

Tesis Doctoral

Comunicación sexual en triatominos (Heteroptera: Reduviidae): claves químicas asociadas al vuelo y al apareamiento

Zacharias, Claudia Andrea

2011-03-21

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:

Zacharias, Claudia Andrea. (2011-03-21). Comunicación sexual en triatominos (Heteroptera: Reduviidae): claves químicas asociadas al vuelo y al apareamiento. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Zacharias, Claudia Andrea. "Comunicación sexual en triatominos (Heteroptera: Reduviidae): claves químicas asociadas al vuelo y al apareamiento". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011-03-21.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**COMUNICACIÓN SEXUAL EN TRIATOMINOS (HETEROPTERA:
REDUVIIDAE): CLAVES QUÍMICAS ASOCIADAS AL VUELO Y AL
APAREAMIENTO**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Autor: **CLAUDIA ANDREA ZACHARIAS**

Director de tesis: Dr. Gabriel Manrique
Consejero de estudios: Dr. Daniel Roccatagliata
Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología de insectos

2011



Triatoma infestans

**COMUNICACIÓN SEXUAL EN TRIATOMINOS (HETEROPTERA:
REDUVIIDAE): CLAVES QUÍMICAS ASOCIADAS AL VUELO Y AL
APAREAMIENTO**

Claudia A. Zacharias
2011



Rhodnius prolixus

COMUNICACIÓN SEXUAL EN TRIATOMINOS (HETEROPTERA: REDUVIIDAE): CLAVES QUÍMICAS ASOCIADAS AL VUELO Y AL APAREAMIENTO

Resumen

Se analizó el papel de las claves químicas en la comunicación sexual de las vinchucas *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*. Se evaluó la existencia de claves químicas que fueran capaces de disparar el vuelo en *R. prolixus* en el contexto sexual. Las observaciones del comportamiento de vuelo mostraron que una corriente de aire limpio es suficiente para orientar el inicio del vuelo de hembras y machos. El agregado de olores de hembras a dicha corriente provocó un incremento en la frecuencia de activación de vuelo de machos. Se analizó la fuente de las claves químicas que promovían el vuelo de los machos por medio de oclusiones alternadas de las glándulas de Brindley y/o metasternales. La oclusión de las glándulas metasternales de las hembras implicó un descenso en los niveles de vuelo de los machos. Además, los extractos naturales de estas glándulas promovieron el vuelo de los machos demostrando su relevancia en la estimulación del vuelo, lo que sugiere un posible papel en la comunicación sexual de *R. prolixus*. Los volátiles de las glándulas metasternales de la hembra fueron puestos a prueba sobre la antena de machos de *R. prolixus* y *T. infestans* por medio de cromatografía gaseosa acoplada a electroantografía (CG-EAG). La estimulación de las antenas de machos de *R. prolixus* mostró que responde al 2-metil-3-buten-2-ol, 2-metil-1-butanol y (2S)-pentanol. En *T. infestans* las antenas de los machos sólo respondieron consistentemente a la 3-pentanona. La presentación de volátiles de 2-metil-1-butanol estimuló el vuelo de machos de *R. prolixus* del mismo modo que lo hicieron las hembras presentadas como estímulo. Finalmente, se exploró la función de los lípidos cuticulares en la comunicación sexual de *T. infestans*. La remoción de estos compuestos en las hembras implicó una reducción de los intentos de cópula de los machos. Los machos mostraron una recuperación de los intentos de cópula cuando se reconstituyó artificialmente dichos lípidos sobre la cutícula de las hembras.

Palabras Clave

Triatominae, comportamiento sexual, comunicación química, feromonas, vuelo, electrofisiología, Mal de Chagas.

SEXUAL COMMUNICATION IN TRIATOMINES (HETEROPTERA: REDUVIIDAE): CHEMICAL CUES ASSOCIATED WITH FLIGHT AND MATING

Abstract

The role of chemical cues in the sexual communication of the kissing bug *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* was analysed. Chemical cues capable of triggering flying behaviour of *R. prolixus* were evaluated in the sexual context. Observations of flying behaviour showed that a clean airstream guides the takeoffs of males and females by itself. The addition of odors of females to this airstream caused an increase in the frequency of flight activation of males. The source of the chemical cues that promoted takeoffs in males was analysed by alternate occlusion of Brindley and metasternal glands orifices. Metasternal gland occlusion caused a decrease of flight activity in males. Besides, metasternal natural extracts promoted takeoff activity in males revealing their relevance in promoting the males flight behaviour and suggesting their participation in the sexual communication of *R. prolixus*. Antenna of *R. prolixus* and *T. infestans* males were stimulated with metasternal glands volatiles of females by using electrophysiological techniques. Antenna of males of *R. prolixus* responded to 2-methyl-3-buten-2-ol, 2-methyl-1-butanol and (2S)-pentanol. Antenna of males of *T. infestans* responded to 3-pentanone. The presentation of 2-methyl-1-butanol volatiles stimulated the flight of males of *R. prolixus* in the same way as the females presented as stimulus did. Finally, we explored the role of cuticular lipids in the sexual communication of *T. infestans*. The removal of these compounds in females resulted in a reduction of mating attempts by males. Males showed a recovery of copulation attempts when these lipids were artificially reconstituted on the cuticle of females.

Keywords

Triatominae, sexual behaviour, chemical communication, pheromones, flight, electrophysiology, Chagas disease.

Agradecimientos

A mi director Gabriel Manrique, por la libertad ofrecida, la paciencia y las discusiones que le dieron forma a este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio: Alicia, Flor, Rulo, Gina, Carmen, Pablo, Seba y Romina, por hacer del laboratorio un lugar donde se aprende, por los consejos y aportes que siempre están dispuestos a dar y por el aguante de todos los días.

A Gina B. Pontes, amiga y compañera, con quien trabajé mano a mano durante la construcción de este proyecto.

A Seba, Nora y Ali por su invaluable ayuda en la lectura crítica de esta Tesis.

A Flor y Rulo por las largas charlas con las que queremos salvar al mundo.

A mis amigos: *Ale*, por tu apoyo incondicional siempre; *Naty*, porque somos familia; *Martín* por tus toques de gurú; *Uri*, por los recitales de los '90; *Dani*: por tus pilas; *Eze*, por el empujón a la independencia; *Diego*: volvé; *Manu*: por tus frases que todavía recuerdo; *Romi*: por ser una persona fabulosa; *Ale*: por tus visitas express.

A mis abuelos, porque me gustaría que estuvieran acá.

A mis padres, Miguel y Susana, por ser un ejemplo de perseverancia, por haberme dado siempre la posibilidad de estudiar y por enseñarme a llegar (hasta acá); y Dani, hermanito... hermanote.

Al Servicio Nacional de Chagas, Córdoba, por la provisión constante de vinchucas.

A las distintas entidades que otorgaron los subsidios, becas y cargos docentes necesarios para el desarrollo de este Tesis: UBACyT, Universidad de Buenos Aires, CONICET, CAPES/SECyT, ANPCyT, UNDP/World Bank/WHO.

Al Programa de Cooperación Internacional CAPES/SECyT por haberme permitido realizar una estadía de investigación en el Centro de Pesquisa René Rachou de la Fundación Oswaldo Cruz en Belo Horizonte, Brasil, donde realicé parte del trabajo de Tesis junto con Gina Pontes, Ana C. Vitta y Marcelo Lorenzo.

Al programa de becas de la International Foundation of Science por haberme dado la posibilidad de realizar cursos internacionales con temática relacionada con esta Tesis.

A toda mi familia

ÍNDICE

Resumen en español.....	6
Resumen en inglés.....	7

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. COMUNICACIÓN QUÍMICA

- 1.1. Comunicación química entre organismos	12
- 1.2. Quimiorrecepción en insectos	13
- 1.3. Respuesta comportamental	15
- 1.4. El comportamiento sexual y la comunicación química entre sexos en insectos.....	16

2. GENERALIDADES DE LOS TRIATOMINOS

- 2.1. Importancia epidemiológica de triatominos	17
- 2.2. Hábitos de los triatominos	19
2.2.1. Comportamiento y hábitos de <i>Triatoma infestans</i>	21
2.2.2. Comportamiento y hábitos de <i>Rhodnius prolixus</i>	23
- 2.3. Comunicación química en triatominos	25
2.3.1. El comportamiento y la comunicación química entre sexos en triatominos.....	26
2.3.2. Las glándulas exocrinas de los triatominos.....	31
2.3.3. Morfología, localización y composición química de las secreciones de las glándulas de Brindley y metasternales	33

3. RELEVANCIA DE ESTE TRABAJO.....

Objetivo General	41
Objetivos Particulares.....	41

Capítulo 2. INICIO DEL VUELO EN EL CONTEXTO SEXUAL

INTRODUCCIÓN

- 1. Evidencias sobre comunicación sexual en <i>Rhodnius prolixus</i> y <i>Triatoma infestans</i>	44
- 2. El vuelo en triatominos	45

- 3. Factores implicados en la orientación del vuelo de triatominos	47
Parte I: VUELO EN PRESENCIA DE UNA CORRIENTE DE AIRE.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS	
- Animales.....	49
- Diseño experimental.....	50
- Análisis estadístico.....	55
PROCEDIMIENTOS PARTICULARES Y RESULTADOS	
- 1. Reconocimiento químico del sexo opuesto: activación y orientación del inicio de vuelo en <i>Rhodnius prolixus</i>	57
Resultados.....	58
Modulación temporal de la respuesta.....	61
- 2. Papel de las glándulas metasternales y de Brindley de las hembras sobre la activación del inicio del vuelo de los machos	62
Resultados.....	64
- 3. Respuesta de machos de <i>R. prolixus</i> a extractos de glándulas metasternales de hembras	67
Obtención de las muestras.....	67
Procedimiento.....	70
Resultados.....	71
Parte II: VUELO EN AUSENCIA DE CORRIENTE DE AIRE	74
MATERIALES Y MÉTODOS	
- Insectos.....	76
- Dispositivo experimental.....	76
- Análisis estadístico.....	78
RESULTADOS.....	80
DISCUSIÓN.....	83

Capítulo 3. RESPUESTAS ELECTROFISIOLÓGICAS Y COMPORTAMENTALES DE LOS MACHOS A OLORES DE HEMBRAS

PARTE I: Análisis electrofisiológicos

INTRODUCCIÓN

- Recepción quimio-sensorial en insectos	91
- El registro de la recepción sensorial.....	94
- Cromatografía Gaseosa.....	98
- Microextracción en fase sólida (SPME).....	101
- Inyección de la muestra.....	102
- Cromatografía gaseosa acoplada a electroantenodetección (CG-EAD).....	102
- Productos de las glándulas metasternales de las vinchucas.....	105

MATERIALES Y MÉTODOS

- Animales	109
- Obtención de las muestras de glándulas metasternales de hembras de <i>Triatoma infestans</i> y <i>Rhodnius prolixus</i>	109
- Identificación de compuestos individuales de glándulas metasternales de hembras que evocan respuestas electrofisiológicas en las antenas de los machos	110
- Identificación química de los compuestos glandulares de hembras.....	114

RESULTADOS

Identificación de compuestos individuales de glándulas metasternales de hembras que evocan respuestas electrofisiológicas en las antenas de los machos	
<i>Triatoma infestans</i>	115
<i>Rhodnius prolixus</i>	118

PARTE II: Análisis comportamental

INTRODUCCIÓN.....	122
-------------------	-----

MATERIALES Y MÉTODOS

- Animales.....	125
- Series experimentales.....	126
- Análisis estadístico.....	127

RESULTADOS

Identificación de compuestos volátiles individuales presentes en las glándulas metasternales de las hembras de <i>Rhodnius prolixus</i> que promueven el vuelo de machos	128
--	-----

DISCUSIÓN.....	131
----------------	-----

Capítulo 4. PAPEL DE LOS LÍPIDOS CUTICULARES EN EL COMPORTAMIENTO SEXUAL EN *TRIATOMA INFESTANS*

INTRODUCCIÓN

- La cutícula de los insectos.....	134
- Comunicación química de contacto en insectos.....	136
- La cutícula de triatominos	138
- Comportamiento de apareamiento en triatominos.....	139

MATERIALES Y MÉTODOS

- Animales.....	141
- Diseño experimental	141
- Series experimentales.....	143
- Análisis de datos.....	145

RESULTADOS.....	146
-----------------	-----

DISCUSIÓN.....	151
----------------	-----

Capítulo 5. CONCLUSIONES FINALES..... 154

BIBLIOGRAFÍA..... 161

CAPÍTULO 1

Introducción general

La ciencia está construida en base a hechos, como una casa está construida de piedras; pero una acumulación de hechos no hace a la ciencia del mismo modo que una acumulación de piedras no hace a una casa.

Henri Poincaré, *Science and Hypothesis*, 1905.

1. COMUNICACIÓN QUÍMICA

1.1. Comunicación química entre organismos

A lo largo de la evolución los insectos y otros animales desarrollaron mecanismos de comunicación química característicos, utilizados para la transferencia de información entre individuos de la misma especie. Para esto es imprescindible un flujo de información que involucre la interacción entre una fuente (el emisor) y un receptor. Entre ambos existe un canal de transmisión, o sea, un medio disponible por el cual la información es transmitida. Para que suceda la transmisión de información, el organismo receptor debe ser capaz de reconocer las señales emitidas por el emisor (Dusenbery, 1992). Hablamos, entonces, de comunicación química cuando la transmisión de información se realiza mediante la emisión de compuestos químicos desde la fuente hacia el receptor a través del canal químico de comunicación.

Los estímulos químicos son considerados una de las principales señales que utilizan los insectos para llevar a cabo actividades cruciales para la supervivencia, como la búsqueda de alimento, de pareja o de sitios de oviposición, entre otros. Las señales químicas participan en la mediación de los procesos fisiológicos y comportamentales y se clasifican según la funcionalidad y el beneficio conferido durante la transferencia de información. Dicke y Sabelis (1988) definen a un *semioquímico* o *infoquímico* como una sustancia química que transporta información de un organismo a otro de la misma o de diferente especie agrupándolos en: *feromonas* y *aleloquímicos*. Las *feromonas* son señales químicas que median interacciones entre individuos de la misma especie, donde el receptor, el emisor o ambos son los beneficiados (Dusenbery, 1992). Dentro de esta categoría existe una gran diversidad de sustancias que de acuerdo a su función pueden distinguirse en feromonas sexuales (median la atracción entre machos y hembras) (Karlson y Butenandt, 1959), de

agregación (promueven el acercamiento entre individuos), de alarma (generan un estado de alerta frente a alguna forma de peligro), de marcado de sendero (demarcan el camino hasta una fuente de alimento), de oviposición (indican la existencia de un lugar donde fueron depositados los huevos de una determinada especie) (Hubbard *et al.*, 1987), entre otros. Por otra parte, los *aleloquímicos* median interacciones entre individuos de especies diferentes o interespecíficas, que pueden resultar más o menos favorables para el emisor o para el receptor (*e.g.*, kairomonas, alomonas, sinomonas). Se requiere, entonces, un profundo conocimiento de la actividad biológica de las especies actuantes y del contexto comportamental para alcanzar una correcta consideración de la funcionalidad y del valor adaptativo de un aleloquímico.

1.2. Quimiorrecepción en insectos

Los insectos dependen sustancialmente del olfato para desempeñar sus actividades comportamentales. Los olores son utilizados para la localización de las presas u hospedadores y también en la defensa, la selección de plantas o lugares para oviponer, en la búsqueda de un compañero sexual, en los procesos de cortejo y apareamiento o en la organización de las actividades sociales (Birch y Haynes, 1982). Los insectos, al igual que la mayoría de los animales, adquieren la información del medio que los rodea a través de sus órganos sensoriales. La unidad estructural y funcional básica de recepción mecano- o quimiosensorial en los insectos es la *sensilia* (Chapman, 1998). Las sensilias se pueden encontrar en cualquier parte del cuerpo de un insecto, aunque se concentran especialmente en los apéndices, generalmente en las patas, los cercos del abdomen, los palpos de la cabeza y particularmente en las antenas, donde se pueden encontrar en grandes densidades. La antena de los insectos es, entonces, el principal órgano responsable de la percepción de olores. Los diferentes tipos de sensilias de diversas modalidades (mecano-, quimio-, termo-higrorreceptoras) se caracterizan por una porción cuticular, que varía ampliamente en cuanto a su forma y dimensiones,

asociada a una o más células receptoras o sensoriales y pueden tener ninguno, uno o múltiples poros distribuidos en su superficie (Fig 1.1). Cada sensilia olfativa contiene una o más células receptoras y tres células auxiliares, llamadas tricógenas, tormógenas y tecógenas. Las moléculas de olor pasan a través de los poros de la cutícula a la linfa de la sensilia y se unen a proteínas solubles que las transportan hasta receptores de la membrana de las dendritas (Kaissling, 1987; Nation, 2002). En las dendritas, las moléculas de olor son reconocidas por las proteínas receptoras. La conformación de la proteína receptora es alterada por la ligadura de la molécula de olor, que conduce a la apertura de los canales de sodio en la membrana de la célula nerviosa y desencadena potenciales de acción que transportan la información al sistema nervioso central (Chapman, 1998).

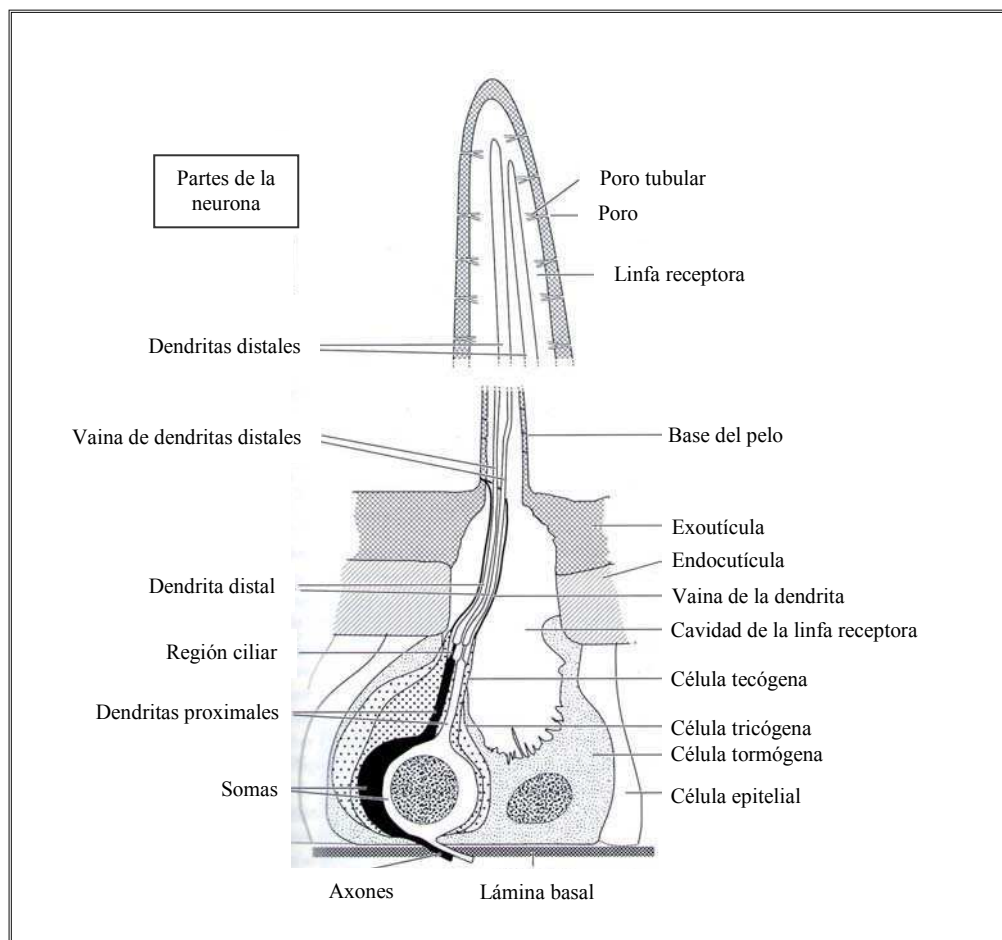


Figura 1.1. Sensilia olfativa de insecto. La parte terminal del pelo se muestra aumentada para mostrar los poros (modificado de Chapman, 1998).

1.3. Respuesta comportamental

La recepción de un estímulo puede desencadenar comportamientos de reconocimiento y localización de la fuente emisora. El animal que recibe una señal y es afectado por ésta, puede modificar su actividad general o sólo permanecer en alerta a la aparición de otras señales. La relevancia y/o la persistencia de una fuente de estimulación podrían desencadenar un comportamiento de orientación (atracción, repelencia o menotaxia) hacia la fuente, así como también no generar respuesta alguna. Los comportamientos de atracción suelen estar presentes en situaciones de búsqueda a mediana y larga distancia de estímulos positivos, en donde las claves químicas desempeñan un papel importante.

La detección de un estímulo puede ser utilizado como una guía para orientarse y alcanzar la fuente de dicho estímulo mediante mecanismos que pueden agruparse en *kinesis* y *taxias*. Las *kinesis* implican que el organismo responde con una variación en la velocidad de desplazamiento en función de la intensidad del estímulo (*e.g.*, concentración de un compuesto químico), mientras que las *taxias* comprenden a los comportamientos de orientación cuya respuesta del organismo depende de la dirección del estímulo. Las *taxias* pueden estar condicionadas según la modalidad del estímulo, como la *quimiotaxis*, *termotaxis* o *fototaxis* que implican respuestas guiadas por señales químicas, térmicas o lumínicas, respectivamente. La *quimiotaxis*, particularmente, implica que el animal orienta el eje de su cuerpo en dirección a la fuente de estímulo, debido a que puede percibir el gradiente de olor. Otra *taxia*, como la *anemotaxis*, se refiere a la respuesta orientada de un animal en respuesta a la presencia de una corriente de aire. La corriente de aire puede funcionar como transportador de olores que sensibiliza al insecto y podría causar que éste se oriente a favor (*anemotaxis* positiva) o en contra (*anemotaxis* negativa) del sentido de la corriente. La mayoría de los organismos son capaces de emplear más de una de estas estrategias, *i.e.*, *kinesis* y/o *taxias*, de forma

combinada, que dependen de las circunstancias y del contexto (Dusenbery, 1992; Bell *et al.*, 1995).

1.4. *El comportamiento sexual y la comunicación química entre sexos en insectos*

El comportamiento sexual de los insectos puede ser dividido en diferentes fases sucesivas entre las que se reconocen: 1) atracción a larga distancia (*e.g.*, vuelo orientado por corrientes modulado por olores), 2) atracción a corta distancia, 3) comportamiento de cortejo, 4) cópula y 5) interacción post-cópula, *i.e.*, permanencia del macho junto a la hembra durante un tiempo indeterminado, probablemente para prevenir posteriores cópulas de la hembra con otros machos (Groot, 2000). Las distintas especies de insectos no siempre despliegan todas las fases, por ejemplo, las especies gregarias no precisan atraer a individuos del sexo opuesto a larga distancia. Cuando los adultos no se distribuyen próximos unos con los otros, uno de los sexos puede utilizar distintas vías de comunicación (*e.g.*, química, visual o auditiva) durante la búsqueda de pareja (Lewis, 1984). Habitualmente, es uno de los sexos el que emite la señal para atraer al sexo opuesto y son las señales químicas las más efectivas para atraer a las parejas sexuales a distancia y para promover la cópula (Cardé y Bell, 1995; Cardé y Minks, 1997).

La comunicación química no es la única modalidad utilizada para la comunicación entre sexos pero ésta es ampliamente utilizada durante el comportamiento reproductivo de muchas especies. Los machos y hembras de diversas especies de insectos se comunican previamente o durante el apareamiento mediante la liberación de compuestos volátiles. La sustancia o mezcla de sustancias químicas que son secretadas al exterior por individuos de un sexo y que desencadenan respuestas de comportamiento sexual en otro individuo receptor del sexo opuesto son llamadas *feromonas sexuales* (Karlson y Lüscher, 1959). Las feromonas son vitales en la comunicación entre los individuos de una misma especie y las respuestas de los

insectos a estos compuestos son robustas y estables. Estas sustancias son capaces de modificar el comportamiento del insecto y son utilizadas con frecuencia en el manejo y la regulación de poblaciones de insectos plaga. Las feromonas sexuales responsables por la orientación a distancia fueron primeramente descritas e identificadas químicamente en lepidópteros (Butenandt *et al.*, 1959) y actualmente son utilizadas para monitorear plagas agrícolas (Minks y Van Deventer, 1992; Cardé y Minks, 1997).

La producción y liberación de las feromonas sexuales desde los individuos emisores y las respuestas correspondientes de los insectos receptores dependen de la edad, el estado reproductivo, tiempo de ayuno o, incluso, de factores ambientales (McNeil, 1991; Raina *et al.*, 1992; 1994; Landolf y Philips, 1997). Por ejemplo, las hembras podrían liberar una feromona solamente al encontrar suficiente disponibilidad de alimento para la prole y coordinar así su comportamiento reproductivo (Raina *et al.*, 1992). La mayoría de las feromonas que han sido identificadas fueron estudiadas en lepidópteros y son, usualmente, secretadas por las hembras (Tamaki, 1985).

2. GENERALIDADES DE LOS TRIATOMINOS

2.1. Importancia epidemiológica de triatominos

La subfamilia Triatominae (Orden: Heteroptera, Familia: Reduviidae) incluye 141 especies descritas agrupadas en 18 géneros (Galvão *et al.*, 2003; Forero *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006; Costa y Felix, 2007; Sandoval *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2007; Bérenger y Blanchet, 2007) con tamaños que varían en el adulto desde 5 hasta 45 mm.

Los triatominos son insectos paurometábolos, *i.e.*, sus larvas son morfológicamente muy similares a los adultos, aunque de menor tamaño, sin alas y con un sistema reproductor inmaduro, y con los cuales comparten hábitat y nicho trófico. La mayoría de las especies de

vinchucas, nombre con el que comúnmente se conoce en Argentina a los triatominos, se alimentan de sangre de vertebrados endotermos, con quienes conviven en cercana relación ya que pueden habitar en los mismos ambientes. Existen excepciones a esta generalidad, como *Triatoma pseudomaculata* a la que se ha reportado alimentándose de la hemolinfa de la cucaracha *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) (Pontes *et al.*, 2005) o *Dipetalogaster maximus* y *Triatoma guasayana*, que se alimentan también de sangre de reptiles (Carcavallo *et al.*, 1998).

Se ha comprobado que más de la mitad de las especies de triatominos pueden ser vectores del protozooario parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la enfermedad de Chagas (Chagas, 1909; Lent y Wygodzinsky, 1979; Zeledón y Rabinovich, 1981; Schofield y Dolling, 1993) también conocida como tripanosomiasis americana. Esta enfermedad se encuentra catalogada por la Organización Mundial de la Salud (WHO) como la tercera enfermedad más importante en Sudamérica, Centro América y Méjico. Actualmente existen entre 6 y 9 millones de personas infectadas con este parásito y se estima que alrededor de 75 millones se encuentran en áreas de riesgo de transmisión (WHO, 2006; Ghul, 2007; Coura y Dias, 2009). En la República Argentina la zona endémica para esta enfermedad se extiende desde el norte del país hasta el norte de la provincia de Chubut (Guhl, 2007; Salvatella, 2007). Esta tripanosomiasis es la principal endemia de nuestro país y alrededor del 8% de la población está infectada. Las especies de triatominos de mayor importancia epidemiológica son aquellas que colonizan fácilmente las viviendas humanas, ya que ocupan grietas, hendiduras en las paredes y techos de las casas rurales. Las especies silvestres se encuentran usualmente en nidos de aves o refugios de animales tales como marsupiales, roedores y murciélagos (Carcavallo *et al.*, 1998). Existen varias vías de transmisión del parásito, entre las cuales se incluye la vía vectorial, la transplacentaria y amamantamiento, transfusión de sangre contaminada, trasplante de

órganos o contaminación accidental en el laboratorio. La transmisión vectorial responde al 80% de los casos conocidos de la enfermedad en zonas rurales de América Latina (Dias, 1987) y ocurre por medio del contacto de las heces del triatomino, cuando contiene al parásito en la etapa de tripomastigote metacíclico, con las mucosas o la sangre del hospedador endotermo. El contagio por vía vectorial usualmente ocurre durante la picadura de alimentación del insecto (Chagas, 1909; Zeledón y Rabinovich, 1981). No existen vacunas ni tratamientos que permitan curar a los pacientes luego del establecimiento definitivo de la enfermedad. El control de los insectos vectores es, por lo tanto, la principal herramienta que permite evitar el modo de transmisión más frecuente. En la actualidad, la detección de las vinchucas en el campo se basa en la inspección manual con la ayuda de desalojantes químicos y en la utilización de dispositivos o sensores que ofrecen refugio a los insectos (Schofield, 1994; Gürtler *et al.*, 1999). Estos dispositivos están diseñados para detectar alguna señal de la presencia de vinchucas, tales como los excrementos, las exuvias o los huevos. Si estos indicadores revelan la presencia de vinchucas, se procede a la fumigación de las viviendas con piretroides de baja toxicidad para el ser humano.

2.2. Hábitos de los triatominos

La mayor parte de las especies de triatominos ocupan ambientes silvestres y algunas de ellas invadieron las viviendas humanas y contribuyen así a la transmisión del parásito al ser humano (Schofield, 1994; Carcavallo *et al.*, 1998). Varias especies incluyen al hombre dentro de su grupo de hospedadores, tales como *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus megistus* y *Rhodnius prolixus* como las comúnmente encontradas en el interior o en los alrededores de los domicilios humanos (Fig. 1.2).

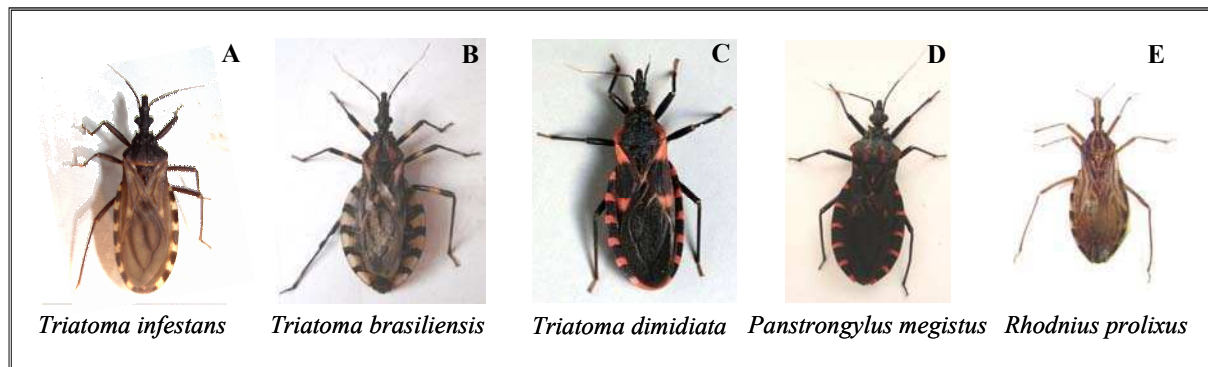


Figura 1.2. Especies de triatominos que comúnmente se encuentran en el interior de las viviendas humanas en América Latina. **A)** En Argentina, Paraguay, Bolivia, Chile; **B)** En Brasil; **C)** En América Central, Ecuador; **D)** En Brasil y **E)** En Venezuela, Colombia. (B, C y D gentileza Maria Angélica de Oliveira).

T. cruzi puede ser hallado en animales silvestres (e.g., zarigüeyas, zorrinos) y puede ser transmitido a estos ambientes por diversas especies de triatominos que cohabitan en sus madrigueras a través de sus heces manteniendo el ciclo silvestre o zoótico del parásito, sin participación del hombre (Lent y Wygodzinsky, 1979; Wisnivesky-Colli *et al.*, 1992; Schweigmann *et al.*, 1995; 1997; Rabinovich *et al.*, 2000).

El ciclo domiciliar de transmisión del parásito se desarrolla en el intradomicilio humano de áreas rurales o periurbanas donde los perros y otros animales domésticos pueden participar como reservorios del parásito transmitidos por vectores triatominos domiciliados (Gürtler *et al.*, 1991; Petersen *et al.*, 1991). Por su parte, el ciclo peridoméstico se desarrolla en el área peridomiciliaria (e.g., gallineros, corrales) e intervienen grandes cantidades de mamíferos domésticos y triatominos de varias especies. Este ciclo representa un nexo entre el ciclo domiciliar y el silvestre, favoreciendo entre ambos el intercambio de triatominos infectados (Bar *et al.*, 2002). La colonización por parte de los triatominos de las habitaciones humanas y del peridomicilio habría sido posterior al establecimiento silvestre del parásito y,

probablemente, haya ocurrido debido a la acción de invasión, reducción y degradación de los hábitats naturales de los triatominos por las poblaciones humanas. Esto contribuyó y aún contribuye a la estabilización de poblaciones de insectos en ambientes artificiales donde logran establecer colonias sustentadas por la gran oferta de alimento y refugio, y promover el ciclo doméstico del parásito (Wisnivesky-Colli, 1993).

Las vinchucas son, en su mayoría, de hábitos nocturnos y salen de sus refugios al comienzo de la noche (Lorenzo y Lazzari, 1996) en búsqueda de alimento que es obtenido con cierta facilidad debido a la habitual cercanía entre el refugio y el hospedador. Así, estos insectos realizan sus actividades durante el reposo de sus hospedadores con lo cual disminuyen la probabilidad de ser detectados evitando los comportamientos de acicalamiento y rechazo de la picadura o predación por parte de ellos. Muchas de sus actividades y procesos se presentan en ventanas acotadas en el tiempo a lo largo de la noche (escotofase), por ejemplo, la salida desde sus refugios y la búsqueda de alimento (Lorenzo y Lazzari, 1996), el inicio del vuelo (McEwen y Lehane, 1993), la dispersión (Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994), la oviposición (Constantinou, 1984; Ampleford y Davey, 1989), la preferencia por altas temperaturas (Lazzari, 1991; Minoli y Lazzari, 2003) y la atracción a luz beta (Bertram, 1971) tienen lugar durante las primeras horas de la noche. Especies como *T. infestans* mostraron su máxima motivación para caminar y la mayor sensibilidad de percepción del dióxido de carbono, señal asociada a la detección del hospedador, durante esta etapa de la noche (Lazzari, 1992; Barrozo y Lazzari, 2004b).

2.2.1. Comportamiento y hábitos de *Triatoma infestans*

La vinchuca *T. infestans*, debido a su amplia distribución (Fig. 1.3) y hábitos casi exclusivamente domésticos y peridomésticos, es el vector más importante de la enfermedad de Chagas del Cono Sur de América (Lent y Wygodzinsky, 1979; Zeledón y Rabinovich,

1981). Su principal fuente de alimento la constituyen mamíferos y aves. Aunque esta especie se encuentra casi exclusivamente asociada a las viviendas humanas, se conocen poblaciones silvestres en el valle de Cochabamba, en zona más extendidas de Bolivia (Dujardin *et al.*, 1987; Bermudez *et al.*, 1993; Noireau *et al.*, 2005) y en la región del Gran Chaco de Argentina (Schofield *et al.*, 2006; Noireau, 2009).

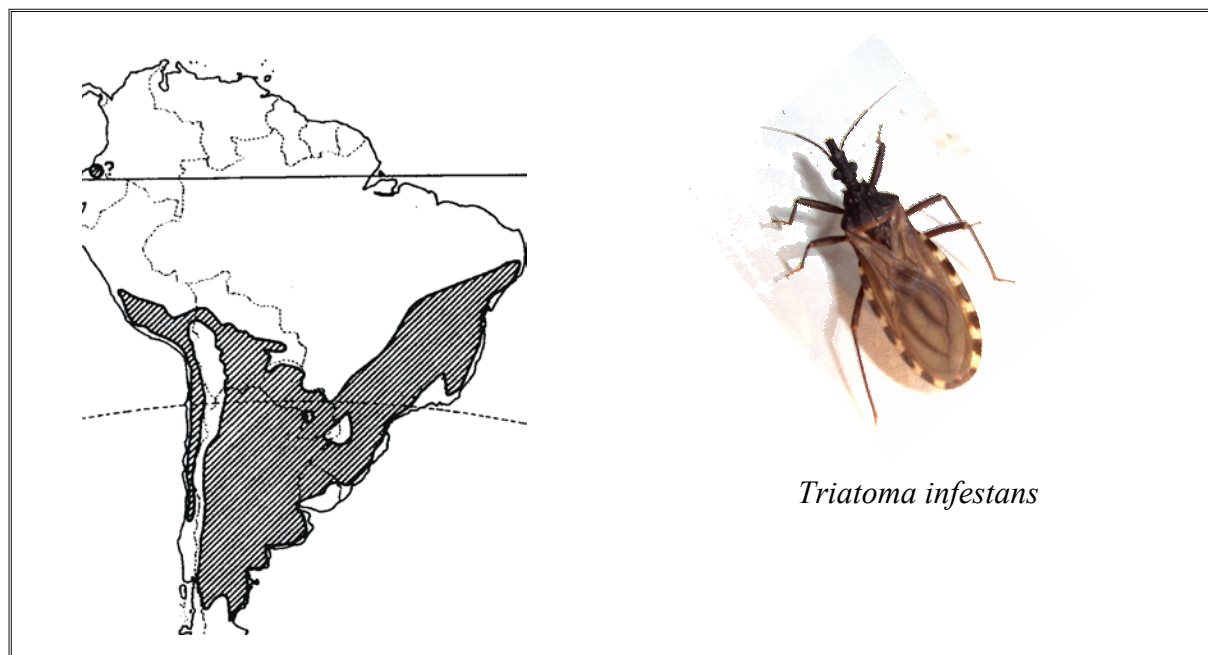


Figura 1.3. Distribución geográfica de *T. infestans* (Carcavallo *et al.*, 1999).

T. infestans es, al igual que muchos otros triatomínos, un insecto hematófago de hábitos nocturnos. Es durante la noche que desarrolla su actividad más intensa, dedicada principalmente a la búsqueda de alimento, refugio, entre otros (Espínola, 1973; Núñez, 1987; Lazzari, 1992; Lorenzo y Lazzari, 1993; Lorenzo y Lazzari, 1996). Actividades tales como la dispersión activa (Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994), la salida de refugios, la búsqueda de alimento (Lorenzo y Lazzari, 1996) y la preferencia por altas temperaturas (Lazzari, 1991), ocurren al anochecer. Otras actividades, tales como el comportamiento de agregación, la búsqueda de refugio y la preferencia por bajas temperaturas tienen lugar al amanecer. La

actividad locomotora espontánea presenta dos picos máximos durante el atardecer y al amanecer (Lazzari, 1992), lo que estaría asociado a la búsqueda activa de alimento y refugio, respectivamente.

Durante el día estos insectos no desplegarían ninguna actividad y permanecen en sus refugios característicamente oscuros como las grietas de las paredes, los techos de paja, las cajas de cartón o los acúmulos de ropa donde obtienen protección ante predadores potenciales. Además, *T. infestans* prefiere permanecer en lugares oscuros (escototaxis) (Wiesinger, 1956) lo cual se asocia con su tendencia a refugiarse durante el día.

En gran parte de Brasil esta especie fue prácticamente erradicada a partir de rigurosas campañas de fumigación y educación, convirtiéndose *P. megistus* y *T. brasiliensis* entre las especies de mayor importancia epidemiológica de la zona. En América Central las especies que se encuentran mayormente asociadas al hombre son *T. dimidiata* y *R. prolixus*.

2.2.2. Comportamiento y hábitos de *Rhodnius prolixus*

R. prolixus Stål 1859 es el principal vector de la enfermedad de Chagas en Venezuela, Colombia y en algunos países de América Central (Guatemala, Honduras, Nicaragua y El Salvador) (Schofield, 1994) (Fig. 1.4). Esta especie está bien adaptada a habitar en viviendas rurales y es considerada de máxima importancia epidemiológica (Monteiro *et al.*, 2003). *R. prolixus* varía su fuente de alimento de acuerdo a la distribución geográfica ya que se lo ha encontrado asociado a palmeras en ambientes selváticos en el norte de América del Sur mientras que en América Central invade viviendas humanas. En estos diferentes ecotopos los insectos de esta especie pueden variar sus fuentes de alimentación de manera oportunista, por ejemplo, Lent y Wygodzinsky (1979) reportaron que este insecto puede ser encontrado en gallineros y comúnmente se encuentra asociado a roedores y aves sobre diversas especies de palmera (Gamboa, 1963). Estos hospedadores pueden actuar como posibles agentes de

dispersión del vector en el ambiente silvestre ya que las hembras de *R. prolixus* adhieren sus huevos al sustrato (e.g., plumas de aves) en el momento de la oviposición (Schilman *et al.*, 1996). En América Central, *R. prolixus* parece estar completamente confinado a los ambientes domésticos y peridomésticos, mientras que en Venezuela y Colombia es posible encontrar tanto poblaciones domésticas como silvestres. Esta especie posee una gran capacidad de colonizar los ambientes artificiales en grandes densidades (Sandoval *et al.*, 2007).

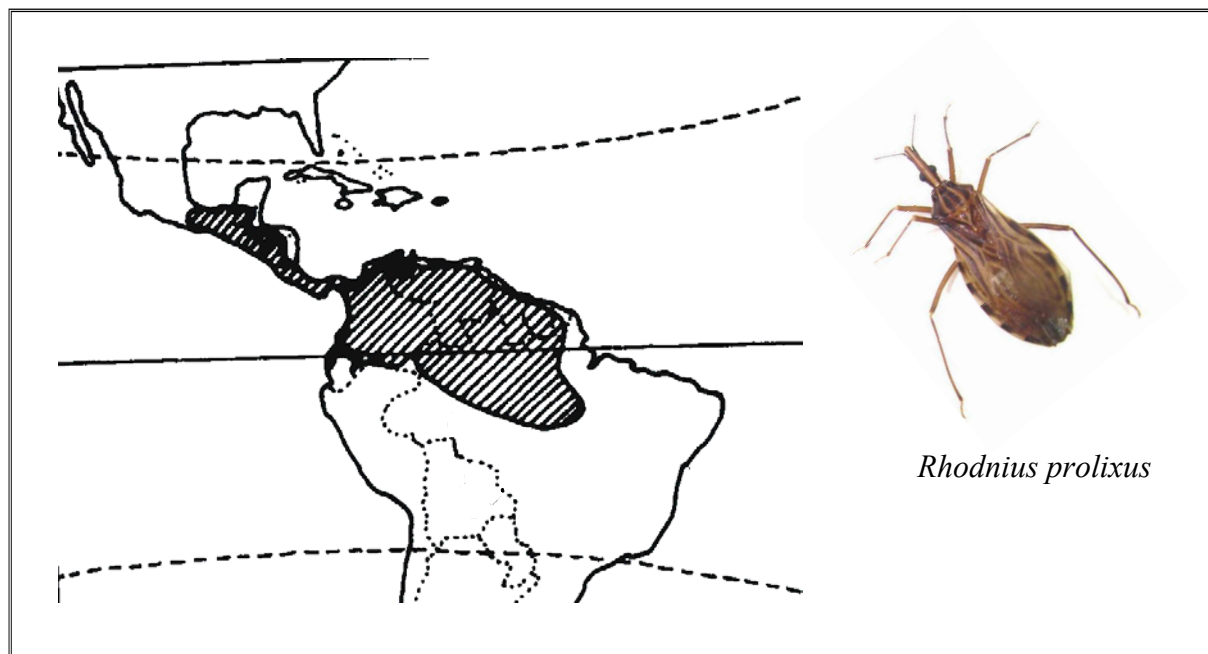


Figura 1.4. Distribución geográfica de *R. prolixus* (Carcavallo *et al.*, 1999).

Desde hace muchas décadas *R. prolixus* se ha convertido en uno de los modelos experimentales de laboratorio más importantes para el estudio de la fisiología y comportamiento de insectos, además de su importancia epidemiológica. Se trata de un insecto relativamente grande, de fácil manipulación y de rápido establecimiento y mantenimiento en condiciones de laboratorio.

2.3. Comunicación química en triatominos

La comunicación química en triatominos ha estado principalmente referida a la presencia de sustancias volátiles que promueven diferentes comportamientos, como la agregación, defensa y alarma o la búsqueda de pareja, entre otras. Schofield y Patterson (1977) sugirieron la existencia de una feromona juvenil de agregación, presente en las heces de larvas de *T. infestans* y de *R. prolixus*, que promueve la atracción de larvas ayunadas aunque no así de larvas alimentadas. La presencia de señales químicas de agregación en las heces ha sido reportada en diversas especies de triatominos (Schofield y Patterson, 1977; Ondarza *et al.* 1986; Cruz López *et al.*, 1993; Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994; Lorenzo y Lazzari, 1996; Lorenzo Figueiras y Lazzari, 2002a; 2002b; Pires *et al.*, 2002; Vitta *et al.*, 2002). Lorenzo Figueiras *et al.* (1994) estudiaron la respuesta de *T. infestans* frente a sustancias volátiles presentes en las heces de larvas y reportaron un comportamiento de agregación alrededor de papeles impregnados con heces secas y de rechazo frente a heces frescas. La deposición de las heces en la cercanía o entrada de los refugios les permitiría a estos insectos reconocerlos como tales al retornar hacia ellos durante la fase final de la noche (Lorenzo y Lazzari, 1996; Pires *et al.*, 2002). Además, se comunicó la existencia de una señal de agregación, denominada *footprint*, que está presente en la cutícula de *T. infestans* (Lorenzo Figueiras y Lazzari, 1998), *P. megistus* (Pires *et al.*, 2002) y *T. pseudomaculata* (Vitta *et al.*, 2002) que promueve el arrestamiento de individuos posiblemente a través de una señal de contacto.

Las vinchucas disponen también de mecanismos activos de alarma y defensa mediante el cual los adultos perturbados emiten un olor "repugnante", fácilmente percibido por el olfato humano (Games *et al.*, 1974; Ward, 1981; Rossiter y Staddon, 1983). La liberación de las secreciones de las glándulas exocrinas metasternales y de Brindley (ambas presentes

únicamente en adultos) ha sido demostrada en condiciones de perturbación mecánica (Manrique *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayoría de los volátiles liberados por estos insectos luego de la perturbación provienen de las glándulas de Brindley. Se ha sugerido que los compuestos emitidos por estas glándulas actuarían como una feromona de alarma en base a la respuesta comportamental de rechazo de *T. infestans* frente al ácido isobutírico, el principal componente de la secreción de las glándulas de Brindley (Ward, 1981). Manrique *et al.* (2006) encontraron un incremento en la actividad locomotora y una respuesta en dirección opuesta a la fuente de emisión cuando larvas de *T. infestans* fueron estimuladas con olores emitidos por adultos perturbados, avalando la hipótesis acerca de una función de alarma de estos volátiles. Varios autores han estudiado el papel biológico de las glándulas de Brindley y sugieren también posibles funciones defensivas, por ejemplo, contra posibles predadores dada la naturaleza corrosiva de su secreción, sin embargo, no existe aún evidencia que avale esta proposición (Schofield, 1979; Ward, 1981, Manrique *et al.*, 2006). El estudio del papel de las secreciones de las glándulas metasternales y de Brindley en la respuesta de defensa y/o alarma de las vinchucas se encuentra actualmente en estudio en nuestro laboratorio.

2.3.1. El comportamiento y la comunicación química entre sexos en triatominos

La existencia de una secuencia estereotipada de fases comportamentales previas al apareamiento ha sido observada y descrita en buena parte de las especies conocidas de insectos. En general, este comportamiento contribuye a la diferenciación específica, basada en la selección sexual de las especies.

Los triatominos están aptos para la reproducción luego de la muda imaginal. Durante este proceso ocurren alteraciones corporales como la aparición de las alas, de las glándulas exocrinas y el desarrollo del sistema reproductor (Dumser y Davey, 1974; Schofield y Upton, 1978; Rossiter y Staddon, 1983). Además de estos cambios, algunos factores como la edad y

el estado nutricional son esenciales para que ocurra la cópula en estos insectos hematófagos (Regis *et al.*, 1985; Lima *et al.*, 1986a; 1986b; 1986c; Malo *et al.* 1993; Manrique y Lazzari, 1994; Pires *et al.*, 2004).

El comportamiento de apareamiento en varias especies de triatomíneos ha sido estudiado en condiciones de laboratorio revelando que estos insectos presentan un comportamiento relativamente simple de cortejo y cópula desplegado, principalmente, por el macho (Hase, 1932; Lima-Carvalho *et al.*, 1985; Lima *et al.*, 1986a; 1986b; 1986c; Sordillo y de Almeida, 1988; Rojas *et al.*, 1990; Rojas y Cruz López, 1992a; 1992b; Manrique y Lazzari, 1994; García-Pérez *et al.*, 1997; Pires *et al.*, 2004). Manrique y Lazzari (1994) realizaron un análisis detallado del apareamiento y de diversos factores que afectan el comportamiento sexual de *T. infestans* encontrando que el apareamiento comienza por iniciativa del macho, *i.e.*, el macho manifiesta los primeros signos comportamentales de percibir a la hembra. Existen otros factores (*e.g.*, señales químicas, vibratorias) que podrían afectar el comportamiento de apareamiento de las vinchucas y evitan, incluso, la ocurrencia de la cópula. Se ha demostrado que la clave vibratoria es utilizada en la comunicación intraespecífica de *T. infestans* y *R. prolixus* en el contexto sexual cuando las hembras no receptivas estridulan espontáneamente (frotan el extremo de su proboscis sobre el surco estridulatorio localizado en el prosterno) al estar en contacto físico directo con el macho, rechazando sus intentos de cópula (Roces y Manrique, 1996; Manrique y Schilman, 2000). Cuando las hembras no están receptivas pueden rechazar los intentos de cópula realizados por el macho a través de 4 patrones comportamentales diferentes: achatamiento del cuerpo contra el sustrato, movimientos abdominales, fuga o estridulación, que usualmente implican la interrupción del intento de apareamiento del macho (Manrique y Lazzari, 1994; Pires *et al.*, 2004). Aún así los rechazos ejecutados por las hembras no siempre impiden la ocurrencia de cópula. Los rechazos desplegados por la hembra disminuyen en intensidad pasadas las dos

semanas de edad adulta, demostrándose el papel activo de la receptividad de las hembras como condicionante de la ocurrencia de la cópula en *T. infestans* (Manrique y Lazzari, 1994). En cuanto al número de apareamientos, los triatomíneos parecen tener distintas estrategias reproductivas. Si bien Lima *et al.* (1986c) y Pires *et al.* (2004) demostraron que las hembras de *P. megistus* aceptan aparearse sólo una vez, aunque puede ocurrir una segunda cópula de corta duración, es más usual la ocurrencia de múltiples apareamientos en otra especie de triatomíneos (Baldwin *et al.*, 1971; Manrique y Lazzari, 1995). Se ha sugerido la existencia de un sistema reproductivo poliándrico en *T. infestans* ya que las hembras de esta especie pueden copular con varios machos en un corto período de tiempo (Manrique y Lazzari, 1995). Por su parte, las hembras de *T. brasiliensis* pueden copular hasta 27 veces con el mismo macho a lo largo de su vida adulta (Brasileiro, 1982). Complementariamente, Vitta y Lorenzo (2009) describieron que los machos de esta especie muestran un comportamiento de guardia de la pareja más intenso frente a la presencia de competidores. Además, estos autores encontraron que la duración de la cópula podría acortarse si los machos se aparean con hembras que ya han copulado previamente. Aún así, no se conoce si estos cambios en el comportamiento del macho están disparados por señales químicas.

La ecología química aborda el estudio de las feromonas principalmente desde dos puntos de vista; por un lado se trata de identificar químicamente las sustancias responsables de la modificación del comportamiento de conspecíficos y por otro las estructuras responsables de producir y secretar dichas sustancias. El estudio de la existencia de una feromona suele comenzar a partir de observaciones de cambios en el comportamiento provocados por ésta, antes de su identificación. En las últimas décadas se ha descrito la existencia de un factor liberado durante la cópula que afecta la distribución espacial de machos y promueve su agregación en torno a la pareja en cópula (Baldwin *et al.*, 1971, en *R. prolixus*; de Brito Sánchez *et al.*, 1995 y Manrique y Lazzari, 1995 en *T. infestans*).

Velázquez Antich (1965) describió la atracción entre machos y hembras de *Triatoma pallidipennis* mediada por olores y el mismo autor (1968) sugirió que las hembras de *R. prolixus* eran atraídas por olores provenientes de los machos, aunque la evidencia experimental no es muy concluyente. En *R. prolixus* se postuló la existencia de una feromona de atracción sexual producida por parejas en cópula alrededor de la cual se agregaban los machos (Baldwin *et al.*, 1971). De manera similar, este comportamiento fue observado en machos de *Triatoma mazzottii* atraídos por una feromona de atracción sexual producida por las hembras durante la cópula, aunque con resultados contradictorios (Ondarza *et al.*, 1986; 1987; Rojas *et al.*, 1991). Por su parte, Neves y Paulini (1981) comunicaron cierta evidencia de atracción química entre machos y hembras en *T. infestans* y *P. megistus*. Posteriormente, Manrique y Lazzari (1995) demostraron que una señal química es liberada durante la cópula en *T. infestans* que provoca que los machos que se agreguen alrededor de parejas en cópula.

Con respecto a la naturaleza química de la señal emitida durante la cópula de triatominos, Rios Candelaria (1999) mostró que durante el cortejo de *R. prolixus* se liberaba ácido acético y ácido isobutírico, compuestos que resultarían ser atractivos para machos en pruebas realizadas en olfatómetro. También Rojas *et al.* (2002) sugirieron que los compuestos producidos por las glándulas de Brindley identificados en *R. prolixus*, estarían relacionados con el contexto sexual en esta especie. Mientras tanto, Guerenstein y Guerin (2004) propusieron que bajas concentraciones de ácido isobutírico pueden funcionar como señal sexual en *R. prolixus* y en altas concentraciones actuaría como una señal de alarma. Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias experimentales que prueben que este compuesto promueva algún comportamiento sexual. Por su parte, Fontán *et al.* (2002) describieron una serie de compuestos que fueron detectados durante la cópula de *T. infestans* e indicaron que estos representarían una feromona sexual para la especie. En la mezcla compleja de sustancias identificadas, estos autores encontraron ácidos grasos descritos por

otros autores como parte de la mezcla de la secreción de las glándulas de Brindley de esta especie.

El origen de las señales químicas involucradas en la comunicación sexual de triatomíneos ha sido estudiado sólo en las últimas décadas. En estudios recientes sobre el comportamiento sexual de triatomíneos se analizó el papel que juegan las glándulas exocrinas principales que poseen los adultos de *T. infestans*, las glándulas de Brindley y las glándulas metasternales. De esta manera se logró identificar a los compuestos volátiles presentes en estas glándulas encontrándose preliminarmente que durante la cópula las glándulas metasternales descargan su contenido mientras que en este mismo contexto no se encontró emisión por parte de las glándulas de Brindley (Manrique *et al.*, 2006). Frente a esta evidencia, ensayos de comportamiento realizados en *T. infestans*, mostraron una fuerte reducción de la frecuencia de cópula en *T. infestans* cuando los orificios de las glándulas metasternales de las hembras eran artificialmente ocluidos con parafina (Crespo y Manrique, 2007). Complementariamente, la proporción de cópula y el comportamiento de agregación de los machos no variaban cuando las hembras tenían los orificios de sus glándulas de Brindley ocluidos. Esto sugiere que los volátiles de las glándulas de Brindley de las hembras no tendrían un papel sobre la ocurrencia de cópula ni en el comportamiento de agregación de los machos de *T. infestans* y por lo tanto parecen ser irrelevantes para el contexto sexual. Estos resultados tomados en conjunto sugieren que el comportamiento de cópula y la agregación de machos están ligados a la liberación de compuestos volátiles por parte de las glándulas metasternales de las hembras. Los compuestos de las glándulas de Brindley parecen ser parte de una señal de comunicación intraespecífica que es relevante como feromona de alarma (Ward, 1981; Manrique *et al.*, 2006) y que probablemente tengan una función defensiva. Cabe destacar, además, que ambos tipos de glándulas descargan su contenido frente a una perturbación mecánica no conociéndose aún si existe alguna función diferencial en este

contexto defensivo (Manrique *et al.*, 2006). La investigación acerca de la secreción de las glándulas metasternales de *T. infestans* reveló la presencia de varias cetonas altamente volátiles y alcoholes. Pontes *et al.* (2008) describieron la identidad química de los compuestos producidos por las glándulas metasternales de *R. prolixus* y establecieron una relación entre estas secreciones y la comunicación sexual de estos insectos. Estos autores demostraron que la emisión de compuestos de las glándulas metasternales por machos o hembras durante la cópula es relevante ya que la frecuencia de cópula decrece fuertemente en su ausencia. Al mismo tiempo, estos autores observaron que son las hembras las que emiten el contenido de las glándulas metasternales más frecuentemente que los machos y liberan una mayor variedad de compuestos volátiles durante las primeras horas de la escotofase, momento en que la actividad sexual es máxima (Crespo y Manrique, 2005).

2.3.2. Las glándulas exocrinas de los triatominos

Los insectos de la subfamilia Triatominae presentan dos pares de glándulas exocrinas (Staddon, 1979) productoras de sustancias volátiles, las glándulas de Brindley (Brindley, 1930) localizadas en el metatórax dorsolateral y las glándulas metasternales, localizadas en el metatórax ventral (Fig. 1.5). Estas glándulas no son funcionales en las larvas y los triatominos no parecen poseer otras glándulas exocrinas tales como las glándulas abdominales o ventrales descritas en otros insectos de la familia Reduviidae (Kälin y Barret, 1975; Schofield, 1979; Staddon, 1979; Rossiter y Staddon, 1983). Sin embargo, los machos de *Triatoma rubrofasciata* y *T. infestans* presentan áreas glandulares asociadas a su genitalia que podrían estar involucradas en la producción de sustancias volátiles (Barth, 1980; Weirauch, 2003). Estas áreas están localizadas en la membrana intersegmental entre el 8° y 9° segmento del abdomen, denominada por estos autores como área glandular hipodermal. Las sustancias

potencialmente producidas por estas estructuras glandulares podrían tener un papel en la atracción sexual aunque no ha sido demostrado aún.

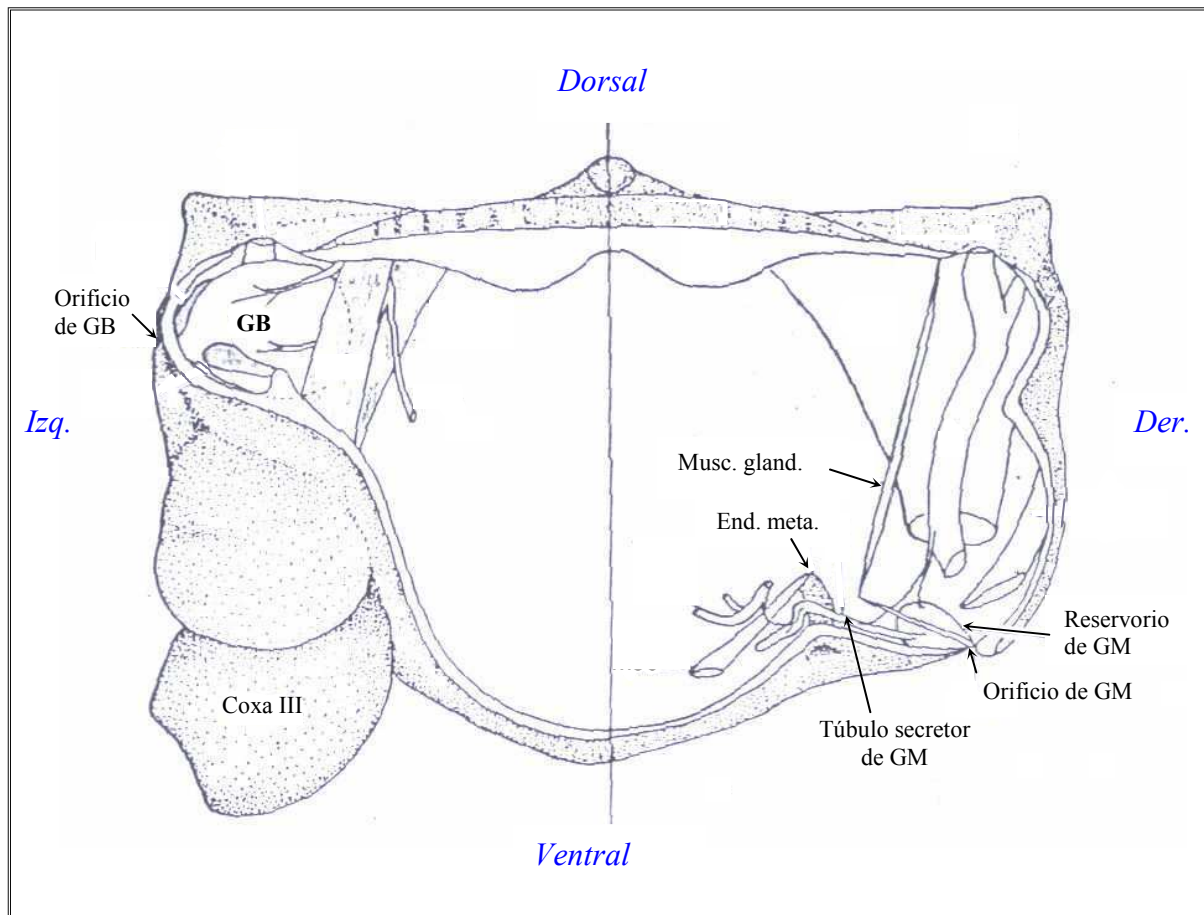


Figura 1.5. Esquema del corte transversal del metatórax de *P. megistus*. La metacoxa y la glándula de Brindley fueron removidas del lado derecho del esquema. A izquierda: representación de una de las dos glándulas de Brindley ubicadas cada una a ambos lados del cuerpo en posición dorso-lateral. A derecha: representación de una de las dos glándulas metasternales ubicadas cada una a ambos lados del cuerpo en posición latero-ventral. **GB**: glándula de Brindley; **GM**: glándula metasternal; **End. meta.:** endosternito metasternal; **Musc. gland.:** músculo glandular torácico (modificado de Schofield y Upton, 1978).

2.3.3. Morfología, localización y composición química de las secreciones de las glándulas de Brindley y metasternales

Las glándulas de Brindley y metasternales son estructuralmente similares entre sí y presentan una unidad glandular formada principalmente por una porción secretora, un ducto y un reservorio (Kälin y Barrett, 1975 en *R. prolixus*; Schofield y Upton, 1978 en *P. megistus*; Barrett *et al.*, 1979; Vitta *et al.*, 2009 en *T. brasiliensis*). La localización y morfología de las glándulas de Brindley y metasternales son similares en todas las especies descritas (Schofield y Upton, 1978). A pesar que ambos tipos de glándulas presentan orificios de salida independientes, se ha sugerido que cuando se libera la secreción de las glándulas metasternales se mezclaría en el episterno con la secreción de las glándulas de Brindley (Schofield y Upton, 1978). Sin embargo, no se ha comprobado esta hipótesis ni sus posibles implicancias comportamentales.

Las glándulas de Brindley son estructuras saculares que cuando están llenas pueden tener un diámetro de 2 mm en *P. megistus*. Su ubicación es dorso-lateral al metatórax aunque puede extenderse hacia la parte lateral de la cavidad abdominal anterior, abriéndose al exterior a través de un orificio en el episterno metatorácico (Schofield y Upton, 1978) (Fig. 1.6). Anteriormente a la apertura externa de la glándula se encuentra una estructura acanalada en forma de “L” que recorre ventral y anteriormente, a lo largo del epímero, el margen del episterno que actúa como superficie de evaporación de la secreción (Kälin y Barrett, 1975).

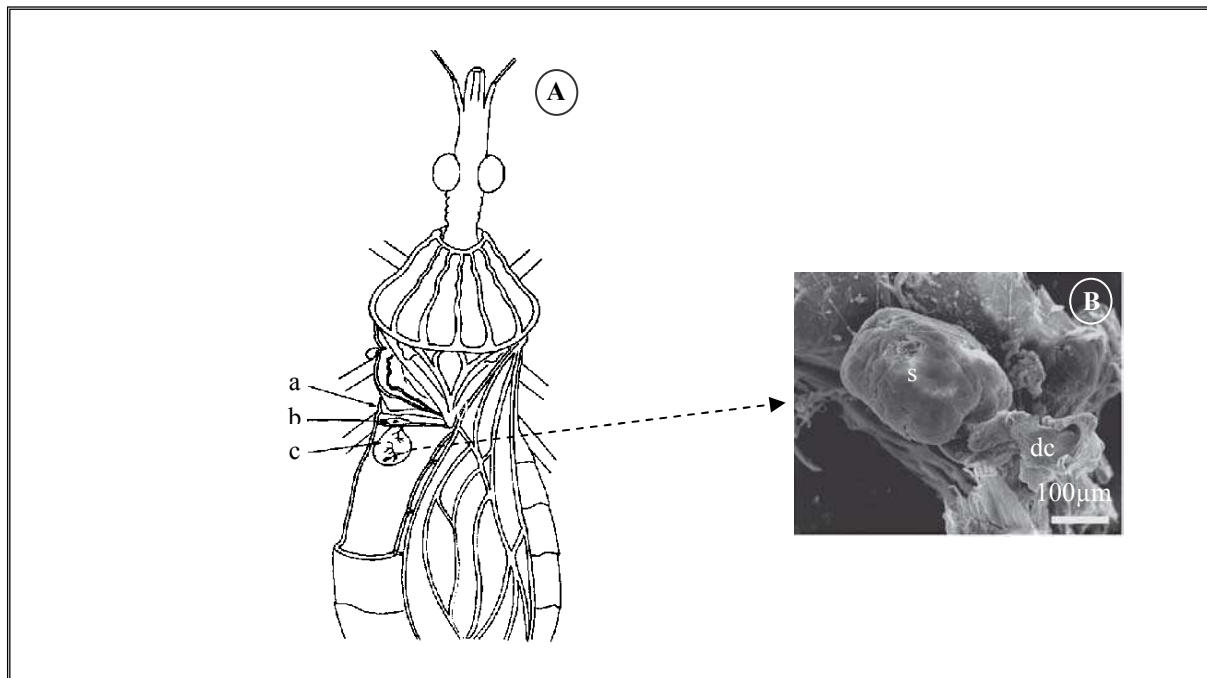


Figura 1.6. Glándula de Brindley en triatominos. **A)** Vista dorsal de un adulto parcialmente diseccionado de *R. prolixus*. La glándula de Brindley izquierda (c) se extiende hacia el abdomen justo por debajo del espiráculo del 2° tergito abdominal (b). La abertura externa de la glándula está localizada sobre el epímero metatorácico (Kälin y Barrett, 1975). **B)** Microfotografía electrónica de barrido de glándula de Brindley de *T. brasiliensis*; porción secretora (s) y ducto colector (dc) (Vitta *et al.*, 2009).

En las últimas décadas se ha investigado la composición química de la secreción de las glándulas de Brindley y los volátiles liberados por insectos perturbados en varias especies de triatominos, revelando que el ácido isobutírico es su componente más abundante, probablemente asociado a funciones de defensa y alarma (Ward, 1981; Cruz López *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 2002; Guerenstein y Gueran, 2004; Manrique *et al.*, 2006). Diversos trabajos mostraron en *R. prolixus* que esta secreción emitida luego de una perturbación estaría compuesta únicamente por ácido isobutírico (Pattenden y Staddon, 1972; Games *et al.*, 1974) o por una mezcla de ácido isobutírico y otros compuestos en menor proporción, que incluye diversos ácidos grasos y ésteres no identificados (Rojas *et al.*, 2002; Guerenstein y Guerin, 2004). Del mismo modo, en *T. infestans*, la secreción fue descrita como ácido isobutírico (Schofield, 1979), o como una mezcla compleja de compuestos volátiles con ácido isobutírico

(Hack *et al.*, 1980; Cruz López *et al.*, 1995; Guerenstein y Guerin, 2004) o ácido acético (Juárez y Brenner, 1981) como componentes principales. Cabe destacar que el ácido isobutírico fue descrito como el componente principal, tanto de la secreción de las glándulas de Brindley, como del espacio circundante (*headspace*) de adultos perturbados en la mayoría de los trabajos sobre triatominos, con la excepción de *D. maximus*, especie que posee glándulas de Brindley poco desarrolladas (Rossiter y Staddon, 1983; Guerenstein y Guerin, 2004). Sin embargo, mediante la utilización de un método más sensible, se demostró que la mezcla de volátiles incluye tanto a varios ácidos grasos de cadena corta como a ésteres, alcoholes y componentes nuevos como por ejemplo cetonas (Manrique *et al.*, 2006). Los análisis paralelos del contenido de estas glándulas diseccionadas de machos de *T. infestans* reveló que el éster 2-metilbutil-2-metilpropanoato y el ácido 2-metilpropanoico eran los volátiles más representados (González Audino *et al.*, 2007). Estos mismos autores hallaron que la mezcla de volátiles de las glándulas de Brindley de machos eran capaces de tener efectos repelentes sobre machos y hembras de *T. infestans*, posiblemente asociado a estrategias defensivas.

Las glándulas metasternales están ampliamente presentes en Heteroptera (Weirauch, 2006) y se encuentran localizadas en el lado interno y anterior de la cavidad metacoxal (Fig. 1.7). Están conformadas por un reservorio pequeño en forma de pera y un túbulo secretor simple o ramificado, según la especie (Fig. 1.7-C y E). El orificio de salida de la secreción se encuentra en el margen anterior de la cavidad metacoxal y por encima de este se pueden observar varios pelos largos de la metacoxa que funcionarían como difusores de la secreción glandular (Schofield y Upton, 1978). La primera vez que se publicó acerca de la producción de sustancias volátiles de las glándulas metasternales en triatominos fue en *D. maximus* (Rossiter y Staddon, 1983). Estos autores identificaron a la 3-metil-2-hexanona como único producto presente en la secreción el cual podría actuar como una sustancia de alarma, útil para

repeler predadores o para la comunicación intraespecífica, aunque no fue experimentalmente comprobado.

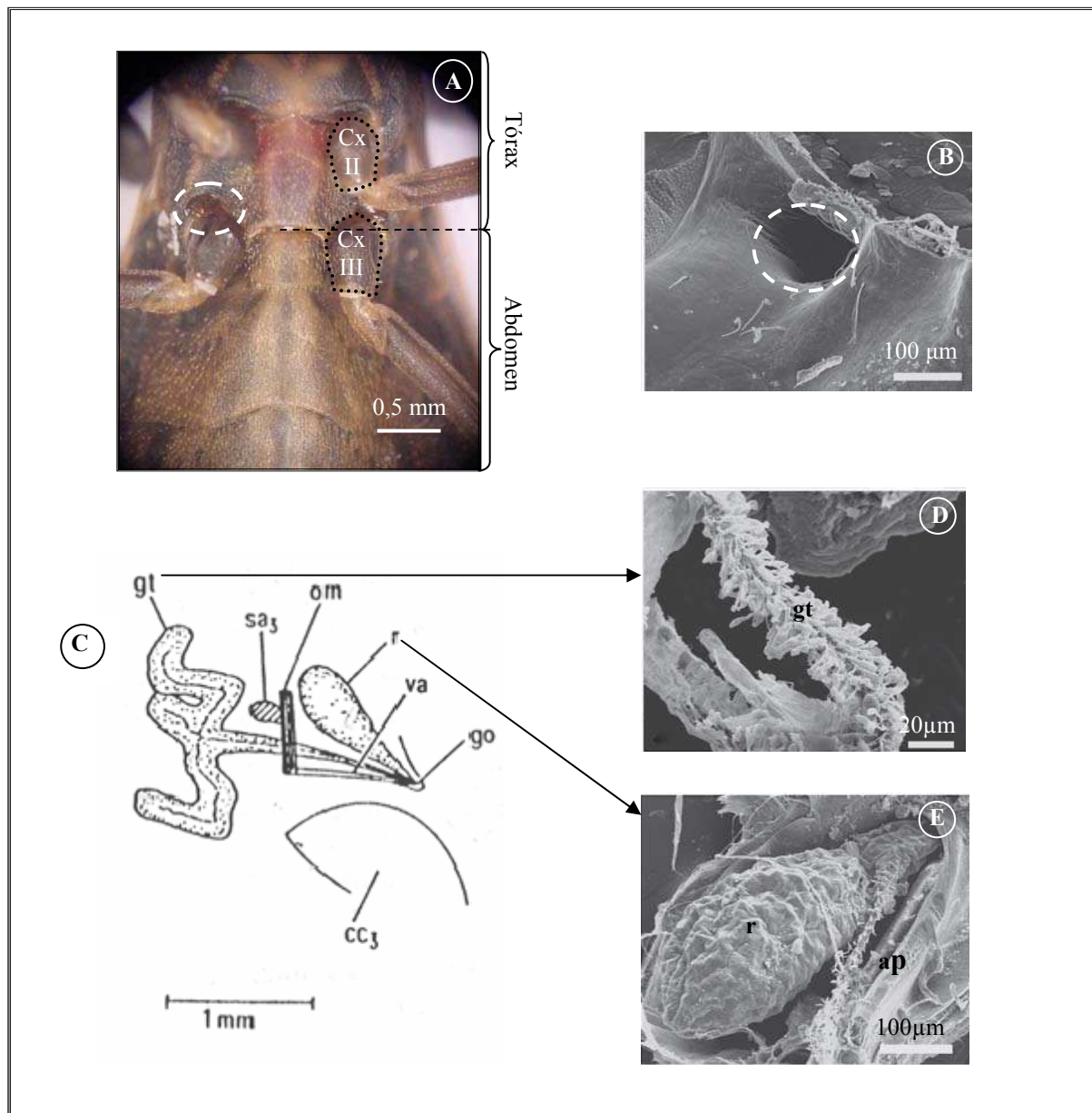


Figura 1.7. Glándula metasternal en triatomíneos. **A)** Sección parcial del tórax y abdomen de adulto de *R. prolixus* en vista ventral (10x). El círculo con línea discontinua destaca la cavidad que aloja al orificio de salida de la glándula metasternal derecha. **CxII**: mesocoxa; **CxIII**: metacoxa (Fotografía: Gina Pontes); **B)** Microfotografía electrónica de barrido de la cavidad que aloja al orificio de salida la glándula metasternal en *T. brasiliensis* destacado dentro del círculo con línea discontinua (modificado de Vitta *et al.*, 2009). **C)** Esquema de la glándula metasternal derecha de *D. maximus*. **cc3**: cavidad articular de coxa III; **go**: abertura de la glándula; **gt**: túbulo secretor de la glándula; **om**: músculo de apertura; **r**: reservorio; **sa3**: apófisis metasternal; **va**: brazo valvular de apertura. **D-E)** Fotografías electrónicas de barrido de porciones de la glándula metasternal de *T. brasiliensis*: **D)** Detalle de la porción secretora. **E)** Reservorio (**r**) y porción secretora (**gt**). **ap**: apófisis metasternal.

En *T. infestans* se identificaron hasta seis compuestos, como cetonas y alcoholes, donde la 3-pentanona es el principal constituyente de las glándulas metasternales (Manrique *et al.*, 2006). La 3-pentanona fue detectada sobre parejas en cópula lo que sugiere que este compuesto volátil podría intervenir en la comunicación sexual de esta especie. En ensayos de comportamiento, Crespo y Manrique (2007) demostraron que las glándulas metasternales de hembras de *T. infestans* participan en el comportamiento sexual de esta especie y promueven la cópula y la agregación de machos alrededor de la pareja en cópula. Pontes *et al.* (2008) mostraron que las glándulas metasternales de *R. prolixus* constituyen una fuente de una mezcla compleja de sustancias volátiles de la cual identificaron 12 cetonas y alcoholes siendo el 2-metil-3-buten-2-ol el compuesto más abundante, seguido por (2S)-pentanol, (3E)-2-metil-3-penten-2-ol y 4-metil-3-penten-2-ol. Por otro lado, Vitta *et al.* (2009) identificaron varios compuestos de estas glándulas en *T. brasiliensis* y describieron cetonas y alcoholes entre otros compuestos.

3. RELEVANCIA DE ESTE TRABAJO

El estudio del comportamiento de las especies de triatomíneos que transmiten al flagelado *T. cruzi* presenta una gran relevancia por permitir mejorar la comprensión de los procesos tales como su dispersión y reproducción y, por lo tanto, la colonización de las viviendas donde usualmente ocurre la transmisión vectorial del parásito. Además, la comprensión de los mecanismos involucrados en la posible atracción a distancia entre sexos de estos insectos, así como su reconocimiento antes y durante la cópula puede potencialmente permitir el diseño de cebos atractivos que faciliten su control.

La principal estrategia de prevención de la transmisión de la enfermedad de Chagas es a través de la eliminación de los vectores domiciliarios. Es por eso que la profundización del nivel de conocimiento de la fisiología sensorial y del comportamiento de las especies vectoriales

se torna esencial. El estudio de los aspectos comportamentales de estos insectos podría utilizarse para complementar las actividades de control e incrementar los índices de captura o la reducción de los índices de reproducción, entre otros. Comprender aspectos tales como los factores que desencadenan el vuelo (importante mecanismo de dispersión e invasión de nuevas viviendas), las señales químicas involucradas en la orientación y reconocimiento de la pareja, y la identificación de los compuestos que participan en los eventos que conducen a la cópula podría contribuir al desarrollo de nuevas herramientas de control basados en la manipulación del comportamiento.

La dispersión de los triatominos a través del vuelo es probablemente el mecanismo más importante de reinfestación de los domicilios después del efecto residual de los insecticidas (Schofield, 1985; Gürtler *et al.*, 1993; Cecere *et al.*, 2004; Vazquez-Prokopec *et al.*, 2004). Además, la colonización de nuevos hábitats depende entre otros factores de la habilidad de estos insectos en encontrar y seguir pistas localizadas a una determinada distancia. Por otro lado, se ha sugerido que la migración por vuelo sería un factor clave en la regulación de la densidad poblacional (McEwen *et al.*, 1993). Algunos factores que pueden modular la actividad de vuelo de los triatominos incluyen el efecto del estado nutricional, del género, del estado reproductivo de las hembras, de la densidad de la población o de la temperatura ambiental (Lehane y Schofield, 1982; Lehane *et al.*, 1992; McEwen *et al.*, 1993; McEwen y Lehane, 1993; 1994). También se han encontrado diferencias entre sexos en la capacidad de iniciar el vuelo (Ward y Baker, 1982). Sin embargo, hasta el presente, la comunicación química no se ha evaluado suficientemente como parte de un mecanismo de orientación a distancia que facilite el encuentro sexual en triatominos. En este sentido, se desconoce si las claves químicas juegan algún papel en la atracción, reconocimiento sexual y orientación de las vinchucas en el contexto del vuelo, lo que pone en evidencia la falta de conocimiento acerca de la biología reproductiva y estrategias de apareamiento en esta

subfamilia. En el Capítulo II de este trabajo de Tesis se explorará el modo en que se ve afectado el comportamiento de activación del vuelo en presencia de olores emitidos por individuos del sexo opuesto en *R. prolixus*. Además, se analizará si la orientación del inicio del vuelo puede estar modulada por la presencia de claves químicas arrastradas por corrientes de aire en el contexto sexual.

Una de las principales características de los insectos es la sensibilidad y especificidad con que sus antenas perciben los componentes químicos relevantes a partir de mezclas de infoquímicos (Kaissiling y Thorson, 1980; Steinbrecht y Schneider, 1980). De esta manera, las antenas son los principales órganos de percepción de los olores y capturan moléculas volátiles mediante pelos olfativos o sensilias (Chapman, 1998; Nation, 2002).

El estudio de la quimiorrecepción en triatominos, enfocado principalmente en las señales químicas involucradas en la comunicación intraespecífica, es crucial para el desarrollo de medidas de control vectorial alternativas como la disrupción del apareamiento mediante la utilización de feromonas sexuales. Dado que se conoce la existencia de volátiles que afectan el comportamiento sexual en algunas especies de triatominos, la investigación de las respuestas electrofisiológicas de los quimiorreceptores antenales puede ofrecer interesantes aportes para este fin. Estudios sobre las respuestas electrofisiológicas en machos de *T. infestans*, demostraron que ocurren cambios significativos en la actividad eléctrica, o sea a nivel nervioso, asociado exclusivamente con volátiles liberados por uno o ambos sexos durante la cópula (de Brito Sánchez *et al.*, 1995). Por otro lado, olores provenientes de hembras, machos o parejas que no estaban en situación de cópula no evocaron dichas respuestas electrofisiológicas.

Hasta el presente existen escasos reportes de respuestas electrofisiológicas de las antenas de triatominos y el sistema de cromatografía gaseosa acoplada a electroantenodetección (CG-EAD) ha sido utilizado pocas veces para el estudio del

comportamiento sexual de estos insectos. En base al hecho que la secreción de las glándulas metasternales es relevante para el éxito u ocurrencia de cópula, en el Capítulo III de esta Tesis se estudiarán los compuestos de estas glándulas que pudieran ser detectados por las antenas de *T. infestans* y *R. prolixus* y su implicancia en el comportamiento del inicio del vuelo de *R. prolixus* asociado al reconocimiento sexual. Generalmente, la sensibilidad y especificidad de una antena frente a los componentes de una feromona hacen del CG-EAD una herramienta poderosa para el análisis de estas mezclas de volátiles y permite la identificación de componentes, o mezcla de ellos, biológicamente activos.

El encuentro y reconocimiento entre sexos, en la mayoría de los insectos, está mediado por feromonas sexuales que pueden ser producidas por la hembra o por el macho. Este tipo de feromonas desencadenan reacciones comportamentales en el sexo opuesto y pueden atraerlo a largas distancias y provocar la agregación de uno o varios individuos alrededor del emisor (Shorey, 1973). Luego de la aproximación, otros tipos de señales químicas estimulan el comportamiento de cortejo y cópula. Estas señales pueden estar localizadas en la cutícula (hidrocarburos, alcoholes, ésteres de ácidos grasos saturados o insaturados) o pueden ser producidos por glándulas exocrinas (Lang y Foster, 1976). Así, la atracción y reconocimiento sexual podría involucrar a los lípidos cuticulares, cuya composición ha sido estudiada en *T. infestans* y *R. prolixus* (Juárez *et al.*, 1984; 2001). Los componentes hidrocarburos de la capa lipídica de la cutícula están involucrados, entre otras funciones, como feromona de contacto involucrada en el reconocimiento sexual en distintas especies de insectos (Howard, 1993; Singer, 1998; Howard y Blomquist, 2005). La composición de los lípidos varía cuantitativamente de acuerdo con el estadio en desarrollo (larvas, adultos) y con el género (hembra, macho), y en diversas especies de insectos se ha demostrado que están involucrados en la quimiorrecepción de contacto en los momentos previos o durante la cópula (Tregenza y Wedell, 1997; Ginzl *et al.*, 2003). Existen pocos

reportes acerca de los lípidos cuticulares en triatominos, la mayoría de ellos están relacionados con hidrocarburos cuticulares para la caracterización de especies y filogenias (Juárez y Blomquist, 1993; Juárez *et al.*, 2001; 2002). En el Capítulo IV de esta Tesis se analizará la posible participación de los lípidos cuticulares en el reconocimiento sexual a corta distancia en triatominos con una posible función feromonal de contacto en los momentos previos al apareamiento de *T. infestans*.

Objetivo General

La concreción de un apareamiento depende del encuentro del macho con la hembra y de la motivación para copular. Ambos eventos parecen estar mediados por claves químicas liberadas por las hembras en triatominos.

El presente trabajo de Tesis propone explorar el papel que desempeñan las claves químicas en el encuentro entre sexos de las vinchucas *R. prolixus* y *T. infestans* y el estudio de los mecanismos comportamentales y la naturaleza química de las señales utilizadas en la comunicación sexual. Dicho análisis se basó en el estudio cuantitativo del comportamiento durante el período previo a la cópula mediante experimentos realizados bajo condiciones controladas de laboratorio. El estudio del comportamiento y análisis funcional de las estructuras sensoriales son indispensables para comprender la manera en que estos insectos llevan adelante sus actividades fundamentales entre las que se incluye la búsqueda, detección y reconocimiento de parejas para la reproducción.

Objetivos Particulares

- Estudiar si el inicio de vuelo en vinchucas esta modulado por la presencia de compuestos químicos involucrados en el encuentro entre sexos.

- Identificar la/s fuente/s emisora/s de los compuestos químicos involucrados en el inicio de vuelo que participan en el encuentro entre sexos.
- Explorar los compuestos producidos por las glándulas metasternales de hembras de *T. infestans* y *R. prolixus* que promuevan respuestas olfativas en las antenas de los machos por medio de técnicas electrofisiológicas.
- Determinar el/los compuesto/s químico/s producidos por las hembras que modulen el inicio de vuelo de machos.
- Determinar si los lípidos cuticulares de *T. infestans* cumplen un papel en la comunicación química en los momentos previos a la cópula a corta distancia.

Se trabajó en el marco de las siguientes hipótesis:

- En las vinchucas existen sustancias volátiles (señales químicas/feromonas) presentes en las hembras que modulan el inicio de vuelo de machos.
- Las vinchucas son capaces de percibir diversas señales químicas, generadas por las glándulas exocrinas, y utilizar dicha información para detectar la presencia de individuos de la misma especie y localizarlos en el espacio.
- Las glándulas metasternales de las hembras están involucradas en la modulación del inicio de vuelo de machos.
- Los volátiles que sean activos y detectables por los quimiorreceptores alojados en las antenas de estos insectos son candidatos a tener relevancia biológica.
- El reconocimiento sexual previo al apareamiento en *T. infestans* está mediado por lípidos cuticulares que actúan como feromonas de contacto.

CAPÍTULO 2

Inicio del vuelo en el contexto sexual



Adulto de *Rhodnius prolixus* iniciando vuelo (Foto: Rodrigo Sinistro)

Aerodinámicamente el abejorro no debería ser capaz de volar, pero el abejorro no lo sabe, por lo que continúa volando de todos modos - Mary Kay Ash

INTRODUCCIÓN

1. Evidencias sobre comunicación sexual en *R. prolixus* y *T. infestans*

En *R. prolixus* y *T. infestans* existen evidencias comportamentales que demuestran la participación de señales químicas (*i.e.*, feromonas) en la comunicación sexual. Se ha sugerido la existencia de volátiles emitidos por parejas de *R. prolixus* durante la cópula que resultan atractivos para machos conespecíficos que se acercan y agregan alrededor de la pareja (Baldwin *et al.*, 1971). Del mismo modo, Manrique y Lazzari (1995) mostraron que los machos de *T. infestans* exhiben un comportamiento similar al de *R. prolixus* agregándose alrededor de la pareja en cópula. De acuerdo con estos autores las hembras de *T. infestans* no muestran un comportamiento de agregación en presencia de una pareja en cópula. Estos resultados sugieren que el comportamiento de los machos estaría afectado por una señal de agregación emitida por parejas en cópula, al menos en las especies mencionadas.

Los triatominos adultos presentan dos pares de glándulas exocrinas, las glándulas de Brindley y las metasternales, que emiten su contenido al exterior en dos lugares diferentes del metatórax (Fig. 1.5). Entre los productos más abundantes de las glándulas de Brindley se encuentra el ácido isobutírico que, junto con otros componentes de la secreción, parecería actuar como feromona de alarma (Ward, 1981; Manrique *et al.*, 2006). Por otra parte, se han asociado a las secreciones de estas glándulas con la comunicación sexual de estos insectos (Fontán *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2002; Guerenstein y Guerin, 2004). Sin embargo, recientemente se aportó evidencia de la relación de los productos de las glándulas metasternales con la comunicación sexual de diversas especies de triatominos (Manrique *et al.*, 2006; Crespo y Manrique, 2007; Pontes *et al.*, 2008; Vitta *et al.*, 2009). Particularmente, Crespo y Manrique (2007) y Pontes *et al.* (2008) mostraron que la oclusión de los orificios de las glándulas metasternales de hembras de *T. infestans* y *R. prolixus*, respectivamente,

disminuye la probabilidad de cópula y previene el comportamiento de agregación de machos alrededor de parejas en cópula. En cambio, la oclusión de las glándulas de Brindley no afecta la ocurrencia de cópula ni la agregación de machos alrededor de una pareja. Adicionalmente, Pontes *et al.* (2008) demostraron que las hembras de *R. prolixus* emiten volátiles provenientes de las glándulas metasternales más frecuentemente que los machos y esta actividad estaría acotada a las primeras horas de la escotofase.

2. El vuelo en triatominos

El vuelo ha sido considerado un factor de importancia en la dispersión de las vinchucas y para la epidemiología de la enfermedad de Chagas (Lehane y Schofield, 1976). Este mecanismo de transporte es considerado un factor implicado en la colonización de nuevos domicilios por parte de las especies de vinchucas de hábitos domésticos y además, podría ser utilizado por especies silvestres durante la invasión de viviendas humanas. Estas nuevas colonizaciones ocurren frecuentemente en áreas de reciente urbanización o en zonas en la que el vector doméstico original ha sido eliminado de las viviendas a través de medidas de control (Lehane y Schofield, 1976), por lo que se ha propuesto al vuelo como el mecanismo de reinfestación más importante del domicilio luego del efecto residual de los insecticidas (Schofield y Matthews, 1985; Cecere *et al.*, 2004; Vazquez-Prokopec *et al.*, 2004).

El inicio del vuelo de los triatominos ha sido asociado a bajos niveles nutricionales y las altas temperaturas (Ekkens, 1981; Lehane y Schofield, 1982) como por ejemplo en *T. infestans* (Lehane *et al.*, 1992; Ceballos *et al.*, 2005), en *R. prolixus* y *Triatoma sordida* en experimentos realizados en laboratorio (Gringorten y Friend, 1979; McEwen y Lehane, 1993) y en *Triatoma guasayana* y *T. sordida* en observaciones de campo (Noireau y Dujardin, 2001). Particularmente, las observaciones del efecto del estado nutricional sobre la actividad

de vuelo en *T. infestans*, mostraron que esta especie presenta picos máximos de vuelo a partir de los 12-18 días de ayuno y, además, condiciones de ayuno creciente causarían una reducción del 50% en la puesta de huevos luego de haber volado (Lehane y Schofield, 1982; Lehane *et al.*, 1992; McEwen y Lehane, 1994; Ceballos *et al.*, 2005; Gurevitz *et al.*, 2006). Asimismo, ejemplares de esta especie capturados en trampas de luz, presentan normalmente un bajo estado nutricional (Wisnivesky-Colli *et al.*, 1993; Noireau y Dujardin, 2001). Por otro lado, McEwen *et al.* (1993) sugirieron a partir de datos de campo, que el inicio del vuelo podría estar modulado por la densidad poblacional en *T. infestans*.

Si bien los triatominos son insectos principalmente caminadores, el arribo activo a nuevos hábitats parece ocurrir generalmente por medio del vuelo. En observaciones de campo, se encontró que *T. infestans* realizó vuelos de hasta 110 m al ser liberados en grupos (Lehane y Schofield, 1981), aunque esta distancia superó los 200 m cuando las condiciones climáticas eran de mayor temperatura (Schofield *et al.*, 1992). Por otro lado, Schweigmann *et al.* (1988) informaron que la dispersión por medio del vuelo de *T. infestans* podría transportarlos hasta 1,5-2 km de sus posibles lugares de origen. Por otro lado, Gringorten y Friend (1979) sugirieron, a partir de ensayos de laboratorio, que *R. prolixus* es un buen volador ya que presenta adaptaciones anatómicas y reflejos musculares para llevar a cabo vuelos de 2-3 h de duración, lo que sugiere la posibilidad de vuelos considerablemente largos en la naturaleza. Otros autores comunicaron que esta especie es capaz de mantener un vuelo sostenido durante 11 minutos y sugirieron una capacidad de desplazamiento de hasta 800 m por episodio de vuelo (Lehane y Schofield, 1976; 1978).

La heterogeneidad en la capacidad de vuelo ha sido documentada en varias especies de insectos principalmente por el polimorfismo alar pero también por el dimorfismo de los músculos de vuelo (Harrison, 1980; Zera y Denno, 1997). En estudios sobre metabolismo del vuelo se ha demostrado que en dos especies de triatominos, *Panstrongylus megistus* y *T.*

sordida, el glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH, principal componente del metabolismo energético) está presente en mayores cantidades en el músculo alar de insectos que presentan actividad de vuelo en relación con aquellos que no inician el vuelo (Soares y Santoro, 2000). Recientemente, Gurevitz *et al.* (2006), mostraron que la mayoría de los adultos de *T. infestans* colectados en el campo podían dividirse en dos grupos, el primero compuesto por insectos con probabilidad elevada de iniciar el vuelo y el segundo constituido por insectos con probabilidad muy baja o nula para iniciar la actividad de vuelo. Estas diferencias no están ligadas al género, edad del adulto, peso, estado nutricional, razón peso/largo o azar, sino más bien por el polimorfismo hallado en los músculos alares. Dentro de una misma población de adultos de *T. infestans* existen individuos con músculos alares que les permiten iniciar el vuelo y otros que carecen de estos (Gurevitz *et al.*, 2006).

A lo largo de varios estudios se observaron diferencias pronunciadas en la actividad de vuelo entre sexos aunque con resultados contradictorios ya que los machos de *T. infestans* parecerían volar ligeramente más (Espínola, 1973; Ceballos *et al.*, 2005) o levemente menos que las hembras (Lehane y Schofield, 1982). En coincidencia con los últimos resultados, los machos de esta especie mostraron una menor proporción del inicio de vuelo que las hembras en estudios de campo (Schofield *et al.*, 1991). Asimismo, Gurevitz *et al.* (2006) observaron una asociación entre la edad y el sexo en *T. infestans* revelando que las hembras presentan un pico de actividad de inicio de vuelo a las 4 semanas de edad y los machos a las 3 semanas luego de la ecdisis imaginal.

3. Factores implicados en la orientación del vuelo de triatominos

La luz es una clave comúnmente utilizada por los animales como referencia para la orientación espacial. Muchos insectos, en particular aquellos que se dispersan durante la noche por medio del vuelo, utilizan la luz reflejada por la luna como referencia espacial para

mantener su trayectoria. Minoli y Lazzari (2006) demostraron, en estudios de laboratorio, que *T. infestans* y *R. prolixus* exhiben una verdadera atracción hacia la luz blanca y descartaron que el arribo a una fuente luminosa sea por simple azar. Estos autores mostraron una mayor proporción de inicio de vuelo en *R. prolixus* comparado con *T. infestans*, y fueron las hembras de ambas especies las que mostraron una mayor tendencia de vuelo. Mediante la utilización de trampas de luz en áreas rurales de la Argentina, Vazquez-Prokopec *et al.* (2004) colectaron exitosamente adultos de *T. infestans* que arribaban volando. La captura de varias especies de triatomíneos con trampas de luz ha sido reiteradamente observada en áreas endémicas confirmando que estas fuentes pueden inducir la atracción de adultos voladores (Sjogren y Ryckman, 1966; Tonn *et al.*, 1978; Schweigmann *et al.*, 1988; Noireau *et al.*, 2000; Noireau y Dujardin, 2001; Vazquez-Prokopec *et al.*, 2004; Minoli y Lazzari, 2006). Además, Carbajal de la Fuente *et al.* (2007) mostraron que se pueden capturar ejemplares de las especies *Triatoma brasiliensis* y *Triatoma pseudomaculata* mediante la utilización de trampas de luz en su ambiente selvático en el noroeste de Brasil. Esta tendencia que exhiben las vinchucas a volar hacia fuentes de luz, forma parte también de relatos de los habitantes de zonas rurales, que hacen mención del arribo de vinchucas que llegan volando, en particular, hacia la luz de sus viviendas, ya sea luz eléctrica o de candiles de kerosén.

Existe evidencia consistente que da prueba de la comunicación sexual mediada por claves químicas en diversas especies de vinchucas. Sin embargo, hasta el presente, no se reveló relación alguna entre la comunicación química y la modulación del comportamiento del vuelo en triatomíneos en el contexto sexual.

En este capítulo se estudió la existencia de una relación entre la comunicación entre sexos y el inicio del vuelo, mediada a través de señales químicas utilizando a *R. prolixus* como modelo experimental.

Parte I. VUELO EN PRESENCIA DE UNA CORRIENTE DE AIRE

El viento es el principal responsable de la dispersión de los estímulos olfativos y los insectos utilizan el viento para orientarse hasta las fuentes de olor. Cuando un individuo se orienta utilizando corrientes de aire como pistas direccionales, presenta un comportamiento de anemotaxis. Las corrientes turbulentas pueden arrastrar filamentos de olor concentrados a grandes distancias (decenas o centenas de metros) o también pueden reducir rápidamente la concentración de los volátiles a pocos centímetros de la fuente. La orientación de los insectos en los ambientes naturales es el resultado de una mezcla de reacciones quimiotácticas, optomotoras y anemotácticas (Miller y Roelofs, 1980; Murlis *et al.*, 2000).

En esta Parte I se estudiará si el comportamiento de inicio del vuelo puede ser disparado por la presencia de olores provenientes de conespecíficos adultos. Analizaremos también si la orientación del despegue de las vinchucas está modulada por la presencia de señales sexuales químicas arrastradas por corrientes de aire. Posteriormente, se investigará el posible origen de estos olores en base a la oclusión alternada de los orificios de los dos tipos de glándulas exocrinas presentes en triatominos adultos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron machos y hembras adultos de *R. prolixus* y se trata de un modelo clásico en el estudio de la fisiología de insectos. Los ejemplares fueron provistos por el Servicio Nacional de Chagas (Santa María de Punilla -S: 31°23'56,1''; O: 64°10'55,7''-, provincia de Córdoba, Argentina) en estadios tempranos del desarrollo (larvas de 3° ó 4° estadio) o fueron criados desde huevos en nuestro insectario ubicado en el Bioterio Central (Sector Animales no tradicionales) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Los insectos eran

mantenidos a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, 30-60% HR, con un régimen de iluminación de 12:12 h luz:oscuridad y eran alimentados semanalmente sobre gallinas vivas. Se utilizaron adultos vírgenes en todos los ensayos para lo cual las larvas de 5° estadio eran separadas por sexo hasta la eclosión imaginal. Luego, las hembras y los machos adultos eran mantenidos en recipientes separados. Al momento de los ensayos se utilizaron adultos de 1 a 2 meses de edad y con un ayuno de 14 hasta 25 días.

Diseño Experimental

Los ensayos se realizaron en una carpa de vuelo modificada a partir del dispositivo propuesto por Minoli y Lazzari (2006). Este dispositivo experimental consistió en un cubo de tela de tul semitransparente (2 x 2 x 2 m); en el centro de la misma una arena experimental circular de acrílico (15 cm de diámetro x 5 cm de altura) se hallaba suspendida sobre una plataforma de madera a 1 m del suelo y sostenida mediante hilos de nylon (Fig. 2.1). Un cilindro de madera (1,5 cm de diámetro x 15 cm de altura) estaba fijado en el centro de la arena circular que presentaba en su ápice una “plataforma de vuelo” desde la cual los insectos podían iniciar el vuelo y abandonar la arena (Fig. 2.2). Los insectos sólo podían abandonar la arena experimental mediante el vuelo ya que la tapa que cubría parcialmente la arena estaba revestida internamente con vaselina sólida (Parafarm, Alemania) impidiendo a los insectos trepar por las paredes del dispositivo. La tapa de la arena circular presentaba un orificio central (8 cm de diámetro) atravesado por un cilindro de madera (“mástil”) que permitía a los insectos trepar hacia la plataforma de vuelo (Fig. 2.2 y 2.3).

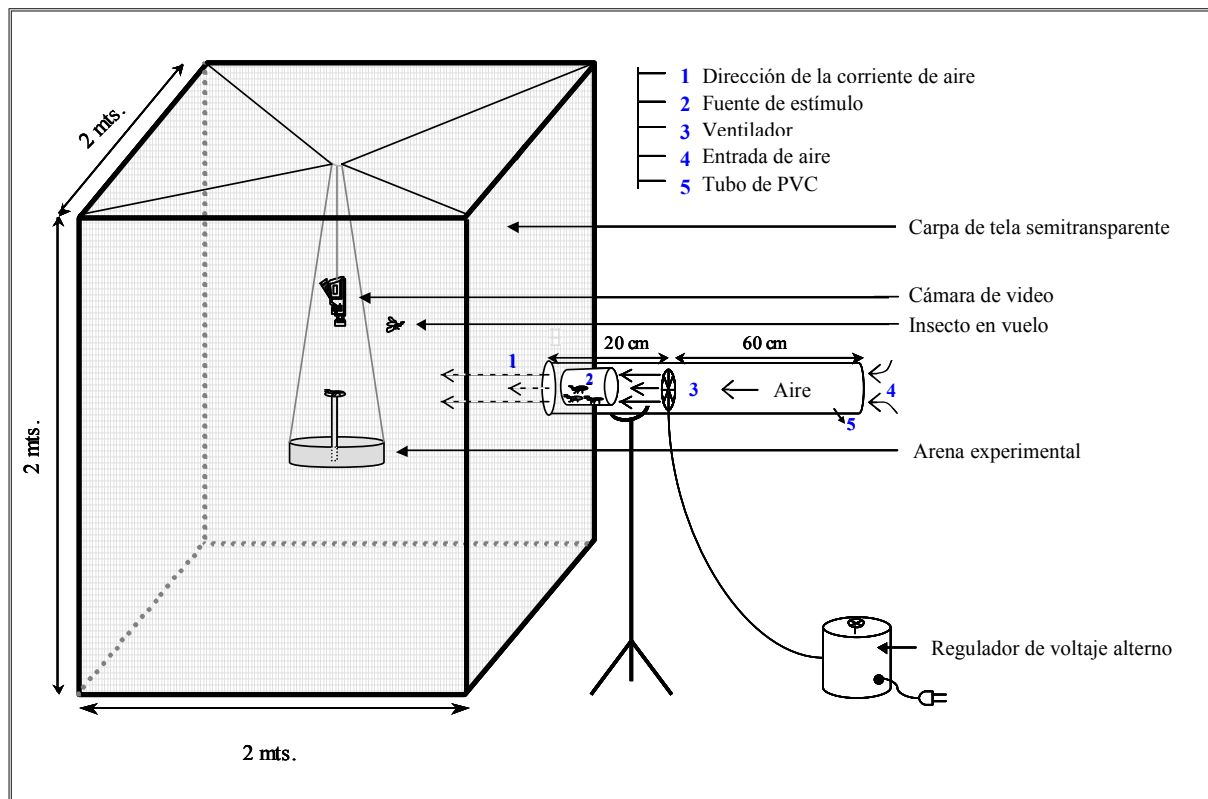


Figura 2.1. Dispositivo experimental *carpa de vuelo* utilizado para estudiar el inicio del vuelo de *R. prolixus*. La arena experimental estaba suspendida en el centro de la carpa (ver detalle en Fig. 2.2). La fuente de estímulo (2) se antepone a una corriente de aire que era generada por un ventilador (3) y alcanzaba la arena experimental a 1 m de distancia. (adaptado de Minoli y Lazzari, 2006).

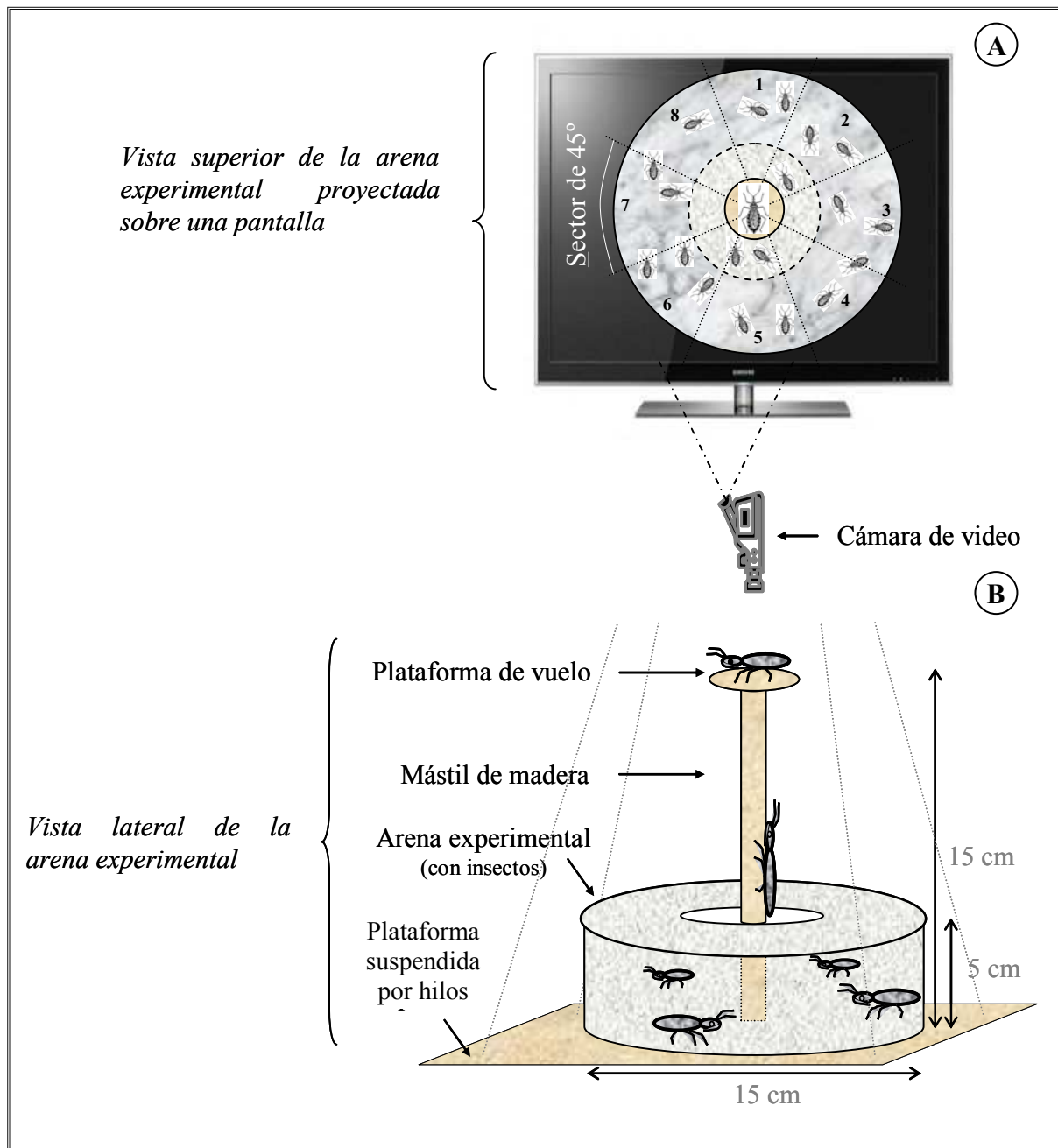


Figura 2.2. Detalle de la arena experimental situada dentro de la carpa de vuelo. **A)** Vista superior de la arena que se proyectaba en un monitor. Para el análisis cuantitativo de los ensayos, la imagen era dividida arbitrariamente en ocho sectores iguales. La posición del estímulo estaba alineada con el sector *I*. **B)** Los insectos liberados dentro de la arena podían caminar libremente, trepar por el mástil de madera o iniciar el vuelo desde la plataforma (adaptado de Minoli y Lazzari, 2006).

Cada ensayo consistía en liberar un grupo de 20 insectos adultos del mismo sexo en el interior de la arena experimental y exponerlos a diversos estímulos olfativos. El ensayo comenzaba cuando los 20 insectos eran colocados delicadamente dentro de la arena experimental (Fig. 2.2) sin la manipulación con pinzas dado que los triatominos adultos secretan el contenido de sus glándulas de Brindley y metasternales cuando se los perturba mecánicamente (*e.g.*, mediante manipulación con pinzas, movimientos bruscos) (Manrique *et al.*, 2006 en *T. infestans*). Luego de esto, los insectos podían caminar libremente en la arena y sólo podían abandonar la arena al iniciar el vuelo desde la plataforma (Fig. 2.2 y 2.3). Los ensayos se iniciaban al comienzo de la fase de oscuridad (18:00) y tenían una duración de 8 h. Este período de experimentación fue elegido dado que durante la escotofase estos insectos despliegan su mayor actividad (Espínola, 1973; Núñez, 1987; Lazzari, 1991; 1992; Lorenzo y Lazzari, 1993; Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994; Lorenzo y Lazzari, 1996).

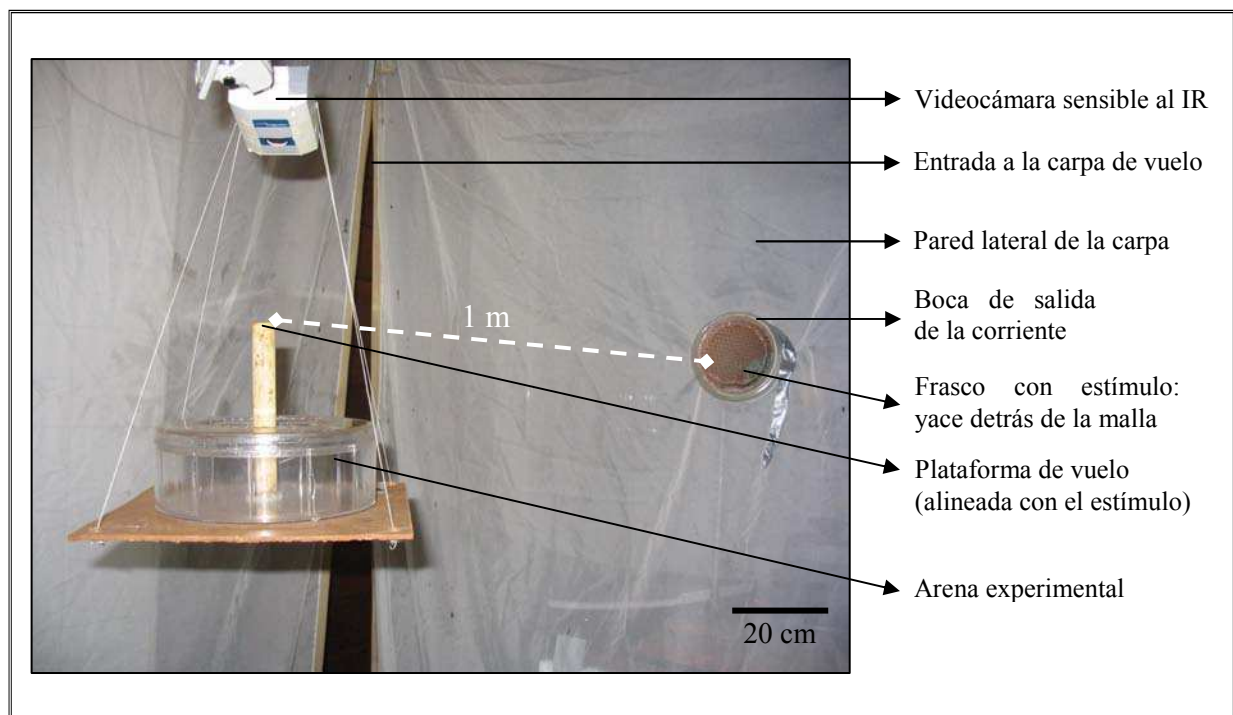


Figura 2.3. Vista interior de la carpa de vuelo. La arena experimental está suspendida en el centro de la carpa. La salida de la corriente de aire está alineada con la plataforma de vuelo (línea blanca discontinua). La boca del tubo está cerrada con una malla plástica con orificios de 4 mm de diámetro.

Los insectos eran entrenados, previamente a los ensayos, durante 5 días a un fotoperíodo de 12 (06:00-18:00):12 h (18:00-06:00) luz:oscuridad con el objetivo de sincronizar a todos los individuos a este ciclo de luz.

Para permitir el monitoreo de los insectos la arena era iluminada con diodos emisores de luz infrarroja (IR) de 900 nm (o LEDs, *Light-Emitting Diode*) y videofilmada con una cámara sensible al IR (Videoman, JCC-300, Korea) de manera tal que el comportamiento de los insectos podía ser registrado en completa oscuridad. La luz infrarroja no es percibida por las vinchucas (Reisenman *et al.*, 1998). La cámara se conectaba a una video grabadora con secuencia de video acelerada (*Time Lapse Video Cassette Recorder* - Samsung, SLV-960JP, Korea) para poder grabar en forma continua la actividad de vuelo de los insectos durante las 8 h de duración de cada ensayo. Para la cuantificación del comportamiento y análisis de los datos, las grabaciones de los ensayos eran reproducidas sobre la pantalla de un monitor de televisión.

La difusión espontánea de los volátiles está condicionada, mayormente, por el valor de la presión atmosférica y la temperatura ambiente. Mientras más alta sea la temperatura, mayor será la cantidad de compuesto que se evapore. Si en una habitación con volátiles hay una corriente de aire, entonces además de la difusión, las moléculas de los compuestos son arrastradas en el sentido de la corriente. Por esta razón se generó una corriente de aire de velocidad controlada delante de la cual se colocaban los distintos compuestos químicos o estímulos, siempre a una temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. De este modo, la corriente de aire arrastraba los olores desde el frasco contenedor de estímulos hasta la posición de inicio de vuelo de los insectos en la arena experimental. La corriente era generada por un ventilador eléctrico (8 cm de diámetro) fijado transversalmente en el interior de un tubo de PVC (85 cm de largo x 12 cm de diámetro) (referencia 3 en Fig. 2.1). Dicho tubo estaba localizado a 1 m de altura por fuera de la carpa de vuelo y conectado a una de las paredes de la carpa (Fig. 2.3),

alineado con la posición de la plataforma de vuelo. El extremo del tubo presentaba una malla de plástico que permitía el pasaje de la corriente de aire y los olores arrastrados por esta, pero evitaba que los insectos experimentales entraran en contacto con la fuente de estímulo (Fig. 2.3). El ventilador generaba una corriente de aire tal que a 1 m de distancia (posición de la plataforma de vuelo) tenía una velocidad de $12 \pm 0,88$ cm/seg. La velocidad de la corriente se controlaba mediante un regulador de voltaje y se medía con un termo-anemómetro (Testo 405-V1, Alemania. Precisión del instrumento: $\pm 0,5$ cm/seg).

Análisis estadístico

Las diferencias en las frecuencias de inicio de vuelo fueron analizadas mediante estadística paramétrica lineal. Se realizaron análisis de varianza de dos factores (ANOVA) y se asumieron factores fijos (género -machos o hembras- y tipo de estímulo). La normalidad y homocedacia de los datos fueron verificadas (P-Plot y prueba de *Levene*, respectivamente) (Zar, 1984). En los casos en que se obtuvieron interacciones con el ANOVA, se realizaron pruebas de Efectos Simples y comparaciones *post hoc* con la prueba de *Tukey*.

En cada ensayo se cuantificó, **a)** el número total de insectos que iniciaron el vuelo desde la plataforma de vuelo *i.e.*, activación y **b)** la dirección elegida por cada insecto durante el despegue *i.e.*, orientación. La primera variable era registrada para evaluar la activación del insecto en respuesta a los olores ofrecidos como estímulos olfativos, mientras que la segunda era considerada para evaluar la orientación del inicio de vuelo bajo las mismas condiciones. Los datos de cada serie experimental se calcularon como la proporción de insectos que iniciaron el vuelo en cada ensayo como indicativo de la *activación*; y como la proporción de insectos que iniciaron el vuelo hacia alguno de los ocho sectores, como indicativo de *orientación*.

Dado que la arena experimental era circular, la pantalla sobre la cual se proyectaba la imagen fue arbitrariamente dividida en ocho sectores iguales (vista superior de Fig. 2.2). Se utilizó estadística circular para el análisis de las direcciones elegidas por los insectos durante el despegue (Batschelet, 1965; Zar, 1984; Fisher, 1993). Este tipo de análisis permite evaluar componentes como la dirección promedio elegida por los animales durante el inicio de vuelo (ángulo medio o $\alpha\mu$) así como también la intensidad con la que los individuos mantuvieron una dirección determinada (largo del vector resultante o r). Los valores del $\alpha\mu$ varían entre 0° y 360° , mientras que los valores de r pueden variar entre 0 y 1 (0 indica una dirección media no definida o azarosa y 1 denota un inicio del vuelo determinado). La posición de la corriente de aire fue situada arbitrariamente a 0° (sector 1, Fig. 2.2). Por lo tanto, durante los experimentos se evaluó la orientación de los individuos con respecto a la dirección angular 0° .

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando la prueba de *Rayleigh* en la que se propone como hipótesis nula H_0 : *la población de datos se encuentra uniformemente distribuida alrededor de un círculo*, esto implica que no hay dirección de despegue definida, y como hipótesis alternativa H_a : *la población de datos no sigue una distribución uniforme*. Cuando se rechazaba la H_0 , o sea, cuando los datos se apartaban significativamente de una distribución uniforme, se aplicaba la prueba V (Greenwood y Durand, 1955; Durand y Greenwood, 1958) para evaluar si el ángulo medio ($\alpha\mu$) calculado era estadísticamente distante del ángulo medio esperado (*i.e.*, la posición de la corriente de aire a 0°).

PROCEDIMIENTOS PARTICULARES Y RESULTADOS

1. Reconocimiento químico del sexo opuesto: activación y orientación del inicio de vuelo en *R. prolixus*

La fuente de estímulo que generaba los olores consistía en un grupo de 10 insectos adultos, hembras o machos, contenidos en el recipiente de acrílico cuyos extremos estaban cerrados con una malla plástica (malla: 0,2 cm diámetro). El recipiente con los insectos utilizados como estímulo era colocado dentro del tubo de PVC frente a la corriente de aire provista por el ventilador (referencia 2 en Fig. 2.1). De esta manera, la corriente de aire generada por el ventilador pasaba a través de la malla de plástico del recipiente que contenía a los insectos y arrastraba los olores hasta la plataforma de vuelo, a 1 m de distancia desde donde los insectos puestos a prueba podían percibirlos.

Las series experimentales consistieron en estimular un grupo de 20 individuos adultos (machos o hembras) de *R. prolixus* a una corriente de aire que arrastraba olores provenientes de conespecíficos:

- a) 20 machos estimulados con aire limpio sin olores de conespecíficos;
- b) 20 machos estimulados con una corriente de aire con olores de 10 machos;
- c) 20 machos estimulados con una corriente de aire con olores de 10 hembras;
- d) 20 hembras estimuladas con aire limpio sin olores de conespecíficos;
- e) 20 hembras estimuladas con una corriente de aire con olores de 10 machos;
- f) 20 hembras estimuladas con una corriente de aire con olores de 10 hembras.

Se realizaron cuatro réplicas para cada serie experimental.

Para evitar la dependencia de datos, cada ejemplar fue utilizado una sola vez en los ensayos experimentales.

Resultados

Los insectos que iniciaban el vuelo y abandonaban la arena experimental trepaban primero por el cilindro de madera y luego de sondear brevemente con sus antenas la corriente de aire, iniciaban el despegue. Los dos factores puestos a prueba, género (macho o hembras) y tipo de estímulo reveló una interacción significativa (ANOVA de 2 factores, $F_{(2, 18)}=12,63$; $p<0,001$) que indica que los machos y las hembras responden de manera diferente a los estímulos (corriente de aire limpio, olores de machos u olores de hembras) presentados. La frecuencia de activación del inicio de vuelo de los machos varió significativamente en función del estímulo presentado ($F_{(2, 18)}=11,94$; $p<0,001$) y mostraron una mayor activación cuando estaban en presencia de una corriente de aire que arrastraba olores de hembras. La frecuencia de inicio de vuelo de los machos fue significativamente mayor en presencia de las hembras (83%) que en presencia de una corriente de aire limpio (34%) (*Tukey*, $p<0,05$) o que en presencia de olores de otros machos (38%) (*Tukey*, $p<0,05$) (Figura 2.4). Además, no se detectaron diferencias significativas entre la activación del vuelo de los machos en presencia de olores de machos o de una corriente de aire limpia (*Tukey*, N.S.). En contraste, las hembras responden de manera similar frente a todos los estímulos olfativos ofrecidos, ya que en presencia de una corriente de aire limpio (38%), frente a una corriente de aire con olores de machos (48%) o en presencia de una corriente de aire con olores de hembras (21%) no fueron encontradas diferencias significativas en las frecuencias de inicio del vuelo ($F_{(2, 18)}= 2,85$, $p=0,08$). Por otro lado, la activación del vuelo entre sexos no presenta diferencias ya que los machos y las hembras inician el vuelo en frecuencias similares en presencia de una corriente de aire limpio ($F_{(1, 18)}=0,12$; $p=0,74$) (Fig. 2.4).

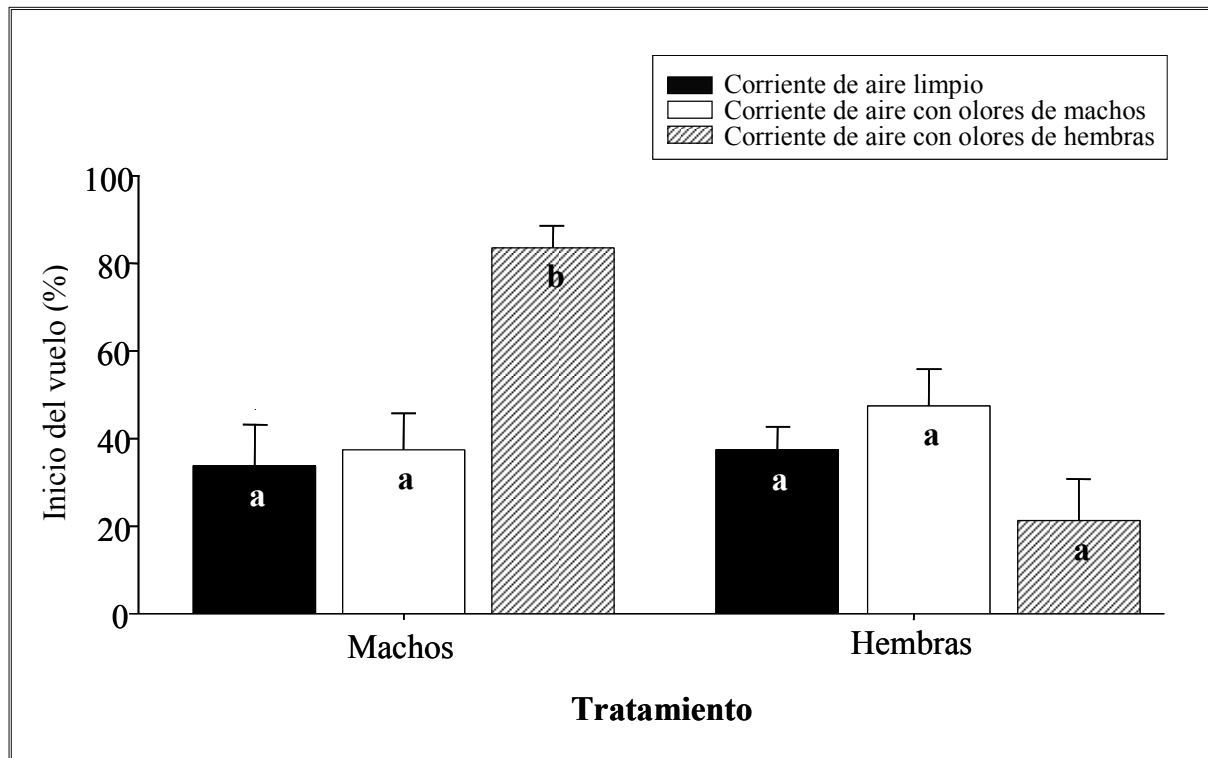


Figura 2.4. Frecuencia media \pm E.S. de inicio del vuelo de machos y hembras de *R. prolixus* estimulados con una corriente de aire cargada de olores de conespecíficos. Las letras (a,b) indican diferencias estadísticas entre los grupos experimentales (*Tukey*, $p < 0,05$).

La capacidad de orientarse en relación a la posición del estímulo se representa en los histogramas circulares de la figura 2.5. Los machos presentaron una clara orientación del despegue hacia el sector donde estaba colocada la fuente de corriente de aire ya sea en presencia o en ausencia de olores de conespecíficos (*Rayleigh*: $p < 0,001$; prueba *V*: $p < 0,001$ en todos los casos) (Fig. 5 A-C) (Tabla 2.1). Por su parte, las hembras mostraron resultados similares a los machos presentando un inicio del vuelo direccionado hacia la fuente de corriente de aire limpia o cargada con olores de machos o de hembras (*Rayleigh*: $p < 0,05$; prueba *V*: $p < 0,05$) (Fig. 2.5 D-F) (Tabla 2.1).

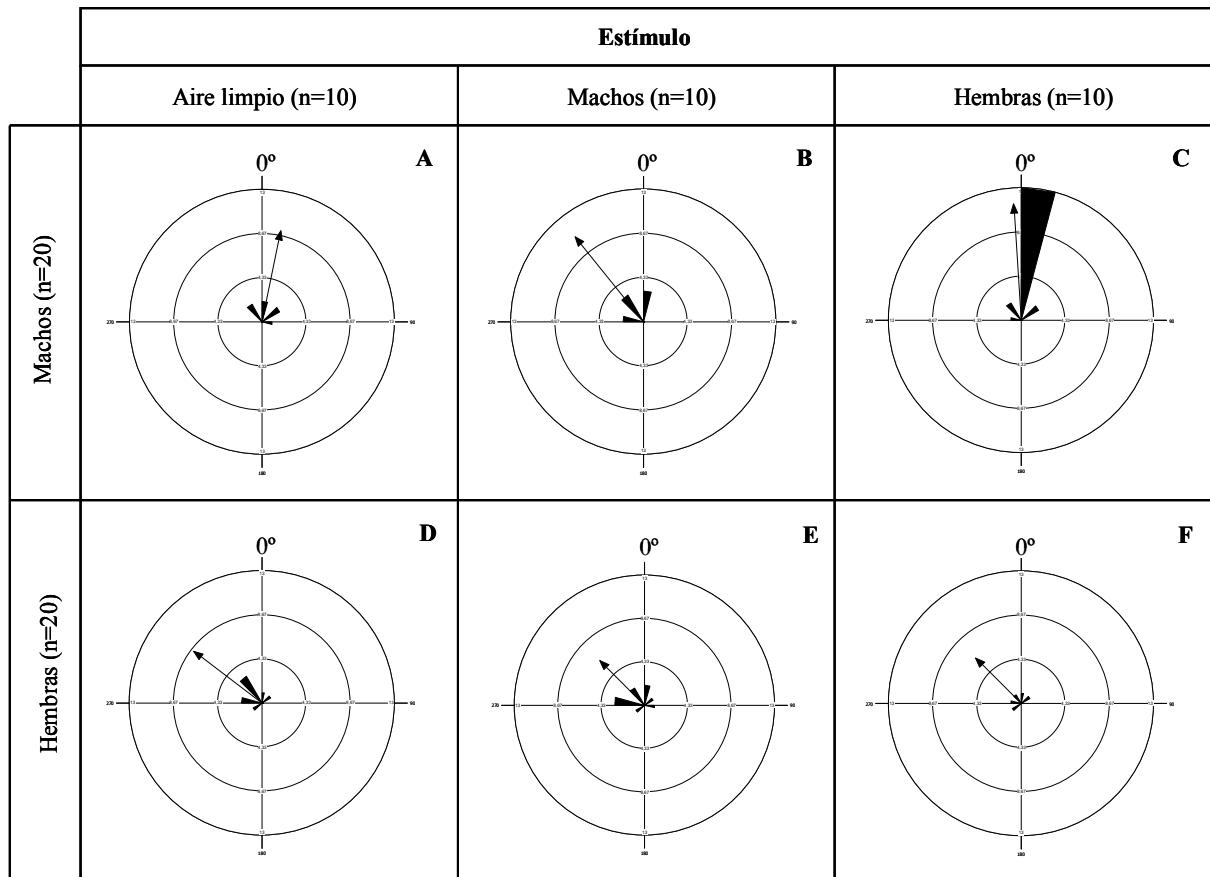


Figura 2.5. Orientación del inicio del vuelo de machos y hembras de *R. prolixus* estimulados con una corriente de aire cargada de olores de conespecíficos. La flecha en cada diagrama indica el vector resultante r . La posición de la corriente de aire estaba alineada en 0° para todos los casos. Cada círculo concéntrico tiene un valor de 1,33 y representa el número medio de insectos que iniciaron su vuelo en esa dirección.

Grupo puesto a prueba	Estímulo	Vector medio (μ)	Longitud de μ (r)	Prueba de Rayleigh	prueba V
Machos	Aire limpio	10.911°	0,627	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	Olores de machos	324.255°	0,948	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	Olores de hembras	0.383°	0,881	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Hembras	Aire limpio	316.025°	0,56	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	Olores de machos	307.875°	0,526	$p < 0,001$	$p = 0,003$
	Olores de hembras	339.216°	0,772	$p < 0,001$	$p < 0,001$

Tabla 2.1. Análisis estadístico de la orientación del inicio del vuelo de machos y hembras de *R. prolixus* estimulados con una corriente de aire cargada con olores de conespecíficos.

Modulación temporal de la respuesta

En los ensayos experimentales mostrados en la Figura 2.6 fue posible determinar que la mayoría de los insectos que iniciaban su vuelo, lo hacían durante las primeras horas de la fase oscura, tanto en machos como en hembras (Fig. 2.6 A y B, respectivamente).

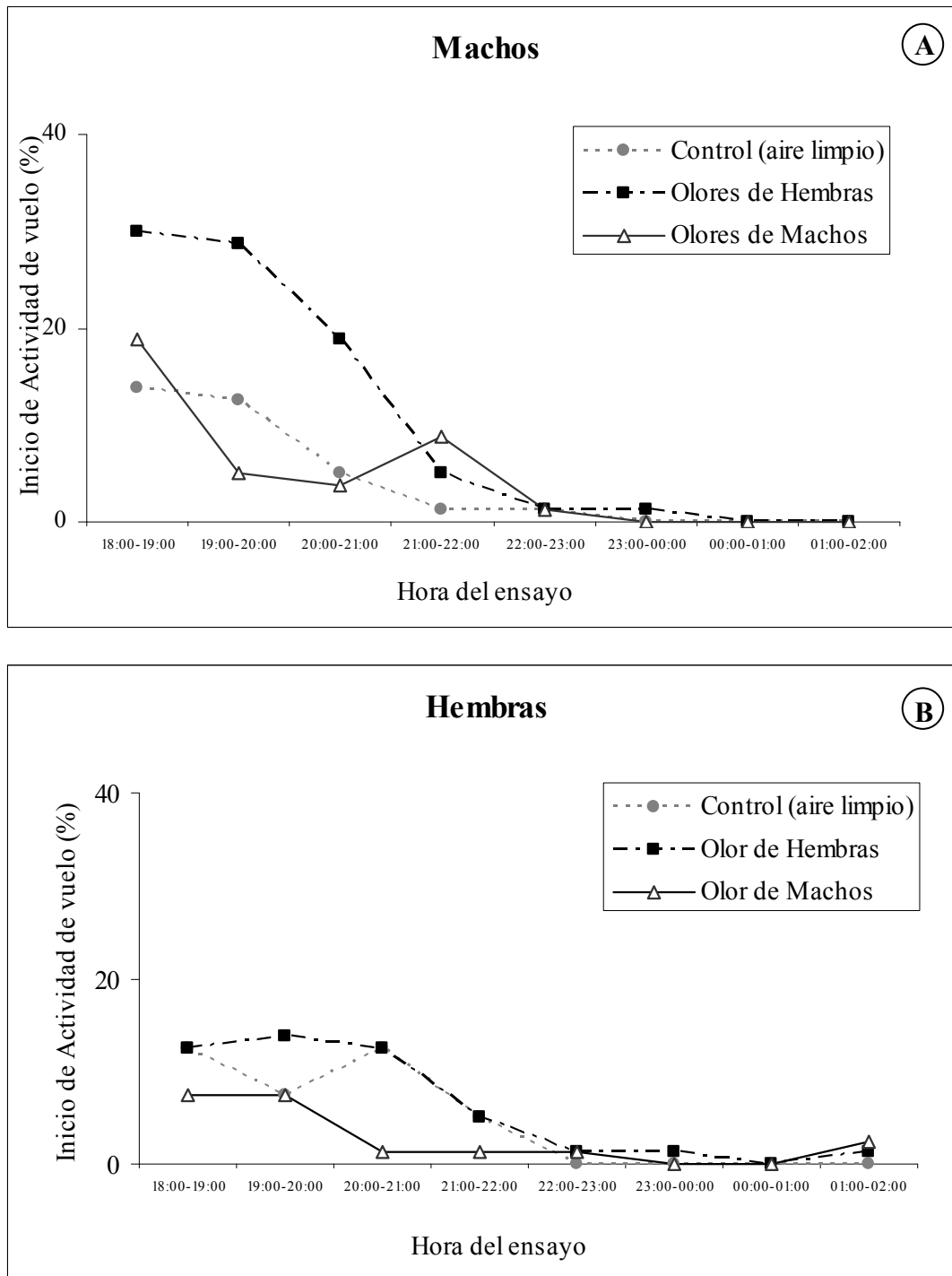


Figura 2.6. Frecuencia de inicio del vuelo en función de la hora de ensayo. **A)** Machos; **B)** Hembras de *R. prolixus*.

2. Papel de las glándulas metasternales y de Brindley de las hembras sobre la activación del inicio del vuelo de los machos.

El diseño experimental, la metodología y el sistema de estimulación descritos en el punto anterior fueron utilizados nuevamente en esta sección con el objetivo de explorar el origen de la fuente emisora de los volátiles responsables de la activación del vuelo en machos de *R. prolixus*. En base a los resultados antes mencionados que muestran que son los machos los que vuelan activamente en dirección a las hembras, nos centramos en analizar una posible relación entre las glándulas exocrinas de las hembras y el inicio de vuelo de los machos.

Para identificar la fuente de los olores que estimulan el vuelo de los machos, se ocluyeron alternadamente los orificios de las glándulas de Brindley y/o metasternales de las hembras. Para ello, se utilizó parafina (temperatura de fusión 56°-58°C, ANEDRA, Argentina) fundida con un microcauterio (Max Wax, wax-pen #2, USA) (Fig. 2.7). Las oclusiones se realizaban 24 h antes de la realización de los ensayos de vuelo (Crespo y Manrique, 2007).

Las series experimentales consistieron en exponer un grupo de 20 machos de *R. prolixus* y se los enfrentados a una corriente de aire que arrastraba olores provenientes de:

- a) 10 hembras intactas;
- b) 10 hembras con los orificios de sus glándulas de Brindley ocluidas;
- c) 10 hembras con los orificios de sus glándulas metasternales ocluidas;
- d) 10 hembras con los orificios de ambas glándulas (metasternales y de Brindley) ocluidas;
- e) 10 hembras *sham* (manipuladas del mismo modo que las hembras en b), c) y d) pero sin ocluir los orificios de salida de sus glándulas, aplicando escamas de parafina sobre las coxas de las patas I).

Para evitar la dependencia de datos, cada ejemplar fue utilizado una sola vez en los ensayos experimentales.

Se realizaron cuatro réplicas para cada serie experimental.

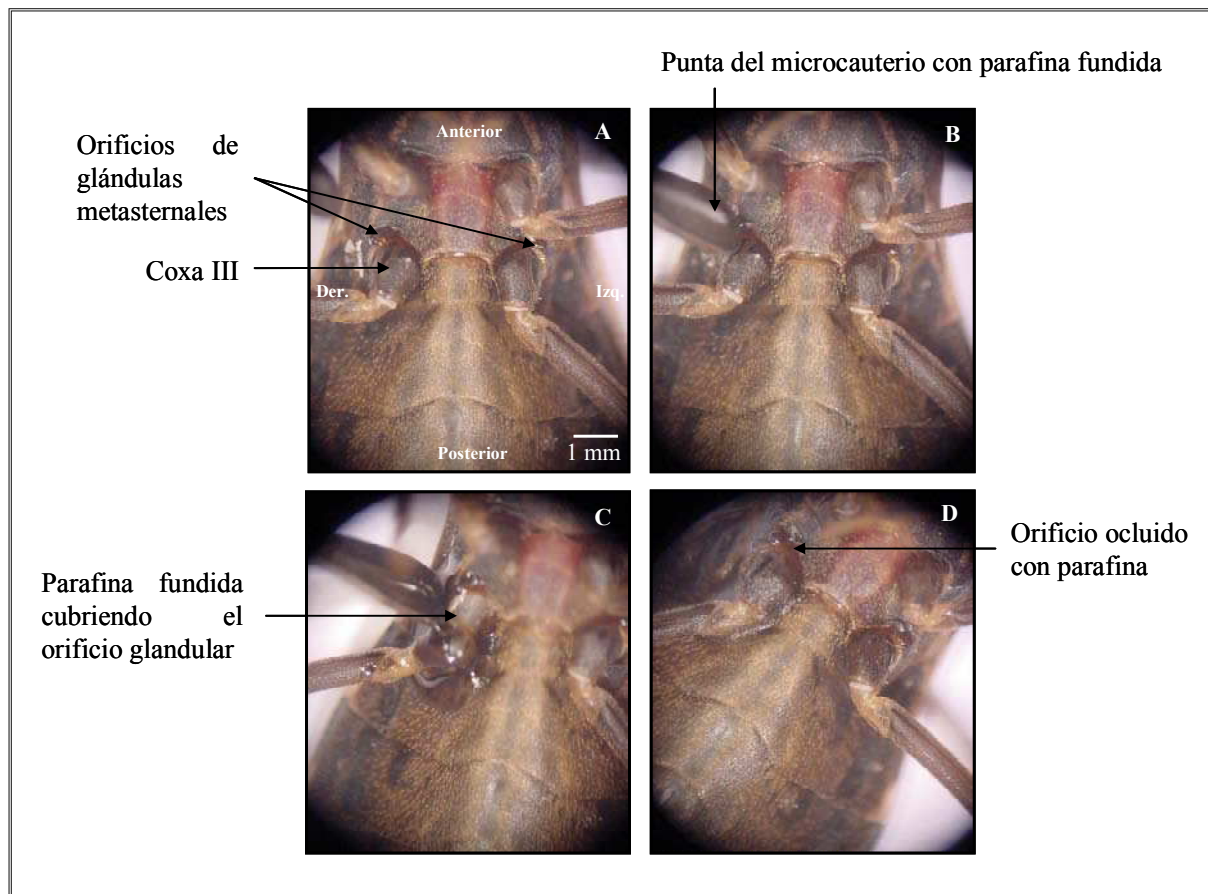


Figura 2.7. Oclusión de las glándulas metasternales. A-D: Secuencia del procedimiento de oclusión de uno de los dos orificios glandulares; se muestra la parte posterior del tórax y la anterior del abdomen de una hembra de *R. prolixus* en vista ventral. **A)** Ubicación del orificio de salida de la glándula metasternal derecha por delante de la coxa de la pata III. **B)** Microcauterio listo para colocar parafina líquida sobre el orificio. **C)** Orificio de salida de la glándula totalmente cubierto con parafina líquida. **D)** Orificio sellado con parafina ya solidificada. **Der:** derecha; **Izq:** izquierda. (Fotografías: Gina B. Pontes).

Resultados

La frecuencia de inicio de vuelo de los machos reveló un efecto significativo del tratamiento ($F_{(4, 15)}=19,95$; $p<0,001$). El 83% de los machos iniciaron el vuelo en presencia de una corriente de aire que arrastraba olores de hembras intactas (Fig. 2.8). No se encontraron diferencias significativas entre la frecuencia de vuelo de los machos confrontados con olores de hembras intactas y de hembras con sus glándulas de Brindley ocluidas (74%) (Tukey, N.S.). Sin embargo, una menor proporción de machos iniciaron el vuelo cuando fueron estimulados con hembras con glándulas metasternales ocluidas (24%, Tukey: $p<0.05$) (Fig. 2.8) o cuando los orificios de ambos tipos de glándulas estaban ocluidos simultáneamente (23%), sin encontrarse diferencias entre éstos últimos dos tratamientos (Tukey, N.S.). A modo de control, los machos que fueron puestos a prueba con hembras *sham* presentaron una frecuencia de despegue del 73%, que no difirió significativamente con los resultados obtenidos de los machos estimulados con olores de hembras intactas (*i.e.*, la manipulación con parafina sobre las hembras no afecta la respuesta comportamental de vuelo de los machos) o de hembras con los orificios de sus glándulas de Brindley ocluidas (Tukey, N.S.).

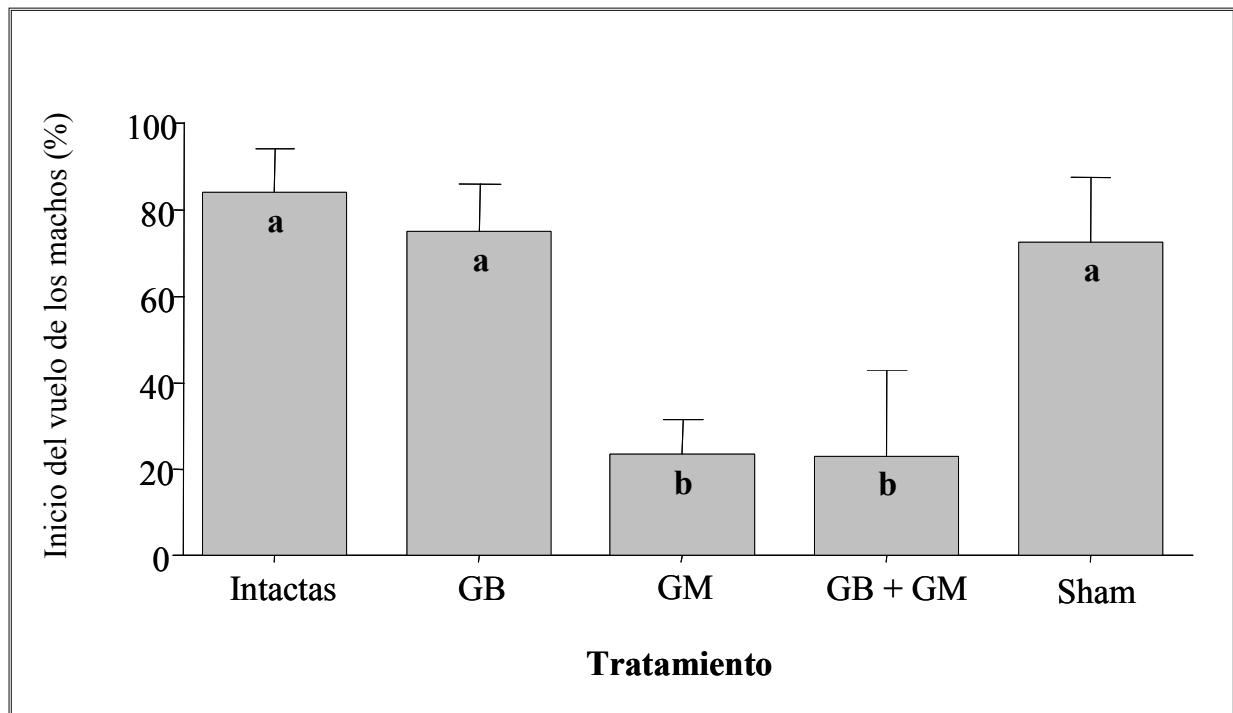


Figura 2.8. Frecuencia media \pm E.S. de inicio del vuelo de machos de *R. prolixus* estimulados con una corriente de aire cargada de olores de hembras con oclusión alternada de las glándulas metasternales. **Intactas**: hembras no manipuladas; **GB**: hembras con los orificios de salida de las glándulas de Brindley ocluidas; **GM**: hembras con los orificios de salida de las glándulas metasternales ocluidas; **GB+GM**: hembras con los orificios de salida de las glándulas de Brindley y metasternales ocluidas; **Sham**: hembras manipuladas con parafina sin cubrir ningún orificio de salida glandular. Las letras (a,b) indican diferencias estadísticas entre los grupos experimentales (Tukey, $p < 0,05$).

El inicio del vuelo de los machos se mostró direccionado hacia la fuente de corriente de aire en todos los casos experimentales (Fig. 2.9) (Tabla 2.2).

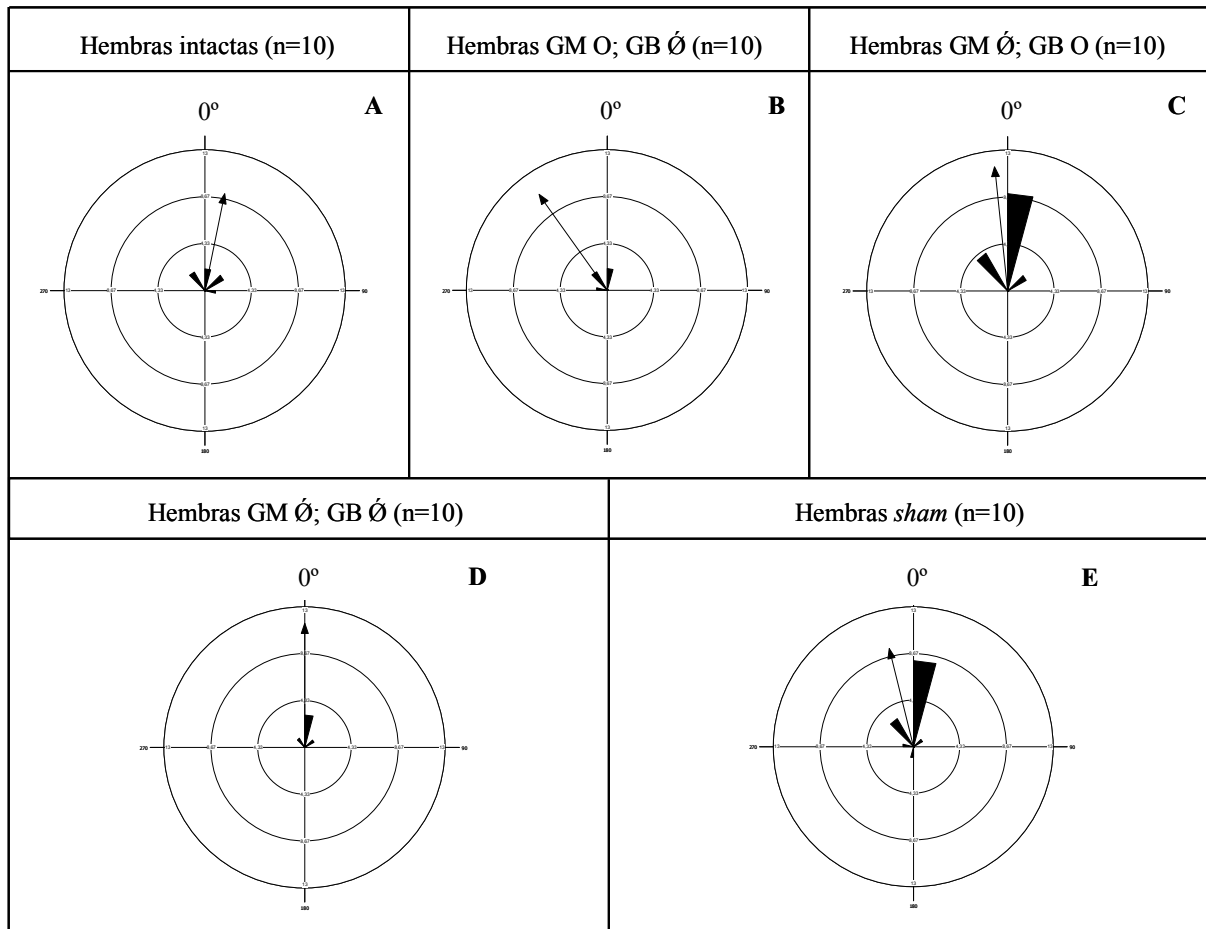


Figura 2.9. Orientación del inicio del vuelo de machos *R. prolixus* estimulados con una corriente de aire cargada de olores de hembras con oclusión alternada de las glándulas metasternales. **Hembras intactas:** hembras no manipuladas; **Hembras GM O; GB Ø:** hembras con los orificios de salida de las glándulas de Brindley ocluidas; **Hembras GM Ø; GB O:** hembras con los orificios de salida de las glándulas metasternales ocluidas; **Hembras GM Ø; GB Ø:** hembras con los orificios de salida de las glándulas de Brindley y metasternales ocluidas; **Hembras sham:** hembras manipuladas con parafina sin cubrir ningún orificio de salida glandular. La flecha en cada diagrama indica el vector resultante *r*. La posición de la corriente de aire estaba alineada en 0° para todos los casos. Cada círculo concéntrico tiene un valor de 1,33 y representa el número medio de insectos que iniciaron su vuelo en esa dirección.

	Estímulo	Vector medio (μ)	Longitud de μ (r)	Prueba de <i>Rayleigh</i>	prueba V
	Hembras intactas	0.383°	0,881	p<0,001	p<0,001
	GM ocluidas	325.922°	0,806	p<0,001	p<0,001
Machos	GB ocluidas	355.432°	0,877	p<0,001	p<0,001
	GM + GB ocluidas	16.578°	0,836	p<0,001	p<0,001
	<i>Sham</i>	346.145°	0,808	p<0,001	p<0,001

Tabla 2.2. Análisis estadístico de la orientación del inicio del vuelo de machos de *R. prolixus* estimulados con corrientes de aire cargadas con olores de hembras con oclusión alternada de las glándulas metasternales. **GM:** Orificios de las glándulas metasternales; **GB:** orificios de glándulas de Brindley.

3. Respuesta de machos de *R. prolixus* a extractos de glándulas metasternales de hembras

A partir de los resultados del punto anterior, se propuso a las glándulas metasternales como la fuente de olores responsable de estimular el inicio del vuelo de los machos en el contexto sexual. Para verificar fehacientemente dichos resultados, se prepararon extractos de glándulas metasternales extraídas de hembras por medio de disecciones selectivas bajo microscopio estereoscópico, y se probaron dichos extractos sobre el inicio del vuelo de los machos de *R. prolixus*.

Obtención de las muestras

Las extracciones de glándulas metasternales se realizaron manualmente bajo microscopio estereoscópico. En primer lugar y previo a la disección, se expuso a cada insecto a una temperatura de -18°C durante 3 a 5 min para reducir sus actividades metabólicas. La exposición al frío tiene un efecto anestésico que evita la perturbación del insecto durante su posterior manipulación y la consecuente pérdida de contenido de las glándulas. Una vez aletargadas por el frío, cada hembra fue colocada ventralmente hacia arriba y sujeta con masa de modelaje para dejar expuesto solamente el tórax y los primeros esternitos del

abdomen (Fig. 2.10-A y B). El insecto ya sujetado era completamente embebido en solución de Ringer (solución fisiológica para insectos, ver receta más adelante) para evitar que los tejidos se sequen y era utilizada inmediatamente luego de ser descongelada para minimizar la evaporación de los volátiles contenidos en las glándulas. Inmediatamente luego del montaje en la masa, se utilizó un micro-bisturí para cortar una pequeña porción de cutícula y retirar las glándulas metasternales localizadas en el metatórax lateral a ambos lados del cuerpo (Fig. 2.10). Cada glándula era retirada junto con una pequeña pieza de cutícula que incluía el orificio de apertura de la glándula (*ca.* 0,25 mm²) con la glándula adherida a ella (Fig. 2.10-C). Las glándulas eran colocadas inmediatamente en un vial de vidrio (2 ml), que se cerraba con una tapa de Teflón®/silicona, y mantenidas en hielo hasta el final de las disecciones. Cada muestra se completaba al coleccionar 10 glándulas (5 hembras). Las muestras control estaban compuestas por 5 pares de porciones de cutícula y tejido del mismo tamaño de las muestras glandulares pero extraídas del prosterno. Estas muestras control se obtenían de las mismas hembras de las que se extraían las glándulas metasternales en forma simultánea y no contenían tejido glandular (Fig. 2.10-B).

Solución Ringer para insectos (modificada de Case, 1957):

Solución base: 1000 ml. agua destilada, 7,5 g NaCl, 0,14 g NaHCO₃, 0,35 g KCl, 0,21 g CaCl₂, 2,5 g glucosa. Llevar a pH 7,0.

Buffer: 0,15 molar solución KH₂PO₄, 0,15 molar solución Na₂HPO₄

Ringer: 10 volúmenes de solución base + 1 volumen de buffer.

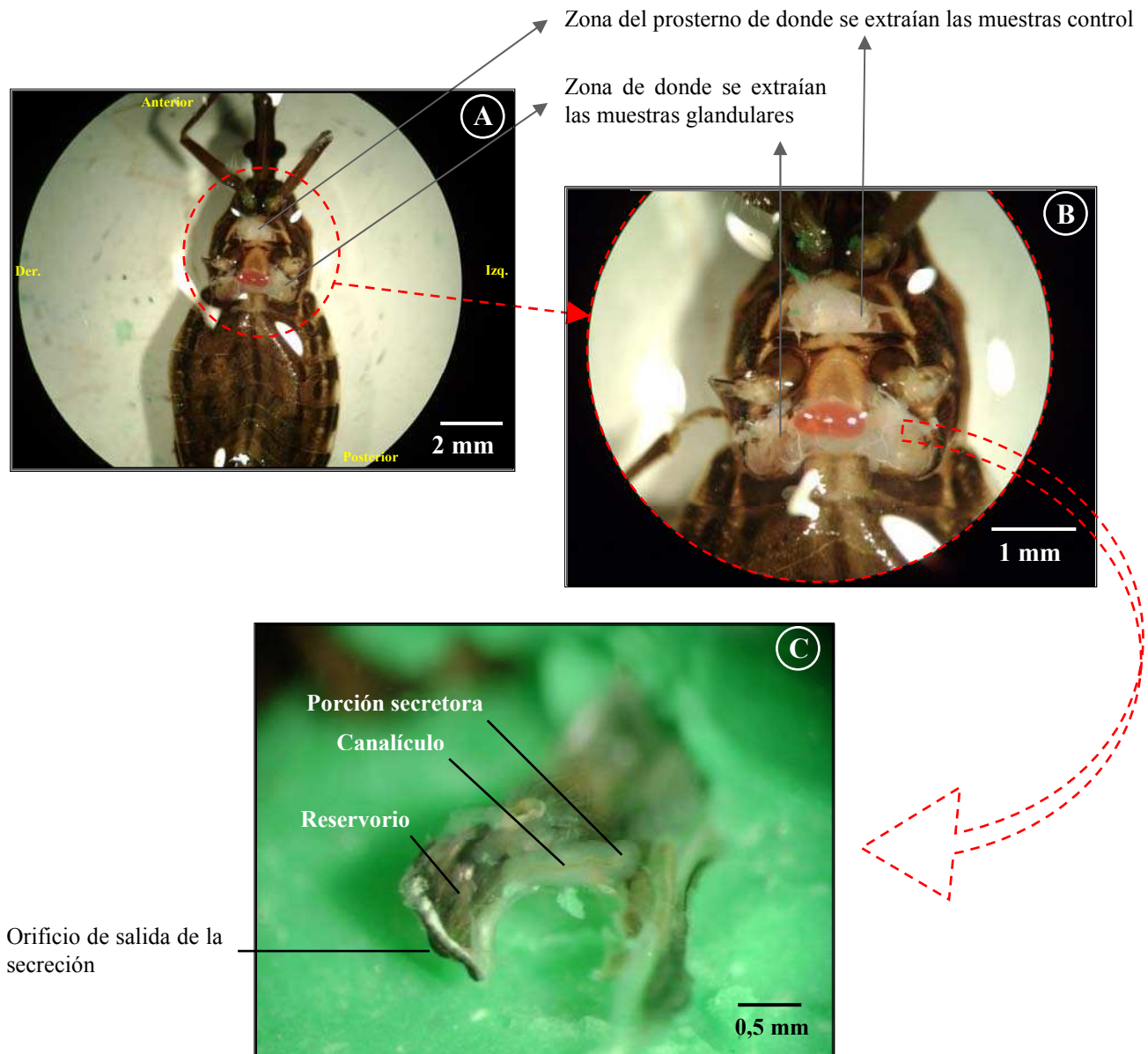


Figura 2.10. Primeros pasos de la disección de glándulas metasternales de hembras de *R. prolixus* (el procedimiento fue idéntico en hembras de *T. infestans*). **A)** vista ventral de la hembra inmersa en Ringer luego de la disección de las glándulas metasternales. **B)** Imagen aumentada de A). **C)** Glándula metasternal adherida a la cutícula (reservorio + parte secretora con canaliculo).

Procedimiento

La metodología de los ensayos de vuelo se realizaron en la carpa de la figura 2.1 y se procedió de la misma manera en que fue descrito anteriormente en este capítulo. Esta vez la presentación del estímulo consistió en exponer el vial de 2 ml con las muestras de glándulas metasternales o de cutícula (control) de las hembras frente a la corriente de aire. Cada muestra permanecía cerrada hasta el comienzo de cada ensayo y se la conservaba a -18°C . Previo al comienzo de cada ensayo, cada muestra era mantenida durante 1 hr. a temperatura ambiente (*ca.* 25°C) y luego calentada a 50°C por 15 min para favorecer la evaporación de los compuestos glandulares. Al iniciar cada ensayo, se removía la tapa del vial para así permitir que la corriente de aire arrastrara los volátiles de las muestras de glándulas contenidas en su interior (referencia 2 en Fig. 2.2).

Las series experimentales consistieron en exponer un grupo de 20 machos de *R. prolixus* enfrentados a una corriente de aire que arrastraba olores provenientes de:

- a) 10 hembras intactas;
- b) preparaciones de glándulas metasternales extraídas de hembras;
- c) preparaciones de cutícula y tejido no glandular de hembras.

Se realizaron cuatro réplicas para cada serie experimental.

Para evitar la dependencia de datos, cada ejemplar fue utilizado una sola vez en los ensayos experimentales.

Resultados

La frecuencia de inicio de vuelo de los machos fue significativamente diferente en función del estímulo puesto a prueba (ANOVA de 1 factor, $F_{(2, 9)}=13,75$; $p=0,002$). Los machos iniciaron su vuelo con una alta frecuencia en presencia de una corriente de aire con olores provenientes de las muestras de glándulas metasternales (59%) (Fig. 2.11). En este caso, la frecuencia de despegue no difirió significativamente de la observada en los machos cuando se les presentaban hembras intactas como estímulo (*Tukey*, N.S.). Por otro lado, los olores de las muestras de cutícula y tejido utilizadas como control, promovieron una frecuencia de inicio de vuelo de los machos significativamente menor, cuando se la comparó con corrientes de aire asociadas a olores de hembras intactas (*Tukey*, $p<0,05$) o con muestras de glándulas metasternales de hembras (*Tukey*, $p<0,05$).

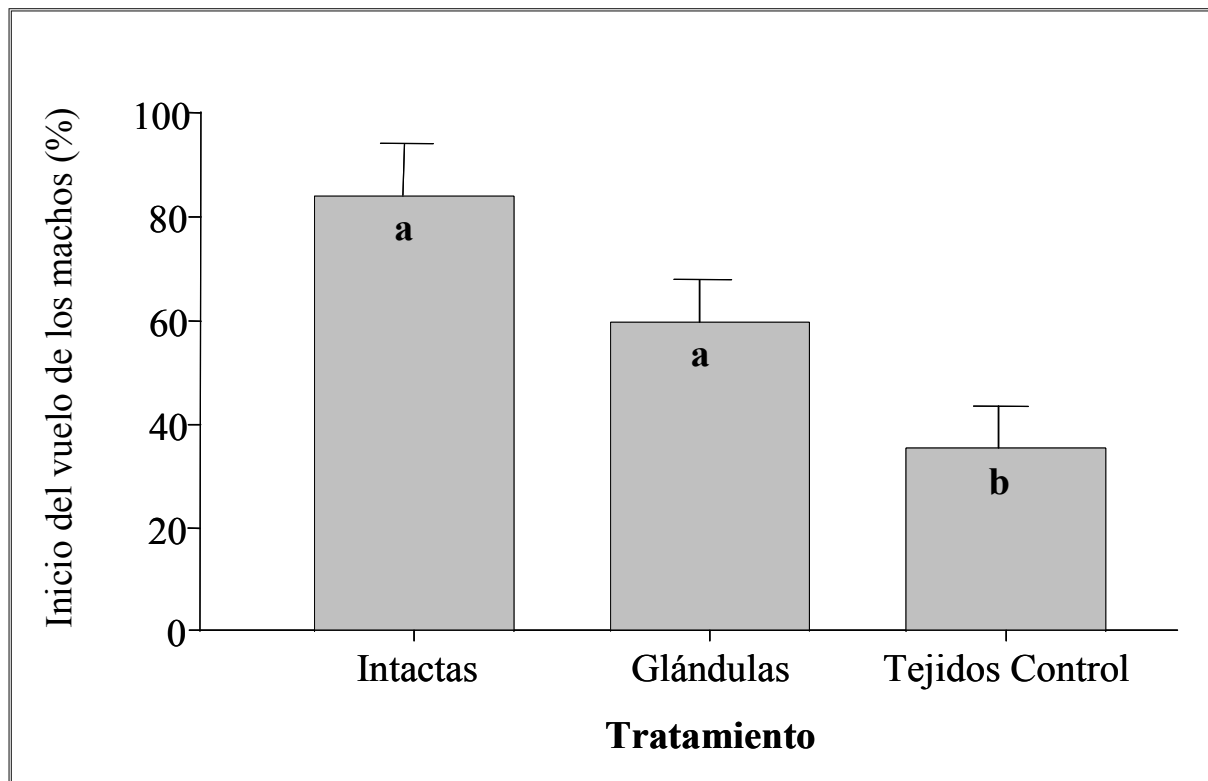


Figura 2.11. Frecuencia media \pm E.S. de inicio del vuelo de machos de *R. prolixus* estimulados con una corriente de aire cargada de olores de extracto de glándulas metasternales de hembras y sus correspondientes controles. **Intactas:** hembras no manipuladas; **Glándulas:** viales de 2 ml con 10 glándulas metasternales de hembras; **Tejidos Control:** vial con 10 muestras de cutícula y tejido no glandular de hembras. Las letras (a,b) indican diferencias estadísticas entre los grupos experimentales (*Tukey*, $p < 0,05$).

Como puede observarse en la figura 2.12, el inicio de vuelo de los machos mostró ser significativamente direccionado hacia la fuente de la corriente de aire cargado con olores de extracto de glándulas metasternales y de cutícula y tejido no glandular de hembras (Tabla 2.3).

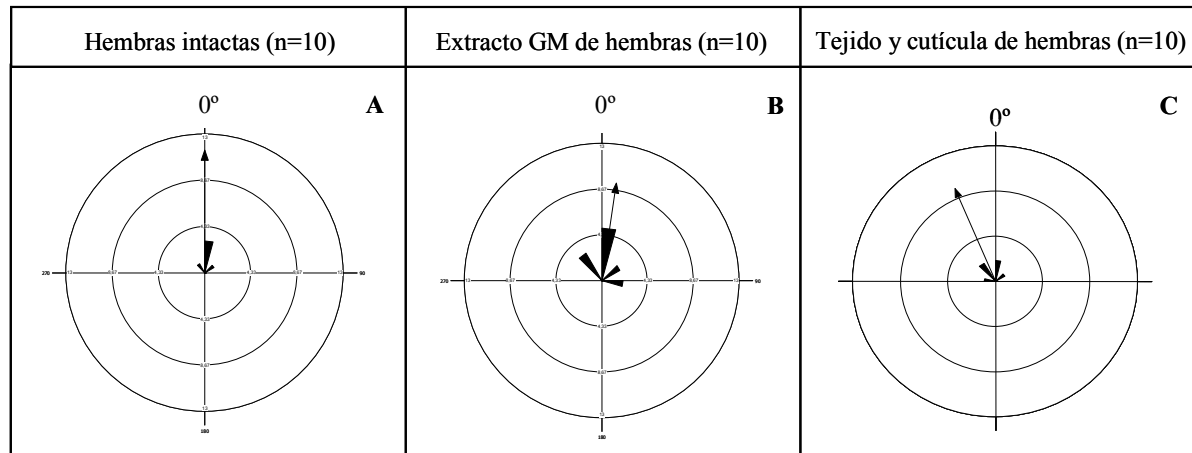


Figura 2.12. Orientación del inicio del vuelo de machos *R. prolixus* estimulados con una corriente de aire cargada de olores de extracto de glándulas metasternales de hembras y sus correspondientes controles. **GM:** glándulas metasternales. La flecha en cada diagrama indica el vector resultante r . La posición de la corriente de aire estaba alineada en 0° para todos los casos. Cada círculo concéntrico tiene un valor de 1,33 y representa el número medio de insectos que iniciaron su vuelo en esa dirección.

	Estímulo	Vector medio (μ)	Longitud de μ (r)	Prueba de Rayleigh	prueba V
	Hembras intactas	0.383°	0,881	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Machos	Extracto de GM	18.147°	0,582	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	Tejido + cutícula	332.417°	0,428	$p = 0,009$	$p = 0,003$

Tabla 2.3. Análisis estadístico de la orientación del inicio del vuelo de machos de *R. prolixus* estimulados con corrientes de aire cargadas con olores de extracto de glándulas metasternales de hembras y sus correspondientes controles. GM: glándulas metasternales.

Parte II: VUELO EN AUSENCIA DE CORRIENTE DE AIRE

Los resultados comportamentales de inicio del vuelo obtenidos en *R. prolixus* en presencia de una corriente de aire confirman que esta especie presenta un comportamiento de *anemotaxis positiva*. El término *anemotaxis* se refiere a la respuesta de orientación en relación a una corriente de aire. La *anemotaxis positiva* implica que el animal se traslada hacia la fuente de la corriente (se dirige corriente arriba) y una *anemotaxis negativa* implica que el animal se aleja de esta fuente (se dirige corriente abajo). Dado que las corrientes de aire pueden funcionar como vehículos transportadores de olores desde la fuente de origen hacia la posición del insecto, los estímulos químicos (olores) pueden sensibilizar a los organismos y desencadenar una *anemotaxis condicionada por olor*. La quimiotaxis es la orientación guiada por el cambio de concentración de olor y se restringe a un espacio acotado del ambiente sin movimiento de aire, donde la formación del gradiente de olor es lento y dominado por procesos de difusión. En ambientes con corrientes de aire, las turbulencias están frecuentemente presentes, lo que impide la formación de gradientes de olor.

En base a esta información y a resultados de esta Tesis, nos propusimos eliminar la corriente de aire y poner a prueba el comportamiento de vuelo de los insectos en base a la difusión de olores emitidos por conespecíficos.

Los fenómenos que ocurren para posibilitar la difusión de volátiles dependen de varios factores, como el valor de la presión atmosférica y la temperatura ambiente. En *R. prolixus* se identificaron 12 compuestos entre cetonas y alcoholes, siendo los compuestos más abundantes: 2-metil-3-buten-2-ol seguido por (2S)-pentanol, (3E)-2-metil-3-penten-2-ol y 4-metil-3-penten-2-ol (Pontes *et al.*, 2008). Mientras que en *T. infestans* se identificaron seis compuestos emitidos por las glándulas metasternales siendo los más abundantes eran la 3-pentanona (cetona), 2-metil-1-butanol (alcohol) y 3-pentanol (alcohol) (Manrique *et al.*,

2006). Por lo tanto, los compuestos se evaporan inmediatamente al ser liberados por las glándulas. Mientras más alta sea la temperatura del ambiente en el que se encuentra el insecto, mayor será la cantidad de compuesto que se evapore. Una vez que se empieza a evaporar el compuesto, su concentración aumenta en la cercanía del lugar en que se encuentra la fuente de emisión, o sea, el orificio de salida de la glándula, generándose una diferencia de concentración. Así empieza a operar otro mecanismo, el de la difusión. El volátil se empieza a difundir hacia todo el volumen del cuarto experimental hasta que algunas de sus moléculas llegan a las antenas de conoespecíficos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

Se utilizaron adultos de *R. prolixus* criados en nuestro laboratorio a una temperatura de $28\pm 1^\circ\text{C}$, 30-60% HR y con un régimen de iluminación de 12:12 h luz:oscuridad. Se utilizaron adultos vírgenes para lo cual las larvas de 5° estadio fueron separadas por sexo hasta la eclosión imaginal y luego las hembras y machos adultos permanecieron en recipientes separados. Se utilizaron adultos de 1-2 meses de edad y con un ayuno de 14-25 días.

Dispositivo experimental

En esta sección se utilizó la misma carpa de vuelo descrita en la Parte I de este capítulo. Estos ensayos se realizaron en ausencia de una corriente de aire lo que implicó una modificación en el modo de la puesta a prueba de los olores utilizados como estímulos (Fig. 2.13)

Cada ensayo consistió en liberar un grupo de 20 insectos adultos del mismo sexo en el interior de la arena experimental y exponerlos a diversos estímulos olfativos provenientes de adultos conespecíficos propagados por difusión desde 1 m de distancia. En cada ensayo se liberaban delicadamente 20 insectos dentro de la arena experimental (Fig. 2.2) evitándose la perturbación de los mismos. Luego de esto, los insectos podían caminar libremente en la arena y sólo podían abandonar la arena volando desde la plataforma de vuelo (Fig. 2.2). Los ensayos comenzaban al inicio de la fase de oscuridad (18:00) y tenían una duración de 8 h.

Los insectos eran entrenados previamente a los ensayos durante 5 días a un fotoperíodo de 12 (06:00-18:00):12 h (18:00-06:00) luz:oscuridad con el objetivo de sincronizar a todos los individuos a este ciclo de luz.

El estímulo consistió en colocar un grupo de 10 insectos (machos o hembras) en un recipiente de acrílico cerrado en ambos extremos con una malla plástica (0,2 cm de diámetro). El recipiente se colocaba suspendido por hilos de nylon en el interior de la carpa y adyacente a alguna de las cuatro paredes laterales de la misma (referencia 2 en Fig. 2.13). El estímulo se colocaba a 1 m de distancia de la arena experimental y suspendido a 1 m del suelo, a la misma altura de la plataforma de vuelo (Fig. 2.13).

Las series experimentales consistieron en estimular un grupo de 20 individuos adultos (machos o hembras) de *R. prolixus* a olores provenientes de conoespecíficos:

- a) 20 machos sin estímulo;
- b) 20 machos estimulados con olores de 10 machos;
- c) 20 machos estimulados con olores de 10 hembras;
- d) 20 hembras sin estímulo;
- e) 20 hembras estimuladas con olores de 10 machos;
- f) 20 hembras estimuladas con olores de 10 hembras.

Se realizaron ocho réplicas para cada serie experimental excepto en la serie **f** donde se realizaron cuatro réplicas.

Para evitar la dependencia de datos, cada ejemplar fue utilizado en los ensayos experimentales una sola vez.

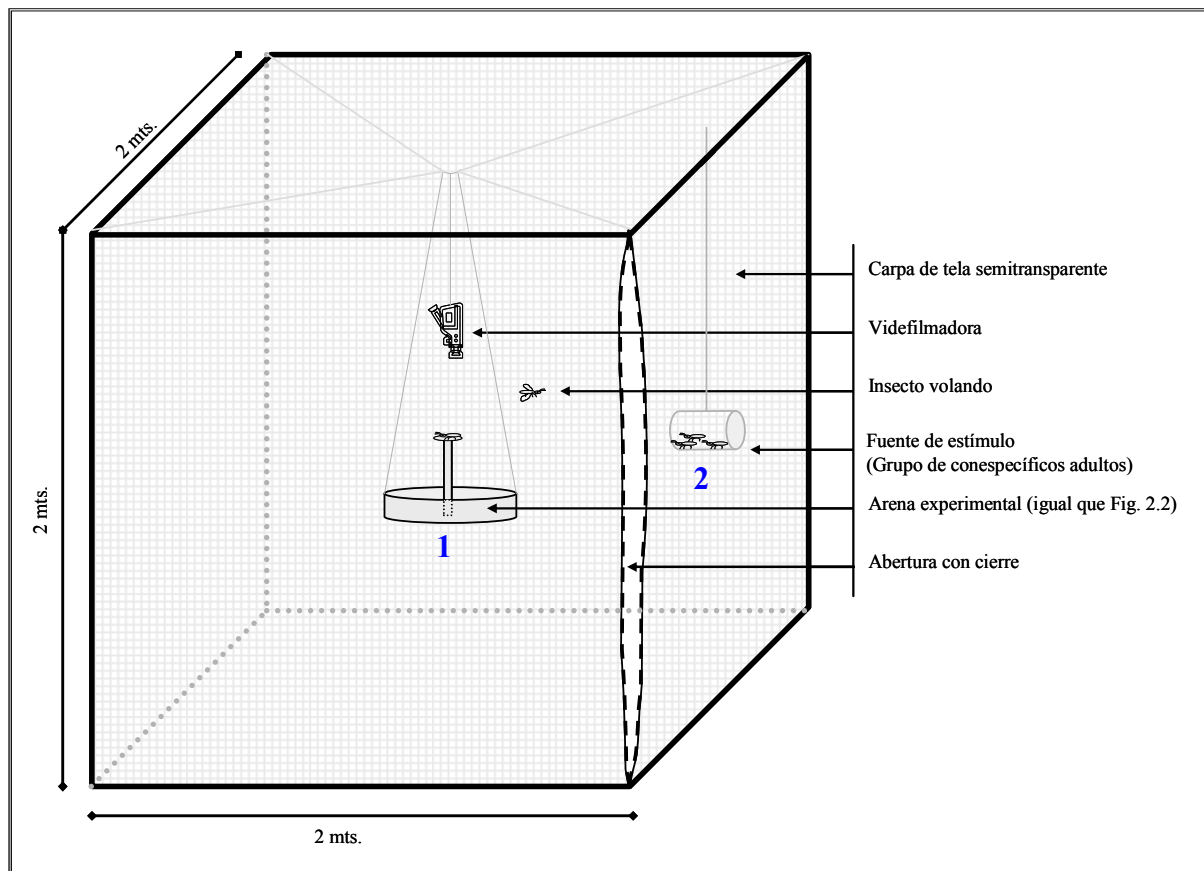


Figura 2.13. Carpa de vuelo diseñada para ensayos realizados en ausencia de una corriente de aire. La carpa y arena experimental son las mismas a las presentadas en las figuras 2.1 y 2.2. En este caso el recipiente con el grupo de insectos conespecíficos ofrecidos como estímulo permanecía suspendido y adyacente a alguna de las cuatro paredes de la carpa; el lado de la carpa donde se colocaba el estímulo variaba entre ensayos. El recipiente del estímulo (2) estaba alineado con la plataforma de vuelo (adaptado de Minoli y Lazzari, 2006).

Los ensayos control consistían en colocar recipientes vacíos como estímulo con el fin de evaluar la activación del inicio de vuelo basal. En cada ensayo se cuantificó, **a**) el número total de insectos que iniciaron el vuelo desde la plataforma de vuelo *i.e.*, activación y **b**) la dirección elegida por cada insecto durante el despegue.

Análisis estadístico

Las diferencias en las frecuencias de vuelo fueron analizadas mediante análisis de varianza de dos factores (ANOVA) y se asumieron factores fijos (género y tipo de estímulo).

La normalidad y homocedacia de los datos fueron verificadas (P-Plot y prueba de *Levene*, respectivamente) (Zar, 1984). Se realizaron análisis de los efectos principales y contrastes *post hoc* mediante la prueba de *Tukey* para diseños desbalanceados ya que para una de las series experimentales (serie **f**) se realizaron menor cantidad de réplicas.

RESULTADOS

Como se mencionó anteriormente, el comportamiento de las vinchucas en los momentos previos al inicio de vuelo está caracterizado por una caminata azarosa que eventualmente lleva al insecto a trepar el mástil central de la arena y, luego de una breve exploración sobre la plataforma de vuelo (*e.g.*, movimientos antenales de sondeo), inicia el vuelo.

La figura 2.14 muestra los porcentajes de vuelos totales ocurridos en las distintas series experimentales realizadas en ausencia de una corriente de aire. El patrón de respuesta de los machos no difirió del patrón de las hembras ($F_{(2, 38)}=1,43$; $p=0,25$), esto es, los machos y las hembras presentan frecuencias de despegue mayores en presencia de olores de hembras y menores en presencia de olores de machos en comparación con el control sin olores. Dado que el ANOVA de dos factores no reveló interacciones significativas entre los dos factores (1-género y 2-tipo de estímulo) se analizaron los efectos principales. Los individuos respondieron diferente ante los estímulos ofrecidos independientemente del sexo ($F_{(2,38)}=7.87$, $p=0,001$), o sea, la ausencia de estímulo y la presencia de olores de hembras no provocan una respuesta de inicio del vuelo diferente ya sea en machos o en hembras (*Tukey*, $p=0,18$) mientras que los olores de hembras afecta las frecuencias de despegue (*Tukey*, $p<0,001$). Aún así, los machos presentaron en promedio frecuencias mayores de inicio de vuelo (39,8%) que las hembras (19,4%) independientemente de los estímulos ofrecidos ($F_{(1,38)}=9,45$; $p=0,003$). Además, el análisis de la dirección del inicio de vuelo mostró una distribución uniforme de los datos de todas las series (prueba de *Rayleigh*, N.S.) (Fig. 2.15).

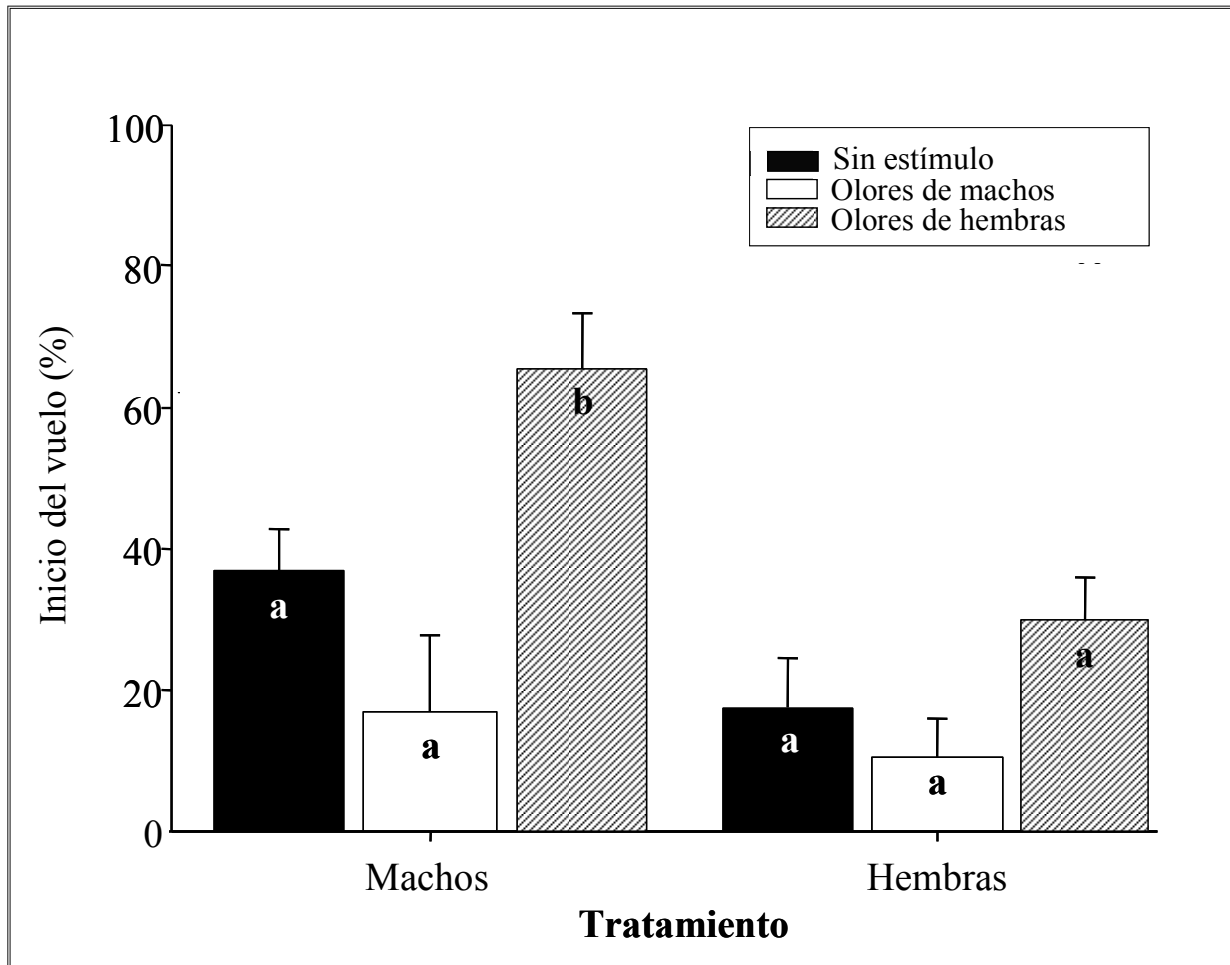


Figura 2.14. Frecuencia media \pm E.S. de inicio del vuelo de machos y hembras de *R. prolixus* estimulados con olores de conespecíficos. Las letras (a,b) indican diferencias estadísticas entre los grupos experimentales (*Tukey*, $p < 0,05$).

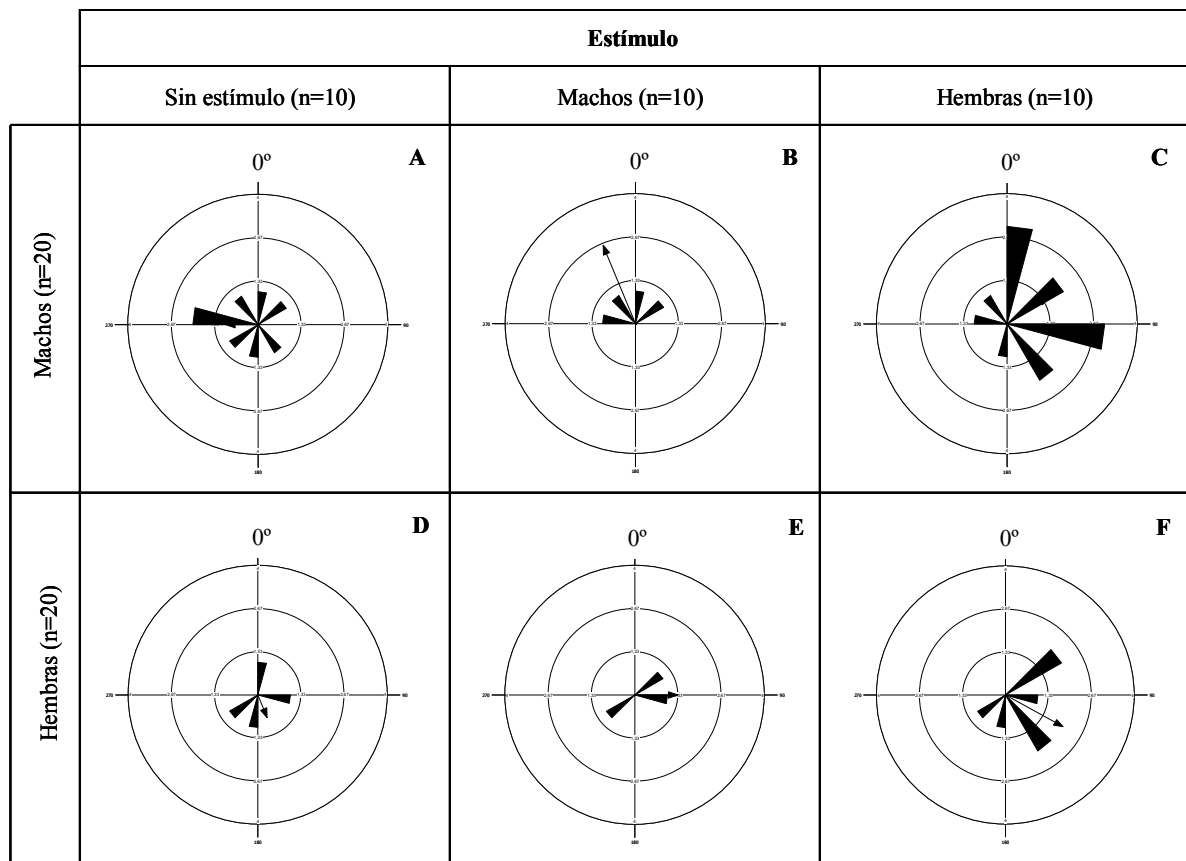


Figura 2.15. Orientación del inicio del vuelo de machos y hembras de *R. prolixus* estimulados con estímulos con olores de conoespecíficos. La flecha en cada diagrama indica el vector resultante r . La posición de la corriente de aire estaba alineada en 0° para todos los casos. Cada círculo concéntrico tiene un valor de 1,33 y representa el número medio de insectos que iniciaron su vuelo en esa dirección. En todos los casos N.S.: prueba de Rayleigh $p > 0,05$; prueba V , $p > 0,05$.

	Estímulo	Vector medio (μ)	Longitud de μ (r)	Prueba de Rayleigh	prueba V
Machos	Sin estímulo	270°	0,25	$p=0,621$	$p=0,5$
	Olores de machos	$337,5^\circ$	0,653	$p=0,189$	$p=0,044$
	Olores de hembras	$56,701^\circ$	0,379	$p=0,155$	$p=0,146$
Hembras	Sin estímulo	$157,5^\circ$	0,191	$p=0,878$	$p=0,684$
	Olores de machos	90°	0,333	$p=0,751$	$p=0,5$
	Olores de hembras	$118,675^\circ$	0,508	$p=0,166$	$p=0,814$

Tabla 2.3. Análisis estadístico de la orientación del inicio del vuelo de machos y hembras de *R. prolixus* estimulados con olores de conoespecíficos.

DISCUSIÓN

En este capítulo de Tesis se analizó la posible relación entre la comunicación química en el contexto sexual y el comportamiento de inicio del vuelo de las vinchucas. Se logró comprobar que la activación del despegue de los machos estaría modulada por la presencia de estímulos químicos provenientes de las glándulas metasternales de las hembras y que dichos compuestos pueden promover el comportamiento de vuelo al ser arrastrados por una corriente de aire. El vuelo de los machos se ve estimulado en presencia de olores de las hembras aún en ausencia de una corriente de aire, sin embargo, los despegues no muestran una orientación en dirección a la fuente de estímulo. Hasta donde se conoce, este es el primer estudio donde se demuestra que el inicio del vuelo se ve afectado por la presencia de claves químicas liberadas por conespecíficos en el contexto sexual en triatominos.

Todos los experimentos realizados en esta sección se diseñaron excluyendo estímulos visuales y mecánicos, y además los ensayos se realizaron en un cuarto limpio de olores externos a los puestos a prueba por lo que los cambios observados en las frecuencias del inicio de vuelo de los insectos sólo podrían deberse a la presencia de claves químicas presentes en el cuarto de experimentación. La evidencia más contundente de comunicación química y reconocimiento sexual está sostenida por la observación del incremento de la frecuencia de despegue de los machos al ser confrontados a olores de hembras conespecíficas y por la evidente orientación hacia la fuente de estímulo. Además, los olores de los machos no fueron capaces de promover el inicio del vuelo de hembras o, incluso, de otros machos conespecíficos. Proponemos, entonces, que este comportamiento sería parte de un mecanismo de búsqueda de pareja, probablemente realizado activamente por los machos, el cual estaría mediado por una o más señales químicas (*i.e.*, feromona sexual) emitida por las hembras.

La comparación entre sexos de los niveles basales de vuelo (*i.e.*, sin la presentación de estímulos) no mostró una diferencia entre hembras y machos, en concordancia con Schofield

et al. (1991) en *T. sordida* y Minoli y Lazzari (2006) en *R. prolixus*. Sin embargo, en nuestros estudios, en presencia de olores del sexo opuesto, se manifestaron diferencias ya que los machos iniciaban su vuelo más frecuentemente al ser estimulados con olores de hembras que en cualquier otra situación experimental. Estos resultados complementan los hallados por Pontes *et al.* (2008) quienes informaron que los adultos de *R. prolixus* emiten el contenido de sus glándulas metasternales espontáneamente durante la noche y son las hembras las que presentan una mayor tendencia de emisión. El comportamiento de "llamado sexual" es bien conocido en hembras de lepidópteros y se caracteriza por la proyección del abdomen, la exposición de las glándulas y la emisión de la feromona hacia el ambiente (Butenandt *et al.*, 1959, West y Bowers, 1994). Se sabe que la alimentación puede afectar algunos aspectos de la producción feromonal en las hembras de varios insectos (Chapman, 1998). Particularmente, los adultos de *T. infestans* tienden a emitir menos secreción de sus glándulas de Brindley a medida que aumenta el tiempo de ayuno (Palottini y Manrique, 2010).

El contenido de las glándulas de Brindley de las hembras no parece afectar los niveles espontáneos de despegue de los machos ya que su oclusión no afecta el comportamiento de inicio de vuelo (Fig. 2.8). Sin embargo, en trabajos anteriores se han asociado a los compuestos de estas glándulas con el comportamiento sexual de los triatominos (en *T. infestans*: Fontán *et al.*, 2002; en *R. prolixus*: Rojas *et al.*, 2002; Guerenstein y Guerin, 2004) por lo que su participación en otras fases de las interacciones sexuales podría ser posible. En vista de los resultados aquí presentados, es importante resaltar que las secreciones de las glándulas metasternales de las hembras son un factor clave para promover el inicio de vuelo de los machos de *R. prolixus* ya que los compuestos de estas glándulas fueron suficiente estímulo para activar y orientar por sí solas el inicio del vuelo.

Concluimos, así, que las glándulas metasternales de las hembras participan en la promoción del despegue de los machos en el contexto sexual. De este modo, estos insectos

son capaces de discriminar corrientes de aire limpio de otras que arrastran olores de conoespecíficos con respuestas de vuelo más intensas para el último caso. Estos resultados sugieren que *R. prolixus* podría ser capaz de percibir y reconocer, a larga distancia, volátiles atractivos y trasladarse activamente hacia ellos.

Las larvas y adultos de triatominos permanecen agregados en lugares protegidos o en refugios durante el día, y aún durante gran parte de la noche, mediado sobre todo por el comportamiento de *tigmotaxis* y por la presencia de feromonas de agregación (Schofield y Patterson, 1977; Ondarza *et al.* 1986; Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994; Lorenzo Figueiras y Lazzari, 1998), además del comportamiento de *fototaxis negativa* que los mantienen en lugares oscuros. Por ejemplo, las larvas de *T. infestans* salen de sus refugios para alimentarse durante la noche y presentan un aumento del nivel de actividad dada la alta motivación por alimentarse (Lazzari, 1992; Lorenzo y Lazzari, 1998). Por otro lado, ha sido demostrado que la actividad de los machos de *R. prolixus* y *T. brasiliensis* aumenta significativamente cuando se presentan señales olfativas provenientes de hembras conoespecíficas que promueven la salida de los éstos de los refugios en los que se encuentran (Vitta, 2009; Pontes, 2010). Dado que los compuestos emitidos por las hembras son capaces de fomentar la salida de los refugios de los machos y que las glándulas metasternales de éstas promueven el inicio del vuelo de los machos, de esta manera queda expuesto el alcance de la comunicación química en el contexto sexual de estos insectos, aún a largas distancias. Así, puede proponerse que los volátiles emitidos por las hembras participan de un mecanismo de "llamado" sexual que promovería el acercamiento del macho durante la búsqueda de pareja.

Los resultados aquí presentados sugieren que el vuelo de machos y hembras estaría limitado a una ventana temporal al comienzo de la noche. Los triatominos poseen una clara organización temporal circadiana de muchas actividades (Ampleford y Steel, 1982; Constantinou, 1984; Lazzari, 1992; Minoli y Lazzari, 2003; Barrozo *et al.*, 2004b; Lazzari *et*

al., 2004; Bodin *et al.*, 2008; Guerenstein y Lazzari, 2009). Estos insectos poseen un patrón de actividad bimodal (búsqueda del hospedador al anochecer y búsqueda del refugio al amanecer) que puede ser mediado por diferentes señales olfatorias que generan respuestas comportamentales específicas en diferentes momentos del día (Lazzari, 1992; Lorenzo y Lazzari, 1996; Lorenzo y Lazzari, 1998; Barrozo *et al.*, 2004b). Contrariamente, la respuesta olfatoria a la feromona de agregación de *R. prolixus* no parece estar controlada por un reloj endógeno, sino más bien por la influencia directa de variables externas (Bodin *et al.*, 2008). La motivación de los machos para responder a las señales sexuales emitidas por las hembras podría también ser un proceso modulado por un mecanismo de sincronización circadiano. Recientemente, se ha demostrado que las hembras de *R. prolixus* emiten olores relacionados con el contexto sexual con mayor intensidad durante las primeras horas de la escotofase (Pontes *et al.*, 2008). Complementariamente, la presencia de hembras en las proximidades de los refugios ocupados por machos de *T. brasiliensis* es capaz de promover la salida de estos y provocar un aumento significativo de su actividad locomotora también al inicio de la noche (Vitta, 2009). Así como en estos ejemplos, nuestros resultados que muestran una actividad de inicio de vuelo en las primeras horas de la escotofase, parecen indicar la existencia de una ventana temporal para esta actividad. Sin embargo, resulta necesario realizar nuevos experimentos para poner a prueba esta hipótesis.

A lo largo de todos los ensayos realizados en presencia de una corriente de aire, los insectos siempre mostraron cierta frecuencia de despegue, independientemente de las condiciones experimentales. La sola presencia de una corriente de aire, sin estímulos agregados, parecería estimular la activación de vuelo (Fig. 2.4, columnas negras). La presencia de una corriente de aire puso en evidencia la existencia de una respuesta de vuelo orientada y a larga distancia. Además, y en concordancia con el comportamiento de *anemotaxis positiva* descrita para larvas de 5° estadio de *T. infestans* (Barrozo *et al.*, 2003),

R. prolixus mostró una clara tendencia del inicio del vuelo en dirección a la fuente de corriente de aire (Figura 2.5). La presencia de una corriente de aire generó que todos los insectos volaran en contra de la corriente manifestando un claro comportamiento de *anemotaxis positiva*.

Los ensayos realizados en ausencia de una corriente de aire fueron realizados con el objetivo de analizar el comportamiento de vuelo espontáneo en el contexto sexual. Como se ha dicho anteriormente, los machos de *R. prolixus* estimulados con hembras conespecíficas presentan frecuencias de inicio de vuelo que sobrepasan cualquier otro estímulo puesto a prueba, aún en ausencia de una corriente de aire. Es posible subrayar que la presencia de hembras (a 1 m de distancia de los machos) es suficiente para activar el vuelo de los machos. Esto nos lleva a sugerir que, en ausencia de estímulos visuales (ya que los ensayos se realizaron en oscuridad funcional para los insectos) y estímulos mecánicos (los insectos estimulados estaban localizados sobre una plataforma suspendida en el aire y no estaban en contacto con ningún sustrato), los machos se activan iniciando el vuelo y utilizan claves químicas en la orientación hacia las hembras mediada por compuestos volátiles.

Poco se sabe acerca de los factores que modulan la actividad de vuelo además de la motivación fisiológica, las fuentes artificiales de luz o la temperatura (Lehane y Schofield, 1981; 1982; Lehane *et al.*, 1992; Schofield *et al.*, 1992; McEwen *et al.*, 1993; McEwen y Lehane, 1993; 1994; Gurevitz *et al.*, 2006; Minoli y Lazzari, 2006). Sin embargo, trabajos realizados a campo indican que los machos son capturados más frecuentemente que las hembras al comienzo del período de vuelo (Ekkens, 1981; Noireau y Dujardin, 2001 en *T. sordida* y *T. guasayana*). Los grupos de hembras o machos confrontados a corrientes de aire limpio (Fig. 2.4) o en ausencia de corriente y sin estímulos olfativos (Fig. 2.11) mostraron una activación basal similar del inicio de vuelo (*ca.* 35% iniciaron el vuelo). La actividad basal de inicio del vuelo ya ha sido comunicada en otras especies, por ejemplo, experimentos de

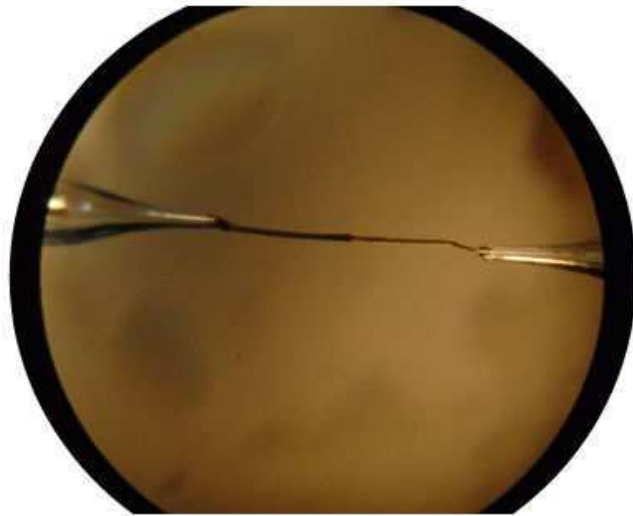
campo con machos y hembras de *T. sordida* mostraron que un 65% de los individuos liberados iniciaban el vuelo, aunque lo hacían en todas las direcciones (Schofield *et al.*, 1991). Por otro lado, los resultados de Gurevitz *et al.* (2006) y Minoli y Lazzari (2006) mostraron que las hembras presentan una mayor probabilidad de vuelo que los machos en *T. infestans* y *R. prolixus*. Sin embargo, los resultados presentados en este capítulo revelaron que el inicio del vuelo espontáneo de los machos y las hembras de *R. prolixus* ocurre en proporciones similares.

El vuelo activo a cargo del macho podría incrementar la velocidad de los procesos de reinfestación del domicilio y peri-domicilio ya que las hembras que colonizan nuevos ecotopos podrían ser capaces de atraer machos incrementando así su capacidad de producción de huevos. Esto resulta relevante dado que el vuelo de triatominos ya ha sido relacionado con procesos de dispersión y posterior colonización de domicilios (Sjogren y Ryckman, 1966; Lehane y Schofield, 1976; Schofield y Matthews, 1985; Wisnivesky-Colli *et al.*, 1993; Cecere *et al.*, 2004; Vazquez-Prokopec *et al.*, 2004; Ceballos *et al.*, 2005).

Cabe recordar que la sola presencia de las glándulas metasternales, aún extraídas del cuerpo de las hembras, son capaces de promover la activación del vuelo de los machos. La identificación de los volátiles capaces de modificar el comportamiento de los machos de *R. prolixus*, *e.g.*, atrayéndolos hacia fuentes puntuales, podría permitir el desarrollo de cebos para la detección y control de estos insectos vectores. Algunos de los compuestos capaces de activar el vuelo de los machos probablemente hayan sido indirectamente comunicados en los trabajos de Manrique *et al.* (2006) y Pontes *et al.* (2008) ya que identificaron los compuestos de las glándulas metasternales de *T. infestans* y *R. prolixus*, respectivamente. Para esto, sería necesario establecer la identidad de los compuestos volátiles responsables de desencadenar este comportamiento, lo cual conforma parte de los objetivos particulares del siguiente capítulo de Tesis.

CAPÍTULO 3

Respuestas electrofisiológicas y comportamentales de los machos a olores de hembras



Antena de macho de *R. Prolixus* suspendida entre dos electrodos

Parte I: ANÁLISIS ELECTROFISIOLÓGICOS

INTRODUCCIÓN

Recepción quimio-sensorial en insectos

La recepción de información del medio que rodea a los animales es llevada a cabo a través de sus órganos sensoriales y, en particular, la unidad estructural y funcional básica de recepción sensorial en los insectos es la *sensilia* (Chapman, 1998). Las sensilias se pueden encontrar en cualquier parte del cuerpo del insecto, aunque están concentradas en los apéndices, como las patas, cercos del abdomen, palpos de la cabeza y especialmente en las antenas, donde suelen encontrarse en grandes densidades. Las sensilias, que pueden ser de diversa modalidad (*e.g.*, mecano-, quimio-, termo-higroreceptoras) se caracterizan por poseer una porción cuticular, que varía en cuanto a su forma y tamaño, asociada a una o más células receptoras o sensoriales.

En los insectos, la quimiorrecepción (*i.e.* recepción de sustancias químicas) puede ocurrir de distintas formas según la fase y concentración en que se encuentren. *Olfación* es la habilidad de detectar compuestos generalmente muy volátiles en estado gaseoso y a una muy baja concentración relativa. Si la sustancia en cuestión se halla en fase líquida o en solución y a una alta concentración relativa e incluso sustancias presentes en superficies secas, nos estamos refiriendo a *quimiorrecepción de contacto* (Morita y Shiraishi, 1985).

La percepción de compuestos químicos, por medio del olfato, es posible por la capacidad que poseen algunas células altamente especializadas de responder emitiendo impulsos nerviosos ante la presencia de sustancias químicas en el medio ambiente. Para que esta respuesta ocurra, las células tienen que ser capaces de reconocer sustancias químicas del medio ambiente en base a la afinidad de las moléculas de la señal química con los receptores

de la membrana celular. Consecuentemente, las células olfativas transducen la señal química en un impulso nervioso que se propaga hacia el cerebro (Farbman, 1994). Otra característica importante de la célula olfativa es que puede responder tanto a la intensidad del estímulo como a su calidad.

Existen diversos tipos de sensilias diferenciadas fundamentalmente por su morfología, *e.g.*, tricoideas, basicónicas, coelocónicas, placodeas, entre otras (Chapman, 1982; Kaissling, 1987). Las sensilias olfativas se caracterizan por poseer una pared cuticular con numerosos poros pequeños que permiten la entrada de moléculas químicas que posteriormente son llevadas a los receptores de la membrana de la célula sensorial por proteínas transportadoras. Cada sensilia contiene una o varias células sensoriales primarias (receptores olfativos) cuyas dendritas están localizadas en su interior. Los poros de la sensilia son una ventana de contacto entre el exterior y la hemolinfa receptora ubicada en el lumen del pelo, la cual contiene a las dendritas receptoras (Kaissling, 1987; Frabman, 1994). La quimiorrecepción tiene lugar a partir que la sustancia química es absorbida en la superficie del pelo, penetra luego por los poros mediante transporte pasivo y llega a la hemolinfa receptora, donde se une a proteínas transportadoras (Kaissling, 1987; Nation, 2002). El complejo *sustancia odorífera-proteína transportadora* viaja por la linfa receptora hasta la superficie de la dendrita, donde se une a un receptor específico. Es el receptor de membrana de la célula el que determina la especificidad de la respuesta. Una vez que la sustancia hace contacto con el receptor de membrana, si la concentración de la sustancia es suficiente para superar cierto valor umbral, la información se propaga mediante potenciales de acción por las terminales del nervio antenal hacia el sistema nervioso central (Kaissling, 1994). En el sistema nervioso central la información es procesada e integrada (codificación de olores, comparación con la información existente) provocando o no una respuesta comportamental determinada. El estímulo inicial, *i.e.*, la unión de la sustancia con el receptor de membrana, es inactivado por un cambio en la proteína

transportadora, que pasa del estado reducido a oxidado, cesando de esta manera la estimulación.

La sensibilidad de las neuronas quimiorreceptoras a diferentes olores es muy variable. Algunas son altamente sensibles a un único tipo de molécula odorífera y relativamente poco o nada sensible a otras moléculas un poco diferentes. Éstas son conocidas como células olfativas especialistas. Otras neuronas son sensibles a un amplio grupo de diferentes sustancias (*e.g.*, reaccionan ante un grupo funcional común a varias sustancias) y se las conoce como receptores generalistas. En general, los receptores feromonales son especialistas y están asociados a situaciones muy específicas, como por ejemplo, la búsqueda de alimento o el contexto sexual.

En los triatomíneos existen tres diferentes tipos de sensilias ubicados en las antenas y clasificados de acuerdo a su morfología y función: 1) no porosas en cuenca flexible (tricobotrias, sensilia campaniforme, bristiles); 2) no porosas con cuenca inflexible (sensilia coleónica) y 3) porosas con cuenca inflexible (basicónicas y trocoides de pared fina y de pared gruesa) (Catalá y Schofiel, 1994; Catalá 1997).

En los triatomíneos, los cinco estadios larvales y los adultos de ambos sexos poseen un par de antenas que se encuentran divididas en cuatro segmentos que desde la parte proximal a la distal toman los nombres de: escapo, pedicelo, artejo flajelar I y artejo flajelar II (Fig. 3.1-A) y cada uno de estos segmentos porta algún tipo de sensilia (*e.g.*, Fig. 3.1-B).

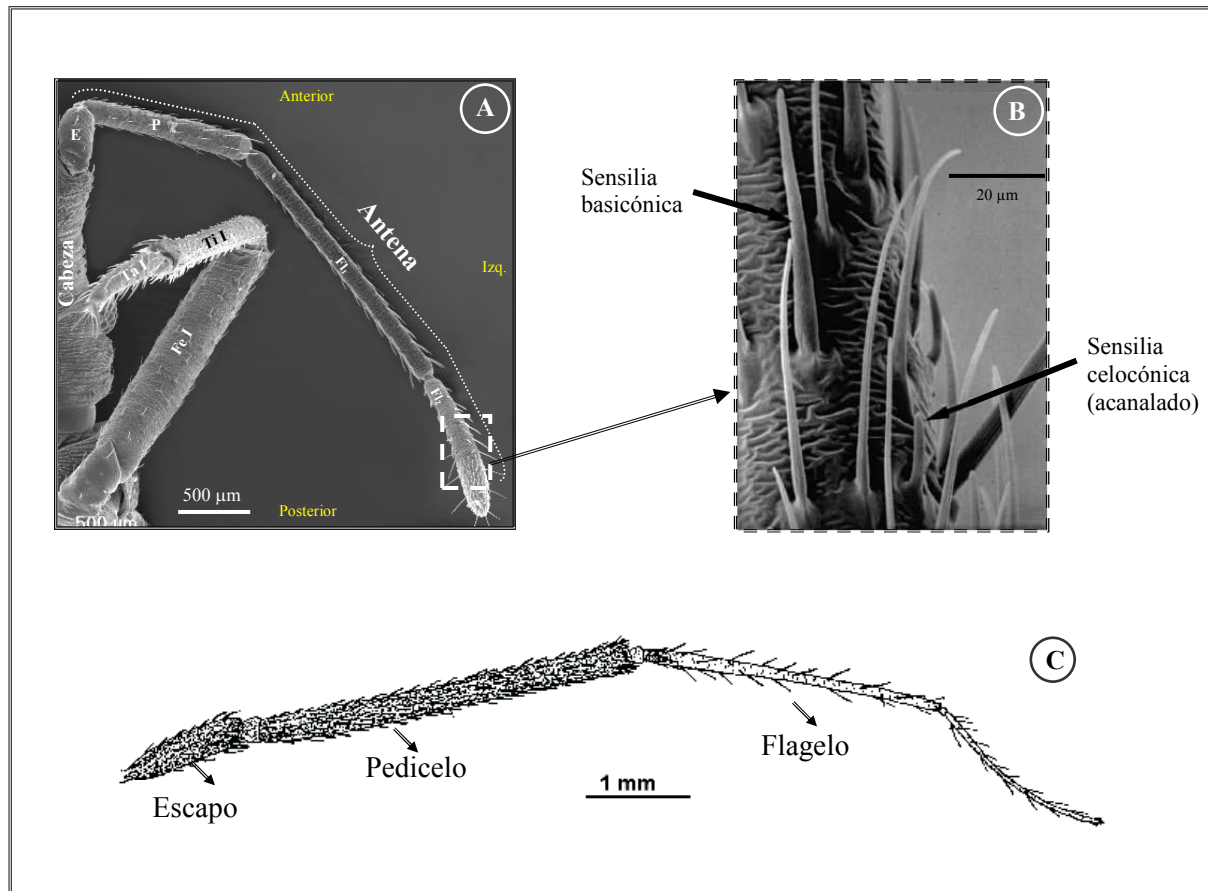


Figura 3.1. Micrografía electrónica de barrido de antena izquierda entera y detalle de sensilias de *T. infestans*. **A)** Microfotografía parcial de una larva de 5° estadio en vista ventral; se observa parte de la cabeza y la antena y pata I izquierdas. El rectángulo negro indica la porción de la antena aumentada en B). (Pata I): **Fe I**: fémur; **Ti I**: tibia; **Ta I**: tarso; (Antena izq.): **E**: escapo; **P**: pedicelo; **Fl₁**: 1° artejo flagelar; **Fl₂**: 2° artejo flagelar (Foto: M. Vlimant). **B)** Segmento terminal de antena de larva de 5° estadio de *T. infestans* (modificado de Guerenstein y Guerin, 2001). **C)** Antena de triatomino.

El registro de la recepción sensorial

La actividad de las células sensoriales en respuesta a diferentes estímulos (químicos, físicos o mecánicos) se puede registrar principalmente a través de la utilización de técnicas electrofisiológicas como la electroantenografía. La técnica de la electroantenografía tuvo sus comienzos en manos de Schneider (1957) que registró pequeñas fluctuaciones de voltaje entre el ápice y la base de una antena cuando estaba siendo estimulada por una feromona. Schneider (1957) estudió el sistema olfativo de *Bombyx mori* revelando que el potencial de recepción del

insecto frente a su feromona podía ser registrado utilizando una antena aislada, posicionada entre dos microelectrodos capilares conectados a un amplificador.

La diferencia de potencial entre la base y la porción terminal de la antena de un insecto cambia cuando se la expone a olores para los cuales el insecto posee receptores, evidenciando una probable importancia biológica del compuesto para la especie puesta a prueba. La diferencia de voltaje estaría representando la sumatoria de potenciales de múltiples respuestas de neuronas olfatorias dentro de la antena (Schneider, 1964) mientras que la amplitud del voltaje correspondería a la sensibilidad de la antena frente a un compuesto determinado ya que aumenta con el incremento de la concentración del estímulo químico hasta que se alcanza un nivel de saturación. Al registrar simultáneamente la suma de potenciales receptores de varias sensilias de manera extracelular, se consigue un electroantegrano (EAG). Este tipo de registro comúnmente se realiza utilizando dos electrodos ubicados a ambos extremos de una antena extraída y en contacto directo con su hemolinfa. Los electrodos se encuentran inmersos en una solución salina conductora y dentro de dos capilares de vidrio (Fig. 3.2). De la misma manera, un electrodo (de registro) puede estar en contacto con la hemolinfa en el extremo apical de la antena y el otro (de referencia) en contacto con la hemolinfa en otra región del cuerpo (*e.g.*, la base de la antena, la cabeza o cuerpo del insecto). Un electroantegrano es el resultado de la suma de corrientes receptoras extracelulares originadas simultáneamente en varias sensilias. Es generalmente aceptado que el electrodo ubicado en la región apical de la antena se cargue negativamente ante una estimulación de los receptores antenales. Esto probablemente se deba a la orientación morfológica de los componentes subcuticulares de las sensilias. El espacio linfático de la sensilia junto con la región del soma de las células sensoriales generarían un pequeño dipolo transepitelial con su polo negativo dirigido hacia al extremo distal de la antena. Debido a la

baja resistencia de la hemolinfa, cada dipolo contribuye con una pequeña diferencia de potencial al electroantegrado (Kaissling, 1995).

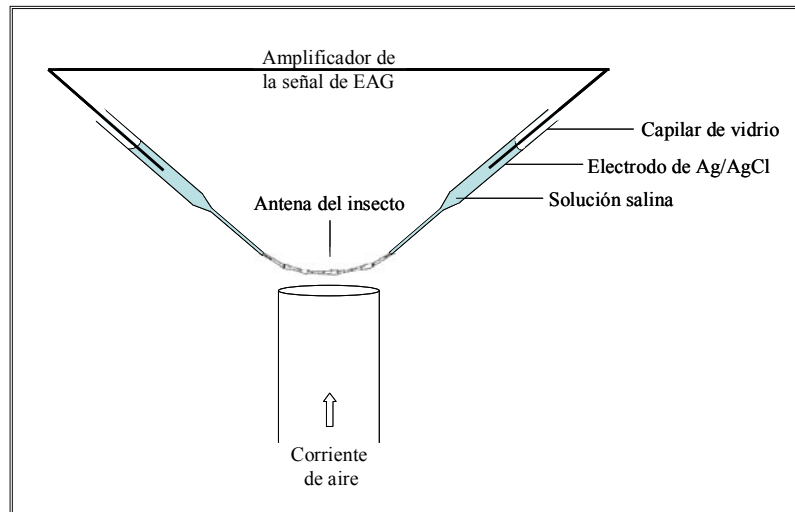


Figura 3.2. Esquema del modo en que se expone una antena de insecto durante el registro de respuestas electrofisiológicas. La corriente de aire de velocidad y flujo controlado arrastra consigo los volátiles puestos a prueba.

Esta técnica es de gran utilidad para identificar el tipo de estímulo que puede ser detectado fisiológicamente por los insectos a partir de la presentación de claves olfativas o de otros tipos (ej.: calor, humedad, etc.). Esta técnica puede realizarse con anterioridad a pruebas de tipo comportamental con el fin de identificar posibles sustancias químicas que, al ser detectadas por las antenas de las especie bajo estudio, contribuya a la identificación de candidatos que puedan afectar algún comportamiento de particular interés de estudio. Por lo tanto, los ensayos en antenas pueden ayudar a explorar olores encontrados en el medio ambiente de un insecto permitiendo la identificación de aquellos que podrían afectar alguna actividad comportamental. Así, si un compuesto no provocara ningún cambio del potencial eléctrico en el electroantenograma, difícilmente evoque respuestas comportamentales

significativas en bioensayos posteriores, implicando la ausencia de receptores en la antena que detecten ese/os compuesto/s puestos a prueba.

La técnica mostró ser eficiente en estudios sobre varios órdenes de insectos, como Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Ortoptera y Tricoptera (Roelofs y Bjostad, 1984; Jewett *et al.*, 1996). Existe un gran número de trabajos que utilizaron la técnica de CG-EAD en el proceso de identificación de feromonas, sobre todo en lepidópteros (Van der Pers, 1980; Van der Pers y Minks, 1997) entre los que se destaca Millar *et al.* (1996) que describieron la feromona sexual de *Anomala nuxvorella* (Lepidoptera: Pyralidae) o de *Anomala daimiana* (Coleoptera: Scarabaeidae) (Leal *et al.*, 1993). Particularmente, las técnicas electrofisiológicas en triatomíneos, mediante EAGs o a través de registros extracelulares de sensilia única, revelaron la existencia de receptores antenales sensibles a sustancias volátiles tales como (L) ácido láctico, ácido pirúvico, aldehídos, ácidos grasos de cadena corta, piridinas, furanos, terpenos y aminas en *T. infestans* (Bernard, 1974; Taneja y Guerin, 1997; Guerenstein, 1999; Guerenstein y Guerin 2001, Diehl *et al.* 2003). Cabe destacar, que la mayor parte de estas respuestas probablemente estén asociadas a la detección del hospedador. En otro contexto, De Brito Sánchez *et al.* (1995) informaron acerca de variaciones significativas en la actividad eléctrica de antenas de machos de *T. infestans* asociados a olores provenientes de parejas en cópula. Estudios electroantenográficos llevados a cabo con una serie homóloga de aldehídos alifáticos sobre hembras y machos de *T. infestans* provocaron respuestas eléctricas crecientes en ambos sexos a medida que aumentaba el largo de la cadena de los compuestos presentados hasta el nonanal después del cual las respuestas disminuían (Fontán *et al.*, 2002). Ese estudio demostró que la presencia de compuestos electrofisiológica y comportamentalmente activos emitidos por parejas en cópula podrían tener un papel como feromona sexual. Por otro lado, la evaluación de componentes de

glándulas de Brindley sobre antenas de machos de *T. infestans* mostró respuestas eléctricas significativas para el 2- y 3-metilbutil-2-metilpropanoato (González Audino *et al.*, 2007).

Cromatografía Gaseosa

La cromatografía es un método físico utilizado para la separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles. Está basado en la volatilización de los componentes de la mezcla de interés. Esta mezcla es introducida en el puerto de inyección de una columna cromatográfica (Fig. 3.3) que está tapizada internamente por una fase *fija*, mientras que los compuestos volatilizados son arrastrados por una fase *móvil*, siendo ambas fases inmiscibles entre sí. La elusión de los componentes de la mezcla se produce por el flujo de la fase *móvil* de gas inerte (*e.g.*, helio, argón, nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono) evitando la reacción con el analito que fluye a través de la columna siendo su única función la de transportarlo a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases donde la fase *fija* puede ser un sólido poroso (cromatografía de gas sólida), o bien una película líquida delgada que recubre un sólido particulado o las paredes de la columna (cromatografía de gas líquido), siendo esta última la más ampliamente utilizada. En la cromatografía de gas sólida, la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos en ella se produce mediante el proceso de separación de los componentes de la mezcla sobre la superficie sólida. Este proceso de adsorción no es lineal ya que la retención del analito sobre la superficie es semipermanente y se obtienen picos de elusión con colas siendo su única aplicación la separación de especies en estado gaseoso de bajo peso molecular. La cromatografía de gas líquido utiliza como fase estacionaria moléculas de líquido inmovilizadas sobre la superficie de un sólido inerte, siendo la partición de los mismos entre las fases líquida y gaseosa.

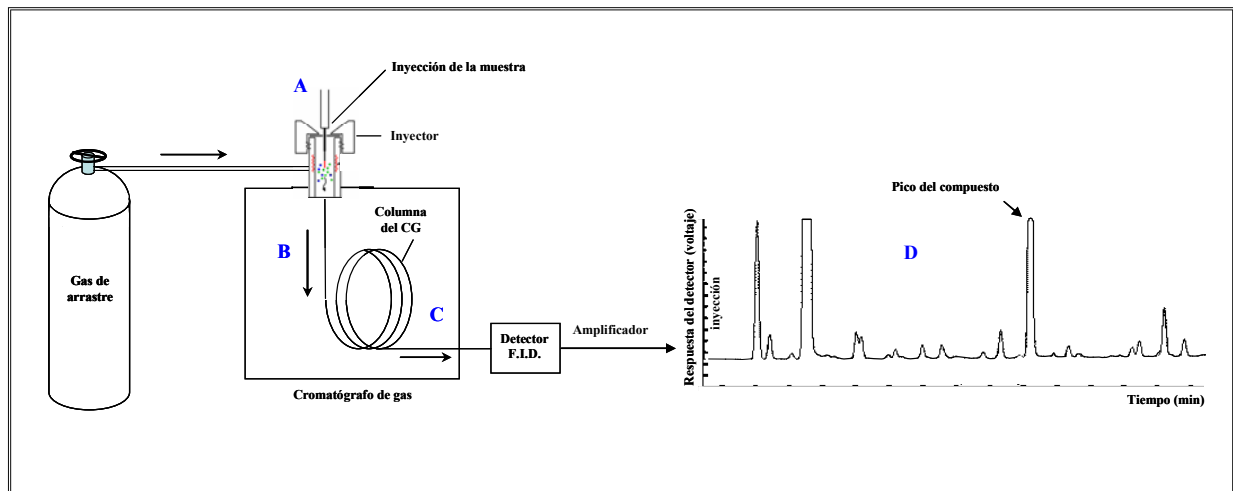


Figura 3.3. Cromatógrafo de gas básico. **A)** mezcla de varios compuestos inyectados dentro de una cámara previamente calentada (inyector) donde el vapor de la muestra se mezcla con la corriente de gas inerte y es arrastrada hacia la entrada de la columna. **B)** A medida que el vapor de la mezcla es arrastrado por el flujo de gas inerte, los compuestos con mayor afinidad por el revestimiento de la columna viajarán más lentamente y se separarán de los compuestos con menor afinidad por el revestimiento de la columna. **C)** A medida que los compuestos continúan moviéndose a través de la columna, cada compuesto aislado sale (se eluye) secuencialmente hacia un detector que, conectado a un amplificador, produce un voltaje proporcional a la cantidad de compuesto que pasa a través de él. **D)** Cromatograma de gas: nivel de respuesta del detector (voltaje) en función al tiempo de retención transcurrido y proyectada en una pantalla de computadora mediante el uso de un software apropiado.

En la cromatografía gaseosa se utilizan diversos componentes: el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de una estufa que lo contiene) y el detector (Fig. 3.3). El gas portador (fase *móvil*) proviene de cilindros provistos con válvulas reductoras de presión y cumple básicamente con el propósito de transportar los componentes de la muestra y crear una matriz adecuada para el detector. Luego, la muestra de interés se introduce en el puerto de inyección, por ejemplo mediante una fibra de micro-extracción en fase sólida (o SPME: *Solid-Phase MicroExtraction*, ver más adelante), produciéndose la desorción de la misma y su introducción en la corriente de gas. La columna se halla dentro de una estufa a temperatura variable, lugar donde se realiza la separación de los componentes de la muestra. La separación de los componentes de la mezcla se produce

por las diferentes solubilidades en esta fase a una temperatura dada, en base a sus presiones de vapor relativas y de acuerdo a sus afinidades con la fase estacionaria. Cuando los compuestos son arrastrados por la corriente del gas, algunos poseen una afinidad química mayor por el revestimiento de la columna que otros y viajarán más lentamente. Como resultado, los compuestos se separan a medida que viajan a través de la columna y saldrán de esta a diferentes momentos (el *tiempo de retención* del compuesto). Las sustancias separadas salen de la columna disueltas en el gas de arrastre y pasan por un detector: dispositivo que genera una señal eléctrica proporcional a la cantidad del material eluido a medida que cada componente separado fluye a través de él. En la cromatografía de gases, la velocidad a la cual viaja un compuesto también depende de la temperatura de la columna (los compuestos se mueven más rápidamente a mayores temperaturas de la columna). Por esta razón, la columna está alojada en una estufa cuya temperatura puede ser controlada con mucha precisión.

El efluente de la columna del cromatógrafo es liberado a un detector que produce voltaje de corriente directa cuya amplitud es proporcional a la concentración del compuesto eluido de la columna. El detector comúnmente utilizado es el de ionización de llama (FID: *Flame Ionization Detector*) que es sensible a todas las moléculas orgánicas. La salida de este detector es normalmente representada en un gráfico de dos ejes siendo el eje de las ordenadas el que representa el voltaje del detector y el eje de las abscisas representa el tiempo. Con la misma columna y condiciones operativas del cromatógrafo de gases, un compuesto particular siempre eluirá con el mismo tiempo de retención siendo, entonces, el tiempo de retención un carácter diagnóstico que puede ser usado para identificar individualmente compuestos en mezclas desconocidas.

El *tiempo de retención* de un componente de la muestra es el tiempo transcurrido desde la inyección de la misma hasta la aparición del máximo pico correspondiente a dicho

componente. De esta manera, es posible definir el tiempo de retención como el tiempo que un cierto componente permanece retenido en la fase estacionaria.

La cromatografía de gases puede estar asociada a la espectrometría de masas en una técnica híbrida conocida como GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) y tiene como función identificar diversas sustancias dentro de una muestra. La espectrometría de masas es una técnica experimental que permite la medición de iones derivados de moléculas. Las mediciones se realizan en un espectrómetro de masas que es el instrumento que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga. Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto.

Microextracción en fase sólida (SPME)

Esta técnica se utiliza con el fin de extraer, separar y analizar mezclas de sustancias volátiles para su posterior identificación y consiste en una columna capilar de cromatografía de gases muy corta (aprox. 2 cm) abierta al exterior. La fase sólida es una fibra que puede estar constituida por un polímero líquido o un adsorbente sólido que sirve para la extracción. Esta capa puede extraer diferentes tipos de moléculas, volátiles o no volátiles, de diferentes tipos de medios en fase líquida o gaseosa (Fig. 3.4). La cantidad de moléculas extraídas por la fibra es proporcional a su concentración en la muestra, siempre y cuando se alcance el equilibrio termodinámico.

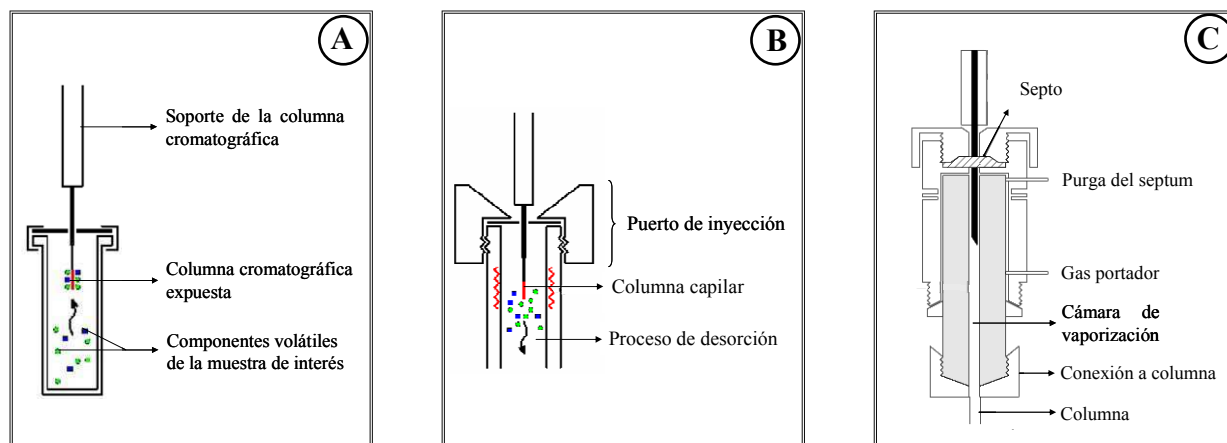


Figura 3.4. A) Columna capilar cromatográfica expuesta a la mezcla de volátiles de interés para su adsorción. B) Inyección de la muestra adsorbida en A) en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases (desorción de la muestra). C) Detalle del puerto de inyección y conexión a la columna cromatográfica.

Inyección de la muestra

Luego de la extracción, la fibra es transferida al puerto de inyección del cromatógrafo de gases (instrumento de separación), donde la desorción de las moléculas tiene lugar (Fig. 3.4-B). La inyección de la muestra en el cromatógrafo de gases implica la introducción de la fibra con los analitos que se desorben por calor en una cámara de vaporización instantánea dentro del cromatógrafo gaseoso para tomar contacto con el flujo de gas de arrastre (Fig. 3.4-C).

Este método de microextracción se realiza de manera rápida y no utiliza solventes. El umbral de detección varía según la afinidad de los compuestos adsorbidos por la fase sólida y puede estar en el orden de partes por trillón (ppt).

Cromatografía gaseosa acoplada a electroantodetección (CG-EAD)

La electroantografía acoplada a un cromatógrafo de gases, implica que los volátiles obtenidos de una mezcla son registrados simultáneamente por la antena y por el detector electrónico (FID) del cromatógrafo. Este procedimiento permite la identificación rápida de los

compuestos de mezclas complejas que pueden estimular las sensillas olfativas de un insecto, o sea, con esta técnica es posible saber qué sustancia química específica es detectada fisiológicamente por la antena del insecto puesto a prueba. Se pueden utilizar olores derivados directamente de fuentes naturales. Esta información puede ser utilizada para descubrir compuestos biológicamente relevantes (*e.g.*, feromonas) que modifiquen el comportamiento de los insectos.

En el CG-EAD, el efluente que sale del extremo de la columna es separado en dos, con una porción del efluente dirigido hacia el FID y la otra que pasa a través de la corriente de aire purificada que es inyectada hacia la antena del insecto (Fig. 3.5). Los electrodos en contacto con la hemolinfa del insecto conducen voltaje con corriente directa desde la antena hacia la entrada de un amplificador de alta impedancia el cual a su vez alimenta a un lector gráfico que expone simultáneamente la salida de voltaje de la antena y la del FID en función del tiempo (Fig. 3.5-E). Los cambios sincronizados de voltaje del FID con los de la antena indican sensibilidad olfativa por parte del insecto al compuesto eluido en un tiempo de retención particular. La salida del FID puede usarse para confirmar la presencia, identidad y cantidad de los compuestos expuestos a la antena mientras que la salida de la antena (EAD) indica la presencia o ausencia de sensibilidad olfatoria a los compuestos eluidos y provee una medida relativa de la intensidad de la estimulación olfatoria.

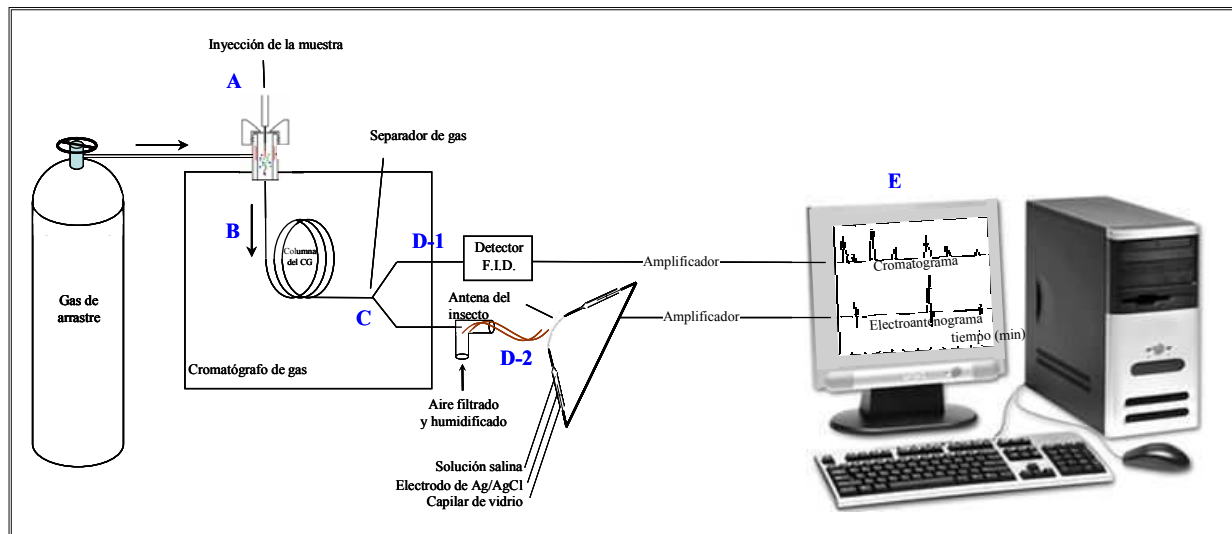


Figura 3.5. Cromatógrafo de gas acoplado a un detector electroantenográfico (CG-EAD). **A)** La mezcla de varios compuestos es inyectada y arrastrada hacia la entrada a la columna. **B)** El gas inerte arrastra el vapor de la muestra y los compuestos con mayor afinidad con el revestimiento viajarán más lentamente y se separarán. **C)** El efluente de la columna es dividido en dos: una mitad viaja hacia el FID y la otra mitad es llevada simultáneamente hacia la antena del insecto. **D-1)** El FID produce un voltaje proporcional a la cantidad de compuesto orgánico del efluente de la columna. **D-2)** El efluente de la columna es mezclado con aire purificado e inyectado sobre la antena del insecto unida a un amplificador. **E)** La salida eléctrica amplificada tanto del FID como de la antena son simultáneamente proyectados en una pantalla de computadora.

Las mediciones de la actividad eléctrica de las antenas se realizan midiendo el cambio del potencial eléctrico de la antena cuando esta es estimulada con sustancias volátiles. Si un incremento en la concentración de la sustancia que se está probando induce un incremento en la magnitud del cambio de potencial eléctrico, esto se debe a que existen receptores olfativos que responden de manera dosis-dependiente al olor en cuestión.

Productos de las glándulas metasternales de las vinchucas

Uno de los tipos de glándulas exocrinas presentes en triatominos, y estudiados en esta Tesis, son las glándulas metasternales cuyos orificios de salida abren en el metatórax lateral contiguamente a las cavidades de inserción del tercer par de patas. (Fig. 1.5 y 1.7-A). Los compuestos volátiles de las glándulas metasternales de *T. infestans* y de *R. prolixus* fueron estudiados por Manrique *et al.* (2006) y Pontes *et al.* (2008), respectivamente. En *T. infestans* se identificaron seis compuestos (Fig. 3.6), siendo los compuestos más abundantes la 3-pentanona, 2-metilbutanol, 3-pentanol y un compuesto aún no identificado, tanto de hembras como de machos. La 3-pentanona, el componente que representa el 76% de la secreción de las glándulas metasternales de *T. infestans*, fue detectada sobre el aire circundante (*headspace*) de parejas en cópula, sugiriendo que estos olores podrían intervenir en la comunicación sexual de esta especie (Manrique *et al.*, 2006). En ensayos de comportamiento, Crespo y Manrique (2007) demostraron que las glándulas metasternales de hembras de *T. infestans* participan en el comportamiento sexual de esta especie, promoviendo tanto la ocurrencia de cópula como el comportamiento de agregación de machos alrededor de la pareja en cópula descrito para esta especie. Por otro lado, estos autores propusieron que las glándulas de Brindley no tendrían un rol en la ocurrencia de cópula ni tampoco en la promoción de la agregación de machos ya que la oclusión de sus orificios no modificó la frecuencia de cópula ni la agregación de machos.

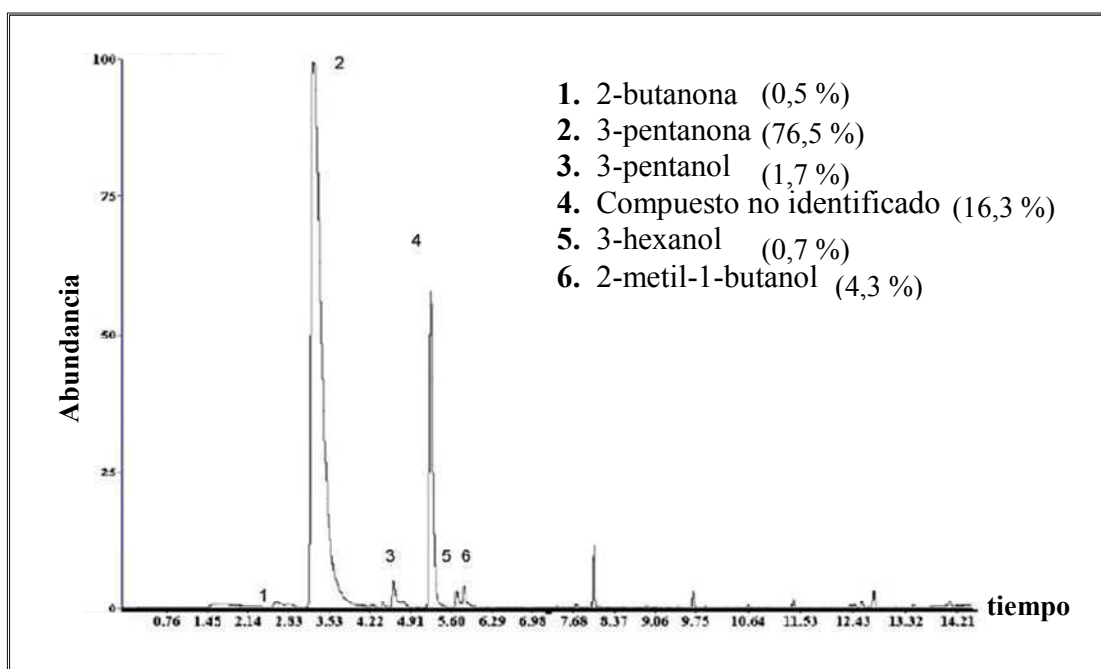


Figura 3.6. Cromatografía gaseosa de los compuestos volátiles presentes en las glándulas metasternales en hembras de *T. infestans*. Entre paréntesis: porcentaje del compuesto sobre el total de la muestra. Compuestos identificados mediante CG-MS. Técnica de captura de volátiles: SPME (figura modificada de Manrique *et al.*, 2006).

Los productos de secreción de las glándulas metasternales de hembras y machos de la vinchuca *R. prolixus* producen unos doce compuestos siendo todos ellos cetonas y alcoholes (Pontes *et al.*, 2008). Los compuestos más abundantes son 2-metil-3-buten-2-ol, (2S)-pentanol, (3E)-2-metil-3-penten-2-ol y (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol (Fig. 3.7). Sin embargo, son las hembras las que emiten productos de secreción más abundantemente que los machos durante las primeras horas de la escotofase (Pontes *et al.*, 2008). El 2-metil-3-buten-2-ol ya ha sido reportado como parte de las feromonas de agregación de varias especies de escarabajos de la corteza (Giesen *et al.*, 1984; Klimetzek *et al.*, 1989; Schlyter *et al.*, 1992) y también como parte de una feromona de alarma en el avispa asiático *Vespa crabro* (Veith *et al.*, 1984). El 2-pentanol ha sido encontrado en la avispa chaqueta amarilla (Ono *et al.*, 2003; Ono, 2005), como un attractante a frutos para los coleópteros *Carpophilus hemipterus* y *Conotrachelus nenuphar* (Phelan y Lin, 1991; Prokopy *et al.*, 2001), y como parte de

secreciones defensivas de *Polyzosteria* y cucarachas relacionadas (Wallbank y Waterhouse, 1970). Por otro lado, análisis realizados en *R. prolixus* por Pontes *et al.* (2008) detectaron la liberación de compuestos de las glándulas metasternales sobre parejas en cópula y observaron una disminución de la frecuencia de cópula durante ensayos comportamentales con oclusión de los orificios de estas glándulas en machos o hembras. Por lo tanto, estas secreciones glandulares parecen estar involucradas en la comunicación sexual de esta especie.

Compuesto	Tiempo Retención (min)	Índice de Retención de Kováts	Cantidad Relativa (x± DE) (%) ♀	Cantidad Relativa (x± DE) (%) ♂
2-butanona	2,53	909	≤0,5	≤0,5
2-pentanona	3,68	979	≤0,5	≤0,5
(2S)-butanol	4,92	1030	5,7±1,4	2,2±0,7
2-metil-3-buten-2-ol	5,48	1048	61±10	62,2±7,2
3-metil-2-butanol	7,31	1108	1,1±0,5	0,9±0,3
3-pentanol	7,99	1120	1,4±0,4	1,1±0,2
(2S)-pentanol	8,50	1131	20±4,9	21±5,3
(3E)-2-metil-3-penten-2-ol	10,07	1166	6,1±3,0	5,3±1,5
(2S)-4-metil-2-pentanol	10,80	1181	≤0,5	≤0,5
(3S)-hexanol	12,00	1207	≤0,5	≤0,5
2-metil-1-butanol	12,49	1217	3,5±5,1	3,3±4,1
(2S/2R)-4-metil-3-penten-2-ol	14,99	1267	2,1±1,3	2,5±0,8

Figura 3.7: Identificación de los compuestos de las glándulas metasternales de *R. prolixus*. Se identificaron 12 cetonas y alcoholes, siendo los compuestos más abundantes: 2-metil-3-buten-2-ol seguido por (2S)-pentanol, (3E)-2-metil-3-penten-2-ol y 4-metil-3-penten-2-ol (Pontes *et al.*, 2008). En color gris están resaltados los compuestos que se pusieron a prueba en la presente Tesis en experimentos comportamentales de vuelo.

A partir de los trabajos realizados hasta el presente, surge que se ha avanzado en el conocimiento de la naturaleza química de las secreciones glandulares y en su función en diferentes contextos. Sin embargo, no se ha estudiado en forma precisa específica e individualmente a los compuestos químicos liberados por ambos tipos de glándulas exocrinas.

En este trabajo de Tesis, aspiramos a iniciar la caracterización de la respuesta electrofisiológica, es decir, a nivel del nervio antenal, sitio donde se encuentran la gran mayoría de receptores olfativos en insectos, y la respuesta comportamental de las vinchucas para determinar si alguna mezcla de los componentes volátiles liberados constituyen algún tipo de señal para las vinchucas en el contexto sexual.

El objetivo de esta primera parte fue identificar los volátiles liberados por las glándulas metasternales de las hembras detectados por las antenas del macho en *T. infestans* y *R. prolixus*. Para ello, se realizaron experimentos utilizando la técnica denominada cromatografía gaseosa acoplada a electroantenodetección (CG-EAD) con la finalidad de encontrar respuestas electrofisiológicas por parte de los receptores olfativos localizados en las antenas de los machos, ante los compuestos volátiles presentes en las glándulas metasternales de las hembras presentados separadamente por el cromatógrafo de gases.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron machos y hembras vírgenes de las especies *T. infestans* y *R. prolixus*, que fueron separados por sexo desde el 5° estadio y mantenidos en recipientes de acrílico utilizando papel de filtro como sustrato. Los insectos fueron mantenidos en un régimen de iluminación de 12:12 h luz:oscuridad, 28±2°C, 30-60% HR y alimentados quincenalmente sobre gallinas vivas. Se utilizaron adultos de 1 a 2 meses de edad con un ayuno de 7 a 10 días (*T. infestans*) y de 15 a 20 días (*R. prolixus*) al momento de los ensayos.

Obtención de las muestras de glándulas metasternales de hembras de T. infestans y R. prolixus

El procedimiento de obtención de las muestras de glándulas metasternales está descrito en el ítem *Obtención de las muestras* de la sección 3 de Procedimientos particulares y resultados del capítulo II de esta Tesis. Una vez obtenida la muestra, se mantenía a -18°C hasta los momentos previos del ensayo de CG-EAD.

Previamente a cada ensayo en el CG-EAD, cada muestra era sonicada en un dispositivo de ultra-sonido (Trotón, Inpec Eletrônica, Brasil) a una frecuencia de 40 kHz durante 5 minutos y después sometida a 50°C durante 30 min. Los olores eran capturados insertando la fibra de micro-extracción en fase sólida (SPME) del tipo DVB/CAR/PDMS a través de un soporte en el interior del frasco que contenía la muestra exponiéndola a los volátiles presentes allí dentro. La fibra de SPME utilizada tenía 2 cm de largo y 50-30 µm de ancho y estaba recubierta con divinilbenceno (DVB, mezcla de isómeros), carboxeno (CAR) y polidimetilsiloxano (PDMS) (SUPELCO, USA). (Fig. 3.4-A). Luego de la adsorción de los volátiles en la fase sólida de la fibra, la misma era insertada durante 1 minuto en el puerto de

inyección del cromatógrafo gaseoso para la desorción térmica de los analitos (Fig. 3.4-B). Se utilizó una columna cromatográfica del tipo SupelcoWax-10: 30 m de largo; 0,25 mm diámetro interno; 0,25 μm . El inyector del cromatógrafo fue programado a 230°C, utilizado en modo *splitless* siendo Helio (He) el gas de arrastre que circulaba a un velocidad de 30cm/s. El programa de temperatura utilizado para la estufa del CG fue el siguiente: 40°C durante 5 min, subsecuente calentamiento hasta 120°C aumentando 3°C/min y posteriormente hasta 200°C aumentando a una tasa de 15°C/min. La interfase fue calentada a 250°C y la energía de ionización fue de 70eV.

Identificación de compuestos individuales de glándulas metasternales de hembras que evocan respuestas electrofisiológicas en las antenas de los machos

El análisis de la respuesta de los receptores sensoriales de las antenas de las vinchucas a la estimulación con compuestos de las glándulas metasternales se llevó a cabo mediante registros electrofisiológicos extracelulares o electroantenogramas (EAG). Para ello, se enfriaba un macho en un congelador (-18°C) durante 2 min para anestesiarlo, luego de lo cual se realizaba un corte transversal en la cabeza por delante de los ojos. Luego se cortaba la proboscis por la base, cuidando que las antenas queden intactas. La conexión eléctrica de los electrodos (Fig. 3.8-B) se realizaba insertando el lado positivo del circuito a la abertura de la cabeza (poniendo en contacto el electrodo de referencia con la hemolinfa), mientras que el ápice de ambas antenas juntas se conectaba al electrodo negativo. El extremo de ambos flagelos antenales era cortado para asegurar buena conductividad eléctrica, cerrando así el circuito eléctrico para el registro del EAG (Fig. 3.8-A). Se utilizaron micromanipuladores (MP-12, Syntech, Holanda) para guiar los electrodos con precisión.

Las antenas se montaron entre 2 capilares de vidrio llenos de una solución de KCl 0,1M (de composición similar a la de la hemolinfa de la antena, modificada de Case, 1957)

asociados cada uno a 1 electrodo de plata con un diámetro interno entre 20-30 μm . Los electrodos se conectaron a un pre-amplificador de resistencia de entrada de 10^{12} Ohms (CS-05, Syntech, Holanda) de AC/DC para aumentar la intensidad de la señal de alta impedancia. De esta forma se midió y registró de manera continua (DC) la diferencia de potencial eléctrico entre ambos extremos (base de la cabeza y ápice de ambas antenas). La salida del pre-amplificador era procesada por una interfase que proveía un control basal opcional de la señal analógica-digital (IDAC 232, Syntech, Holanda). El almacenamiento, posterior análisis y visualización de la señal digitalizada del FID y la señal de la interfase se realizaba mediante una computadora equipada con un software para el CG-EAD (GC-EAD2000, Syntech, Holanda) (Fig. 3.5 y 3.8). De esta manera, la captura de datos se proyectaba en tiempo real mostrando en gráficos los resultados.

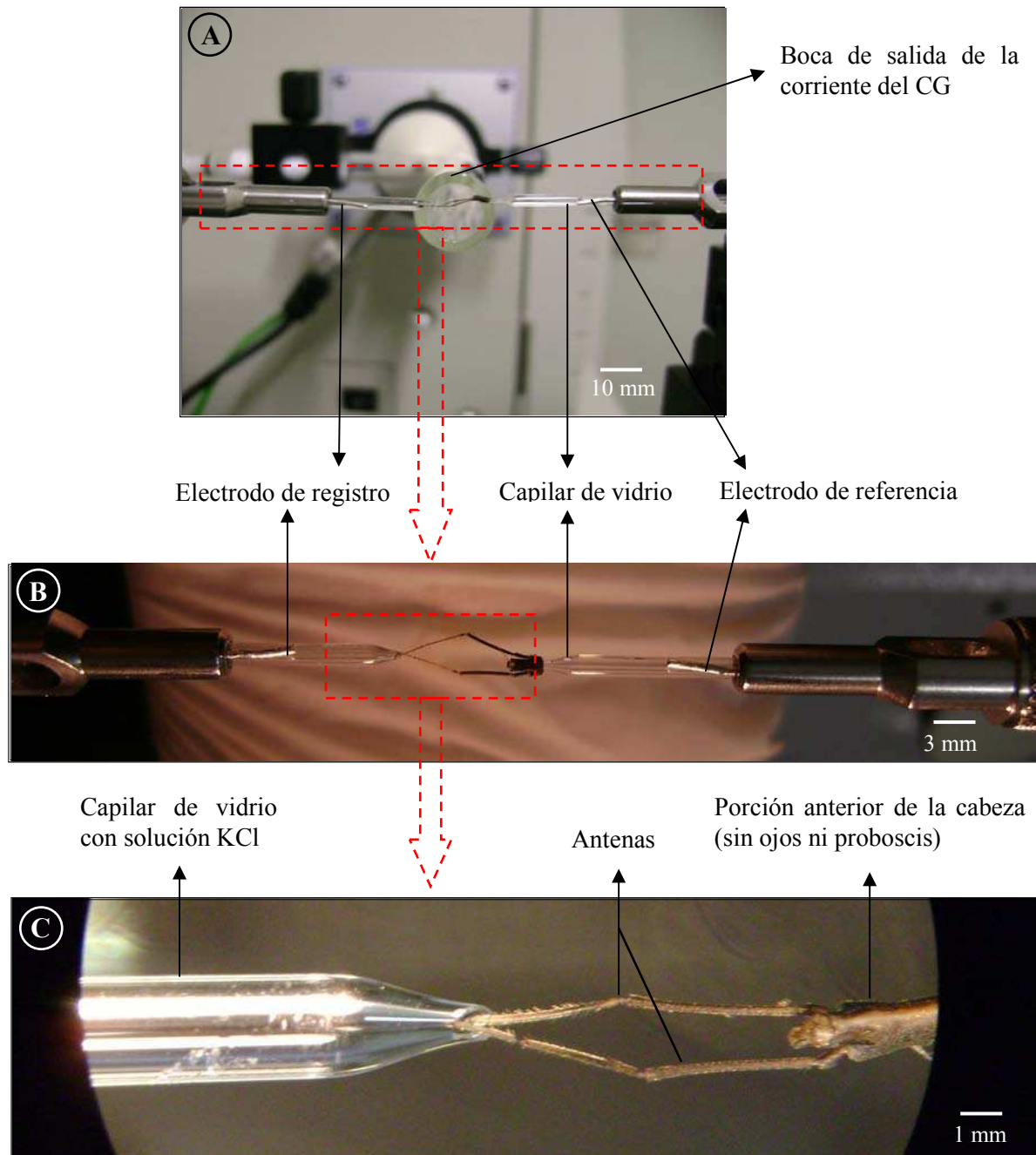


Figura 3.8. Disposición de las antenas de macho adulto de *R. prolixus* en el EAG (el procedimiento es idéntico en *T. infestans*). **A)** En primer plano, conexión de las antenas y porción de la cabeza a los electrodos. Segundo plano: transversal a los electrodos se observa la boca de salida de la corriente del CG. Rectángulo con línea discontinua: imagen aumentada en **B)**. **C)** Imagen aumentada de B). Antenas en contacto con el capilar de vidrio que contiene al *electrodo de registro* inmerso en solución de KCl.

La estimulación de las antenas se llevó a cabo mediante la presentación de una corriente de aire continua de flujo controlado (280 ml/min) humidificada luego de pasar por un recipiente con agua destilada. La corriente de aire era conducida por medio de una manguera de silicona hasta un tubo de vidrio en forma de "L" (lado largo: 11 cm; lado corto: 8 cm; diámetro: 0,8 cm), cuyo extremo distal de salida de la corriente de aire estaba a 0,3 cm de distancia de la antena (Fig. 3.9).

Antenas suspendidas entre los electrodos del EAG
(ver Fig. 3.8-A)

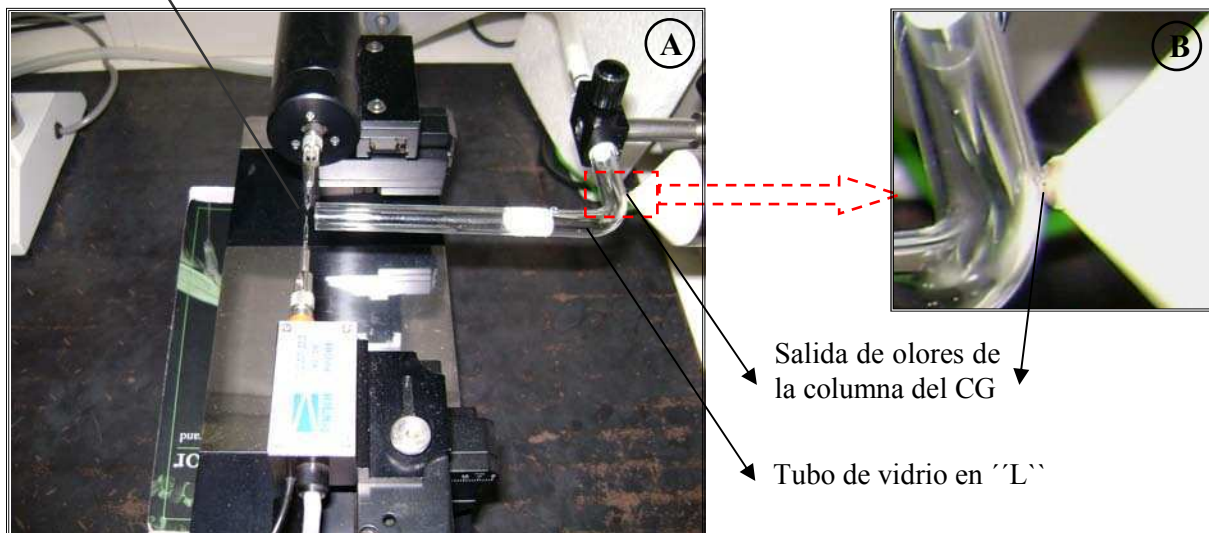


Figura 3.9. Interfase entre el cromatógrafo de gases y el electroantenógrafo. **A)** vista general de la interfase; a derecha: parte terminal de la columna cromatográfica en contacto con una corriente de aire controlada contenida en un tubo de vidrio en forma de "L"; a izquierda: la corriente de aire del tubo desemboca frente a las antenas conectadas al electroantenógrafo. **B)** Detalle de conexión entre la columna del CG y el tubo de vidrio con corriente de aire controlada.

Teniendo en cuenta que el largo de las antenas era de 6 mm aproximadamente, y que el diámetro interno de la boca del tubo de estimulación era de 8 mm, la corriente saliente cubría la totalidad de la antena. Para determinar si la preparación se encontraba en buen

estado, se soplab a una bocanada de aliento sobre las antenas confirmando que hubiera una respuesta previamente y al final de cada ensayo. Para los registros se utilizaron antenas de un total de 10 machos de cada especie (*T. infestans* o *R. prolixus*) estimulados por los volátiles de muestras compuestas por 10 glándulas metasternales provenientes de 5 hembras conoespecíficas cada una.

Identificación química de los compuestos glandulares de hembras

Con el objetivo de confirmar la identidad química de los compuestos presentes en las muestras de las glándulas metasternales de hembras, se introdujeron compuestos químicos sintéticos en el cromatógrafo de gases siguiendo el mismo protocolo de temperatura utilizado para analizar las muestras glandulares. Se estimularon así antenas de machos con compuestos químicos sintéticos y se observó la respuesta electrofisiológica frente a cada uno de ellos. Según los resultados obtenidos con las muestras de glándulas (ver abajo), se estimuló a las antenas de machos de *T. infestans* con 3-pentanona y para machos de *R. prolixus* con 2-metil-3-buten-2-ol, 2-metil-1-butanol, (2S)-pentanol y 2-butanol. En la siguiente tabla se muestran las características de los compuestos utilizados:

Compuesto	Peso Molec.	Grado de pureza	Origen	Especie en la que se utilizó
3-pentanona	86,13	98%	Sigma-Aldrich (EUA)	<i>T. infestans</i>
2-metil-1-butanol	88,95	99 %	Sigma-Aldrich (EUA)	<i>R. prolixus</i>
(2S)-pentanol	88,14	99,5 %	Fluka (Suiza)	<i>R. prolixus</i>
2-metil-3-buten-2-ol	86,1338	98 %	Sigma-Aldrich (Alemania)	<i>R. prolixus</i>
2-butanol	72,11-	99%	Sigma-Aldrich (EUA)	<i>R. prolixus</i>

RESULTADOS

Identificación de compuestos individuales de glándulas metasternales de hembras que evocan respuestas electrofisiológicas en las antenas de los machos

Triatoma infestans

Los resultados electrofisiológicos sobre 10 pares de antenas de machos analizados mostraron solamente respuesta electrofisiológica frente a la 3-pentanona presente en las muestras de glándulas metasternales de las hembras (Fig. 3.10), demostrando que las antenas de los machos perciben este compuesto (el 100% de las antenas analizadas respondió a este compuesto). Para confirmar la identidad química del pico que provocó la respuesta de la antena se estimuló a la antena del macho con volátiles del compuesto sintético obtenido comercialmente, en este caso, 3-pentanona (Sigma-Aldrich). El compuesto sintético era inyectado en el CG y sometido al mismo protocolo de secuencia de temperaturas que las muestras de las glándulas. Como resultado obtuvimos una coincidencia de los tiempos de retención entre el pico del sintético y el pico que provocó la respuesta en la antena, por lo que pueden ser considerados como el mismo compuesto. El pico de compuesto del FID que coincide con una respuesta en el EAD (Fig. 3.10) tiene un tiempo de retención aproximado de 4,75 min y coincidentemente, la 3-pentanona sintética presentó un tiempo de retención de 4,82 min (Fig. 3.11).

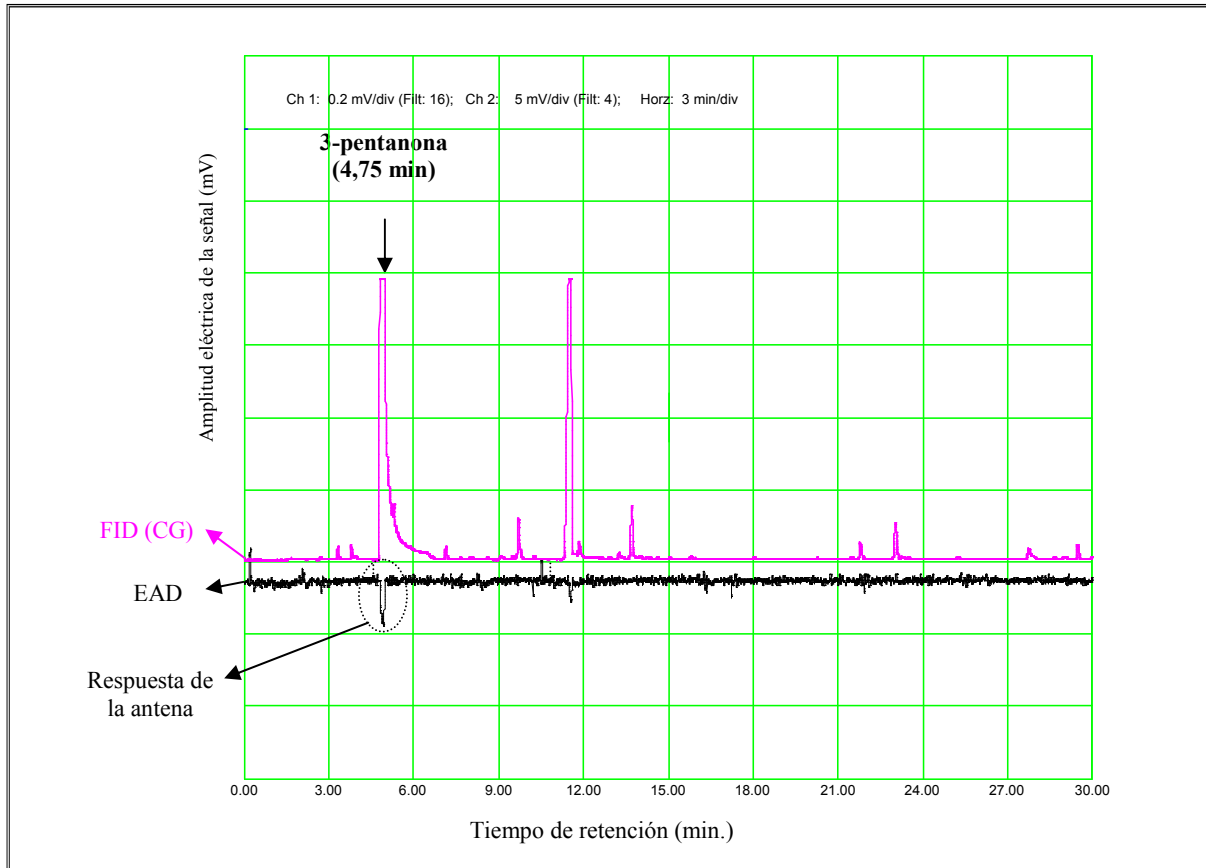


Figure 3.10. Cromatografía gaseosa (FID) y la correspondiente señal de electroantenograma (EAD) de las antenas de un macho de *T. infestans* en respuesta a volátiles de **10 glándulas metasternales** de hembras. FID: 0,2mV/división; EAD: 5mV/división.

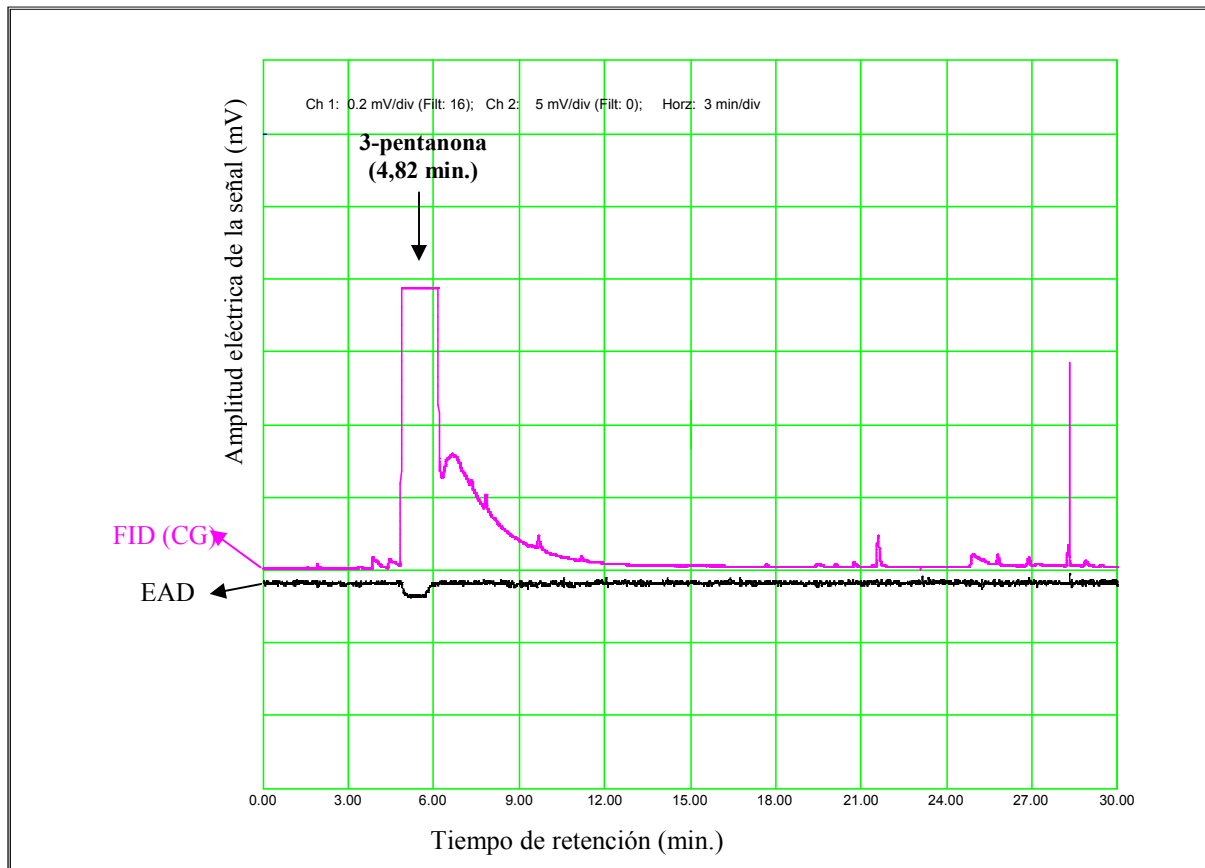


Figure 3.11. Cromatografía gaseosa (FID) y la correspondiente señal de electroantenograma (EAD) de las antenas de un macho de *T. infestans* en respuesta a volátiles compuesto **3-pentanona** sintético. FID: 0,2mV/división; EAD: 5mV/división.

Paralelamente, en ensayos control, se analizaron las respuestas electrofisiológicas de seis antenas de machos frente a los volátiles capturados de muestras de cutícula y tejido no glandular (Fig. 3.12). No se encontraron respuestas electrofisiológicas de las antenas al ser estimuladas con muestras control.

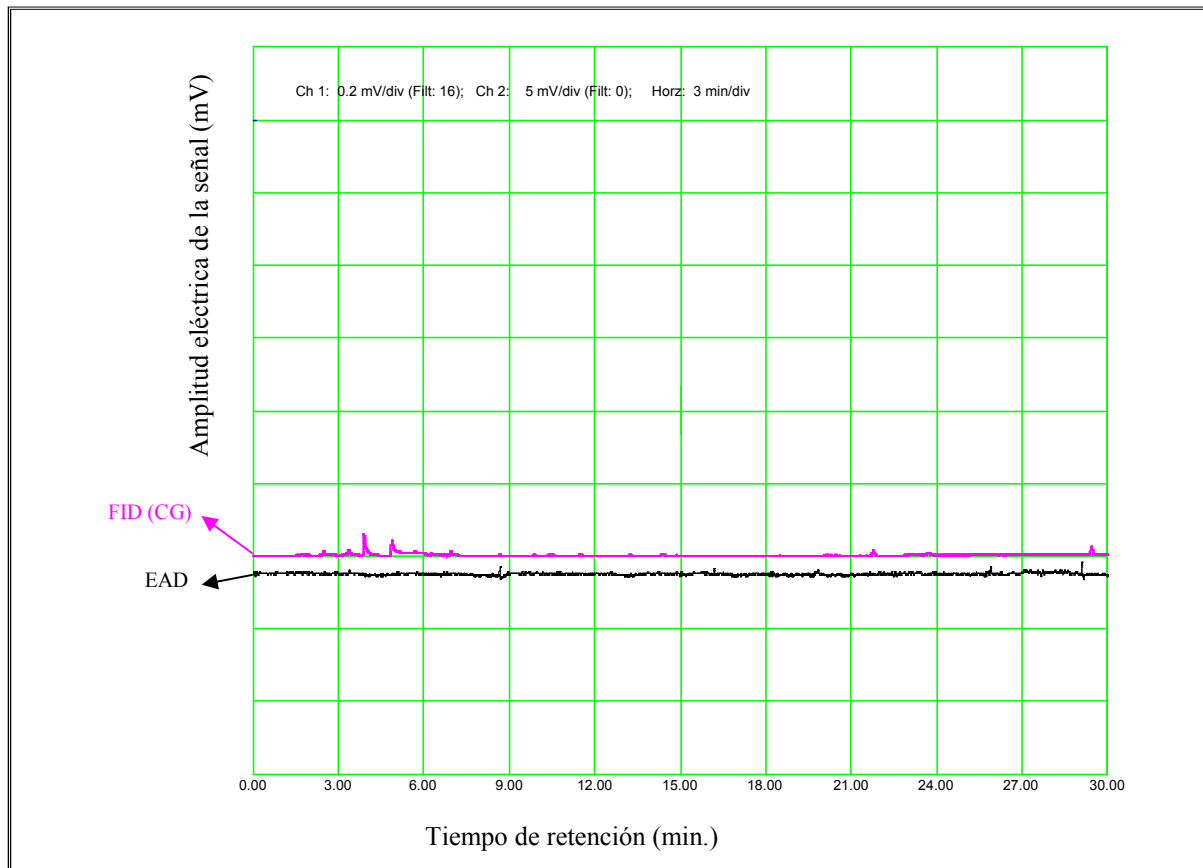
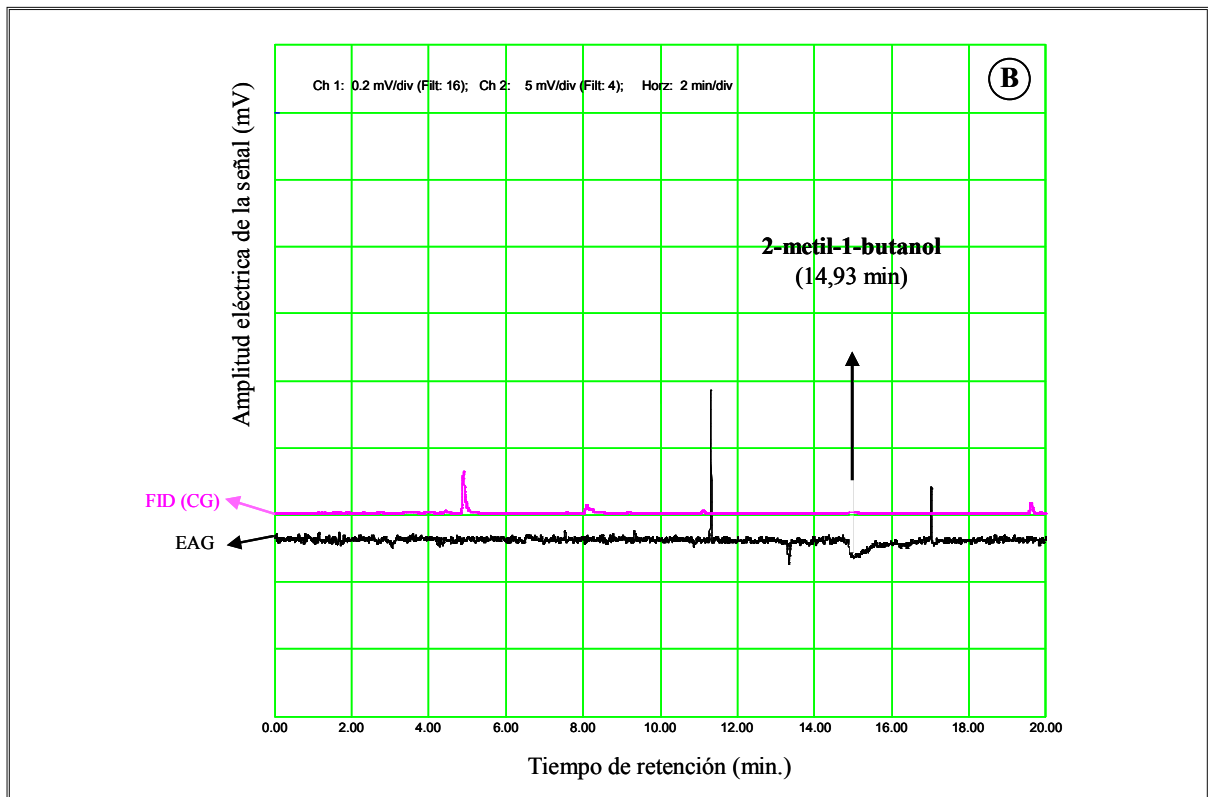
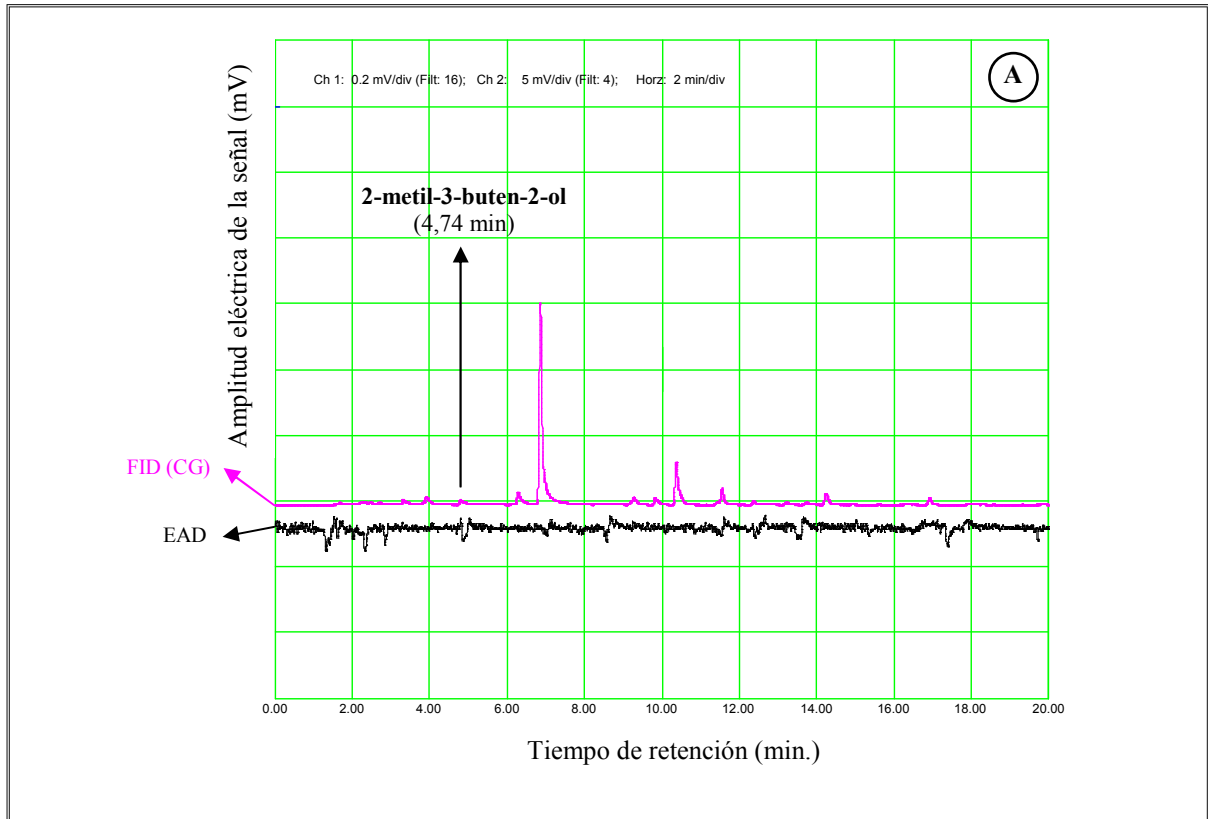


Figure 3.12. Cromatografía gaseosa (FID) y la correspondiente señal de electroantenograma (EAD) de las antenas de un macho de *T. infestans* en respuesta a volátiles de una **muestra control** proveniente de 10 piezas de cutícula de hembras. FID: 0,2mV/división; EAD: 5mV/división.

Rhodnius prolixus

Las mediciones electrofisiológicas se realizaron de la misma manera y bajo las mismas condiciones experimentales que para las antenas de los machos de *T. infestans*. Las respuestas mostradas por las antenas de *R. prolixus* resultaron poco consistentes y hasta ahora no repetibles al ser estimuladas con volátiles de muestras de glándulas metasternales de hembras, por lo que estos resultados pueden considerarse preliminares o exploratorios. A pesar de esto, se observaron respuestas electrofisiológicas ante la estimulación con volátiles provenientes de las muestras de glándulas metasternales, identificados como 2-metil-3-buten-2-ol (Fig. 3.13-A), 2-metil-1-butanol (Fig. 3.13-B) y (2S)-pentanol (Fig. 3.13-C).



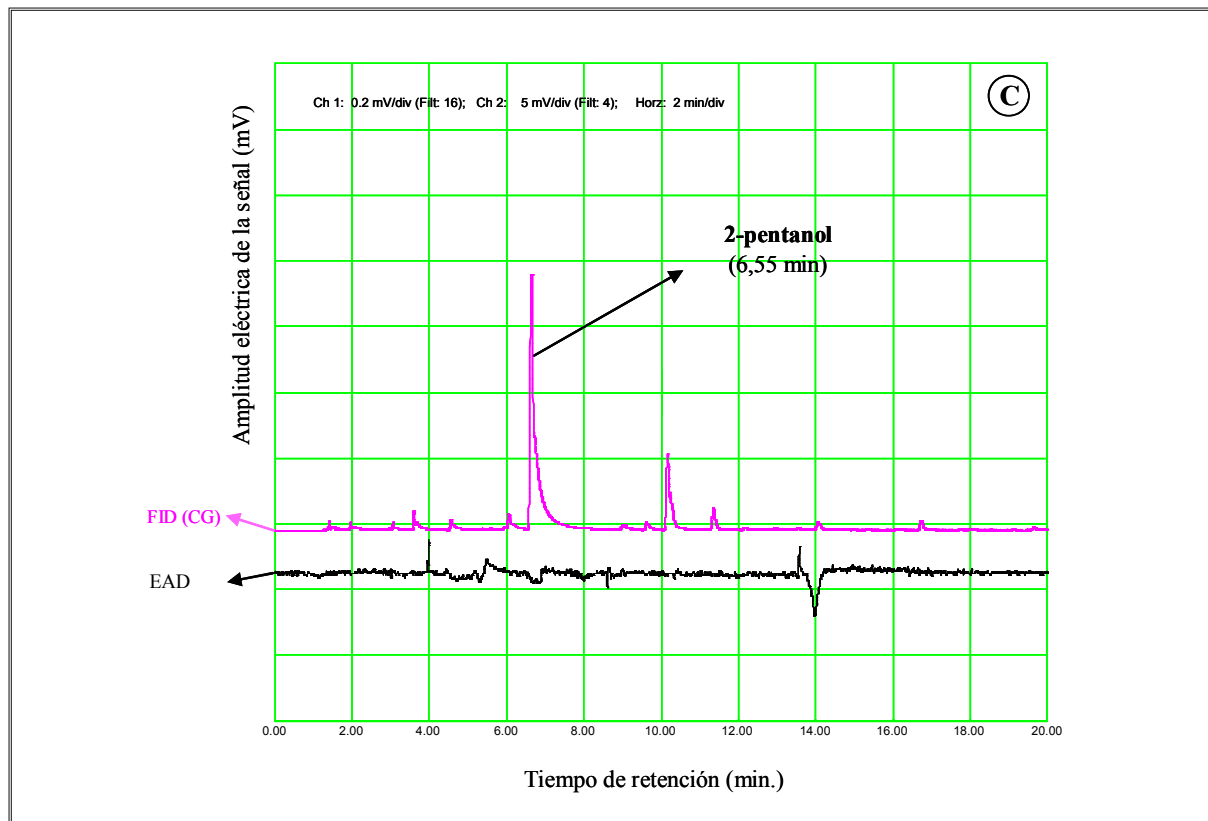


Figure 3.13. Cromatografía gaseosa (FID) y la correspondiente señal de electroantenograma (EAD) de las antenas de un macho de *R. prolixus* en respuesta a volátiles de **10 glándulas metasternales** de hembras. En las figuras se señalan los compuestos que evocaron una respuesta antenal: **A)** 2-metil-3-buten-2-ol, **B)** 2-metil-1-butanol y **C)** (2S)-pentanol. FID: 0,2mV/división; EAD: 5mV/división.

Se confirmó la naturaleza química de algunos de los volátiles presentes en las glándulas metasternales que evocaban alguna respuesta electrofisiológica mediante la estimulación de las antenas con compuestos sintéticos obtenidos comercialmente (2-metil-3-buten-2-ol, 2-metil-1-butanol y (2S)-pentanol) (Fig. 3.14 A-C).

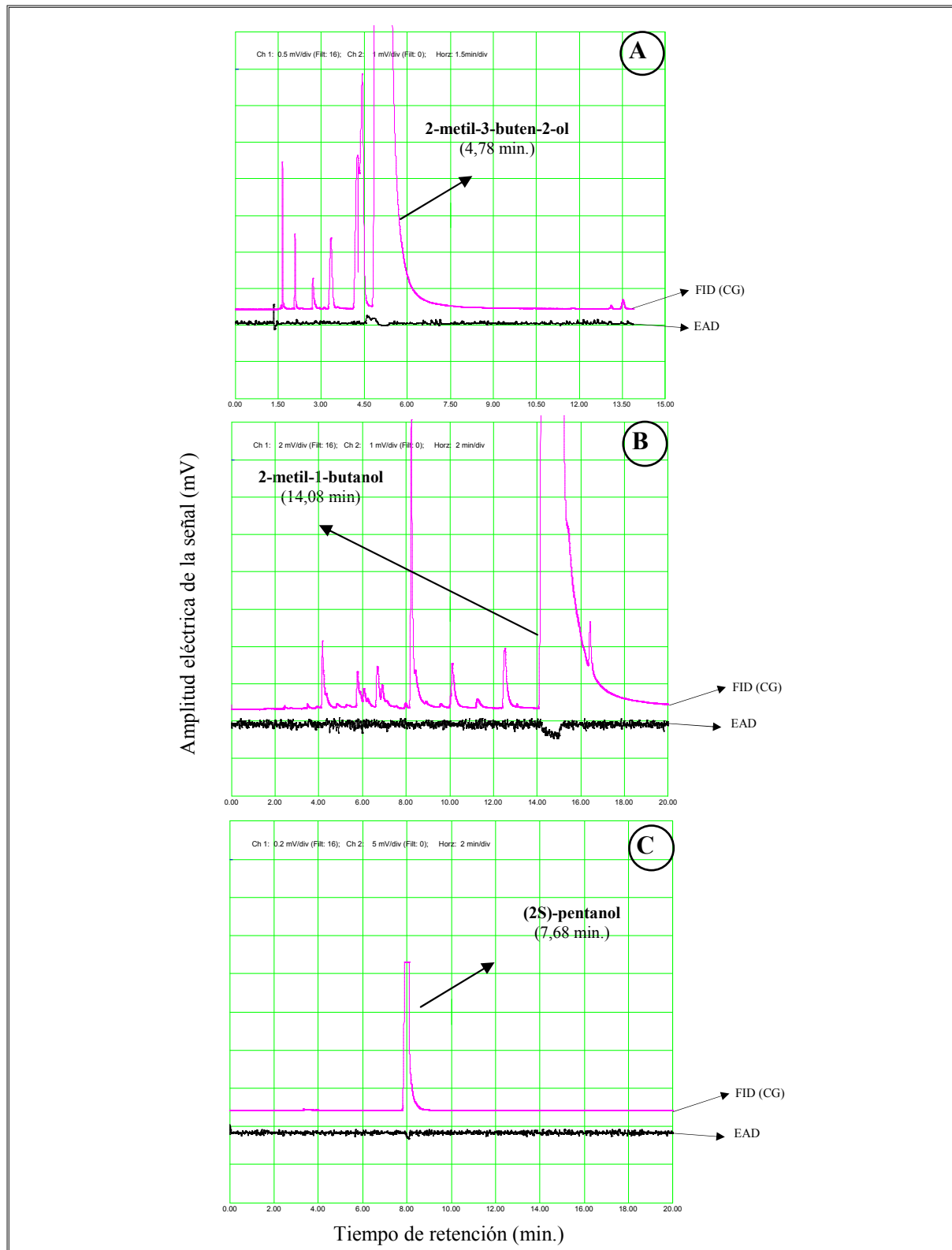


Figure 3.14. Cromatografía gaseosa (FID) y la correspondiente señal de electroantenograma (EAD) de las antenas de un macho de *R. prolixus* en respuesta a volátiles de los compuestos sintéticos: A) 2-metil-3-buten-2-ol; B) 2-metil-1-butanol; C) (2S)-pentanol. FID: 0,2mV/división; EAD: 5mV/división.

Parte II: ANÁLISIS COMPORAMENTAL

INTRODUCCIÓN

En el capítulo II se analizó la relación entre el comportamiento de inicio de vuelo en *R. prolixus* y las claves químicas involucradas en el contexto sexual. Se estudió también la posible fuente de emisión de dichos compuestos volátiles, proponiendo a las glándulas metasternales de las hembras como las responsables de la comunicación y reconocimiento sexual a distancia en *R. prolixus*. Luego, en la primer parte del actual capítulo estudiamos cuales de los compuestos individuales de las glándulas metasternales son percibidas a nivel periférico por las antenas de dichos insectos. En esta segunda parte del capítulo III estudiaremos las respuestas comportamentales de machos a los compuestos detectados por las antenas de *R. prolixus*.

La técnica de CG-EAD es de gran utilidad para identificar compuestos capaces de generar una respuesta fisiológicas a nivel del sistema periférico de los insectos estimulados con claves olfativas naturales y complejas. Los ensayos electrofisiológicos con antenas pueden ayudar a explorar olores encontrados en el medio ambiente de un insecto permitiendo la identificación de aquellos que podrían afectar alguna actividad comportamental. Así, si un compuesto no evocara ningún cambio en el electroantograma, difícilmente se obtendrían resultados significativos en bioensayos posteriores, ya que el insecto no contaría con receptores en la antena que detecten ese compuesto. De esta manera, una vez identificados, es posible poner a prueba el efecto de distintas sustancias químicas sobre distintos aspectos comportamentales de los insectos.

Pontes *et al.* (2008) identificaron los compuestos producidos por las glándulas metasternales de *R. prolixus* y establecieron una asociación entre las secreciones altamente

volátiles y la comunicación sexual. Demostraron también que los compuestos producidos por las glándulas metasternales son emitidos espontáneamente por los adultos vírgenes de ambos sexos, siendo esta emisión más intensa en las hembras y durante la escotofase. Además, en ensayos comportamentales se registró una reducción en la ocurrencia de cópula en ausencia de los olores producidos por las glándulas metasternales de machos o de hembras, lo que indicaría la existencia de procesos de reconocimiento inter-sexual.

En estudios realizados utilizando cromatografía gaseosa asociada con espectrometría de masa o CG-MS se identificaron hasta doce compuestos producidos por las glándulas metasternales de *R. prolixus* (Pontes *et al.*, 2008). Ambos sexos presentan el mismo perfil de secreción glandular siendo el 2-metil-3-buten-2-ol, (2S)-pentanol, (3E)-2-metil-3-penten-2-ol y (2R/2S)-4-metil-3-penten-2-ol los más abundantes. Como ya ha sido mencionado, son las hembras las que liberan más frecuentemente estos compuestos durante las primeras horas de la noche. Durante el período oscuro muchas especies de triatominos, incluyendo a *R. prolixus*, presentan su pico de máxima actividad *e.g.*, el comportamiento de agregación/dispersión (Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994), el inicio del vuelo (McEwen y Lehane, 1993), la salida de refugios y la búsqueda de alimento (Lorenzo y Lazzari, 1996). Por otro lado, la oclusión de los orificios de salida de las glándulas metasternales de machos o hembras deviene en una significativa reducción de la frecuencia de cópula, lo cual sugiere que las secreciones de las glándulas metasternales de *R. prolixus* estarían involucradas en la comunicación sexual.

En base a estos datos y con el objetivo de identificar los compuestos individuales funcionalmente activos en la comunicación entre sexos de *R. prolixus*, se puso a prueba la activación del inicio de vuelo de los machos en presencia de algunos compuestos sintéticos (obtenidos comercialmente) presentes en las secreciones de las glándulas metasternales de las hembras. De esta manera, el objetivo particular de esta parte de la Tesis fue analizar el/los

compuestos potencialmente implicados en el acercamiento de machos a hembras e investigar las dosis capaces de promover el inicio del vuelo de machos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron adultos de *R. prolixus* criados en nuestro laboratorio a una temperatura de $28\pm 1^\circ\text{C}$, 30-60% HR y con un régimen de iluminación de 12:12 h luz:oscuridad. Se utilizaron adultos vírgenes para lo cual las larvas de 5° estadio fueron separadas por sexo hasta la eclosión imaginal y luego las hembras y machos adultos permanecieron en recipientes separados. Se utilizaron adultos de 1-2 meses de edad y con un ayuno de 14-25 días.

Se realizaron experimentos de activación del inicio de vuelo de machos de *R. prolixus* en relación a cuatro volátiles sintéticos:

- (2S)-pentanol (Fig. 3.15)
- 2-metil-1-butanol (Fig. 3.16)
- 2-metil-3-buten-2-ol (Fig. 3.17-A)
- 2-butanol (Fig. 3.17-B)

Dichos compuestos fueron seleccionados en base a que generaron respuestas electrofisiológicas en antenas de machos, y que además son los más representados en los registros obtenidos con cromatografía gaseosa de glándulas metasternales de las hembras. El dispositivo (Fig. 2.1-2.2) y metodología utilizados fueron los mismos que los descritos en el capítulo anterior. La forma de liberación del estímulo fue diferente al ser evaluadas distintas dosis de los compuestos sintéticos. Con el objetivo de encontrar la proporción adecuada capaz de promover la máxima respuesta de vuelo de machos, se evaluaron distintas dosis de los compuestos específicos exponiendo a grupos de machos de *R. prolixus* a los compuestos químicos sintéticos: 2-metil-3-buten-2-ol, 2-metil-1-butanol, (2S)-pentanol, 2-butanol. Los machos (N =20 por ensayo) se liberaban en la arena experimental suspendida en el interior de la carpa de tela (Fig. 2.1 y 2.2), de la cual los insectos sólo podían abandonar mediante el

vuelo. La preparación del estímulo consistía en mezclar distintos volúmenes de cada compuesto sintético en estado líquido con aceite mineral dentro de un vial de 2 ml que inmediatamente se tapaba herméticamente para evitar la evaporación del mismo. Posteriormente, el vial se destapaba manualmente y se anteponeía a una corriente de aire ($12 \pm 0,88$ cm/s) (Fig. 2.1) que alcanzaba la plataforma de vuelo desde donde los insectos podían iniciar el vuelo. Una videofilmadora registraba el comportamiento de vuelo en ensayos de 8 h de duración, que iniciaban al comienzo de la escotofase. Los ensayos se realizaban en oscuridad funcional para los insectos, bajo condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) y HR (30 - 40 %).

Series experimentales

Se realizaron diluciones de cada uno de los compuestos en un volumen de aceite mineral constante con el objetivo de poner a prueba grupos de 20 machos de *R. prolixus* estimulados con un amplio rango de dosis de cada compuesto y explorar la respuesta de inicio del vuelo. Cada grupo de machos era estimulado con una corriente de aire que arrastraba olores provenientes de:

- a) Corriente de aire limpia de olores;
- b) 10 hembras;
- c) 1ml de aceite mineral;
- d) (2S)-pentanol: 10 μg ; 100 μg ; 1mg;
- e) 2-metil-1-butanol: 100 μg ; 1000 μg ;
- f) 2-metil-3-buten-2-ol: 0,1 μg ; 10 μg ; 1000 μg ;
- g) 2-butanol: 100 μg ; 1000 μg .

Se realizaron cuatro réplicas para cada serie experimental.

Para evitar la dependencia de datos, cada ejemplar fue utilizado una sola vez en los ensayos experimentales.

En cada ensayo se cuantificó el número total de insectos que iniciaron el vuelo desde la plataforma de vuelo *i.e.*, activación. Esta variable era registrada para evaluar la activación del insecto en respuesta a los olores puestos a prueba. Los resultados de cada serie experimental se calcularon como la proporción total de insectos que iniciaron el vuelo como indicativo de *activación*.

Análisis estadístico

Las diferencias en las frecuencias de vuelo fueron analizadas empleando estadística lineal. La normalidad y homocedacia de los datos fueron verificadas (P-Plot y test de *Levene*, respectivamente). Subsecuentemente, se aplicó un ANOVA de 1 factor ($p < 0,05$). En los casos en que se obtuvieron efectos significativos con el ANOVA, se realizaron comparaciones *post hoc* empleando el test de *Tukey*.

RESULTADOS

Identificación de compuestos volátiles individuales presentes en las glándulas metasternales de las hembras de R. prolixus que promueven el vuelo de machos

El análisis del efecto de cada uno de los compuestos sintéticos sobre el inicio de vuelo de machos mostró al (2S)-pentanol como un fuerte evocador de la respuesta de vuelo. En la Figura 3.15 puede observarse que una dosis de 10 μg fue capaz de estimular a los machos a iniciar su vuelo en mayor proporción (71%) que la corriente de aire limpio o el aceite mineral (33,8%), mostrando una frecuencia de inicio de vuelo que no difiere significativamente de la obtenida al estimular con hembras (84%) (Tukey, N.S.). La misma tendencia fue observada con una dosis mayor (1 mg).

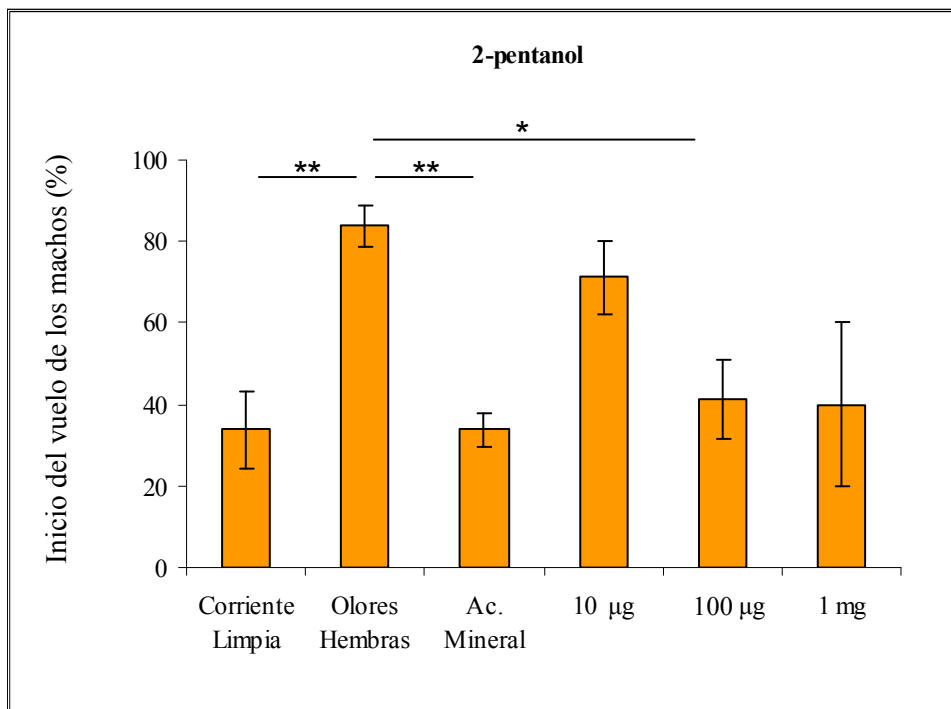


Figura 3.15. Frecuencia media \pm E.S. de inicio del vuelo de machos de *R. prolixus* estimulados con una corriente de aire cargada de olores de distintas dosis de (2S)-pentanol. **Corriente Limpia:** corriente de aire sin olores; **Olores Hembras:** olores de 10 hembras; **Ac. Mineral:** aceite mineral, solvente utilizado para la preparación de las diluciones de los compuestos sintéticos. Asteriscos: indican diferencias significativas: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$.

Por otro lado, la exposición de los machos a distintas concentraciones de 2-metil-1-butanol mostró que solo la dosis de 1000 μg promueve su frecuencia de inicio vuelo (46,3%) no hallándose diferencias significativas con los valores de frecuencia de machos expuestos a olores de hembras (84%) (Tukey, N.S.) (Fig. 3.16).

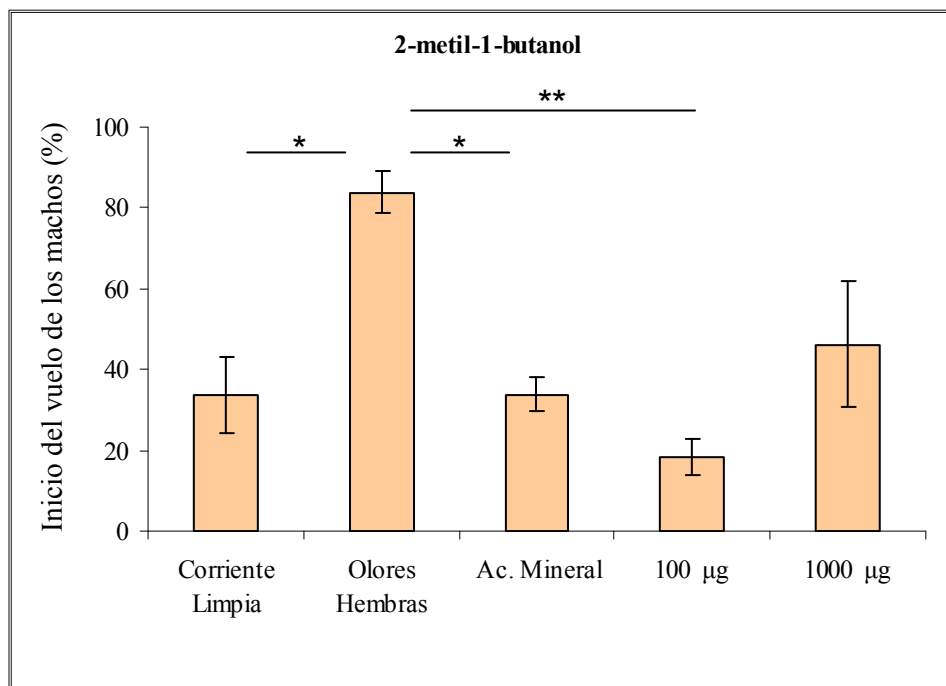


Figura 3.16. Frecuencia media \pm E.S. de inicio del vuelo de machos de *R. prolixus* estimulados con una corriente de aire cargada de olores de distintas dosis de **2-metil-1-butanol**. **Corriente Limpia**: corriente de aire sin olores; **Olores Hembras**: olores de 10 hembras; **Ac. Mineral**: aceite mineral, solvente utilizado para la preparación de las diluciones de los compuestos sintéticos. Asteriscos: indican diferencias significativas: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$.

Del mismo modo, se expusieron grupos de machos frente a olores de otros dos compuestos sintéticos, también presentes en las glándulas metasternales de las hembras.

El inicio del vuelo de machos frente al 2-metil-3-buten-2-ol no parece promover la activación del vuelo, ya que no se encontraron diferencias significativas con los controles de corriente de aire limpio o aceite mineral (ANOVA, N.S.) (Fig. 3.17 A). En la Figura 3.17 B

puede observarse que el 2-butanol no modifica el vuelo de los machos, presentando éstos proporciones de inicio de vuelo similares cuando se les presenta aceite mineral (sin olores) o simplemente aire limpio.

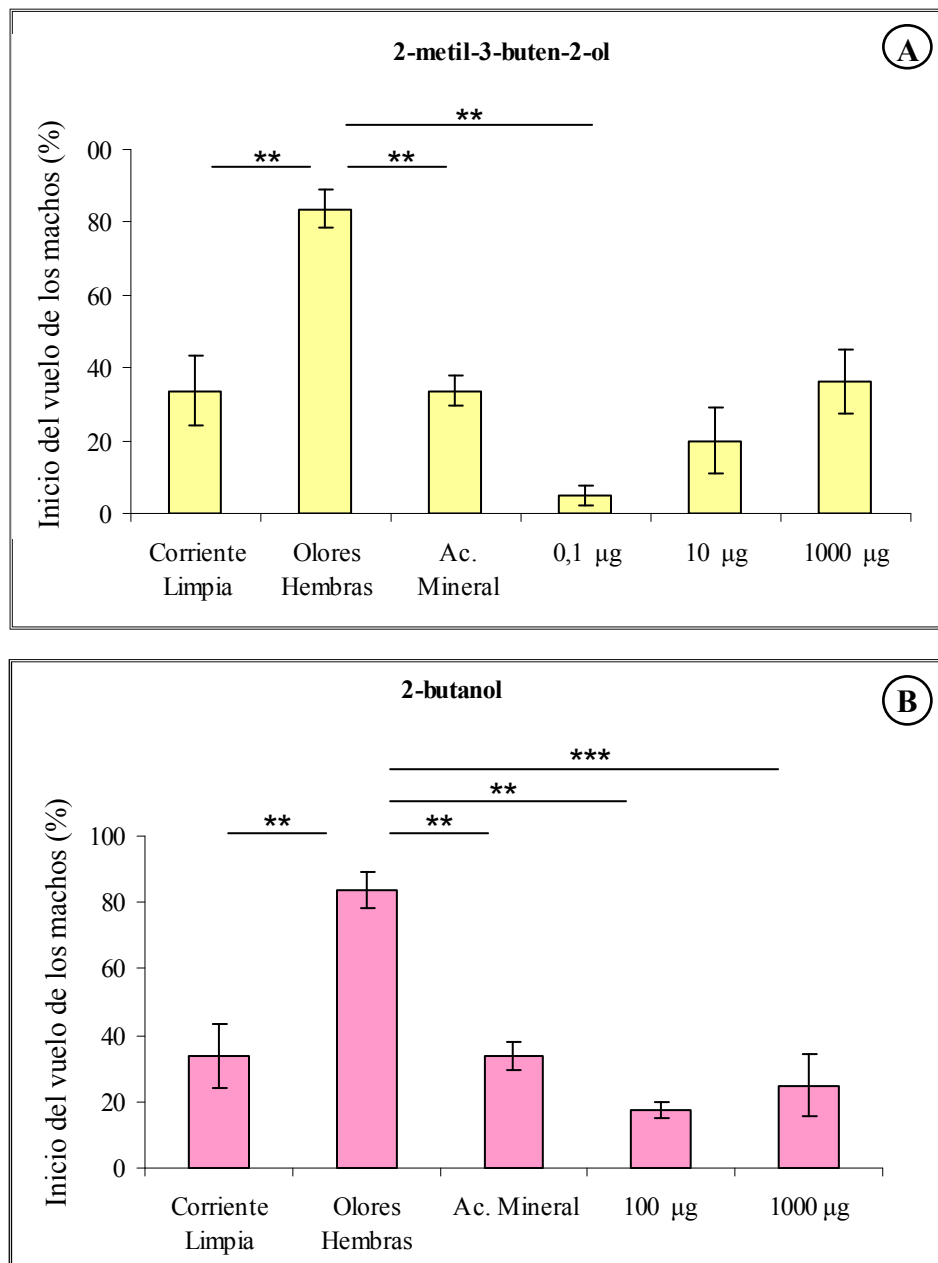


Figura 3.17. Frecuencia media \pm E.S. de inicio del vuelo de machos de *R. prolixus* estimulados con una corriente de aire cargada de olores de distintas dosis de **2-metil-1-butanol (A)** y **2-butanol (B)**. **Corriente Limpia**: corriente de aire sin olores; **Olores Hembras**: olores de 10 hembras; **Ac. Mineral**: aceite mineral, solvente utilizado para la preparación de las diluciones de los compuestos sintéticos. Asteriscos: indican diferencias significativas: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$; (***) : $p < 0,001$.

DISCUSIÓN

A partir de los resultados presentados, en este capítulo fue posible verificar que las antenas de los machos de *T. infestans* y *R. prolixus* responden a una serie de compuestos volátiles producidos por las glándulas metasternales de las hembras mediante la utilización de la técnica de CG-EAD. Específicamente, se observaron respuestas consistentes a la 3-pentanona en todas las preparaciones antenales de *T. infestans* mientras que otros compuestos presentes en la mezcla emitida por esta glándula, no lo hicieron. Además, las antenas de los machos respondieron a los volátiles del compuesto sintético de 3-pentanona corroborando la presencia de quimiorreceptores sensibles a este compuesto. Es prematuro afirmar, sin embargo, que otros compuestos presentes en las secreciones de las glándulas metasternales sean capaces de estimular químicamente a receptores antenales de los machos, ya sea en este u otros contextos. En esta especie, uno de los compuestos más abundantes de la secreción de las glándulas metasternales es la 3-pentanona (Manrique *et al.*, 2006). Además, las antenas de los machos respondieron electrofisiológicamente frente a volátiles de este compuesto lo que sugiere que la 3-pentanona podría estar relacionada con algún papel biológico en esta especie.

En *R. prolixus* los resultados fueron más variados encontrándose que las antenas de machos responden electrofisiológicamente al menos al 2-metil-3-buten-2-ol, 2-metil-1-butanol y 2-pentanona, presentes en los volátiles liberados por las glándulas de hembras. De manera complementaria, los ensayos comportamentales de vuelo pusieron en evidencia que el (2S)-pentanol por sí solo promueve el inicio del vuelo en los machos proporcionando en su conjunto nuevos aportes sobre la fisiología sensorial de los triatominos. Las respuestas electrofisiológicas junto con la activación significativa del inicio del vuelo de los machos estimulados con componentes de las glándulas metasternales, complementan reportes previos sobre el comportamiento sexual de triatominos (Manrique *et al.*, 2006; Crespo y Manrique, 2007; Pontes *et al.*, 2008, Vitta *et al.* 2009). Estos resultados nos conducen a proponer a las

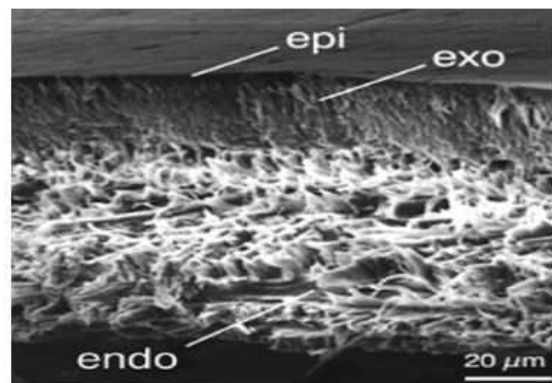
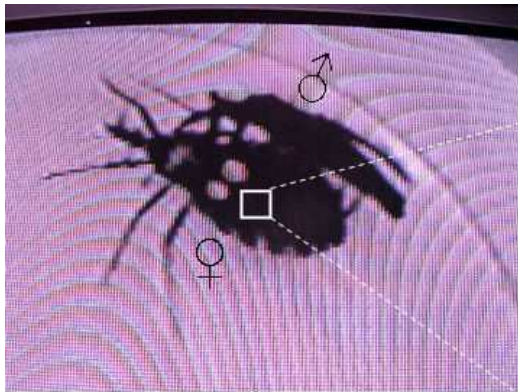
glándulas metasternales de las hembras como mediadoras del reconocimiento, orientación y atracción sexual en estos insectos.

La identificación previa de los compuestos presentes en las glándulas metasternales de las hembras de *T. infestans* y *R. prolixus* (Fig. 3.6 y 3.7; Manrique *et al.*, 2006; Pontes *et al.*, 2008) permitió acotar la búsqueda de los compuestos biológicamente relevantes en relación con las respuestas fisiológicas y comportamentales de estos insectos. De esta manera, se estudiaron por primera vez las respuestas eléctricas antenales de machos de triatominos frente a la presencia de compuestos volátiles provenientes de hembras conspecíficas en el contexto sexual.

Consideramos que los resultados aquí presentados son un aporte a la comprensión de los procesos asociados a la comunicación química de los triatominos en el contexto sexual. La evidencia presentada en el presente capítulo pone de manifiesto que los productos de las glándulas metasternales poseen la capacidad de promover respuestas sensoriales neuronales de las antenas de los machos y comportamentales sobre el inicio del vuelo. Por esta razón, profundizar los conocimientos sobre la fisiología sensorial de los triatominos puede resultar de particular interés e importancia en el desarrollo de herramientas de detección, atracción y/o captura de alta sensibilidad para estos insectos.

CAPÍTULO 4

Papel de los lípidos cuticulares en el comportamiento sexual de *Triatoma infestans*



Y entre los animales, que cambian de piel, de nombre, y que entre rugidos y vahos van adentrándose en los espacios de realidad-irrealidad, el enamorado se asoma como una sombra presa de la porfía...

Cristián Basso Benelli, *El amor insecto*

INTRODUCCIÓN

La cutícula de los insectos

El tegumento es la capa más externa de los insectos que comprende la epidermis y la cutícula, cubriendo todo el cuerpo inclusive los extremos anterior y posterior del tubo digestivo y las tráqueas. La cutícula, característica distintiva de todos los artrópodos, provee soporte y protección por su rigidez y dureza que le son propias y es imprescindible en el control de la pérdida de agua a lo largo de la superficie del cuerpo. Por otro lado, las propiedades mecánicas de la cutícula establecen un límite superior en el aumento del volumen corporal. Esta cota es parcialmente superada por los insectos en crecimiento al sufrir el proceso de muda, mediante el cual reemplazan su cutícula vieja por una nueva y de mayor tamaño. La cutícula es secretada por las células de la epidermis y los oenocitos que están relacionados con la producción de lípidos cuticulares, que son parte de la composición de la misma.

La cutícula de los insectos posee dos capas principales con composición y características fisicoquímicas diferentes: una más externa y delgada denominada *epicutícula*, y varias capas internas que llevan en conjunto el nombre de *procutícula*. La procutícula está formada originalmente por una sola capa que luego del proceso de esclerotización o curtido se puede diferenciar en la *endocutícula*, en íntimo contacto con la epidermis, y la *exocutícula* ubicada por encima (Chapman, 1982) (Fig. 4.1).

La *epicutícula* es la capa más externa de la cutícula, está en contacto con el exterior, es inextensible y establece un límite al volumen corporal de los insectos. Está compuesta por una mezcla de lípidos que puede contener hidrocarburos simples y ramificados, saturados e insaturados, ácidos grasos libres, alcoholes libres, ésteres alquilos, glicerol, esterol y aldehídos (Lockey, 1988). La función principal de estos compuestos es minimizar la pérdida de agua por evaporación a través del tegumento (Gibbs, 1998). Además, protegen a los

insectos del ataque de microorganismos, insectos parásitos y predadores (de Renobales *et al.*, 1991).

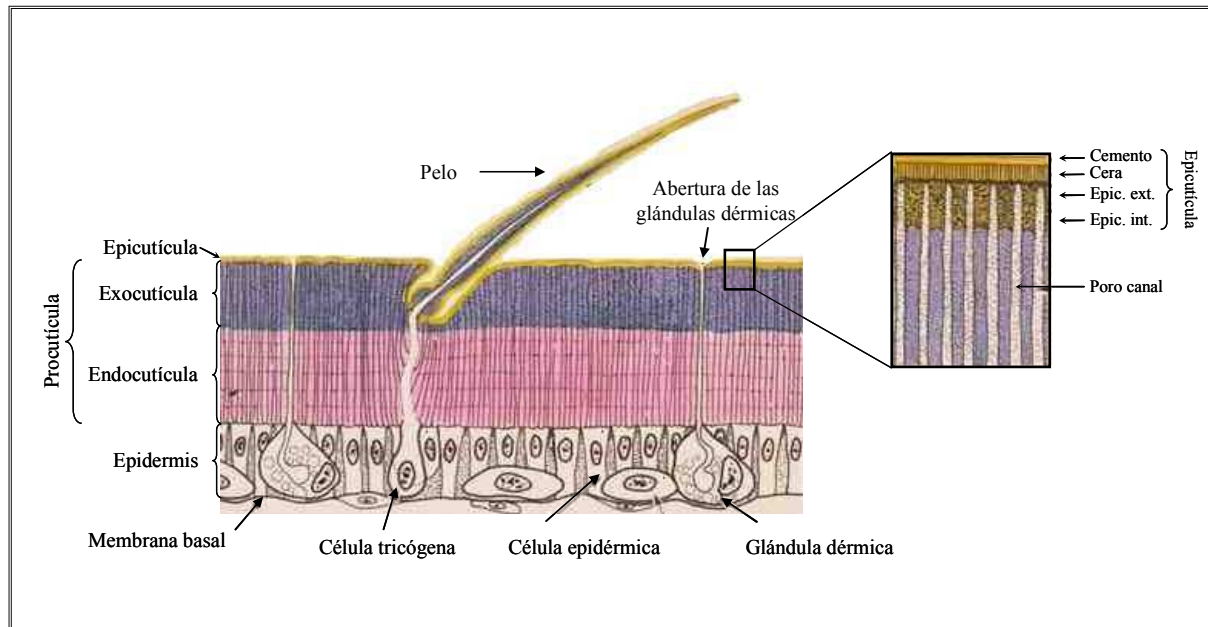


Figura 4.1. Sección de cutícula típica y esclerotizada de insectos. Izquierda: se observa la organización general de los componentes de la cutícula y su epidermis subyacente. Derecha: detalle de las capas que componen a la epicutícula (esquema modificado de Wigglesworth, 1972).

Asimismo, la epicutícula está subdividida en diferentes capas: *capa de cemento* (es la más externa y está formada por proteínas y lípidos); una *capa de cera* -ubicada por debajo de la capa de cemento, que le otorga impermeabilidad a la cutícula-; la *epicutícula externa* (compuesta por lípidos y proteínas que brindan puntos de inserción a los músculos); y la *epicutícula interna* (capa adyacente a la procutícula, constituida por cadenas lipoproteicas estabilizadas por uniones covalentes e involucrada en la reparación de daños cuticulares) (Chapman, 1982) (Fig. 4.1).

La *procutícula* está compuesta básicamente por proteínas y quitina. La quitina es un polisacárido constituido por N-acetilglucosamina que se dispone en cadenas estabilizadas por puentes de hidrógeno formando microfibrillas. La cutícula recientemente secretada es blanda y flexible pero rápidamente la procutícula se endurece mediante el proceso de esclerotización. Este proceso implica una estabilización de las cadenas de proteínas mediante uniones químicas covalentes entre quinonas, derivadas de la molécula N-acetildopamina. De este modo, la región más externa de la procutícula, subyacente a la epicutícula y usualmente esclerotizada, toma el nombre de *exocutícula*, diferenciándose de la porción más interna que constituye entonces, la *endocutícula*. La exocutícula se encuentra curtida o esclerotizada mientras que la endocutícula está estabilizada únicamente por uniones intermoleculares no covalentes (puentes de hidrógeno, uniones de Van der Waals y electrostáticas).

Comunicación química de contacto en insectos

Los lípidos cuticulares tienen un importante papel en la comunicación química ya que participan en el comportamiento de agregación y la atracción sexual como *feromonas de contacto*. Los hidrocarburos cuticulares han sido involucrados como *semioquímicos* en el reconocimiento sexual y la reproducción (Howard y Blomquist, 1982; 2005; Singer, 1998). El reconocimiento de especie y castas, el marcado de territorio, el reclutamiento, las feromonas de alarma, kairomonas, también son parte de muchas de las funciones que cumplen los hidrocarburos cuticulares (Howard y Blomquist 1982; 2005).

El procesamiento de las señales de contacto, como los hidrocarburos cuticulares, son procesados por quimiorreceptores de contacto que poseen los insectos en todo su cuerpo, aunque en mayor proporción en los tarsos, piezas bucales (Chapman, 1982) y en sus antenas. Los quimiorreceptores de contacto se caracterizan por la presencia de un único poro en o cerca del extremo de la sensilia por lo que son llamadas uniporosas. Estas sensilias pueden ser

estimuladas por moléculas disueltas en el aire (a corta distancia), aunque son generalmente estimulados por sustancias químicas en solución acuosa o por sustancias químicas distribuidas sobre superficies sólidas (Chapman, 1982).

La mezcla compleja de hidrocarburos cuticulares de muchas especies de insectos provee información significativa para su utilización en la comunicación química. La quimiorrecepción de contacto ha sido repetidamente observada en insectos en el comportamiento de control de la alimentación, control de la oviposición, comportamiento gregario, búsqueda de alimento, comportamiento de agregación y comportamiento sexual, entre otros. En la mariposa *Danaus plexippus* la búsqueda de una superficie apta para oviponer sobre las hojas de la planta hospedadora está mediado por quimiorreceptores de contacto que se encuentran en los tarsos y en la antena (Bauer *et al.*, 1998). Otro ejemplo, es el comportamiento gregario de las larvas de la langosta *Locusta migratoria*, que es estimulado por el contacto de los insectos con ciertos hidrocarburos presentes en su cutícula (Heifetz y Applebaum, 1996). Estudios realizados en adultos de la mosca *Phormia regina* revelaron que estos insectos son capaces de responder a hidrocarburos cuticulares de baja volatilidad detectados por las sensilias de contacto localizadas en sus patas (Stoffolano *et al.*, 1997). En esta especie, los hidrocarburos cuticulares han sido relacionados con el comportamiento sexual como responsables de la estimulación de la cópula en los machos ya que la remoción de estos compuestos de la cutícula de las hembras reduce marcadamente el número de intentos de cópula y el tiempo que permanece el macho montado sobre la hembra (Stoffolano *et al.*, 1997). En Heteroptera, el comportamiento de agregación de la chinche de fuego *Pyrrhocoris apterus* está mediado parcialmente por estímulos químicos de contacto (Schmuck, 1987). En el citado trabajo, se demostró la necesidad del contacto de estas chinches con una sustancia química específica para que se produjera el arrestamiento y la posterior agregación. Coincidentemente, en el último segmento antenal que muestra un gran

número de sensilias estilocónicas, ocurriría la recepción de la sustancia arrestante que es producida por dos glándulas ubicadas en la parte anterior del abdomen de las larvas (Zdarek, 1970 en Schmuck, 1987).

La cutícula de triatominos

Los trabajos sobre la composición de los lípidos cuticulares en triatominos han estado siempre enfocados sobre la caracterización de especies y filogenias a través de la identificación de los hidrocarburos cuticulares de varias especies (Juárez y Blomquist, 1993; Juárez *et al.*, 2001, 2002; Juárez y Fernández, 2006). Juárez y Blomquist (1993) describieron los hidrocarburos cuticulares de *T. infestans* como una mezcla de compuestos no ramificados o con ramificaciones de metilos y de cadenas de 18 a 34 carbonos de extensión. Estos autores realizaron comparaciones entre los perfiles de hidrocarburos de larvas y adultos en las especies *R. prolixus* y *T. infestans*, hallando diferencias marcadas en la mayoría de los componentes cuticulares de larvas y adultos encontrando altas cantidades de hidrocarburos en la epicutícula larval. También, se encontraron diferencias en la composición cuticular entre macho y hembra en *T. infestans*, pero no así en *R. prolixus* (Juárez *et al.*, 1985; Juárez *et al.*, 2001). Por otro lado, extractos cuticulares de *T. infestans* extraídos con hexano, particularmente fracciones de ácidos grasos libres, actúan como una señal involucrada en el comportamiento de agregación de conoespecíficos (Lorenzo Figueiras y Lazzari, 1998; Lorenzo Figueiras *et al.*, 2009). La ausencia de dimorfismo sexual en la composición de hidrocarburos cuticulares de *R. prolixus* podría sugerir que el comportamiento de apareamiento no estaría mediado por hidrocarburos cuticulares.

Comportamiento de apareamiento en triatomínos

La exhibición de una secuencia comportamental estereotipada en los momentos previos al apareamiento ha sido observada y descrita en una vasta cantidad de especies de insectos. Este comportamiento es, en general, característico de cada especie y contribuye a la selección sexual de cada una. En varias especies de triatomínos se ha descrito el comportamiento de apareamiento detallado en etogramas que describen las diferentes etapas comportamentales previas, durante y posteriores al apareamiento (Lima *et al.*, 1986c en *Panstrongylus megistus*; Rojas *et al.*, 1990 en *Triatoma mazzottii*; Rojas y Cruz López, 1992b en *Triatoma phyllosoma*). Particularmente, Manrique y Lazzari (1994) realizaron un análisis detallado del apareamiento y de diversos factores que afectan el comportamiento sexual de *T. infestans*. Estos autores sugirieron que el apareamiento en *T. infestans* comienza por iniciativa del macho ya que es éste el que manifiesta las primeras señales de percibir sensorialmente a la hembra. Se planteó que el patrón de apareamiento puede dividirse en siete etapas comportamentales realizadas por el macho: 1) *posición vigilante*: ante la presencia de una hembra el macho permanece quieto y mueve sus antenas en dirección hacia la hembra. Si la hembra se mueve, el macho sigue la dirección de su movimiento con las antenas; 2) *salto o montada*: el macho se aproxima a la hembra y salta repentinamente sobre ella o se sube sobre su dorso lentamente; 3) *rotación*: una vez ubicado sobre el dorso de la hembra, el macho realiza un giro de 360° (aunque es un comportamiento poco frecuente); 4) *posición dorsolateral*: el macho se aferra a la hembra en posición dorsolateral (indistintamente derecha o izquierda). En esta posición la hembra permanece inmóvil, sostenida dorsal y ventralmente mediante los tres pares de patas del macho. Algunas veces, el macho extiende su rostro colocándolo sobre la cabeza de la hembra con un ángulo aproximado de 90°. En esta posición dorsolateral, la porción posterior del abdomen del macho se coloca por debajo de la porción posterior del abdomen de la hembra y expone luego su apéndice genital o *aedeagus*; 5)

cópula: el macho trae hacia sí el extremo del abdomen de la hembra con el tercer par de patas. Los parámetros del macho asisten en la inmovilización de la *genitalia* de la hembra lo que permite la introducción del órgano copulador; 6) *sujeción*: luego de la separación de la *genitalia*, el macho vuelve a colocarse sobre el dorso de la hembra y permanece por algunos minutos sobre ella sujetándola con sus patas.; 7) *separación*: el macho desciende de la hembra y se separa. La duración media de la cópula de *T. infestans* es de 10 minutos, aproximadamente (Schofield, 1979).

Diversos autores estudiaron el papel de la edad y el estado nutricional de los machos adultos como condicionantes de la ocurrencia de la primera cópula (Regis *et al.*, 1985; Malo *et al.*, 1993) y propusieron que este hecho puede tener relación con el desarrollo de una glándula accesoria del macho. Por otro lado, Manrique y Lazzari (1994) observaron que los intentos de cópula que realiza el macho no siempre son exitosos y advirtieron que la hembra es capaz de desplegar, por lo menos, cuatro comportamientos de rechazo ante los intentos de cópula del macho, como ser: achatamiento del cuerpo sobre el sustrato, evasión, movimientos abdominales y estridulación. La frecuencia con que se manifiestan los rechazos de la hembra frente a la intención de cópula del macho es máxima luego de la primera alimentación como adulto y disminuye luego de las 2 semanas postalimentación (Manrique y Lazzari, 1994). Quedó demostrado así el papel activo de la receptividad de las hembras como condicionante de la ocurrencia de la cópula en *T. infestans*.

El objetivo particular de este capítulo de la Tesis fue estudiar el papel que cumplen los lípidos presentes en la cutícula de *T. infestans* en el comportamiento de cópula. Se realizaron ensayos, bajo condiciones controladas de laboratorio, para analizar el comportamiento sexual de los machos frente a hembras con diferentes tratamientos a las que se les manipuló artificialmente determinadas claves químicas de la cutícula.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron machos y hembras vírgenes de la especie *T. infestans* en todos los ensayos. Para obtener insectos vírgenes se realizó un seguimiento desde larvas de 5° estadio luego de lo cual se los separó por sexo y se mantuvo a machos y hembras en recipientes cilíndricos plásticos (10 cm altura, 8,5cm de diámetro) hasta su ecdisis imaginal. Los insectos fueron criados desde huevos en nuestro insectario que es provisto regularmente por el Servicio Nacional de Chagas (Santa María de Punilla, Córdoba, Argentina). Los insectos eran mantenidos a una temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, 30-60% humedad relativa, con un régimen de iluminación de 12:12 h luz:oscuridad y eran alimentados semanalmente sobre gallinas vivas. En el momento de realizar los ensayos, los insectos tenían 1-2 meses de edad como adultos y un ayuno de 7 días.

Diseño experimental

La arena experimental consistió en una caja de vidrio circular (3 cm de altura y 13 cm de diámetro) cubierta por una tapa de vidrio transparente, con el objetivo de evitar escapes de los insectos experimentales (Fig. 4.2). En la base de la arena se colocaba un papel de filtro que ofrecía al insecto un sustrato propicio para su movilización. Se utilizaba un sustrato nuevo en cada ensayo con el objetivo de evitar la contaminación entre ensayos por efecto de olores provenientes de la deposición de heces, secreciones de glándulas exocrinas, entre otros. Además, entre ensayos sucesivos, la arena se limpiaba con etanol que se dejaba evaporar por completo a temperatura ambiente antes de utilizarla nuevamente.

El bioensayo utilizado se basó en descripciones experimentales previas utilizadas en otras especies (Tregenza y Wedell, 1997, en el grillo *Gryllus bimaculatus*; Ginzel *et al.*, 2003, en el cerambícido *Xylotrechus colonus*; Lorenzo Figueiras y Manrique, 2009, en *R. prolixus*).

Los ensayos consistían en colocar un macho virgen a 10 cm de una hembra virgen dentro de la arena experimental (Figura 4.2). La hembra era sometida a distintos tratamientos que afectaban la composición lipídica cuticular superficial, mientras que el macho permaneció siempre intacto. Previamente al comienzo de cada ensayo se llevaba adelante una etapa de *aclimatación* de 1 min durante la cual el macho y la hembra permanecían dentro de frascos separados en completa oscuridad (Fig. 4.2-A). Los insectos se colocaban al azar a ambos extremos de la arena experimental. Finalizada la aclimatación se liberaba a ambos insectos y luego de cubrir la arena con la tapa de vidrio se filmaba y grababa cada ensayo durante 30 min para su posterior análisis.

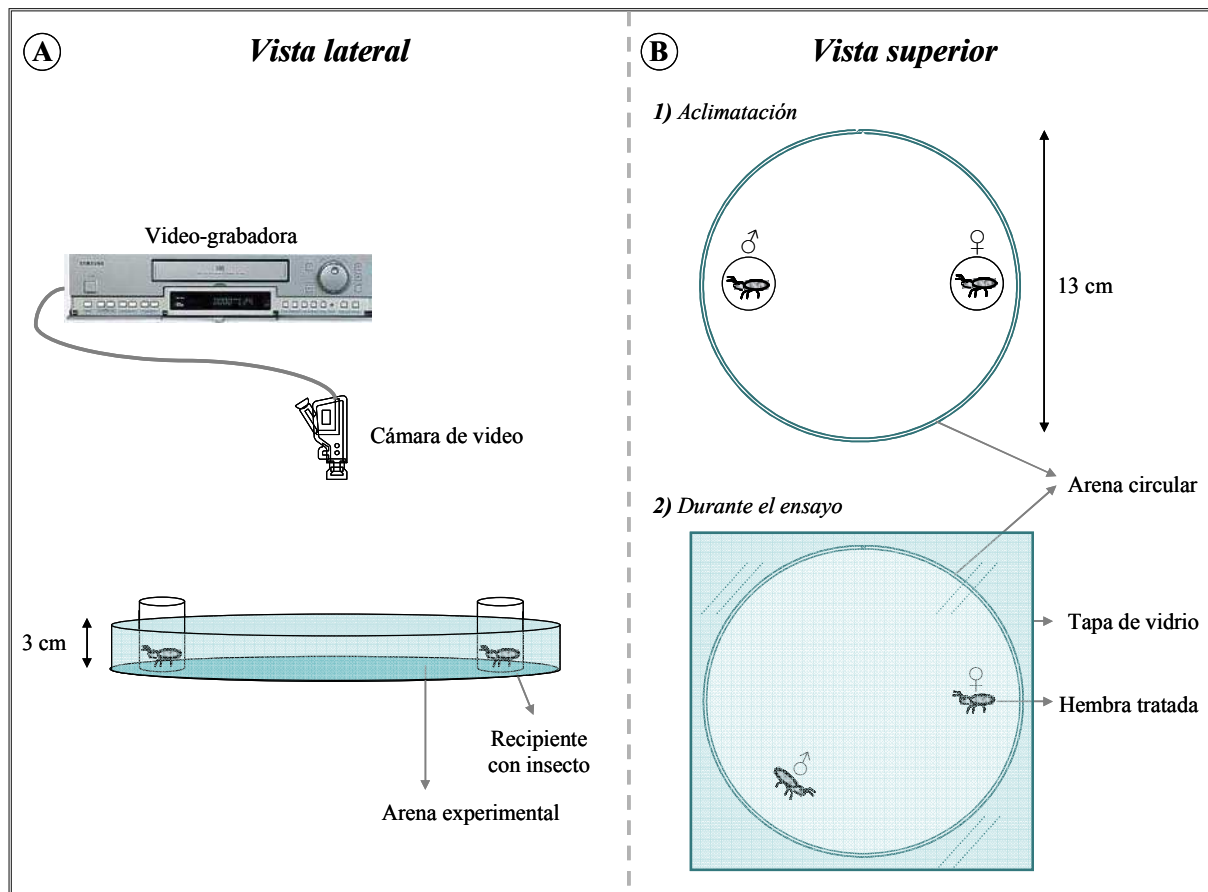


Figura 4.2. Arena experimental en vista lateral (A) y en vista superior (B). A) en la parte inferior, la arena experimental durante la etapa de *aclimatación* y, por encima, la cámara de video suspendida a 40 cm para filmar y grabar el comportamiento desplegado por los insectos. B: 1) *Aclimatación*: vista superior de la arena durante la aclimatación; 2) *Durante el ensayo*: vista superior de la arena durante el transcurso del ensayo. La arena permanece cubierta por un vidrio durante todo el ensayo.

Todos los insectos eran entrenados a ciclos de 12:12 h luz:oscuridad durante los cinco días previos a los ensayos con el fin de sincronizar el fotoperíodo. Los ensayos se realizaron durante la 2ª y 3ª hora de la noche de los insectos que es la ventana temporal durante la cual *T. infestans* despliega el pico de mayor actividad (Espínola, 1973; Núñez, 1987; Lazzari, 1991; 1992; Lorenzo y Lazzari, 1993; Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994; Lorenzo y Lazzari, 1996). Los ensayos se realizaron en un cuarto mantenido a $28\pm 1^\circ\text{C}$, 40-60% RH y en oscuridad funcional para los insectos.

La manipulación de los insectos se realizó sin perturbarlos mecánicamente a los insectos para evitar la liberación del contenido de las glándulas exocrinas evitando el uso de pinzas o movimientos bruscos. El traslado de los insectos de un frasco a otro se realizó permitiendo que éstos treparan a pequeños trozos de papel de filtro y colocándolos delicadamente en un nuevo recipiente.

Series experimentales

Las series experimentales fueron definidas en función de los distintos tratamientos que se realizaron sobre las hembras:

1) *Hembra viva* (control): se utilizó una hembra adulta, virgen.

2) *Hembra muerta*: se utilizó una hembra muerta por congelamiento. El insecto era sometido a una temperatura de -18°C durante 15 min y luego permanecía a temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$) por 15 min. De esta manera se evitaba la perturbación del insecto y la consecuente liberación de compuestos de las glándulas exocrinas de Brindley y metasternales.

3) *Hembra lavada*: se utilizó una hembra a la que se le extrajeron los lípidos cuticulares con hexano analítico (Merck, Alemania). El procedimiento comenzaba con la exposición de la hembra a -18°C durante 15 min luego de los cual permanecía a temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$) por otros 15 min. Posteriormente, se la colocaba en un vial de 5 ml de

capacidad con 300 µl de hexano tibio cuya acción es disolver las grasas y ceras dado que se trata de un solvente orgánico, no polar.

Se agitaba el frasco durante 15 min para que toda la cutícula del insecto estuviera en contacto con el hexano. Luego se retiraba a la hembra del frasco y se dejaba evaporar el hexano de la superficie cuticular a temperatura ambiente durante 15 min. De esta manera se obtuvo un individuo donde sus lípidos cuticulares superficiales habían sido extraídos casi por completo. El frasco con los lípidos cuticulares extraídos de la hembra con el hexano se utilizó para los ensayos de la serie descrita a continuación.

4) *Hembra pintada*: se utilizó una hembra *lavada* (como se describe en el punto anterior) y posteriormente se le aplicó uniformemente sobre la cutícula el extracto de lípidos cuticulares equivalentes a una sola hembra obtenida en el punto 3), por microgoteo. Luego, se dejó evaporar completamente el solvente durante 15 min a temperatura ambiente.

En cada ensayo se analizó el comportamiento sexual de los machos en presencia de una hembra tratada. El comportamiento de los insectos se registró por medio de una cámara sensible a la luz infrarroja (Videoman, JCC-300, Korea) conectada a una grabadora de video con secuencia de video acelerada (Samsung, SLV-960JP, Korea). La arena era iluminada con luz infrarroja lo que permitía registrar los ensayos en completa oscuridad.

Para cada tratamiento, se cuantificó la *frecuencia de intentos de cópula* que se definió como la proporción de ensayos en los que los machos intentaron copular. Un *intento de cópula* fue definido como el comportamiento desplegado por el macho que al estar tomado de la hembra expone el órgano copulador.

Se analizaron también las siguientes variables con el objetivo de explorar de qué manera se modifica el comportamiento sexual del macho frente a una hembra en los momentos previos a la cópula:

a) Tiempo hasta el primer contacto: tiempo transcurrido desde el comienzo del ensayo hasta que el macho contactaba a la hembra con sus antenas o primer par de patas por primera vez (media \pm D.E.).

b) Cantidad de contactos: cantidad de veces que el macho tocó a la hembra con sus antenas o patas delanteras a lo largo de los 30 minutos que duraba el ensayo.

c) Tiempo hasta el primer intento de cópula: tiempo transcurrido desde el comienzo del ensayo hasta que el macho inició el intento de cópula (media \pm D.E.).

Para evitar la dependencia de datos, cada ejemplar fue utilizado una sola vez en los ensayos experimentales (media \pm D.E.).

Análisis de datos

Las comparaciones estadísticas entre las respuestas de los machos (intentos de cópula) en presencia de una hembra *viva*, *muerta*, *lavada* o *pintada* se analizaron con la prueba de independencia $R \times C$ mediante la aplicación de la prueba de G con la corrección de William (Sokal y Rohlf, 1995). Además, se realizaron comparaciones individuales *post hoc* y se ajustó la tasa de error por experimento con el método Dunn-Šidák (Sokal y Rohlf, 1995).

Las variables **a) tiempo hasta el primer contacto**, **b) cantidad de contactos** y **c) tiempo hasta el primer intento de cópula**, se analizaron estadísticamente con una ANOVA de 1 factor ($p < 0,05$). En los casos en que se obtuvieron efectos significativos con el ANOVA, se realizaron comparaciones *post hoc* con la prueba de Tukey (Zar, 1984).

RESULTADOS

El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los tratamientos (*i.e.*, macho con una hembra *viva*, *muerta*, *lavada* o *pintada*) (prueba de *G*, $p < 0,001$), que indica que los distintos tratamientos sobre la cutícula de las hembras afectaron la frecuencia de ensayos con intentos de cópula. Las comparaciones *post hoc* revelaron que los machos con hembras *vivas* presentaron la mayor frecuencia de intentos de cópula (94%) (prueba de *G*, $p < 0,001$), los machos frente a hembras *lavadas* (24%) presentaron la menor frecuencia de intentos (prueba de *G*, $p = 0,03$) y no se encontraron diferencias significativas entre machos con hembras *muertas* (60%) o *pintadas* (35%) (prueba de *G*, N.S.) (Fig. 4.3) (Tabla 4.1). Estos resultados sugieren que el macho podría distinguir entre hembras a las que se les removieron los lípidos cuticulares de aquellas que los poseen.

Cabe destacar que las hembras de la serie *muertas* habían sido sometidas sólo al frío extremo (-18°C) por lo que su composición cuticular no se veía afectada. Al remover los lípidos cuticulares de las hembras *lavadas*, los machos intentaron copular en baja proporción. Al restituir los lípidos cuticulares sobre la cutícula previamente lavada, los machos mostraron una recuperación en la frecuencia de intentos de cópula sin encontrar diferencias significativas entre hembras *muertas* o *pintadas*.

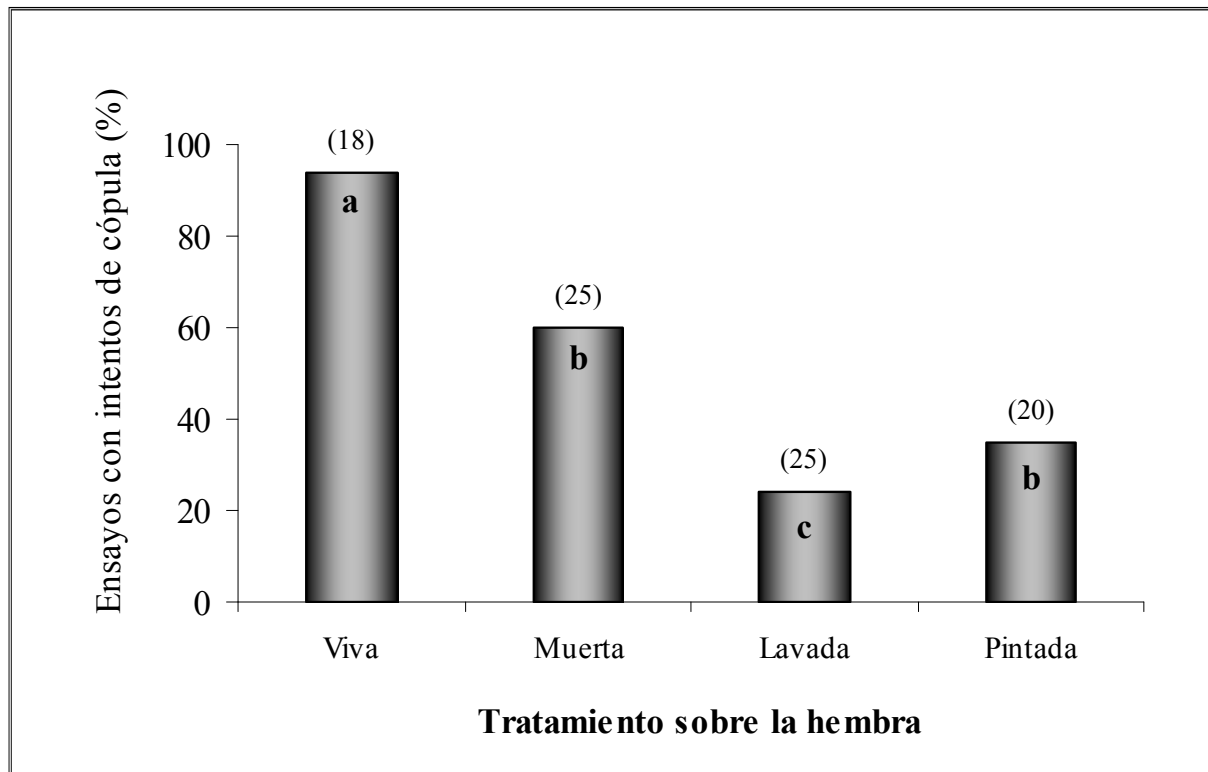


Figura 4.3. Porcentaje de ensayos con intentos de cópula de los machos expuestos a hembras con distintos tratamientos sobre su cutícula. Entre paréntesis: número de ensayos realizados. Letras (a, b, c): indican diferencias estadísticas.

Tratamientos	G	gl	p
V+M+L+P	26,37	3	<0,001
M+P	2,72	1	0,098
M+P+L	6,92	2	0,03
M+P+V	15,95	2	<0,001

Tabla 4.1. Análisis estadístico de la frecuencia de ensayos con intentos de cópula de los machos expuestos a hembras con distintos tratamientos. V: hembra viva; M: hembra muerta; L: hembra lavada; P: hembra pintada

Los análisis detallados del comportamiento desplegado por el macho durante los ensayos mostraron:

a) Tiempo hasta el primer contacto

En los ensayos con hembras *vivas*, el macho tocó por primera vez a la hembra poco después de haber comenzado el ensayo ($0,24 \pm 0,16$ min) (Fig. 4.4). Sin embargo, cuando la hembra estaba *muerta* ($3,03 \pm 1,83$ min) o *lavada* ($4,48 \pm 2,59$ min) (Tukey, N.S.) el macho demoró más tiempo en realizar el primer contacto con la hembra (Tukey, $p < 0,05$) (Fig. 4.4). Por otro lado, el tiempo que demoró un macho en contactar a una hembra *pintada* fue tan reducido como con una hembra *viva* ($0,71 \pm 0,64$ min) (Tukey, N.S.).

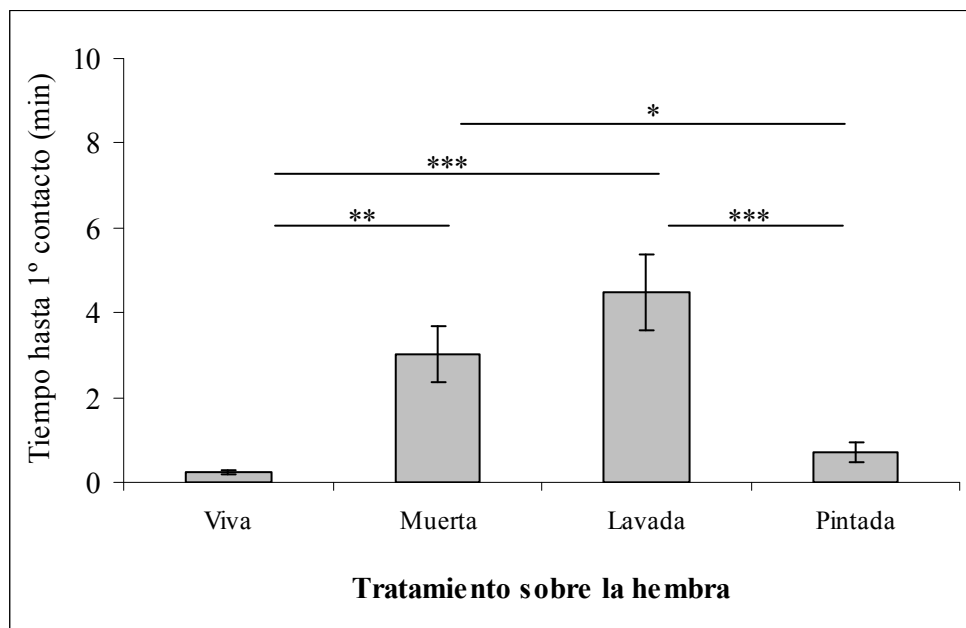


Figura 4.4. Tiempo medio transcurrido \pm error estándar (E.S.) desde el comienzo del ensayo hasta que el macho contactó a la hembra con sus antenas o patas por primera vez. Duración del ensayo: 30 min. N=8 en todas las series experimentales. Asteriscos: indican diferencias significativas, prueba de Tukey: (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$. (***): $p < 0,001$.

b) Cantidad de contactos

La cantidad de veces que el macho tocó con sus antenas o patas delanteras a las hembras no varió significativamente entre tratamientos (Figura 4.5; ANOVA, N.S.). Este resultado sugiere que el comportamiento del macho de contactar a la hembra no estaría condicionado por el tratamiento realizado sobre la cutícula de la hembra.

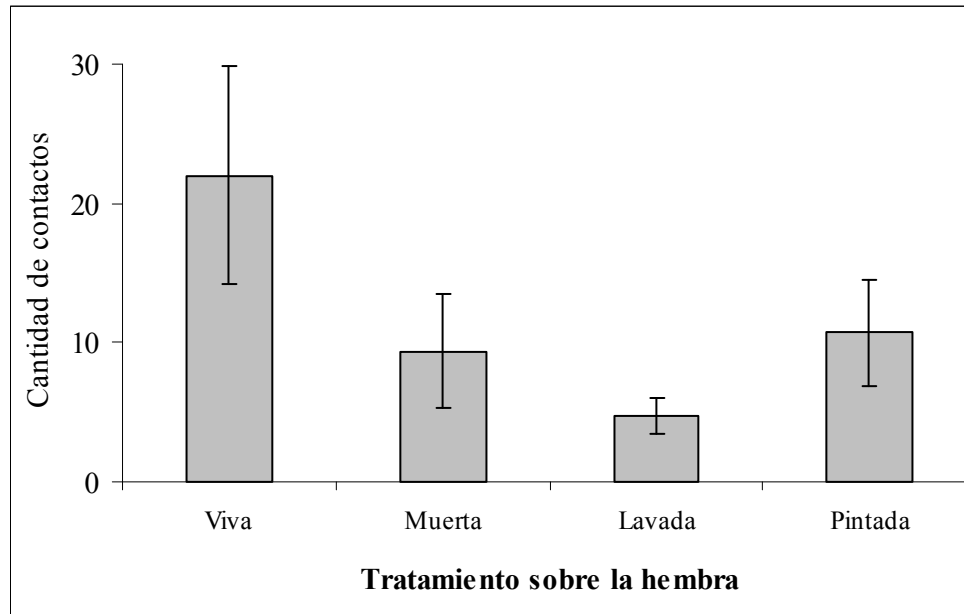


Figura 4.5. Cantidad media \pm E.S. de veces que el macho contacta a la hembra con sus antenas o patas delanteras a lo largo de los 30 min de duración del ensayo. N=8 en todas las series experimentales. ANOVA, N.S. en todos los casos.

c) Tiempo hasta el primer intento de cópula

El tiempo medio que transcurrió desde el comienzo del ensayo hasta que un macho intentó copular con la hembra *viva* fue de $2,36 \pm 1,29$ min y no se encontraron diferencias entre éste resultado y las series de machos frente a hembras *muertas* ($8,28 \pm 5,36$ min) o *pintadas* ($4,95 \pm 3,27$ min) (Tukey, N.S.). El tiempo hasta la cópula asciende a 25 min, aproximadamente, cuando la hembra estaba *lavada* (Tukey, $p < 0,01$). Estos resultados sugieren que los lípidos cuticulares afectarían la incidencia de cópula.

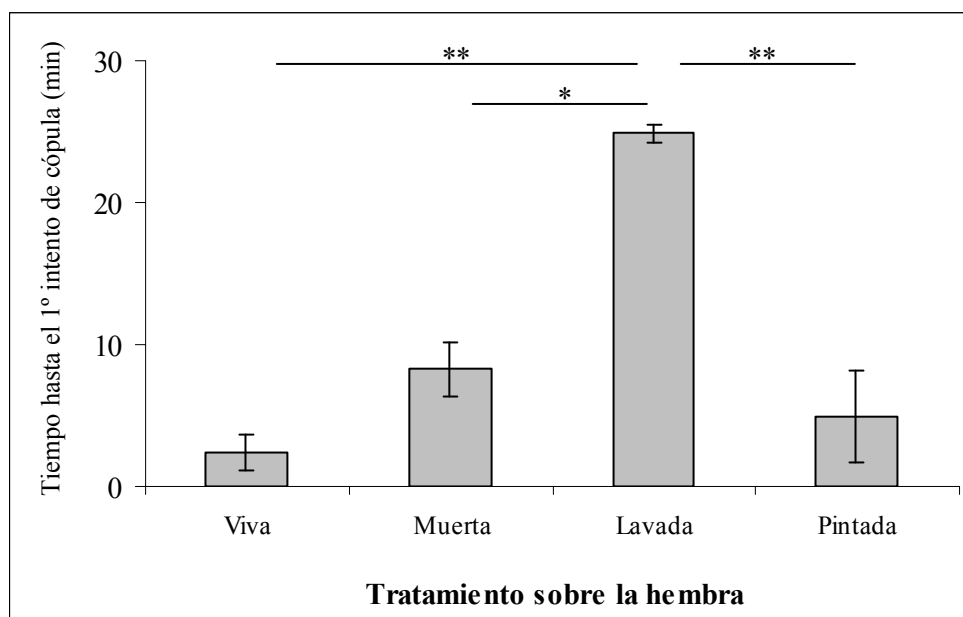


Figura 4.6. Tiempo medio transcurrido \pm E.S. desde el comienzo del ensayo hasta que el macho intenta copular con la hembra por primera vez. Duración del ensayo: 30 min. N=8 en todas las series experimentales. (*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$.

DISCUSIÓN

La evidencia comportamental presentada en este capítulo de Tesis muestra que los lípidos cuticulares de las hembras promoverían el comportamiento de cópula de los machos. La remoción de los lípidos de la epicutícula de la hembra implicó la reducción significativa de los intentos de cópula apoyando la hipótesis de la participación de algunos compuestos lipídicos de la cutícula en la estimulación a la cópula. Esta baja frecuencia de cópula de los machos expuestos a hembras *lavadas* era parcialmente reestablecida al pintarlas con el extracto cuticular perteneciente a una hembra. Los resultados refuerzan la idea de la participación de los lípidos cuticulares como claves en el comportamiento de apareamiento.

Los ensayos eran realizados en completa oscuridad, por lo que pueden excluirse los estímulos visuales como claves involucradas en el reconocimiento y la toma de decisión de los machos de intentar copular. Sin embargo, en los ensayos con hembras *vivas* otras claves podrían estar mediando el encuentro entre individuos: a larga distancia podrían ser claves químicas (compuestos feromonales volátiles emitidos por la hembra) o, también, claves mecánicas (*e.g.* a través de vibraciones del sustrato). La existencia de claves olfativas que median la atracción entre sexos ya ha sido demostrada en varias especies de triatomíneos (Crespo y Manrique, 2007; Pontes *et al.*, 2008; Vitta *et al.*, 2009) incluyendo los resultados presentados en el Capítulo II. Adicionalmente, en varias especies de insectos, las claves mecánicas han sido reportadas como mediadoras de encuentros sexuales (Markl, 1983) y aunque no exista evidencia de su utilización en triatomíneos en esta función, es una posibilidad que no puede ser descartada.

En los experimentos con machos y hembras *muertas* las claves visuales, mecánicas y químicas a larga distancia estaban excluidas. Esto significa, por ejemplo, que las claves químicas de volátiles liberados por las glándulas metasternales, cuya participación en la comunicación sexual ha sido comprobada, estarían anuladas. El hecho que un macho copule

con una hembra *muerta* nos lleva a suponer que el comportamiento de la hembra viva no sería condicionante para estimular el intento de cópula de un macho. Sin embargo, el macho intenta copular con una hembra *muerta* con una menor frecuencia que con una *viva*, aunque lo hace a tiempos similares (Fig. 4.6). Asimismo, luego de iniciado el ensayo, el macho demoró más tiempo en entrar en contacto con la hembra *muerta* que con una hembra *viva* (Fig. 4.4), debido probablemente a que la segunda es capaz de caminar libremente por la arena favoreciendo el encuentro con el macho.

Los machos prácticamente no copulan con hembras *lavadas*, y cuando lo hacen demoran más tiempo en entrar en contacto con ella y en comenzar la cópula comparado con una hembra *viva*, *muerta* o *pintada*. La frecuencia de intentos de cópula se restituye parcialmente cuando la cutícula de la hembra está pintada con lípidos. La condición experimental de una hembra *lavada* (extracción de sus lípidos cuticulares) implica la supresión de la clave química de contacto, además de las claves mecánicas y químicas volátiles. La existencia de una señal química de contacto involucrada en el comportamiento sexual de *T. infestans* es apoyada por la reducción drástica de los intentos de cópula y el aumento del tiempo que el macho demora en contactar e intentar copular por primera vez con una hembra *lavada*.

La restauración de los lípidos cuticulares sobre las hembras a las que previamente se les habían extraído sus lípidos, resultó en la recuperación parcial de la frecuencia de intentos de cópula de los machos. Es posible que durante la extracción cuticular y la posterior reaplicación de lípidos se perdiera parte de la muestra, lo que explicaría que la restitución de la frecuencia de cópula no alcance la frecuencia observada en machos con hembras *vivas*. Asimismo, un macho demora un tiempo similar en contactar e intentar copular con una hembra *pintada* que con una hembra *viva*, sugiriendo que los lípidos cuticulares de la hembra participan en la modulación del comportamiento sexual del macho.

Generalmente, los machos no intentaban copular con una hembra sin antes contactarla con las antenas o patas delanteras. No era sino luego que el macho entraba en contacto con la hembra, que éste intentaba copular con ella. Si bien la cantidad de veces que un macho contactaba a una hembra no estaba relacionado con el tratamiento realizado sobre la cutícula de ésta, probablemente, los machos contacten en una primera instancia a una potencial pareja de cópula para después percibir si se trata o no de una hembra. Ciertamente, las vinchucas podrían percibir compuestos de baja volatibilidad de la cutícula a través de las quimiosensilias de contacto ubicadas en sus patas y antenas al tomar contacto con la superficie de otro insecto (Insausti *et al.*, 1999). Algunos componentes de la capa lipídica de la cutícula están involucrados en el reconocimiento de muchas especies de insectos (Howard y Blomquist, 1982) y podría pensarse que algunos componentes de la capa cuticular de *T. infestans* serían responsables del reconocimiento sexual. Parecería que una concentración relativa de sustancias en la cutícula de la hembra permitiría a los machos reconocer potenciales parejas ya que se encontraron diferencias en la composición cuticular entre macho y hembra en *T. infestans* (Juárez *et al.*, 1985; Juárez *et al.*, 2001).

En base a los resultados presentados en este Capítulo, se proveen evidencias sobre la existencia de compuestos cuticulares en *T. infestans* que darían prueba de la existencia de comunicación química de contacto entre machos y hembras durante los momentos previos al apareamiento.

CAPÍTULO V

Conclusiones Finales

CONCLUSIONES FINALES

En este trabajo de Tesis se estudió la comunicación química de triatominos en el contexto sexual. Se presentaron nuevas evidencias comportamentales que verifican y demuestran que existen volátiles emitidos por las hembras que promueven el acercamiento de los machos, y que las glándulas metasternales son la fuente de generación de dichos volátiles. A través de métodos de electrofisiología se identificaron los compuestos individuales generados por las glándulas metasternales de las hembras que son percibidos por las sensilias de las antenas de los machos. Posteriormente, se estudió el efecto de compuestos individuales sintéticos percibidos por las antenas de machos sobre la activación y orientación del vuelo, logrando identificar compuestos funcionalmente importantes en *R. prolixus*. Finalmente, se estudió el papel de los lípidos presentes en la cutícula de las vinchucas en el reconocimiento de la pareja sexual, demostrando que dichos compuestos son relevantes en la identificación química.

Los resultados expuestos en este trabajo demostraron que el vuelo de los machos de *R. prolixus* puede ser mediado por claves químicas emitidas por hembras conespecíficas. Este es el primer estudio realizado en vinchucas que revela la existencia de un comportamiento de orientación del inicio del vuelo mediada por olores en el contexto sexual. La respuesta de orientación hacia corrientes de aire que cargan olores es un mecanismo ampliamente extendido que media el encuentro sexual entre machos y hembras en insectos en general. Sin embargo, hasta el momento no se habían reportado casos de orientación anemotáctica del vuelo relacionada con señales sexuales en triatominos. Este trabajo presenta evidencia que muestra que los machos de *R. prolixus* expresan una respuesta orientada en contra de corrientes de aire asociados o no a volátiles emitidos por adultos conespecíficos. El comportamiento de anemotaxis positiva ya ha sido reportado en la caminata de larvas de *T. infestans* (Barrozo *et al.*, 2003) y también asociado a claves olfatorias arrastradas por una

corriente de aire en el contexto de búsqueda de alimento (Lorenzo Figueiras y Lazzari, 1998; Vitta *et al.*, 2002; Barrozo y Lazzari 2004a; 2004b).

Cabe destacar, que en ausencia de una corriente de aire y de estímulo olfativos, los machos de *R. prolixus* iniciaron el vuelo uniformemente en todas las direcciones, apoyando la idea acerca de la corriente de aire como una señal implicada en la orientación durante el inicio del vuelo. Particularmente, los machos en todas las series experimentales presentaron una orientación hacia la fuente de corriente de aire siendo esta respuesta anemotática positiva más marcada cuando los machos son confrontados a corrientes de aire que acarrear volátiles provenientes de hembras y no así de machos. De esta manera, los machos serían capaces de discriminar corrientes de aire que transportan olores del sexo opuesto, promoviendo el inicio del vuelo. Sugerimos que los machos de *R. prolixus* pueden percibir y reconocer volátiles de las hembras a larga distancia y transportarse activamente en dirección a estas. En conclusión, el vuelo de los machos podría estar actuando como un mecanismo facilitador del encuentro sexual mediado por una feromona producida por las hembras. Esto podría darse inclusive en ausencia de una corriente de aire. Estos resultados resultan relevantes debido a que el vuelo ha sido ampliamente reconocido como un mecanismo de dispersión y como parte del proceso de colonización y recolonización de hábitats naturales y artificiales en triatominos (Sjogren y Ryckman, 1966; Lehane y Schofield, 1976; D'Alessandro *et al.*, 1984; Schofield y Matthews, 1985; Diotaiuti *et al.*, 2000; Cecere *et al.*, 2004; Vazquez-Prokopec *et al.*, 2004; Ceballos *et al.*, 2005). De esta manera, por ejemplo, los machos podrían percibir a las hembras, establecidas en un área particular, a cortas o largas distancias, y ser atraídos hacia éstas facilitando el aumento de los números poblacionales de estos insectos.

Las secreciones producidas por las glándulas metasternales presentan perfiles cualitativos similares entre sexos en *R. prolixus* (Pontes *et al.*, 2008). Sin embargo, los resultados comportamentales de vuelo presentados en este trabajo mostraron que sólo los

olores emitidos por las glándulas metasternales de las hembras fueron capaces de desencadenar respuestas en los machos. Las glándulas metasternales de algunos heterópteros presentaban, originalmente, secreciones con función defensiva y evolucionaron posteriormente para producir feromonas sexuales (Blum, 1996). Es posible que los volátiles producidos por estas glándulas hayan evolucionado hacia una nueva función en triatominos ya que los adultos perturbados emiten las secreciones de las glándulas metasternales y de Brindley simultáneamente (Manrique *et al.*, 2006). Aún así, debe considerarse que ambos tipos de glándulas secretan múltiples compuestos con posibles efectos activadores, inhibidores o sinérgicos según la calidad química, las concentraciones y el contexto de la secreción. Resta entonces descubrir donde se encuentran las diferencias funcionales de las emisiones químicas que promueven la atracción de machos hacia las hembras.

La fuente de los volátiles que promueven el inicio de vuelo de los machos de *R. prolixus* son las glándulas metasternales de las hembras, ya que la oclusión de sus orificios de salida implicó una disminución de la respuesta de vuelo de los machos. Además, los volátiles de las glándulas metasternales extraídas de las hembras fueron suficiente estímulo para promover la activación del vuelo de machos del mismo modo que lo hicieron los olores provenientes de hembras intactas. Crespo y Manrique (2007) se han referido a la importancia de esta glándula en la ocurrencia de cópula, como así también en la agregación de machos alrededor de una pareja en cópula de *T. infestans*. En 2008, Pontes *et al.*, demostraron que la ausencia de olores de glándulas metasternales deviene en una caída drástica de la frecuencia de cópula en *R. prolixus*. En este estudio, la oclusión de las glándulas de Brindley de las hembras no afectó la respuesta de vuelo de los machos, resultado que sugiere que no participarían en la comunicación química en este contexto. Sin embargo, algunos compuestos de las glándulas de Brindley han sido asociados, previamente, con la función sexual según otros autores (Rojas *et al.*, 2002 y Guerenstein y Guerin, 2004 en *R. prolixus*, Fontán *et al.*,

2002 en *T. infestans*), por lo cual no se puede descartar que estas glándulas cumplan funciones en otros aspectos del comportamiento sexual en diferentes momentos del cortejo.

En varias oportunidades se ha descrito que los triatominos poseen una organización temporal de muchos de sus comportamientos (Ampleford y Steel, 1982; Constantinou, 1984; Lazzari, 1992; Minoli y Lazzari, 2003; Barrozo *et al.*; 2004a; 2004b; Lazzari *et al.*, 2004; Bodin, *et al.*, 2008; Guerenstein y Lazzari, 2009). La motivación por iniciar el vuelo también podría ser un proceso modulado en el tiempo e incluso estar controlado por un mecanismo circadiano. Además, las hembras vírgenes emiten espontáneamente los compuestos de sus glándulas metasternales en mayor frecuencia que los machos y lo hacen durante las primeras horas de la escotofase (Pontes *et al.*, 2008), período en el cual la actividad sexual presenta un pico (Crespo y Marique, 2005). El comportamiento de salida de los refugios de los machos y el aumento de su actividad locomotora está promovido por la presencia de hembras también durante el inicio de la noche (Pontes, 2010). Si bien es necesario realizar experimentos que pongan a prueba la hipótesis del control circadiano del inicio del vuelo, es posible sugerir que los mecanismos de búsqueda de pareja son realizadas por el macho en respuesta a olores emitidos por las hembras durante las primeras horas de la noche.

La captura de compuestos volátiles por medio de SPME permitió realizar registros exitosos de CG-EAD, confirmando que esta técnica de extracción de olores es adecuada para las preparaciones de muestras de olor en los estudios electrofisiológicos. Las antenas de machos fueron utilizadas como detectores de compuestos con actividad electrofisiológica, posibilitando la identificación de las sustancias producidas por las glándulas metasternales capaces de estimular los receptores de los machos. Específicamente, la 3-pentanona en *T. infestans* y el 2-metil-3-buten-2-ol, 2-metil-1-butanol y (2S)-pentanol en *R. prolixus*, evocaron respuestas en la mayoría de las preparaciones antenales de machos. La 3-pentanona ya había sido detectada por Manrique *et al.* (2006) como el componente mayoritario de las

secreciones de las glándulas metasternales emitidas por parejas en cópula de *T. infestans* y el 2-metil-3-buten-2-ol es el compuesto más representado en las glándulas metasternales de *R. prolixus* (Pontes *et al.*, 2008), proponiéndolos como posibles mediadores de la comunicación química en estas especies.

En ensayos comportamentales presentados en esta Tesis, los machos de *R. prolixus* mostraron una activación del vuelo al ser estimulados con olores de extractos de glándulas metasternales y posteriormente también lo hicieron al ser estimulados con compuestos sintéticos como el 2-pentanol. Este compuesto es capaz de disparar el inicio del vuelo por sí solo del mismo modo que lo hacen las hembras intactas. La existencia de otros compuestos secretados por las glándulas metasternales de las hembras capaces de estimular a los receptores antenales o de promover la actividad de vuelo de los machos no puede ser descartada y es un estudio que necesita ser profundizado.

En los últimos años y en los capítulos II y III de esta Tesis se han reunido evidencias acerca de la existencia de claves químicas que median la atracción entre sexos a larga distancia en varias especies de triatominos (Crespo y Manrique, 2007; Pontes *et al.*, 2008; Vitta *et al.* 2009). Si bien el comportamiento sexual en triatominos es característicamente simple y carente de un comportamiento de cortejo complejo, distintos tipos de claves químicas parecerían actuar en distintos momentos del encuentro entre sexos; de naturaleza volátil a larga distancia y menos volátil en proximidad. Los lípidos cuticulares en los insectos tienen un papel importante en la comunicación química, estando involucrados en el comportamiento de agregación, la atracción y reconocimiento sexual como feromonas de contacto. En este trabajo se estudió el comportamiento de *T. infestans* en los momentos previos a la cópula para determinar la existencia de una clave química presente en la cutícula que actúe como feromona de contacto. La evidencia comportamental reveló que los lípidos cuticulares de las hembras promoverían los intentos de cópula y reducirían el tiempo que

demora un macho en contactarlas e intentar copular, ya que al remover los lípidos de la cutícula de la hembra, los machos intentan aparearse con menor frecuencia y demoran más en hacerlo. Esto sugiere que las claves de quimiorrecepción de contacto juegan un papel importante en el apareamiento. Complementariamente, el comportamiento de cópula no se vio atenuado cuando otras modalidades sensoriales, como la visual y la mecánica, estaban suprimidas ya que los ensayos se realizaron en completa oscuridad y las hembras muertas no transmiten vibraciones a través del sustrato. Asimismo, la actividad de la hembra no sería determinante para estimular el inicio del apareamiento del macho ya que éstos intentan copular con hembras experimentales muertas (*i.e.*, inmóviles y sin posibilidad de secretar volátiles). De manera similar, *R. prolixus* presenta una reducción de la frecuencia de cópula al remover los lípidos de la cutícula de las hembras (Lorenzo Figueiras y Manrique, 2009). Se presentan, así, evidencias acerca de la existencia de una señal de comunicación química entre sexos que probablemente juegue un papel en el reconocimiento de la pareja a corta distancia que estimula el apareamiento.

La evidencia experimental revelada en este trabajo presenta un avance importante en el entendimiento de la dinámica de apareamiento de los triatominos. Teniendo en cuenta los numerosos casos de control de poblaciones de insectos plaga presentes en la literatura que involucran a la interrupción del encuentro sexual o a la disminución del éxito de los encuentros sexuales, los resultados de esta Tesis podrían tener relevancia epidemiológica. Además, los insectos dependen de estímulos químicos para asegurar las actividades fundamentales de su ciclo de vida como la alimentación y reproducción. La posibilidad de identificar estos estímulos químicos permitió manipular su comportamiento y regular la supervivencia de una población con compuestos “modificadores del comportamiento” (Shorey, 1973; Cardé y Elkinton, 1984; McNeil, 1991; Bento, 2001). El presente trabajo de Tesis demostró que existen productos naturales provenientes de las glándulas exocrinas de *R.*

prolixus y *T. infestans* que podrían ser utilizados en el desarrollo de nuevos métodos de control. Potencialmente, los compuestos biológicamente activos de las glándulas metasternales podrían ser utilizados en la preparación de cebos utilizables en trampas de captura de adultos de *R. prolixus*. Además, las feromonas sexuales podrían servir potencialmente para el diseño de programas destinados a evitar la transmisión de la enfermedad de Chagas, sobre todo en aquellas especies que ya demostraron haber desarrollado resistencia a insecticidas. Las trampas de detección y captura para triatominos son necesarias en la detección temprana de la reinvasión de las viviendas luego de los tratamientos insecticidas para evitar el contacto de los triatominos con las personas o animales que actúen como reservorio del parásito trasmisor de la enfermedad de Chagas. Los compuestos y las respuestas comportamentales descritas previamente podrían ser explotadas en el desarrollo de herramientas de control de estos insectos aunque dependen de trabajo adicional donde se pongan a prueba a los compuestos sintéticos de manera dosis-dependiente a nivel electrofisiológico y a través de ensayos comportamentales.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Ampleford, E.J. y Steel, C.G.H. (1982). Circadian control of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Comp. Physiol. [A]* 147:281-286.
- 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.
- Baldwin, W.F.; Knight, A.G. y Lynn, K.R. (1971). Sex pheromone in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Can. Entomol.* 103:18-22.
- Bar, M.A.; Damborsky, M.P.; Oscherov, E.B.; Milano, A.M.F.; Avalos, G. y Wisnivesky-Colli, C. (2002). Triatomines involved in domestic and wild *Trypanosoma cruzi* transmission in Concepcion, Corrientes, Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97:43-46.
- Barrett, F.M; Millen, B.F. y Lai-Fook, J. (1979). The Brindley's glands of *Rhodnius prolixus*. I. Structure of the mature gland. *Can. J. Zool.* 57:1109-1119.
- Barrozo, R.B.; Manrique, G. y Lazzari, C.R. (2003). The role of water vapour in the orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *Journal of Insect Physiology.* 49:315-321.
- Barrozo, R.B. y Lazzari, C.R. (2004a). Orientation behaviour of the bloodsucking bug *Triatoma infestans* to short-chain fatty acids: synergistic effect of L-lactic acid and carbon dioxide. *Chemical Senses.* 29:833-841.
- Barrozo, R.B. y Lazzari, C.R. (2004b). The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. *Chemical Senses.* 29:319-329.
- Barrozo, R.B.; Minoli, S.A. y Lazzari, C.R. (2004a). Circadian rhythm of behavioural responsiveness to carbon dioxide in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *J. Insect Physiol.* 50:249-254.
- Barrozo, R.B.; Schilman, P.E.; Minoli S.A. y Lazzari, C.R. (2004b). Daily rhythms in disease-vector insects. *Biological Rhythm Research.* 35:79-92.
- Barth, R. (1980). A glândula ectodermal do aparelho copulador do *Triatoma infestans* (Heteroptera: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 75: 119-124.

- Batschelet, E. (1965). Statistical methods for the analysis of problems in animal orientation and certain biological rhythms. En: S.R. Galles; K. Schmidt-Koenig; G.I. Jacobs y R.F. Belleville (editors). *Animal Orientation and Navigation*, NASA, Washington. pp. 61–91.
- Bauer, R.; Haribal, M.; Renwick, A. y Städler, E. (1998). Contact chemoreception related to host selection and oviposition behaviour in the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. *Physiological Entomology*. 23:1-7.
- Bell, W.J.; Kipp, L.R. y Collins, R.D. (1995). The role of chemo-orientation in search behavior. En *Chemical Ecology of Insects* (R. T. Cardé y W. T. Bell - eds.) pp: 105-152. Chapman y Hall, New York.
- Bento, J.M. (2001). Fundamentos do monitoramento, da coleta massal e do confundimento de insetos-pragas, cap. 16. In: Vilela, E.F. & Della Lucia, T.M.C. 2001. Feromônios de Insetos. Biologia, química e emprego no manejo de pragas. 2° Ed.
- Bérenger, J.M. y Blanchet, D. (2007). A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera; Reduviidae; Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102(6):733-736.
- Bermudez, H.; Balderrama, F. y Torrico, F. (1993). Identification and characterisation of wild foci of *Triatoma infestans* in Central Bolivia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 49:371.
- Bernard, J. (1974). Étude électrophysiologique de récepteurs impliqués dans l'orientation vers l'hôte et dans l'acte hématophage chez un Hémiptère: *Triatoma infestans*. Tesis Doctoral, University of Rennes, Francia.
- Bertram, D.S. (1971). Attraction of Triatominae bugs vectors of Chagas' disease to betalights. *Nature*. 231:268.
- Birch, M.C. y Haynes, K.F. (1982). Insect pheromones. The institute of Biology's. Studies in biology. 147: pp.60.
- Blum, M.S. (1996). Semiochemical parsimony in the Arthropoda. *Ann. Rev. Entomol.* 41:353-74.

- Bodin, A.; Barrozo, R.B.; Couton, L. y Lazzari, C.R. (2008). Temporal modulation and adaptive control of the behavioural response to odours in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.* 54:1343-1348.
- Brasileiro, V.L.F. (1982). Fecundidade e fertilidade da fêmea de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera - Reduviidae). I- Influência da cópula e da longevidade. *Revista Brasileira de Biologia.* 42:1-13.
- Brindley, M.D.H. (1930). On the metasternal scent glands of certain Heteroptera. *Trans. Ent. Soc. Lond.* 78:199-208.
- Butenandt, A.; Beckmann, R.; Stamm, D. y Hecker, E. (1959). Über den Sexual-Lockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitutionsermittlung. *Zeitschrift für Naturforschung.* 14b:283-284.
- Carbajal De La Fuente, A.L.; Minoli, S.A; Lopes, C.M.; Noireau, F.; Lazzari, C.R. y Lorenzo, M.G. (2007). Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. *Acta Tropica.* 101:115-119.
- Carcavallo, R.U.; Franca Rodríguez, M.E.; Salvatella, R.; Curto de Casas, S.I.; Sherlock, I.S.; Galvão, C.; Da Silva Rocha, D.; Galíndez Girón, I.; Otero Arocha, M.A.; Martínez, A.; Da Rosa, J.A; Canale, D.M.; Farr, T.H. y Barata, J.M. (1998). Habitats and related fauna. En: Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas, Vol. II, Capítulo. 14, parte A. (R.U. Carcavallo; I. Galíndez Girón; J. Jurberg y H. Lent - eds.). pp: 561-600. Editora Fiocruz-Rio de Janeiro.
- Carcavallo, R.U.; Galíndez Girón, I.; Juberg, J. y Lent, H. (1999). Atlas of Chagas's disease vectors in the Americas Vol. III. 746-1217.
- Cardé, R.T. y Elkinton, J.S. (1984). Field trapping with attractants: methods and interpretation, p 111-129. In: Techniques in pheromone research (eds. Hummel, H.E. & Miller, T.A.). Springer-Verlag, New York 464 pp.
- Cardé, R.T. y Bell, W.J. (1995). Chemical ecology of insects 2. Chapman y Hall, New York, pp 443.
- Cardé, R.T. y Minks, A.K. (1997). Insect pheromone research: new directions. Chapman y Hall, New York, pp 684.

- Case, R. (1957). Differential of the effect of pH and CO₂ on the spiracular function of insect. *Journal of Cell Comparative Physiology*. 49:103-113.
- Catalá, S. (1997). Antennal sensilla of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a comparative study of five genera. *Int J. Insect Morphol. Embryol.* 26:6-73.
- Catalá, S. y Schofield, C.J. (1994). The antennal sensilla of *Rhodnius*. *J. Morphol.* 219:193-203.
- Ceballos, L.A.; Vazquez-Prokopec, G.M.; Cecere, M.C.; Marcet, P.L. y Gürtler, R.E. (2005). Feeding rates, nutritional status and flight dispersal potential of peridomestic populations of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta Trop.* 95:149-59.
- Cecere, M.C.; Vazquez-Prokopec, G.M.; Gürtler, R.E. y Kitron, U. (2004). Spatio-temporal analysis of reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) following insecticide spraying in a rural community in Northwestern Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71:803–810.
- Chagas, C. 1909. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen, n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1:528.
- Chapman, R.F. (1982). The insects. Structure and function. 3rd ed. Chapman R.F. (ed.), London.
- Chapman, R.F. (1998). The insects. Structure and function. 4th ed. Chapman R.F. (ed.), London.
- Constantinou, C. (1984). Circadian rhythm of oviposition in the blood sucking bugs, *Triatoma phyllosoma*, *T. infestans* and *Pastrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Interdisciplinary Cycle Research.* 15:203-212.
- Costa, J. y Felix, M. (2007). *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102(1): 87-90.
- Costa, J.; Argolo, A.M. y Felix, M. (2006). Redescription of *Triatoma melanica* Neiva y Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa.* 1385:47-52.

- Coura, J.R. y Dias, J.C. (2009). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104(1):31-40.
- Crespo, J.E. y Manrique, G. (2005). Mating occurrence rhythm in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae). En Actas del VIII Latinamerican Symposium of Chronobiology. p. 104.
- Crespo, J.G. y Manrique, G. (2007). Mating behavior of the hematophagous bug *Triatoma infestans*: role of Brindley's and metasternal glands. *J. Insect Physiol.* 53(7):708-14.
- 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.; Morgan, E.D. y Ondarza, R.N. (1995). Brindley's gland exocrine products of *Triatoma infestans*. *Med. Vet. Ent.* 9: 403-406.
- D' Alessandro, A; Barreto, P.; Saravia, N. y Barreto, M. (1984). Epidemiology of *Trypanosoma cruzi* in the oriental plains of Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33(6):1084-1095.
- De Brito Sánchez, M.G.; Manrique, G. y Lazzari, C.R. (1995). Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae) II. Electrophysiological correlates. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 90:649-651.
- De Renobales, M.; Nelson, D. y Blomquist, G. (1991). Cuticular lipids. En: Binnington, K & Etnakaran, A. (Eds.). *Physiology of the Insect Epidermis*. CSIRO Publications, East Melbourne, Victoria, Australia, pp. 240-251.
- Dias, J.C.P. (1987). Control of Chagas' disease in Brazil. *Parasitology Today.* 3: 36-341.
- Dicke, M. y Sabelis, M.W. (1988). Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology.* 2:131-139.
- Diehl, P.; Vlimant, A.; Guerenstein, P. y Guerin, P.M. (2003). Ultrastructure and receptor cell responses of the antennal grooved peg sensilla of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Arthropod Structure Development.* 31:271-285.
- Diotaiuti, L.; Faria Filho, O.; Carneiro, F.C.F.; Dias, J.C.P.; Pires, H.H.R. y Schofield, C.J. (2000). Aspectos operacionais do controle do *Triatoma brasiliensis*. *Cadernos de Saude Publica.* 16(2):61-67.

- Dujardin, J.P.; Tibayrene, M.; Venegas, E.; Maldonado, P.; Desjeux, P. y Ayala, F.J. (1987). Isozyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *Journal of Medical Entomology*. 24:40-45.
- Dumser, J.B. y Davey, G.D. (1974). Endocrinological and other factors influencing testis development in *Rhodnius prolixus*. *Can. J. Zool.* 52:1011-1022.
- Durand, D. y Greenwood, J.A. (1958). Modification of the Rayleigh test for uniformity in analysis of two-dimensional orientation data. *Journal of Geology*. 66:229-238.
- Dusenbery, D.B. (1992). Sensory Ecology: how organisms acquire and respond to information. Freeman W.H. (ed.), New York, USA.
- Ekkens, D.B. (1981). Nocturnal flights of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) in Sabino Canyon, Arizona. *J Med. Entomol.* 18:211-227.
- Espínola, H. N. (1973). Aspectos do comportamento do *Triatoma infestans* (Klug, 1834) em condições experimentais. Doctoral Thesis, Belo Horizonte, Brasil.
- Farbman, A.I. (1994). The cellular basis of olfaction. *Endeavour*. 18:2-8.
- Fisher, N.I. (1993). Statistical analysis of circular data. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fontán, A.; González Audino, P.; Martínez, A.; Alzogaray, R.A.; Zerba, E.N.; Camps, F. y Cork, A. (2002). Attractant volatiles released by female and male *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of Chagas disease: chemical analysis and behavioral bioassay. *J. Med. Entomol.* 39(1):191-197.
- Forero, D.; Weirauch, C. y Baena, M. (2004). Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa*, 670: 1-12.
- Galvão, C.; Carcavallo, R.; Rocha, D.S. y Juberg, J. (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*. 202: 1-36.
- Gamboa, C.J. (1963). Comprobación de *Rhodnius prolixus* extradomiciliado en Venezuela. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 54:18-25.
- 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.

- García-Pérez, J.; Blanco-Pinon, A. y Navarro-Fernandez, E. (1997). Comportamiento sexual de *Triatoma gerstaeckeri* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Zoologica Mexica*. 70:55-63.
- Ghul, F. (2007). Chagas disease in Andean countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 102:29-38
- Gibbs, A.G. (1998). Water-proofing properties of cuticular lipids. *American Zoologist*. 38:471-482.
- Giesen, H.; Kohnle, U.; Vite, J.P.; Pan, M.L. y Francke, W. (1984). The aggregation pheromone of the Mediterranean pine bark-beetle *Ips (Orthotomicus) erosus*. *Z. ang. Entomol.* 98:95-97.
- Ginzl, M.; Blomquist, G.; Millar, J. y Hanks, L. (2003). Role of contact pheromones in mate recognition in *Xylotrechus colonus*. *Journal of Chemical Ecology*. 29(3):533-545.
- González Audino, P.; Alzogaray, R.A.; Vassena, C. Masuh, H.; Fontán, A; Gatti, P.; Martínez, A.; Camps, F.; Cork, A. y Zerba1, E. (2007). Volatile compounds secreted by Brindley's glands of adult *Triatoma infestans*: identification and biological activity of previously unidentified compounds. *Journal of Vector Ecology*. 32(1):75-82
- Greenwood, J.A. y Durand, D. (1955). The distribution of length and components of the sum of n random unit vectors. *Annals of Mathematical Statistics*. 26:233-246.
- Gringorten, J.L. y Friend, W.G. (1979). Wing-beat pattern in *Rhodnius prolixus* Stål (Heteroptera: Reduviidae) during exhaustive flight. *Can. J. Zool.* 57:391-395.
- Groot, A.T. (2000). Sexual behaviour of the green capsid bug. PhD thesis, University of Wageningen.
- Guerenstein, P.G. (1999). Sensory and behavioural responses of *Triatoma infestans* to host and conspecific odours. Tesis Doctoral, University of Neuchâtel, Suiza.
- Guerenstein, P.G. y Guerin, P.M. (2001). Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. *The Journal of Experimental Biolog.* 204:587-597.
- Guerenstein, P.G. y Guerin, P.M. (2004). A comparison of volatiles emitted by adults of three triatomine species. *Ent. Exp. et Applicata*. 111:151-155.
- Guerenstein, P.G. y Lazzari, C.R. (2009). Host-seeking: how triatomines acquire and make use of information to find blood. *Acta Tropica*. 110:148-158.

- Gurevitz, J.M.; Cevallos, L.A.; Kitron, U. y Gürtler, R.E. (2006). Flight Initiation of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) under natural climatic conditions. *J. Med. Entomol.* 43(2):143–150.
- Gürtler, R.E.; Cecere, M.C.; Rubel, D.N.; Petersen, R.M.; Schweigmann, N.J.; Lauricella, M.A.; Bujas, M.A.; Segura, E.L. y Wisnivesky-Colli, C. (1991) Chagas' disease in northwest Argentina: infected dogs as a risk factor for the domestic transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85:741-745.
- Gürtler, R.E.; Petersen, R.M.; Cecere, M.C.; Schweigmann, N.J.; Rubel, D.N.; Chuit, R.; Gaultieri, J.M. y Wisnivesky-Colli, C. (1993). Chagas disease in north-west Argentina: risk of domestic reinfestation by *Triatoma infestans* after a single community-wide application of deltamethrin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82:27-30.
- Gürtler, R.E.; Cécere, M.C.; Canale, D.M.; Castañera, M.B.; Chuit, R. y Cohen, J.E. (1999). Monitoring house reinfestation by vectors of Chagas' disease: a comparative trial of detection methods during a four-year follow-up. *Acta Tropica.* 72: 213-234.
- Hack, W.H.; Ricciardi, A.I.; Oscherov, B. y Olivetti, B. (1980). Composition of the secretion of Brindley's gland in Triatominae. *Medicina* (Buenos Aires). 40(I):178-180.
- Harrison, R.G. (1980). Dispersal polymorphisms in insects. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 11: 95-118.
- Hase, A. (1932). Beobachtungen an Venezolanisch Triatoma-Arten, sowie zur allgemeinen Kenntnis der familie der Triatomidae (Hemiptera). *Zeitschrift für Parasitenkunde.* 4:585-652.
- 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.
- Howard, R.W. (1993). Cuticular hydrocarbons and chemical communication. En: Stanley-Samuelson, D.W y Nelson, D.R. Editors. *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology*, University of Nebraska Press, Lincoln, pp. 179–226.
- Howard, R.W. y Blomquist, G.J. (1982). Chemical Ecology and Biochemistry of Insect Hydrocarbons, *Ann. Rev. Entomol.* 27:149-172.
- Howard, R.W y Blomquist, G.J. (2005). Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annual Review of Entomology.* 50: 371–393.

- Hubbard, S.F.; Marris, G.; Reynolds, A. y Rowe, G.W. (1987). Adaptative patterns in the avoidance of superparasitism by parasitic wasps. *J. Anim. Ecol.* 56:387-401.
- Insausti, T.C.; Lazzari, C.R. y Campanucci, V.A. (1999). Neurobiology of behaviour A, in Carcavallo et al. (Eds.), Atlas of Chagas' disease vectors in America, vol. III, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil pp. 1017-1051.
- Jewett, D.K.; Brigham, D.L. y Bjostad, L.B. (1996). *Hesperophylax occidentalis* (Trichoptera: Limnephilidae): Electroantennogram structure-activity study of sex pheromone component 6-methylnonan-3-one. *Journal of Chemical Ecology.* 22 (1):123-137.
- Juárez, P. y Brenner, R.R. (1981). Bioquímica del ciclo evolutivo del *Triatoma infestans* (vinchuca). V. Emisión de ácidos grasos volátiles. *Acta Fisiológica Latino-Americana.* 31:113-117.
- Juárez, P. y Blomquist, G. (1993). Cuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans* and *T. mazzottii*. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 106B(3):667-674.
- Juárez, M.P. y Fernández, G.C. (2006). Cuticular hydrocarbons of triatomines. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 147(A):711-730.
- Juárez, M.P.; Brenner, R.R. y Gros, E.G. (1984). The epicuticular lipids of *Triatoma infestans* -I. Glycerides. *Comp. Biochem. Physiol.* 78(B): 427-431.
- Juárez, P.; Brenner, R.; Labayen, I.L. y Gros, E.G. (1985). Biochemistry of the Development cycle of *Triatoma infestans*. VII. Lipid composition of the cuticle surface extracted with hexane. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 35(2):223-36.
- Juárez, P.; Blomquist, G.J. y Schofield, C.J. (2001). Hydrocarbons of *Rhodnius prolixus*, a Chagas disease vector. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 129(B):733-746.
- Juárez, M.P.; Carlson, D.A.; Salazar Schettino, P.M.; Mijailovsky, S. y Rojas, G. (2002). Cuticular hydrocarbons of Chagas disease vectors in Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 97(6): 819-827.
- Kaissling, K.E. (1987). R.H. Wright lectures on insect olfaction. Colbow K (ed), Simon Fraser University, Burnaby, Canadá.
- Kaissling, K.E. (1994). Transduction in olfactory and gustatory receptors. *Proc. 22nd Göttingen Neurobiology Conf.* En Elsner N y Breer H. (eds.), G. Thieme Verl. Stuttgart, New York, pp. 242-247.

- Kaissling, K.E. (1995). Single unit and electroantennogram recording in insect olfactory organs. En *Experimental cell biology of taste and olfaction: current techniques and protocols* (A. I. Spielman y J.G. Brand - eds.). pp: 361-377.
- Kaissling, K.E. y Thorson, J. (1980). Insect olfactory sensilla: structural, chemical and electrical aspects of the functional organization. In *Receptors for Neurotransmitters, Hormones in Insects* (ed. Satelle DB, Hall LM, Hildebrand JG), pp 261-282. Elsevier, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Kälin, M. y Barrett, F.M. (1975). Observations on the anatomy, histology, release-site, and function of Brindley's gland in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 68:126-134.
- Karlson, P. y Butenandt, A. (1959). Pheromones (ectohormones) in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 4:49-58.
- Karlson, P. y Lüscher, M. (1959). 'Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*. 183:55-56.
- Klimetzek, D.; Bartels, J. y Francke, W. (1989). The pheromone system of the elm bark beetle *Pteleobius vittatus* (F.) (Col., Scolytidae). *J. Appl. Entomol.* 107:518-523.
- Landolf, P.J. y Philips, T.W. (1997). Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.* 42:371-391.
- Lang, J.T. y Foster, W.A. (1976). Is there a female sex pheromone in the mosquito *Culiseta inornata*? *Environ. Entomol.* 5:1109-1115.
- Lazzari, C.R. (1991). 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.; Minoli, A.S. y Barrozo, R.B. (2004). Chemical ecology of insect vectors: the neglected temporal dimension. *Trends in Parasitology.* 20:506-507.
- Leal, W.S.; Sawada, M. y Hasegawa, M. (1993). The Scarab beetle *Anomala daimiana* utilizes a blend of two other *Anomala spp.* sex pheromones. *Naturwissenschaften* 80:181-183.
- Lehane, M.J. y Schofield, C.J. (1976). Preliminary report on flight by some triatomine bugs. *Transac. Royal Society of Trop. Medic. and Hyg.* 70:520-526.

- Lehane, M.J. y Schofield, C.J. (1978). Measurement of speed and duration of flight by triatomine bugs. *Transac. Royal Society of Trop. Medic. and Hyg.* 72:438.
- Lehane, M.J. y Schofield, C.J. (1981). Field experiments of dispersive flight by *Triatoma infestans*. *Transac. Royal Society of Trop. Medic. and Hyg.* 75:399-400.
- Lehane, M.J. y Schofield, C.J. (1982). Flight initiation in *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. Entomol. Res.* 72:497-510.
- Lehane, M.J.; Mcewen, P.K.; Whitaker, C.J.; Schofield, C.J. (1992). The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. *Acta Trop.* 52:27-38.
- 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, 163 (3), p. 123-524.
- Lewis, T. (1984). Insect communication. Academic Press, Orlando, Florida. Pp. 414.
- Lima-Carvalho, A.L.; Valverde-Macedo, M.; Sordillo, C.M.O. y de Almeida, J.R. (1985). Observações sobre o comportamento de corte e cópula em *Triatoma protacta* (Heteroptera: Reduviidae). *Resumos do Congresso Brasileiro de Zoologia*. pp. 78-79.
- Lima, M.M.; Juberg, P. y Almeida, J.R. (1986a). Behavior of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease. I. Courtship and copulation of *Panstrongylus megistus* in laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 8:271-274.
- Lima, M.M.; Jurberg, P. y Ribeiro De Almeida, J. (1986b). Behaviour of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease. I Courtship and copulation of *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835) in the laboratory. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 81:1-5.
- Lima, M.M.; Jurberg, P. y Ribeiro De Almeida, J. (1986c). Behaviour of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease. II. Influence of feeding, lighting and time of day on the number of matings, mating speed and duration of copulation of *Panstrongylus megistus* (Burm., 1835) under laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 81:381-388.
- Lockey, K.H (1988). Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 89(B):595-645.

- Lorenzo Figueiras, A.N. y Lazzari, C.R. (1998). Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: A novel assembling factor. *Physiological Entomology*. 23:33-37.
- Lorenzo Figueiras, N.A. y Lazzari, C.R. (2002a). Aggregation behaviour and interspecific responses in *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 97:569-571.
- Lorenzo Figueiras, N.A. y Lazzari, C.R. (2002b). Aggregation behaviour and interespecific responses in three species of Triatominae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93:133-137.
- Lorenzo Figueiras, A.N. y Manrique, G. (2009). Are cuticular lipids involved in mate recognition in *Rhodnius prolixus* (Heteroptera, Reduviidae)? En actas del VI Encontro Brasileiro de Ecologia Química. p.:73. Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
- Lorenzo Figueiras, A.N.; Kenigsten, A. y Lazzari, C.R., (1994). Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: chemical signals and temporal pattern. *Journal of Insect Physiology*. 40:311-316.
- Lorenzo Figueiras, A.N.; Girotti, J.R.; Mijailovsky, S.J. y Juárez, M.P. (2009). Epicuticular lipids induce aggregation in Chagas disease vectors. *Parasites & Vectors* <http://www.parasitesandvectors.com/content/2/1/8>.
- Lorenzo, M.G.y Lazzari, C.R. (1993). Dynamics of the use of refuges by *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 88:265.
- 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. of Insect Physiology*. 42(9):903-907.
- Lorenzo, M.G. y Lazzari, C.R. (1998). Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Act. Trop.* 79:163-170.
- Malo, E.A.; Ramírez-Rovelo, A.; Cruz López, L. y Rojas, J.C. (1993). Life cycle and influence of age and feeding on the first mating of *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae), *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 88: 203-206. 154
- Manrique, G. y Lazzari, C.R. (1994). Sexual behaviour and stridulation during mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 89(4):629-633.
- Manrique, G. y Lazzari, C.R. (1995). Existente of sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): I-Behavioural Evidence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 90(5):645-648.

- Manrique, G. y Schilman, P.E. (2000). Two different vibratory signals in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: reduviidae). *Acta Tropica*. 77(3):271-8.
- Manrique, G.; Vitta, A.C.; Ferreira, R.A.; Zani, C.L.; Unelius, C.R.; Lazzari, C.R.; Diotaiuti, L. y Lorenzo, M.G. (2006). Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity, and potential function of volatiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. *J. Chem. Ecol.* 32(9):2035-52.
- Martínez, E.; Chávez, T.; Sossa, D.; Aranda, R.; Vargas, B. y Vidaurre, P. (2007). *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolivia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. *Boletín del Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo*. 3(1):1-11.
- McEwen, P.K. y Lehane, M.J. (1993). Factors influencing flight initiation in the triatomine bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Sci. Appl.* 14:461-464.
- McEwen, P.K. y Lehane, M.J. (1994). Relationships between flight initiation and oviposition in *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *J. Appl. Entomol.* 117:217-223.
- McEwen, P.K.; Lehane, M.J.; Whitaker, C.J. (1993). The effect of population density on flight initiation in *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). *J. Appl. Entomol.* 116: 321–325.
- McNeil, J.N. (1991). Behavioral ecology of pheromone-mediated communication in moths and its importance in the use of pheromone traps. *Ann. Rev. Entomol.* 36:407-430.
- Millar, J.G.; Knudson, A.E.; Mcelfresh, J.S.; Gries, R.; Gries, G. y Davis, J.H. (1996). Sex attractant pheromone of the pecan nut casebearer (Lepidoptera: Pyralidae). *Bioorg. Medic. Chem.* 4:331-339.
- Miller, J.R. y Roelofs, W.L. (1980). Individual variation in pheromone sexual component ratios in two populations of the redbanded leafroller moth, *Argyrotaenia velutinana*. *Environ. Entomol.* 9:359- 363.
- Minks, A.K. y Van Deventer, P. (1992). Practical applications: the European scene. Pheromones and behaviour modifying chemicals. 51:9–18.
- Minoli, S.A. y Lazzari, C.R. (2003). Chronobiological basis of thermopreference in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Insect Physiol.* 49:927-932.

- Minoli, S.A. y Lazzari, C.R. (2006). Take-off activity and orientation of triatomines (Heteroptera: Reduviidae) in relation to the presence of artificial lights. *Acta Trop.* 97:324-30.
- Monteiro, F.A.; Barrett, T.V.; Fitzpatrick, S.; Cordon-Rosales, C.; Feliciangeli D. y Beard, C.B. (2003). Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol. Ecol.* 12(4):997–1006.
- Morita, H. y Shiraishi, A.S. (1985). Chemoreception physiology. En *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol 6 (ed. G. A. Kerkut, L. I. Gilbert), pp 133-170. Pergamon Press, Oxford.
- Murlis, J.; Willis, M.A. y Cardé, R.T. (2000). Spatial and temporal structures of pheromone plumes in fields and forests. *Physiological Entomology.* 25:211–222.
- Nation, J.L. (2002). *Insect Physiology and Biochemistry*. University of Florida, CRC Press, pp. 485.
- Neves, D.P. y Paulini, E. (1981). Atracção sexual em *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) por feromônio. *Rev. bras. Ent.* 25:301-306.
- Noireau, F. (2009). Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104:60-64
- Noireau, F. y Dujardin, J. P. (2001). Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96:385-389.
- Noireau, F.; Flores, R.; Gutierrez, T.; Abad-Franch, F.; Flores, E. y Vargas, F. (2000). Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94:23-27.
- Noireau, F.; Cortez, M.G.R.; Monteiro, F.A.; Jansen, A.M. y Torrico, F. (2005). Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? *Trends Parasitol.* 21:7-10.
- Núñez, J.A. (1987). Behaviour of Triatominae bugs. En Brenner y 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.

- Ondarza, R.N.; Gutierrez-Martinez, A.; Malo, E.A. y Rojas, J.C. (1987). Actividad afrodisiaca de la feromona sexual de *Triatoma mazzottii*. *Usinger Southwestern Entomologist*. 12:327–333.
- Ono, M.; Terabe, H.; Hori, H. y Sasaki, M. (2003). Components of giant hornet alarm pheromone. *Nature*. 424:637–638.
- Ono, M. (2005). Semiochemicals that regulate social behaviour of hornets. *Aroma Res.* 6:230–236.
- Palottini, F. y Manrique, G. (2009). Reload capacity of Brindley's glands and its relationship with the degree of fasting in the blood-sucking bug *Triatoma infestans*. En actas del VI Encontro Brasileiro de Ecologia Química. p.: 91. Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
- Pattenden, G. y Staddon, B.W. (1972). Identification of iso-Butyric acid in secretion from Brindley's scent glands in *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae). *Ann. Entomol. Soc Am.* 65(5):1240-1241.
- Petersen, R.; Schweigmann, N.J.; Vallvé, S.; Lauricella, M. y Gürtler, R. (1991) Características demográficas y prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en la población canina de la localidad rural de Bermejo, San Juan. *Revista de Medicina Veterinaria*. 72(3):112-119.
- Phelan, P.L. y LIN, H. (1991). Chemical characterization of fruit and fungal volatiles attractive to dried-fruit beetle, *Carpophilus hemipterus* (L.) (Coleoptera: Nitidulidae). *J. Chem. Ecol.* 17:1253–1272.
- Pires, H.H.R.; Lorenzo, M.G.; Diotaiuti, L.; Lazzari, C.R. y Lorenzo Figueiras, A.N. (2002). Aggregation behaviour in *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans*: inter and intraspecific responses. *Acta Tropica*. 81(1):47-52.
- Pires, H.H.R.; Lorenzo, M.G.; Lazzari, C.R.; Diotaiuti, L. y Manrique, G. (2004). The sexual behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): an experimental study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 99(3):295-300.
- Pontes, G.B. (2010). Comportamento sexual de *Rhodnius prolixus*. Tesis Doctoral, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. pp.: 118.

- Pontes, G.B.; Noireau, F. y Lorenzo, M.G. (2005). Estudio da interação entre *Periplaneta americana* (Blattodea:Blattidae) e seu potencial predador *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Heteroptera:Reduviidae) em condições experimentais. En actas del XLI Congreso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical do Cono Sul. Florianópolis, Brasil.
- Pontes, G.B.; Bohman, B., Unelius, C.R. y Lorenzo, M.G. (2008). Metasternal gland volatiles and sexual communication in the triatomine bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Chem. Ecol.* 34(4):450-7.
- Prokopy, R.J.; Phelan, P.L.; Wright, S.E.; Minalga, A.J.; Barger, R. y Leskey, T.C. (2001). Compounds from host fruit odor attractive to adult plum curculios (Coleoptera: Curculionidae). *J. Entomol. Sci.* 36:122–134.
- Rabinovich, J.E.; Schweigmann, N.J.; Yohai, V. y Wisnivesky-Colli, C. (2000). Probability of *Trypanosoma cruzi* transmission by *Triatoma infestans* to the opossum *Didelphis albiventris*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 65:125-130
- Raina, A.K.; Kingan, T.G. y Mattoo, A.K. (1992). Chemical signals from host plant and sexual behaviour in a moth. *Science.* 255:592-594.
- Raina, A.K.; Kingan, T.G. y Giebultowicz, J.M. (1994). Mating-induced loss of sex pheromone and sexual receptivity in insects with emphasis on *Helicoverpa zea* and *Lymantria dispar*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 25:317-327.
- Regis, L.; Gomes, Y.M. y Furtado, A.F. (1985). Factors influencing male accessory gland activity and first mating in *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Inst Sci Applic.* 6:579-583.
- Reisenman, C.E.; Lazzari, C.R. y Giurfa, M. (1998). Circadian control of photonegative sensitivity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Comp. Physiol.* 183(A):533-541.
- Ríos Candelaria, E. (1999). Análisis químico y conductual de los compuestos volátiles emitidos por *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chiapas, Chiapas.

- 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.
- Roelofs, W. y Bjostad, L. (1984). Biosynthesis of lepidopteran pheromones. *Bioorganic Chemistry.* 12 (4):279-298.
- Rojas, J.C. y Cruz López, L. (1992a). Factors que afectan la respuesta de *Triatoma mazzottii* a la feromona de agregación en laboratorio. *Southwestern Entomologist.* 19:393-401.
- Rojas, J.C. y Cruz-López, L. (1992b). Sexual behaviour in two species of *Triatoma phyllosoma* Complex (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *J. Med. Entomol.* 29:13-18.
- Rojas, J.C.; Malo, E.A.; Gutierrez-Martinez, A. y Ondarza, R.A. (1990). Mating behaviour of *Triatoma mazzottii* Usinger (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83:598-602.
- Rojas, J.C.; Ríos-Candelaria, E.; Cruz López, L.; Santiesteban, A.; Bond-Compean, J.G.; Brindis, Y. y Malo, E.A. (2002). A reinvestigation of Brindley's gland exocrine compound of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Ent.* 39(2):256-265.
- Rojas, J.C.; Ramírez-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-2-hexanone from the triatominae bug *Dipetalogaster maximus* (Uhler) (Heteroptera; Reduviidae). *Experientia.* 39:380-381.
- Salvatella, R.A. (2007). Achievements in controlling Chagas disease in Latin America. OMS, Geneva.
- Sandoval, C.M.; Pabón, E.; Jurberg, J. y Galvão, C. (2007). *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) *Zootaxa.* 1443:55–64.
- Schilman, P.E.; Núñez, J.A. y Lazzari, C.R. (1996). Attributes of oviposition substrates affect fecundity in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 42 (9): 837-841.
- Schlyter, F.; Birgersson, G.; Byers, J.A. y Bakke, A. (1992). The aggregation pheromone of *Ips duplicatus* and its role in competitive interactions with *I. typographus*. *Chemoecology* 3:103–112.

- Schmuck, R. (1987). Aggregation of the fire bug, *Pyrrhocoris apterus*, with special reference to its assembling scent. *Entomol. Gener.* 12:155-169.
- Schneider, D. (1957). Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo-und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori*. *Z. Vergl. Physiol.* 40:8-41.
- Schneider, D. (1964). Insect antennae. *Ann. Rev. Entomol.* 9:103-122.
- Schofield, C.J. (1979). The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): A review. *Bull. Entomol. Res.* 69:363-379.
- Schofield, C.J. (1985). Control of Chagas disease vectors. *Br. Med. Bull.* 41:187-194.
- Schofield, C.J. (1994). Triatominae, biología y control. United Kingdom: Eurocommunica Publications, United Kingdom. 79p.
- 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.
- Schofield, C.J. y Upton, C.P. (1978). Brindley's scent-glands on the metasternal scent glands of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev. Brasil Biol.* 38:665-678.
- Schofield, C.J. y Matthews, J.N.S. (1985). Theoretical approach to active dispersal and colonization of houses by *Triatoma infestans*. *J. Trop. Med. Hyg.* 88: 211-222.
- Schofield, C.J.; Lehane, M.J.; McEwan, P.; Catalá, S.S. y Gorla, D.E. (1991). Dispersive flight by *Triatoma sordida*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85(5):676-678.
- Schofield, C.J.; Lehane, M.J.; McEwan, P.; Catalá, S.S. y Gorla, D.E. (1992). Dispersive flight by *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in Argentina. *Med. Vet. Entomol.* 6:51-56.
- Schofield, C.J. y Dolling W.R. (1993) Bedbugs and kissing-bugs (blood-sucking Hemiptera). En: (Lane, R.P. y Crosskey, R.W., eds) *Medical Insects and Arachnids*. Chapman y Hall, London. 483-516.
- Schofield, C.J.; Jannin, J. y Salvatella, R. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 22:583-588.

- Schweigmann, N.J.; Vallve, S.; Muscio, O.; Ghillini, M.; Alberti, A. y Wisnivesky-colli, C. (1988). Dispersal flight by *Triatoma infestans* in an arid area of Argentina. *Med. Vet. Entomol.* 2(4):401–404.
- Schweigmann, N.J.; Pietrokovsky, S.; Conti, O.; Bottazzi, V.; Solarz, N. y Wisnivesky-Colli, C. (1995) Interactions between *Didelphis albiventris* and *Triatoma infestans* in relation to the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 90(6):679-682.
- Schweigmann, N.J.; Pietrokovsky, S.; Conti, O.; Ecosteguy, M.; Botazzi, V.; Solarz, N. y Wisnivesky-Colli, C. (1997) Infection of *Triatoma guasayana*, *Triatoma sordida* and *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi* from naturally infected opossum. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 92(2):151-152.
- Shorey, H.H. (1973). Manipulation of insect pests of agricultural crops, p 353-367. In: Chemical control of insects behaviour. Theory and application (eds. Shorey HH, McKelvey JJ). Jhon Wiley & Sons, New York.
- Singer, T.L. (1998). Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *Am. Zool.* 38:394–405.
- Sjogren, R.D. y Ryckman, R.E. (1966). Epizootiology of *Trypanosoma cruzi* in southwestern North America. Nocturnal flights of *Triatoma protracta* (Uhler) as indicated by collections at black light traps (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *J. Med. Entomol.* 3(1):81-92.
- Soares, R.P.P. y Santero, M.M. (2000). α -Glycerophosphate dehydrogenase activity in flight muscles of triatomine bugs *Panstrongylus megistus* and *Triatoma sordida*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 95:707-709.
- Sokal, R. y Rohlf, F.J. (1981). *Biometry*. Freeman y Co. San Francisco, CA.
- Sordillo, C.M.O. y de Almeida, J.R. (1988). Comportamento de corte e cópula de *Triatoma pseudomaculata* sob condicoes de laboratório. *Sociedade Entomologica do Brasil.* 17:47-69.
- Staddon, B.W. (1979). The scent glands of Heteroptera. *Advances in Insect Physiology.* 14:131-157.

- Steinbrecht, R.A. y Schneider, D. (1980). Pheromone communication in Moths sensory physiology and behavior. In: *Insect Biology in the future* (eds. Locke M, Smith DS). Academic Press, New York.
- Stoffolano, J.G.; Schaubert, E.; Yin, C. M.; Tillman, J. A. y Blomquist, G.J. (1997). Cuticular hydrocarbons and their role in copulatory in *Phormia regina* (Meigen). *J. Insect Physiol.* 43:1065-1076.
- Tamaki, Y. (1985). Sex pheromones. En: Kerkut G.A. y Gilbert L.I. (eds.) *Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology*, vol. IX, pp. 145-191.
- Taneja, J., y Guerin, P.M. (1997). Ammonia attracts the haematophagous bug *Triatoma infestans*: behavioural and neurophysiological data on nymphs. *Journal of Comparative Physiology.* 181(A): 21-34.
- Tonn, R.J., Espínola, H.; Mora, E. y Jiménez, J.E. (1978). Trampa de luz negra como método de captura nocturna de Triatominos en Venezuela. *Bol. Dir. Malaria. San. Amb.* 18:25–30.
- Tregenza, T. y Wedell, N. (1997). Definitive evidence for cuticular pheromones in a cricket. *Anim. Behav.* 54:979-984.
- Van Der Pers, J.N.C. (1980). Comparison of electroantennogram response spectra to plant volatiles in seven species of *Yponomeuta* and in the tortricid *Adoxophyes orana*. *Ent. Exp. Appl.* 30:181-192.
- Van Der Pers, J.N.C. y Minks, A.K. (1997). Measuring pheromone dispersion in the field with the single sensillum recording technique, p 359-371. In: *Insect Pheromone Research: New directions* (eds. Cardé RT, Minks AK) Chapman & Hall, New York, 684 p.
- Vazquez-Prokopec, G.M.; Ceballos, L.A.; Kitron, U.M. y Gürtler, R.E. (2004). Active dispersal of natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in rural northwestern Argentina. *J. Med. Entomol.* 41(4):614–621.
- Veith, J.; Koeniger, N. y Maschwitz, U.W. (1984). 2-Methyl-3-butene-2-ol, a major component of the alarm pheromone of the hornet, *Vespa crabro*. *Naturwissenschaften.* 71:328-329.

- Velázquez Antich, A. (1965). Introducción al estudio de la atracción por el olor en reduviidos hematofagos transmisores de la enfermedad de Chagas Investigaciones de laboratorio con el *Triatoma phyllosoma pallidipennis* (Stal). *Archivos Venezolanos de Medicina e Parasitología Medica*. 5:329-344.
- Velázquez Antich, A. (1968). Atracción por olor en ninfas e adultos de *Rhodnius prolixus*. *Rev. Inst. Med. Trop. y Parasitol.* 10:242-246.
- Vitta, A.C.R. (2009). Comportamento Sexual de *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae: Triatominae). Tesis Doctoral, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. pp.: 166.
- Vitta, A.C.R. y Lorenzo, M.G. (2009). Copulation and mate guarding behavior in *Triatoma brasiliensis*. *J. Med. Entomol.* 46:789-795.
- Vitta A.C.R.; Figueiras, N.A.; Lazzari C.R.; Diotaiuti, L. y Lorenzo, M.G. (2002). Aggregation mediated by faeces and footprints in *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera: Reduviidae), a Chagas disease vector. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 97:865-867.
- Vitta, A.C.R.; Bohman, B; Unelius, R. y Lorenzo, M.G. (2009). Behavioral and electrophysiological responses of *Triatoma brasiliensis* males to volatiles produced in the metasternal glands of females. *J Chem Ecol.* 35:1212–1221.
- Wallbank, B.E. y Waterhouse, D.F. (1970). The defense secretions of Polyzosteria and related cockroaches. *J. Insect Physiol.* 16:2081–2096.
- Ward, J.P. (1981). A comparison of the behavioural responses of the haematophagous bug, *Triatoma infestans* to synthetic homologues of two naturally occurring chemicals (n- and isobutyric acid). *Physiol. Ent.* 6:325-329.
- Ward, J.P. y Baker, P.S. (1982). The tethered flight performance of a laboratory population of *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Bulletin of Entomological Research.* 72:17-28
- Weirauch, C. (2003). Glandular areas associated with the male genitalia in *Triatoma rubrofasciata* (Triatominae, Reduviidae, Hemiptera) and other Reduviidae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98(6):773-776.

- Weirauch, C. (2006) Metathoracic glands and associated evaporatory structures in Reduvidae (Heteroptera: Cimicomorpha), with observation on the mode of function of the metacoxal comb. *Eur. J. Entomol.* 103:97-108.
- West, R.J. y Bowers, W.W. (1994). Factors affecting calling behavior by *Lambdina fiscellaria fiscellaria* (Lepidoptera: Geometridae) under field conditions. *Physiol. Chem. Ecol.* 23:122-129.
- WHO. World Health Organization (2006). Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. *OPS/HDM/CD.* 425-06.
- Wiesinger, D. (1956). Die Bedeutung der Umweltfaktoren für den Saugakt von *Triatoma infestans*. *Acta Tropica.* 13:97-141.
- Wigglesworth, V.B. (1972). The principles of insect physiology. Chapman y Hall, London.
- Wisnivesky-Colli, C. (1993). La importancia del peridomicilio en un programa de eliminación de *Triatoma infestans*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 26:55-63.
- Wisnivesky-Colli, C.; Schweigmann, N.J.; Alberti, A.; Pietrokovsky, S.M.; Conti, O.; Montoya, S.; Riarte, A. y Rivas, C. (1992). Sylvatic American trypanosomiasis in Argentina. *Trypanosoma cruzi* infection in mammals from the Chaco forest in Santiago del Estero. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 86:38-41.
- Wisnivesky-Colli, C.; Gürtler, R.E.; Solarz, N.D.; Schweigmann, N.J.; Pietrokovsky, S.M.; Alberti, A. y Flo, J. (1993). Dispersive flight and house invasion by *Triatoma guasayana* and *Triatoma sordida* in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 88:27-32.
- Zar, J.H. (1984). Biostatistical Analysis, Prentice-Hall, New Jersey. 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.
- Zera, A.J. y Denno, R.F. (1997). Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 207-230.