

## Tesis de Posgrado

# Fisiología del comportamiento de triatoma infestans, (KLUG, 1834) (heteróptera: Reduviidae), orientación térmica

Lazzari, Claudio Ricardo

1990

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Lazzari, Claudio Ricardo. (1990). Fisiología del comportamiento de triatoma infestans, (KLUG, 1834) (heteróptera: Reduviidae), orientación térmica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2336\\_Lazzari.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2336_Lazzari.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Lazzari, Claudio Ricardo. "Fisiología del comportamiento de triatoma infestans, (KLUG, 1834) (heteróptera: Reduviidae), orientación térmica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2336\\_Lazzari.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2336_Lazzari.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

233

R. Lazzari

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

FISIOLOGIA DEL COMPORTAMIENTO DE *TRITOMA INFESTANS* (KLUG, 1834)  
(HETEROPTERA: REDUVIIDAE), ORIENTACION TERMICA

Autor: Claudio Ricardo Lazzari

Director: Dr. Josué Antonio Núñez

Laboratorio de Fisiología del Comportamiento  
Departamento de Cs. Biológicas  
F.C.E.N. - U.B.A.

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

1990

2336  
y. 2

## **Agradecimientos**

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a mi director y maestro, el Dr. Josué A. Núñez, por sus consejos, constante estímulo y horas dedicadas a transmitirme sus conocimientos de la Fisiología del Comportamiento de Insectos. Al Prof. Dr. Deszö Varjú por haberme permitido trabajar en su laboratorio de la Universidad de Tübingen (RFA) y por sus consejos y enseñanzas. A Jochen Zeil, Hans-Jürgen Dahmen, Martina Wicklein, Klaus Riede y demás integrantes de la Cátedra de Biocibernética de la Universidad de Tübingen por su ayuda, dedicación y discusión crítica de algunos resultados. A Teresita Insausti y Flavio Roces por la lectura crítica y corrección de las diferentes versiones del manuscrito, y por la discusión de los resultados, de la que han surgido algunos de los conceptos aquí vertidos. A Marcelo Aizen por sus consejos y ayuda en el análisis estadístico de los datos. A la F.C.E.N., el CONICET y el Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD), por los cargos y becas que me permitieron realizar este trabajo. Al Dr. Eduardo Zerba y demás integrantes del Centro de Investigaciones sobre Plagas e Insecticidas (CIPEIN) por su constante interés, estímulo y valiosa ayuda en los comienzos de este trabajo. A la Dra. Elsa E. Segura por haberme permitido trabajar durante algún tiempo en el Instituto "Fatala Chabén". A la Dra. Olga Brioux de Mandirola, quien puso gentilmente a mi disposición el espectrofotómetro infrarrojo del Dpto. de Físico-Química de la F.C.E.N.. A Alejandra Kenigsten, Alicia Lorenzo, Marcela Charbuki, Alejandro Farias, Martín Giurfa, Walter Farina y Pablo Guerestein por su amistad, ayuda y consejos. A mi esposa Teresita por su amor, infinita paciencia, comprensión y asistencia en la cría de las vinchucas. A mis padres y hermanas. A Concepción y Félix.

**A Tere**

## Indice

	pag.
<b>1. Introducción.....</b>	<b>4</b>
1a. Introducción general.....	4
1b. Introducción al comportamiento de los Triatominos.....	5
1bi. Agregación.....	6
1bii. Defensa.....	7
1biii. Comportamiento sexual.....	9
1biv. Comunicación intraespecífica.....	10
1bv. Dispersión.....	11
1bvi. Organización temporal del comportamiento.....	13
1bvii. Respuesta a estímulos visuales.....	14
1bviii. Búsqueda y reconocimiento del alimento.....	15
1c. El sentido térmico.....	17
1ci. Sentido térmico y orientación espacial.....	19
1cii. Sentido térmico y reconocimiento del alimento....	22
1ciii. Sentido térmico y orientación temporal.....	23
1civ. Las sensilias termorreceptoras.....	25
1d. Objetivos del trabajo.....	27
<b>2. Cría de las vinchucas en el laboratorio.....</b>	<b>29</b>
2a. El alimentador artificial.....	30
2b. Preparación y conservación de la sangre.....	32
2c. Claves accesorias en el alimentador artificial.....	34
2ci. Materiales y métodos.....	34
2cii. Resultados.....	35
<b>3. Orientación térmica y búsqueda de alimento.....</b>	<b>37</b>
3a. La respuesta a estímulos térmicos.....	37
3b. Sensibilidad e intervalo de respuesta.....	39
3bi. Primera serie experimental.....	40
3bii. Segunda serie experimental.....	43
3biii. Resultados.....	45

3c.	Efecto del ayuno en la respuesta a estímulos térmicos...	45
3ci.	Resultados.....	49
3d.	Estimación de la temperatura de fuentes distantes.....	49
3di.	Materiales y métodos.....	49
3dii.	Resultados.....	52
3e.	¿Perciben las vinchucas la radiación IR del hospedador?..	56
3ei.	Materiales y métodos.....	57
3eii.	Resultados.....	59
<b>4.</b>	<b>Temperatura de la sangre y comportamiento alimenticio.....</b>	<b>64</b>
4a.	Materiales y métodos.....	65
4b.	Resultados.....	68
<b>5.</b>	<b>Preferencia térmica.....</b>	<b>74</b>
5a.	Materiales y métodos.....	74
5b.	Resultados.....	77
5bi.	Termopreferencia.....	77
5bii.	Preferencia térmica para la oviposición.....	80
5biii.	Orientación en un gradiente de humedad relativa.....	80
<b>6.</b>	<b>Clave térmica y orientación temporal.....</b>	<b>83</b>
6a.	Materiales y métodos.....	84
6b.	Resultados.....	87
6bi.	Temperatura ambiente y actividad circadiana.....	87
6bii.	¿Sincronizan las vinchucas ritmos térmicos?.....	93
6biii.	Entrenamiento a dos <i>Zeitgeber</i> simultáneos.....	98
6biv.	La respuesta de insectos desantenados.....	98
<b>7.</b>	<b>Las sensilias termorreceptoras.....</b>	<b>104</b>
7a.	Morfología funcional.....	104
7b.	Electrofisiología.....	111
7bi.	Métodos de estimulación.....	111
7bii.	Registro extracelular en la cueva de cerdas.....	113
7biii.	La respuesta global: el electroantenograma.....	117

<b>8. Discusión de los resultados y su posible aplicación.....</b>	<b>123</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>149</b>

# CAPITULO 1

## Introducción

### 1a. INTRODUCCION GENERAL

En un entorno no homogéneo, sujeto a cambios físicos y químicos, los organismos deben extraer información relevante para su subsistencia. Es así como órganos sensoriales especializados toman selectivamente información del ambiente (*recepción*), la que es procesada en el sistema nervioso central (*percepción*) para generar una respuesta acorde. La fisiología sensorial comparada busca comprender las sensaciones de los diferentes organismos en su medio, ya que ellos experimentan universos sensoriales de modalidades muy diversas. Sólo mediante el análisis de los elementos constituyentes de las estaciones de recepción y procesamiento de la información es posible obtener un panorama completo de las facultades sensoriales de un animal y de la funcionalidad y evolución de las mismas.

El enfoque de la fisiología del comportamiento analiza las relaciones funcionales entre los elementos que constituyen el sistema que media entre una entrada sensorial y la salida de comportamiento. En un extremo de la cadena encontramos al *estímulo*, constituido por un cambio del estado físico o químico del medio ambiente o en el propio organismo. Dicho cambio puede ser detectado por un *receptor*, constituido por un órgano o célula sensorial y dar lugar, en la salida, a una reacción de comportamiento reconocible por un observador.

En todos los casos, el método de la fisiología del comportamiento se basa en considerar al animal como un sistema constituido por cajas negras cuya función y conexiones deben deducirse del análisis de las relaciones entrada-salida. Según el fundador y principal representante de esta escuela, el alemán Erich von Holst (1953), el animal debe permanecer intacto y en condiciones tan naturales como sea posible, respondiendo con su



comportamiento a las preguntas del experimentador, sin notar que es parte de un experimento.

El análisis cuantitativo detallado de las relaciones entrada/salida en los animales requiere del desarrollo de dispositivos y métodos de estimulación y de registro del comportamiento adecuados al animal y al problema en estudio. En muchos casos se trata de estudiar la respuesta a estímulos de los cuales nosotros como hombres carecemos de una vivencia directa. Debido a que no poseemos ciertos sentidos (e.g. electrorrecepción o sentido magnético), otros los tenemos poco desarrollados (e.g. sentido térmico u olfato), u operan en intervalos muy distintos a los de otros organismos (e.g. recepción de ultrasonidos o infrasonidos), se requieren métodos de medida que amplíen nuestra capacidad de percepción.

La información obtenida de esta manera se complementa con el análisis según el enfoque de la fisiología clásica o "fisiología de órganos" (von Holst, 1953) y del análisis morfológico, para brindar un cuadro completo de las capacidades sensoriales de un animal.

#### 1b. INTRODUCCION AL COMPORTAMIENTO DE LOS TRIATOMINOS

La importancia de los Reduviidae hematófagos como transmisores del Mal de Chagas ha sesgado, frecuentemente, la investigación de su biología hacia los aspectos relacionados con su papel de vectores de la enfermedad. Es así que no se ha prestado suficiente atención a problemas básicos relativos a la biología general de insectos.

Como paradójica contrapartida, el cúmulo de conocimiento básico disponible sobre ciertos temas que han sido intensivamente investigados en las vinchucas, como el control del proceso de muda (Wigglesworth, 1964), las propiedades mecánicas de la cutícula (Núñez, 1963), la regulación de la excreción (Maddrell, 1971) y

varios otros, contrasta con el escaso aprovechamiento del mismo con fines aplicados. Es así que, la investigación básica y la aplicada de la biología de las vinchucas parecen, con frecuencia, avanzar por carriles diferentes que raramente se tocan para complementarse. El ejemplo más destacado de dicha complementación es quizás la optimización de la cría en el laboratorio mediante alimentación artificial (Núñez & Segura, 1987; Núñez & Lazzari, 1990).

En este contexto, uno de los aspectos menos conocidos es el comportamiento de las vinchucas, cuyo estudio se ha llevado a cabo, generalmente, bajo el prisma de la aplicación al control. Lamentablemente, la importancia de muchos de los hallazgos y su aplicabilidad se ven relativizados debido a la falta de la rigurosidad experimental necesaria.

Los trabajos clásicos de Hase (1932, 1933), Wigglesworth & Gillet (1934a, b), Wiesinger (1956) y Kraus (1957) fueron los primeros en utilizar el método experimental y de ellos proviene gran parte de nuestro conocimiento actual. Las revisiones recientes de Schofield (1979) y Núñez (1987) actualizan aquellos conocimientos y ponen en evidencia la enorme cantidad de preguntas que permanecen abiertas.

Se justifica, entonces, una revisión breve de los trabajos recientes, a fin de facilitar la interpretación de los resultados que se presentarán en este estudio.

#### 1bi. Agregación

Durante el día las vinchucas permanecen normalmente ocultas en un estado de inmovilidad denominado *akinesis*. Durante este estado los insectos permanecen en estrecho contacto con el sustrato y con otros miembros de la población (*tigmotaxis*), de modo que normalmente se los encuentra agregados en grietas y superficies rugosas. Dicho comportamiento, eleva el umbral de respuesta a otros estímulos (Núñez, 1987). La agregación de los insectos en lugares protegidos estaría mediada, o por lo menos

facilitada. por este comportamiento. El estado de agregación/dispersión de las vinchucas muestra una variación diaria y una dependencia de la condición de ayuno de los insectos (Lazzari, no publ.).

Feromonas de agregación que atraerían a ninfas ayunadas e inmovilizarían a ninfas alimentadas estarían presentes en las heces recién depositadas por las ninfas (Schofield & Patterson, 1977). Schofield (1979) sugiere que las heces depositadas en las cercanías del hospedador podrían atraer a insectos ayunados hacia el hospedador. En nuestro laboratorio, Kenigsten & Lorenzo (com. pers.) hallaron que las heces secas también ejercen un efecto de atracción sobre las ninfas. En este caso, el significado de las posibles feromonas de agregación podría ser otro, ya que las heces secas se encuentran en mayor cantidad en los refugios naturales. Allí se encuentran otros individuos de la misma especie (entre ellos pareja sexual) y también los simbiontes intestinales necesarios, pero no alimento.

Comportamientos de coprofagia y de canibalismo han sido observados en el laboratorio. Dichos comportamientos podrían contribuir a la transmisión de *Trypanosoma cruzi* y *Blastocrithidia triatomae* entre los individuos de una población de vinchucas (Brumpt, 1914; Schaub, 1988; Schaub et al., 1988).

#### lbii. Defensa

Akinesis, tigmotaxis y escototaxis (preferencia por lugares oscuros) pueden considerarse mecanismos de protección pasiva contra eventuales predadores durante los periodos de inactividad.

Las vinchucas disponen también de mecanismos activos de defensa, tales como secreciones repulsivas, feromonas de alarma y estridulación. En varias especies de Triatominae se ha descrito, además, un comportamiento de "camuflaje", i.e. los insectos cubren su cuerpo con tierra y detritos y logran confundirse con el entorno (Zeledón et al., 1973).

Cuando los adultos son disturbados emiten una secreción, elaborada en las glándulas de Brindley, cuyo principal componente es el ácido isobutírico (Games et al., 1974). Esta sustancia es corrosiva y actuaría como repelente de posibles predadores (Schofield, 1979). A bajas concentraciones, el ácido isobutírico parece actuar como feromona de alarma para otros miembros de la población (Ward, 1981).

Al ser tomadas con pinzas, tanto adultos como ninfas comienzan a estridular con el rostro (Hase, 1933). El significado biológico de la estridulación aguarda todavía ser aclarado. Dado que una función defensiva de la estridulación contra diferentes tipos de predadores ha sido demostrada en otros insectos, incluidos algunos Heteroptera (Leston, 1957; Masters, 1979), es posible atribuirle también en las vinchucas una función similar, al menos en los estadios ninfales.

El comportamiento de escape de *Triatoma infestans* desencadenado por la vía visual, presenta características no observadas en ningún otro insecto. Cuando un objeto se acerca hacia una vinchuca por encima del horizonte, ésta huye manteniendo dicho objeto en una posición relativamente constante en su retina de unos 120° respecto al eje longitudinal del cuerpo. Esta reacción de escape, que puede ser considerada subóptima desde el punto de vista de la geometría de la situación, permite a los insectos mantener al predador potencial dentro del campo visual durante la huida. Un ángulo mayor, aunque geoméricamente ventajoso, haría que el predador pudiera ubicarse fácilmente en la región ciega posterior del insecto, más allá de los 140°. La ausencia de dicha reacción de fijación en el caso de objetos que ocupan el campo visual debajo del ecuador del ojo demuestra una especialización funcional del ojo compuesto relativa a este comportamiento (Lazzari & Varjú, 1989, 1990).

#### 1biii. Comportamiento Sexual

Lima et al. (1986) y Rojas et al. (1988) describieron el comportamiento de apareamiento de *Pastrongylus megistus* y de *Triatoma mazzottii* respectivamente, correspondiendo ambos a un modelo general en Triatominae. Nuestros ensayos realizados bajo condiciones controladas de laboratorio y utilizando insectos cuidadosamente seleccionados y controlados, demuestran una fecundación poliándrica de las hembras.

Nuestras observaciones indican que cuando un macho encuentra una hembra receptiva, la sostiene por el dorso y le transfiere un espermátforo, como describieron los autores citados anteriormente. Si la pareja se encuentra aislada de otros individuos, al finalizar la cópula el macho frota repetidas veces la parte ventral de su abdomen contra el dorso de la hembra (Lazzari, no publ.). Ni este comportamiento, que aparenta un marcado químico, ni la reciente fecundación, impiden que esa hembra vuelva a copular inmediatamente y reciba espermátforos de otros machos (en nuestros experimentos, de hasta 5 machos sucesivos).

Si en proximidad de una pareja que comienza a copular se encuentran otros machos, los mismos se agrupan rápidamente sobre la pareja. Los machos copulan sucesivamente uno tras otro, permaneciendo todos juntos hasta que el último transfiere su espermátforo a la hembra.

Las hembras, por su parte, pueden volver a copular en los días sucesivos. En cópulas múltiples sucesivas, el último espermátforo recibido es expulsado inmediatamente después de la separación de la pareja, ignorándose si algunos espermatozoides llegan a alcanzar las espermatecas. Transcurridos aproximadamente siete días desde la primera cópula, intervalo en el que la hembra está lista para oviponer, rechaza los intentos de cópula de otros machos intentando huir y estridulando con el rostro (Lazzari, no publ.).

#### 1biv. Comunicación Intraespecífica

La aparición en los adultos de Triatominae de glándulas metatorácicas y de Brindley trae aparejada la aparición de sustancias aparentemente defensivas y de alarma, ausentes en las ninfas. Por otra parte, en nuestro laboratorio fueron hallados en los Triatominae adultos dos nuevos órganos estridulantes, i.e. timbal y stridulitrum-plectrum alar. Núñez (com. pers.) registró la actividad de un órgano tipo timbal durante el comportamiento sexual de *T. infestans* y *Rhodnius prolixus*. La presencia de dicho órgano ya había sido descrita en otros Geocorisae (Gogala, 1984a). Estas nuevas adquisiciones revelan la complejidad de un sistema de comunicación intraespecífico del cual nada conocemos. Por otra parte, el surco estridulatorio podría asumir nuevas funciones, específicas del estado adulto. Observaciones de Readio (1927) le atribuyen a la estridulación con el rostro una función de rechazo de la cópula en hembras. Experimentos realizados en nuestro laboratorio, confirman dicha observación. Como se dijo anteriormente, una hembra puede copular repetidas veces. Sin embargo, luego de transcurridos siete días de la primera cópula, cuando las hembras se encuentran listas para oviponer, rechazan los intentos de cópula de los machos estridulando con el rostro.

Las señales emitidas por las vinchucas han sido registradas e interpretadas como ondas de presión que viajan a través del aire, midiéndose frecuencias de hasta 100 kHz (Schofield, 1977). Sin embargo, las vinchucas carecen de órganos capaces de recibir señales sonoras de las frecuencias medidas, i.e. tímpanos. Los análisis biofísicos de la comunicación acústica en muchos insectos, incluidas las chinches terrestres (Geocorisae), demuestra que el canal de comunicación es la vibración del sustrato, de los cuerpos de los interactuantes o de la masa de aire que rodea al emisor y no las ondas sonoras que viajan por el aire (Leston & Pringle, 1963; Gogala, 1984a, b; Michelsen 1983). Las vinchucas disponen de órganos subgenuales, de Johnston y de tricobotrias que podrían operar en la frecuencia de las señales

vibratorias. El problema de la comunicación vibratoria en las vinchucas merece ser investigado tomando como base los estudios de Gogala y colaboradores en especies relacionadas.

La presencia de feromonas sexuales liberadas por parejas en cópula que atraerían y "excitarían" a los machos ha sido señalada en *R. prolixus* (Baldwin et al., 1971) y en *T. mazzoti* (Ondarza et al. 1986, 1987). La aparente ausencia de tales feromonas en *T. infestans* fue comunicada por Schofield & Moreman (1976). Nuestros experimentos con esta especie sugieren, sin embargo, la existencia de aquellas sustancias. Como se señaló anteriormente, sobre una pareja en cópula se agregan inmediatamente numerosos machos, los que copulan uno tras otro con la hembra. La función de esta feromona permanece oscura hasta el presente, pero dado que se libera durante la cópula no parece intervenir en la atracción a distancia de los sexos. Baldwin et al. (1971) y Schofield (1979) concluyen que su valor como atractivo sería menos importante que su efecto "afrodisíaco". La existencia de dicha feromona sexual y su posible asociación a la fecundación poliándrica sugiere que ciertas ventajas adaptativas podrían originarse de la fecundación múltiple de las hembras (Thornhill & Alcock, 1983).

Respecto a la atracción a distancia entre los sexos, los experimentos de Velásquez Antich (1968) y de Núñez (1987) sugieren que las hembras de *R. prolixus* serían atraídas por sustancias liberadas por los machos, hipótesis que no ha sido ensayada experimentalmente en *T. infestans*.

#### 1bv. Dispersión

El vuelo espontáneo de las vinchucas es un comportamiento muy raramente observado en el laboratorio. Sin embargo, experimentos realizados induciendo a los insectos a volar muestran que los mismos pueden hacerlo durante períodos de tiempo relativamente largos (Lehane & Schofield, 1976, 1982; Gringorten & Friend, 1979; Ward & Baker, 1982). Lehane & Schofield (1982) observaron que la mayor actividad de vuelo ocurre al comienzo de la noche y que la

motivación para volar aumenta con el grado de ayuno de los insectos. Ward & Baker (1982) obtuvieron en *T. infestans* vuelos de hasta 2h 40 min de duración. Las vinchucas podrían entonces dispersarse activamente a muchos kilómetros de distancia.

Schofield (1979), basado en los resultados de captura de vinchucas mediante trampas de luz, sugiere que esta "*attraction to light*" podría ser el mecanismo de colonización de nuevas viviendas. Dado que los habitats selváticos carecen de fuentes de luz artificial, este autor postula la necesidad de mecanismos específicos de orientación relacionados con la selección de cada tipo de hábitat. Específicamente, un cambio de signo de la reacción fototáctica, según se trate de colonizar un ambiente selvático o uno rural. Dicho comportamiento, sin embargo, podría también explicarse considerando un problema general a que se ven enfrentados muchos animales con el advenimiento de las fuentes artificiales de luz. Aunque una fuente de luz artificial pueda atraer insectos que eventualmente permanezcan en una vivienda, no implica necesariamente un comportamiento de orientación, sino que podría tratarse de un fenómeno de "desorientación". Es sabido que muchos animales, incluidos los insectos, utilizan fuentes naturales de luz, como el sol o la luna, para orientarse. Mantener un ángulo constante respecto a ellos (*menotaxis*) permite sostener un curso de orientación con un error despreciable, ya que la distancia a que se encuentra la fuente-referencia es muy grande (Jander, 1963). Con la aparición en el ambiente de fuentes de luz artificial tanto o más luminosas que las naturales, aparecen los errores fatales, especialmente en los animales nocturnos. Dado que las fuentes de luz artificial se encuentran a distancias pequeñas, en comparación con, por ejemplo, la luna, el mantener un ángulo constante respecto a ellas da lugar a que la trayectoria deje de ser rectilínea. Si el animal se orienta con un ángulo de  $90^\circ$  respecto de la fuente, describirá un círculo. Si el ángulo es mayor de  $90^\circ$  describirá una espiral, cuyo centro es la fuente, alejándose de la misma. Finalmente, si el ángulo de orientación



elegido es menor de 90°. describirá también una espiral con centro en la fuente, pero acercándose a ella (von Buddenbrock, 1952). En este mecanismo de "desorientación" residiría la eficiencia de captura de las trampas de luz y no en la orientación fototáctica positiva de insectos que normalmente prefieren la oscuridad. Si los Triatominae son capaces de orientación menotáctica no ha sido aún investigado, pero dicha "atracción a la luz" bien puede ser un indicio en este sentido.

#### 1bvi. Organización Temporal del Comportamiento

La actividad locomotora de las vinchucas en relación a ciclos de iluminación ha sido analizada por Wiesinger (1956) y Settembrini (1984) en *T. infestans* y por Constantinou (1979, 1984a) y Núñez (1982, 1987) en *R. prolixus*. Ambas especies restringen su actividad a la escotofase, desplegando *R. prolixus* la máxima actividad durante la primera hora de oscuridad y *T. infestans* durante la segunda. Esta diferencia en la fase del ciclo de actividad circadiana fue correlacionada por Núñez (1987) con la mayor sensibilidad aparente de *T. infestans* a ser disturbada por la luz en comparación a *R. prolixus*. Luego de este pronunciado máximo de actividad que aparece al comenzar la fase oscura o poco después, la actividad disminuye gradualmente hasta el amanecer, donde se interrumpe la actividad luego de observarse un pico menor. Durante el día los insectos permanecen inactivos. A pesar de la ocurrencia del segundo pico de actividad al final de la escotofase, los autores mencionados consideran el patrón de actividad de las vinchucas como unimodal, es decir, con un solo máximo de origen endógeno, que se observa al comienzo de la noche.

Siquiendo las llamadas reglas de Aschoff (Pittendrigh, 1960) para animales de hábitos nocturnos, en *T. infestans* el período espontáneo de oscilación ( $\tau$ ) del pico del atardecer es mayor en condiciones de iluminación constante (28h 6m) que de oscuridad constante (24h 58m) (Settembrini, 1984). El período espontáneo de

oscilación puede, sin embargo, sufrir variaciones espontáneas (Saunders, 1982).

El nivel de actividad de *R. prolixus* aumenta con el ayuno y con la presencia en el ambiente de olores de un hospedador, prolongándose incluso la actividad a la fotofase (Núñez, 1982, 1987).

Además de ritmos circadianos de actividad locomotora (Wiesinger, 1956; Constantinou, 1979; 1984a; Núñez, 1982; Settembrini 1984), las vinchucas exhiben ritmos diarios de oviposición (Constantinou, 1979, 1984b; Ampleford and Davey, 1989), de actividad de vuelo (Lehane & Schofield, 1982), de ecdisis (Ampleford and Steel, 1982; Ampleford, 1985), de agregación (Lazzari, no publ.), de preferencia térmica (ver capítulo 5), de eclosión del huevo (Lazzari, 1990) y de atracción hacia la luz beta (Bertram, 1971).

#### 1bvii. Respuesta a estímulos visuales

Varias reacciones evocadas por señales visuales han sido analizadas en triatominos: atracción hacia la luz beta (Bertram, 1971), actividad eléctrica de los fotorreceptores (Schofield, 1975), comportamiento fototáctico y actividad frente a luz de distintas longitudes de onda (Ward & Finlayson, 1982), escape y especialización funcional del ojo compuesto (Lazzari & Varjú, 1989, 1990) y fotorreceptores implicados en la sincronización circadiana (Constantinou, 1984a). Los análisis de la sensibilidad espectral de las vinchucas utilizando métodos electrofisiológicos (Schofield, 1975) y de análisis del comportamiento (Ward & Finlayson, 1982) sugieren un intervalo de sensibilidad que no incluiría la región del azul. Paradójicamente, la composición espectral de la luz nocturna y de los lugares protegidos de la luz solar directa está fuertemente sesgada hacia aquellas longitudes de onda. Según los resultados de aquellos autores, las vinchucas serían ciegas a la luz que domina su ambiente visual, una implicancia que hace que el problema deba ser reinvestigado. Por

otra parte, Sjogren & Ryckman (1966), hallaron que las trampas de luz negra (UV) son un efectivo medio de captura de triatominos, lo que revela cierta sensibilidad más allá del azul.

El análisis del comportamiento visual en el contexto de la búsqueda de alimento, siguiendo el modelo de la mosca tse-tse (Brady, 1972), aún no fue realizado en triatominos. La visión sólo parece jugar un papel en dicho comportamiento cuando la entrada sensorial antenal es abolida por antenectomia (Wigglesworth & Gillet, 1934a). *Rhodnius prolixus* desantennados persiguen e intentan picar objetos que se muevan en su proximidad, un comportamiento nunca observado en insectos normales. Este hecho es muy interesante por sus implicancias desde el punto de vista de la integración de las diferentes entradas sensoriales, y también desde el punto de vista evolutivo, dado el carácter de "cazadores visuales" de otros Reduviidae.

Constantinou (1984a) postuló la existencia de fotorreceptores extrarretinales en *R. prolixus*, implicados en la sincronización de la actividad circadiana frente a ritmos de iluminación. El análisis detallado de las figuras y tablas de datos que presenta este autor en su artículo hacen necesaria la repetición de los ensayos, ya que no apoyan aquella interpretación.

#### lbviii. Búsqueda y reconocimiento del alimento

La orientación de los insectos hematófagos hacia el hospedador está guiada por claves de distinta modalidad. Cuando se encuentran a algunos metros de la fuente de alimento, alertados por la presencia de un hospedador potencial, los insectos utilizarían corrientes de aire para orientarse (Kennedy, 1977). El umbral para desencadenar dicha orientación anemotáctica disminuye con la presencia en el aire de ciertos compuestos químicos como CO<sub>2</sub> o ácido láctico (Núñez, 1982, 1987). Siguiendo corrientes de aire transportadoras de olores, los insectos pueden alcanzar la zona en que el gradiente de concentración de moléculas odoríficas puede ser percibido por los insectos (quimiotaxis). En

proximidad, el calor emitido por un animal de sangre caliente parece ser la clave necesaria y suficiente para la orientación y para desencadenar la respuesta de picar. Las vinchucas no parecen ser una excepción a este modelo general, el que ha sido objeto de revisión por Núñez (1987).

El reconocimiento del alimento se lleva a cabo a través de compuestos fagoestimulantes presentes en la dieta, jugando la temperatura un papel secundario (Friend & Smith, 1977; ver capítulo 4). En *R. prolixus* se ha descrito la respuesta a un gran número de compuestos nucleótidos fagoestimulantes, midiéndose dosis efectivas (ED<sub>50</sub>) que van desde concentraciones  $3,8 \times 10^{-6}$  M para el ATP hasta  $0,63 \times 10^{-3}$  M para el AMP (Friend & Smith, 1977). Otros compuestos como el 2,3-difosfoglicerato y el ácido fítico también son potentes estimulantes de la ingestión, con valores de ED<sub>50</sub> menores a 10  $\mu$ M (Smith & Friend, 1982). La sensibilidad a los fagoestimulantes de *R. prolixus*, aumenta en forma lineal con el grado de ayuno de los insectos.

En resumen, el avance en nuestro conocimiento del comportamiento de las vinchucas es relativamente lento si se lo compara con las investigaciones realizadas en otros insectos de importancia sanitaria equivalente. Dos revisiones recientes del tema comienzan resaltando el problema: "*Research on the behaviour of the Triatominae has been relatively neglected*" (Schofield, 1979); "*General features of the behavior of triatomine bugs are known from descriptions of observations (...) as they are based on untested and even unrecognized assumptions, they are only of preliminary value and mostly to be confirmed by future work*" (Núñez, 1987). Es así que comenzamos nuestro estudio del comportamiento de *T. infestans* analizando una de las claves más importantes en la búsqueda de alimento, que ha sido muy poco investigada en los insectos, i.e. la clave térmica.

## 1c. EL SENTIDO TERMICO

El intercambio de calor con el medio ambiente puede afectar directamente los procesos fisiológicos que ocurren en el cuerpo de un organismo, como el metabolismo, crecimiento o desarrollo. Muchos procesos pueden incluso verse totalmente interrumpidos por efecto de temperaturas altas o bajas.

El flujo de energía en forma de calor puede, además, ejercer su efecto indirectamente, a través de los termorreceptores. El sentido térmico, operando en un nivel de sensibilidad mucho mayor que el organismo como un todo, permite al animal orientarse en el espacio según la temperatura del ambiente, o hacia un objeto más frío o más caliente que el entorno. Por otra parte, permite ajustar los relojes internos según las variaciones térmicas regulares en el ambiente.

En comparación con otras modalidades sensoriales, como visión u olfacción, el sentido térmico ha sido relativamente poco investigado. Los únicos estudios más o menos intensivos se refieren a los termorreceptores cutáneos de los mamíferos y los termorreceptores de las serpientes de las familias Crotalidae y Boeidae.

En algunos insectos se ha descrito con gran detalle la ultraestructura de los termorreceptores y las características de la respuesta electrofisiológica (Loftus, 1978; Loftus & Cobière-Tichané, 1981; Cobière-Tichané & Loftus, 1983; Altner & Loftus, 1985). Sin embargo, son muy pocos los autores que han intentado incursionar más allá de este primer nivel de recepción, analizando aspectos de la percepción, mediante estudios de comportamiento.

La recepción de un estímulo térmico podría estar mediada por cualquiera de los diferentes mecanismos implicados en el intercambio de energía en forma de calor que reconoce la física.

La *conducción* de calor a través del aire genera un gradiente de temperatura, dependiente de la diferencia entre la temperatura de la fuente y la del ambiente, que podría ser seguido por el

animal del mismo modo que algunos organismos siguen gradientes de compuestos químicos mediante verdadera quimiotaxis.

El intercambio de calor entre un cuerpo caliente y el aire que lo rodea da lugar a un aumento de la temperatura de este último, disminuyendo de este modo su peso específico. Este aire, más caliente y liviano que el resto, se elevará poniendo en movimiento a toda la masa de aire restante, proceso que se denomina *convección*. Las corrientes de convección proporcionarían también una clave que podría ser utilizada por los animales para orientarse térmicamente.

Un tercer mecanismo implicado en el intercambio de calor entre dos cuerpos está relacionado con el flujo de energía en forma de ondas electromagnéticas entre ambos cuerpos, denominado *radiación*. Las longitudes de onda implicadas corresponden a las regiones de infrarrojo medio y lejano, es decir mayores de 1  $\mu\text{m}$ . Dicha clave también es susceptible de ser percibida por los animales y utilizada para la orientación hacia una fuente caliente.

Cuál o cuales de estos tres mecanismos es utilizado por los distintos animales que se orientan mediante la clave térmica es una pregunta de la fisiología sensorial comparada que ha sido relativamente poco estudiada.

Si consideramos se carácter de principal vector domiciliario de la enfermedad de Chagas en nuestro país y lo poco que se conoce de su comportamiento, concluiremos que *T. infestans* posee una doble significancia como modelo experimental. Conocida la utilización de la clave térmica en su búsqueda de alimento, la posibilidad de la cría masiva en el laboratorio y otras particularidades, las vinchucas constituyen un sistema modelo adecuado para el análisis del sentido térmico. Por otra parte, debido a la importancia sanitaria de esta especie, todo aporte a su conocimiento adquiere valor de aplicabilidad potencial.

1ci. Sentido térmico y orientación espacial

El ejemplo de orientación en el espacio utilizando la clave térmica mejor estudiado, y que constituye la primera evidencia de percepción de calor radiante en un animal, es el de las serpientes de las familias Crotalidae y Boeidae, las cuales predan sobre animales de sangre caliente (Bullock & Cowles, 1952; Hartline, 1972). Estos animales poseen órganos termorreceptores sensibles a la radiación infrarroja (IR) emitida por el cuerpo de un animal homeotermo y dicha información es suficiente para localizar a sus presas.

La hipótesis de que los insectos poseerían receptores de radiación IR ha sido propuesta en diversas oportunidades (Callahan 1965a, b; Hsiao & Susskind, 1970; Hsiao, 1972). Mediante el análisis de las propiedades dieléctricas de la cutícula y de las sensillas antenales, dichos investigadores concluyen que los insectos poseen estructuras físicamente capacitadas para la recepción IR. De hecho, la preferencia por lugares irradiados con radiación IR, e.g. radiación solar, fue demostrada en algunos insectos (Vielmetter, 1956, 1958; Magnum & Callahan, 1968; Gogala, 1978; Remmert, 1985). Sin embargo, la capacidad de orientarse hacia fuentes distantes emisoras de radiación IR sólo ha sido establecida y caracterizada en el bupréstido *Melanophila acuminata*. Este coleóptero, que coloniza bosques incendiados, es capaz de detectar incendios forestales desde muchos kilómetros de distancia por su emisión de radiación IR, a través de dos órganos termorreceptores ubicados en el tórax (Evans, 1964, 1966a, b).

Dado que el calor emitido por el cuerpo de un hospedador homeotermo constituye una de las claves más importantes para su orientación, los insectos hematófagos constituyen uno de los modelos más adecuados para el estudio del sentido térmico. En estos insectos el problema de la orientación hacia el hospedador utilizando la clave térmica ha recibido cierta atención, pero los resultados son contradictorios. En principio, tanto corrientes de convección como gradientes de aire caliente y calor radiante

podrían estar implicados en dicha orientación. Hasta el presente no pudo hallarse evidencia experimental a favor de la percepción IR (Wigglesworth & Gillet, 1934a, b; Peterson & Brown, 1951; Friend & Smith, 1977; Galun, 1977; Núñez, 1987), mientras que las corrientes de convección, parecen estar implicadas únicamente en el transporte de olores (Kahn et al., 1968; Hocking, 1971). En vista de estos hechos, en la bibliografía se ha aceptado normalmente que el gradiente de aire caliente entre la fuente y el insecto constituiría la clave más importante para la orientación térmica. Dicha creencia generalizada no proviene de evidencia experimental directa sino simplemente "por eliminación". Este interrogante continúa entonces aún abierto y permanece como una de las preguntas más importantes de la fisiología sensorial de los insectos hematófagos.

El reconocimiento de la importancia de la clave térmica en la orientación de las vinchucas proviene del trabajo clásico de Wigglesworth & Gillet (1934a, b). Trabajando con *R. prolixus*, dichos autores midieron la respuesta de los insectos a una fuente de calor, constituida por un tubo de ensayo con agua a 35°-38°, ubicada a 5,5 cm de distancia. La respuesta se mantuvo al cubrir los ojos y ocelos con barniz opaco y amputando la proboscis en su base, pero no al amputar ambas antenas, sugiriendo así que los receptores responsables se ubicarían en las mismas. Utilizando el mismo diseño, demostraron que los insectos prefieren una fuente caliente cubierta con piel de ratón a una no cubierta. Sin embargo, en ausencia del estímulo térmico, la estimulación química de la piel no es suficiente para evocar una respuesta. Insectos a los que se les había amputado una antena se orientaron en línea recta hacia la fuente, pero en su proximidad inmediata, al extender la proboscis hacia ella, realizaban un brusco giro en la dirección de la antena intacta errando al objetivo. Un análisis del mecanismo de orientación de acuerdo al esquema clásico, llevó a reconocer dos mecanismos de orientación que se suceden en la respuesta. En la orientación a distancia, la entrada sensorial de



una antena es suficiente para guiar a los insectos correctamente hacia la fuente (*telotaxis*). En la proximidad inmediata de la fuente de estimulación serían necesarias ambas antenas, comparándose la entrada sensorial en ambas (*tropotaxis*). La dirección de orientación resultaría entonces de aquella en que la estimulación sea similar en ambos órganos. En los insectos a los que se les amputó una antena, llegado el momento de la comparación, la única entrada presente ocasiona que el insecto gire buscando el equilibrio.

Nicolle & Mathis (1941) y Fujita & Kloetzel (1976) analizaron la respuesta de las vinchucas a una fuente térmica a distintas temperaturas. En ambos casos, los autores reconocen un intervalo de temperaturas capaces de evocar una máxima respuesta de los insectos, que es cercano a la temperatura corporal de sus hospedadores.

La regulación de la temperatura corporal alrededor de un valor constante (homeotermia), por medio de la producción endógena (endotermia) y disipación de calor, independiza aquellos procesos de la temperatura ambiente. En los animales cuya temperatura corporal depende casi exclusivamente de la temperatura del ambiente (ectotermos), el único mecanismo alternativo para mantener un cierto control de la temperatura de su cuerpo y de la tasa metabólica es mediante su comportamiento (Vielmetter, 1958; Remmert, 1985; Wurtsbaugh & Neverman, 1988). En los insectos el efecto de la temperatura ambiente parece ser diferente sobre los distintos procesos fisiológicos. Por lo tanto, la preferencia activa de un cierto valor de temperatura ambiente es el resultado de la interacción de diversos parámetros fisiológicos y de la adaptación a ciertas condiciones ecológicas (Remmert, 1960).

En el caso de las vinchucas, el conocimiento de la preferencia térmica y de los factores que la afectan podría ayudar a inferir la distribución de los insectos en las viviendas, en relación a las condiciones microclimáticas. Por otra parte, la preferencia de temperatura para permanecer y para oviponer pueden ser datos de

utilidad para la cría de los insectos en el laboratorio con fines de estudio o de diagnóstico parasitológico.

#### lciii. Sentido térmico y reconocimiento del alimento

Se acepta corrientemente que la temperatura de la sangre es un factor determinante primordial de la respuesta de ingestión en los insectos hematófagos. Sin embargo, esta clave podría no estar implicada en todas las etapas comportamentales que conducen a la toma de alimento. Wigglesworth & Gillet (1934a) hallaron que en *R. prolixus* desantendados, la respuesta rostral puede ser desencadenada por vía visual. Por otra parte, Friend & Smith (1977) demostraron en la misma especie que una vez iniciada la ingestión, los insectos no son disturbados si se reemplaza una dieta a 37°C por otra a temperatura ambiente. Estos autores sostienen que la temperatura de la dieta actuaría como desencadenante o "disparador" (en la literatura inglesa: *trigger*) de la ingestión, del mismo modo que los compuestos fagoestimulantes.

En la abeja, un insecto de hábitos no hematófagos, Núñez (1966) observó que el control térmico del comportamiento alimenticio es regulado principalmente por la entrada sensorial antenal, más que por la temperatura del alimento en sí. Es decir, la temperatura del alimento juega un papel secundario, aunque no así la temperatura a que se encuentran las antenas.

Varios autores han resaltado la importancia de la entrada sensorial antenal y de la clave térmica para evocar la respuesta rostral de las vinchucas (Wigglesworth & Gillet, 1934a; Nicolle & Mathis, 1941; Barth, 1952; Wiesinger, 1956; Bernard, 1974; Lazzari, 1983). Sin embargo, nuestro conocimiento acerca de las vías sensoriales y claves involucradas en el desencadenamiento de la respuesta de ingestión es muy deficiente.

### lciii. Sentido térmico y orientación temporal

La sincronización de procesos fisiológicos y comportamentales con variaciones más o menos regulares del medio ambiente, es una estrategia universalmente presente en los seres vivos. La capacidad de prever la aparición de un predador, de una presa, de las condiciones climáticas óptimas para la reproducción o el desarrollo de la cría, tiene un indudable valor adaptativo en un ambiente que varía con cierta periodicidad.

Es así que casi todos los organismos han desarrollado mecanismos para medir el tiempo, que les permiten sincronizar aquellas variaciones que son importantes para su subsistencia. La presencia de relojes biológicos de periodicidad cercana a la duración del día (*circadiano*), de un ciclo de mareas (*circatidal*), de medio o un ciclo lunar (*circasemilunar o circalunar*), o de un año (*circanual*), se ha demostrado en un gran número de plantas y animales. El prefijo *circa-* denota que, en condiciones constantes, el reloj biológico tiene una precisión cercana, pero que sólo se aproxima, al período que interesa medir. Por esta razón deben ser ajustados o puestos en fase por señales del medio ambiente conocidas en la literatura con el término alemán *Zeitgeber* (dador de tiempo, sincronizador). La característica más importante de un ritmo endógeno es su persistencia en condiciones constantes, oscilando con un período espontáneo característico que no varía con la temperatura ( $Q_{10}$  cercano a 1). Esta propiedad permite distinguirlos de aquellos ritmos originados en la respuesta directa a un factor ambiental que varía periódicamente ya que desaparecen en su ausencia.

De acuerdo a la importancia ecológica relativa de las diferentes señales ambientales en un dado hábitat, los organismos pueden utilizar *Zeitgeber* de diversa modalidad para la puesta en fase de su reloj interno. Uno de los ejemplos más interesantes y mejor estudiados lo constituyen las poblaciones del quironómido *Clunio marinus* que viven en el norte de Europa. Estos insectos eclosionan como adultos y se reproducen con bien marcada

ritmicidad circadiana, tidal y semilunar. De acuerdo a la latitud, para la sincronización de los ritmos de eclosión es utilizada además de la luz solar, la temperatura del agua, la turbulencia marina o la luz de la luna, según cual sea la señal más conspicua en cada región geográfica (Neumann, 1976).

Salvo en los organismos que viven en ambientes que no son alcanzados por la luz solar, como cavernas o las profundidades marinas, la iluminación constituye el más importante *Zeitgeber*. Su estabilidad frente a cambios en el ambiente, en comparación a otras variables como la temperatura o la humedad relativa, convierten al ritmo diario de luz/oscuridad (LD) en la señal más confiable. Tanto la variación diaria de iluminación, como el cambio a lo largo del año de la duración del período de luz (*fotoperíodo*) relativo al período de oscuridad, son señales ampliamente utilizadas por los organismos en la sincronización de ritmos circadianos y circanuales respectivamente.

En la naturaleza, junto con el ritmo diario de iluminación ocurre un ciclo concomitante de temperatura, con una relación de fases más o menos estable. El mínimo de temperatura ambiente ocurre cercano al amanecer y el máximo al promediar la fotofase (fase de luz). No es sorprendente, entonces, que un ciclo diario de temperatura pueda actuar como *Zeitgeber* y entrenar ritmos circadianos del mismo modo que el ciclo de luz/oscuridad.

El análisis comparado de ambas señales, iluminación y temperatura, como agentes de sincronización de la actividad circadiana, es de interés tanto para conocer la base fisiológica como el significado ecológico de los ritmos biológicos. Por otra parte, un análisis de este tipo es importante para el análisis de la utilización de la información térmica en sus diferentes variantes por los animales.

Dada la notable sensibilidad térmica exhibida y sus hábitos fotofóbicos, las vinchucas podrían constituir un material especialmente adecuado para analizar este problema. Es de interés entonces el preguntarse si *T. infestans* es capaz de utilizar las

oscilaciones diarias de la temperatura ambiente para sincronizar su actividad circadiana y cuál es la importancia ecológica relativa de luz y temperatura en este comportamiento.

lciv. Las sensilias termorreceptoras

Las antenas de los insectos son órganos caracterizados por una alta concentración de receptores sensoriales. Salvo algunas notables excepciones, como los tímpanos de ortópteros, cigarras, mariposas nocturnas y mántidos, los halterios de los dípteros, los receptores IR de algunos coleópteros, los cercos abdominales de varios grupos. etc., la mayoría de los receptores mecánicos, químicos e higo-térmicos se encuentran allí ubicados. Esto no significa, sin embargo, que sean el asiento exclusivo de las diferentes sensilias, sino simplemente que en las antenas se encuentran en mayor cantidad.

Las vinchucas poseen una notable variedad y cantidad de sensilias antenales. Desde los estudios más antiguos se ha reconocido a las antenas de las vinchucas como el asiento de los receptores implicados en la respuesta térmica (Wigglesworth & Gillet, 1934a; Nicolle & Mathis, 1941; Barth, 1952; Wiesinger, 1956; Mayer, 1968; Bernard, 1974; Lazzari, 1983; Núñez, 1987).

Wigglesworth & Gillet (1934a) describieron cuatro clases de sensilias antenales en *R. prolixus*, cuya función fue interpretada según criterios morfológicos y, en un caso, relacionando abundancia y sensibilidad a la temperatura. Por su parte, Barth (1952) comunicó el hallazgo de un nuevo órgano sensorial, al que bautizó "*cova das cerdas*". Dicho órgano se encuentra presente en el pedicelo de la antena de reducidos de hábitos hematófagos, aunque no en las especies fitófagas o entomófagas. Este hecho, junto con la morfología del órgano, difícilmente asimilable a un mecano- o quimiorreceptor, llevaron a que se le atribuya "por eliminación" una función termorreceptora, hipótesis que no pudo ser confirmada mediante experimentos de ablación. El mismo autor (Barth, 1953) describió un órgano cordotonal en la articulación

entre pedicelo y flagelo (órgano de Johnston) y un órgano vesicular aparentemente relacionado con la penetración de los estiletes mandibulares en los tejidos del hospedador.

El primer estudio electrofisiológico de las sensilias antenales de *T. infestans* fue llevado a cabo por Mayer (1968), hallando una quimiosensilia capaz de responder al aire exhalado durante la respiración humana. Posteriormente, Bernard (1974) realizó un estudio electrofisiológico de varias sensilias antenales de *T. infestans*. Este autor describe la respuesta de 8 clases de sensilias, identificando 4 mecano-, 3 quimio- y 1 higrortermostreceptor. Justo y Tramezzani (1979) identificaron sólo 4 tipos de sensilias, cuya distribución no se corresponde con las descripciones de los demás autores. Justo (1979) intentó por primera vez en este grupo, el registro de la actividad total de la antena de *T. infestans*, método conocido como electroantenograma. Lamentablemente nunca fueron comunicados tales resultados. Lazzari (1983) identificó, mediante análisis morfológico, 18 tipos diferentes de sensilias en las antenas de esta especie. Las sensilias fueron agrupadas de acuerdo a su posible función en: 8 tipos morfológicos de mecanorreceptores, 1 mecano-quimiorreceptor, 6 quimiorreceptores y 3 posibles termorreceptores. Estos resultados, obtenidos con métodos morfológicos clásicos y colorantes que penetran los poros de los quimiorreceptores (Slifer, 1955, 1960), coinciden con los obtenidos por Bernard (1974) mediante electrofisiología.

Los estudios más recientes corresponden a McIver y Siemicki (1984, 1985), quienes manifestaron comenzar un estudio ultraestructural completo de las sensilias *R. prolixus*, describiendo algunas mecanosensilias y una supuesta higrortermostensilia.

La única demostración fehaciente de la función termorreceptora de una sensilia en triatominos proviene de los registros electrofisiológicos realizados por Bernard (1974) de un tipo de sensilia celocónica (clasificación morfológica según Snodgras,

1926). Esta sensilia que se encuentra no sólo en las antenas, sino también en toda la superficie del cuerpo de *T. infestans* (Lazzari, 1983), está inervada por tres células sensoriales. Una de ellas aumenta la frecuencia de disparo de potenciales de acción con la disminución de la temperatura, por lo que se la debería denominar, según criterios electrofisiológicos, como "receptor de frío" (Kerkut & Taylor, 1957). Las dos células que acompañan a la unidad termorreceptora son sensibles a la humedad relativa. Una de ellas aumenta la frecuencia de disparo en relación directa (unidad higrorreceptora) y la otra en relación inversa (unidad xerorreceptora) al aumento de la humedad relativa. Este tipo de termorreceptores en sensilias celocónicas, asociadas a un par de higrorreceptores antagonistas, responde a un modelo general presente en otros insectos (Horn, 1982).

La cueva de cerdas, de la que se ha sugerido una función termorreceptora, es un órgano en forma de saco, de 200-230  $\mu\text{m}$  de largo y 40-45  $\mu\text{m}$  de ancho, ubicado el tercio distal del segundo artejo antenal. Un gran número de cerdas muy delgadas llenan la cavidad del órgano, la que se comunica al exterior mediante un canal de 80-90  $\mu\text{m}$  de largo y 3-5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Barth, 1952; Lazzari, 1983).

#### 1d. OBJETIVOS DEL TRABAJO

En el presente trabajo de tesis serán analizados los siguientes problemas:

a) cría de las vinchucas en el laboratorio mediante la utilización de alimentadores artificiales (capítulo 2)

b) importancia de la temperatura de un hospedador como clave para la orientación de las vinchucas, a distancia y en proximidad (capítulo 3)

c) mecanismos físicos implicados en la percepción del calor emitido por una fuente caliente por las vinchucas (capítulo 3)

d) importancia de la temperatura de la sangre como clave de reconocimiento del alimento y desencadenante del comportamiento de ingestión (capítulo 4)

e) efecto modulador de la temperatura de la sangre sobre el comportamiento de ingestión (capítulo 4)

f) preferencia térmica para la selección de hábitat y para la oviposición (capítulo 5)

g) importancia de la oscilación diaria de la temperatura ambiente en la sincronización de la actividad circadiana (capítulo 6)

h) características morfológicas y electrofisiológicas de las sensilias termorreceptoras de las antenas (capítulo 7)

i) discusión global de los resultados y su transferencia a problemas de aplicación (capítulo 8)



## **CAPITULO 2**

### **Cría de las vinchucas en el laboratorio**

La cría en masa de las vinchucas en el laboratorio es un problema que debe ser afrontado por todo laboratorio de investigación y/o diagnóstico de la enfermedad de Chagas. El método más ampliamente utilizado es el descrito por Cerisola et al. (1974), recientemente revisado por Núñez & Segura (1987). En dicha técnica se permite a los insectos alimentarse sobre hospedadores vivos, utilizándose especialmente aves debido a su carácter refractario a la infección con *Trypanosoma cruzi*.

La alimentación de las vinchucas *in vivo* presenta los inconvenientes del mantenimiento de los hospedadores y de la escasa posibilidad de poder controlar las condiciones de alimentación de los insectos. En nuestro laboratorio se realizan desde hace algunos años, en forma permanente, experimentos tendientes a la optimización de un método de cría de vinchucas, utilizando alimentadores artificiales. La descripción general del método y de las condiciones de mantenimiento de los insectos fueron descriptas por Núñez & Segura (1987).

Brevemente, las vinchucas son mantenidas a 28°-30°C y 50-70% de humedad relativa en una cámara con circulación constante de aire. Los insectos se distribuyen en recipientes de PVC de 500 cc de capacidad. La base y la cubierta de los mismos han sido reemplazadas por malla de nylon, para permitir la circulación de aire. De este modo se evita la acumulación de sustancias volátiles provenientes de la descomposición de los excrementos que pueden ser nocivas para los insectos. En el interior de los recipientes, un trozo de papel de filtro plisado hace las veces de sustrato y absorbe orina y heces. Los adultos se distribuyen en número de 10-15 parejas por recipiente y las ninfas en un número acorde a su estado de desarrollo. La base de los recipientes que contienen los adultos es de malla de 5 mm de apertura, diámetro

suficiente para permitir que los huevos la atravesen al caer. Un recipiente con un trozo de papel de filtro en forma de embudo colocado debajo permite recoger los huevos, libres de los excrementos que son retenidos en el papel, sin disturbar a los insectos. La alimentación de los adultos es semanal y la de las ninfas se realiza en dos días consecutivos, una vez por estadio. La limpieza del insectario se realiza lejos del tiempo de ecdisis y antes de la alimentación. La fragilidad de los insectos recién alimentados o recién mudados puede provocar su muerte al ser manipulados.

#### 2a. EL ALIMENTADOR ARTIFICIAL

El ejemplo más exitoso de la utilización de alimentadores artificiales en la cría de un insecto hematófago es el de la mosca tse-tsé, *Glossina spp.* (Mews et al., 1977; Wetzel, 1980). Diversos tipos de alimentadores artificiales han sido presentados y utilizados experimentalmente con redúvidos hematófagos (Nicolle, 1941; Friend & Cartwright 1963; Kloft & Schlagbauer, 1965; Langley & Pimley, 1978), pero la cría en masa de vinchucas exclusivamente mediante alimentación *in vitro* ha sido escasamente comunicada (Núñez & Segura, 1987). En nuestro laboratorio se mantiene la cría de *T. infestans*, en dichas condiciones, desde el año 1983.

Un alimentador artificial debe simular, en alguna medida, las condiciones que un insecto hematófago encuentra en un hospedador en el momento de alimentarse. Aunque esto es posible de lograr sólo parcialmente, existen condiciones mínimas que son suficientes para desencadenar la orientación de los insectos y la ingestión del alimento. El alimentador presentado en la figura 2.1 es una variante del desarrollado por Núñez (Núñez & Segura, 1987), que actualmente se utiliza en nuestro laboratorio y que permite la alimentación simultánea de un gran número de insectos. Dicho diseño se adecua además al ensayo simultáneo de diversas dietas.

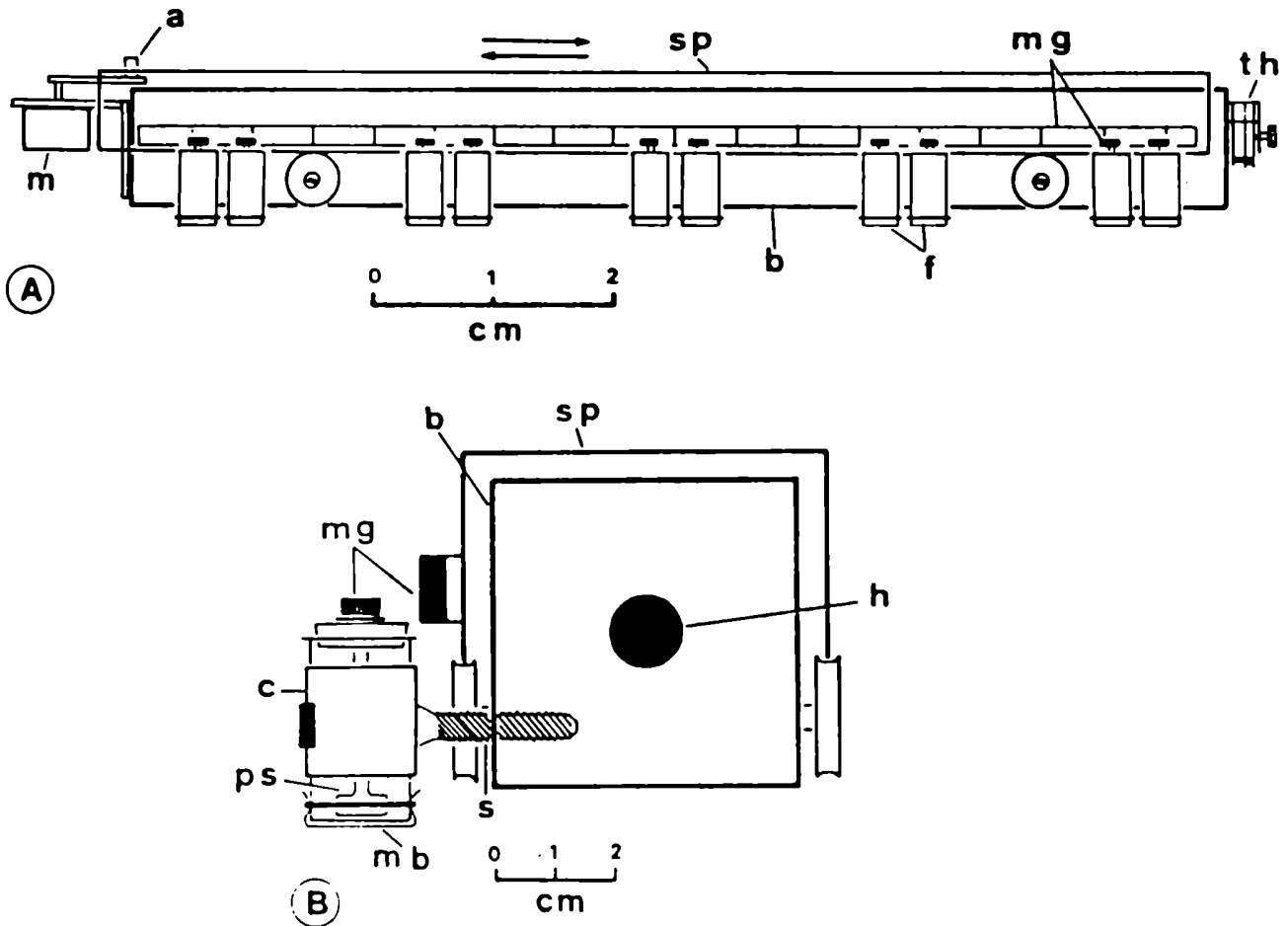


Fig. 2.1. Alimentador artificial utilizado en la cria de *Triatoma infestans* en el laboratorio. A) vista frontal; B) vista lateral y detalle del recipiente con la sangre. *a*, brazo rotatorio; *b*, barra de aluminio; *c*, agarradera metálica; *f*, recipientes con sangre; *h*, calefactor eléctrico; *m*, motor sincrónico (50 RPM); *mb*, membrana de látex (60  $\mu$ m de espesor); *mg*, imanes; *ps*, paleta plástica de agitación; *s*, tornillo de fijación; *sp*, pieza deslizante; *th*, termostato bimetalico.

La sangre se encuentra en recipientes de vidrio sin fondo, en cuya base se fija una membrana de látex de 60µm de espesor mediante un anillo de goma ("O"-Ring). Una abrazadera de bronce, fijada a una barra de aluminio sostiene el recipiente con sangre. En el interior de la barra de aluminio se encuentra una resistencia eléctrica generadora de calor, controlándose su temperatura por medio de un termostato bimetálico. En el interior de cada recipiente una pequeña paleta plástica agita la sangre mediante la acción de un imán fijado en un extremo superior de la paleta. Una hilera de imanes fijados a una placa que se desliza sobre la barra de aluminio por la acción de un motor sincrónico (20 RPM) genera el movimiento rotatorio del agitador de la sangre. De este modo se mantiene homogénea la temperatura de la sangre, calentada por conducción a través de la abrazadera de bronce, y se evita la eritrosedimentación.

El mantenimiento de la sangre a una temperatura de 32°-35°C es estímulo suficiente para inducir a las vinchucas a picar la membrana y alimentarse.

## 2b. PREPARACION Y CONSERVACION DE LA SANGRE

Los resultados de Núñez & Lazzari (1990) muestran que en *T. infestans* la aceptación de una dieta de sangre depende de la preparación de la misma. El anticoagulante utilizado y las condiciones de conservación de la sangre hasta su utilización en la alimentación de los insectos son factores que afectan la ingestión.

Tanto el agregado de heparina (6UI/ml) como de una solución de citrato (33ul/ml de sangre de una solución de 1,32 g de citrato de sodio + 0,44 de ácido cítrico + 1,47 g de glucosa + 10 ml de agua destilada) a la sangre evitan su coagulación y permiten conservarla por algunos días a 4°C.

La conservación por períodos de hasta dos meses a 4°C o el congelamiento y conservación a -20°C disminuye significativamente la aceptación de la sangre heparinizada. La sangre citratada no es afectada por el tiempo de conservación ni por el congelamiento.

La superioridad de la solución de citrato podría ser atribuida a la estabilización de la estructura celular y de las moléculas fagoestimulantes (por ej. ATP). Sin embargo, la hemólisis producida por el congelamiento, que afecta la aceptación de la sangre heparinizada, no empeora la aceptación de la sangre citratada. Por otra parte *T. infestans* acepta en igual grado dietas sanguíneas o soluciones salinas sin el agregado de compuestos fagoestimulantes. La diferencia podría deberse, por lo tanto, a una pobre capacidad de conservación de la heparina, que daría lugar a la aparición, con el tiempo, de compuestos con efectos deletéreos sobre la ingestión. Por otra parte, ambos anticoagulantes podrían afectar de manera diferente la liberación de CO<sub>2</sub> de la dieta. En el caso de los mosquitos, fue sugerido que la difusión de CO<sub>2</sub> a través de la membrana podría afectar el sistema nervioso central, disminuyendo el umbral de respuesta a fagoestimulantes (Galun et al., 1988). No se conoce aún si la solución de citrato podría influir en la liberación de CO<sub>2</sub>, como aparentemente ocurre con el bicarbonato de sodio.

Es así que la utilización de soluciones de citrato es un método eficiente para la conservación de la sangre destinada a la alimentación de triatomíneos en el alimentador artificial. Este anticoagulante permite la preparación de grandes cantidades de sangre y su conservación por largos períodos a -20°C, con la única restricción de que el descongelamiento debe producirse inmediatamente antes de la alimentación (Núñez & Lazzari, 1990).

## 2C. CLAVES ACCESORIAS EN EL ALIMENTADOR ARTIFICIAL

Los diferentes diseños de alimentadores artificiales comparten la característica de utilizar sólo la clave térmica para estimular a los insectos a alimentarse. Si bien dicha clave ha sido señalada repetidamente como necesaria y suficiente para evocar una respuesta, las condiciones de alimentación se encuentran muy empobrecidas respecto a un hospedador vivo. Corresponde entonces preguntarse, en que medida la adición de claves suplementarias presentes en un animal vivo y que las vinchucas utilizarían para orientarse puede mejorar la eficiencia de un alimentador artificial. Se ha señalado, por ejemplo, que la presencia en el ambiente de ciertos compuestos químicos, como el CO<sub>2</sub>, podría afectar la cantidad de alimento ingerida por los insectos (Galun et al, 1988).

En los experimentos descriptos a continuación se analizó la influencia de la adición de olores del hospedador y de la constitución de la superficie a picar en la respuesta de ingestión de *T. infestans*.

### 2ci. Materiales y métodos

En los experimentos fueron utilizadas ninfas del tercer estadio criadas en nuestro laboratorio y alimentadas con sangre bovina en el alimentador artificial. Los insectos fueron alimentados como segundo estadio y utilizados 30 días más tarde, es decir alrededor de 20 días luego de la ecdisis.

Luego de ser marcadas individualmente con pintura acrílica según un código de colores, los insectos fueron pesados individualmente en una balanza analítica al 0,01 mg (Mettler H20T). Luego fueron repartidos en grupos de 10 individuos en recipientes plásticos de 7 cm de altura por 5 cm de diámetro, con un trozo de papel de filtro plisado a modo de sustrato y cerrados con una malla de nylon.

Las siguientes dietas fueron presentadas en el alimentador de la figura 2.1 a 35°C:

- a. Solución 0,15 M de NaCl a través de una membrana de látex.
- b. Como en a + piel fresca de ratón sobre la membrana.
- c. Como en a + sólo un anillo de piel de ratón.
- d. Como en a + suave corriente de aire proveniente de una jaula con ratones.
- e. Como en a + suave corriente de aire ambiental.
- f. Como en a, pero utilizando como dieta solución salina para mamíferos (Ringer Locke).

Se permitió a las ninfas alimentarse durante una hora y se pesó luego el recipiente con los insectos. A las 24 horas los insectos fueron pesados individualmente.

Se realizaron dos repeticiones, utilizando 10 animales por dieta en cada una. La ingesta fue normalizada a mg de alimento, 24 hs luego de la ingestión, por mg de insecto ayunado y los datos se analizaron mediante el test de Student.

#### 2cii. Resultados

La adición de olores, como claves de estimulación accesorias a la temperatura del alimentador, no mejoró la aceptación de la dieta. Como muestra la figura 2.2, ni la piel de ratón ni el aire con olor mejoraron la ingestión de los insectos. Aunque la piel podría representar una superficie más adecuada para picar, su presencia empeoró la ingestión significativamente ( $P < 0,01$ ). La corriente de aire, con o sin olores adicionados, parece disturbar a los insectos, a pesar de la importancia de los olores como claves durante la búsqueda de alimento. Este efecto deletéreo fue significativo ( $P < 0,05$ ).

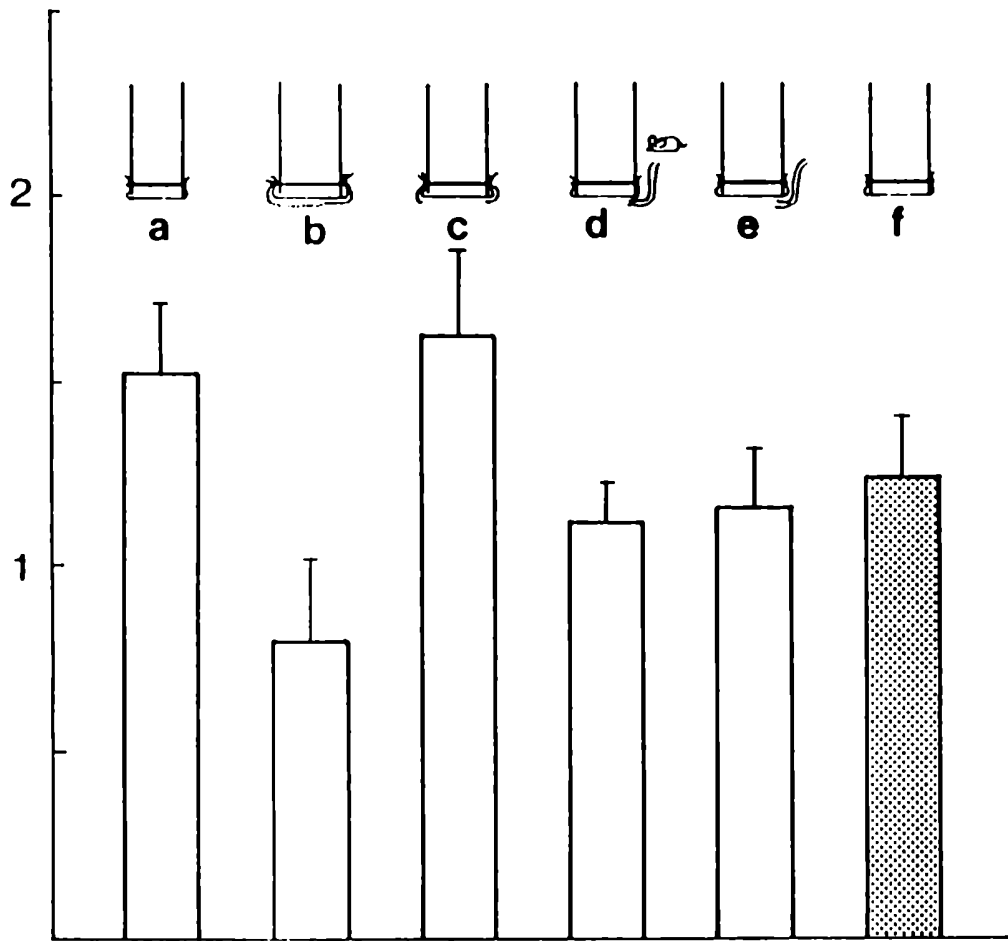


Fig 2.2. Cantidad ingerida, expresada como aumento de peso 24 horas después de la ingestión por unidad de peso de insecto ayunado, de solución 0,15M NaCl presentada a través de una membrana de látex con: a, nada; b, piel fresca de ratón por debajo de la membrana; c, solo un anillo de piel de ratón; d, flujo de aire proveniente de una jaula con ratones; e, flujo de aire ambiental y f, solución Ringer para mamíferos (Ringer Locke). Valor medio + error standard (n= 20).



### **CAPITULO 3**

## **Orientación térmica y búsqueda de alimento**

En las siguientes secciones se analizarán: 1) la secuencia comportamental desencadenada por la estimulación térmica; 2) la curva de sensibilidad de la respuesta; 3) el efecto del ayuno y del estadio de desarrollo; 4) los mecanismos de percepción de estímulos térmicos y 5) la estimación a distancia de la temperatura de una fuente.

#### **3a. LA RESPUESTA A ESTIMULOS TERMICOS**

Cuando una vinchuca es enfrentada a una fuente térmica, se desencadena una serie de respuestas comportamentales que culmina con intentos de picar la superficie caliente.

Como fue señalado anteriormente, fuera del período en que las vinchucas se vuelven espontáneamente activas, se encuentran en un estado de inmovilidad. En dicho estado de akinesis, el umbral para responder a estimulación sensorial es relativamente alto. Por lo tanto, los insectos pueden no responder espontáneamente a la estimulación térmica, si no se los "despierta" (Wigglesworth & Gillet, 1934a) mediante estimulación mecánica o por medio de una corriente de aire.

La observación de la secuencia comportamental que sigue a la activación de los insectos nos permite descomponer la misma en los siguientes elementos, en orden de umbral creciente:

- *Movimientos antenales:* El insecto alertado de la presencia de un hospedador potencial, comienza a mover sus antenas en un comportamiento de rastreo del medio circundante. Ambas antenas se mueven coordinadamente, hacia arriba y hacia abajo, hacia los lados y hacia atrás. Wigglesworth & Gillet (1934a) señalan que dicho movimiento recuerda el de un "semáforo de banderas".

*Actividad locomotora:* Luego de algunos segundos, el animal separa su vientre del sustrato y comienza a caminar en dirección a la fuente caliente. El movimiento de las antenas persiste durante dicha aproximación, pero el patrón de movimiento cambia, manteniendo ambos órganos un ángulo más o menos constante entre sí cercano a los 90°, con un componente principal de movimiento en sentido vertical.

- *Extensión de la proboscis:* Cuando la fuente se encuentra a una distancia cercana al alcance del rostro, los insectos extienden la proboscis, una reacción bien definida y característica de las chinches predadoras. Wigglesworth & Gillet (1934a) y Núñez (1982) llamaron a dicha respuesta: *probing response (PR)*. Este nombre puede conducir a confusiones, dado que otros autores utilizan la misma denominación para la prueba del alimento (Hopkins, 1964; Friend & Smith, 1977; Walker & Edman, 1985). Por otra parte, la proboscis puede ser desplegada a cierta distancia de la fuente y no culminar con el contacto con la misma (Wigglesworth & Gillet, 1934a; Núñez, 1982). Nicolle & Mathis (1941) denominaron este comportamiento *reaction thermorostrale*, pero esta denominación tampoco parece adecuada, ya que dicha respuesta puede ser evocada por estímulos de modalidad distinta a la clave térmica. Por dichas razones, nos referiremos a ella como *respuesta rostral* o *reflejo rostral (RR)*.

*Intento de picar:* Cuando la proboscis contacta la superficie de la fuente caliente, el insecto intenta hundir sus estiletes en ella. Si se trata de una fuente de material rígido, el insecto intenta picarla realizando una serie de movimientos rápidos o presión sostenida durante varios minutos. Durante este tiempo, el movimiento del sustrato o bien de la fuente es indicativo de la fuerza realizada por los insectos para atravesar la superficie y tratar de alimentarse. Es importante destacar que el animal, cuando no consigue penetrar sus estiletes, intenta picar en los alrededores, en zonas que no están calientes, a distancias de hasta 10 mm de la fuente. Esta característica de la respuesta de

picar fue aprovechada en los experimentos que se relatarán en el capítulo 4.

- *Limpieza de las antenas:* Este componente de la respuesta a estimulación térmica fue citado por Wiglesworth & Gillet (1934a) para *R. prolixus*. El insecto frota sus antenas entre las almohadillas presentes en la cara interna de la base de las tibiae anteriores. Dicho comportamiento no es un componente de presencia constante en la reacción a un estímulo térmico. En *T. infestans*, la limpieza de antenas se observa con mayor frecuencia en situaciones de bajo nivel de estimulación, en que el animal no puede localizar la fuente o no puede alcanzarla.

### 3b. SENSIBILIDAD E INTERVALO DE RESPUESTA

Los trabajos de Nicolle & Mathis (1941) y de Fujita y Kloetzel (1976) indican que tanto *T. infestans* como *R. prolixus* muestran una preferencia por fuentes con una temperatura cercana a la de un animal de sangre caliente.

Nicolle & Mathis (1941) midieron los intentos de ninfas y adultos de *T. infestans* de picar un recipiente con agua a distintas temperaturas. Sus resultados muestran que uno o dos grados de diferencia con la temperatura ambiente son suficientes para estimular a los insectos. El límite superior de dicha respuesta, es decir la máxima temperatura de la fuente que provocó la reacción de picar en los insectos, fue de 40°C y 45°C para ninfas y adultos respectivamente.

Fujita y Kloetzel (1976) midieron la preferencia de adultos de *R. prolixus* para alimentarse de fuentes con diferente temperatura. En sus experimentos, los insectos fueron enfrentados a alimentadores a 19°, 25°, 31°, 37° y 43°C. Según estos autores los insectos mostraron una preferencia por la fuente a 37°C, aunque los resultados no fueron analizados estadísticamente.

En los experimentos que se presentan a continuación se analizaron, utilizando dos diseños experimentales distintos, diferentes parámetros de la respuesta de los insectos en función de la temperatura de la fuente.

### 3bi. Primera serie experimental

En los ensayos fue utilizado el dispositivo cuyo diagrama se muestra en la figura 3.1. El estímulo se presenta por medio de un alambre de cobre de 2 mm de diámetro (al.), calentado mediante una resistencia eléctrica (res.) cuya temperatura puede controlarse por medio de un potenciómetro (pot.). Un segundo alambre, a una distancia de 10 mm del primero y que se mantiene a temperatura ambiente, sirve como control. Ambos alambres se hallan protegidos por una máscara de poliestireno expandido (masc.) que deja libre, como fuente de estimulación térmica, sólo su sección frontal de  $3,14 \text{ mm}^2$ . El frente de la máscara se cubrió con papel milimetrado y sobre el mismo se delimitaron zonas de 2 mm de ancho con alambres de  $80 \mu\text{m}$  de diámetro.

El campo visual fue iluminado por detrás, a través de una ventana de  $11 \times 25 \text{ mm}$  practicada en una placa de acrílico blanco. Una lámpara pequeña, de 15 Watt de potencia, se ubicó a 20 cm de distancia para evitar el calentamiento de la zona cercana al animal experimental. La luz alcanzó la zona de observación a través de un tubo de  $4 \times 4 \text{ cm}$  de sección (Fig. 3.2).

Los insectos se colocaron individualmente en recipientes cilíndricos de 23 mm de diámetro y 37 mm de altura, con un trozo rectangular de malla plástica como sustrato, cerrados mediante malla de tela de 1 mm de abertura.

Mediante el aislamiento del área experimental se procuró minimizar las posibles interferencias ambientales y del observador. Los insectos fueron observados a través de una ventana de vidrio desde una distancia de 20 cm, utilizando un sistema óptico construido para tal fin (Fig. 3.2). Todo el conjunto de elementos se ubicó dentro de una caja de cartón de 85

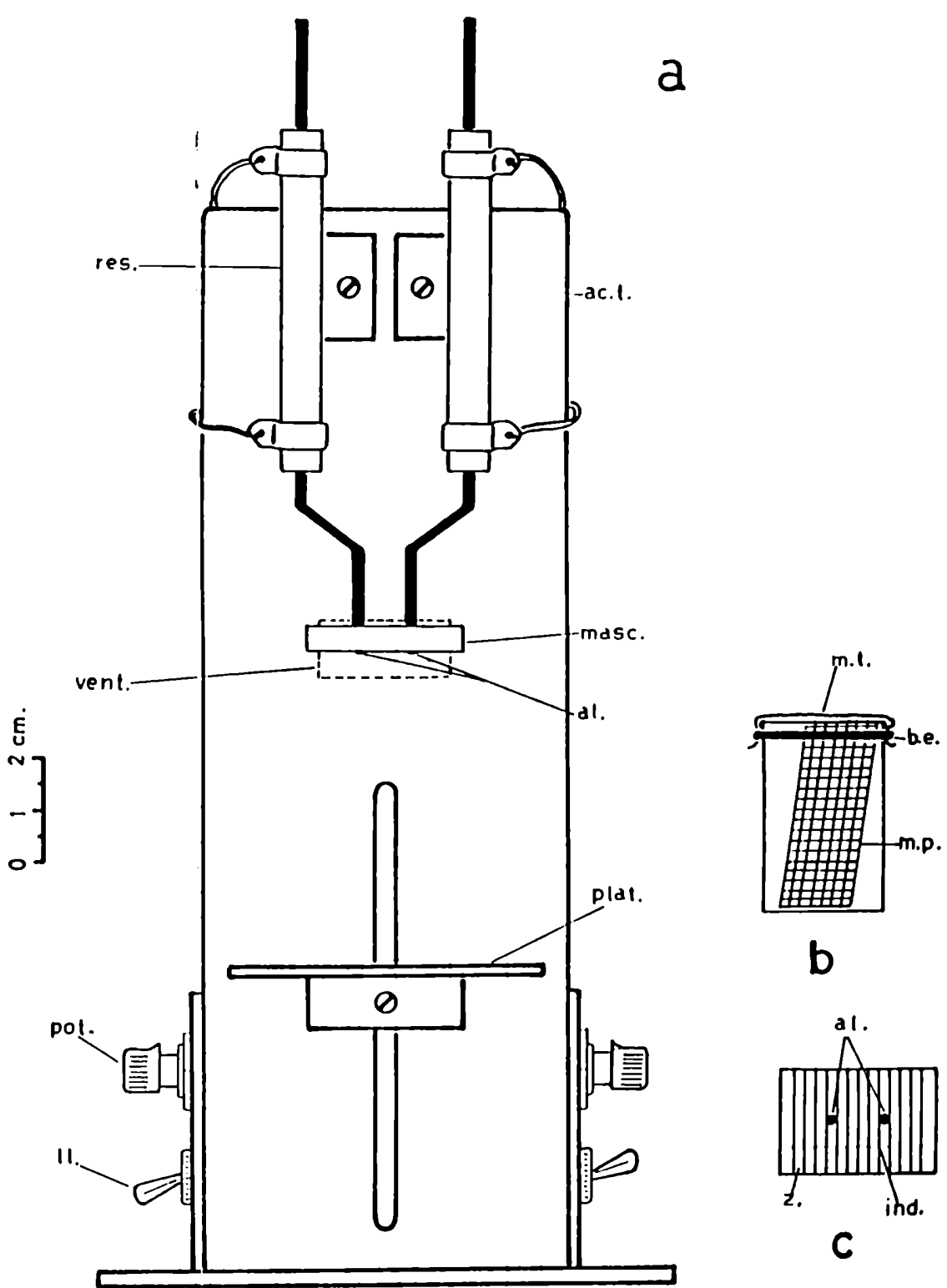


Fig. 3.1. Sistema de estimulación térmica utilizado en la primera serie experimental, descrita en la sección 3b.. a) vista frontal; b) recipiente para los insectos; c), vista inferior del área de estimulación. *ac.t.*, placa de acrílico transparente; *al.*, alambres de cobre; *b.e.*, banda elástica; *ind.*, alambres indicadores de las zonas de referencia; *ll.*, llave eléctrica; *masc.*, máscara de poliestireno expandido; *m.t.*, malla de tela; *m.p.*, malla plástica; *plat.*, plataforma; *pot.*, potenciómetro para regulación de la temperatura de estimulación; *res.*, resistencia eléctrica; *vent.*, ventana de iluminación (por transparencia); *z.*, zonas de referencia de 1 mm de ancho.

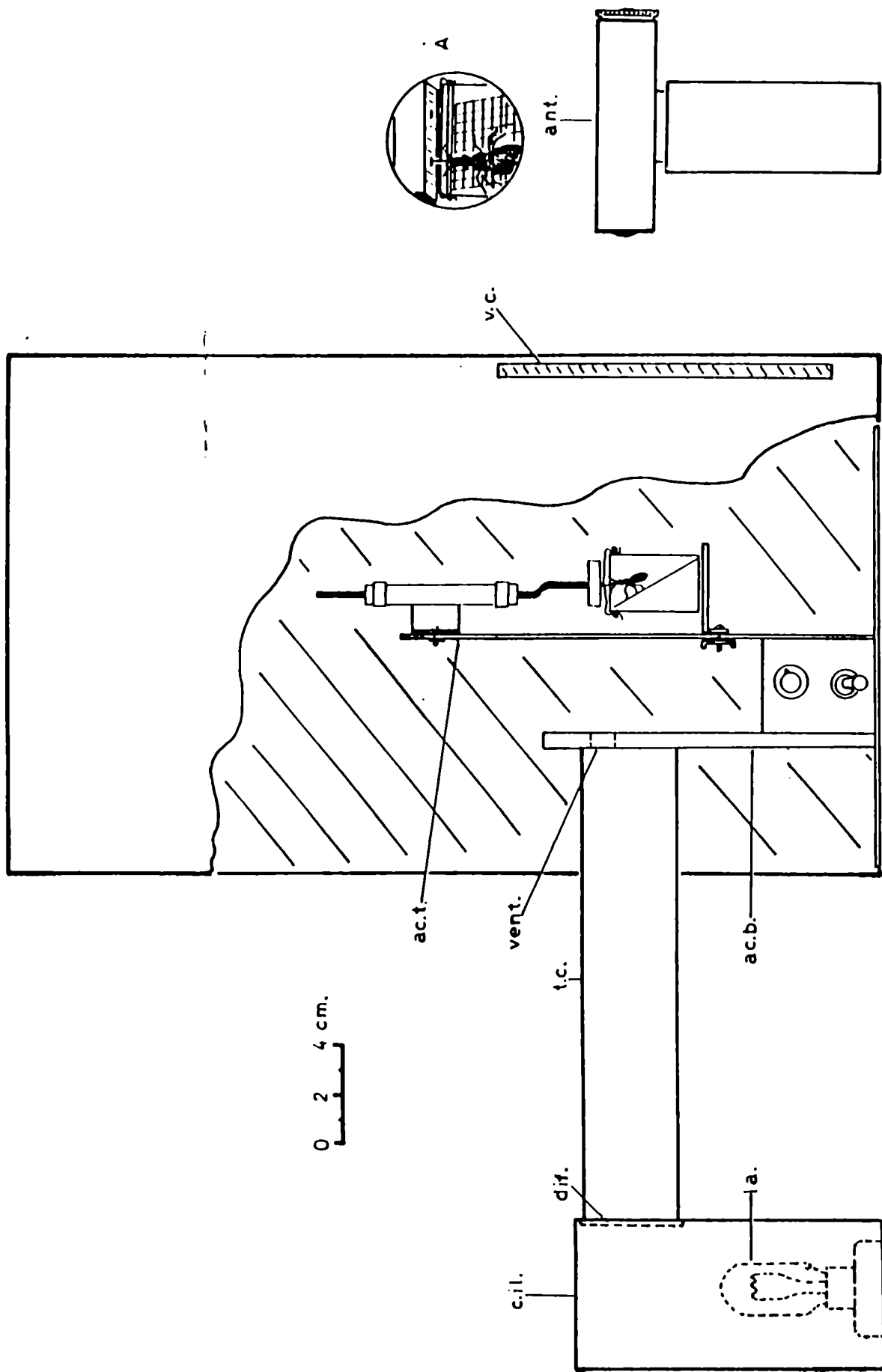


Fig. 3.2. Disposición general del sistema de estimulación térmica de la Fig. 3.1. ac.b., placa de acrílico blanco; ac.t., placa de acrílico transparente; ant., sistema óptico de observación; c.il., caja de iluminación; dif., difusor; la., lámpara de iluminación (15 Watt); t.c., tubo de iluminación; v.c., vidrio corredizo; vent., ventana de iluminación. A) campo visual del observador.

x 62 x 40 cm, para limitar la entrada de luz ambiental. Toda manipulación de los insectos y de los recipientes se realizó con pinzas.

Al comenzar cada ensayo, el animal experimental fue activado mediante la exposición a una corriente de aire ambiental proveniente de un secador de cabello. A continuación, el recipiente se ubicó frente a la máscara con los alambres de cobre, uno de los cuales se calentó a la temperatura deseada. Mediante un registrador manual de eventos se registró durante 2 minutos la aparición y duración de los diversos componentes de la respuesta de los insectos, descritos en la sección 3b.. Con cada individuo se realizaron dos ensayos de 2 minutos de duración para cada temperatura, utilizando 10 ninfas del tercer estadio, alimentadas como segundo estadio un mes antes.

### 3bii. Segunda serie experimental

El dispositivo representado en la figura 3.3 consiste en una barra de aluminio con un extremo sumergido en hielo en estado de fusión (0°C) y el otro en agua a 90°C). De este modo se establece a lo largo de la barra un gradiente de temperatura. Treinta zonas de 1 cm cada una fueron demarcadas en la región media y la temperatura medida en cada zona. Los insectos fueron colocados, en número de 5, en recipientes de 23 mm de diámetro y 37 mm de altura, con un trozo de papel de filtro plisado como sustrato. Los recipientes fueron cerrados con un trozo de malla de tela de 1 mm de abertura. Cinco recipientes fueron ubicados en una gradilla, los insectos expuestos a una corriente de aire a temperatura ambiente proveniente de un secador de cabello y enfrentados al estímulo térmico, cada recipiente en una región distinta del gradiente. El número de insectos que intentaban picar la superficie de aluminio fue registrado a los 30, 60, 90, 120, 150 y 180 segundos. En los experimentos fueron utilizadas 200 ninfas del cuarto estadio, alimentadas como tercer estadio un mes antes. Como en la anterior serie de experimentos, toda manipulación de

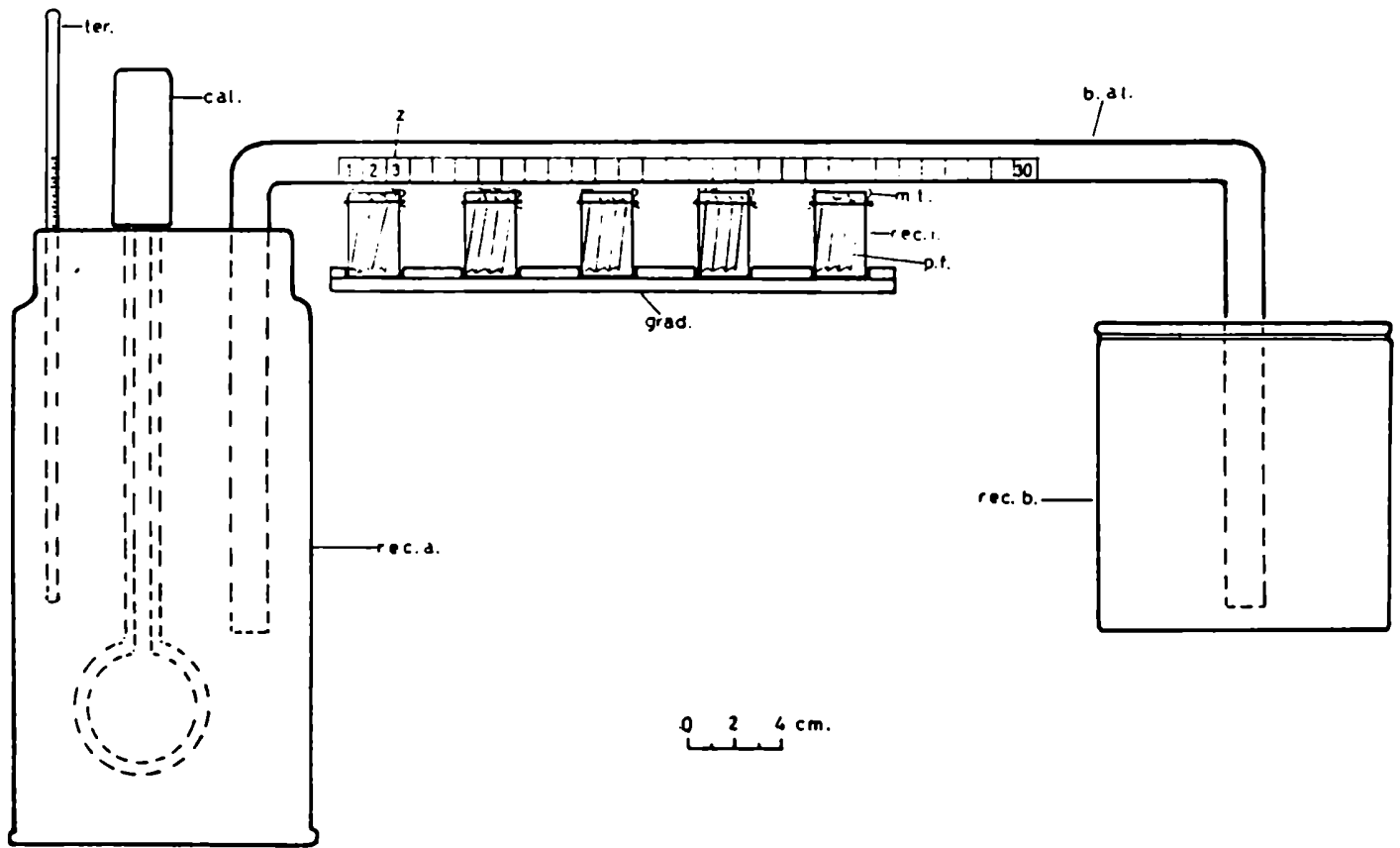


Fig. 3.3. Sistema de estimulación utilizado en la segunda serie experimental de la sección 3c. *b.al.*, barra de aluminio; *cal.*, calefactor eléctrico; *grad.*, gradilla; *m.t.* malla de tela; *p.f.* papel de filtro plisado; *rec.a.*, recipiente aislante a 90°C; *rec.b.*, recipiente aislante a 0°C; *rec.i.*, recipiente para los insectos (n= 5); *ter.*, termómetro; *z.*, zonas de referencia de 1 cm de ancho.



los recipientes se realizó con pinzas y el área experimental fue aislada del experimentador mediante cartón y vidrio.

### 3biii. Resultados

La figura 3.4 muestra la respuesta de las ninfas del tercer estadio, expresada como el número de insectos que mostraron la respuesta rostral y el número de intentos de picar la fuente, en relación a la temperatura de la fuente. Para ambos parámetros medidos, la respuesta aumentó hasta una temperatura de 47°C, para disminuir bruscamente a temperaturas mayores.

En los ensayos en que se utilizó el segundo dispositivo experimental y ninfas del cuarto estadio, se observó un comportamiento similar (Fig. 3.5). La intensidad de la respuesta aumentó también hasta un valor de temperatura de la fuente de 47°C, para decaer a temperaturas mayores. La respuesta no mostró variaciones significativas con el tiempo de estimulación. Es interesante recalcar que a temperaturas mayores de 47°C los insectos, independientemente de la distancia a que se encontraran de la fuente, no respondieron a la estimulación, realizando, a lo sumo, movimientos antenales.

### 3c. EFECTO DEL AYUNO EN LA RESPUESTA A ESTIMULOS TERMICOS

En la presente serie experimental se midió la respuesta de ninfas del tercer y cuarto estadio, bajo las mismas condiciones experimentales, y su variación con el ayuno. Veinte ninfas de cada estadio fueron alimentadas y colocadas individualmente en recipientes similares a los utilizados anteriormente. A partir de las 24 hs siguientes a la alimentación se presentaron los individuos, cada 48 o 72 horas, al dispositivo descrito en la sección 3ci. durante 2 minutos y siempre a la misma hora del día (10:00). Utilizando un registrador manual de eventos se midieron

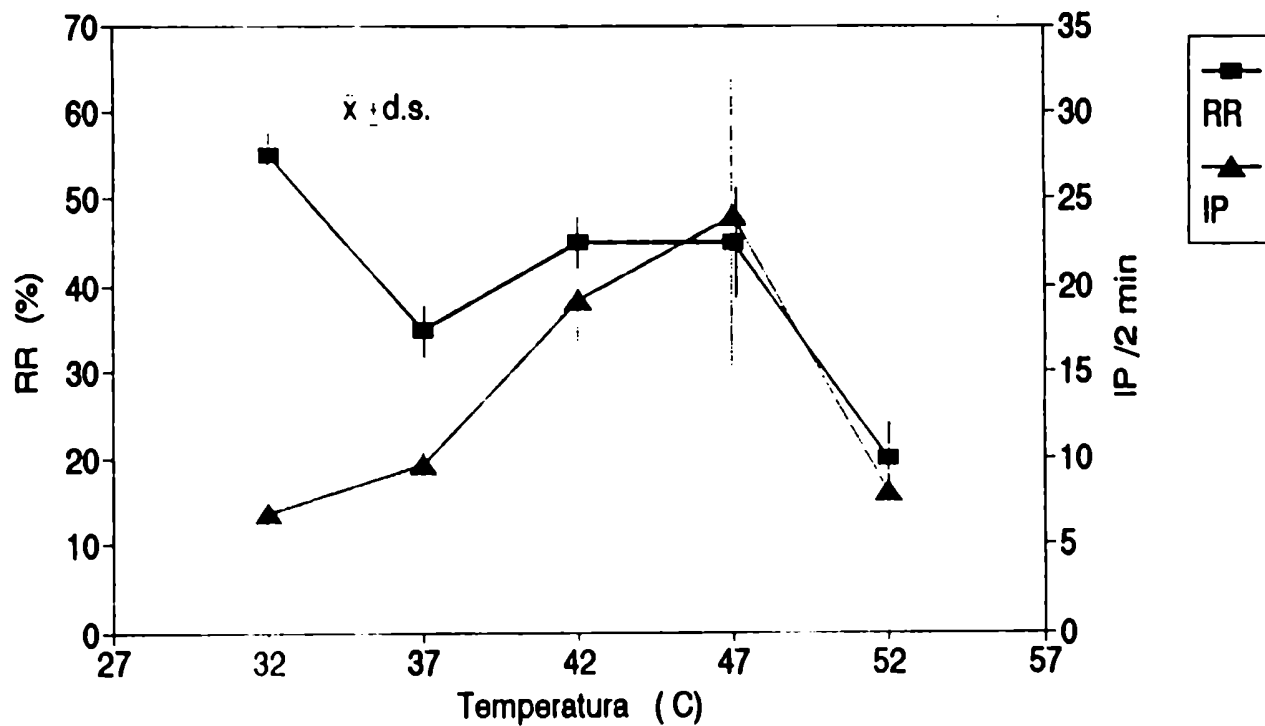


Fig. 3.4. Respuestas de las ninfas del tercer estadio a la estimulación térmica, en el dispositivo de las Figs. 3.1 y 3.2. RR(%), porcentaje de insectos que respondieron con la respuesta rostral; IP/2min, número de intentos de picar la fuente desplegados en los 2 minutos de presentación del estímulo. Temperatura ambiente 27°C. Media  $\pm$  desviación standard de dos presentaciones de cada insecto a cada una de las temperaturas (n=10).

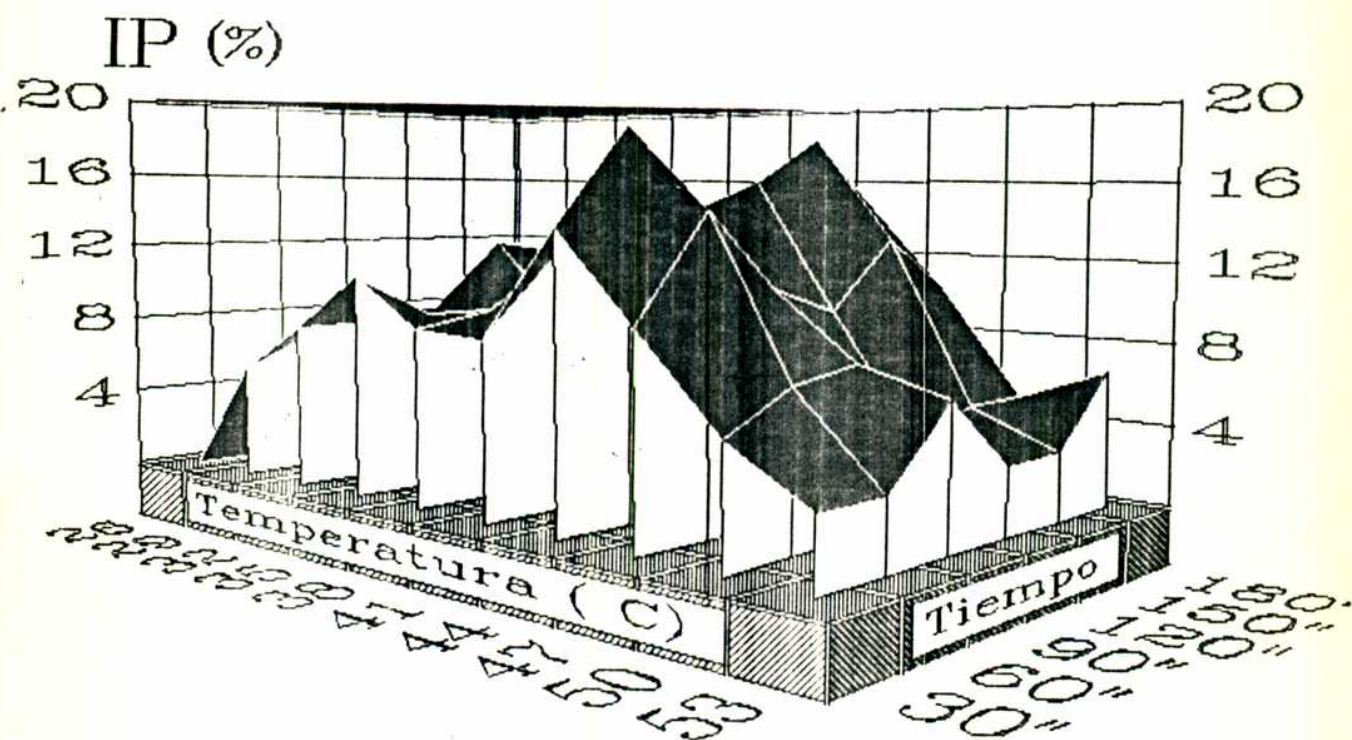
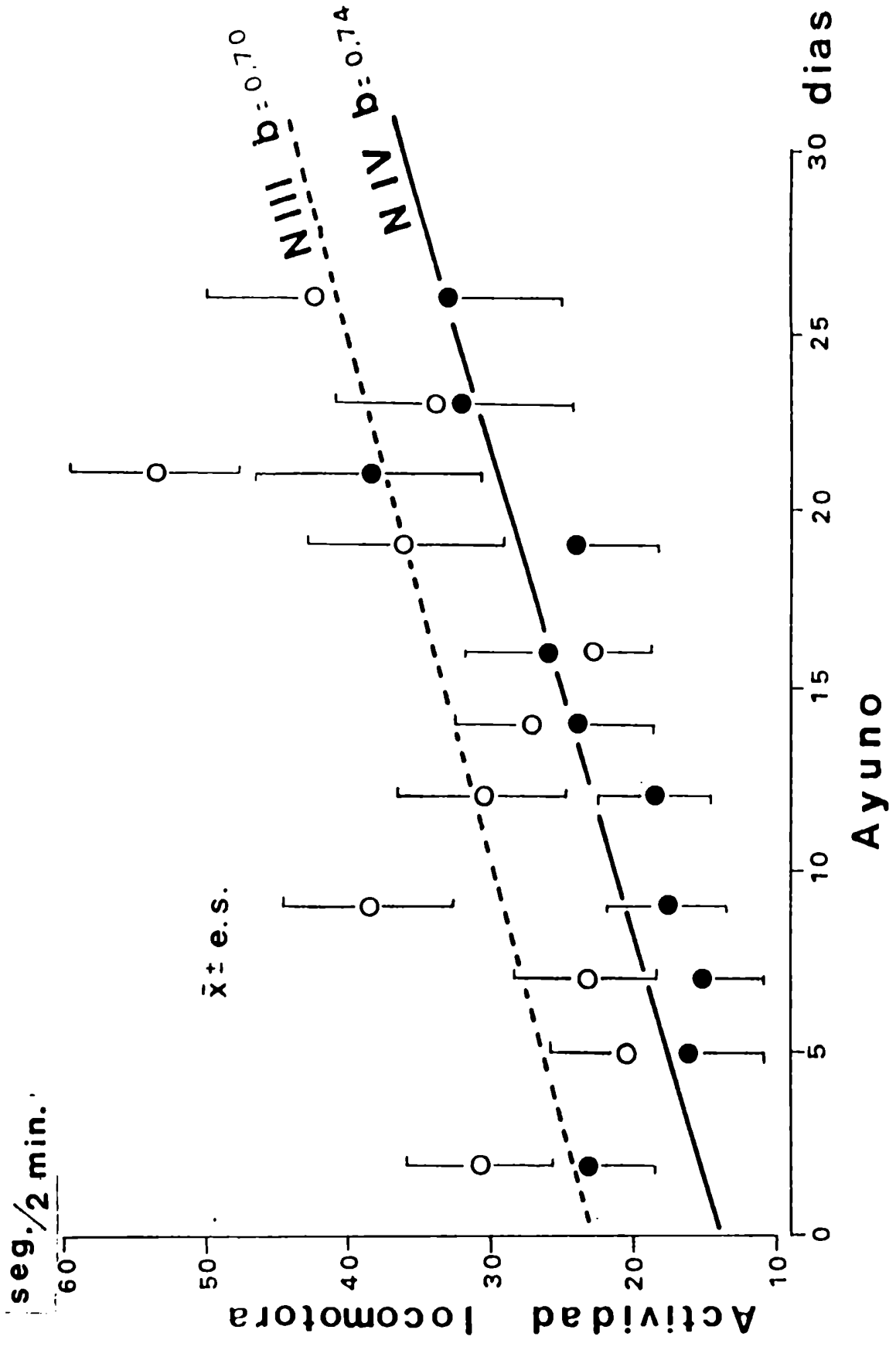


Fig. 3.5. Respuesta de las ninfas del cuarto estadio a la estimulación térmica, en el dispositivo de la Fig. 3.3. IP(%), porcentaje de insectos que intentaron picar la barra de aluminio a cada temperatura en función del tiempo de estimulación.



la aparición y duración de los diversos comportamientos que conforman la respuesta ante un estímulo térmico (sección 3b.).

### 3ci. Resultados

De los parámetros medidos, el que mejor describió la variación de la respuesta de las ninfas III y IV frente al ayuno fue la duración de la actividad locomotora desplegada ante la estimulación térmica (Fig. 3.6). Las pendientes de ambas rectas de regresión son significativamente distintas de 0 (test de ANOVA,  $P=0,05$  para NIII y  $P=0,02$  para NIV), pero no entre sí (t-test, n.s.). Las ordenadas al origen, en cambio, difieren significativamente (t-test,  $P=0,05$ ).

Durante todo el experimento, las ninfas del tercer estado mostraron un mayor nivel de respuesta. La variación de la respuesta con el ayuno fue sin embargo similar, considerando aquella diferencia.

### 3d. ESTIMACION DE LA TEMPERATURA DE FUENTES DISTANTES

Dada la importancia de la clave térmica en las vinchucas durante la búsqueda de alimento, es importante preguntarse si estos insectos son capaces de reconocer un hospedador potencial desde cierta distancia solamente a través del calor por él emitido.

En el presente experimento se analizó la capacidad de las vinchucas de estimar la temperatura de un cuerpo situado a cierta distancia del animal, en condiciones de "lazo abierto" (*open-loop*), es decir evitando la variación de los parámetros de estimulación por efecto de la respuesta del animal.

### 3di. Materiales y métodos

El método fue tomado y adaptado de los clásicos experimentos de orientación visual en insectos desarrollado por Hassenstein

(1951) y por primera vez utilizado aquí para analizar la respuesta a estímulos térmicos en un animal.

La figura 3.7 muestra esquemáticamente la situación experimental. Los insectos, ninfas del quinto estado con un mes de ayuno, con sus ojos cubiertos por medio de pintura blanca (Tipp-Ex<sup>®</sup>), fueron suspendidos mediante un trozo de cartulina fiiado con cera al dorso y una pinza, sosteniendo un tetraedro esférico (*Spangenglobus*) de 22 mm de diámetro y 49 mg de peso, de poliestireno expandido blanco entre sus patas.

En tales condiciones, los insectos desplazan con sus patas el *Spangenglobus* al intentar caminar. Al alcanzar el extremo de una arista el animal debe decidir si tomar el camino de la derecha o el de la izquierda (en realidad es el tetraedro el que se desplaza y no el insecto). En condiciones de absoluta simetría, la probabilidad de elección de cada dirección será la misma, i.e. 50%. Si se presenta al insecto un estímulo desde alguna dirección distinta a la del eje longitudinal del cuerpo, la probabilidad de elección ya no será la misma para ambas direcciones. El insecto podrá responder girando con mayor o menor frecuencia hacia la dirección del estímulo de acuerdo a la modalidad e intensidad del mismo.

Las fuentes de estimulación térmica fueron construidas con bloques de aluminio de 9 cm de ancho, 5 cm de altura y 1 cm de espesor. Los bloques, pintados con pintura negra, fueron calentados mediante resistencias eléctricas a la temperatura deseada, la cual fue regulada por sendos termostatos electrónicos con una precisión de 0,5°C. Las fuentes se ubicaron a 45° a izquierda y derecha del plano sagital del animal suspendido y a una distancia de 10 cm del mismo.

La temperatura de las fuentes se eligió de modo de simular la temperatura de la superficie corporal de un hospedador (32°C), una temperatura a la cual en proximidad de la fuente no responden (50°C) y temperatura ambiente (18°C).

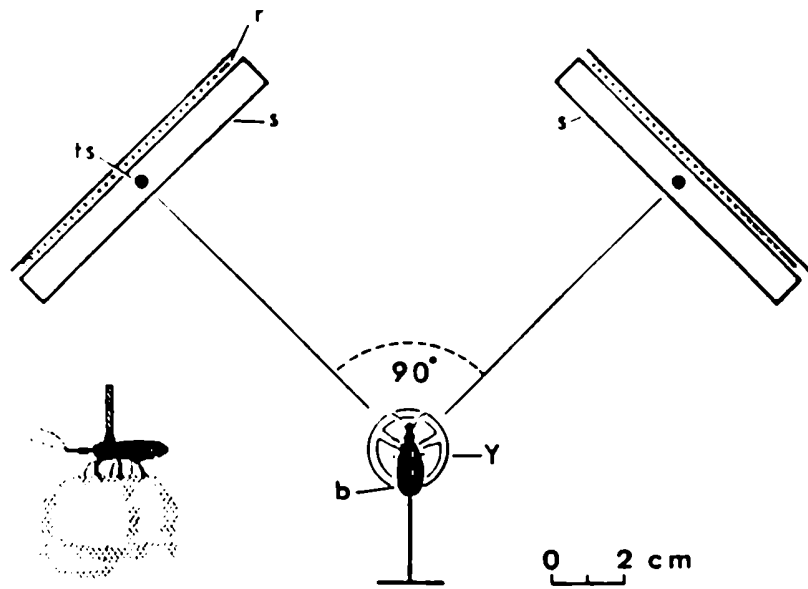


Fig. 3.7. Dispositivo utilizado en los ensayos de discriminación de la temperatura de dos fuente. *b*, insecto suspendido; *r*, resistencia eléctrica; *s*, fuentes térmicas; *ts*, sensores de temperatura; *Y*, tetraedro esférico (*Spananoglobus*).

El área experimental se aisló del experimentador mediante placas de vidrio. Las fuentes fueron limpiadas cuidadosamente para eliminar posibles olores y los insectos fueron manipulados con pinzas.

Los insectos, distribuidos en tres grupos experimentales de 10 animales cada uno, fueron presentados individualmente a las fuentes térmicas a las siguientes temperaturas: (A) 32° vs 18°C, (B) 50° vs. 18°C y (C) 32° vs. 50°C. En cada ensayo, la cantidad de elecciones en dirección a cada una de las fuentes (tendencia de giro) de cada animal fue medida durante 10 minutos. El estímulo fue presentado dos veces a cada animal, invirtiendo la posición de las fuentes para neutralizar el efecto de asimetrías en las condiciones experimentales o en la tendencia de giro espontánea (endógena) de los insectos.

La temperatura en la posición del animal experimental fue medida en cada presentación individual con un error de 0,1°C. No se encontraron diferencias entre esta temperatura y la temperatura ambiente.

Para el análisis estadístico de los datos y dada la ausencia en la literatura de método alguno para tal análisis de discriminación, se optó por utilizar el test de la  $G$  de heterogeneidad (Sokal & Rohlf, 1981).

### 3dii. Resultados

Los insectos mostraron una tendencia significativa a orientarse hacia la fuente a 32°C y a alejarse de la fuente a 50°C.

Las tablas 3.I, 3.II y 3.III muestran la tendencia de giro de cada animal experimental, el valor del estadístico  $G$  y la significación estadística de la preferencia individual hacia las fuentes a las temperaturas ensayadas. Además se calcularon la significación y homogeneidad de la respuesta del grupo de 10 insectos utilizados en cada condición experimental.



Tabla 3.I. Tendencia de giro de los insectos en el tetraedro esférico (*Spangenglobus*), cuando se presentaron dos fuentes a 32° y 18°C, como se muestra en la Fig. 3.7. Se presentan: las elecciones individuales y el valor del estadístico  $G$  para cada individuo y para el grupo.  $G$ ,  $P(1 \text{ gl})$ : estadístico y significación de la respuesta individual, 1 grado de libertad. Para la respuesta grupal.  $G_{H9}$ :  $G$  de heterogeneidad, 9 g.l.;  $G_{P1}$ :  $G$ -agrupado, 1 g.l.;  $G_{T10}$ :  $G$ -total, 10 g.l..

Insecto	Elecciones		Preferencia (%) (32°C)	Significancia	
	32°	18°		$G$	$P(1 \text{ gl})$
1	32	16	66,66	5,44	0,019
2	42	23	64,60	5,63	0,018
3	27	21	56,25	0,75	n.s.
4	43	20	68,25	8,59	0,003
5	14	4	77,77	5,88	0,015
6	25	13	65,79	3,85	0,049
7	40	10	78,43	17,52	<0,001
8	28	8	77,77	11,77	<0,001
9	44	24	64,77	5,97	0,014
10	29	16	64,44	3,81	0,050

$G_{H9} = 9,16$ ;  $P = 0,42$  (n.s.); i.e. homogeneidad en las respuestas  
 $G_{P1} = 60,60$ ;  $P < 0,0001$ ; i.e. homogeneidad en las elecciones  
 $G_{T10} = 69,22$ ;  $P < 0,0001$ ; i.e. elecciones difieren de relación 1:1

Tabla 3.II. Como la tabla 3.I, pero para temperaturas de las fuentes de 50° y 18°C.

Insecto	Elecciones		Preferencia (%) (50°C)	Significancia	
	50°	18°		G	P(1 gl)
1	26	36	41,93	1,62	n.s.
2	7	27	20,59	12,56	<0,001
3	23	19	54,74	0,38	n.s.
4	31	35	46,97	0,24	n.s.
5	20	28	41,67	1,34	n.s.
6	36	58	38,29	5,20	0,020
7	29	30	49,15	0,02	n.s.
8	31	31	50,00	0	n.s.
9	20	20	50,00	0	n.s.
10	68	62	52,31	0,28	n.s.

$G_{H9} = 16,89$ ;  $P = 0,05$ ; i.e. no homogeneidad de las respuestas  
 $G_{P1} = 4,75$ ;  $P = 0,02$ ; i.e. homogeneidad en las elecciones  
 $G_{T10} = 21,63$ ;  $P = 0,017$ ; i.e. elecciones difieren de relación 1:1

Tabla 3.III. Como las tablas 3.I y 3.II, pero para temperaturas de las fuentes de 32° y 50°C.

Insecto	Elecciones		Preferencia (%) (32°C)	Significancia	
	32°	50°		G	P(1 gl)
1	7	6	53,84	0,08	n.s.
2	89	53	62,68	9,23	0,002
3	13	15	46,43	0,14	n.s.
4	41	39	51,25	0,05	n.s.
5	35	16	68,63	7,25	0,007
6	24	10	70,59	5,94	0,010
7	27	22	55,10	0,51	n.s.
8	11	4	73,33	3,40	0,060
9	13	13	50,00	0	n.s.
10	5	6	45,45	0,09	n.s.

$G_{H9} = 12,00$ ;  $P = 0,2$  (n.s.); i.e. homogeneidad en las respuestas  
 $G_{P1} = 14,69$ ;  $P = 0,0001$ ; i.e. homogeneidad en las elecciones  
 $G_{T10} = 26,69$ ;  $P = 0,003$ ; i.e. elecciones difieren de relación 1:1

Las vinchucas mostraron una preferencia por la fuente que simula la temperatura de un hospedador potencial (32°C). Evitaron sin embargo la fuente a 50°C, a pesar que emitía un mayor flujo de energía y se encontraba a 10 cm de distancia.

A diferencia de los experimentos en los que se utilizó la fuente a 32°C. cuando se ensayó con la fuente a 50°C contra aquella a temperatura ambiente (18°C), las elecciones difieren significativamente del azar ( $P=0,017$ ) y con la misma tendencia ( $P=0,02$ ), pero la magnitud individual de la respuesta varió significativamente dentro del grupo experimental ( $P=0,05$ ).

Ningún insecto desplegó la proboscis durante el experimento (respuesta rostral).

### 3e. ¿PERCIBEN LAS VINCHUCAS LA RADIACION IR DEL HOSPEDADOR?

Cuando un animal se orienta hacia una fuente de estímulos empleando como clave la temperatura de la misma, podría utilizar cualquiera de los diferentes mecanismos implicados en el intercambio de energía como forma de calor que reconoce la física.

Uno de los aspectos más interesantes y discutidos de la termorrecepción se refiere a los mecanismos de transferencia de calor entre el emisor y el receptor. Como fue dicho anteriormente (sección 1c.), tanto la conducción a través de gradientes de aire caliente como las corrientes de convección originadas por el movimiento del aire y el flujo de radiación electromagnética son mecanismos potenciales para dicha transferencia. La percepción de radiación IR no ha sido demostrada, hasta el presente, en insecto hematófago alguno

En la serie experimental que se presenta a continuación se pone a prueba la hipótesis de percepción de radiación IR en *Triatoma infestans*.

### 3ei. Materiales y métodos

Los animales utilizados en los ensayos fueron ninfas del cuarto estadio de *T. infestans* criadas en el laboratorio y alimentadas con sangre de cabra heparinizada, utilizando un alimentador artificial. Luego de un período de ayuno de un mes, las vinchucas fueron enfrentadas individualmente a un alambre de cobre de 2 mm de diámetro calentado a 30°C, a una distancia de 4-5 cm (Fig. 3.8). La temperatura ambiente fue de 20°C. Para evitar la formación de gradientes de aire caliente y de corrientes de convección, fueron interpuestos, entre el alambre de cobre y los insectos, diversos filtros: grupo (A): vidrio (1 mm de espesor); (B): polietileno (tres capas, cada una de 0,25 mm de espesor); (C): vidrio + polietileno [(A) + (B)] y (D): un control sin filtro. El grupo (C), con la capa de polietileno orientada hacia el insecto, proporcionó un control para posibles olores en el polietileno. Para evitar el calentamiento de los filtros, estos fueron presentados en forma consecutiva en cada ensayo individual.

Cada insecto fue colocado en una recipiente plástico de 37 mm de altura y 23 mm de diámetro, con un trozo de malla plástica a modo de sustrato (Fig. 3.8a). El recipiente se cerró con malla de nylon de 1 mm de abertura.

Doce insectos se asignaron a cada grupo experimental (N=48). El número de movimientos antenales y la duración de la actividad locomotora desplegados frente al estímulo térmico fueron registrados durante 2 minutos. Dichos parámetros fueron seleccionados en razón de manifestarse con el menor umbral en la secuencia comportamental de orientación térmica y proveer medidas adecuadas para su cuantificación (sección 3a.).

Para minimizar interferencias del observador y del ambiente, los insectos, los filtros y los recipientes fueron manipulados con pinzas y el área experimental fue dispuesta como muestra la figura 3.8b. Los recipientes y los filtros fueron cuidadosamente limpiados antes del ensayo.

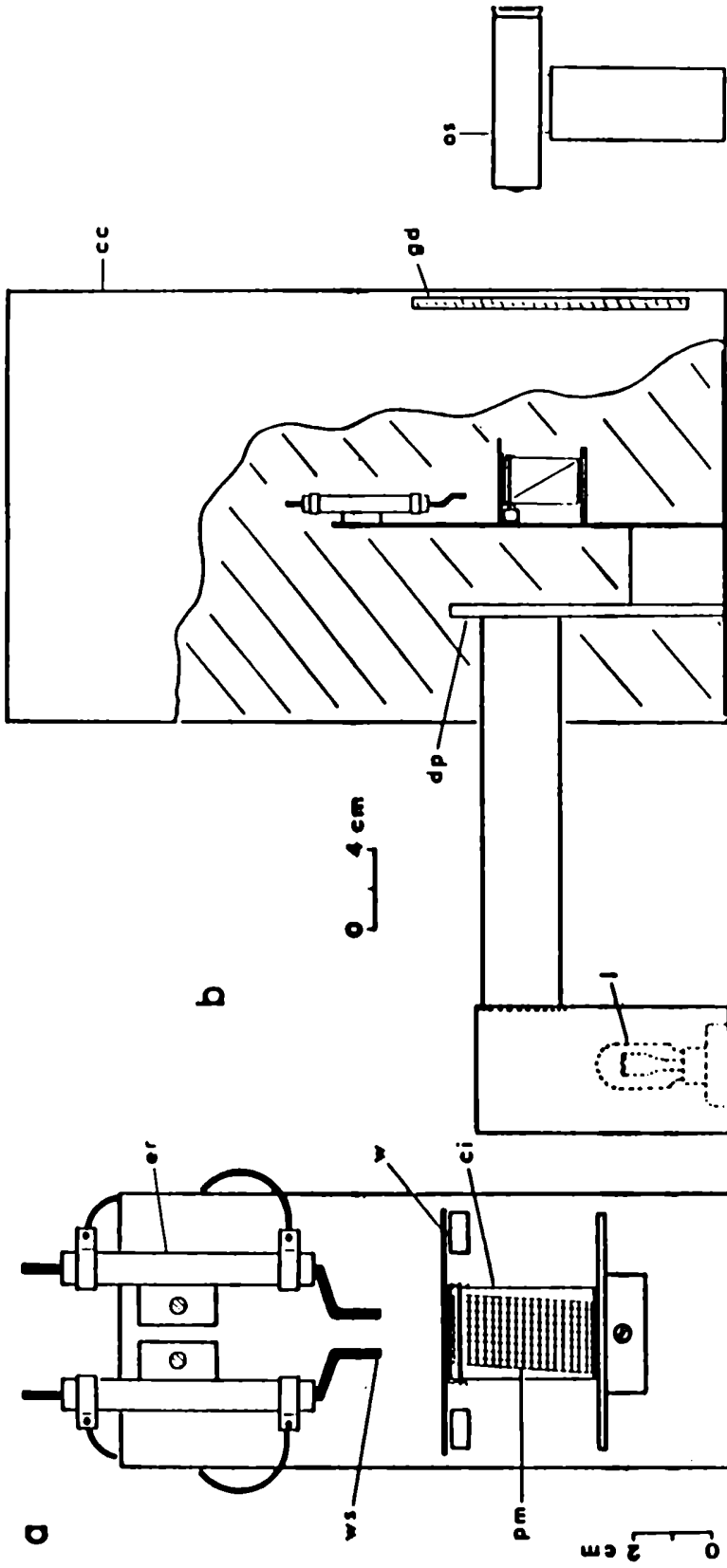


Fig. 3.8. Dispositivo utilizado para ensayar la respuesta de las vinchucas al calor radiante. El mismo es similar al presentado en las Figs. 3.1 y 3.2. (a) vista frontal parcial. (b) vista lateral. cc, caja de cartón; ci, recipiente para los insectos; dp, placa difusora; er, resistencia eléctrica; gd, puerta de vidrio; l, lámpara (15 W); os, sistema óptico de observación; pm, malla plástica; w, filtro; ws, fuente térmica. En cada ensayo solo se calentó una fuente.

La transmitancia de los filtros utilizados en los experimentos fue medida en un espectrofotómetro infrarrojo Beckman IR 10, obteniéndose las curvas presentadas en la figura 3.9. Para longitudes de onda comprendidas entre 4 y 20  $\mu\text{m}$ , que corresponden a la emisión principal de un cuerpo a 32°C (Fig. 3.9) (Hardy, 1934), la transmitancia medida fue de 36% para el filtro de polietileno, mientras que sólo de 0,2 % para el de vidrio. Para longitudes de onda de 4 a 40  $\mu\text{m}$ , que abarcan toda el área del espectro electromagnético que es de interés, fue de 51% y 0,09% respectivamente.

La temperatura en el lugar ocupado por los insectos y sobre la superficie de los filtros fue medida antes y después de cada ensayo individual y no pudo detectarse diferencia alguna con la temperatura ambiente. La temperatura fue medida con una precisión de 0,1°C con un termistor (Fenwall Electronics GC32MC1, constante de tiempo 1,6 segundos).

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el test de la  $U$  de Mann-Witney (Siegel, 1956).

### 3eiii. Resultados

Las vinchucas reaccionaron a la estimulación con los movimientos antenales característicos, en los planos horizontal y vertical. La estimulación evocó, en algunos insectos, actividad locomotora, orientada o no hacia la fuente térmica. La figura 3.10 muestra el número de movimientos antenales realizados por los 48 insectos utilizados (12 bajo cada situación experimental) y el tiempo en segundos de actividad locomotora desplegada, en los 2 minutos registrados. La tabla 3.IV muestra la significación estadística de los datos obtenidos.

En los experimentos, los insectos reaccionaron al estímulo térmico en ausencia de gradientes de aire caliente y corrientes de convección, al ser alcanzados por parte de la radiación IR emitida por la fuente, i.e. cuando el filtro de polietileno fue interpuesto entre los mismos y la fuente. Sin embargo, cuando fue

interpuesto alguno de los filtros con vidrio, el nivel de respuesta fue muy bajo o bien nulo.

En estos ensayos no fue observada nunca la respuesta rostral (extensión de la proboscis), que los insectos despliegan en proximidad de la fuente y que habría sido de esperar si los filtros se hubiesen calentado, constituyendo ellos mismos una fuente térmica.



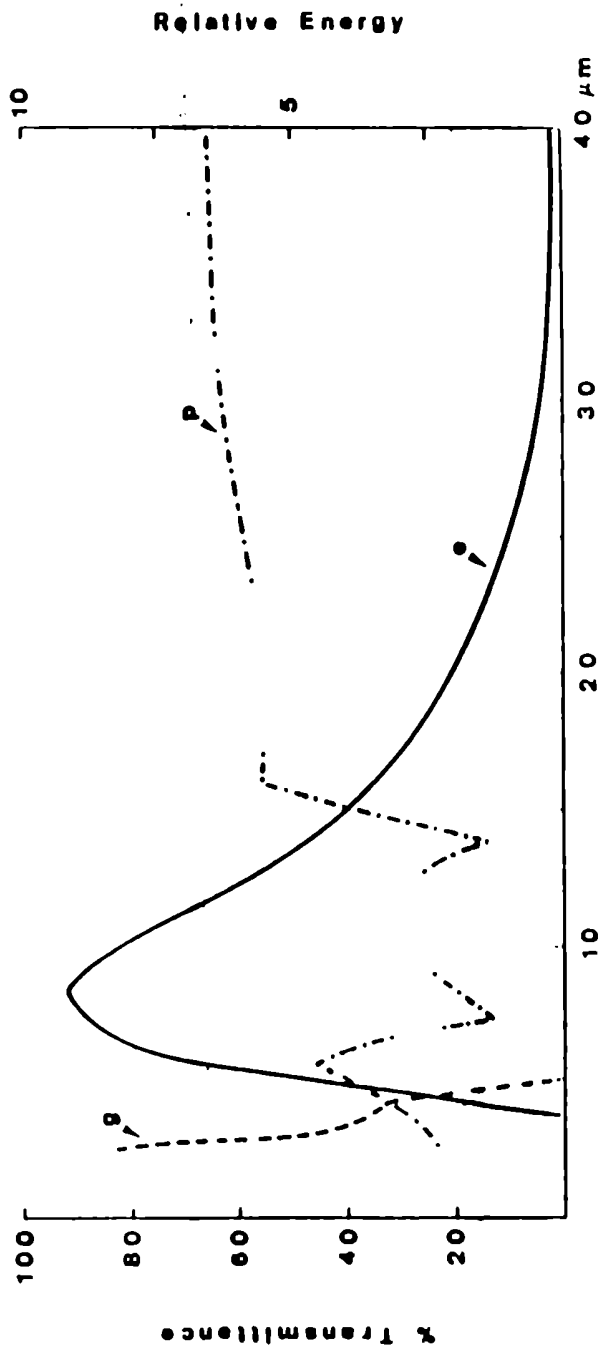


Fig. 3.9. Curvas de transmitancia de los filtros utilizados en los experimentos, medidas en un espectrofotómetro infrarrojo (Beckman IR 10) y curva de emisión de cuerpo negro a 32°C. e, curva de emisión (redibujada de Hardy, 1934); g, vidrio; p, polietileno.

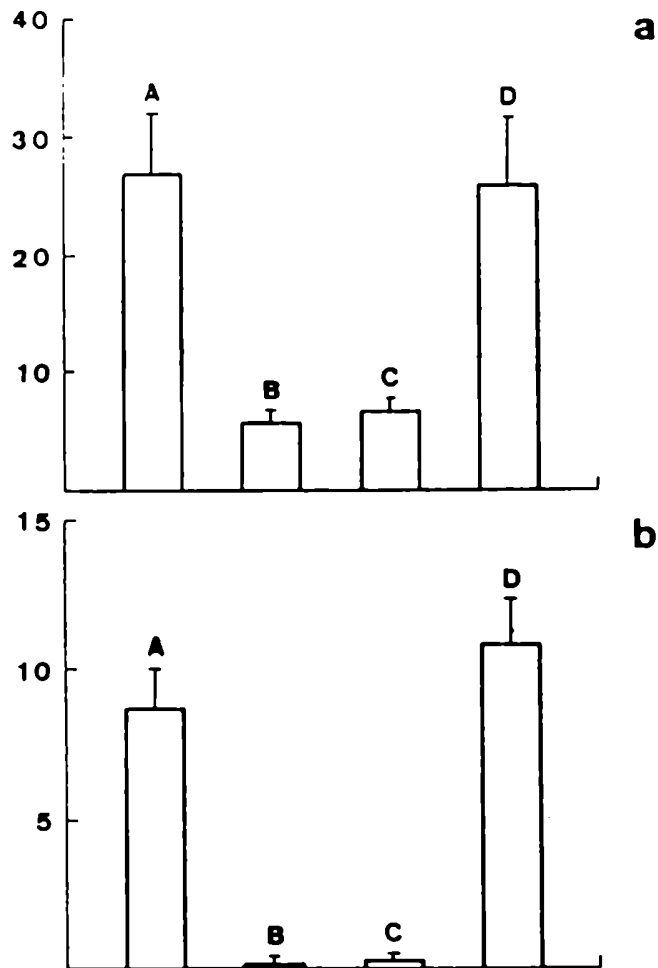


Fig. 3.10. Numero de movimientos antenales (a) y segundos de actividad locomotora (b) desplegados por los insectos cuando fue interpuesto un filtro de: (A), polietileno; (B), vidrio; (C), vidrio + polietileno y (D), control sin filtro, entre los insectos y la fuente a 30°C, en el dispositivo de la Fig. 3.8, durante 2 minutos. Valor medio + error standard (N= 48).

Tabla 3.IV. Significación estadística de las diferencias en el número de movimientos antenales y de la actividad locomotora desplegada por las vinchucas, que se presentan en la Fig. 3.10a y b, analizada según el test de la  $U$  de Mann-Whitney.

Grupos Experimentales	Significación ( $P$ )	
	Movimientos antenales	Actividad locomotora
(A) vs (B)	0,001	0,001
(A) vs (C)	0,001	0,001
(A) vs (D)	n.s.	n.s.
(B) vs (C)	n.s.	n.s.
(B) vs (D)	0,001	0,001
(C) vs (D)	0,01	0,001

Grupo (A): filtro de polietileno; (B): filtro de vidrio;  
(C): (A) + (B); (D), control sin filtro.

## **CAPITULO 4**

### **Temperatura de la sangre y comportamiento alimenticio**

Se acepta corrientemente que la temperatura de la sangre es un factor determinante primordial de la respuesta de ingestión en los insectos hematófagos (Friend & Smith, 1977). Sin embargo, nuestro conocimiento acerca de las vías sensoriales y claves involucradas en el desencadenamiento de la respuesta de ingestión es muy deficiente. La clave térmica podría entonces no estar implicada en todas las etapas comportamentales que conducen a la toma de alimento.

Por otra parte, en los estudios del comportamiento de ingestión de *R. prolixus* se considera el comportamiento de ingestión como una respuesta de tipo todo o nada (Friend & Smith, 1977). Es decir, una vez que los insectos prueban el alimento y lo reconocen como tal se desencadenaría la respuesta de ingestión, que continuaría hasta alcanzar el llenado del buche. Luego de una oferta de alimento, obtendríamos insectos que no han probado o que lo han probado pero no lo aceptan y aquellos que lo aceptaron y llenaron sus buches. De este modo, se ha analizado la efectividad de los compuestos estimulantes de la ingestión, calculando la concentración efectiva que produce un 50% de insectos que se han alimentado a pleno. La composición de la dieta no ejercería entonces un efecto modulador de la ingestión, afectando la cantidad de alimento ingerida.

En los experimentos que se describen a continuación se analiza la importancia de la temperatura de la sangre en el comportamiento alimenticio, relacionado con la integración de la información sensorial que llega por las distintas vías, i.e. antenal, rostral, etc.. La cuantificación de la ingestión no se realizará por simple reconocimiento visual de los insectos que se han alimentado (Friend & Smith, 1977), sino pesando a los insectos y calculando

la cantidad de sangre ingerida, a fin de poner a prueba la hipótesis de la ingestión todo o nada en *T. infestans*.

#### 4a. Materiales y métodos

En los experimentos se utilizaron ninfas del quinto estadio de *T. infestans* criadas en el laboratorio y alimentadas con sangre heparinizada en un alimentador artificial. Los insectos fueron alimentados en su cuarto estadio ninfal y utilizados en los ensayos 45-60 días más tarde, i.e. cerca de 20 días después de la ecdisis del quinto estadio.

El alimentador artificial utilizado (Fig. 4.1) consiste de un recipiente de vidrio para la sangre, con una membrana de látex de 60  $\mu\text{m}$  como base. Un agitador magnético, girando a 50 revoluciones por minuto a través de la acción de un imán fijado a un motor sincrónico, mantiene homogénea la temperatura de la sangre y evita la sedimentación de las células sanguíneas.

La temperatura de la sangre se controló mediante una abrazadera de fijación, de cobre, que en un extremo sostiene el recipiente con la dieta y en el otro un recipiente con agua. El conjunto fue aislado térmicamente mediante un block de poliestireno expandido. La temperatura de la dieta pudo así mantenerse constante ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), a valores seleccionados entre  $6^\circ$  y  $35^\circ\text{C}$ , modificando la temperatura en el recipiente con agua.

Una pequeña placa de acero o placa estimulante, de 3 x 15 mm, cuya temperatura se elevó a  $35^\circ\text{C}$ , por medio de una corriente eléctrica. La misma fue térmicamente aislada de la membrana de látex mediante una placa de poliestireno expandido de las mismas dimensiones, ubicada a 2 mm por debajo del recipiente con sangre.

La temperatura fue medida con una precisión de  $0,1^\circ\text{C}$  utilizando un termómetro electrónico. La temperatura ambiente osciló entre  $18^\circ$  y  $22^\circ\text{C}$ .

Luego de haber sido individualmente marcadas con pintura acrílica, las ninfas fueron pesadas al 0,01 mg (balanza Mettler H 20T). Luego fueron repartidas en grupos de 10 individuos en

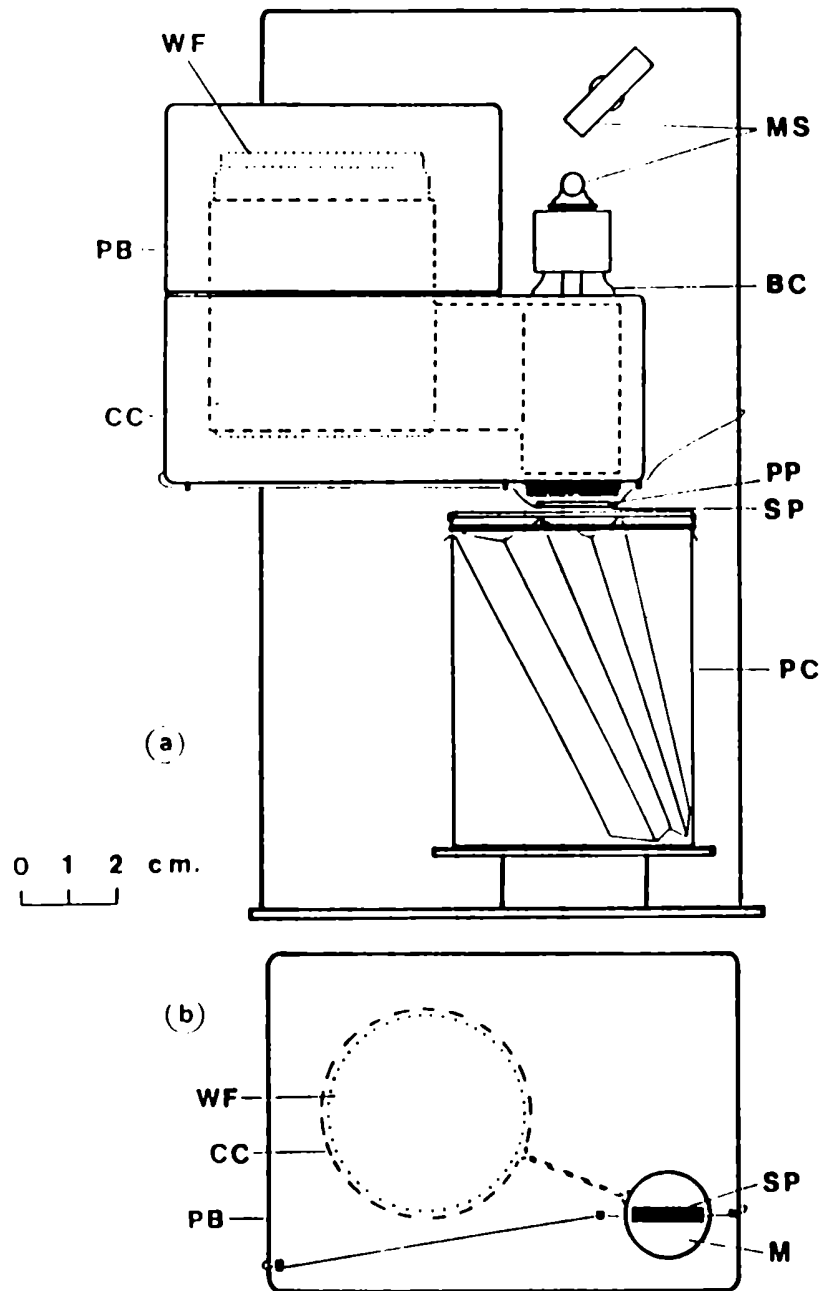


Fig. 4.1. Alimentador utilizado en los ensayos del efecto de la temperatura de la sangre en el comportamiento de ingestión. (a) vista frontal; (b) vista inferior. BC, recipiente con sangre; CC, abrazadera de cobre, M, membrana de látex; MS, agitador magnético; PB, bloque de poliestireno expandido; PC, recipiente plástico para los insectos; PP, placa de poliestireno expandido; SP, placa de estimulación; WF, recipiente con agua.

recipientes plásticos de 7 cm de altura y 5 cm de diámetro, con un trozo de papel de filtro plisado en su interior a modo de sustrato. Los insectos fueron utilizados en los experimentos veinticuatro horas más tarde.

Cada experimento se realizó de acuerdo con la siguiente secuencia:

- (a) se llenaron los recipientes con sangre y agua a una dada temperatura y se encendió el agitador magnético
- (b) una vez estabilizada la temperatura de ambos recipientes (15-20 min), se calentó la placa de estimulación a 35°C
- (c) se pesó un recipiente con insectos y se lo ubicó seguidamente en el alimentador
- (d) luego de que la primera ninfa probó el alimento, la placa estimuladora se mantuvo caliente por 2-3 min, interrumpiéndose entonces la corriente eléctrica a través de la misma
- (e) se permitió la toma de alimento hasta que el último de los insectos interrumpió espontáneamente la ingesta (duración máxima: 120 min con sangre a 6°C)
- (f) el recipiente con los insectos se pesó inmediatamente y a continuación cada individuo.

El tiempo invertido en la toma de alimento y la cantidad de sangre ingerida, expresada como mg de sangre por mg de insecto ayunado, fueron medidos para cada insecto. Para compensar la posible pérdida de orina o heces durante el experimento, fue calculado un factor de corrección mediante la siguiente ecuación:  $F=(Wc-Wi)/Wt$ ; donde  $Wc$  corresponde al aumento de peso de recipiente con los insectos,  $Wi$  al aumento total de peso de los insectos individualmente pesados y  $Wt$  al peso total de los insectos alimentados. La corrección aumentó los valores de ingestión medidos en un 2-4%.

Para poner en evidencia eventuales interferencias de otras claves (visuales, olfativas) en la orientación, se realizaron

experimentos control con la placa estimulante a temperatura ambiente y la sangre a valores entre 5° y 11°C.

Se utilizó un total de 200 ninfas, 10 en cada uno de 20 ensayos. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el test de ANOVA para regresión lineal.

#### 4b. Resultados

La respuesta de los insectos fue esencialmente similar a la relatada en la sección 3a. para un estímulo térmico. Cuando las vinchucas "despertaban" del estado de akinesis, movían ambas antenas simultánea o alternadamente, en forma discontinua. Comenzaba luego la actividad locomotora y, en proximidad de la fuente de alimento, la proboscis era extendida, las antenas retraídas y las piezas bucales contactaban la membrana. Finalmente, ésta era atravesada por los estiletes y comenzaba la ingestión. A veces, los insectos contactaban repetidas veces la membrana antes de picar. Algunas, sin embargo, no la perforaron en absoluto, luego de realizar breves y rápidos contactos durante períodos que variaron entre algunos segundos a dos minutos.

En los experimentos control, sin estimulación térmica, sólo fueron observados ocasionales movimientos de las antenas.

La figura 4.2 muestra que el número de ninfas que se alimentaron aumentó con la temperatura de la sangre. Este hecho es consistente con la observación que la frecuencia de los contactos interrumpidos con la membrana (i.e. contactos sin picar) disminuye con el aumento de la temperatura de la sangre.

Como se observa en la tabla 4.I, la cantidad de sangre ingerida no varió con la temperatura de la misma. La ingestión fue similar tanto a temperaturas muy por debajo de los valores que una vinchuca puede hallar al alimentarse sobre un hospedador homeotermo, como a valores cercanos a la misma.

La figura 4.3 muestra que la cantidad de sangre ingerida sigue una distribución que no difiere significativamente de una curva de



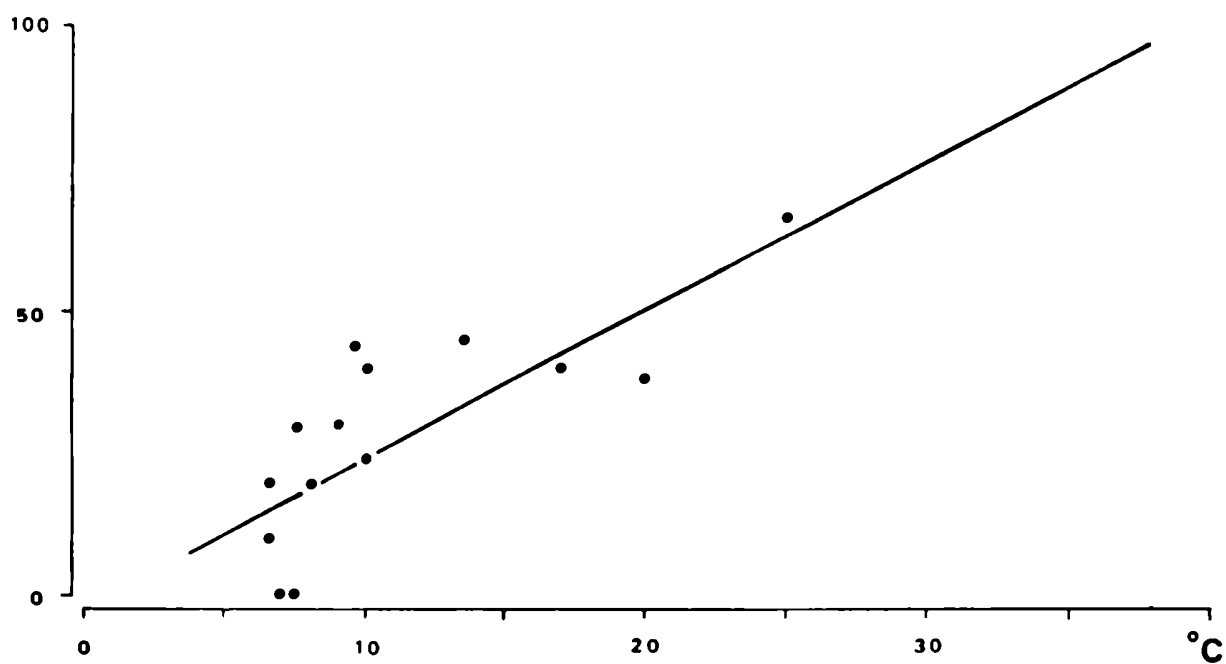


Fig. 4.2. Relacion entre la temperatura de la sangre en el alimentador y el porcentaje de insectos que se alimentaron en cada grupo. Ecuación de regresión:  $y = 2,58 x - 1,71$  (test de ANOVA,  $P < 0,001$ ).

Tabla 4.I. Ingestión de sangre, expresada como mg de sangre ingerido por mg de insecto ayunado, para dos rangos de temperaturas de la sangre en el alimentador

Intervalo de Temperatura	N	Ingestión (media $\pm$ d.s.)
6° - 15°C	10	4,61 $\pm$ 0,47
20° - 35°C	24	4,31 $\pm$ 0,43

distribución Gaussiana. El llenado del buche no es, por lo tanto, una respuesta del tipo todo\_o\_nada en *T. infestans*.

El tiempo demorado por los insectos en la ingestión de alimento disminuyó con el aumento de la temperatura del mismo (Fig. 4.4, línea punteada). Ya que la cantidad ingerida es independiente de este factor, la tasa promedio de ingestión aumenta con la temperatura de la sangre (Fig. 4.4, línea llena).

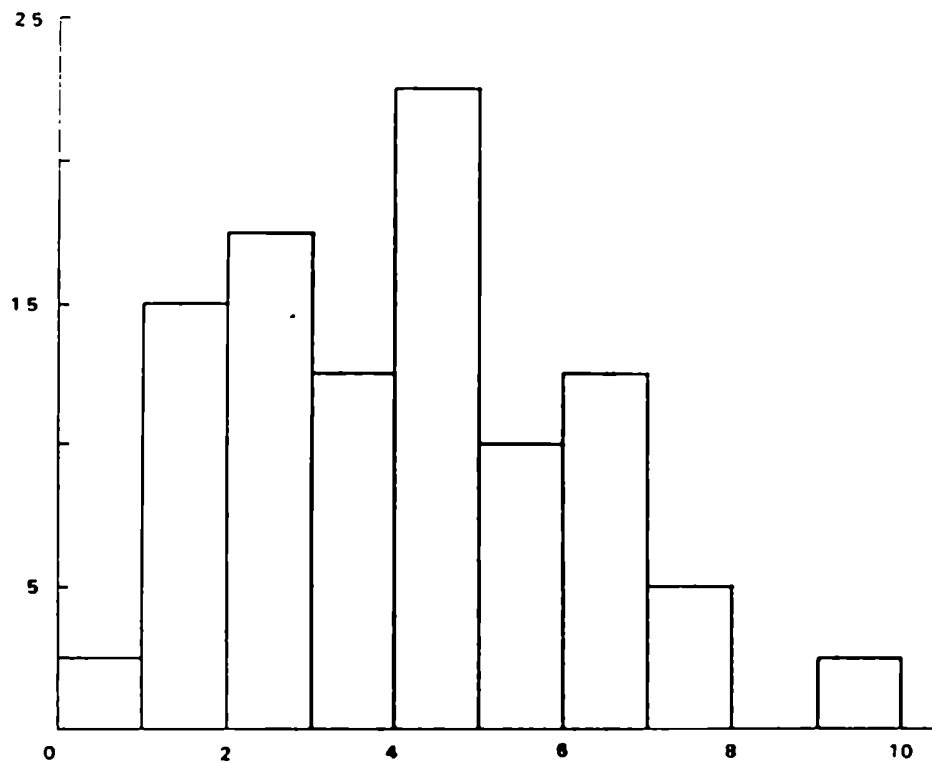


Fig. 4.3. Histograma de frecuencia de la cantidad de alimento ingerida a todas las temperaturas ensayadas. La distribución no difiere de una curva normal (test de Kolmogorov-Smirnov), asimetría: 0,47; kurtosis: 2,96. Ecuación de regresión para la relación entre cantidad ingerida y temperatura de la sangre:  $y = -0,009 x + 4,31$  (test de ANOVA, n.s.).

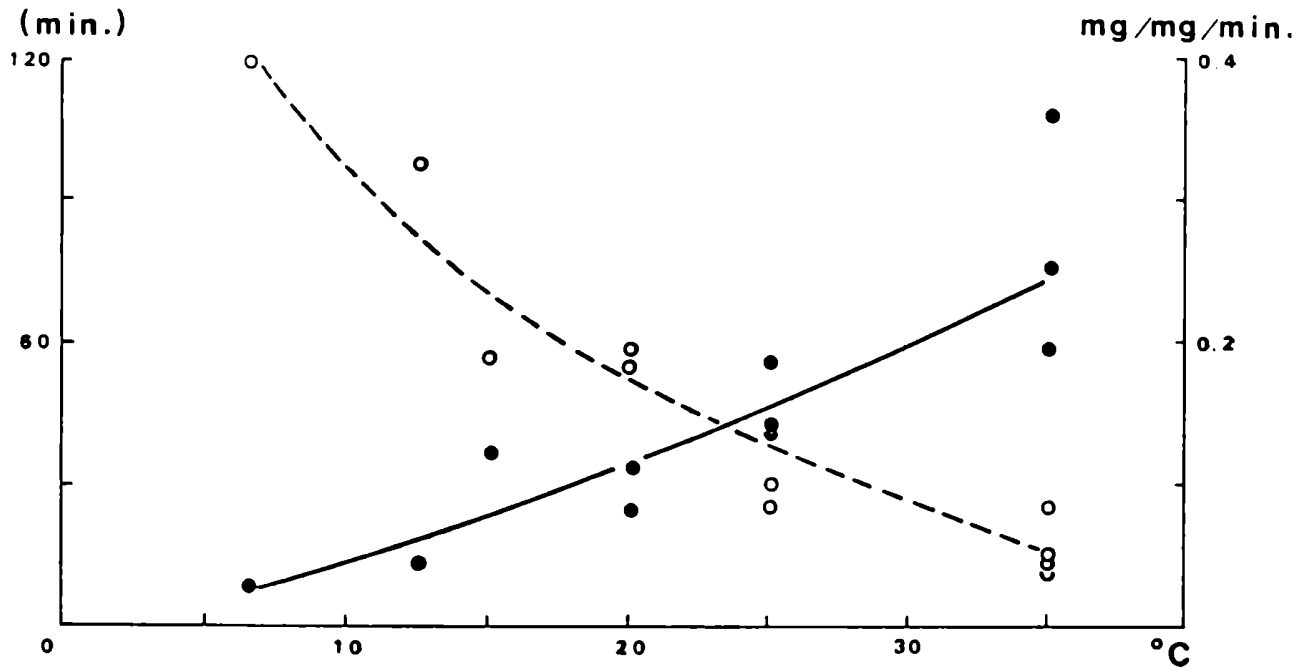


Fig 4.4. Curvas de regresión del tiempo demorado en la ingestión (línea punteada) y la velocidad de ingestión (línea llena) a diferentes temperaturas de la sangre. Los puntos representan valores individuales. Análisis de regresión del tiempo de ingestión:  $y = 242,33 - 63,3 \ln x$  (test de ANOVA,  $P=0,001$ ) y de la velocidad de ingestión:  $y = 0,138 x^{1,31}$  (test de ANOVA,  $P=0,003$ )

## **CAPITULO 5**

### **Preferencia térmica**

La preferencia térmica de un animal es medida con frecuencia bajo condiciones controladas pero por un corto período de tiempo. En la mayoría de los casos se registra la posición de los mismos en un gradiente de temperatura luego de un cierto tiempo en la arena experimental. Estos resultados son importantes, pero no permiten predecir el comportamiento de los animales bajo condiciones distintas a las de los experimentos.

Di Luciano (1983) halló que ninfas del primer estadio de *T. infestans* tanto recién alimentadas como no alimentadas, prefieren una temperatura de 26°-27°C. Hasta el presente no se dispone de ninguna otra información sobre este comportamiento, como por ejemplo su variación a lo largo del día.

En las secciones siguientes se analiza el comportamiento de adultos de *T. infestans* en un gradiente de temperatura. En los experimentos se registró la preferencia térmica y la agregación de los insectos, la variación diaria y con el ayuno de ambos comportamientos, y la temperatura preferida por las hembras para oviponer. También se realizó un ensayo para detectar eventuales interferencia de la variación de la humedad relativa a lo largo del gradiente en el comportamiento de los insectos.

#### 5a. Materiales y métodos

Se utilizaron insectos adultos, criados en el laboratorio y alimentados semanalmente con sangre de oveja citratada en el alimentador artificial. Veinte días después de la ecdisis imaginal, diez hembras marcadas en el tórax con pintura acrílica para su identificación y diez machos sin marcar fueron alimentados y colocados en el gradiente de temperatura que muestra la figura 5.1.

El gradiente fue generado en una arena de acrílico de 35 x 9 x 3.5 cm con una cubierta de vidrio. El piso de la arena se cubrió

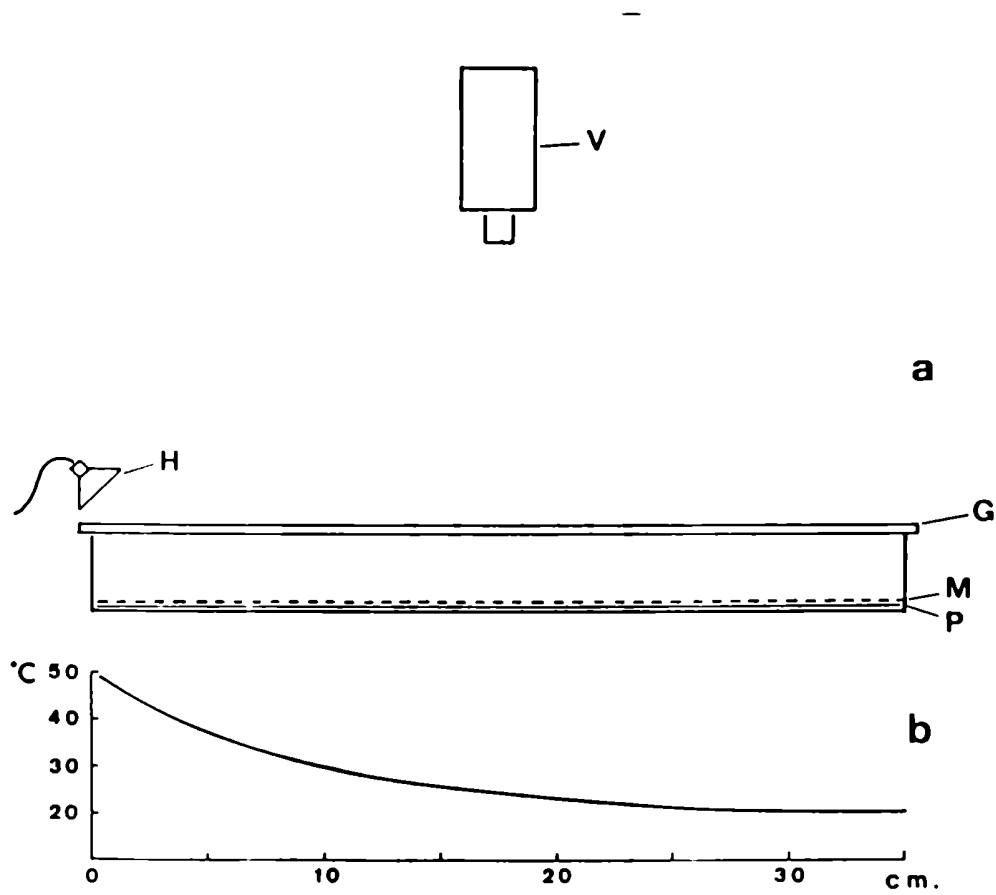


Fig 5.1. a) Vista lateral esquemática de la arena con el gradiente de temperatura. G, cubierta de vidrio; H, calefactor eléctrico; M, malla plástica; P, papel de filtro; V, cámara de video. b) variación de la temperatura en función de la distancia al calefactor.

con papel de filtro y una malla plástica que evitaba que los huevos rueden y sean desplazados. En un extremo, un calefactor eléctrico mantenía 50°C. En el otro extremo, la temperatura alcanzaba 20°C. siendo esta la temperatura constante de la cámara climática en que fue llevado a cabo el experimento. En los bordes laterales de la cubierta de vidrio se marcaron zonas de 1 cm de ancho. Utilizando una termocupla de 0,1°C de precisión se midió la temperatura en cada zona. Para comparar la temperatura ambiente con la temperatura corporal de los insectos, algunas vinchucas fueron decapitadas y la termocupla implantada en el tórax, sellando el orificio con Vaselina<sup>R</sup>. Los insectos sobrevivieron varias horas y fue posible medir repetidamente la temperatura corporal de los mismos en el gradiente. Sólo fueron halladas diferencias de  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  entre la temperatura corporal y la ambiente.

Sobre la arena se impuso un ritmo de iluminación de 14 horas de luz (06:00-20:00, 60 lux) y 10 horas de oscuridad.

La posición de los insectos se registró durante 10 segundos, cada 30 minutos, mediante una cámara de video. Durante el registro, la arena fue iluminada con una lámpara de 15 Watt de potencia (120 lux).

Luego de 17 días de iniciado el experimento, las vinchucas fueron alimentadas, los huevos puestos en cada zona del gradiente contados y recogidos, y los insectos devueltos a la arena. Esta segunda fase del experimento duró 12 días. Finalmente los huevos fueron contados y recogidos y las secuencias filmadas analizadas.

Para el análisis de las aproximadamente 1400 secuencias de video, las coordenadas espaciales  $x$  e  $y$  de cada insecto fueron leídas imagen por imagen por medio de una plaqueta digitalizadora y almacenadas en una computadora. Estos datos permitieron calcular la posición media de los insectos en relación con la temperatura.

Medida la humedad relativa en las diferentes zonas del gradiente se comprobó una variación de la misma de 56% en el



extremo más caliente a 70% en el otro extremo (precisión  $\pm 5\%$ ). Para tener una idea de la posible interferencia de este factor ambiental en los experimentos de preferencia térmica se generó un gradiente de humedad relativa utilizando soluciones salinas saturadas. En una cámara termostatzada a 28°C y dividida en 6 compartimentos se generaron las siguientes humedades relativas: A, 85% (KCl); B, 75% (NaCl); C, 64% (NaNO<sub>2</sub>); D, 56% (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); E, 45% (KNO<sub>2</sub>); F, 34% (MgCl<sub>2</sub>).

Cinco hembras y cinco machos recién alimentados se colocaron en la cámara y se registró la ubicación de los mismos siempre a la misma hora (10:00) durante 20 días. Un ritmo de iluminación artificial idéntico al del experimento principal fue impuesto en el área experimental.

## 5b. Resultados

### 5bi. Termopreferencia

La preferencia térmica no fue un fenómeno estático, sino un proceso dinámico que mostró un ritmo diario de variación. La preferencia fue fuertemente afectada, además, por el nivel de ayuno de los insectos.

Un ritmo de variación diaria, con una amplitud de aproximadamente 2°C independientemente del valor medio de la temperatura preferida, puede apreciarse en la figura 5.2, promediado para los 17 días del primer período experimental. Durante la fotofase el valor medio aumenta, con un máximo al apagarse la luz, para disminuir luego en el transcurso de la noche.

En la figura 5.3 puede observarse que durante los primeros días siguientes a la alimentación, los insectos prefirieron una temperatura media de 28°-29°C, posteriormente se desplazaron hacia sitios de menor temperatura, pero manteniendo el ritmo de termopreferencia. Al cabo de 12 días, la temperatura preferida decayó a 25°-26°C. Luego de ser alimentados por segunda vez prefirieron nuevamente un valor de temperatura más alto, de 27°-

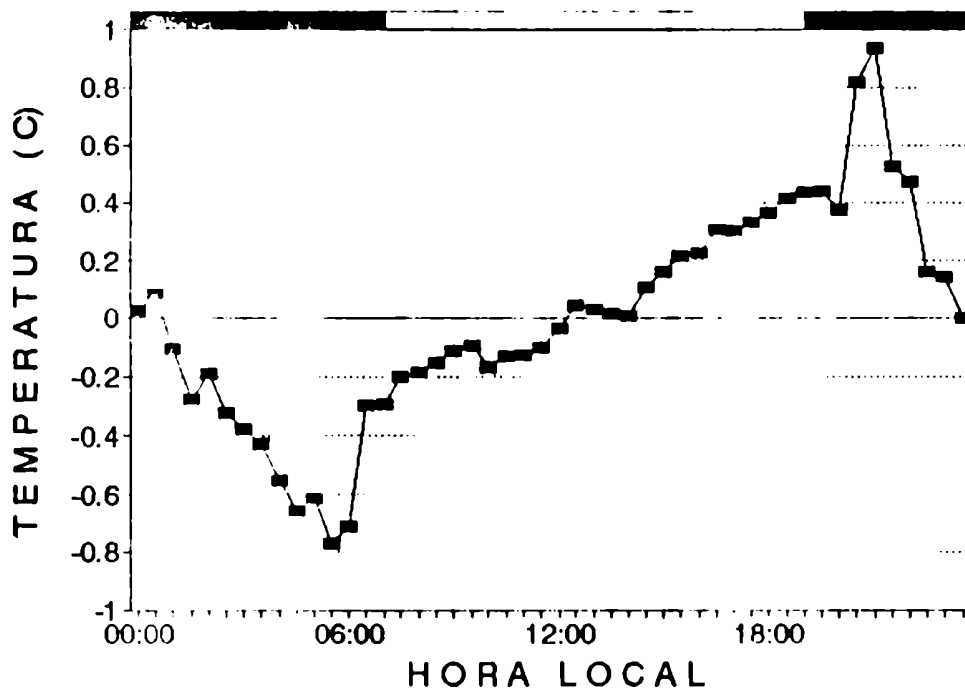


Fig. 5.2. Variación diaria de la temperatura preferida. La desviación del valor medio de cada día fue calculado para cada intervalo de media hora y promediado durante los 17 días de la primera fase experimental. En la parte superior se indican los períodos de luz y oscuridad.

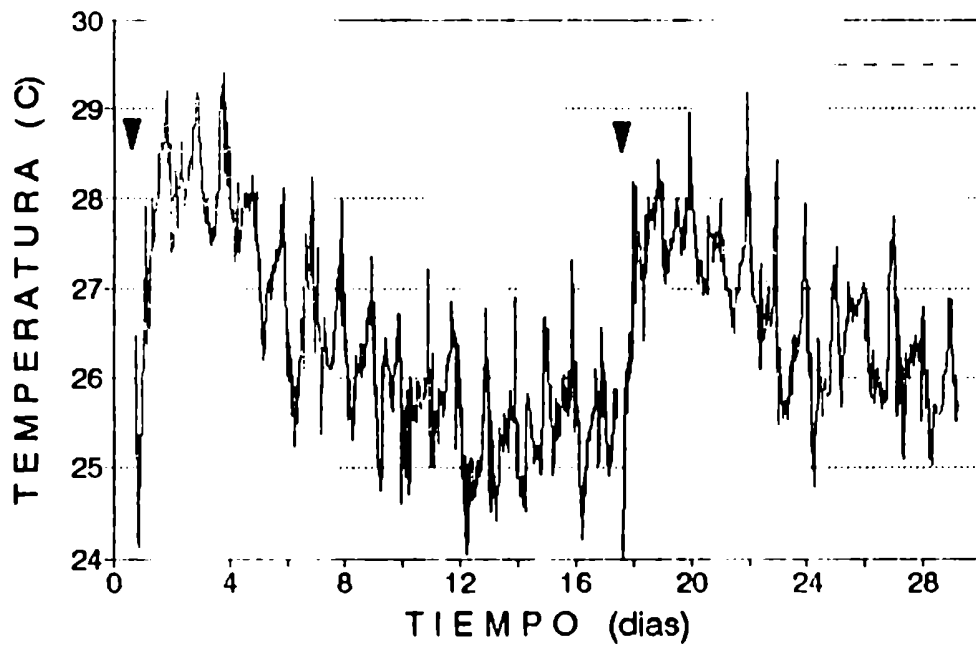


Fig. 5.3. Preferencia térmica en función del tiempo de ayuno, medida cada 30 minutos y promediada para los 20 insectos en el gradiente. Las flechas indican la alimentación de los insectos y la línea superior los períodos de luz y oscuridad.

28°C. para declinar luego lentamente. Los valores observados durante los 2 días posteriores a la alimentación y los últimos 2 días de cada fase del experimento difieren significativamente ( $P < 0.001$ . test de la Mediana).

No se observaron diferencias entre el comportamiento de los machos y el de las hembras marcadas.

#### 5bii. Preferencia térmica para la oviposición

La figura 5.4 presenta la distribución de los huevos puestos a las diferentes temperaturas en el gradiente. Los resultados fueron similares en ambas fases del experimento y mostraron un máximo destacado a 29°C y uno secundario a 26°C. El análisis estadístico de las frecuencias de oviposición observadas en cada intervalo de temperatura muestra que ambos picos, a 26° y a 29°C, difieren significativamente de las frecuencias esperadas en los mismos intervalos. tanto de una distribución uniforme como de una distribución normal con la misma media y desviación standard ( $G$ -test,  $P < 0.01$ ). El análisis del tiempo invertido por los insectos en cada zona del gradiente, no revela correlación alguna entre este parámetro y los máximos de oviposición observados.

#### 5biii. Orientación en un gradiente de humedad relativa

Como puede apreciarse en la figura 5.5, en el gradiente de humedad los insectos fueron siempre hallados alrededor del 40% de humedad relativa. No se observó entonces variación alguna que pudiera correlacionarse con el desplazamiento de los insectos en el gradiente de temperatura, en función del ayuno. Tampoco se observaron diferencias en el comportamiento de machos y hembras.

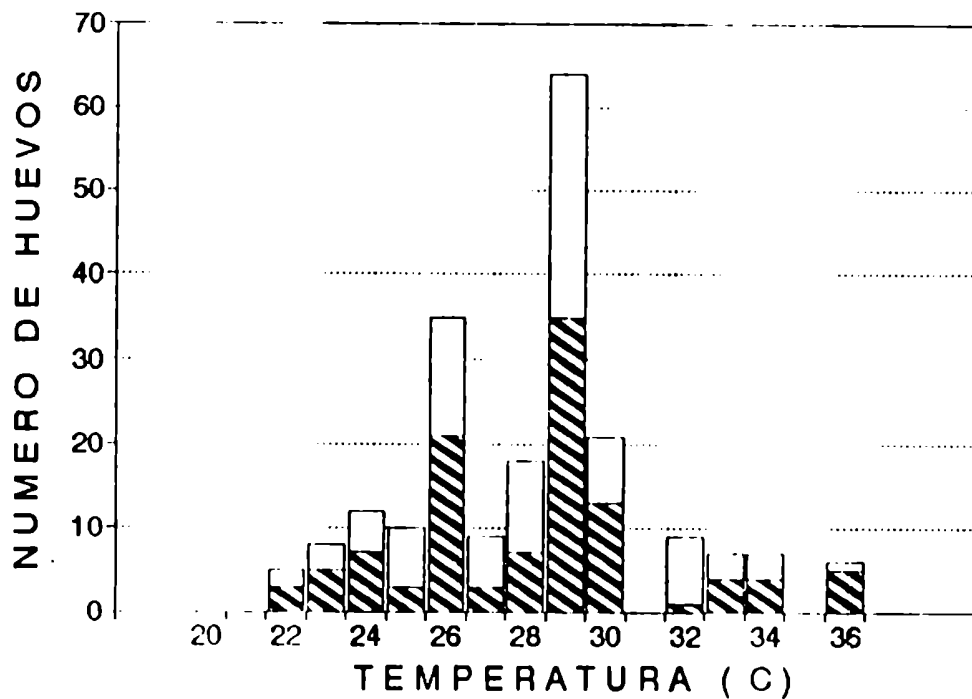


Fig. 5.4. Preferencia térmica para la oviposición. Para cada temperatura se representa la cantidad de huevos puestos durante la primera (barras rayadas) y segunda (barras claras) fase experimental (N= 211). Ambos picos, a 26° y 29°C difieren significativamente de las frecuencias esperadas tanto de una distribución uniforme, como de una distribución normal, con igual valor medio y desviación standard, en los mismos intervalos (test de la G,  $P < 0,01$ ).

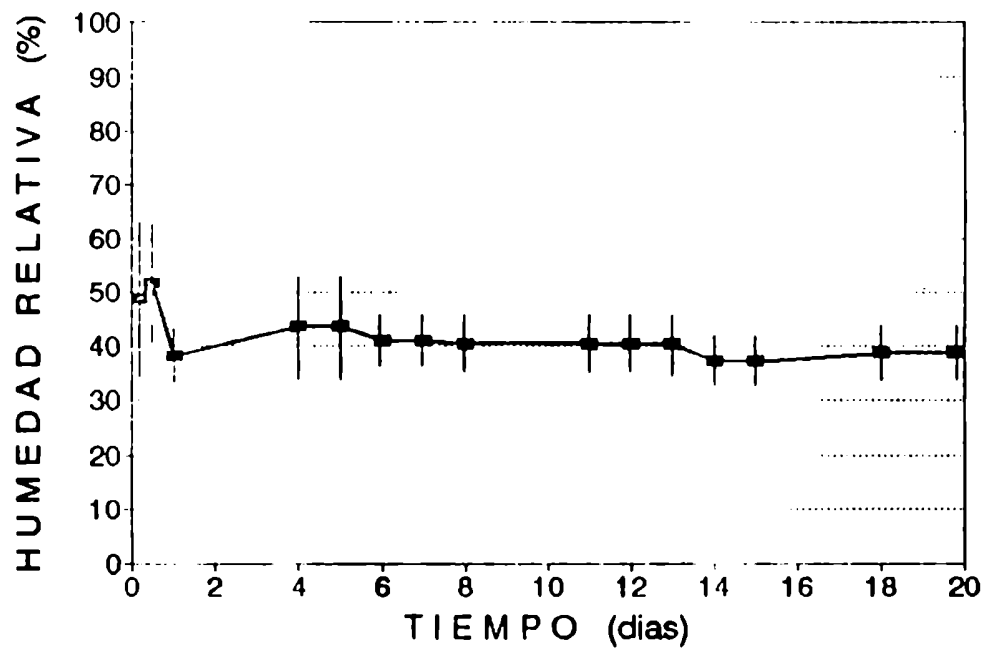


Fig. 5.5. Distribución de las vinchucas en el gradiente de humedad relativa en función del tiempo. Valor medio  $\pm$  desviación standard (N= 10).

## **CAPITULO 6**

### **Clave térmica y orientación temporal**

Como fue comentado previamente, en las vinchucas se han descrito ritmos diarios de actividad locomotora (Wiesinger, 1956; Constantinou, 1979; 1984a; Núñez, 1982; Settembrini 1984), de actividad de vuelo (Lehane & Schofield, 1982), de oviposición (Constantinou, 1979, 1984b; Ampleford & Davey, 1989), de ecdisis (Ampleford & Steel, 1982; Ampleford, 1985), de atracción hacia la luz beta (Bertram, 1971), de agregación (Lazzari, no publ.), de preferencia térmica (sección 5bi.) y de eclosión del huevo (Lazzari, 1990). La naturaleza endógena demostrada en el caso de los ritmos de actividad locomotora, de oviposición, de eclosión del huevo y de ecdisis, permite considerar a los mismos como auténticos ritmos circadianos. Entre ellos, la actividad locomotora es el parámetro que puede ser cuantificado con mayor facilidad, por lo que se lo ha seleccionado para realizar el presente estudio.

En este capítulo se continuará con el análisis de la orientación térmica de las vinchucas, pero no ya en el espacio, sino en el tiempo. En primer término se caracterizará la respuesta circadiana de *T. infestans* a ciclos de iluminación (LD) bajo las condiciones experimentales utilizadas. Luego se estudiará el efecto de la temperatura ambiente sobre la actividad de los insectos y sobre la respuesta a ciclos LD. Se estudiará a continuación la respuesta a ciclos térmicos diarios, como única señal de sincronización. Se pondrán después en competencia ciclos ambientales de iluminación y temperatura en diferentes relaciones de fase. Finalmente se analizará el efecto de la antenectomía sobre la respuesta a ambas señales. térmica y lumínica.

## 6a. Materiales y métodos

Para hacer comparables los resultados a aquellos obtenidos por otros autores, se utilizó el mismo método que fuera empleado por Constantinou (1979, 1984a) y Settembrini (1984) para registrar la actividad de las vinchucas.

El actómetro, representado en la figura 6.1, es una variante del modelo arquetípico de caja oscilante, desarrollado por Szymanski (1914). Se trata de un cilindro de 10 cm de largo y 3 cm de diámetro, cerrado en ambos extremos, hecho con malla plástica de 1 mm de abertura. Un corte en la región media superior permite el ingreso de los insectos. El cilindro se encuentra adherido a una varilla de madera balsa del mismo largo, de 0,5 cm de lado, en la que se fijó transversalmente media hoja de afeitar en su punto medio. El conjunto se balancea sobre una placa de cobre, apoyado sobre el lado libre de la media hoja de afeitar. Un alambre de cobre, con un extremo fijado a la media hoja de afeitar y el otro suelto, abre y cierra un circuito eléctrico, dependiendo del movimiento del actómetro, entre la placa de cobre que sostiene el conjunto y una segunda, más pequeña, conectada al registrador. El actómetro, de unos 5 gramos de peso, se desplaza aproximadamente  $1^{\circ}$ - $2^{\circ}$  al cruzar un insecto su línea media, abriéndose o cerrándose el circuito.

Para el registro de la actividad se utilizó un registrador de eventos de tres canales. A cada canal se conectaron 5 actómetros, luego de atravesar cada señal individual un filtro pasa alto y un diodo que transforman el escalón producido al cerrarse el circuito en un pulso.

Al igual que los autores citados anteriormente, se utilizaron machos adultos criados en el laboratorio a  $30^{\circ}\text{C}$ , con un ritmo de iluminación de 12 horas de luz (60 lux) y 12 de oscuridad (LD 12:12). Los insectos fueron alimentados artificialmente con sangre de oveja citratada. En todos los casos, los insectos fueron alimentados y colocados en los actómetros 24 horas más tarde.



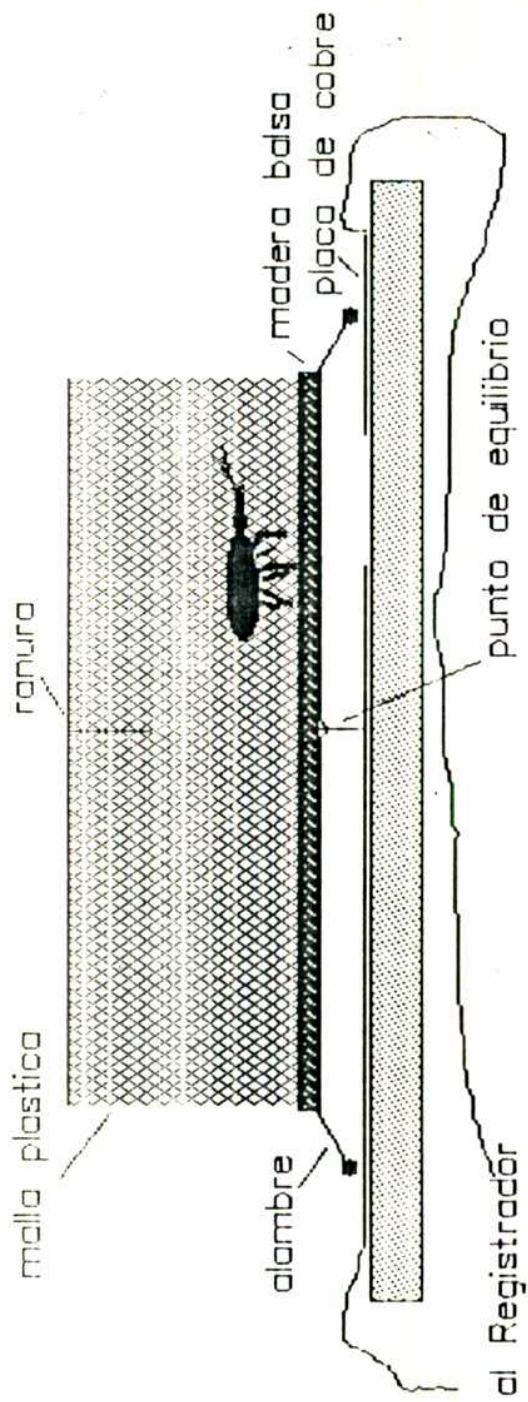


Fig. 6.1. Actómetro utilizado para registrar la actividad locomotora de *T. infestans*, en relación a ritmos diarios de iluminación y/o temperatura ambiente.

Los actómetros se ubicaron en una cámara termostatzada mediante termostatos electrónicos de precisión al 0,5°C, a la temperatura correspondiente o de acuerdo a un programa térmico. El área donde se encontraban los actómetros se iluminó desde el exterior de la caja para evitar modificaciones en la temperatura con la iluminación. Para ello se utilizó un tubo fluorescente cuya luz fue atenuada hasta obtener una iluminación de 25 lux uniforme en el interior de la cámara. Mediante temporizadores se impusieron ciclos de iluminación y/o de temperatura, según se describirá a continuación.

En cada serie experimental, se detallarán la condición del entrenamiento previo de los insectos, la temperatura y los programas de iluminación o el ciclo de temperatura que correspondan en cada caso.

En las abscisas de todos los gráficos de actividad versus tiempo, este último parámetro se expresa como tiempo circadiano, a fin de independizarlo de la hora local. La hora cero del tiempo circadiano corresponde al encendido de la luz o bien al aumento de la temperatura en el caso de ritmos térmicos. En las ordenadas se presenta en los registros la cantidad de movimientos por individuo por hora, promediada para 10 insectos. Si bien este procedimiento podría enmascarar ciertas características de la respuesta, se adoptó por representar mejor la respuesta de un grupo de insectos, que es lo que se quiere medir. Los registros individuales, muy comunes en la bibliografía, si bien permiten analizar ciertas características de los ritmos excluyendo la variación individual, dificultan la visualización de la respuesta global. En ciertos casos, como en la mosca tse-tse (*Glossina morsitans*), hay componentes de la actividad circadiana que no son evidentes en registros individuales y sólo pueden detectarse promediando las respuestas de varios individuos (Brady, 1988).

## 6b. Resultados

### 6bi. Temperatura y actividad circadiana

En esta serie experimental se midió la actividad de los insectos sometidos a un ritmo de iluminación LD 12:12 durante 8 días y luego mantenidos en oscuridad (DD) o iluminación constante (LL) a diferentes temperaturas.

Se describirá primeramente la respuesta del grupo mantenido a 30°C. En los registros realizados bajo régimen de iluminación LD 12:12 (Fig. 6.2) se observan claramente dos períodos de actividad intensa, uno en las primeras horas de la fase oscura y otro al encenderse la luz.

Los registros realizados bajo condiciones de oscuridad constante (DD) (Fig. 6.3), permiten observar dos hechos importantes. Primeramente que el segundo máximo se mantiene en condiciones constantes, aunque sólo durante unos días. En segundo lugar, que su período espontáneo de oscilación difiere del correspondiente al primer máximo de actividad. Mientras el primer máximo mantiene un período muy cercano a 24 horas, el segundo osciló a razón de un ciclo cada 22h 15m, hasta fisionarse con el primero. Luego de este momento sólo puede distinguirse un único pico en los registros. Idéntico patrón puede observarse en los registros realizados por Settembrini (1984, Fig. 4, p. 208).

Al imponer un régimen de iluminación constante (LL) luego de un período de 8 días en LD 12:12 (Fig. 6.4), se observa la desaparición de uno de los máximos. Dada las características de la transición, el único máximo que se observa, el cual oscila con un período espontáneo de 25h 20m, se interpreta como el segundo de los máximos que aparecen en LD, i.e. el del amanecer. Al no apagarse la luz a la hora correspondiente (12:00) no se observa actividad hasta el momento en que debería encenderse nuevamente. A partir de entonces se observa un único pico que mantiene un período más o menos constante.

Al analizar la actividad de los insectos a 20°C (Fig. 6.5), también se observa la presencia de dos picos de actividad con la

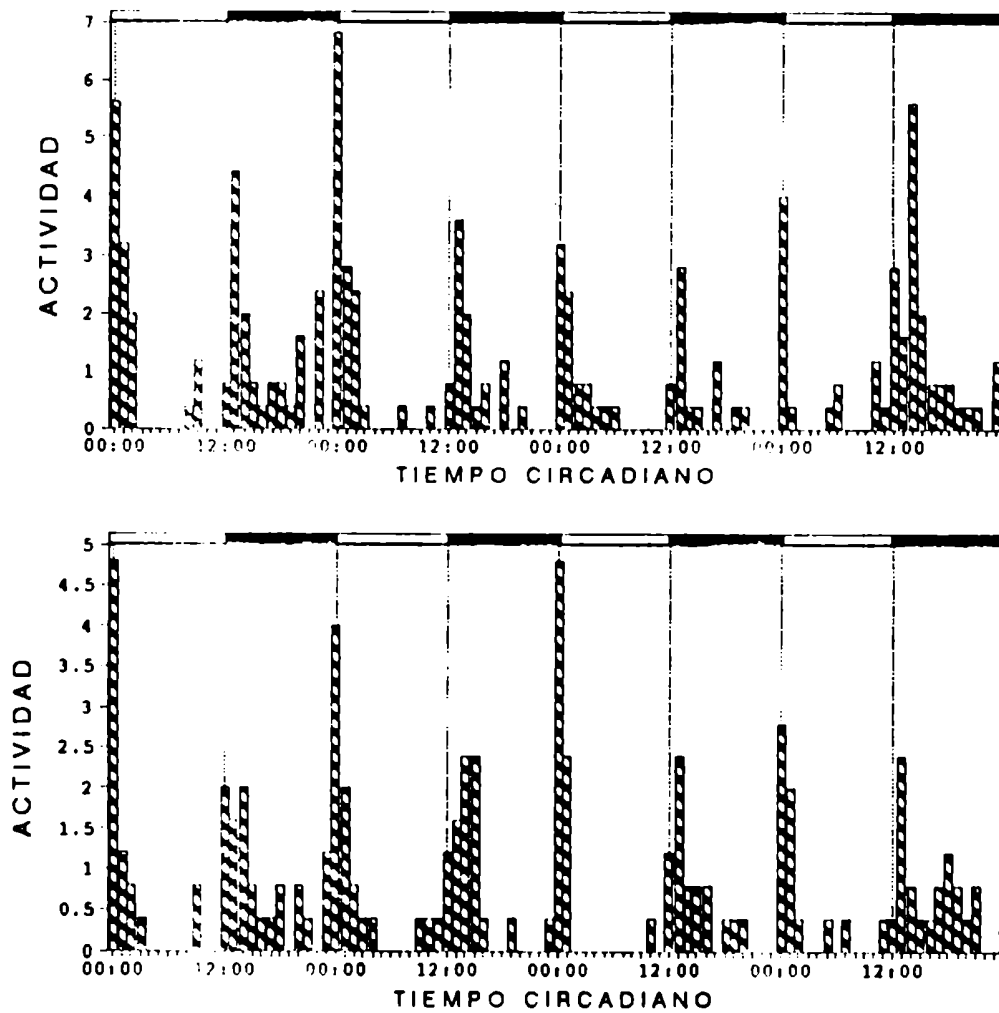


Fig. 6.2. Actividad locomotora durante 8 días sucesivos, expresada como número de movimientos de cada actómetro por hora, promediado para diez insectos, bajo un régimen de 12 horas de luz (25 lux) y 12 horas de oscuridad, a 30°C. La cero hora del tiempo circadiano corresponde al comienzo de la fotofase.

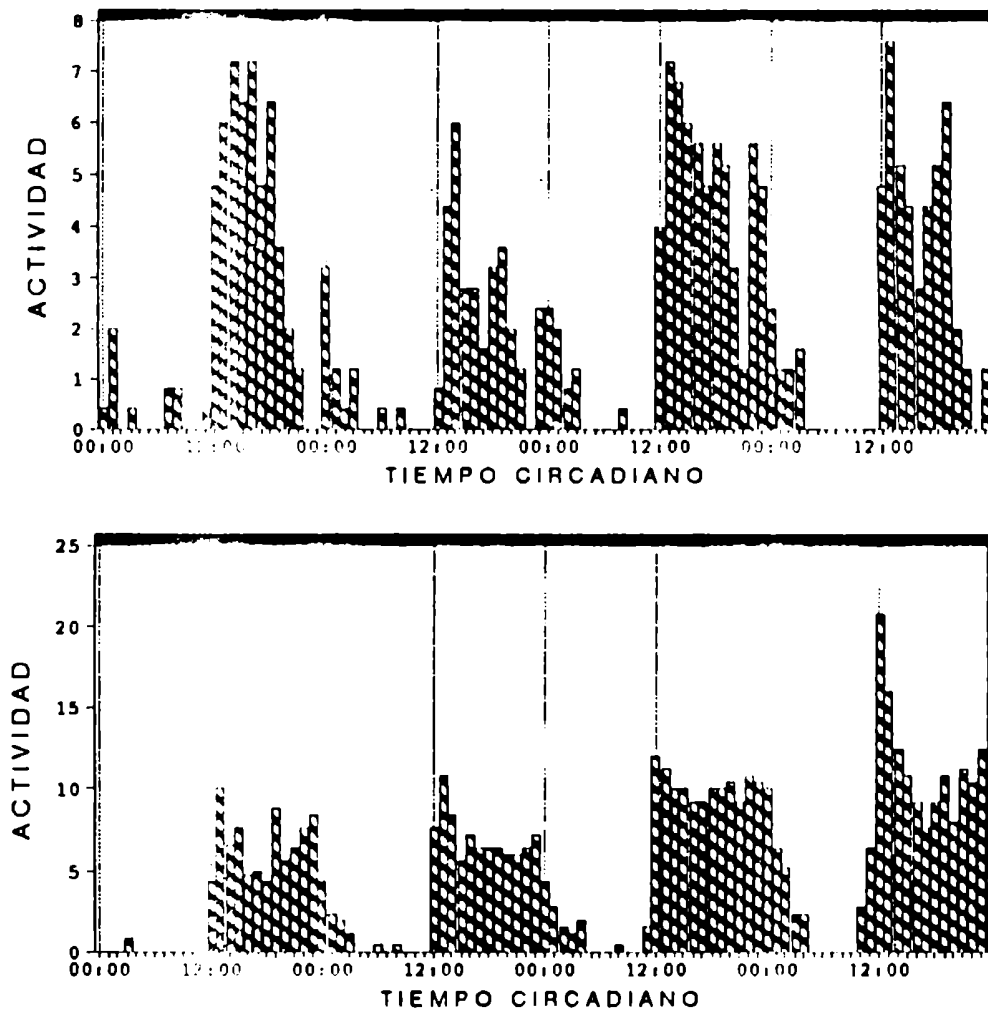


Fig. 6.3. Actividad locomotora durante los primeros 8 días sucesivos en condiciones de oscuridad constante (DD), a 30°C. Nótese el desplazamiento del pico menor, correspondiente al comienzo del día subjetivo, hasta fusionarse con el pico mayor.

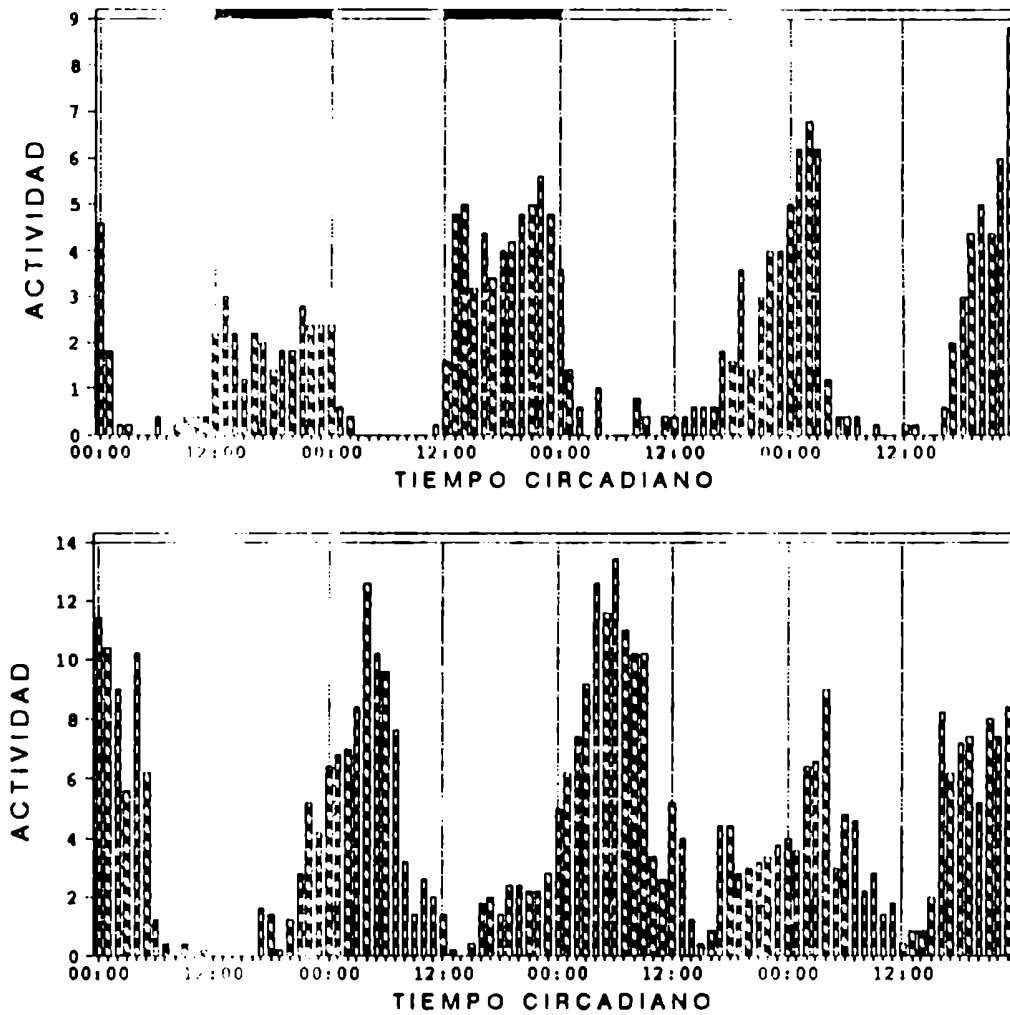


Fig. 6.4. Actividad locomotora en condiciones de iluminación constante (11), a 30°C. Nótese la ausencia, en el momento de la transición, del máximo correspondiente al atardecer.

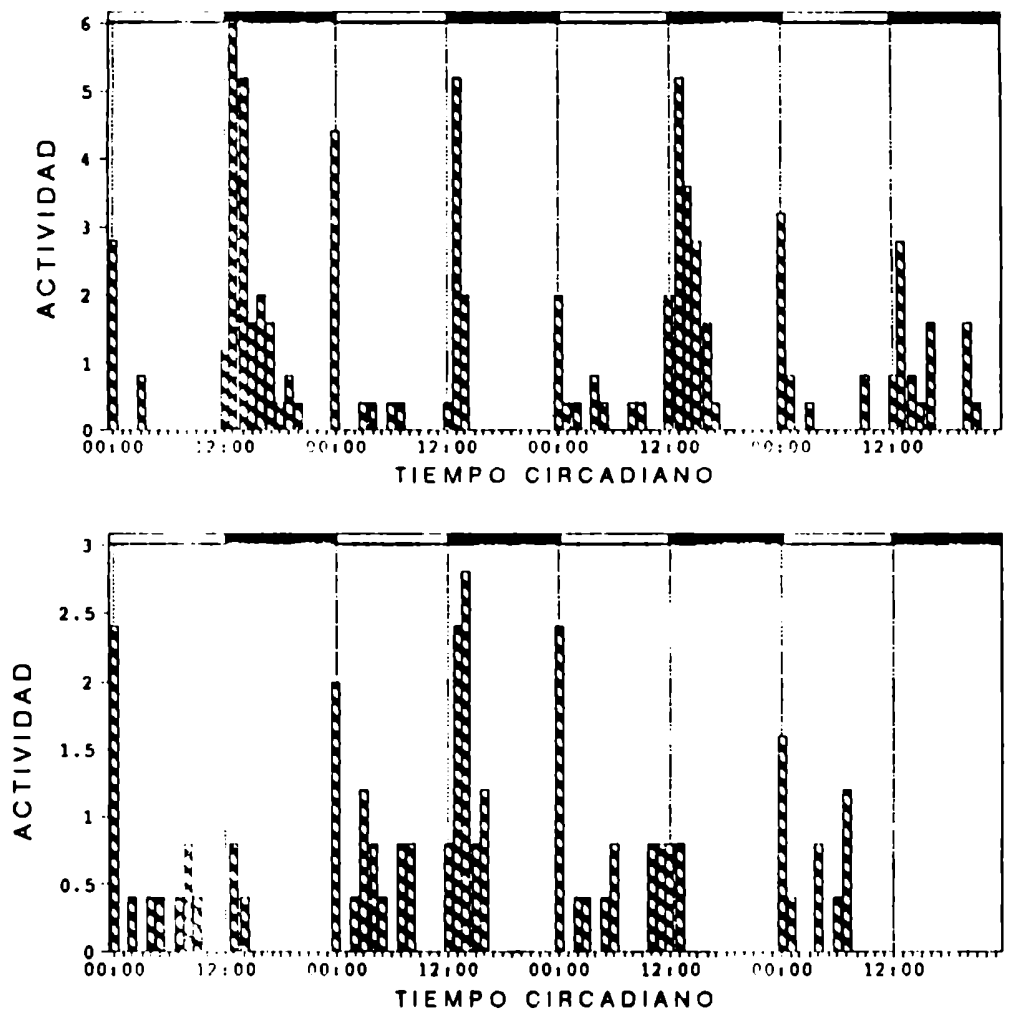


Fig. 6.5a. Actividad locomotora en condiciones LD 12:12, a 20°C.

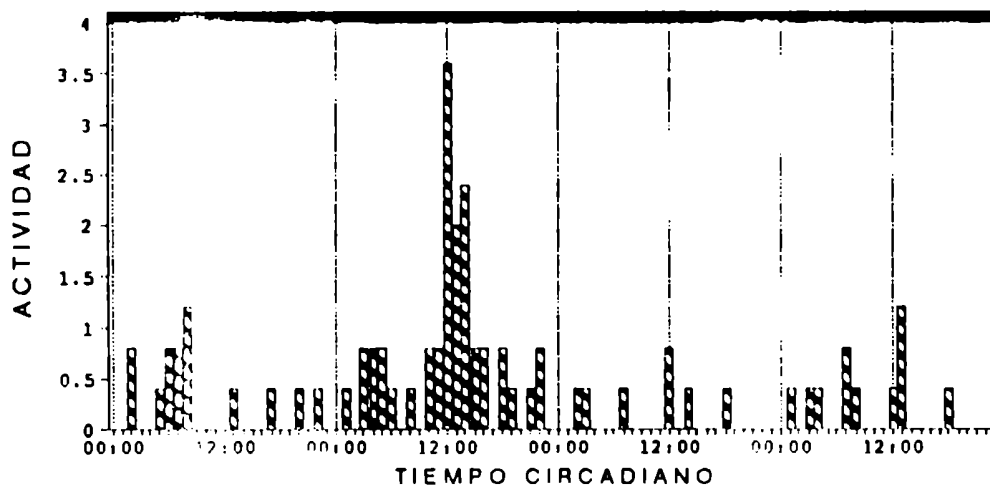
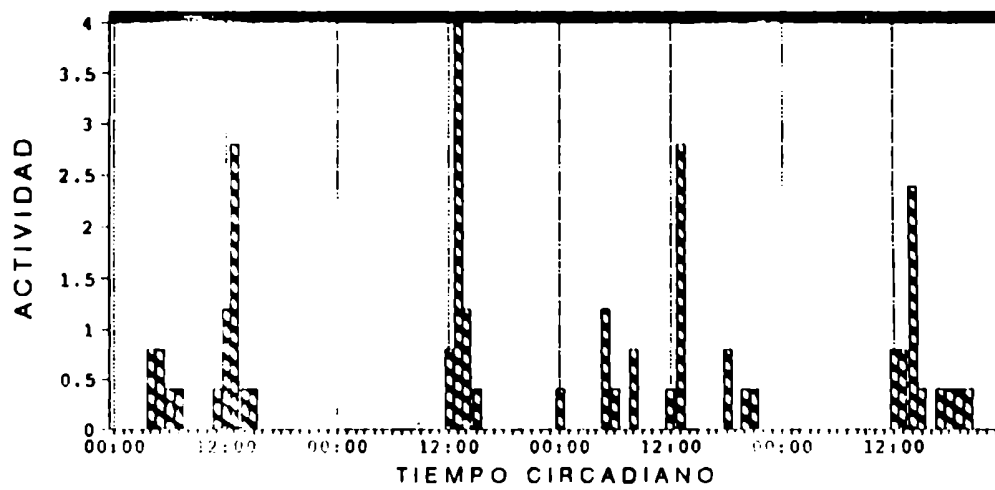


Fig 6.5b. Actividad locomotora en condiciones de oscuridad constante a 20°C, durante los 8 días siguientes a los registros de la Fig. 6.5a.



misma relación de fase respecto al ciclo de iluminación que la observada a 30°C. Se observa además una considerable disminución del nivel de actividad con el correr de los días. En condiciones de oscuridad constante, desaparecen los picos de actividad y se pierde, finalmente, toda ritmicidad.

Comparando la actividad locomotora desplegada por los insectos a cuatro temperaturas distintas, i.e. 20°, 23°, 25° y 30°C, en condiciones de LD 12:12 (Fig. 6.6), se observa una relación no lineal entre actividad y temperatura ambiente. La mayor actividad, expresada en número de movimientos por individuo por hora, fue registrada a 25°C, mostrándose los insectos menos activos a 20° y a 30°C. Excepto entre los valores correspondientes a 23° y 30°C, en todos los casos la actividad a dos temperaturas distintas difiere significativamente (test de la  $t$ , en todos los casos  $P < 0,01$ ).

#### 6bii. ¿Sincronizan las vinchucas ritmos térmicos?

En estos experimentos se impuso a los insectos un ritmo de temperaturas de 12 horas a 30°C (HT), y 12 horas a 20°C (LT), en condiciones de oscuridad (DD) o bien iluminación (LL) constantes. Los insectos fueron mantenidos a 25°C durante los primeros 4 días y bajo un régimen LD 12:12. Luego de ese período en DD o LL a la misma temperatura y finalmente, a partir del noveno día, bajo el régimen de oscilación térmica.

Las Figs. 6.7 y 6.8 muestran la respuesta de los insectos en oscuridad e iluminación constante respectivamente. En ambos casos se observa la presencia de dos picos de actividad coincidiendo con los cambios de temperatura. El pico mayor de actividad coincide con la transición de 30°C a 20°C.

Para comprobar que la sincronización de la actividad es debida al ciclo térmico y no a algún otro factor que varía con la misma periodicidad y relación de fase, se desplazó la fase del ciclo térmico en 12 horas. Ante la inversión del ciclo, los insectos respondieron siguiendo dicho desfase, ajustándose a la nueva

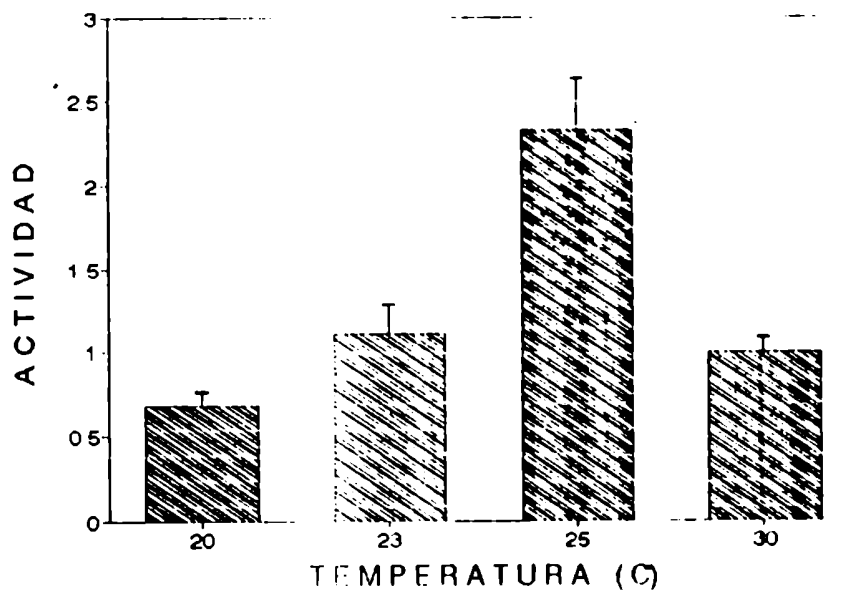


Fig. 6.6. Variación de la actividad locomotora espontánea, en condiciones LD 12:12, en función de la temperatura. Valor medio + error standard. Excepto entre los valores correspondientes a 23° y 30°C, en todos los casos la actividad a dos temperaturas distintas difiere significativamente (test de la *t*, en todos los casos  $P < 0,01$ ).

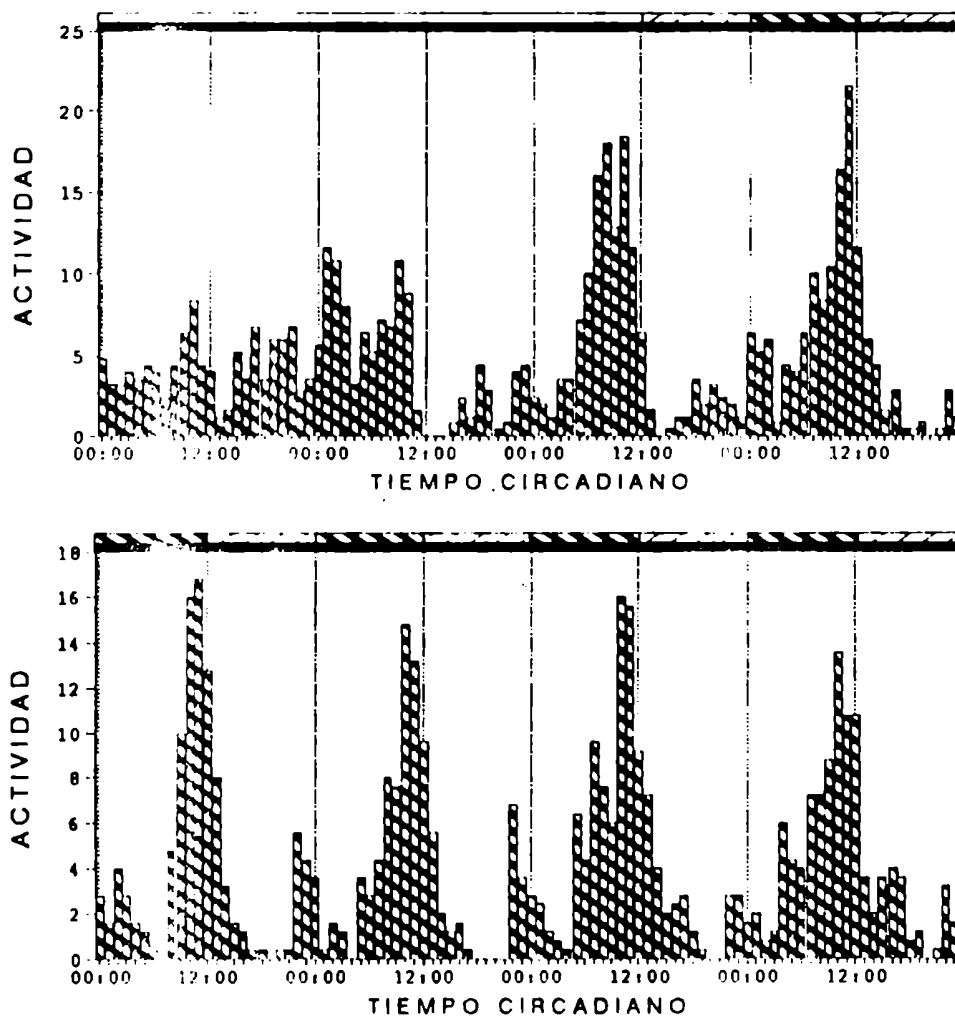


Fig. 6.7. Sincronización de la actividad circadiana con un ritmo de oscilación térmica HLLT 30° (rayado grueso en recuadro superior), 0° (rayado fino), en oscuridad constante. Nótese que la actividad, hasta ese momento arrítmica (DD, 25°C), se expresa como dos picos que se adelantan a la transición de temperaturas.

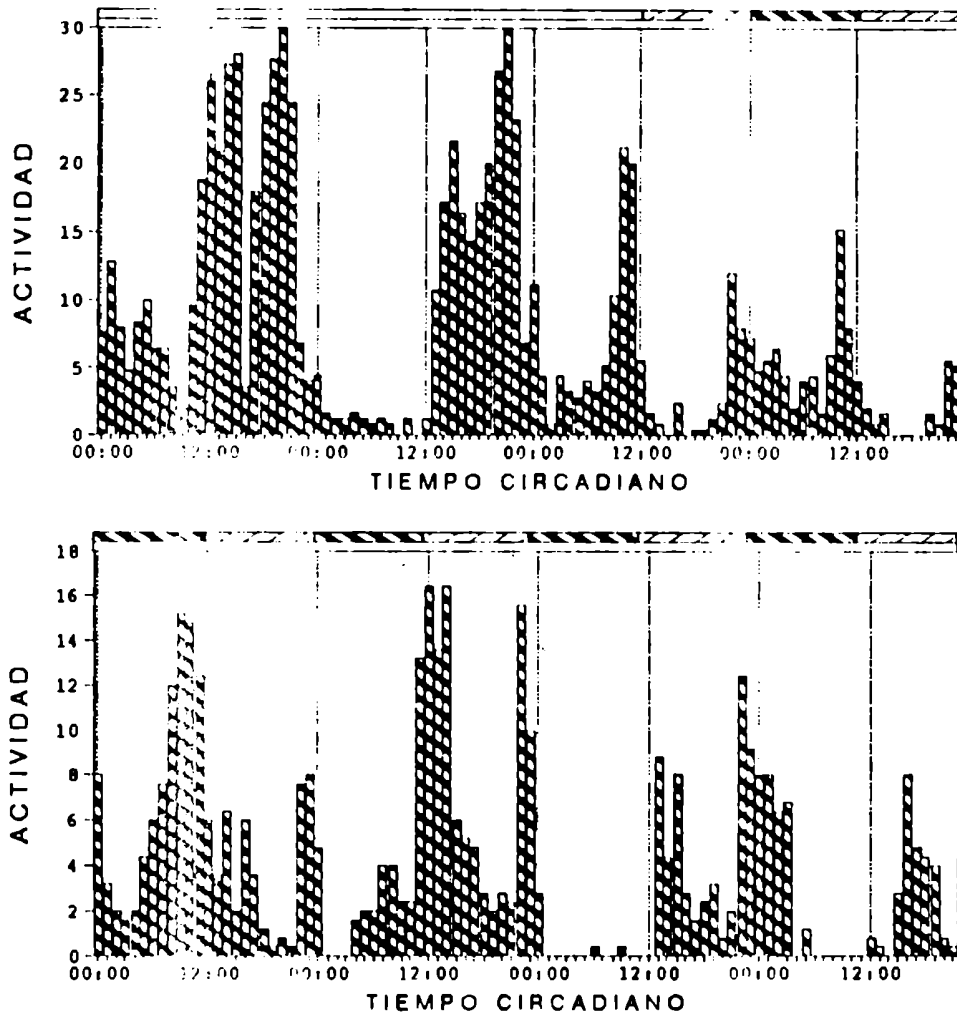


Fig. 6.8. Sincronización de un ritmo térmico en condiciones de iluminación constante. Recuadros superiores como en la Fig. 6.7.

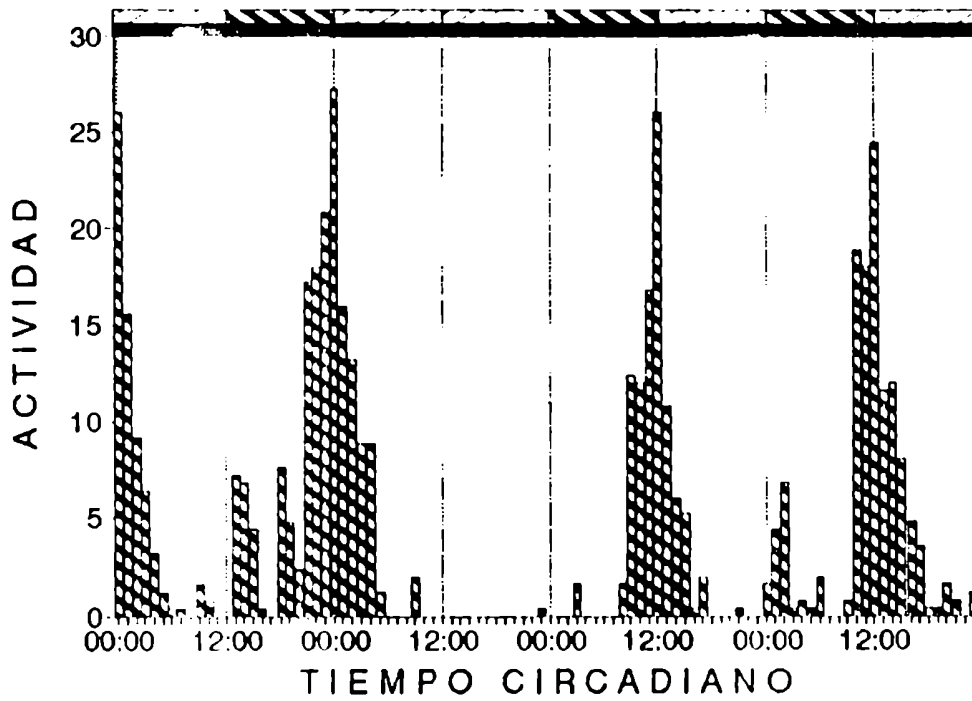


Fig. 6.9. Respuesta a la inversión del ciclo HTLT por alargamiento de la fase fría. Luego de una transición de un solo ciclo de duración, los insectos recuperan la relación de fase con el ritmo ambiental.

situación al cabo de un período de transición de un sólo ciclo de duración (Fig. 6.9).

6biii. Entrenamiento a dos *Zeitgeber* simultáneos

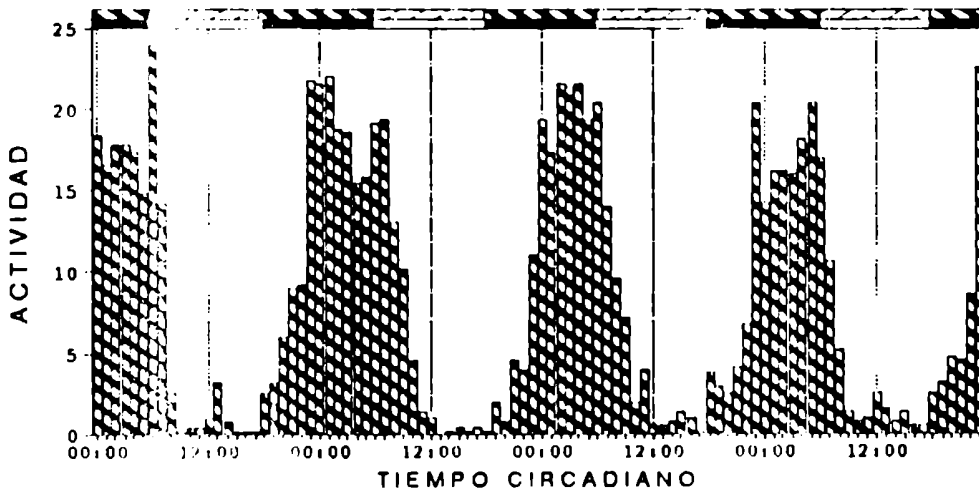
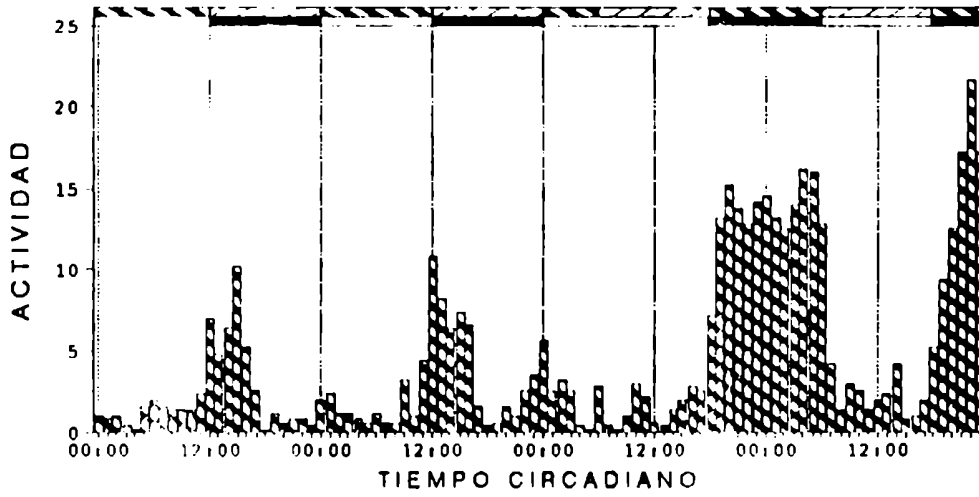
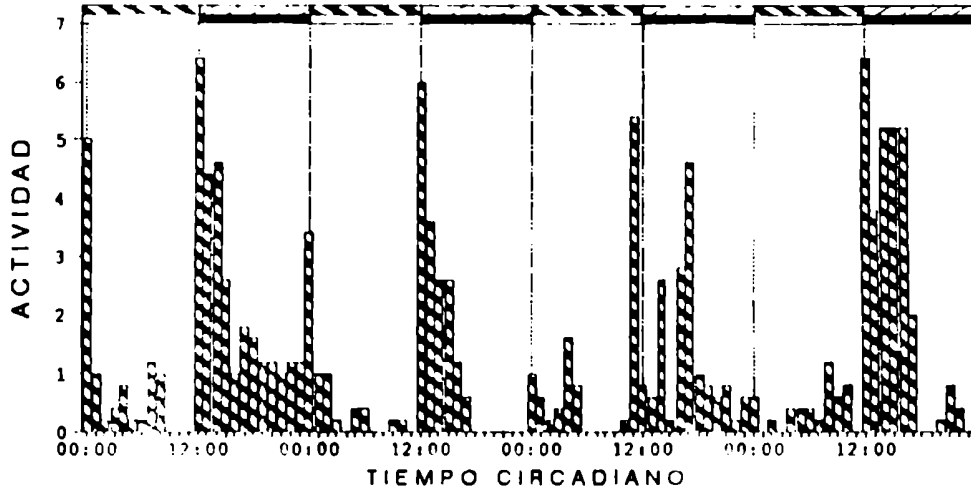
Para evaluar la importancia relativa de los ciclos de luz y temperatura como señales para la puesta en fase del marcapasos circadiano interno, se presentaron ambas simultáneamente pero con diferentes relaciones de fase. Ante esta situación conflictiva, la expresión de la actividad de los insectos estará más afectada por aquella señal que ejerza un mayor control sobre el oscilador interno.

La figura 6.10 presenta los registros de la actividad de los insectos bajo dos ciclos simultáneos, de luz y temperatura, presentados según se indica en la parte superior de las figuras. Se observa que la expresión de la actividad circadiana coincide total o parcialmente con la fase oscura. El ciclo de temperatura por su parte ejerce una modulación de la expresión de la actividad, pero sólo entre límites que parecen estar determinados por el ciclo de luz. El desplazamiento del período de actividad hacia la fotofase sólo pudo lograrse parcialmente.

6biv. La respuesta de los insectos desantenados

No se han identificado, hasta el presente, estructuras termorreceptoras que sean necesarias para la sincronización de ritmos térmicos diarios en ningún insecto. La respuesta a la temperatura parece entonces estar mediada por un efecto general sobre organismo. En las vinchucas se ha observado que las antenas son necesarias tanto para la orientación hacia una fuente térmica (Wigglesworth & Gillet, 1934a), como en un gradiente de temperatura ambiente (Di Luciano, 1983).

En este experimento se registró la actividad de insectos que fueron desantenados 24 hs antes de ser colocados en los actómetros. Durante los primeros diez días se impuso un ritmo de temperatura HTLT 12:12 (30°, 20°C), en oscuridad constante. Luego



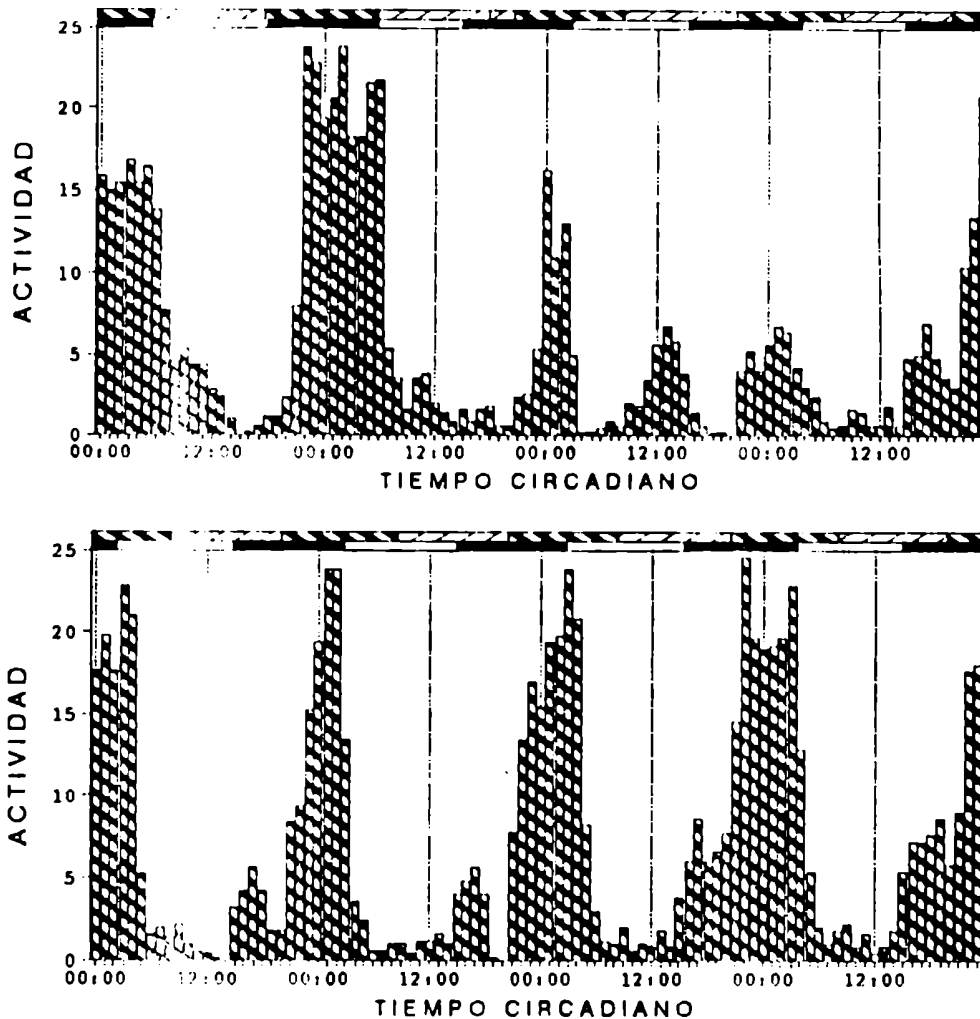
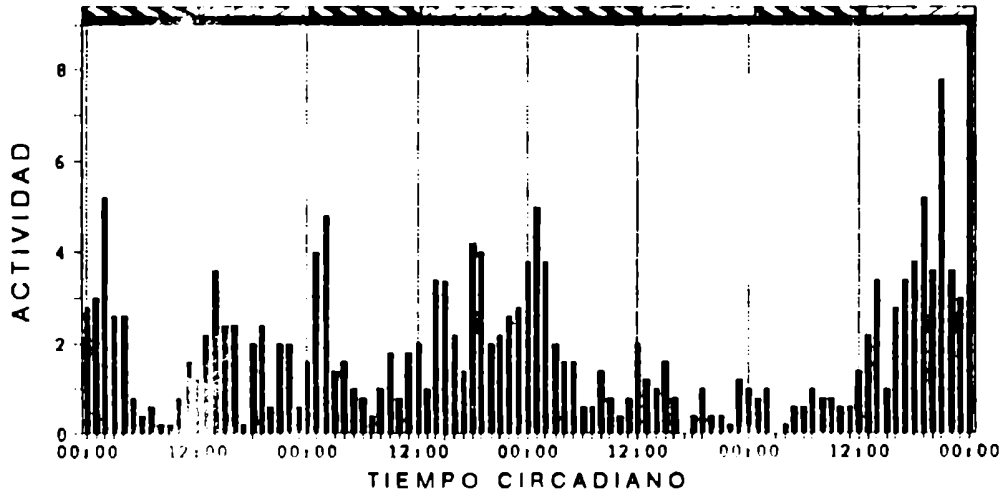
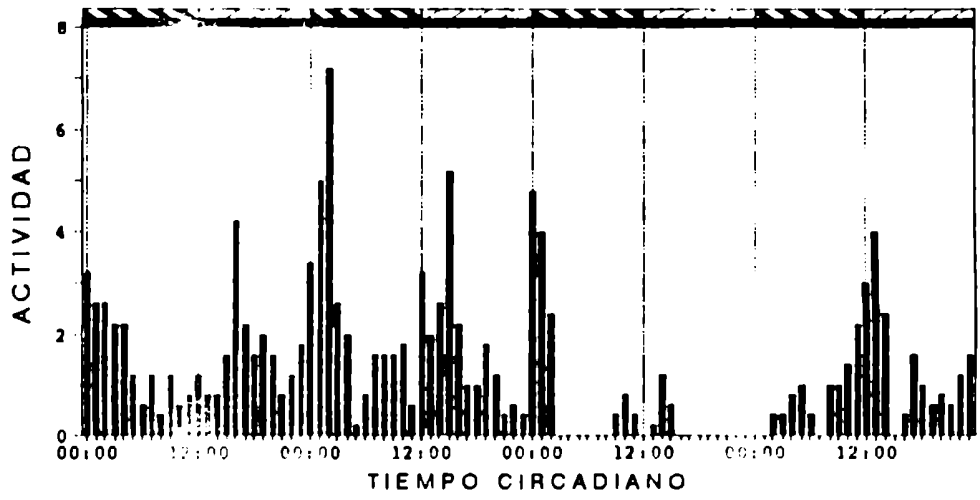


Fig. 6.10. Entrenamiento a dos ciclos simultáneos de iluminación y temperatura con diferentes relaciones de fase. Hasta el día 6 la fotofase coincidió con la temperatura alta ( $30^{\circ}\text{C}$ ), entonces se prolongó en seis horas la fase de luz y se acortó el mismo número de horas de la fase cálida, resultando en un corrimiento de  $180^{\circ}$  de la fase de ambos ciclos. El día 14 se realizó un corrimiento de 3 horas en ambos ciclos, resultando una diferencia de fase de  $90^{\circ}$  respecto de la situación anterior.



de este periodo se impuso un ritmo de iluminación LD 12:12, a 30°C y, a partir del día 20, nuevamente HTLT 12:12, DD.

Durante la primera fase los insectos mostraron un nivel de actividad relativamente bajo, en la que no se observa una ritmicidad definida (Fig. 6.11). Al imponer sólo el ritmo de iluminación se observa un aumento de la actividad y una ritmicidad unimodal. El pico de actividad aparece, además, durante la fotofase. Este resultado es altamente sorprendente, si se lo compara con la actividad de insectos normales bajo las mismas condiciones. Al imponer nuevamente el ritmo de temperatura y en condiciones de oscuridad constante la actividad persiste con una distribución unimodal, ubicándose el pico en la fase de baja temperatura, hecho que tampoco se observa en insectos intactos.



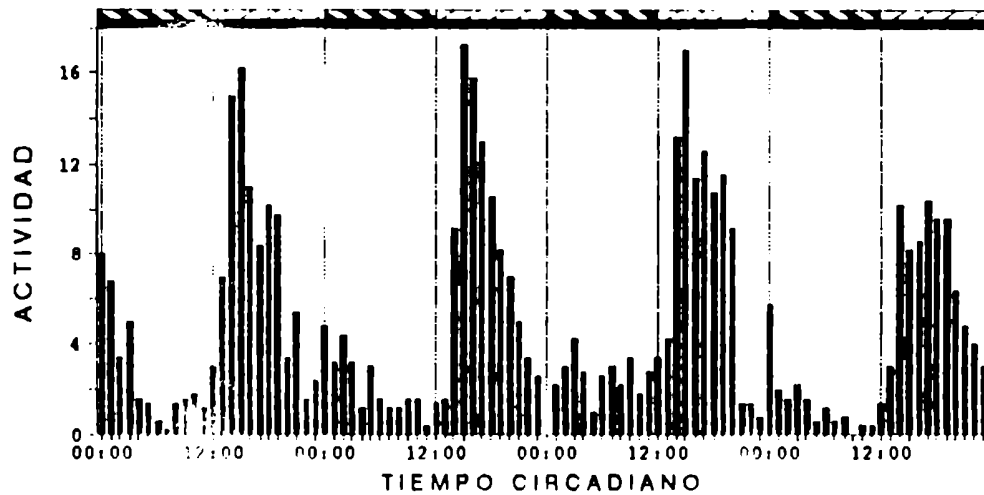
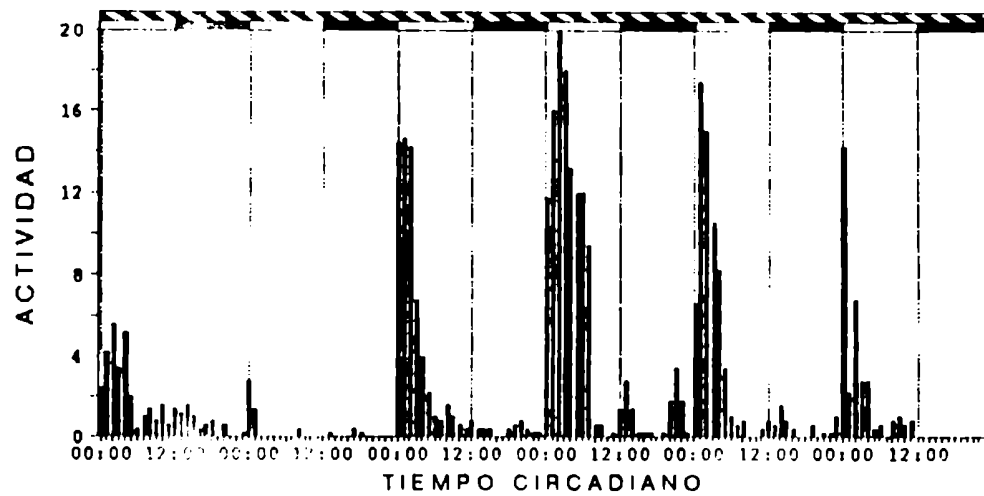


Fig. 6.11. Respuesta de los insectos desanclados a ciclos de iluminación y temperatura. Durante los primeros 8 días los insectos permanecieron en oscuridad constante y bajo un ritmo de oscilación térmica. Durante este período, no puede reconocerse periodicidad circadiana en la actividad de los insectos. El noveno día se impuso un ritmo de iluminación, manteniéndose constante la temperatura a 30°C. Nótese la aparición de un pico de actividad durante la fotofase. El día 15, se impuso nuevamente un ritmo térmico, en oscuridad constante. La actividad rítmica se mantiene y coincide con la fase de baja temperatura.

## CAPITULO 7

### Las sensilias termorreceptoras

#### 7a. MORFOLOGIA FUNCIONAL

De los varios tipos morfológicos de sensilias que se han identificado en las antenas de *T. infestans*, la función termorreceptora sólo se ha demostrado en un tipo de sensilia celocónica (Bernard, 1974). Esta sensilia (Fig. 7.1), que se encuentra además en toda la superficie del cuerpo de las vinchucas (Lazzari, 1983), está inervada por tres células sensoriales. Una de ellas aumenta la frecuencia de disparo de potenciales de acción con la disminución de la temperatura, por lo que se denomina "receptor de frío" (Kerkut & Taylor, 1957). Las dos células que acompañan a la unidad termorreceptora son sensibles a la humedad relativa. Una de ellas aumenta la frecuencia de disparo en relación directa (unidad higrorreceptora) y la otra en relación inversa (unidad xerorreceptora) al aumento de la humedad relativa. Este tipo de termorreceptores en sensilias celocónicas, asociadas a un par de higrorreceptores antagonistas, responde a un modelo general presente en otros insectos (Horn, 1982).

La cueva de cerdas, de la que se ha sugerido una función termorreceptora, es un órgano en forma de saco, de 200-230  $\mu\text{m}$  de largo y 40-45  $\mu\text{m}$  de ancho, ubicado el tercio distal del segundo artejo antenal. Un gran número de cerdas muy delgadas llenan la cavidad del órgano, la que se comunica al exterior mediante un canal de 80-90  $\mu\text{m}$  de largo y 3-5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Barth, 1952; Lazzari, 1983).

La intensa pigmentación oscura de la cutícula del pedicelo, no permite visualizar, desde el exterior de la antena, ni la cueva de cerdas ni su orificio de apertura al exterior. Para el mejor estudio y localización de este órgano, se realizaron cortes histológicos del pedicelo antenal siguiendo el método descrito por Ribi (1987). Brevemente, los insectos fueron narcotizados con

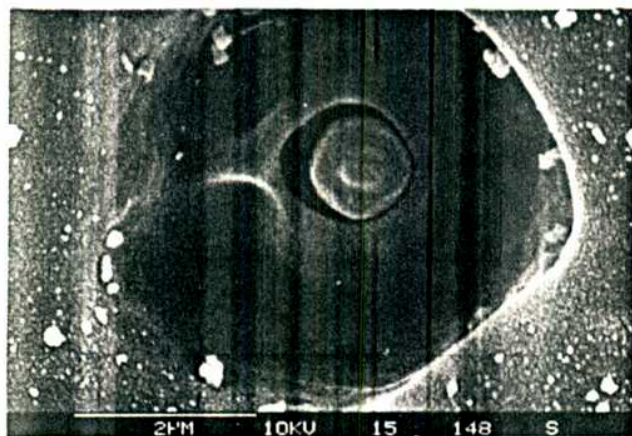


Fig. 7.1. Sensilia celocónica termo-/higro-/xerorreceptora de *T. infestans*.

CO<sub>2</sub>, la porción distal del pedicelo disecada y fijada en una solución de glutaraldehído y paraformaldehído en buffer fosfato durante 4 horas. Luego de 5 lavados con buffer, los trozos de antenas fueron postfijados en solución 2% de OsO<sub>4</sub> en buffer durante 1 hora y lavados nuevamente. Previa deshidratación en una serie de alcoholes de concentración creciente fueron sumergidos en dos baños de óxido de propileno y luego embebidos en el medio de inclusión (resina epoxi araldita). Fueron realizados cortes longitudinales y transversales, de 2 a 5 µm de espesor, en micrótopo con cuchilla de vidrio y, de 0,5 y 1 µm en ultramicrótopo con cuchilla de diamante. Los cortes fueron coloreados en caliente con solución 1% de azul de metileno, con el agregado de 1% de bórax.

La cueva de cerdas se encuentra junto a la pared externa de la antena, unos 200 µm proximal a la tricobotria más distal (Figs. 7.2 y 7.3). El saco cuticular está rodeado de numerosas células nerviosas cuyos axones se dirigen a la rama externa del nervio antenal doble. El conducto que comunica la cavidad del órgano con el exterior posee paredes con plegamientos muy marcados y algunas células hacia la luz de la antena.

Lazzari (1983) comunicó que la cueva de cerdas no es teñida ni por fuccina ácida ni por violeta cristal, colorantes que penetrando por los poros permiten reconocer quimiorreceptores. Por otra parte, la abertura del canal al exterior no puede ser visualizada bajo el microscopio binocular a pesar de su tamaño, aun a gran aumento. En el microscopio electrónico de barrido, sin embargo, la abertura del canal se hace evidente aun a aumentos relativamente bajos (Fig 7.4). Estos hechos podrían deberse a que el canal esté cubierto por la gruesa capa de cera que recubre esa zona de la cutícula, en la que no se encuentran otras sensilias (Fig. 7.4). Recordemos que la preparación de material para microscopía de barrido requiere de la deshidratación del material en etanol y acetona, por lo que la cera cuticular es removida. Para poner a prueba esta hipótesis, se seleccionaron insectos que

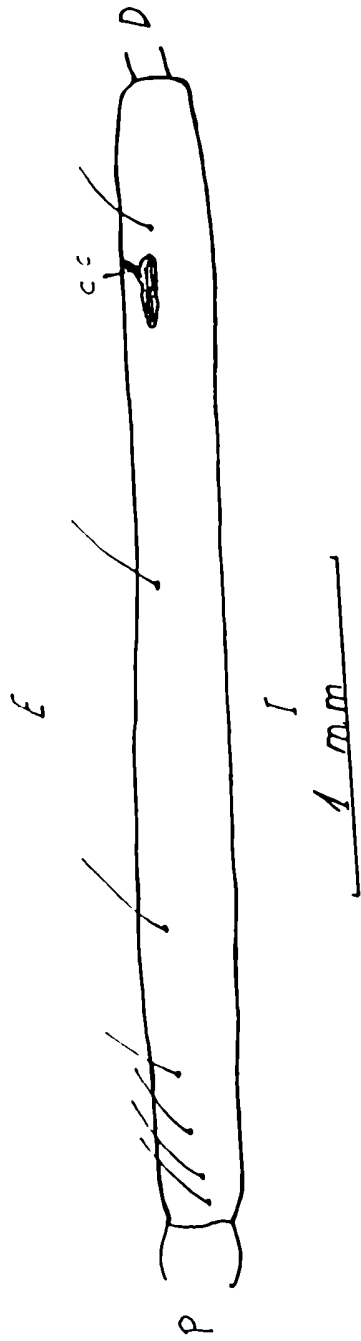
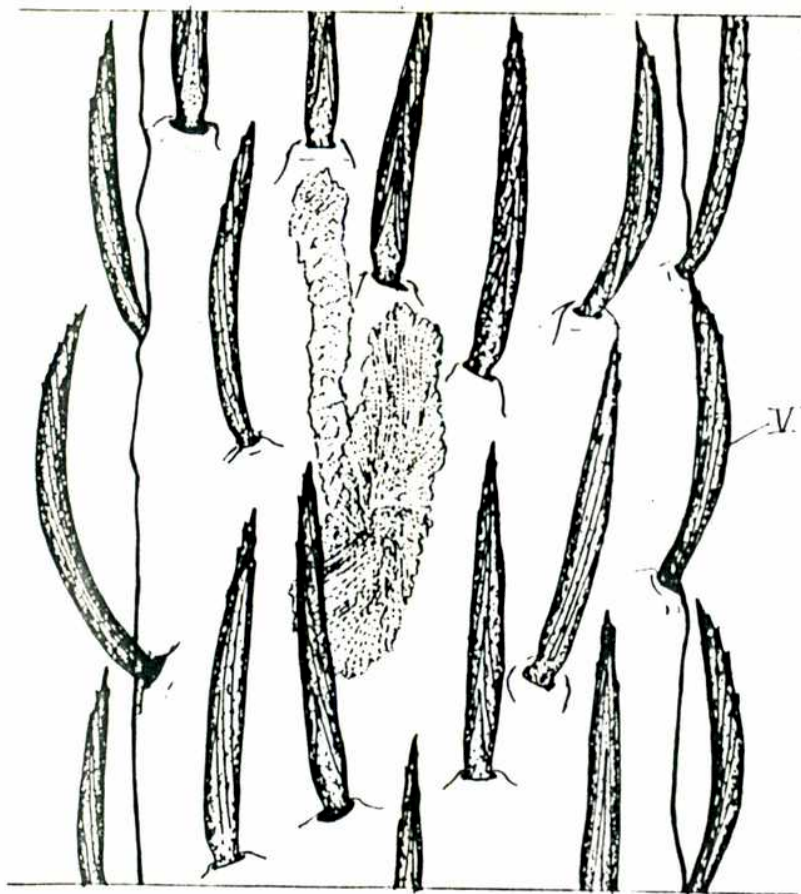


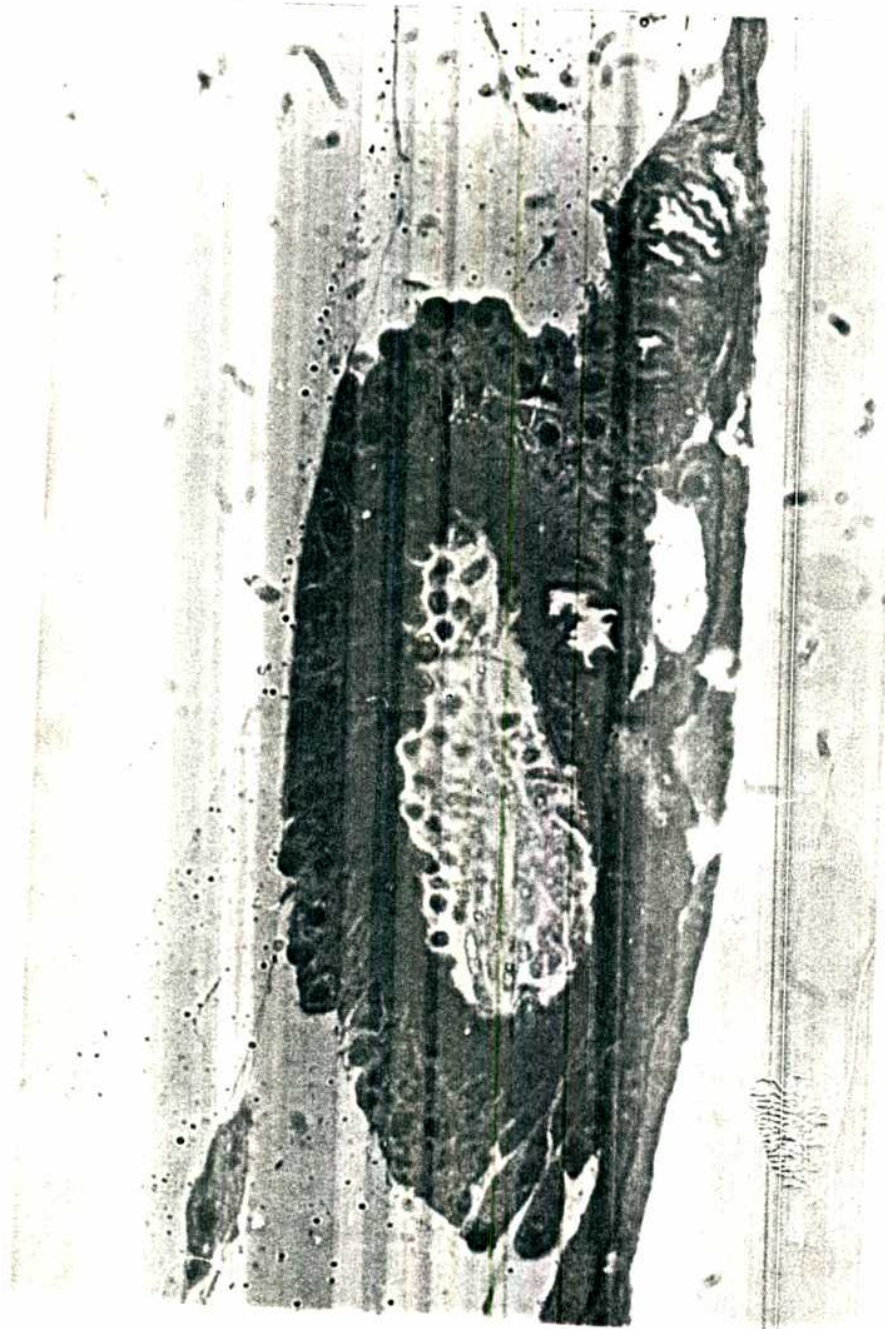
Fig 7.2. Ubicación de la cueva de cerdas en el pedicelo de la antena de *T. infestans*.



100  $\mu$

Fig. 7.3. Cueva de cerdas, a) vista por transparencia; b) corte longitudinal del extremo distal del pedicelo para mostrar la cueva de cerdas. El órgano se encuentra por debajo de la pared lateral externa en la que se abre el orificio del canal. La cavidad de la cueva se encuentra ocupada por cerdas muy delgadas y rodeada por numerosas células que envían sus axones a la rama externa del nervio antenal doble.





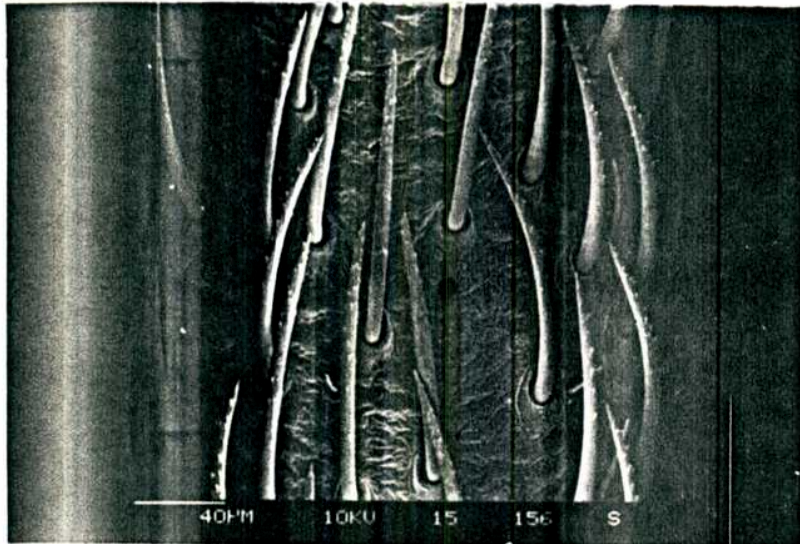


Fig 7.4. Abertura del orificio del canal que comunica la cueva de cerdas con el exterior.

hubiesen emergido recientemente, de cutícula poco pigmentada, y se los sumergió en acetona durante una hora para remover la cera cuticular. Luego se sumergieron en una solución de violeta cristal en una cámara de vacío durante media hora. En dichas preparaciones el colorante fue hallado tanto en el interior de los quimiorreceptores como en el interior de la cueva de cerdas, por lo que se concluye que la cera recubre, por lo menos, la abertura del canal.

Es así que, según el análisis morfológico, la cueva de cerdas no puede asimilarse a ningún mecanorreceptor o quimiorreceptor conocido. Lo que no puede descartarse es la función termorreceptora, sugerida por Barth (1952), hipótesis que se ve reforzada por el hecho que otros insectos poseen fosetas termorreceptoras cubiertas de cera (Evans, 1964, 1966).

## 7b. ELECTROFISIOLOGIA

### 7b.i. Métodos de estimulación

La estimulación térmica se realizó acercando a la antena, preparada para el registro según se describirá más adelante, un pequeño lazo de 1 mm de diámetro, de alambre de níquel-cromo, de 100  $\mu$ m de diámetro, calentado eléctricamente a 30°C.

Para la estimulación química se diluyó la sustancia a ensayar en aceite de silicona en relación 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. El recipiente con la mezcla se colocó dentro de una jeringa de 60 ml de capacidad, llena de aire ambiental (Fig. 7.5), de modo que se alcance un equilibrio de concentraciones. La estimulación se realizó inyectando, a un flujo de 1 ml por segundo, el aire de la jeringa en una corriente de aire ambiental que soplaba constantemente la preparación también a un flujo de 1 ml por segundo (Fig. 7.5).

De esta manera se ensayaron dos sustancias que se conoce provocan una respuesta de comportamiento en las vinchucas, una

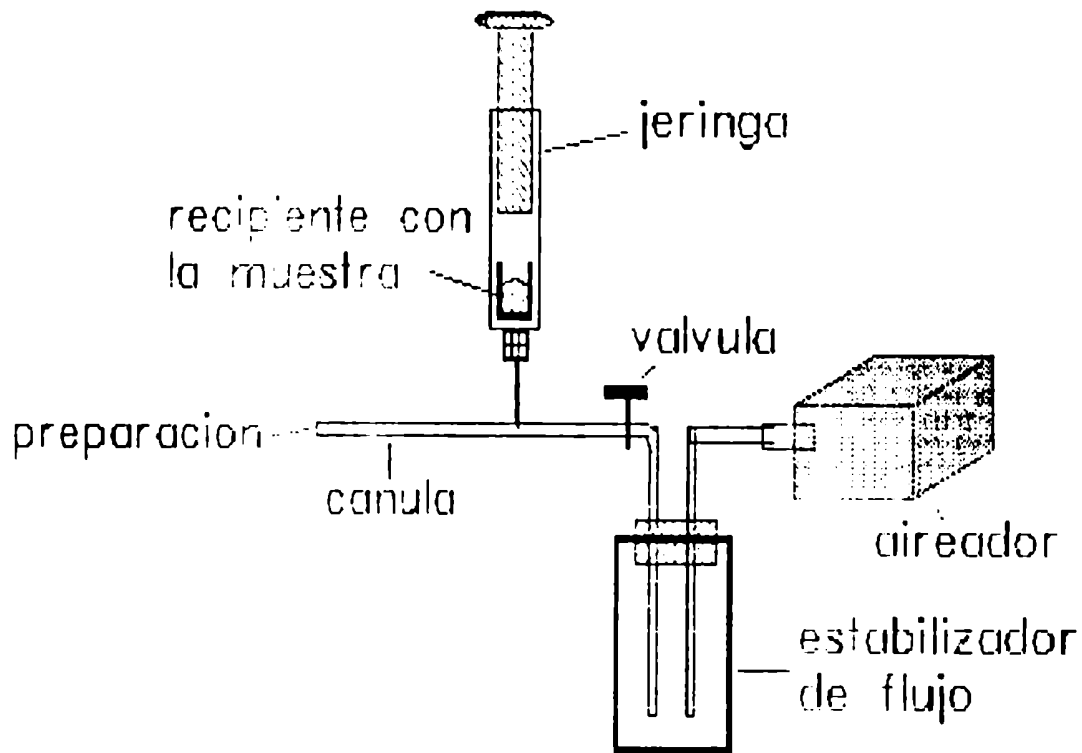


Fig. 7.5. Dispositivo de estimulación utilizado para ensayar la respuesta electrofisiológica de las sensilias antenales a la estimulación química.

relacionada con la orientación hacia el hospedador, i.e. ácido láctico (Núñez, 1987), y la otra con la comunicación intraespecífica, i.e. ácido butírico (Ward & Finlayson, 1982).

Se ensayó además la respuesta al anhídrido carbónico, que también juega un rol importante en la activación de los insectos durante la búsqueda de alimento (Núñez, 1987). Para ello se llenó la jeringa de ensayo con este gas o con una mezcla del mismo con aire, hasta resultar concentraciones aproximadas de CO<sub>2</sub> de 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25% y 3.12% en la jeringa.

La respuesta a compuestos volátiles presentes en la sangre se ensayó colocando dentro de una jeringa llena de aire un trozo de papel de filtro impregnado de sangre humana recién extraída.

En todos los ensayos se realizaron controles de estimulación con el alambre a temperatura ambiente, en el caso de la estimulación térmica, y con aceite de silicona o papel de filtro sin agregados, para la estimulación química. Ningún tipo de respuesta electrofisiológica pudo ser evocada mediante los controles, en preparación alguna.

En esta primera aproximación al estudio de la respuesta electrofisiológica se persiguió solamente la caracterización cualitativa de la respuesta. Un análisis cuantitativo detallado y el trazado de curvas dosis/respuesta requiere condiciones experimentales rigurosamente controladas y la medición de las concentraciones exactas de las sustancia a ensayar en el aire de estimulación, mediante métodos analíticos precisos.

#### 7bii. Registro extracelular en la cueva de cerdas

Una vez conocida, por medios histológicos, la ubicación exacta y relaciones con otras sensilias de la cueva de cerdas, fue posible implantar un electrodo en su proximidad y registrar su actividad eléctrica frente a diversos estímulos. Para ello se utilizó el dispositivo que se muestra en la figura 7.6. Un electrodo de tungsteno, aislado con laca excepto en su extremo, fue implantado a través de la cutícula en la región de la antena

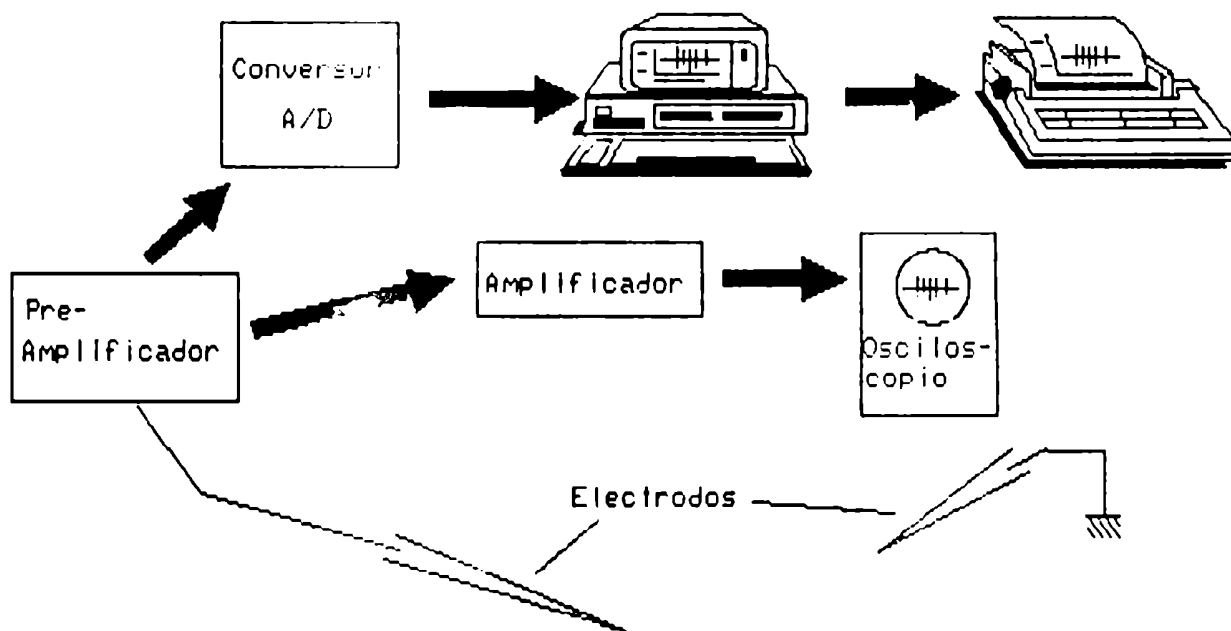


Fig. 7.6. Dispositivo utilizado para el registro de la actividad eléctrica de las sensillas antenales. Ver detalles en el texto, sección 7bii.

ocupada por la cueva. Un segundo electrodo (electrodo indiferente) fue implantado en la cabeza del insecto y conectado a la tierra del sistema de registro. La señal obtenida entre ambos electrodos fue filtrada y amplificada, procesada por un digitalizador de señales analógicas (*Transient Recorder*) y almacenada en una computadora. La señal podía ser a su vez monitoreada en un osciloscopio. Una llave conectada a una pila podía ser conectada cada vez que se daba un estímulo y el pulso generado conducido y procesado en un segundo canal del sistema de registro. Como es usual en estos estudios, el insecto fue inmovilizado y firmemente fijado a una base mediante cinta adhesiva, para evitar movimientos que interfirieran con los registros, y la preparación se ubicó dentro de una jaula de Faraday. Los registros se realizaron en insectos adultos, machos y hembras, hasta una semana después de la ecdisis imaginal.

Para la puesta a punto y control de las condiciones de registro se comenzó siempre registrando la actividad eléctrica de la tricobotria distal frente a una corriente de aire, sensilia de fácil localización bajo el microscopio binocular. Luego el electrodo fue implantado en la región correspondiente a la cueva de cerdas y se registró la actividad eléctrica ante la presentación de la serie de estímulos térmico y químicos. Posteriormente se cortó la antena y se determinó bajo el microscopio, a mayor aumento, la ubicación de la cueva y del orificio de penetración del electrodo.

En ningún caso se obtuvo variación alguna de la actividad espontánea de las neuronas sensoriales por medio de la estimulación química. Ni el CO<sub>2</sub>, ni los ácidos láctico o butírico ni el olor de la sangre provocaron respuesta electrofisiológica alguna en la cueva de cerdas, aunque si la estimulación térmica. La figura 7.7 muestra los resultados obtenidos por registro extracelular en las proximidades de la cueva de cerdas, mediante la presentación del estímulo térmico. De acuerdo a la modalidad de la respuesta, se distienden en los registros tres tipos de

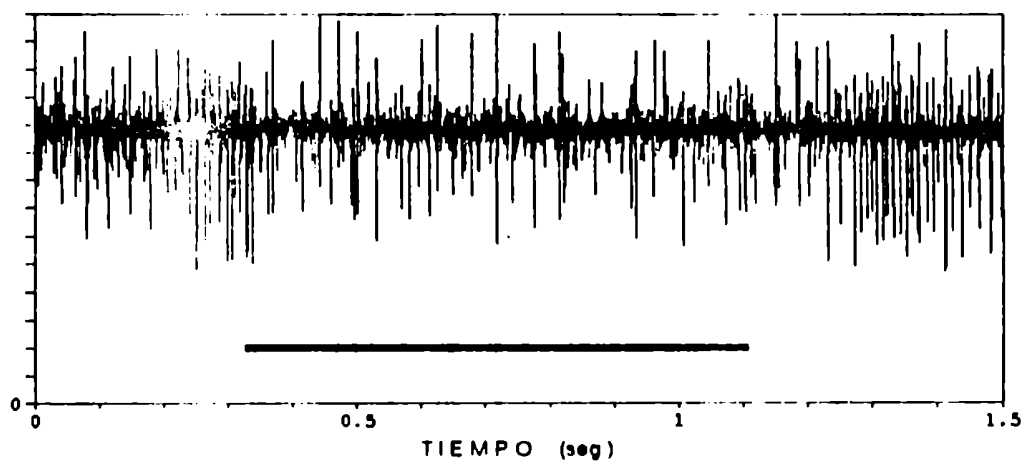
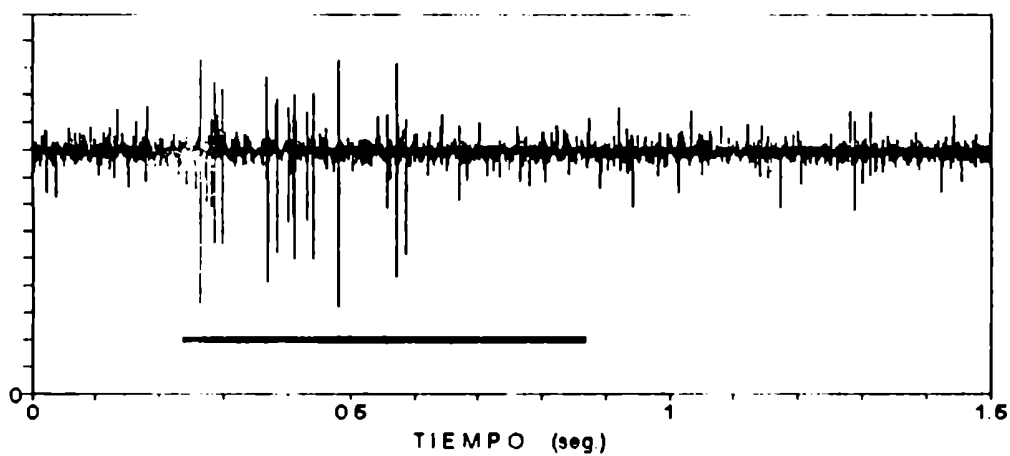
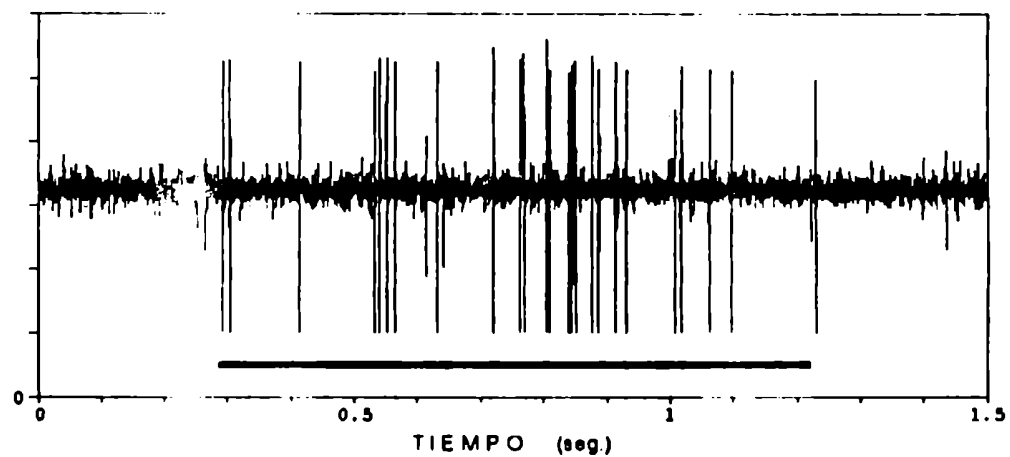


Fig 7.7. Actividad eléctrica de la cueva de cerdas frente a la estimulación térmica. Los registros corresponden a la actividad de tres unidades con diferentes características de respuesta.



unidades. La unidad de la figura 7.7a respondió con un aumento fásico de la frecuencia de disparo de potenciales de acción al inicio de la estimulación térmica. Aquella representada en la figura 7.7b respondió con una disminución de la frecuencia de disparo que se mantuvo de manera tónica durante todo el periodo de estimulación. La célula de la figura 7.7c, aumentó de manera tónica la frecuencia de disparo, que se mantuvo constante durante la presencia del estímulo.

#### 7biii. La respuesta global: el electroantenograma

Para el registro de la actividad eléctrica de un órgano sensorial pueden utilizarse diversas metodologías. La actividad eléctrica de una célula o grupo de células puede registrarse mediante la implantación de un electrodo dentro de una unidad receptora o en su proximidad. Es posible también obtener un registro de la respuesta global del órgano frente a la estimulación, mediante la medición de la variación del potencial eléctrico resultante de la sumación de la actividad de todas las unidades receptoras. En el caso de los insectos, el primer ejemplo exitoso de la utilización de esta técnica lo constituye el registro de la actividad eléctrica global de una región de la retina del ojo compuesto, conocido como *electrorretinograma* (ERG), desarrollado por Autrum (1950). Algunos años más tarde, Schneider (1957) desarrolló un método similar para el registro de la actividad global de la antena de la mariposa del gusano de seda, *Bombix mori*, al que bautizó *electroantenograma* (EAG). El EAG ha contribuido de manera decisiva al conocimiento de la base fisiológica de la olfacción en los insectos. Este método rinde sus mejores resultados cuando se trata de insectos que tienen en sus antenas un gran número de receptores sensoriales que responden al mismo estímulo. Es así que se lo ha utilizado preferentemente para estudiar la respuesta electrofisiológica a feromonas de atracción sexual en mariposas nocturnas. Son escasos los ejemplos de este tipo de estudios en otros grupos de insectos, tratándose

en todos los casos de estudios relacionados con quimiorrecepción (Nashino & Takayanagi, 1979; Davis, 1984; Mayer et al. 1984; Warnes & Finlayson, 1986; Patte et al. 1989).

La base fisiológica del EAG no ha sido aún claramente dilucidada. A la contribución de los potenciales generadores de las neuronas sensoriales, hipotetizada por Schneider (1957), se agregaría, según otros autores, cierta contribución de los potenciales electrotónicos localmente inducidos por aquellos (Mayer et al. 1984). Los potenciales generadores tienen una polaridad negativa en la dirección distal de la antena, mientras que los potenciales electrotónicos se propagan en ambas direcciones. Consecuentemente, el efecto neto frente a la estimulación de los receptores es un EAG negativo.

Los objetivos del presente estudio fueron la puesta a punto y caracterización del EAG en la vinchuca y el ensayo de la respuesta global de la antena a estimulación térmica y química.

Los registros se realizaron utilizando electrodos de vidrio, cuyo extremo fue quebrado para obtener un diámetro de unos 50µm, llenos con solución salina para insectos (según Case, 1957) o bien KCl 3M. A través de una placa de Ag/AgCl se conecta el electrolito con el sistema de registro. El electrodo de registro se insertó en el extremo distal de la antena y un electrodo de referencia, de alambre de Ag/AgCl, se insertó en la cabeza del insecto y se lo conectó a la tierra del sistema. Los electrodos se conectaron a un amplificador y un filtro para eliminar los componente de alta frecuencia. Como en el caso anterior, la señal fue procesada en un digitalizador de señales analógicas y almacenada en una computadora (Fig. 7.6). Los registros se realizaron en insectos adultos, machos y hembras, hasta un semana después de la ecdisis imaginal.

Por medio de la estimulación térmica no pudo obtenerse, en ninguna preparación, una respuesta definida y reproducible. Sí en cambio cuando se ensayó la estimulación química. La figura 7.8 muestra los EAGs obtenidos mediante la estimulación con

concentraciones diferentes de ácido butírico. Se observa que la mayor estimulación, medida como la amplitud del EAG, se obtuvo a una dilución de 1:100 (según el criterio de dilución descrito anteriormente), disminuyendo la amplitud a concentraciones mayores y menores. Para la misma substancia, la forma del EAG varió de acuerdo con la concentración utilizada, variando también la importancia de los componentes positivos y negativos.

Mediante la estimulación con ácido láctico se obtuvo una respuesta de mucho menor amplitud que con ácido butírico, a todas las concentraciones ensayadas (Fig. 7.9). Aunque la amplitud del EAG nunca alcanzó 1 mV, fue definida y reproducible en todas las preparaciones.

El CO<sub>2</sub> provocó una fuerte respuesta del EAG, dependiente de la concentración utilizada (Fig. 7.10).

Los compuestos volátiles presentes en la sangre fresca no provocaron una respuesta reproducible regularmente.

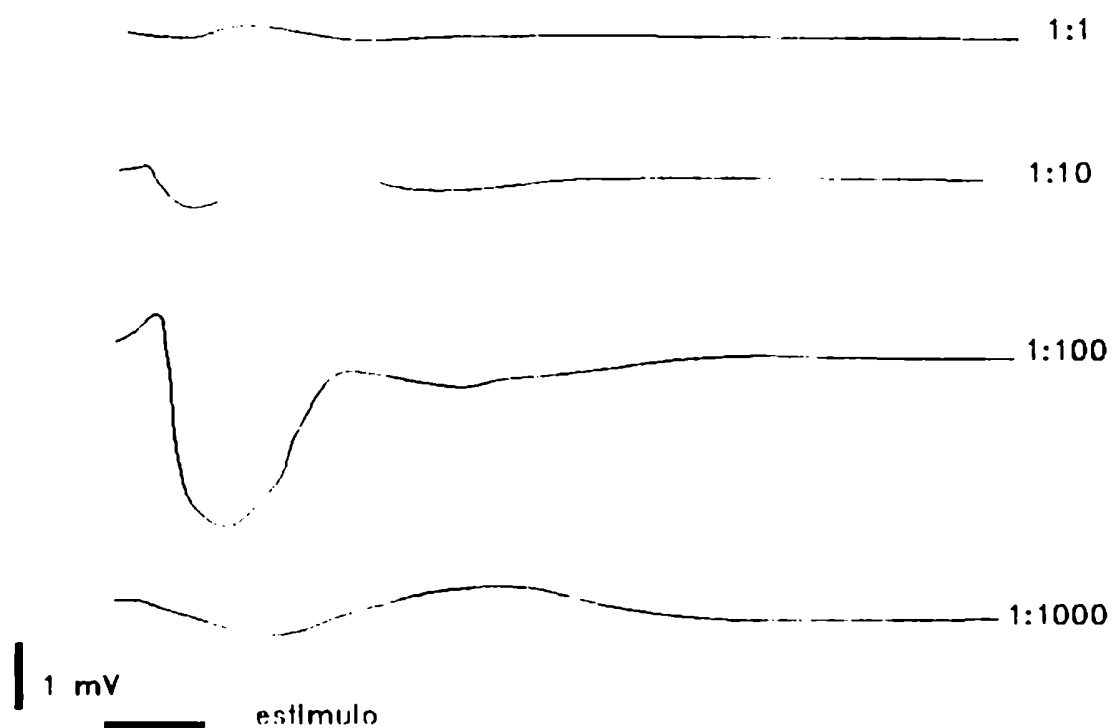


Fig. 7.8. Electroantenogramas obtenidos mediante la estimulación de la antena con ácido butírico. Las concentraciones son relativas y corresponden al método de dilución empleado (ver sección 7bi.).

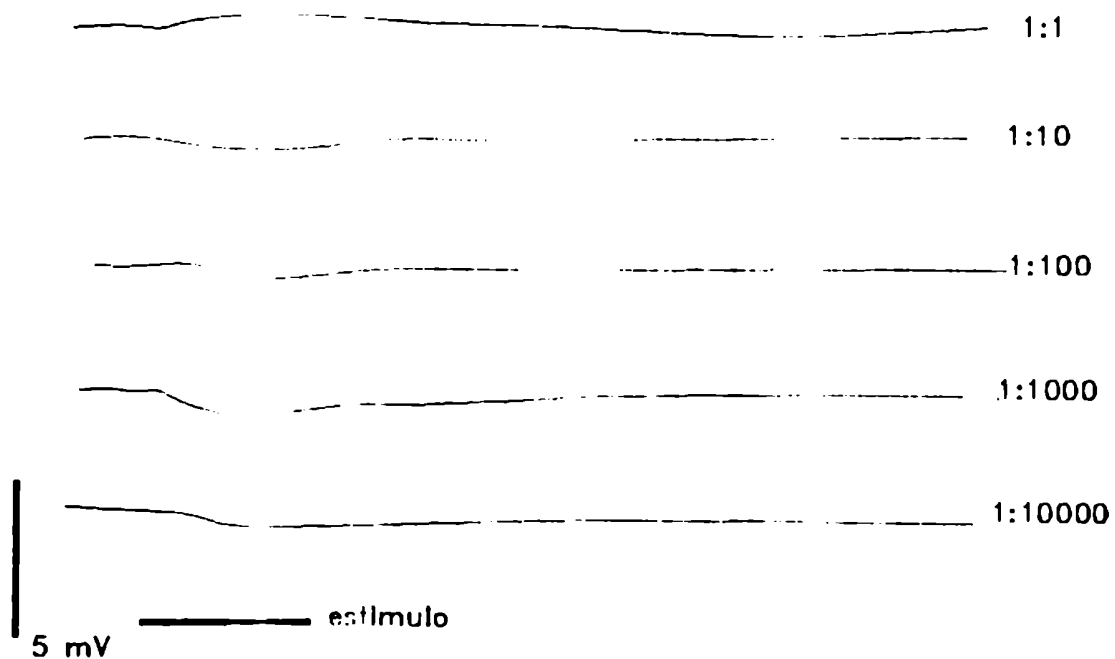


Fig. 7.9. EAGs obtenidos en respuesta a la estimulación con diferentes concentraciones de ácido láctico. Concentraciones como en la Fig. 7.8.

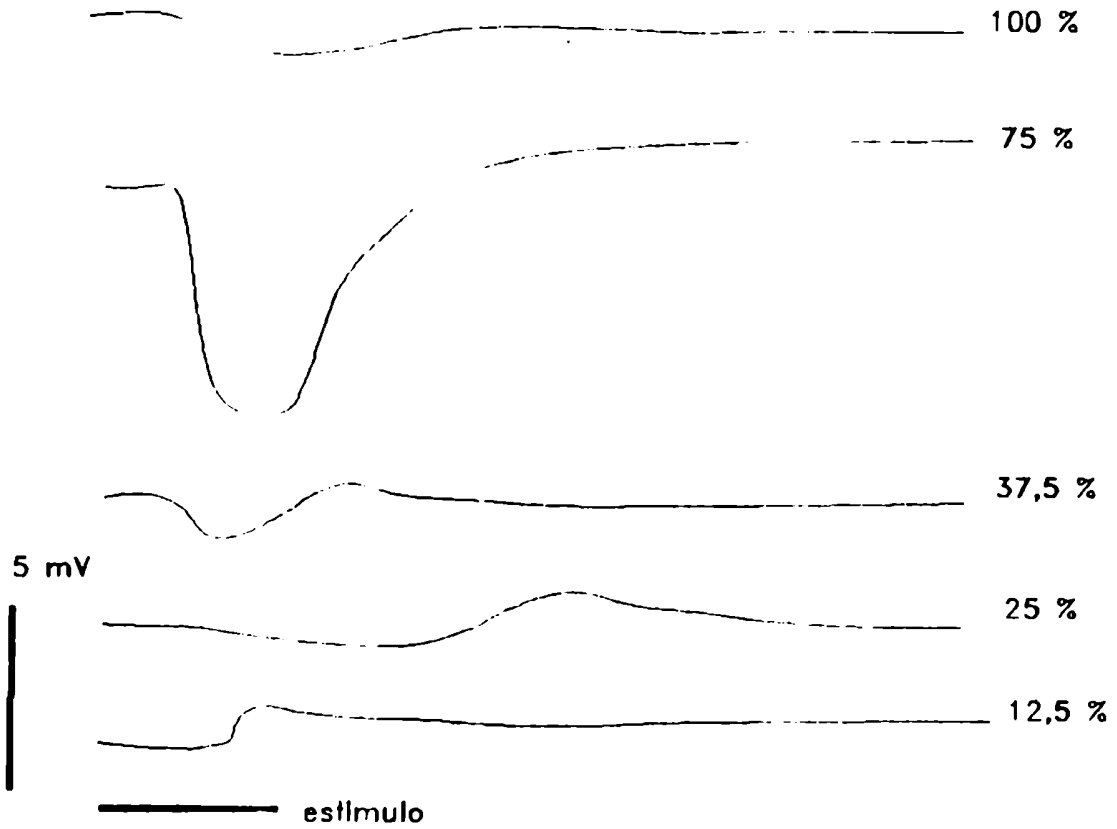


Fig. 7.10. ECGs obtenidos mediante la estimulación con CO<sub>2</sub>, a diluciones según el método descrito en la sección 7bi.

## **CAPITULO 8**

### **Discusión de los resultados y su posible aplicación**

Es posible dividir, con propósitos analíticos, el comportamiento alimenticio de una vinchuca en siete etapas: (a) "despertar" del estado de akinesis, i.e. erección del cuerpo y movimientos antenales; (b) orientación y locomoción hacia la fuente de alimento; (c) extensión de la proboscis (respuesta rostral); (d) contacto con la superficie a picar; (e) perforación de la membrana con los estiletes; (f) prueba del alimento; (g) ingestión de sangre.

El "despertar" (*awakening* de Wigglesworth & Gillet, 1934a) resultaría de la interacción entre factores endógenos y exógenos (Núñez, 1987). La variación circadiana del estado motivacional del insecto, el nivel de ayuno, proximidad de la ecdisis, etc. se incluyen en el primer grupo. A la segunda categoría pertenecen aquellos estímulos externos que puedan alertar sobre la presencia de un hospedador, e.g. corrientes de aire, calor, olores, vibraciones, luz, etc. En la respuesta de orientación a distancia, los insectos podrían seguir corrientes de aire transportadoras de olores (anemotaxis). En proximidad de la fuente de estímulos, el calor emitido por la misma es señal suficiente para desencadenar la respuesta rostral (RR), encontrándose en las antenas los órganos sensoriales involucrados.

Wigglesworth & Gillet (1934a) señalan la limpieza de las antenas como un componente de la respuesta a un estímulo térmico en *R. prolixus*. En *T. infestans* dicho comportamiento se observa con mayor frecuencia en situaciones de bajo nivel de estimulación y cuando los insectos no puede alcanzar la fuente. Una posible interpretación es que el insecto limpie sus antenas como recurso para disminuir el "ruido" o bloqueo de los receptores que pudieran ocasionar partículas de suciedad y de este modo recibir mejor la

señal. Podría también tratarse, sin embargo, de un comportamiento desplazado, que nada tiene que ver con una reacción de búsqueda pero que se expresa frente a una situación de conflicto, por ej. entre búsqueda y huida.

Se ha demostrado que las vinchucas son capaces de estimar desde cierta distancia la temperatura de un objeto y responder con un comportamiento conforme a la temperatura del mismo (sección 3e.). Esta capacidad posee un evidente valor adaptativo, ya que permitiría a los insectos discriminar a un hospedador potencial de un objeto caliente cualquiera, solamente a través de su temperatura.

Cuando una vinchuca se aproxima a una fuente térmica, extiende la proboscis en su cercanía, una respuesta que no es afectada si se cubren los ojos. Esto significa que estos insectos pueden estimar la distancia a que se encuentra la fuente utilizando solamente información térmica, probablemente mediante triangulación con ambas antenas. Las vinchucas podrían asimismo seguir el gradiente de aire caliente, formado entre el animal y la fuente, y medir la forma en que la temperatura aumenta, dado el carácter no lineal de la variación de temperatura con la distancia. Con esta información ellas podrían deducir la posición de la fuente y su temperatura relativa y, alcanzada cierta magnitud en la entrada por ambas antenas, desplegar la respuesta rostral. Sin embargo, cuando la temperatura de la fuente es mayor de 45°-47°C, los insectos no se aproximan a la misma, independientemente de la distancia a que se encuentren (Nicolle & Mathis, 1941, sección 3b. de este trabajo). En el experimento presentado en la sección 3d., los insectos se hallaban suspendidos y no podían seguir gradientes de aire caliente y es improbable que los movimientos antenales pudieran ser suficientemente amplios como para permitir la triangulación, considerando la distancia a la fuente.



La idea tradicional de la orientación por gradientes de aire caliente no es entonces suficiente para explicar el comportamiento de los insectos. Si los insectos pudieran medir la cantidad de energía radiante recibida y su longitud de onda, dado que la primera depende de la distancia a la fuente y la segunda de su temperatura, dispondrían de la información necesaria para conocer la temperatura y distancia de una fuente. Una segunda posibilidad que podría brindar la utilización de la radiación IR, que no requiere discriminación de la longitud de onda, es la medición del ángulo de incidencia con una mayor resolución que el proporcionado por el gradiente de aire caliente.

La percepción de radiación IR no había sido demostrada, hasta el presente, en insecto hematófago alguno. Las vinchucas han demostrado poseer dicha capacidad y, junto con las serpientes de las familias Crotalidae y Boeidae y el coleóptero *Melanophila acuminata*, constituyen los únicos animales capaces de percibir calor radiante conocidos hasta el presente.

Dado que otros autores no lograron demostrar dicha capacidad en reducidos hematófagos (Wigglesworth & Gillet, 1934a, b; Núñez, 1987), es necesario analizar por qué sus resultados difieren de los nuestros. En este contexto podría ser de importancia que: (1) en ambos casos los experimentos se realizaron con *R. prolixus*; aunque diferencias interespecíficas son improbables, no pueden ser excluidas; (2) en ambos fue cuantificada la respuesta rostral, una reacción de umbral mucho mayor que las medidas aquí; (3) Wigglesworth & Gillet (1934a, b) compararon la respuesta hacia dos fuentes a la misma temperatura, pero con diferente emisión IR, pudiendo haber sido la emisión de ambas fuentes superior al umbral; (4) Núñez (1987) interpuso una corriente de aire entre la fuente y los insectos, y ellos no respondieron, aunque en ausencia de la corriente lo hicieran a diferencias de sólo 1°C por encima de la temperatura ambiente. Las vinchucas son extremadamente sensibles a las corrientes de aire, pudiendo haber sido disturbadas por ellas.

No debe excluirse, sin embargo, que en condiciones naturales las vinchucas puedan utilizar gradientes de aire caliente y corrientes de convección, además de la clave IR. La orientación hacia el hospedador es guiada por claves multimodales y cada etapa en la secuencia comportamental utiliza una distinta modalidad de entrada sensorial, entre las que la IR sería una más. Dicha clave presenta la ventaja de no ser perturbada por corrientes de aire que el gradiente de aire caliente o las corrientes de convección. La detección IR permitiría a los insectos la localización de una fuente térmica desde todas direcciones, mientras que las corrientes de convección, por ejemplo, sólo son efectivas cuando el animal se encuentra encima de la fuente.

La base fisiológica de la recepción IR es todavía un tema de controversia, aun en el caso mejor analizado de las serpientes. Si se trata de un proceso de fototransducción como el que ocurre en los sistemas visuales o la simple elevación local de la temperatura de la delgada membrana de las fosetas sensoriales no puede deducirse de los datos disponibles. Si bien no se han hallado aún pigmentos que pudieran absorber la radiación y mediar la transducción del estímulo y no hay suficiente evidencia como para descartar dicha posibilidad. En el caso de *M. acuminata*, el problema no ha sido investigado.

¿Cuál es la sensibilidad térmica de las vinchucas? Con los datos obtenidos en la sección 3e. es posible estimar el umbral de respuesta a estímulos térmicos en *T. infestans*. De acuerdo a la ley de Stefan-Boltzmann, la radiación neta de la fuente térmica utilizada resulta:  $W = \sigma \epsilon ((T + T)^4 - T^4)$ ; siendo  $\sigma = 5,67 \times 10^{-12}$  Watt  $\text{cm}^{-2} \text{ } ^\circ\text{K}^{-4}$ , la constante de Boltzmann;  $\epsilon = 0,78$  la emisividad de la pintura negra y  $T = 10 \text{ } ^\circ\text{K}$ , la diferencia entre la temperatura de la fuente y el fondo (temperatura ambiente). Para la fuente utilizada el valor calculado de  $W$  es  $6 \times 10^{-4}$  Watt  $\text{cm}^{-2}$  o, para una superficie de  $0,0314 \text{ cm}^2$ ,  $1,88 \times 10^{-4}$  Watt. En la posición del insecto, la energía recibida es este valor, dividido el cuadrado

de la distancia (4 cm), o sea  $1,17 \times 10^{-5}$  Watt  $\text{cm}^{-2}$ . Si sólo el 36% de la radiación IR atraviesa el filtro de polietileno, obtenemos que el insecto recibe  $4,2 \times 10^{-6}$  Watt  $\text{cm}^{-2}$ . Este valor de energía es entonces suficiente para desencadenar al menos los primeros componentes de la respuesta a estimulación térmica. Los umbrales de sensibilidad medidos en otros animales en los cuales fue demostrada percepción IR son:  $6 \times 10^{-5}$  Watt  $\text{cm}^{-2}$  en *Melanophila acuminata* (Evans, 1963) y  $8 \times 10^{-5}$  Watt  $\text{cm}^{-2}$  en boas (Hartline, 1974). De acuerdo a estos cálculos, las vinchucas serían los animales con mayor sensibilidad térmica conocida hasta el momento.

Tomando  $4,2 \times 10^{-6}$  Watt  $\text{cm}^{-2}$  como una aproximación al valor umbral, es posible calcular la distancia a que las vinchucas serían capaces de detectar un hospedador, únicamente por el calor irradiado por el mismo. Dado que la cantidad de energía recibida depende del ángulo a que se encuentra el detector, relativo al plano de la superficie emisora ( $\alpha$ ), y de la distancia ( $d$ ), de acuerdo con la ecuación:  $W_1 = W \cos \alpha / d^2$  es posible calcular el valor de distancia  $d$  máxima a que una fuente será percibida por las vinchucas. Obtenemos de este modo que  $d_{\max} = \sqrt{W \cos \alpha / W_1}$ . Siendo la emisión de la piel  $5,44 \times 10^{-4}$  Watt  $\text{cm}^{-2}$  (Hardy, 1934), la superficie de una mano equivalente a la de un disco de 10 cm de diámetro y la de la cara a uno de 20 cm de diámetro, obtenemos las curvas de la figura 8.1. Es decir, las vinchucas podrían percibir el calor irradiado por una cara desde una distancia de 2 metros y por una mano a 1 metro.

El valor de energía calórica aquí considerado producirá un aumento de la temperatura de los receptores antenales de  $0,004^\circ\text{C}$  (Hartline, 1974). Este valor se encuentra varios órdenes de magnitud por encima del ruido térmico en un receptor, calculado por Dusenbery (1988). En termorreceptores de dimensiones comprendidas entre  $0,1 \mu\text{m}$  y 1 mm, dicho valor, considerado el límite físico de operación del sensor, alcanza  $1 \times 10^{-8} \text{ }^\circ\text{C}$ . Una constante en todos los animales en los que se ha demostrado una elevada sensibilidad térmica es la existencia de una diferencia de

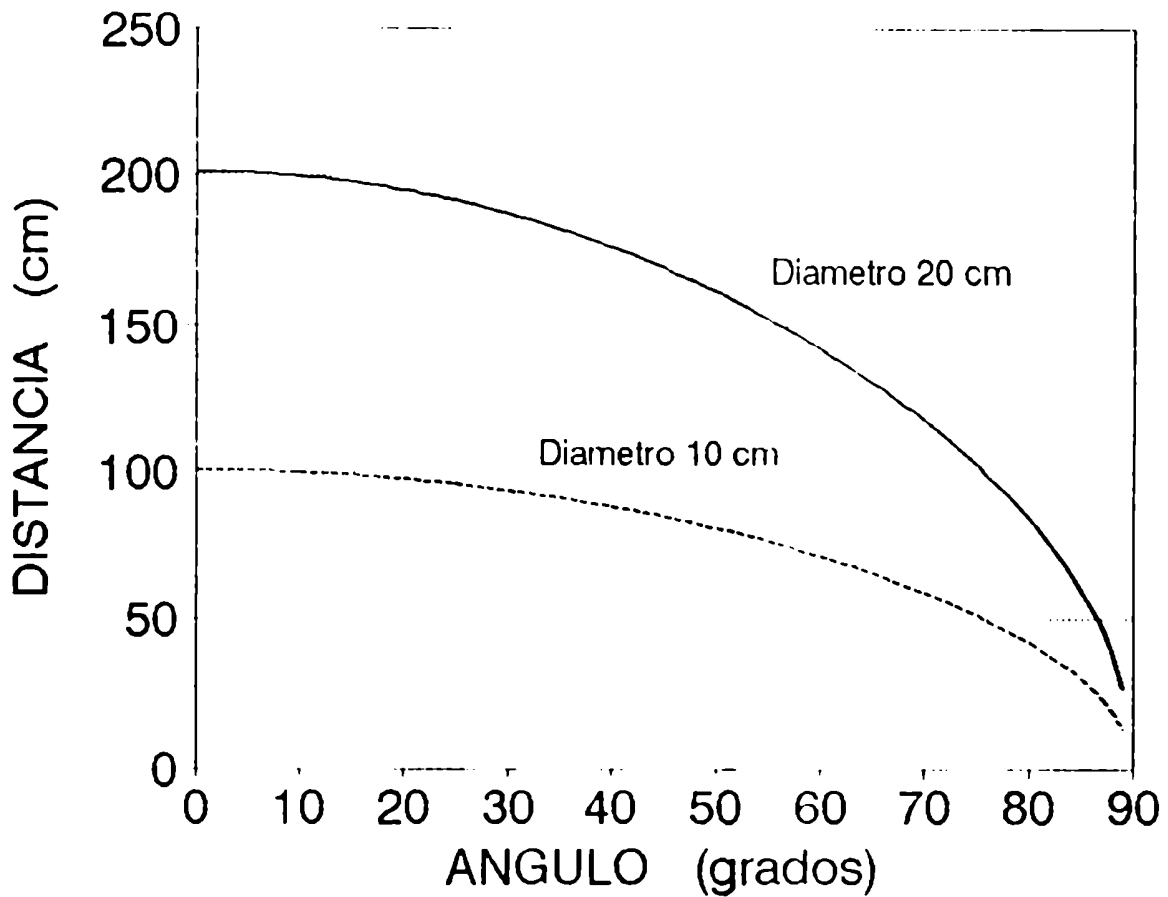


Fig. 8.1. Distancia estimada a que las vinchucas podrían percibir el calor irradiado por un disco 10 cm de diámetro (equivalente a una mano) y otro de 20 cm (equivalente a una cara) desde diversos ángulos relativos al eje transversal al plano del disco. Valores calculados mediante la fórmula:  $d_{max} = \sqrt{W \cos \alpha / W_1}$ , considerando la emisión de la piel humana:  $5,44 \times 10^{-4}$  Watt  $cm^{-2}$  ( $=W$ ) (Hardy, 1934) y en umbral de percepción de las vinchucas:  $4,2 \times 10^{-6}$  Watt  $cm^{-2}$  ( $=W_1$ ).

por lo menos tres órdenes de magnitud entre la máxima sensibilidad exhibida y el límite teórico. Según Dusenbery (1988), la magnitud de las señales térmicas presentes en la naturaleza no requiere una mayor sensibilidad. Por lo tanto, no habrían tenido lugar presiones de selección suficientes para desarrollar receptores más sensibles.

En el caso particular de las vinchucas, se debe recordar que la sensibilidad térmica está asistida, durante la búsqueda de alimento, por otras claves sensoriales, tales como quimiorrecepción, mecanorrecepción (anemotaxis), higrorrecepción, y activación por CO<sub>2</sub>. La convergencia multimodal (Horn, 1985) podría entonces posibilitar un desempeño aún más eficiente durante la búsqueda de alimento.

Según los experimentos relatados en la sección 3c., la intensidad de la respuesta de las vinchucas a la estimulación térmica varía con el estadio ninfal y con el ayuno. Cualquiera que se dedique a criar vinchucas notará que las ninfas de los primeros estadios responden más rápidamente que las ninfas del último estadio o los adultos a la estimulación para alimentarse, ya sea de un animal vivo o del alimentador artificial.. Lo mismo se observa entre animales del mismo estadio que han comido recientemente y aquellos ayunados, como entre las diferentes especies de Triatominae. Por ejemplo, *R. prolixus* responde más rápidamente a la estimulación que *T. infestans*, quien a su vez lo hace con más facilidad que *Dipetalogaster maximus*. La respuesta que conduce a la alimentación sobre un hospedador está normalmente modulada por factores externos, como luz, olores, calor, vibraciones, etc. que interactúan con factores motivacionales endógenos, bajo modulación circadiana y del nivel de ayuno. En otros insectos hematófagos ha sido descripta una modulación de la respuesta de los receptores sensoriales en función del ayuno. Un factor presente en la hemolinfa de *Aedes aegypti* ayunados afecta directamente la respuesta electrofisiológica de las células

sensoriales de los mosquitos ante la estimulación (Davis, 1984). Warnes & Finlayson (1986) describieron una variación de la amplitud del EAG con el ayuno en *Stomoxys calcitrans*. En el caso de los Triatominae, las variaciones de la respuesta con el ayuno, con el desarrollo e interespecíficas podrían deberse a una modulación a nivel periférico sensorial o bien originada en el sistema nervioso central. A que nivel o niveles (recepción, percepción, integración multisensorial o activación de comandos motores) se produce en cada caso la modulación de la respuesta es una incógnita que permanece abierta.

El análisis de la primera etapa de procesamiento de la información a nivel sensorial puede ser investigada mediante métodos electrofisiológicos. El electroantenograma (EAG) constituye la alternativa más rápida y sencilla, teniendo en cuenta nuestro escaso conocimiento de la fisiología sensorial de las vinchucas.

El EAG ha demostrado ser un método aplicable al análisis de la quimiorrecepción en vinchucas. Las respuestas electrofisiológicas al ácido butírico, ácido láctico y CO<sub>2</sub>, constituyen un correlato cualitativo a las respuestas de comportamiento observadas frente a dichos compuestos (Ward & Finlayson, 1982; Núñez, 1987). Debido a que las concentraciones reales de cada compuesto en el aire de estimulación no han sido determinadas, no puede aún inferirse relación cuantitativa alguna. El registro de la respuesta frente a la estimulación química persiguió, como únicos objetivos, el ensayo del EAG en *T. infestans* y la comparación entre las respuestas a estímulos térmicos y químicos. El EAG es un método relativamente sencillo, que permitire ensayar rápidamente la respuesta de las vinchucas a una gran cantidad de sustancias que podrían estar involucradas en diversos comportamientos. Los ensayos de comportamiento, que son la prueba última de la percepción del estímulo y de una respuesta funcional del organismo correlacionada, podrían restringirse entonces a aquellas

sustancias que superan la instancia previa de recepción a nivel sensorial.

Sin embargo, el EAG no parece ser un método adecuado para el estudio de la base sensorial de la respuesta a estímulos térmicos. La ausencia de una respuesta definida podría deberse a la diversas modalidades de respuesta observadas a nivel de los receptores térmicos. Como se dijo anteriormente, las unidades termorreceptoras de las sensilias celocónicas responden, ante un aumento de la temperatura, disminuyendo su frecuencia de disparo. Por otra parte, dichas unidades se encuentran asociadas con otras dos células en las sensilias celocónicas, respectivamente higo- y xerorreceptora. Dado que la presentación de un estímulo térmico implica de manera concomitante una variación local de la humedad relativa, la respuesta global dependerá también de dichas células. A esto se agregaría además la presencia de unidades de diversa modalidad de respuesta frente a estímulos térmicos observada en la cueva de cerdas (Fig. 7.7). La heterogeneidad o diversidad de la respuesta electrofisiológica constituye uno de los factores limitantes de la aplicación del EAG y allí podría residir la causa de la ausencia, en la literatura, de su aplicación al estudio de la termorrecepción en insectos.

La respuesta de los termorreceptores puede ser medida mediante registros extracelulares de las células sensoriales. De este modo, Bernard (1974) caracterizó la respuesta de las sensilias celocónicas a la temperatura y fué estudiada en este trabajo la respuesta de la cueva de cerdas a la estimulación térmica. Tres unidades termosensibles diferentes fueron reconocidas en dicho órgano. Si bien los resultados no permiten excluir la posibilidad de que la cueva de cerdas pueda también responder a otros estímulos químicos, como feromonas u otras sustancias no analizadas, la evidencia morfológica y electrofisiológica sugieren fuertemente una función termorreceptora. Sólo un estudio cuantitativo detallado de la respuesta a estímulos térmicos, bajo condiciones de estimulación más precisas que las aquí utilizadas,

podrá verificar esta hipótesis. Tal estudio se hace también necesario para dilucidar cuál o cuales órganos sensoriales son los responsables de la recepción de calor radiante (IR). La cueva de cerdas comparte ciertas características con los órganos receptores de radiación IR conocidos, como ser la forma de foseta o saco (serpientes y *M. acuminata*) y estar cubierta por una capa de cera (*M. acuminata*). La evidencia disponible es, sin embargo, muy escasa como para atribuirle tal función en las vinchucas.

Con el diseño utilizado en el capítulo 4 de este trabajo se posibilitó la estimulación de los termorreceptores antenales, pero no a través del alimento en sí. En tales condiciones, el estímulo térmico desencadenó la respuesta rostral, conduciendo al contacto de las piezas bucales con la membrana del alimentador. La entrada sensorial a través de los receptores rostrales (mecánica, química, térmica, etc.) se agregaría entonces a la antenal para conducir a la penetración de los estiletes y la prueba del alimento. En esta etapa, serían los compuestos fagoestimulantes presentes en la dieta los únicos responsables de desencadenar la respuesta de ingestión, sin importar la temperatura del alimento. Por lo tanto, la entrada térmica no es necesaria ni para el reconocimiento del alimento, ni luego de comenzada su ingestión. Por otra parte, la cantidad de alimento ingerida tampoco se vería afectada por la temperatura del mismo.

La disminución de la velocidad de ingestión al descender la temperatura de la dieta (Fig. 4.4) podría resultar de una variación en la viscosidad de la sangre o en la disminución de la frecuencia de operación de la bomba de ingestión. La curva de regresión se corresponde más con el segundo efecto, general en un animal exotérmico, que con la variación de la viscosidad de un líquido heterogéneo como la sangre (Smith, 1979).

Temperaturas de la sangre muy bajas provocaron el rechazo al contacto con la superficie a picar en muchos insectos (Fig. 4.2). Este hecho sugiere la presencia de termorreceptores, que operan a



temperaturas bajas (receptores de frío), tal como fueron demostrados en otros insectos mediante técnicas electrofisiológicas (Kerkut & Taylor, 1957).

Los resultados obtenidos nos permiten extraer las siguientes conclusiones: (a) La clave térmica es utilizada para la orientación y para desencadenar la respuesta rostral; (b) La temperatura de la sangre no es un factor desencadenante (*trigger*) de la ingestión, pero el número de insectos que se alimenta aumenta con el aumento de la misma; (c) Una vez iniciada, la ingestión no depende de la temperatura del alimento; (d) La ingestión no es un fenómeno todo o nada, i.e. no todos los insectos que se alimentan, lo hacen llenando sus buches.

Estos hallazgos en *T. infestans* no están de acuerdo con los resultados obtenidos por Friend & Smith (1977) en *R. prolixus*. Estos autores sugieren que la temperatura de la sangre es un factor desencadenante de la respuesta de ingestión y consideran el llenado del buche como un proceso de tipo todo o nada. Diferencias en los diseños experimentales utilizados podrían ser responsables de esta discordancia, aunque no pueden descartarse diferencias interespecíficas. Respecto a esta última posibilidad, Guerenstein (com. pers.) halló diferencias significativas en el comportamiento de ingestión de ambas especies, referidos a su respuesta a compuestos fagoestimulantes.

Por otra parte, el control térmico del comportamiento alimenticio, como en *Apis mellifera* (Núñez, 1966), dependería más de la entrada sensorial antenal que de la temperatura del alimento en sí, la que jugaría un papel secundario.

La eficiencia del alimentador artificial, medida por la cantidad de alimento ingerido por los insectos, no parece mejorar cuando se adicionan claves químicas ni táctiles (sección 2c.). La temperatura de la fuente sería, por lo tanto, la clave más importante implicada en la respuesta de prueba del alimento.

Otras claves no parecen influir de manera significativa, con la posible excepción del CO<sub>2</sub>, no analizada en los presentes ensayos.

Los resultados obtenidos nos permiten desarrollar alimentadores artificiales simples y eficientes, que utilicen el calor como única clave de estimulación de los insectos. Hemos visto que el agregado de claves olfativas al alimentador no aumenta su eficiencia, siendo la clave térmica la señal necesaria y suficiente para que los insectos se alimenten. Ahora bien, el mantener la sangre a 32°-35°C aumenta la velocidad de los procesos bioquímicos de descomposición. Una oferta continua de alimento, por ejemplo durante toda la noche, se ve dificultada por la desnaturalización de la sangre, por lo que en algunas horas puede ya no ser aceptada por las vinchucas. Los resultados presentados en el capítulo 4, relativos a la importancia de la temperatura de la sangre en el comportamiento de ingestión, brindan una clave para la solución de este problema. Fue demostrado entonces que la clave térmica sólo es necesaria para orientar a los insectos hacia la fuente y desencadenar la respuesta de prueba de la dieta, en la que no es tenida en cuenta la temperatura de la misma. Sería posible, por lo tanto, la utilización de alimentadores artificiales en los que la sangre se mantenga refrigerada, si se logra estimular a los insectos independientemente de la temperatura de la dieta.

Un modelo de alimentador diseñado en base a estos principios fue construido y se muestra en la figura 8.2. La sangre, contenida en una bolsa de polietileno de alta densidad esterilizable de 150 cc de capacidad, se mantiene en una caja aislante de poliestireno expandido a baja temperatura (Fig. 8.2a). La bolsa descansa sobre una bandeja pivotante en su extremo anterior y que es sostenida mediante un cable por su extremo posterior. Dicho cable está vinculado al eje excéntrico de un motor eléctrico ubicado en el exterior de la caja. El motor, al girar a razón de 20 RPM, desplaza la bandeja en un movimiento de ascenso y descenso en cada giro. Mediante una cánula de PVC se

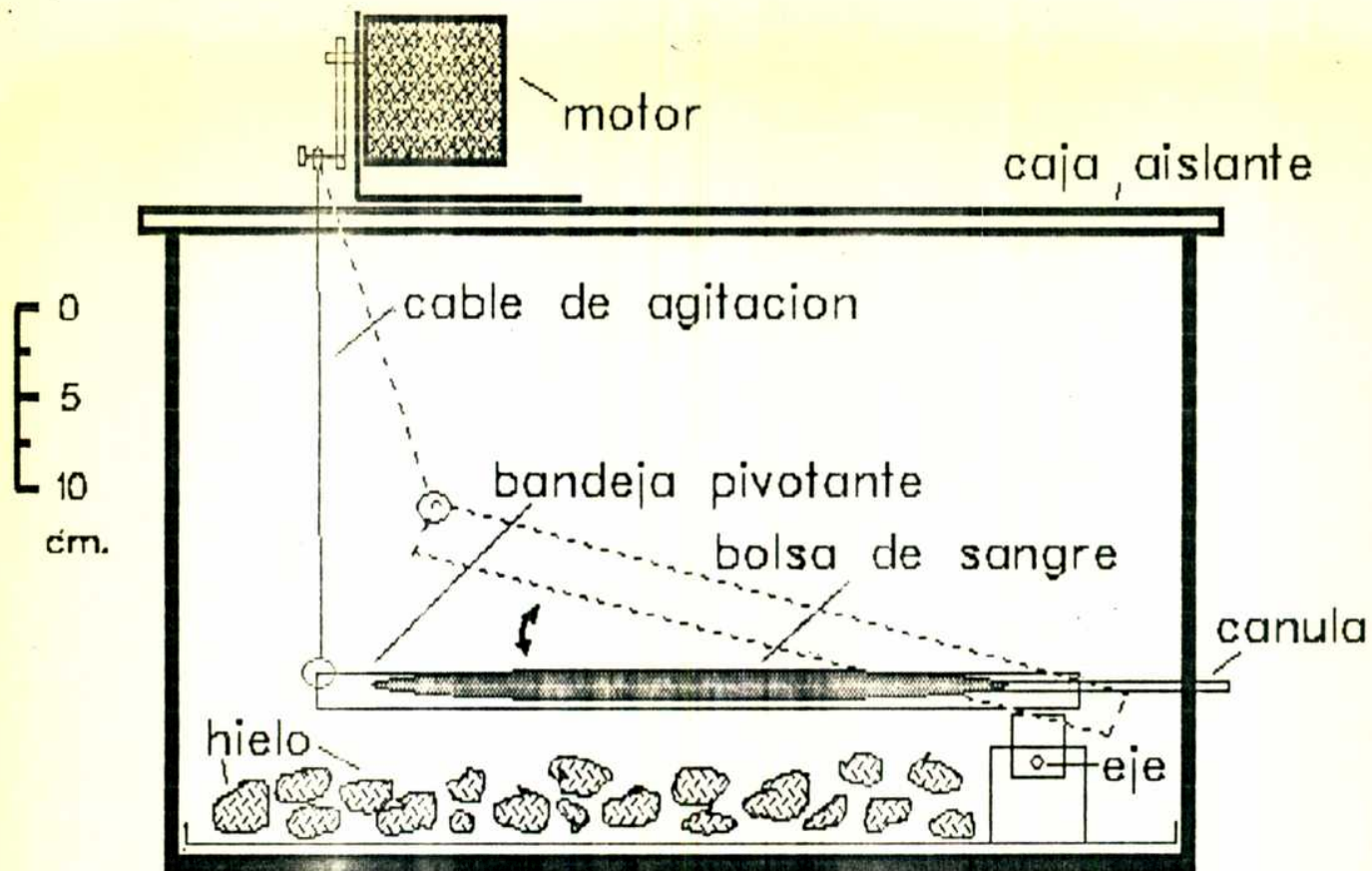
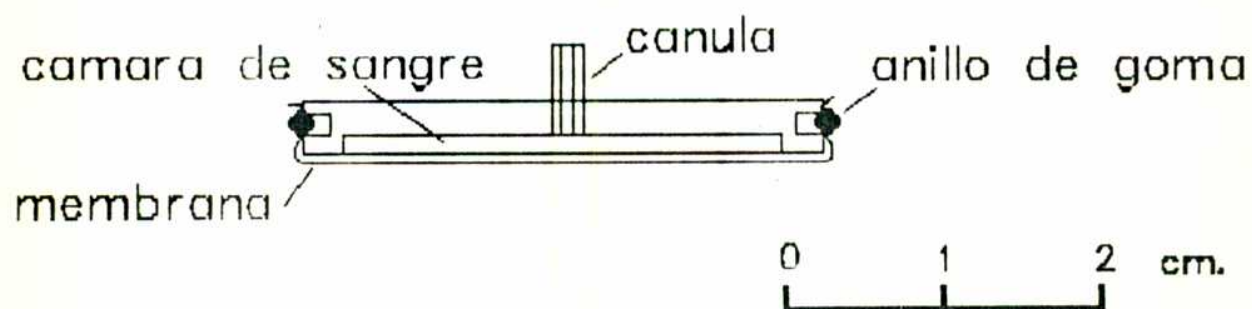
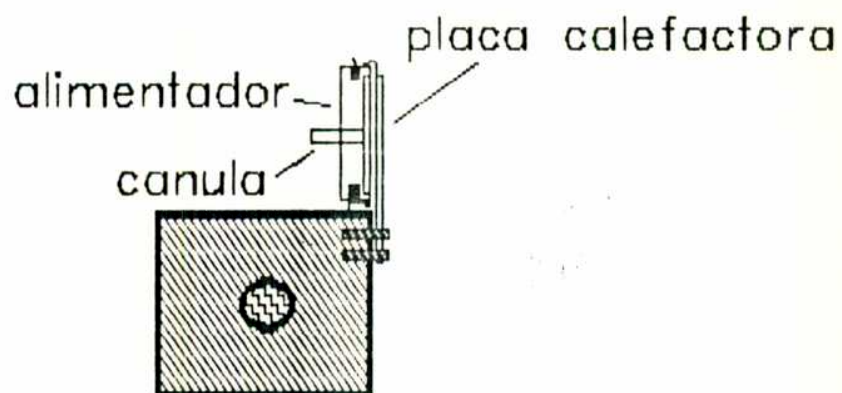
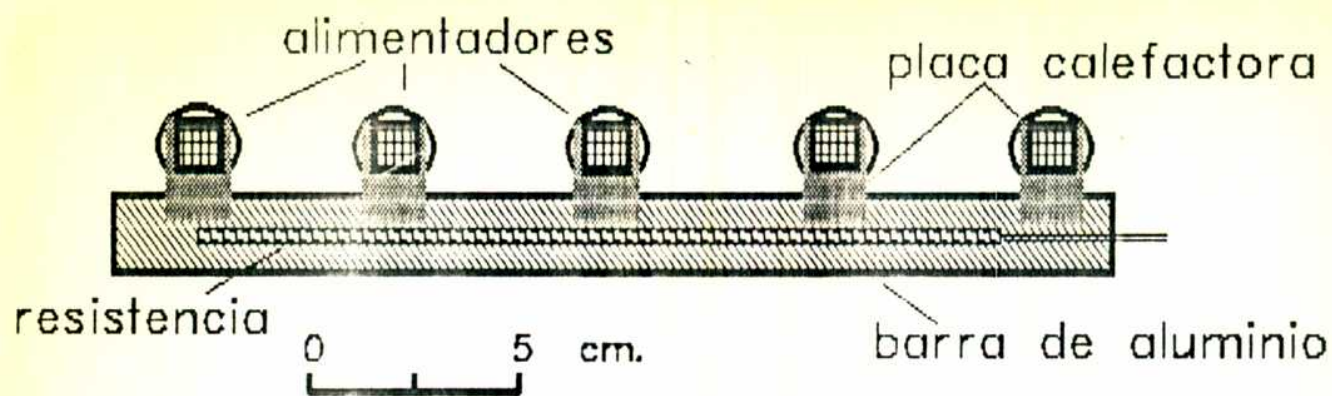


Fig. 8.2. Alimentador artificial en el que se mantiene la sangre a baja temperatura, permitiendo una oferta prolongada de alimento. a) caja aislante con la sangre y sistema de agitación; b) boca de alimentación de 0,5 ml de capacidad; c) sistema estimulador de los insectos, vista frontal; d) sistema estimulador, vista lateral.



conecta la bolsa de sangre con las bocas de alimentación. Las mismas son discos de acrílico en los que se torneó una cámara de aproximadamente 0.5 ml de capacidad (Fig. 8.2b). La cámara se cierra mediante una membrana de látex que se ajusta mediante un anillo de goma (O-Ring). Mediante derivaciones de la cánula principal, es posible asistir a varias bocas simultáneamente.

El sistema estimulador (Fig. 8.2c y d) consiste en una barra de aluminio calentada mediante una resistencia eléctrica ubicada en su interior. Por medio de un transformador variable o un termostato es posible mantener constante la temperatura de la barra. Placas de bronce perforadas, de 0,7 mm de espesor, se hallan fijadas a la barra de aluminio. Cada placa, al ser calentada a través de la barra de aluminio, actúa como estimulador de los insectos a picar. La disipación de calor hacia la sangre se reduce interponiendo una malla plástica de 0,7 mm de espesor y 1.5 m de abertura entre las placas y las bocas de alimentación.

El ascenso y descenso de la bolsa de sangre en la bandeja pivotante genera el movimiento de la sangre en las cánulas y bocas de alimentación, evitando la eritrosedimentación.

El presente alimentador artificial ha sido ensayado con éxito en todos los estadios de *T. infestans* y *R. prolixus*. No sólo permite el mantenimiento de un gran volumen de sangre sin que se desnaturalice, sino que hace posible la oferta continua de alimento.

Los resultados obtenidos en el capítulo 5 de este trabajo revelan una relación de la preferencia térmica con la hora del día y el grado de ayuno de los animales. Las vinchucas mostraron un ritmo diario de preferencia (Fig. 5.2). Las mismas se desplazaron hacia valores mayores de temperatura ambiente durante la fotofase y comienzo de la escotofase, i.e. a las horas del día en que normalmente se encuentran agregadas aunque no inmóviles (cf. Wigglesworth & Gillet, 1934a y Núñez, 1987). Los insectos alcanzan, por lo tanto, una temperatura corporal máxima poco antes

de desplegar su máxima actividad diaria en la segunda hora de la escotofase.

Podría argumentarse que las vinchucas se desplazan hacia temperaturas altas al atardecer, porque podrían ser indicativas de la presencia de un hospedador potencial. Sin embargo, *T. infestans* parece ser capaz de estimar la temperatura de fuentes distantes y evitar aquellas con la temperatura del extremo más caliente de la arena experimental, i.e. 50°C (sección 3d.).

Como fue relatado en la sección 3e., *T. infestans* podría encontrar alimento por medio del calor radiante emitido por el cuerpo del hospedador. Dado que esta clave depende de la diferencia de temperatura entre la fuente emisora y el ambiente, una temperatura ambiente relativamente baja sería más adecuada para la búsqueda nocturna de alimento.

La variación a largo plazo de la temperatura preferida podría constituir una forma de regulación comportamental de la tasa metabólica. Una temperatura alta estimularía la digestión, mientras que, con el aumento del nivel de ayuno, temperaturas más bajas serían más adecuadas para la conservación de energía. El brusco aumento en el valor de temperatura preferida que se produce luego de la alimentación y el descenso gradual al aumentar el ayuno apoyan esta interpretación. Este tipo de termorregulación comportamental parece ser un mecanismo común, que afecta una amplia gama de animales poiquiloterms (Wurtsbaugh & Neverman, 1988).

La ausencia de correlación entre la ocurrencia de los picos de oviposición observados y el tiempo invertido por los insectos a cada valor de temperatura en el gradiente, revela un comportamiento de preferencia activa en las hembras para la oviposición. La presencia de dos máximos de oviposición a 26° y 29°C refleja o bien diferencias individuales en la preferencia de las hembras o bien una dependencia del estado fisiológico de los insectos, relacionado con el grado de ayuno. Desafortunadamente, los registros en video no permiten visualizar los huevos y así

conocer si fueron puestos a determinado valor de temperatura en un cierto momento luego de la alimentación.

En casi todos los ensayos de preferencia térmica, se genera inevitablemente un gradiente de humedad relativa asociado al de temperatura, un hecho raramente tenido en cuenta (Schaub, 1977). La contribución relativa de ambos factores en la selección de un sitio por los animales no puede, en la mayoría de los casos, ser fácilmente discernida. Este hecho es especialmente importante en el caso de las vinchucas, si se tiene en cuenta la enorme modulación de la pérdida de agua que ellas exhiben. Durante el primer día siguiente a la ingestión de sangre, los insectos pierden un 40% de la cantidad de fluido ingerida mediante una copiosa diuresis. La extrema resistencia al ayuno que muestran las vinchucas, por otra parte, requiere de la conservación de agua. Nuestros resultados en el gradiente de humedad indican que, al menos para la variación a largo término, es la temperatura y no la humedad el principal factor responsable del comportamiento de los insectos en el gradiente de temperatura.

Dentro de una vivienda humana, las vinchucas muestran una distribución que no es aleatoria y que parece depender de la disponibilidad de alimento (Schofield, 1979; Zeledón & Rabinovich, 1981). Las condiciones microclimáticas, el estado fisiológico de los insectos y feromonas de agregación (Schofield & Patterson, 1977) son factores que podrían afectar la distribución espacial de las vinchucas. Considerando los resultados obtenidos en el presente trabajo y aquellos de Di Luciano (1983) con ninfas del primer estadio, la preferencia térmica parece sufrir modificaciones a lo largo del desarrollo ontogenético de *T. infestans*. Dicho cambio afecta no sólo la preferencia por un valor determinado de temperatura ambiente, sino también el efecto del ayuno sobre dicho comportamiento. Recordemos que en las ninfas I utilizadas por Di Luciano (1983) el ayuno no modificó la termopreferencia. La distribución en una vivienda podría,

entonces, verse también afectada por esta diferencia en el comportamiento de ninfas y adultos. Los insectos podrían elegir aquellos sitios en los que los valores de temperatura y humedad relativa, así como su variación diaria, se ajusten a los requerimientos del estado de desarrollo y ayuno de los individuos.

Aunque la temperatura preferida no implica necesariamente la óptima para una especie, de los resultados podemos inferir que para *T. infestans*, así como para otros insectos, una exposición a un valor oscilante de temperatura ambiente sería preferible a un valor constante (Remmert, 1960; Hoffmann, 1974; Behrens et al., 1983). Experimentos realizados por Núñez (com. pers.) sugieren que la cría de esta especie a temperatura oscilante es más eficiente que a la temperatura constante correspondiente, alcanzando un mayor número de insectos el estado adulto.

El análisis del comportamiento de las vinchucas en un gradiente térmico puso en evidencia algunos aspectos aplicables a la cría en el laboratorio. En primer lugar, se ha medido cuales son las temperaturas que prefieren las vinchucas para estar y para oviponer. En tanto no se disponga de un análisis detallado de las condiciones óptimas para el desarrollo de una población en el laboratorio, es lícito considerar la preferencia exhibida como una buena aproximación. Si bien el valor medio absoluto mostró una variación con el ayuno, una temperatura ambiente de entre 27° y 29°C parece ser la adecuada para el mantenimiento de adultos alimentados semanalmente. Este intervalo incluye también el valor preferido por las hembras para oviponer más importante. Otra implicancia práctica se deriva de la correlación entre la oscilación diaria de la preferencia térmica y la mayor eficiencia de la cría bajo un régimen oscilante de temperatura (Núñez, com. pers.). Tal como fue demostrado en otros insectos (Ratte, 1985), el mantenimiento a temperatura constante parece constuir una situación que no sería óptima para el desarrollo de las vinchucas.



La actividad de las vinchucas está modulada por un reloj interno que controla la expresión de diversos comportamientos. Todas las especies de Triatominae estudiadas hasta el presente muestran hábitos exclusivamente nocturnos (Wiesinger, 1956; Constaninou, 1979; Settembrini, 1984). La ocurrencia temporal de la actividad locomotora espontánea parece adaptarse a los hábitos diurnos de los hospedadores, evitando así ser víctimas del comportamiento antiparasitario de los mismos. No se han realizado aún estudios de actividad en especies que se encuentren asociados a hospedadores exclusivamente nocturnos, e.g. murciélagos y comadrejas.

Se ha observado que la distribución temporal de la actividad de las vinchucas muestra dos picos, uno al comienzo y otro al final de la escotofase (Fig. 6.2). El primer pico, que en los registros presentes en la literatura aparece mucho más conspicuo que el segundo, centró probablemente la atención de otros autores y los indujo a caracterizar la actividad de las vinchucas como unimodal. Nuestros resultados muestran, sin embargo, que la actividad de *T. infestans* sigue un patrón de distribución bimodal.

Existen tres mecanismos que pueden dar origen a un patrón bimodal de actividad. El primero consiste en la simple respuesta a factores externos, que desencadenan uno o ambos picos de actividad. En ausencia de la señal desencadenante, uno o ambos componentes desaparecen. En el segundo caso, ambos máximos están bajo control de un único oscilador. En condiciones constantes, ambos máximos oscilarán libremente, con idéntico período espontáneo (Wiedenmann, 1980; Roces, 1990). El tercer mecanismo está basado en el control de cada uno de los picos de actividad por un oscilador diferente, pudiendo mostrar cada uno de ellos, en condiciones constantes, un período espontáneo de oscilación propio (Wiedenmann, 1983).

En el caso de la especie aquí estudiada, la persistencia de ambos máximos en condiciones constantes de iluminación y temperatura (Fig. 6.2. 6.3), con un período de oscilación cercano

pero diferente a 24 horas, sugiere que ambos son de naturaleza endógena. Por otra parte, el período de oscilación espontánea difiere entre ambos picos de actividad. Este hecho nos lleva a postular la presencia de dos osciladores diferentes, con períodos espontáneos distintos, que controlan cada uno la expresión de un pico de actividad, al anochecer y al amanecer, que pueden correlacionarse con la búsqueda de alimento y refugio respectivamente.

La variación del nivel de actividad con la temperatura (Fig. 6.6) muestra una relación no lineal entre ambos parámetros. Una gran disminución de la actividad a temperaturas de alrededor de 16°-20°C fue señalada por Wiesinger (1956). En nuestros experimentos se observa igualmente una disminución de la actividad locomotora a 20°C, pero también a una temperatura ambiente de 30°C. Una relación similar entre actividad y temperatura ambiente fue descrita por Brady & Crump (1978) en la mosca tse-tse, *Glossina morsitans*. En este contexto es importante recordar que, como fue presentado en el capítulo 5 de este trabajo, el intervalo de preferencia térmica está comprendido entre 24° y 29°C (Fig. 5.3).

Del análisis comparativo de la sincronización circadiana de la actividad a ciclos discretos de iluminación y temperatura ambiente, resultan ciertas contradicciones con los postulados clásicos. Uno de los criterios más firmes para evaluar la potencia relativa de un *Zeitgeber* es la respuesta a la inversión del ciclo (Rence, 1984). Cuanto menor cantidad de ciclos sean necesarios para la restitución de la diferencia de fases ( $\phi$ ) entre el ciclo ambiental y la actividad, tanto mayor será la influencia de ese factor sobre el oscilador endógeno. Mediante registros individuales, Settembrini (1984) determinó que, a la misma intensidad de luz que la aquí utilizada y a una temperatura de 26°C, los insectos necesitaron de 2 a 4 ( $3 \pm 0,8$ ) ciclos para resincronizar un corrimiento de 12 horas del ciclo de luz/oscuridad. En nuestros experimentos, el grupo de 10 insectos

resincronizó un desplazamiento similar del ciclo térmico, de valor medio 25°C, en solo un ciclo HLT. Según este criterio concluiríamos entonces que para las vinchucas, un ritmo diario de oscilación térmica de 10°C de amplitud es un *Zeitgeber* más potente que un ritmo LD de 25:0 lux. Este resultado podría ser fácilmente explicable por la alta sensibilidad térmica de las vinchucas, por sus hábitos fotofóbicos, etc.. Sin embargo, la utilización de otro paradigma experimental revela tanto la inexactitud de esta conclusión como la complejidad del sistema circadiano de las vinchucas.

La presentación simultánea de un ciclo de iluminación superpuesto a uno de temperatura ambiente permite comprobar que el primero ejerce un efecto sincronizador más importante. En todas las relaciones de fase entre ambos ciclos ambientales analizadas, la actividad se expresó mayormente durante la escotofase, independientemente de la temperatura en aquel momento. Si bien el ciclo térmico ejerce un notable efecto modulador de la expresión de la actividad, nunca logra adelantar su ocurrencia hacia la fotofase. Este resultado, por otra parte, confirma el rol temporizador del ciclo de temperatura, descartándose un efecto directo de depresión o estimulación de la actividad por alguna de las temperaturas del ciclo.

Notablemente, en los escasos estudios de presentación simultánea de ciclos de luz y temperatura se han obtenido respuestas similares en procesos diferentes de insectos no emparentados. En la eclosión de la mosca de la fruta (Pittendrigh et al. 1958), la actividad locomotora de la cucaracha *Leucophaea maderae* (Roberts, 1962) y la actividad circadiana de canto en el grillo *Teleogryllus commodus* (Rence, 1984) se han descrito respuestas similares a la aquí observada en la actividad locomotora de *T. infestans*. La explicación más satisfactoria la brinda el modelo de organización jerárquica de osciladores propuesto por Pittendrigh (1960, 1981a, b).

El modelo se basa en considerar la existencia de un sistema circadiano del cual forman parte múltiples osciladores, organizados jerárquicamente, y no de un oscilador interno único que controla todos los procesos que muestran una periodicidad diaria endógena. Uno de los osciladores (o grupo de osciladores) es sensible a la luz y es puesto en fase por el ciclo de luz/oscuridad, no es afectado por la temperatura ambiente y ejerce el rol de marcapasos para el organismo (oscilador A). El otro (oscilador B) es insensible a la luz, sensible a la temperatura y está subordinado al oscilador A, en cuanto está acoplado y es puesto en fase por aquel. De esta manera es posible explicar el diferente comportamiento ante la inversión del ciclo, según se trate de ciclos de iluminación o de temperatura. Dado que se trata de la expresión de distintos osciladores, cada uno responderá al período de transición de acuerdo a características propias, independiente del otro. Otro fenómeno que predice este modelo, es la existencia de "zonas prohibidas" dentro del ciclo diario, al ser impuestos ciclos simultáneos de luz y temperatura con diferente fase. En nuestro caso, para ninguna de las relaciones de fase entre ambos ciclos estudiadas se observó actividad durante la fotofase.

En su ambiente natural, e independientemente del valor medio en cada época del año, los insectos experimentan una variación diaria de la temperatura ambiente. Dicha oscilación térmica, se ha demostrado que puede actuar como señal de sincronización para la puesta en fase del reloj circadiano de las vinchucas. En condiciones naturales las transiciones luz/oscuridad/luz no ocurren en forma discreta, sino como una variación gradual cuya pendiente cambia a lo largo del año. Detallados análisis teóricos y experimentales, llevados a cabo entre otros por Pittendrigh (1981a, b) y Saunders (1973, 1982), revelan que sólo un sistema de múltiples osciladores es capaz de compensar eficientemente dicha variación. El sistema circadiano estaría asistido por la interacción jerárquica de osciladores que sincronicen las

variaciones diarias lumínicas y térmicas, existiendo dentro de cada categoría elementos que sincronicen cada una de las transiciones (i.e. amanecer y anochecer).

Un sistema circadiano de este tipo parece ser indispensable en aquellos fenómenos de periodicidad anual tales como la diapausa de muchos insectos (Saunders, 1982). En las vinchucas se han descrito variaciones estacionales de composición de las poblaciones o grado de infección con *Trypanosoma cruzi* (Gorla, 1987; Giojalas et al., 1987; Gorla & Schofield, 1989). En ningún caso se ha investigado la naturaleza endógena de un ritmo anual, por lo que desconocemos si este modelo sería aplicable, en las vinchucas, a este tipo de problemas.

Por otra parte, no hay evidencia de que sean necesarias estructuras termorreceptoras especializadas para mediar la entrada térmica responsable de la sincronización de ritmos térmicos. Las antenas de las vinchucas, desde hace mucho consideradas la principal vía de entrada de estímulos térmicos, serían indispensables para la orientación hacia una fuente térmica y en un gradiente de temperatura (Di Luciano, 1983). En la sincronización de ritmos térmicos, sin embargo, no parecen ser indispensables, aunque sí son importantes en la expresión de la actividad rítmica. Las vinchucas desantenasadas no sólo mostraron un patrón de actividad anómalo unimodal sino un corrimiento de la fase, que lleva a la expresión de la actividad a horarios totalmente inusuales.

A la lista de comportamientos anómalos observados luego de practicada la antenectomía se agrega la alteración de la expresión de la actividad circadiana. Las modificaciones del comportamiento de *R. prolixus* que siguen a la ablación de ambas antenas, señaladas por Wigglesworth & Gillet (1934a), no se limitan a la ausencia de respuesta frente a una fuente térmica. Estos autores describen además un aumento del umbral general de respuesta, que hace que los insectos abandonen con mayor dificultad el estado de

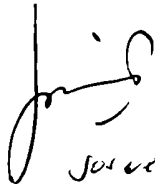
akinesis, y la aparición de reacciones evocadas visualmente que no muestran los insectos intactos. *R. prolixus* sin antenas persiguen e intentan picar objetos, como la punta de un lápiz, que se desplacen en su cercanía. Es por esta razón que en el presente trabajo se ha evitado recurrir a este método. Otros autores han utilizado la antenectomía para intentar poner en evidencia los órganos sensoriales involucrados en diversos comportamientos de *T. infestans* (Hack & Reparaz, 1978; Hack & Bar, 1979; Bar et al., 1987a, b; Di Luciano, 1983). En todos los casos, las alteraciones observadas en las respuestas medidas fueron atribuidas a la falta de los receptores sensoriales correspondientes (térmicos, químicos, etc.), los que se encontrarían ubicados en las antenas. En vista de las alteraciones comportamentales que produce la antenectomía en las vinchucas, se hace necesaria la revisión de la interpretación de los resultados de aquellos autores. A la lista de respuestas anómalas, que nada tienen que ver con la dificultad para orientarse según la clave térmica descrita por Wigglesworth & Gillet (1934a), se agrega ahora una profunda modificación de la respuesta circadiana. Las vinchucas desantenasadas no sólo muestran un patrón de actividad anómalo unimodal, sino un corrimiento de la de fase, que lleva a la expresión de la actividad a horarios inusuales. Dichos resultados fueron independientes de la modalidad del *Zeitgeber*, hecho que delata que la alteración involucra a una instancia de nivel superior del sistema circadiano. No existen antecedentes de investigaciones sobre la base fisiológica de las alteraciones que produce la antenectomía en los insectos, por lo que el tema merece ser investigado.

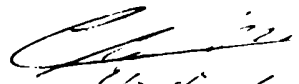
El análisis global de los resultados presentados en las secciones precedentes permite reconocer en la vinchuca un sistema modelo adecuado para el estudio del sentido térmico en los insectos. La posibilidad de la cría masiva en el laboratorio en condiciones de alimentación artificial (capítulo 2) y la importancia de la clave térmica en el comportamiento de las

vinchucas. ha permitido el estudio de las diversas modalidades en que dicha clave afecta a los insectos. La búsqueda de alimento (capítulo 3), la ingestión (capítulo 4), la selección de hábitat (capítulo 5) y la orientación temporal (capítulo 6), son comportamientos en los que se ha puesto en evidencia la importancia del sentido térmico de las vinchucas. El presente trabajo caracteriza entonces un sistema modelo que permite ser analizado desde enfoques experimentales muy diferentes, para el estudio de las bases fisiológicas del sentido térmico en los animales.

Por otra parte, se ha intentado transferir el conocimiento ganado en esta área a otros problemas, tal como la cría en el laboratorio, la utilización de alimentadores artificiales y la distribución de las vinchucas en viviendas humanas. El estudio de los ritmos circadianos en las vinchucas, por su parte, no sólo tiene un sentido de investigación puramente básica. Algunos de estos ritmos son especialmente interesantes dado que evidencian períodos de tiempo en los que los insectos podrían ser más vulnerables a agentes xenobióticos, y que podrían ser aprovechados para el "control racional" de la vinchuca. Si bien se carece de información directa sobre la variación circadiana de la sensibilidad a insecticidas en estos insectos, algunos datos llaman la atención sobre la importancia de ese estudio. En las vinchucas varios procesos rítmicos coinciden en su hora de ocurrencia: la ecdisis y la eclosión del huevo tienen lugar en la misma ventana temporal, i.e. al amanecer (Ampleford and Steel, 1982; Ampleford, 1985; Lazzari, 1990). Los estudios de penetración de insecticidas a través de la cutícula de insectos recién mudados y luego de completado el curtido de la misma revelan una mayor velocidad de penetración en los primeros (Fontán & Zerba, com. pers.). Por otra parte, un segundo máximo de actividad locomotora es desplegado por los insectos al amanecer. Si bien no se dispone de estudios que correlacionen actividad o tasa metabólica y acción de insecticidas en vinchucas, una

correlación positiva entre estos parámetros pudo ser determinada en otros insectos (Page, 1985). Así es que, al amanecer las vinchucas podrían llegar a ser más sensibles a pesticidas ya que en la población un mayor porcentaje de insectos se encuentran más activos, mudando o eclosionando, que a cualquier otra hora del día.

  
Jose Niñez

  
Claudio Lora



## CAPITULO 9

### Bibliografía

- Altner, H. & Loftus, R. (1985) Ultrastructure und function of insect thermo- and hygrosensors. *Ann. Rev. Entomol.* **30**: 273-295.
- Ampleford, E. (1985) Ecdysteroids influence the circadian system timing ecdysis in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Comp. Physiol.* **157**: 699-704.
- Ampleford, E. & Davey, K. (1989) Egg laying in the insect *Rhodnius prolixus* is timed in a circadian fashion. *J. Insect Physiol.* **35**: 183-187.
- Ampleford, E. & Steel, C. (1982) Circadian control of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Comp. Physiol.* **147**: 281-286.
- Autrum, H. (1950) Die Belichtungspotentiale und das Sehen der Insekten. *Z. vergl. Physiol.* **32**: 176-227.
- Baldwin, W.F.; Knight, A.G. & Lynn, K.R. (1971) A sex pheromone in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Can. Entomol.* **103**: 18-22.
- Bar, M.E.; Oscherov, E.B. & Damborsky, M. P. (1987) Competencia interespecífica e intraespecífica de triatominos en condiciones de laboratorio. *Resúmenes I Congreso Argentino de Entomología*, p. 123.
- Barth, R. (1952) Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). II parte: Um novo orgao sensível das Triatominae. *Bol. Inst. Oswaldo Cruz* **5**: 1-4.
- Barth, R. (1953) Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). III parte: Pesquisas sobre o mecanismo de picada das Triatominae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **51**: 11-33.
- Behrens, W.; Hoffmann, K. H.; Kempa, S.; Gäßler, S. & Merkel-Wallner, G. (1983) Effect of diurnal thermoperiods and quickly oscillating temperatures on the development and reproduction of crickets, *Gryllus bimaculatus*. *Oecologia* **59**: 279-287.

- Bernard, J. (1974) Etude électrophysiologique de récepteurs impliqués dans l'orientation vers l'hôte et dans l'acte hématophage chez un Hémiptère: *Triatoma infestans*. Thèse, Université Rennes, 285 pp.
- Bertram, D.S. (1971) Attraction of Triatominae bugs vectors of Chagas' disease to betalights. *Nature* **231**: 268.
- Brady, J. (1972) The visual responsiveness of the tsetse fly *Glossina morsitans* Westw. (Glossinidae) to moving objects: the effects of hunger, sex, host odour and stimulus characteristics. *Bull. ent. Res.* **62**: 257-279.
- Brady, J. (1988) Circadian ontogeny in the tsetse fly: a permanent major phase change after the first feed. *J. Insect Physiol.* **34**: 743-749.
- Brady, J. & Crump, A.J. (1978) The control of circadian activity rhythms in tsetse flies: environment or physiological clock?. *Physiol. Ent.* **3**: 177-190.
- Brumpt, E. (1914) Importance du cannibalisme et de la coprophagie chez les réduvidés hématophages (*Rhodnius*, *Triatoma*) pour la conservation des Trypanosomes pathogènes en dehors de l'hôte vertèbre. *Bull. Soc. Path. Exot.* **7**: 702-705.
- Buddenbrock v., W. (1952) *Vergleichende Physiologie, I. Sinnesphysiologie*. Birkhäuser.
- Bullock, T.H. & Cowles, R.B. (1952) Physiology of an infrared receptor - the facial pit of pit vipers. *Science* **115**: 541-543.
- Callahan, P.S. (1965a) Far infrared emission and detection by night-flying moths. *Nature* **206**: 1172-1173.
- Callahan, P.S. (1965b) Intermediate and far infrared sensing of nocturnal insects. Part I. Evidences for a far infrared (FIR) electromagnetic theory of communication and sensing in moths and its relationship to the limiting biosphere of the corn earworm. *Ann. ent. Soc. Am.* **58**: 727-745.
- Case, R. (1957) Differentiation of the effects of pH and CO<sub>2</sub> on the spiracular function of insects. *J. cell. Comp. Physiol.* **49**: 103-113.
- Cerisola, J.A.; Rohwedder, R.; Segura, E.L.; del Prado, C.; Alvarez, M. & Wynne de Martini, G. (1974) *El Xenodiagnóstico*. 127pp.. Ministerio de Bienestar Social, Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigaciones "Fatala Chaben".

- Constantinou, C. (1979) Circadian rhythms in insects. Thesis, University of London, 270pp.
- Constantinou, C. (1984a) Photoreceptors involved in the entrainment of the circadian activity rhythm of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J. interdiscipl. Cycle Res.* **15**: 195-201.
- Constantinou, C. (1984b) Circadian rhythm of oviposition in the blood sucking bugs, *Triatoma phyllosoma*, *T. infestans* and *Pastrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) *J. interdiscipl. Cycle Res.* **15**: 203-212.
- Corbière-Tichané, G. & Loftus, R. (1983) Antennal thermal receptors of the cave beetle, *Speophyes lucidulus* Delar. II. Cold receptor response to slowly changing temperature. *J. Comp. Physiol.* **153**: 343-351.
- Davis, E.E. (1984) Regulation of sensitivity in the peripheral chemoreceptor systems for host-seeking behaviour by a haemolymph-borne factor in *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* **30**: 179-183.
- Di Luciano, V. S. (1983) Orientation of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to environmental temperatures. *J. Med. Entomol.* **20**: 446-454.
- Dusembery, D.B. (1988) Limits on thermal sensation. *J. theor. Biol.* **131**: 263-271.
- Evans, W.G. (1964) Infra-red receptors in *Melanophila acuminata* De Geer. *Nature* **202**: 211.
- Evans, W.G. (1966a) Perception of infrared radiation from forest fires by *Melanophila acuminata* De Geer (Buprestidae, Coleoptera). *Ecology* **47**: 1061-1065.
- Evans, W.G. (1966b) Morphology of the infrared sense organs of *Melanophila acuminata* (Buprestidae: Coleoptera). *Ann. ent. Soc. Am.* **59**: 873-877.
- Friend, W.G. & Cartwright, E. (1963) A practical apparatus for feeding artificial diets to all stages of *Rhodnius prolixus* Stål. *Can. Entomol.* **95**: 362-364.
- Friend, W.G. & Smith, J.J.B. (1977) Factors affecting feeding by bloodsucking insects. *Ann. Rev. Entomol.* **22**: 309-331.
- Fujita, T. & Kloetzel, K. (1976) A resposta de *Rhodnius prolixus* a estímulos térmicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **10**: 119-125.

- Galun, R. (1977) Responses of blood-sucking arthropods to vertebrate host. En: Shorey & McKelvey (eds.) *Chemical Control of Insect Behavior*, pp. 103-115. Wiley.
- Galun, R.; Friend, W.G. & Nudelman, S. (1988) Purinergic reception by culicine mosquitoes. *J. Comp. Physiol.* **163**: 665-670.
- Games, D.E.; Schofield, C.J. & Staddon, B.W. (1974) The secretion from Brindley's scent glands in Triatominae. *Ann. ent. Soc. Am.* **67**: 820.
- Giojalas, L.; Montenegro, S.; Asin, S. & Gorla, D. (1987) Variaciones estacionales en la probabilidad de infectividad de poblaciones domésticas de *Triatoma infestans*. *Resúmenes I Congreso Argentino de Entomología*, p. 111.
- Gogala, M. (1978) Ecosensory functions in insects (with remarks on Arachnida). En: M.A. Ali (ed.) *Sensory Ecology*, pp. 123-153. Plenum Press.
- Gogala, M. (1984a) Vibration producing structures and song of terrestrial Heteroptera as systematic character. *Biol. Vestn.* **1**: 19-36.
- Gogala, M. (1984b) Vibrational communication in insects (Biophysical and behavioural aspects. En: Kalmring & Elsner (eds.) *Acoustic and Vibrational Communication in Insects*. Paul Parey.
- Gorla, D.E. (1987) Efecto de la estacionalidad climática sobre las estrategias de control de los vectores de la enfermedad de Chagas. *IX Reunión de Investigadores de la Enfermedad de Chagas*, p. 13.
- Gorla, D.E. & Schofield, C.J. (1989) Population dynamics of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in the Argentine Chaco. *Med. Vet. Entomol.* **3**: 179-194.
- Gringorten, J.L. & Friend, W.G. (1979) Wing-beat pattern in *Rhodnius prolixus* Stål (Heteroptera: Reduviidae) during exhaustive flight. *Can. J. Zool.* **57**: 391-395.
- Hack, W.H. & Bar, M.E. (1979) Comportamiento sexual de *Triatoma infestans* en laboratorio. *Resúmenes V Reunión de Investigadores de la Enfermedad de Chagas*, p. 86.
- Hack, W.H. & Reparaz, V.L. (1978) Investigaciones sobre mutilaciones antenales en *Triatoma infestans*. *FACENA* **2**:245-252

- Hardy, J.D. (1934) The radiation of heat from the human body. III. The human skin as a black-body radiator. *J. clin. Invest.* **13**: 615-620.
- Hartline, P. (1974) Thermoreception in snakes. En: A. Fessard (ed.) *Electroreceptors and other Specialized Receptors in Lower Vertebrates (Handb. Sens. Physiol. III/3)*, pp. 297-312. Springer Verlag.
- Hase, A. (1932) Nahrungsaufnahme und Exkretionsverhältnisse bei blutsaugenden Insekten und Gliedertieren. *Naturwissenschaften* **20**: 345-349.
- Hase, A. (1933) Über die Lauterzeugung sowie deren mutmaßliche Bedeutung bei der Wanze *Panstrongylus*, Hemiptera U.Familie Triatomidae. *Biol. Zentralbl.* **53**: 607-614.
- Hassenstein, B. (1951) Ommatidienraster und afferente Bewegungs-Integration. *Z. vergl. Physiol.* **33**: 301-326.
- Hocking, B. (1971) Blood-sucking behavior of terrestrial arthropods. *Ann. Rev. Entomol.* **16**: 1-26.
- Hoffmann, K. H. (1974) Wirkung von konstanten und tagesperiodisch alternierenden Temperaturen auf Lebensdauer, Nahrungsverwertung und Fertilität adulter *Gryllus bimaculatus*. *Oecologia* **17**: 39-54.
- Holst v., E. (1953) Der Physiologe und sein Versuchtier. Lebendiges Wissen, Bd. 99 der "Sammlung Dieterich" Weisbaden, 201-208.
- Hopkins, B.A. (1964) The probing response of *Stomoxys calcitrans* (L.) (the stable fly) to vapours. *Anim. Behav.* **12**: 513-524.
- Horn, E. (1982) *Vergleichende Sinnesphysiologie*. Gustav Fisher Verlag.
- Horn, E. (1985) Multimodal convergences. En: Kerkut & Gilbert (eds.) *Nervous System: Sensory (Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, vol. VI)*, pp. 653-669.
- Hsiao, H.S. (1972) The attraction of moths (*Trichoplusia ni*) to infrared radiation. *J. Insect Physiol.* **18**: 1705-1714.
- Hsiao, H.S. & Susskind, C. (1970) Infrared and microwave communication ba moths. *IEEE Spectrum* **7**: 69-76.
- Jander, R. (1963) Insect orientation. *Ann. Rev. Entomol.* **8**: 95-114.

- Justo, S.N. (1979) Electroantenografía (EAG) en *Triatoma infestans* (Klug, 1834). *Resúmenes V Reunión de Investigadores de la Enfermedad de Chagas*, p. 77.
- Justo, S.N. & Tramezzani, J.H. (1977) Estructuras cuticulares de la cabeza del *Triatoma infestans* (Klug, 1834). *Physis Sección C* **37**: 343-367.
- Kennedy, J.S. (1977) Olfactory responses to distant plants and odor sources. En: Shorey & McKelvey (eds.) *Chemical Control of Insect Behavior*, Wiley.
- Kerkut, G.A. & Taylor, B.J.R. (1957) A temperature receptor in the tarsus of the cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* **34**: 486-493.
- Khan, A.A.; Maibach, H.I. & Strauss, W.G. (1968) The role of convection currents in mosquito attraction to human skin. *Mosquito News* **28**: 462-464
- Kloft, V. & Schlagbauer, A. (1965) Eine Apparatur zur Massenfütterung blutsaugender Insekten durch künstliche Membranen. *Biol. Zentralbl.* **84**: 181- 184.
- Kraus, C. (1957) Versuch einer morphologischen und neurophysiologischen Analyse des Stechaktes von *Rhodnius prolixus* Stål 1858. *Acta Tropica* **14**: 36-87.
- Langley, P.A. & Pimley, R.W. (1978) Rearing Triatominae bugs in the absence of a live host and some effects of diet on reproduction in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. ent. Res.* **68**: 243-250.
- Lazzari, C.R. (1983) Estudio de los receptores sensoriales de las antenas de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Heteroptera: Reduviidae). Seminario de Licenciatura, Universidad de Buenos Aires, 81 pp.
- Lazzari, C.R. (1990) Circadian rhythm of egg hatching in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Enviado a *J. Med. Entomol.*
- Lazzari, C.R. & Varjú, D. (1989) Visual orientation in blood-sucking bugs (*Triatoma infestans*). En: Elsner & Singer (eds.) *Dynamics and Plasticity in Neuronal Systems*, p. 108. Thieme Verlag.
- Lazzari, C.R. & Varjú, D. (1990) Visual lateral fixation and tracking in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Comp. Physiol.* (En prensa).

- Lehane, M.J. & Schofield, C.J. (1976) Preliminary report on flight by some triatomine bugs. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* **70**: 526.
- Lehane, M.J. & Schofield, C.J. (1982) Flight initiation in *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. ent. Res.* **72**: 497-510.
- Leston, D. (1957) The stridulatory mechanism in terrestrial species of Hemiptera. *Proc. zool. Soc. Lond.* **128**: 369-386.
- Leston, D. & Pringle, J.W.S. (1963) Acoustical behaviour of Hemiptera. En: R. Busnel (ed.) *Acoustical Behaviour of Animals*. Elsevier.
- Lima, M.M.; Jurberg, P. & Ribeiro de Almeida, J. (1986) Behavior 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.
- Loftus, R. (1978) Peripheral thermal receptors. En: M.A. Ali (ed.) *Sensory Ecology*. pp. 439-466. Plenum Press.
- Loftus, R. & Corbière-Tichané, G. (1981) Antennal warm and cold receptors of the cave beetle, *Speophyes lucidulus* Delar., in sensilla with lamellated dendrite I. Response to sudden temperature change. *J. Comp. Physiol.* **143**: 443-452.
- Maddrell, S.H.P. (1971) The mechanisms of insect excretory systems. *Adv. Insect Physiol.* **8**: 200-331.
- Magnum, C.L. & Callahan, P.S. (1968) Attraction of near-infrared radiation to *Aedes aegypti*. *J. Econ. Entomol.* **61**: 36-37.
- Masters, W.M. (1979) Insect disturbance stridulation: Its defensive role. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **5**: 187-200
- Mayer, M.S. (1968) Response of single olfactory cell of *Triatoma infestans* to human breath. *Nature* **220**: 924-925.
- Mayer, M.S.; Mankin, R.W. & Lemire, G.F. (1984) Quantitation of the insect electroantennogram: Measurement of sensillar contributions, elimination of background potentials, and relationship to olfactory sensation. *J. Insect Physiol.* **30**: 757-763.
- McIver, S. & Siemicki, R. (1984) Fine structure of antennal mechanosensilla of adult *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *J. Morphol.* **180**: 19-28.

- McIver, S. & Siemicki, R. (1985) Fine structure of antennal putative thermo-/hygrosensilla of adult *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *J. Morphol.* **183**: 15-23.
- Mews, A.R.; Langley, P.A.; Pimley, R.W. & Flood, M.E.T. (1977) Large-scale rearing of tsetse flies (*Glossina* spp.) in the absence of living host. *Bull. ent. Res.* **67**: 119-128.
- Michelsen, A. (1983) Biophysical basis of sound communication. En: B. Lewis (ed.) *Bioacoustics, A Comparative Approach*. Academic Press.
- Neumann, D. (1976) Mechanismen für die zeitliche Anpassung von Verhaltens- und Entwicklungsleistungen an den Gezeitenzyklus. *Verh. D. Zool. Gesellsch.* pp. 9-26.
- Nicolle, P. (1941) Appareil pour l'alimentation artificielle des Réduvidés hématophages. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **34**: 179-184.
- Nicolle, P. & Mathis, M. (1941) Le termotropisme, facteur déterminant primordial pour la pique des Réduvidés hématophages. *C. R. Soc. Biol.* **135**: 25-27.
- Nishino, C. & Takayanagi, H. (1979) Electroantennogram responses form parts of antennae of the American cockroach. *Appl. Ent. Zool.* **14**: 326-332.
- Núñez, J.A. (1963) Central nervous control of the mechanical properties of the cuticle in *Rhodnius prolixus*. *Nature* **199**: 621.
- Núñez, J.A. (1966) Quantitative Beziehungen zwischen der Eigenschaften von Futterquellen und dem Verhalten von Sammelbienen. *Z. vergl. Physiol.* **53**: 142-164.
- Núñez, J.A. (1982) Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. ent. Res.* **72**: 253-262.
- Núñez, J.A. (1987) Behavior of Triatominae bugs. En: Brenner & Stoka (eds.) *Chagas' Disease Vectors*, vol. II, pp. 1-28. CRC Press.
- Núñez, J.A. & Lazzari, C.R. (1990) Rearing of *Triatoma infestans* Klug (Het., Reduviidae) in the absence of a live host. I. Some factors affecting the artificial feeding. *J. Appl. Ent.* **109**: 87-92.
- Núñez, J.A. & Segura, E.L. (1987) Rearing of Triatominae. En: Brenner & Stoka (eds.) *Chagas' Disease Vectors*, vol. II, pp. 29-40. CRC Press.



- Ondarza, R.N.; Gutiérrez-Martínez; & Malo, E.A. (1986) Evidence for the presence of sex and aggregation pheromones from *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Econ. Entomol.* **79**: 688-692.
- Ondarza, R.N.; Gutiérrez-Martínez; Malo, E.A. & Rojas, J.C. (1987) Actividad afrodisíaca de la feromona sexual de *Triatoma mazzottii* Usinger. *Southw. Ent.* **12**: 327-333.
- Page, T. (1985) Clocks and circadian rhythms. En: Kerkut & Gilbert (eds.) *Nervous System: Sensory (Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, vol. VI)*, pp. 577-652.
- Patte, F.; Etcheto, M.; Marfaing, P. & Laffort, P. (1989) Electroantennogram stimulus-response curves for 59 odourants in the honey bee, *Apis mellifica*. *J. Insect Physiol.* **35**: 667-675.
- Peterson, D.G. & Brown, A.W.A. (1951) Studies of the female *Aedes* mosquito. Part III. The response of *Aedes aegypti* (L.) to a warm body and its radiation. *Bull. ent. Res.* **42**: 535-541.
- Pittendrigh, C. (1960) Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **25**: 159-184.
- Pittendrigh, C. (1981a) Circadian systems: General perspective. En: J. Aschoff (ed.) *Biological Rhythms (Handbook of Behavioral Neurobiology vol. IV)* pp. 57-80. Plenum Press.
- Pittendrigh, C. (1981b) Circadian systems: Entrainment. En: J. Aschoff (ed.) *Biological Rhythms (Handbook of Behavioral Neurobiology vol. IV)* pp. 95-124. Plenum Press.
- Ratte, H.T. (1984) Temperature and insect development. En: K.H. Hoffmann (ed.) *Environmental Physiology and Biochemistry of Insects*, pp. 33-66.
- Radio, P.A. (1927) Studies on the biology of the Reduviidae of America north of Mexico. *Kans. Univ. Sci. Bull.* **17**: 5-291.
- Remmert, H. (1960) Über tagesperiodische Änderungen des Licht- und Temperaturpräferenzums bei Insekten (Untersuchungen an *Cicindela campestris* und *Gryllus domesticus*). *Biol. Zentralbl.* **79**: 577-584.
- Remmert, H. (1985) Crickets in sunshine. *Oecologia* **68**: 29-33.

- Rence, B.G. (1984) A comparison of light and temperature entrainment: evidence for a multioscillator circadian system. *Physiol. Ent.* **8**: 215-227.
- Ribi, W. (1987) *Biological Electron Microscopy*. Ribi.
- Roberts, S.K. de F. (1962) Circadian activity rhythms in cockroaches. II. Entrainment and phase-shifting *J. cell. Comp. Physiol.* **59**: 175-186
- Roces, F. (1990) Estrategias de manejo de la cria en la hormiga *Camponotus mus* y su relación con factores ambientales. Tesis, Universidad de Buenos Aires, 166 pp.
- Rojas, J.C.; Malo, E.A.; Gutierrez-Martinez, A. & Ondarza, R.N. (1988) Mating behavior of *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Ann. ent. Soc. Am.* (En prensa).
- Saunders, D.S. (1973) Thermoperiodic control of diapause in an insect: theory of internal coincidence. *Science* **181**:358-360.
- Saunders, D.S. (1982) *Insect Clocks*. Pergamon Press.
- Schaub, G. (1977) Temperatur-Adaptation und Akklimation bei parasitischen Calliphoriden in Abhängigkeit von der Entwicklung. Dissertation, Universität Bonn, 224 pp.
- Schaub, G. (1988) Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between vectors of Chagas' disease. *Acta Tropica* **45**: 11-19.
- Schaub, G.; Böker, C.A.; Jensen, C. & Reduth, D. (1989) Cannibalism and coprophagy are modes of transmission of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) between triatomines. *J. Protozool.* **36**: 171-175.
- Schneider, D. (1957) Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombix mori* L. *Z. vergl. Physiol.* **40**: 8-41.
- Schofield, C.J. (1975) The behavioural biology of Triatominae, with special reference to intraspecific communication mechanism. Thesis, University of London, 326 pp.
- Schofield, C.J. (1977) Sound production in some Triatominae bugs. *Physiol. Ent.* **2**: 43-52.
- Schofield, C.J. (1979) The behaviour of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae): a review. *Bull. ent. Res.* **69**: 363-379.

- Schofield, C.J. & Moreman, K. (1976) Apparent absence of a sex attractant in adult *Triatoma infestans* (Klug), vector of Chagas' disease. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* **70**: 165-166.
- Schofield, C.J. & Patterson, J.W. (1977) Assembly pheromone of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* nymphs (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* **13**: 727-734.
- Settembrini, B. P. (1984) Circadian rhythms of locomotion activity in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* **21**: 204-212.
- Sjorgren, R.D. & Ryckman, R.E. (1966) Epizootiology of *Trypanosoma cruzi* in southwestern North America. part VIII: Nocturnal flights of *Triatoma protracta* (Uhler) as indicated by collections at black light traps. *J. Med. Entomol.* **3**: 81-93.
- Siegel, S. (1956) *Nonparametric statistic for the behavioral sciences*. Mc Graw-Hill.
- Slifer, E.H. (1955) The distribution of permeable sensory pegs on the body of the Grasshopper (Orthoptera: Acrididae). *Entomol. News* **66**: 1-5.
- Slifer, E.H. (1960) A rapid and sensitive method for identifying permeable areas in the body wall of insects. *Entomol. News* **71**: 179-182.
- Smith, J.J.B. (1979) Effect of diet viscosity on the operation of the pharyngeal pump in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* **82**: 93-104.
- Sokal, R.R. & Rohlf F.J. (1981) *Biometry*. Freeman & Co.
- Szymanski, J.S. (1914) Eine Methode zur Untersuchung der Ruhe- und Aktivitätsperioden bei Tieren. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* **158**: 343-385.
- Thornhill, R. & Alcock, J. (1983) *The evolution of insects mating systems*. Harvard Univ. Press.
- Velásquez Antich, A. (1968). Atracción por el olor en ninfas y adultos de *Rhodnius prolixus* (Stål). *Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo* **10**: 242-246.
- Vielmetter W. (1956) Ein auf Ultrarotstrahlung ansprechender Orientierungsmechanismus bei Tagfaltern. *Verh. D. Zool. Gesellsch.* **50**: 102-106.

- Vielmetter, W. (1958) Physiologie des Verhaltens zur Sonnenstrahlung bei dem Tagfalter *Argynnis paphia* L. -I Untersuchungen im Freiland. *J. Insect Physiol.* **2**: 13-37.
- Walker, E.D. & Edman, J. (1985) Feeding-site selection and blood-feeding behavior of *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) on rodent (Sciuridae) hosts. *J. Med. Entomol.* **22**: 287-294.
- 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 iso-butyric acid). *Physiol. Ent.* **6**: 325-329.
- Ward, J.P. & Baker, P.S. (1982) The tethered flight performance of a laboratory population of *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. ent. Res.* **72**: 17-28.
- Ward, J.P. & Finlayson, L.H. (1982) Behavioural responses of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae) to visual stimuli. *Bull. ent. Res.* **72**: 357-366.
- Warnes, M.L. & Finlayson, L.H. (1986) Electroantennogram responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, to carbon dioxide and other odours. *Physiol. Ent.* **11**: 469-473.
- Wetzel, H. (1980) The use of freeze-dried blood in the membrane feeding of tsetse flies (*Glossina p. palpalis*, Diptera: Glossinidae). *Tropenmed. Parasit.* **31**: 259-274.
- Wiedenmann, G. (1980) Two peaks in the activity rhythm of cockroaches controlled by one circadian pacemaker. *J. Comp. Physiol.* **137**: 249-254.
- Wiedenmann, G. (1983) Splitting on a circadian activity rhythm: the expression of bilaterally paired oscillators. *J. Comp. Physiol.* **150**: 51-60.
- Wiesinger, D. (1956) Die Bedeutung der Umweltfaktoren für der Saugakt von *Triatoma infestans*. *Acta Tropica* **13**: 97-141.
- Wigglesworth, V.B. (1964) The hormonal regulation of growth and reproduction in insects. *Adv. Insect Physiol.* **2**: 247-336.
- Wigglesworth, V.B. & Gillet, J.D. (1934a) The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and the mechanism of orientation to the host. *J. Exp. Biol.* **11**: 120-138.
- Wigglesworth, V.B. & Gillet, J.D. (1934b) The function of the antennae in *Rhodnius prolixus*: confirmatory experiments. *J. Exp. Biol.* **11**: 408.

- Wurtsbaugh, W. A. & Neverman, D. (1988) Post-feeding thermotaxis and daily migration in a larval fish. *Nature* **333**: 846-848.
- Zeledón, R. & Rabinovich, J. E. (1981) Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Ann. Rev. Entomol.* **26**: 101-133.
- Zeledón, R.; Valerio, C.E. & Valerio, J.E. (1973) The camouflage phenomenon in several species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* **10**: 209-211.

*José María*

NÚ. 122