron larvas del 4^{to} estadio.

Tomando en cuenta la fuente de estímulo, se realizaron diferentes series de experimentos:

3^{ra} Serie experimental: Se ensayó la respuesta de las larvas frente a un papel de filtro que había estado previamente en contacto con larvas que tenían sus anos bloqueados frente a dos papeles limpios. Se llevaron a cabo doce repeticiones con un total de individuos de 107.

4^{ta} Serie experimental: Se ensayó la respuesta de las vinchucas frente a una caja perforada de plástico (6 cm de diámetro y 2 cm de altura), que contenía 20 larvas del 4^{to} estadio con sus anos ocluidos, contra dos cajas perforadas vacías. Se hicieron diez réplicas, con un total de 105 insectos.

5^{ta} Serie experimental: Se evaluó la respuesta de los insectos frente a un papel de filtro impregnado con heces secas (colectadas evitando el contacto físico de los insectos con los excrementos)

frente a dos papeles limpios. Se realizaron seis repeticiones con 54 insectos en total.

Series control

Los ensayos control fueron hechos con tres papeles limpios. Se utilizaron larvas del 4^{to} estadio como insectos experimentales. Se hicieron cuatro repeticiones para el 1^{er} dispositivo y cinco para el 2^{do} dispositivo, con un total de 48 y 60 insectos respectivamente.

En cada repetición de las diferentes series, los insectos experimentales se liberaron en el centro del compartimiento superior de la arena, con la ayuda de un frasco de plástico invertido (Lorenzo F. et al, 1994). Pasados diez minutos, el frasco se elevaba cuidadosamente y los insectos podían moverse libremente en la arena. Luego de una hora, se registraba el número de vinchucas en cada sector.

Después de cada ensayo, los materiales (pinzas, arena) era lavados cuidadosamente con acetona y secados, los papeles (la base y los papeles a ensayar) descartados y los insectos experimentales remplazados por un grupo naive.

6.2.1. EXPERIMENTOS CON EXTRACTO DE CUTÍCULA

En esta serie de ensayos estudiamos la respuesta de larvas del 4^{to} estadio de *T. infestans* a componentes cuticulares. Los lípidos cuticulares fueron extraídos lavando 20 larvas ayunadas del 4^{to} estadio de *T. infestans* en 15 ml de mezcla de hexanos (Hexanos - Dorwil). Estas larvas tenían sus anos bloqueados con cera. Cada insecto fue sumergido en la solución cabeza abajo, controlando que el ano no se sumergiese, con el objeto de prevenir eventuales deposiciones fecales. Una vez muerta, cada vinchuca era sumergida en la solución y se agitaba suavemente durante diez minutos. Luego los insectos se descartaban y las piezas de papel de filtro (2x1 cm) se sumergían en la solución, agitándose durante cinco minutos. Luego los papeles era secados a 28°C y éstos utilizados un día después. Para descartar la posibilidad de que los residuos de la mezcla de hexanos actúen como repelentes o atractantes, se realizaron controles con papeles impregnados con hexano contra papeles limpios.

Se utilizó como dispositivo experimental el primero descrito en este capítulo (figura 1). Se hicieron para esta serie (6^{ta} Serie experimental) nueve repeticiones, con 9 a 12 insectos por ensayo, con un total de 90 individuos.

Análisis estadístico: Se utilizó una prueba de G de bondad de ajuste para estudiar desviaciones de una distribución al azar (en este dispositivo es: 1/3 para la zona experimental; 2/3 para las zonas control) fue realizado para cada serie experimental (Sokal y Rohlf, 1981).

6.3. RESULTADOS

La tabla 8 y las figuras 24 y 25 muestran los resultados de las 6 series experimentales. La hipótesis nula de una distribución al azar de las vinchucas en la arena fue rechazada para las series 1, 2, 5 y 6. En estas series los insectos ensayados prefirieron significativamente el sector de la arena asociado con el papel tratado con los estímulos, frente a los controles.

TABLA 8: Series experimentales

Series	Fuente de estímulo	Nº total de insectos	(%) de Agregación	Gp	P
--------	--------------------	----------------------	-------------------	----	---

CON CONTACTO FÍSICO

1	Papeles marcados (con insectos c/ ano bloqueado)	90	54,4	16,9	<0,001
2	Papeles marcados (con insectos intactos)	114	48,7	11,5	<0,001
6	Papeles marcados con extracto de cutícula	90	44,4	4,8	<0,05

SIN CONTACTO FÍSICO

3	Papeles marcados (con insectos c/ ano bloqueado)	107	37,0	1,4	NS
4	Insectos con ano bloqueado	88	25,0	2,8	NS
5	Heces secas	54	72,2	34,0	<0,001

TABLA 9: Series Control

Dispositivo Experimental	Nº Total de insectos	Gp	P
1 (sin contacto físico)	59	1,25	NS
2 (contacto físico)	48	0,96	NS

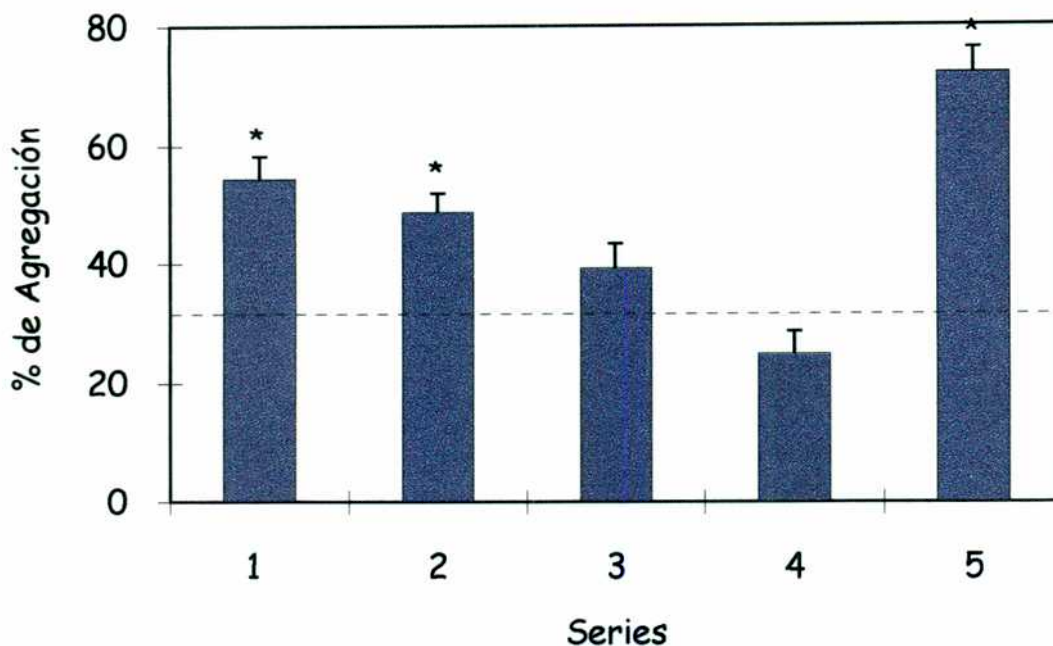


FIGURA 24: Porcentaje de agregación de larvas de *T. infestans* frente a diferentes estímulos en diferentes arenas. Serie 1 y 2 en la arena donde existe el contacto físico de los insectos experimentales con la fuente de estímulo. Series 3, 4 y 5 no hay contacto físico entre insectos y estímulo. Los asteriscos muestran las series donde la respuesta de agregación fue significativa.

Los resultados obtenidos en la primera y segunda series revelaron que los insectos se agregaron significativamente como respuesta a papeles que previamente habían estado en contacto con larvas ayunadas, independientemente de tener sus anos bloqueados o no. Ya que no se observaban marcas de excrementos sobre los papeles elegidos por los insectos, la razón para tal comportamiento selectivo podría ser la existencia de otro factor de agregación depositado por los insectos sobre los papeles, durante los contactos previos.

Sin embargo, cuando la posibilidad de que los insectos ensayados contactaran con los papeles tratados fue evitada (utilizando el 2^{do} dispositivo), en la 3^{ra} serie experimental, no fue observado el comportamiento de agregación. Esta pérdida de agregación se observó también en respuesta a sustancias volátiles producidos por los insectos encerrados en las cajas perforadas (4^{ta} serie). La 5^{ta} serie sirvió como un control del dispositivo 2. Confirmando nuestros resultados en el dispositivo 1 y en el olfatómetro, las heces secas promovieron agregación.

Aunque las series 1 y 3 son idénticas con respecto a la fuente de estímulo utilizada, ellas difirieron en la posibilidad de que los insectos pudiesen hacer contacto con los papeles potencialmente marcados por otros conespecíficos. Cuando el contacto directo era evitado (3^{ra} serie experimental), los insectos no eligieron selectivamente los papeles marcados. Podemos concluir, entonces, que los papeles caminados por las vinchucas contienen un factor de agregación que sólo es efectivo si los insectos ensayados pueden hacer contacto con ellos.

En las series control realizadas para ambos dispositivos, los insectos se distribuyeron al azar (prueba de G , NS). Estos resultados pueden verse en la tabla 9.

Con respecto a los extractos de la cutícula de *T. infestans*, estos fueron efectivos en inducir una agregación significativa en las

larvas ensayadas (6^{ta} serie). En esta serie, los insectos fueron hallados en su mayoría en el sector de la arena asociada con los papeles impregnados con los extractos cuticulares (figura 25).

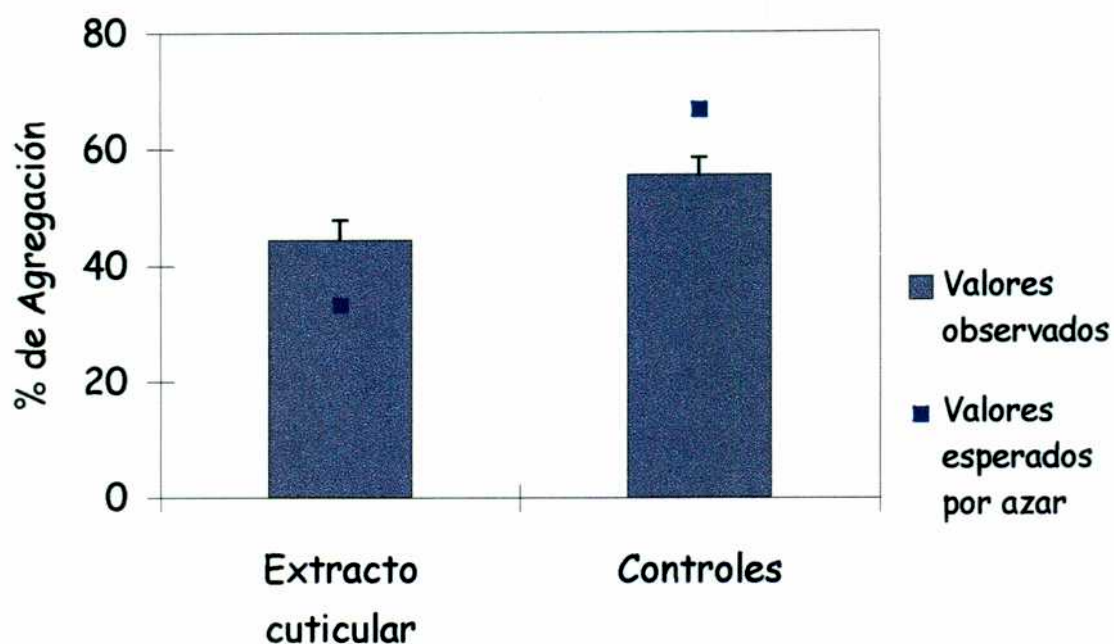


FIGURA 25: respuesta de larvas del 4^{to} estadio a papeles impregnados con los extractos cuticulares vs papeles limpios. Los insectos prefieren significativamente el sector donde se encuentran los papeles tratados ($P < 0,05$).

En los ensayos control, para la serie 6, papeles impregnados con solución de hexano contra controles limpios, los insectos mostraron una distribución al azar (Prueba de G , NS).

6.4. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este capítulo demuestran que otros factores, además de las heces secas, son capaces de promover el comportamiento de agregación en *T. infestans*. Proponemos que las vinchucas podrían tener en su cutícula algún componente químico que es depositado en el sustrato por los insectos al caminar. Esta señal podría ser depositada activa o pasivamente (por ejemplo, por la concentración de olores de vinchucas en los alrededores) por los insectos. En ambos casos, la señal constituye una marca de agregación, actuando como una huella química o "footprint" de estas chinches.

Aunque los residuos fecales podrían estar presentes sobre todo el cuerpo de algunas de las vinchucas lavadas con hexano, podemos excluir al factor de agregación presente en las heces como responsable de la respuesta aquí medida. Esta conclusión se ve apoyada por los diferentes informes que indican que el factor activo en las heces de los triatominos puede ser extraído con solventes polares, pero no con hexano (Rojas y Cruz-López, 1994; Cruz-López y Morgan, 1995; Lorenzo F. y Lazzari, 1995). Más aún, el factor descrito aquí no está presente en las deyecciones y exhibe, además, propiedades químicas diferentes de aquellas encontradas en las heces de las vinchucas (ver Capítulo 3).

Hasta ahora, las únicas señales intraespecíficas de agregación descritas en los triatomíneos son la que está presente en sus excrementos (Schofield y Patterson, 1979; Lorenzo F. *et al.*, 1994, Lorenzo y Lazzari, 1996) y la feromona sexual liberada durante la cópula, la que atrae y agrega a los machos (Baldwin *et al.*, 1971; Manrique y Lazzari, 1995). Aquí se describe una nueva señal química capaz de promover la agregación de las vinchucas.

Cuando el contacto directo con la señal impregnada en los papeles (marcados previamente por conoespecíficos) es evitado, en la 3^{ra} serie experimental, los insectos no eligen selectivamente el papel tratado, sino que su distribución es al azar. Se puede concluir, entonces, que los sustratos que han sido caminados por vinchucas contienen un factor de agregación que sólo es efectivo si los insectos pueden hacer contacto con él. Esto indica que la clave que evoca este comportamiento de agregación no es estrictamente una señal olfatoria (esto es difundida por el aire), sino que actúa a través de un mecanismo de quimiorrecepción de contacto.

Se podría argumentar que las diferencias entre la 1^{ra} y la 3^{ra} serie experimental son debidas a la baja efectividad del 2^{do} dispositivo experimental (figura 27), cuando se ensayan señales olfatorias frente a los insectos experimentales. Sin embargo, este no parece ser el caso, ya que si observamos los resultados de la 5^{ta} serie experimental, los insectos responden agregándose significativamente

a señales olfatorias emanadas de heces ubicadas por debajo de ellos. Por lo tanto, estos resultados revelan diferentes modalidades sensoriales de las claves de agregación en *T. infestans*.

En contraste con las sustancias volátiles presentes en las heces, que son capaces de atraer a las vinchucas, cuando son percibidos a cierta distancia, el nuevo factor (footprint) necesita del contacto directo o de la proximidad de la fuente de estímulo para promover la agregación. Así es que el footprint actuaría más como arrestante de la actividad locomotora de los insectos, que como atrayente para las vinchucas. Este aspecto debe ser tenido en consideración si se pretende incorporarlo a algún dispositivo de detección o captura de vinchucas.

En las larvas de la chinche de fuego (fire bug) *Pyrrhocoris apterus*, el comportamiento de agregación resulta de atracción interindividual guiada por estímulos visuales a distancias largas, y por estímulos quimiotáctiles a distancias muy cortas (Schmuck, 1987). Luego de dispersarse artificialmente, las larvas de todos los estadios de *P. apterus* se reagrupan en un tiempo corto, atraídas interindividualmente por estímulos visuales (este estímulo no es muy específico). Cuando hacen contacto, sin embargo, estímulos quimiotácticos específicos son necesarios para establecer y mantener una agregación con los conoespecíficos. Estos estímulos son producidos por dos glándulas ubicadas en la parte anterior del abdomen y

contienen n-alcanos, n-tridecanos, n-hexadecanos y n-heneicosanos. La recepción de esta feromona se lleva cabo en receptores localizados en el último segmento antenal, que muestra un gran número de sensilias "estilocónicas". Resultados similares fueron obtenidos por Melber (1982, citado por Schmuck, 1987) en *Dysdercus cardinalis* y *D. nigrofasciatus*. Estos insectos producen una feromona efectiva sólo en intervalos cortos y es especie-específica. En las abejas, la presencia de feromonas de marcado (*footprint pheromones*) incrementan la atraktividad de la feromona producidas en la glándula de Nasonov hacia fuentes artificiales de alimento, y ambas feromonas son utilizadas para la orientación hacia la entrada de la colmena (Winston, 1987).

También en *T. infestans*, diferentes factores parecen interactuar modulando el comportamiento de agregación. Está demostrado que los insectos marcan el acceso a los refugios con sus deyecciones, una clave atractante y agregante (Lorenzo y Lazzari, 1996). Una vez dentro del refugio, la estimulación física o mecánica (tigmotaxis) y los footprints podrían detener o arrestar a los animales durante las horas del día, esto es, el período de inactividad.

Aunque a este tipo de señales, las llamamos footprints, el origen glandular de la marca permanece sin aclararse. Los footprints de la abeja parecen ser producidos por todo el cuerpo del insecto, excepto quizás por la cabeza, siendo su producción más abundante en el tórax,

desde donde presumiblemente se mueve hacia las patas (Butler *et al.*, 1969; Free, 1987). En la hormiga primitiva *Prionopelta amabilis*, Hölldobler *et al.* (1992) describieron la presencia de glándulas basitarsales especiales en las patas posteriores de las obreras y reinas, y demostraron que estas secreciones están implicadas en el reclutamiento a fuentes de alimentación y a los sitios de anidamiento. Las hormigas depositan las secreciones de estas glándulas durante un comportamiento especial (dragging= arrastrar el abdomen). Las obreras de *Onychomyrmex* tienen una glándula similar y exhiben el mismo comportamiento que las de *Prionopelta* (Hölldobler y Palmer, 1989a). El género *Amblyopone* posee una glándula especial de marcado (footprint) en el quinto társo de sus patas traseras. Esta secreción parece tener una función de feromona de marcado (Hölldobler y Palmer, 1989b).

El origen de la marca en *T. infestans* permanece desconocido. Considerando que los resultados de las series 1 y 2 no difieren, podemos concluir que la sustancia involucrada no es una secreción proveniente de glándulas anales, ni un componente de la orina o un producto de su degradación.

La cutícula de los insectos está cubierta por una mezcla de hidrocarburos. Se ha demostrado en determinados insectos que algunos de estos compuestos químicos tienen un efecto de agregación relacionado al comportamiento sexual, por ejemplo en adultos de

Drosophila melanogaster (Arienti y Jallon, 1996). En un estudio sobre *Phormia regina* realizado por Stoffolano *et al.* (comunicación personal) se muestra que estas moscas perciben hidrocarburos de baja volatilidad utilizando quimiosensilias de contacto, encontradas en sus patas y no por receptores olfatorios. En *Phormia*, los hidrocarburos están involucrados en el comportamiento copulatorio. Si se remueven los hidrocarburos de la cutícula de las hembras no se afecta el número de apareamientos exitosos realizados por los machos, pero se reduce marcadamente el número de intentos de cópula y la cantidad de tiempo que permanece el macho montado sobre la hembra.

En la última serie experimental (6^{ta}) se muestra que algún (o algunos) compuesto no-polar de la cutícula de las vinchucas está involucrados en su comportamiento de agregación. Esta sustancia podría ser liberada por cualquier parte del cuerpo de estos insectos y, desde allí podría llegar al sustrato por contacto directo o por migración a través de las patas. Los hidrocarburos cuticulares de *T. infestans* han sido descritos por Juárez y Blomquist (1993). Los lípidos cuticulares en esta especie son una mezcla de hidrocarburos no ramificados o con ramificaciones de metilos y de un largo de cadena de 18 a 34 carbonos . La mezcla compleja de hidrocarburos de muchas especies de insectos proveen suficiente contenido de información para su uso en la comunicación química. En el caso de esta especie esta función no ha sido examinada hasta ahora. Los

resultados presentados indican que se vuelve relevante continuar con el estudio de esta "huella química" o footprint, involucrada en el comportamiento de agregación de *Triatoma infestans*.

CAPÍTULO 7. Conclusiones finales

1. Los resultados presentados en este trabajo demuestran la existencia de una sustancia atractante en las heces secas de *Triatoma infestans*, que media el comportamiento de agregación en adultos y larvas de esta especie. Estos insectos responden de la misma manera tanto a heces provenientes de adultos como de larvas.

2. Las vinchucas son significativamente atraídas por una corriente de aire que transporta sustancias volátiles provenientes de las heces secas. Este resultado implica que la señal liberada por los excrementos no actuaría deprimiendo la actividad locomotora, sino que atraería a los insectos.

3. Las heces frescas no promueven la agregación. Más aún en ciertos experimentos provocaron un rechazo significativo. El cambio en la respuesta ocurre transcurridas tres horas de la deposición de las deyecciones. En este momento podría producirse una transformación química, o podría evaporarse una sustancia que estuviese enmascarando el componente atractivo.

4. Inmediatamente luego de la ingesta de sangre, los insectos no se orientan hacia los papeles impregnados con las heces secas, mostrando, en la arena circular, una distribución al azar. El cambio de respuesta de indiferencia a preferencia tiene lugar pasadas 7-8 horas desde la alimentación. Nuestros resultados, el patrón bimodal de agregación/dispersión y de entrada y salida de los refugios exhibidos

por los insectos y las altas densidades de excrementos habitualmente hallados en las cercanías de los refugios, son todos elementos consistentes con la hipótesis que propone que la señal de agregación asistiría a las vinchucas durante su orientación hacia los refugios.

5. La actividad locomotora de *T. infestans* exhibe dos picos, al anochecer y al amanecer, que están relacionados con la búsqueda de alimento y de refugios, respectivamente. El ritmo diario de agregación/dispersión descrito aquí, está en concordancia con esta interpretación. Los insectos se dispersan al atardecer y se agrupan al amanecer, *i.e.*, en la misma ventana temporal que los picos de actividad locomotora.

6. Podemos concluir que el factor de agregación no está presente en la sangre del hospedador, y tampoco es parte del contenido de la región anterior del intestino del insecto. Sugerimos que la sustancia podría ser un producto de la digestión de la sangre ingerida, o que algún agregado a los contenidos del recto intervendría en la formación del compuesto attractante/agregante. Además, por los estudios de fraccionamiento concluimos que el factor activo es hidrosoluble. Los bioensayos descritos mostraron ser eficientes para ensayar la respuesta de los triatominos a diferentes fracciones de su materia fecal. La sustancia activa podría ser caracterizada y utilizada potencialmente para muestreos poblacionales y para el control de vinchucas en las viviendas humanas.

7. Una sustancia agregante también está presente en las heces de *T. sordida* y *T. guasayana*, otros vectores sudamericanos de la enfermedad de Chagas. Los insectos pertenecientes a cada una de estas dos especies y a *T. infestans* se agrupan como respuesta a materia fecal pertenecientes a las dos especies, con la sola excepción que las heces de *T. sordida* no son capaces de atraer larvas de *T. guasayana*. En todos los casos, la respuesta interespecífica fue tan fuerte como la intraespecífica.

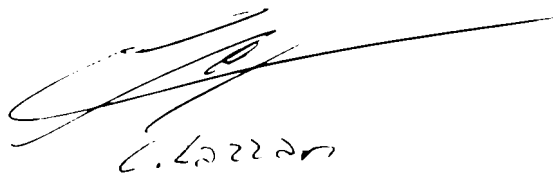
8. Sugerimos que la comunicación interespecífica ayudaría a que cualquiera de estas tres especies pueda encontrar y explotar los refugios utilizados por sus conespecíficos o por miembros de las otras especies. Con respecto al origen, que la sustancia sea interespecífica sugiere que el mismo compuesto o similares están presentes en las heces ensayadas, o que los compuestos tienen un ancestro común. Los insectos identificarían un componente común de la señal, o tendrían una respuesta generalizada a una familia de compuestos.

9. Una sustancia de agregación también está presente en las heces secas de *Rhodnius prolixus*, principal vector de la enfermedad de Chagas en el Norte de Sudamérica y parte de América Central. Sin embargo, las larvas de esta especie no responden a los excrementos de *T. infestans*, aunque sus heces fueron atractivas para *T. infestans*. Sería posible que, aunque todas las especies secretarían una feromona potencial de agregación, no todas las usarían, *R. prolixus* en nuestro

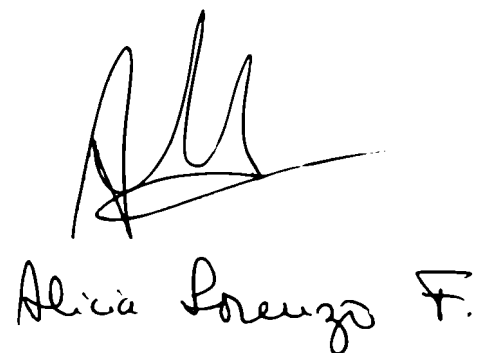
trabajo. Estas vinchucas podrían no emplear esta señal química en la orientación hacia sus refugios.

10. Las vinchucas poseen en su cutícula un compuesto que se impregna en superficies previamente caminadas por ellas. Esta señal química constituye una marca de agregación, que actúa como una "huella química" (footprint) de estos insectos. El compuesto cuticular activo fue extraído con solución de hexano. La señal química no es estrictamente olfatoria, como ocurre con las heces, sino que actuaría según un mecanismo quimiotáctil. Podría actuar primordialmente deteniendo la actividad (arrestante) y no como atractante de los insectos.

11. Tanto la señal fecal como las "huellas químicas" constituyen factores naturales modificadores del comportamiento de las vinchucas, de fácil obtención que podrían ser explotadas en el diseño de estrategias para la detección temprana y control de los vectores del Mal de Chagas.



L. Figueiras



Alicia Lorenzo F.

Capítulo 8. Bibliografía

- Ampleford, E. y Davey, K. (1989). Egg laying in the insect *Rhodnius prolixus* is timed in a circadian fashion. *J. Insect Physiol.*, 35: 183-187.
- Ampleford, E. y Steel, C. (1982). Circadian control of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. comp. Physiol.*, 147: 281-286.
- Appel, A. G. (1994). Intra- and interspecific trappings of two sympatric peridomestic cockroaches (Dictyoptera: Blattidae). *Entomol. Soc. Amer.*, 87: 1027-1032.
- Arienti, V. y Jallon, J. M. (1996). Evolución feromonal de *Drosophila melanogaster*. *Resúmenes VI Congreso Latinoamericano de Entomología* (México), p. 149.
- Baldwin, W. F.; Knight, A. G. y Lynn, K. R. (1971). A sex pheromone in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Can. Entomol.*, 103: 18-22.
- Bauer, R.; Haribal, M.; Renwick, A. y Städler, E. (1996). Contact chemoreception related to oviposition behavior in the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. *Resúmenes 13th Annual Meeting, International Society of Chemical Ecology*, p. 182.
- Bertram, D. S. (1971). Attraction of Triatominae bugs vectors of Chagas' disease to betalights. *Nature*, 231: 268.

- Borden, J. (1977). Behavioral responses of coleoptera to pheromones, allomones and kairomones. *Chemical Control of Insect Behavior: Theory and Application*. Editado por Shorey y McKelvey. pp. 169-198. Willey & Sons, New York. Citado por Borden (1985).
- 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.
- Brossut, R. (1970). L'interattraction chez *Blaberus craniifer* Burm. (Insecta, Dictyoptera): Sécrétion d'une phéromone par les glandes mandibulaires. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270: 529-543.
- Butler, C. G., Fletcher, D. J. y Watler, D. (1969). Nest-entrance marking with pheromones by the honeybee *Apis mellifera* L., and a wasp, *Vespula vulgaris* L.. *Animal Behaviour*, 17, 142-147.
- Byrne, K. J.; Swigar, A.; Silverstein, R.; Borden, J. H. y Stokkink, E. (1974). Sulcatol: population aggregation pheromone in scolytid beetle, *Gnathotrichus sulcatus*. *J. Insect Physiol.*, 20: 1895-1900. Citado por Borden (1985).
- Cruz-López, L.; Malo, E. A. y Rojas, J. C. (1993). Aggregation pheromone in five species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88: 535-539.

Cruz-López L. y Morgan, D. (1995). Chemical investigation of aggregation behaviour of *Triatoma* bugs (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Chemical Ecology*, 21: 2069-2078.

Chapman, R. F. (1982). *The insects. Structure and function*. Chapman R. F. (ed.), London, pp. 919.

de Brito Sanchez, G; Manrique, G. y Lazzari, C. (1995). Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): II. Electrophysiological correlates. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 90: 649-651.

Dethier, V. G. (1976). *The hungry fly*. Harvard University Press, Cambridge, Mass. and London. Citado por Chapman (1982).

Dicke, M. (1988). Microbial allelochemicals affecting the behavior of insects, mites, nematodes, and protozoa in different trophic levels. En: *Novel aspects of insect-plant interactions*. (Eds: Barbosa & Letourneau), pp. 125-163.

Dicke, M. y Sabelis, M. W. (1988). Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds?. *Functional Ecology*, 2: 131-139.

Dusenbery, D. B. (1992). *Sensory Ecology: how organisms acquire and respond to information*. Freeman W.H. (ed.), New York, USA, pp. 558.

- Eichler, S.; Reintjes, N.; Jung, M.; Yassin, A. F.; Schaal, K. P.; Junqueira, A.; Coura, J. R.; Schaub, G. A. (1996). Identification of bacterial isolates and symbionts from wild populations of *Triatoma infestans* and *T. sordida*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91 (Suppl.): 125.
- Eisner, T. E. y Kafatos, F. C. (1962). Defense mechanisms of arthropods. X. A pheromone in an aposematic distasteful insect. *Psyche*, 69: 53-61. Citado por Shorey (1973).
- Flores, G. B. y Lazzari, C. R. (1996). The role of the antennae in *Triatoma infestans*: orientation toward thermal sources. *J. Insect Physiol.*, 42: 433-440.
- Free, J.B. (1987). *Pheromones of social bees*. Chapman & Hall, London.
- Friend, W. G. y Smith, J. J. (1977). Factors affecting feeding by bloodsucking insects. *Ann. Rev. Entomol.*, 22: 309-331.
- Gagliardo, A. y Guilford, T. (1993). Why do warning-colored prey live gregariously ?. Proceedings of the Royal Society of London. *B-Biological Sciences*, 251: 69-74.
- Games, D. E.; Schofield, C. J. y Staddon, B. W. (1974). The secretion from Brindley's scent gland in Triatominae. *Ann. ent. Soc. Am.*, 67: 820.

- Gorla, D. E.; Jurberg, J.; Catalá, S. y Schofield, C. J. (1993). Systematics of *Triatoma sordida*, *T. guasayana* and *T. patagonica* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 88 (3): 379-385.
- Guerenstein, P. G. y Núñez, J. (1994). Feeding response of the haematophagous bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* to saline solution: a comparative study. *J. Insect Physiol.*, 40: 747-752.
- Hansen-Delkeskamp, E. (1992). Functional characterization of antennal contact chemoreceptors in the cockroach *Periplaneta americana*. An electrophysiological investigation. *J. Insect Physiol.*, 10: 813-822.
- Hartman, M. J.; Surfleet, J. A. y Hynes, C. D. (1978). Aggregation pheromone in the larvae of *Tipula simplex* Doane: mode of action and site of production (Diptera: Tipulidae). *Pan-Pac. Ent.*, 54: 305-310.
- Hawkins, A. D. y Myrberg, A. A. (1983). Hearing and sound communication under water. En: Lewis B. (ed.). *Bioacustics*, Academic Press, New York, pp. 347-405.
- Heifetz, Y. y Applebaum, S. (1996). Gregarious behaviour in locust nymphs is initiated by cuticular hydrocarbons and mediated

endocrine peptides. *Resúmenes 13th Annual Meeting, International Society of Chemical Ecology*, p. 14.

Hölldobler, B., Obermayer, E. O. y Wilson, E. O. (1992). Communication in the primitive cryptobiotic ant *Prionopelta amabilis* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Comparative Physiology A*, 170: 9-16.

Hölldobler, B. y Palmer, J. (1989a). A new gland in ants and the possible role in chemical communication. *Naturwissenschaften*, 76: 385-386.

Hölldobler, B. y Palmer, J. (1989b). Footprint glands in *Amblyopone australis* (Formicidae, Ponerinae). *Psyche*, 96: 111-121.

Ishii, S. y Kuwahara, Y. (1967). An aggregation pheromone of the German cockroach *Blattella germanica* L. (Orthoptera: Blattellidae). 1. Site of the pheromone production. *Appl. Ent. Zool.*, 2: 203-217. Citado por Borden (1985).

Ishii, S y Kuwahara, Y. (1968). Aggregation of german cockroach (*Blattella germanica*) nymphs. *Experientia*, 24: 88-89.

Ishii, S. (1970). An aggregation pheromone of the German cockroach *Blattella germanica* L. 2. Species specificity of the pheromone. *Appl. Ent. Zool.*, 5: 33-41. Citado por Borden (1985).

- Ishiwatari, T. (1976). Studies on the scent of stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae) II. Aggregation pheromone activity. *Appl. Ent. Zool.*, 11: 38-44.
- Jander, R. (1963). Insect orientation. *A. Rev. Entomol.*, 8: 95-114.
- Juárez, P. y Blomquist, G. (1993). Cuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans* and *T. mazzottii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106B (3): 667-674.
- Kauffmann, T. (1966). Observations on some factors which influence aggregation by *Blaps sulcata* (Coleoptera: Tenebrionidae) in Israel. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 59: 660-664. Citado por Borden (1985).
- Kitamura, C.; Koh, S. y Ishii, S. (1974). Possible role of feces for directional orientation of the German cockroach, *Blattella germanica* L. (Orthoptera: Blattellidae). *Ibid.*, 9: 271-272. Citado por Rust y Appel (1984).
- Lake, P. y Friend, W. G. (1968). The use of artificial diets to determine some of the effects of *Nocardia rhodnii* on the development of *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol.*, 14: 543-562.
- Lazzari, C. R. (1991a). Circadian rhythm of egg hatching in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. med. Ent.*, 28: 740-741.

- Lazzari, C. R. (1991b). Temperature preference in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. ent. Res.*, 81: 273-276.
- Lazzari, C. R. (1992). Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Insect Physiol.*, 38: 895-903.
- Lazzari, C. R. y Núñez, J. A. (1989). The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distant sources in *Triatoma infestans*. *J. Insect Physiol.*, 35: 525-529.
- Lehane, M. J. y Schofield, C. J. (1982). Flight initiation in *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. ent. Res.*, 72: 497-510.
- Lent, H. y Wygodzinsky, P. (1979). Revision of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' Disease. *Bull Amer Museum Natural History, New York*, Vol. 163, article 3, p. 123-524.
- Levinson, H. Z. y Bar Ilan, A. R. (1971). Assembling and alerting scents produced by the bedbug *Cimex lectularius* L. *Experientia*, 27: 102-103.
- Lockwood, A. y Story, R. (1985). Bifunctional pheromone in the first instar of the southern stink bug, *Nezara viridula* (L) (Hemiptera:

- Pentatomidae): Its characterization and interaction with other stimuli. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 78: 474-479.
- Lorenzo Figueiras, A. N. y Lazzari, C. R. (1996). Intra- and Interspecific responses to aggregation cues in three species of Triatominae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91 (Suppl), p. 135.
- Lorenzo Figueiras, A. N.; Kenigsten, A. y Lazzari, C. R. (1994). Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: chemical signals and temporal pattern. *J. Insect Physiol.*, 40: 311-316.
- Lorenzo, M. G. (1997). Factores que afectan la distribución espacial de la vinchuca *Triatoma infestans* y búsqueda de nuevas herramientas para su control. PhD Thesis. Universidad de Buenos Aires pp. 117.
- Lorenzo, M. G. y 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: 903-907.
- Manrique, G. y Lazzari, C. R. (1994). Sexual Behaviour and Stridulation during Mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89: 629-633.

- Manrique, G. y Lazzari, C. R. (1995). Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): I. Behavioural Evidence, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 90: 645-648.
- Manrique, G. (1997). Comportamiento sexual y comunicación intraespecífica en la vinchuca *Triatoma infestans*. PhD Thesis. Universidad de Buenos Aires, pp. 124.
- Melber, A. (1982). Artspezifische olfaktorische Orientierung im Nahbereich bei der Aggregationsbildung von *Dysdercus*-Larven (Heteroptera: Pyrrhocoridae). Dipl., Univ. Würzburg.
- Neves, D. P. y Paulini, E. (1981). Atração sexual em *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) por feromônio. *Rev. bras. Ent.*, 25: 301-306.
- Neves, D. P. y Paulini, E. (1982). Repelência entre *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans* e *T. sordida* (Hemiptera, Reduviidae), por ação de feromônio. *Revta. bras. Ent.*, 26: 349-354.
- Norris, M. J. (1970). Aggregation response in ovipositing females of the desert locust, with special reference to the chemical factor. *J. Insect Physiol.*, 16: 1493-1515.
- Núñez, J. A. y Lazzari, C. R. (1990). Rearing of *Triatoma infestans* Klug (Heteroptera: Reduviidae) in the absence of a live host. I.

- Some factors affecting the artificial feeder. *Journal of Applied Entomology*, 109: 87-92.
- Núñez, J. A. y 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. (1987). Behaviour of Triatominae bugs. En Brenner & Stoka (eds.). *Chagas' Disease Vectors*, CRC Press, Florida, vol II, pp. 1-28.
- Ondarza, R. N.; Gutierrez-Martinez, A. y Malo, E. A. (1986). Evidence for the presence of sex and aggregation pheromones from *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Econom. Entomol.*, 79: 688-692.
- Osgood, C. E. (1971). An oviposition pheromone associated with the egg rafts of *Culex tarsalis*. *J. Econ. Entomol.*, 64: 1038-1041. Citado por Shorey (1973).
- Otte, D. (1974). Effects and functions in the evolution of signaling systems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5: 385-417.
- Owen, W. B. (1963). The contact chemoreceptor organs of the mosquito and their function in feeding behaviour. *J. Insect Physiol.*, 9: 73-87.

- Pitman, G. B. y Vité, J. P. (1969). Aggregation behavior of *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae) in response to chemical messengers. *Can. Entomol.*, 101: 143-149.
- Pitman, G. B. ;Vité, J. P; Kinzer, G. y Fentiman A. (1969). Specificity of population-aggregating pheromones in *Dendroctonus*. *J. Insect Physiol.*, 15: 363-366.
- Ribeiro, J. M. C. (1987). Role of saliva in blood-feeding arthropods. *Annual Review of Entomology*, 32: 463-478. Citado por Schofield (1994).
- Roces, F y 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. (1991). Feromonas de agregación y conducta sexual en algunas especies mexicanas de *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae). *Bol. Soc. Mex. Entomol.*, 9: 28-33.
- Rojas, J. C. y Cruz-López, L. (1994). Factores que afectan la respuesta de *Triatoma mazzottii* a la feromona de agregación en laboratorio. *Southwestern Entomologist*, 19: 393-401.

- Rojas, J. C.; Ramirez-Rovelo, A. y Cruz-López, L. (1991). Search for a sex pheromone in *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.*, 28: 469-470.
- Rossiter, M. y Staddon, B. W. (1983). 3-Methyl-2hexanone from the triatominae bug *Dipetalogaster maximus* (Uhler) (Heteroptera; Reduviidae). *Experientia*, 39: 380-381.
- Roth, L. M. y Cohen, S. (1973). Aggregation in Blattaria. *Ann. Entomol. Soc. America*, 66: 1315-1323.
- Sauphanor, B. y Sureau, F. (1993). Aggregation behaviour and interspecific relationships in Dermaptera. *Oecologia*, 96: 360-364.
- Schmuck, R. (1987). Aggregation of the fire bug, *Pyrrhocoris apterus*, with special reference to its assembling scent. *Entomol. Gener.*, 12: 155-169.
- Schofield C. J. (1994). Triatominae. *Biología y Control*, pp. 76.
- Schofield, C. J. y 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. (1975). The behavioural biology of Triatominae, with special reference to intraespecific communication mechanisms. Ph.D. thesis, Univ. London, pp. 326.

- Schofield, C. J. (1979). The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): A review. *Bull. Entomol. Res.*, 69: 363-379.
- Schofield, C. J. y Patterson, J. W. (1977). Assembly pheromone of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* nymphs (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.*, 13: 727-734.
- Settembrini, B. P. (1984). Circadian rhythms of locomotion activity in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.*, 21: 204-212.
- Shannon, C. E. y Weaver, W. (1949). *The mathematical theory of communication*. Univ. of Illinois Press, Urbana. Citado por Dusenbery (1992).
- Shorey, H. H. (1973). Behavioral responses to insect pheromones. *Ann. Rev. Entomol.*, 18: 349-380.
- Sokal, R. y Rohlf, F. J. (1981). *Biometry*. Freeman & Co. San Francisco, CA.
- Stoffolano, J. G.; Schaubert, E.; Yin, C.; Tillman-Wall, J. A. y Blomquist, G. J. (1997). Cuticular hydrocarbons and their role in copulatory behavior in *Phormia regina*. En prensa.
- Taneja de Bruyne, J. (1996). Sensory and behavioural responses of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* to vertebrate odours

and to volatiles from triatomine faeces. PhD Thesis. Université de Neuchâtel.

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

Vité, J. P. y Renwick, A. A. (1971). Population aggregating pheromone in the bark beetle, *Ips grandicollis*. *J. Insect Physiol.*, 17: 1699-1704.

Vité, J. P. (1965). Die Wirkung pflanzer- und insekteneigener Lockstoffe auf *Pityophthorus* und *Pityogenes* (Coleoptera: Scolytidae). *Naturwissenschaften*, 52: 267.

Walgenbach, C. A.; Phillips, J. K.; Faustini, D. L. y Burkholder, W. E. (1983). Male-produced aggregation pheromone of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*, and interspecific attraction between three *Sitophilus* species. *J. Chemical Ecology.*, 9: 831-841.

Wiener, N. (1948). *Cybernetics*. Wiley, New York. Citado por Dusembery (1992).

Wigglesworth, V. B. y Guillelt, J. D. (1934). The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* and the mechanism of orientation to the host. *J. exp. Biol.*, 11: 120-139.

- Wigglesworth, V. B. (1972). *The principles of insect physiology*. Chapman and Hall, London.
- Wilson, E. O. (1975). *Sociobiology: the new syntesis*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass., USA, pp. 366.
- Winston, M. (1987). *The Biology of Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge, pp. 281.
- Woodrow, D. F. (1965). The responses of the African migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides* to the chemical composition of the soil at oviposition. *Anim. Behav.*, 13: 348-356. Citado por Chapman (1982).
- Zar, J. H. (1984). *Bioestatistical analysis*. Prentice-Hall, pp. 718.
- Zdarek, J. (1970). Mating behaviour in the bug *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera). *Behaviour*, 37: 253-368. Citado por Schmuck (1987).
- Zeledón, R. y Rabinovich, J. E. (1981). Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *A. Rev. Ent.*, 26: 101-133.