

PAHO. Tratamiento Etiológico de la Enfermedad de Chagas. Conclusiones de una Consulta Técnica. OPS/HCP/HCT/140/99. <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/chagas.pdf>, 1999.

Piron M., R. Fisa, N. Casamitjana, P. López-Chejade, L. Puig, M. Vergés, J. Gascón, J. Gómez i Prat, M. Portús, S. Sauleda. (2007) Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop* 103(3):195-200.

Ribeiro I., Sevcsik A.M., Alves F., Diap G., Don R., Harhay M.O., Chang S., Pecoul B. (2007). New,

improved treatments for chagas disease: from the r&d pipeline to the patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 3(7):e484.

Schijman A.G., J. Altcheh, J.M. Burgos, M. Biancardi, M. Bisio, M.J. Levin, & H. Freilij. (2003). Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother* 52(3):441-9.

Sosa-Estani S., E.L. Segura. (2006). Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: experiences in Argentina. *Curr Opin Infect Dis* 19(6):583-7.

Sosa-Estani S., R. Viotti, & E.L. Segura. (2009) Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol.104(4):167-80.

Yun O., L.M Lima, T. Ellman, W. Chambi, S. Castillo, L. Flevaud, P. Roddy, F. Parreño, P. Albajar Viñas, & P.P. Palma. (2009) Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for chagas disease in honduras, guatemala, and bolivia: 10-year experience of médecins sans frontières. *PLoS Negl Trop Dis*. Vol. 3(7):e488.

Comunicación intraespecífica y comportamiento sexual de *Triatoma infestans*

Gabriel Manrique

Laboratorio de Fisiología de Insectos, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

gabo@bg.fcen.uba.ar

Es importante conocer la biología de insectos vectores de enfermedades para poder desarrollar un adecuado control de los mismos. En el laboratorio de Fisiología de Insectos tenemos dos líneas de investigación sobre la vinchuca *Triatoma infestans* relacionados con el comportamiento sexual y la comunicación intraespecífica.

En las últimas décadas diversos estudios han incrementado la información existente sobre el comportamiento sexual de *T. infestans*. En nuestro laboratorio los estudios se centraron en la caracterización cuantitativa, bajo condiciones experimentales controladas, del comportamiento sexual de esta especie analizando la posible existencia de distintos canales de comunicación intraespecífica ligados al apareamiento. Salvo por la existencia de algunas diferencias menores, el comportamiento de apareamiento de *T. infestans* sigue el modelo general descrito para otros Triatominae. La pareja se aparea por iniciativa del macho consistiendo el patrón de apareamiento esencialmente de siete etapas comportamentales realizadas por el mismo. Brevemente, el macho mueve sus antenas, apuntando las mismas hacia la hembra (*posición vigilante*), repentinamente salta sobre ella o se coloca sobre su zona dorsal lentamente (*salto o montada*), rota, aunque no frecuentemente, sobre la región dorsal de la hembra (*rotación*), se localiza dorsolateralmente respecto a la hembra exponiendo su *genitalia* (*posición dorsolateral*), introduce el aedeago comenzando la cópula, de aproximadamente 10 minutos de duración (*cópula*), se separa la *genitalia* volviendo el macho a colocarse sobre la zona dorsal de la hembra (*sujeción*), y finalmente, éste

desciende hacia el sustrato (*separación*). La cópula no siempre es exitosa; la hembra puede desplegar distintos comportamientos de rechazo. Cuando la hembra no se encuentra receptiva puede rechazar al macho aplanando su cuerpo contra el sustrato (*achatamiento*), escapando ante el salto del macho (*evasión*), moviendo el abdomen (*movimientos abdominales*) o estridulando (*estridulación*). Estas distintas modalidades de rechazo no siguen un orden secuencial ni muestran una clara relación entre parámetros contextuales (como la secuencia comportamental realizada por el macho). Cuando las probabilidades de cópula son bajas se deben mayormente al comportamiento de rechazo desplegado por las hembras. Esto evidencia, entonces, la importancia de la receptividad de la hembra como uno de los factores que afectan el éxito de la cópula en *T. infestans* (Manrique & Lazzari, 1994).

Dentro de la amplia gama de información disponible y utilizable por los organismos con el fin de orientar eficientemente su comportamiento se encuentran las claves olfativas y vibratorias. Los triatominos al igual que otros reduvidos poseen un órgano estridulatorio ubicado en el prosterno que consiste en un surco cuticular longitudinal compuesto por crestas transversales. La estridulación es producida cuando el extremo de la proboscis es frotado sobre el surco. Aunque tanto las larvas como los adultos son capaces de estridular, y habitualmente lo hacen cuando son perturbados mecánicamente por ejemplo cuando son manipulados con pinzas, solo la hembra no receptiva estridula en forma espontánea (Manrique & Lazzari 1994). Estas estridulaciones producidas por la hembra no receptiva fueron medidas como vibraciones transmitidas a través del sustrato y resultaron ser altamente efectivas en rechazar al macho, el cual cesa en su intento de apareamiento permaneciendo inmóvil para finalmente descender de la hembra (Roces & Manrique, 1996; Lazzari et al., 2006). Esto evidencia a la estridulación como un posible mecanismo de comunicación entre los sexos en *T. infestans*.

Como se mencionó anteriormente, otra clave importante a considerar y ampliamente difundida en el comportamiento sexual de los insectos en general, y en *T. infestans* en particular, es la olfativa. La utilización de feromonas resulta ser el modo más importante de comunicación intraespecífica en insectos, en comparación con las otras dos modalidades más utilizadas, *i.e.*, visión y sonido. Las feromonas actúan como verdaderos

mensajeros químicos y son utilizadas por los insectos para modificar distintos comportamientos, como por ejemplo, el apareamiento, la búsqueda de alimento, agregación y alarma o defensa, entre otros. Son producidas por glándulas exócrinas y su producción y síntesis es regulada por factores exógenos y endógenos.

En el caso de *T. infestans* se ha presentado evidencia surgida de experimentos de comportamiento sobre la existencia de una feromona de agregación sexual capaz de modificar el comportamiento de machos (Manrique & Lazzari, 1995). Al analizar experimentalmente la distribución espacial de machos en presencia de una pareja en cópula se demostró la existencia de un comportamiento de agregación (Fig. 1). En presencia de cuatro machos y una hembra, la distancia media de los machos hacia la hembra en cópula disminuyó significativamente a lo largo del tiempo transcurrido desde el inicio del apareamiento. En cambio las hembras no cambian su distribución espacial, es decir, no se agregan (Manrique & Lazzari, 1995). La agregación de machos inducida por la presencia de una pareja en cópula llevó a postular la hipótesis acerca de la existencia de una feromona sexual emitida por la hembra. Al igual que en otros Reduviidae, los triatominos poseen glándulas exócrinas pares en el tórax y abdomen. Éstas incluyen las glándulas metasternales, las glándulas de Brindley, también ubicadas en el tórax, y otras glándulas más pequeñas como las glándulas dermales, ventrales y abdominales.

Sólo los adultos poseen glándulas de Brindley y metasternales mientras que los estadios larvales sólo poseen glándulas dermales y abdominales. Las glándulas de Brindley y metasternales resultaron ser los candidatos potenciales a ser estudiados como posible/es fuente/s de la señal química sexual. Para poner a prueba la hipótesis planteada se realizaron experimentos de oclusión selectiva de ambas glándulas por separado y en conjunto en la hembra, y se analizó el comportamiento de machos registrándose la frecuencia de cópula, la frecuencia de intentos de cópula de los machos y la distribución espacial de machos en presencia de una pareja en cópula (Crespo & Manrique, 2007). Estos experimentos permitieron demostrar que las glándulas metasternales juegan un papel preponderante en el comportamiento sexual de *T. infestans*. Por un lado promueven la ocurrencia de cópula, ya que se observó un decremento en la frecuencia de cópula

cuando fueron ocluidas selectivamente, mientras que la predisposición de los machos para copular no se vio afectada por el tratamiento de oclusión (Fig. 2, Tabla). Además, las hembras con sus glándulas metasternales libres de oclusión promovieron el comportamiento de agregación de machos descrito en esta especie, mostrando la importancia de estas glándulas en este contexto (Fig. 3). En cambio, el comportamiento de agregación de machos no fue observado al ocluir dichas glándulas. Contrariamente, las glándulas de Brindley no parecen cumplir un papel importante en el comportamiento sexual de esta especie. Al ocluir estas glándulas la frecuencia de cópula fue la misma que la observada en los insectos control, y, al igual que en el caso anterior, la predisposición de los machos para copular no se vio afectada (Fig. 2 y Tabla). Además, la distribución espacial de machos en presencia de una pareja en cópula mostró su agregación alrededor de la pareja, comportamiento que no difirió del observado en los insectos control (Fig 3).

En cuanto a la naturaleza química de los compuestos volátiles de las glándulas metasternales, estos fueron identificados, siendo los más abundantes 3-pentanona, 3-metilbutilalcohol, 3-pentanol y un compuesto no identificado (Manrique et al., 2006). Además se identificó la presencia de 3-pentanona en el espacio circundante de parejas en cópula lo que sugiere coincidentemente que su emisión podría tener un papel en la comunicación de *T. infestans*. Distintos autores han asociado a las glándulas de Brindley con el comportamiento sexual de diversas especies de triatominos (Fontán et al., 2002, Rojas et al., 2002, Guerenstein & Guerin, 2004). Sin embargo, la evidencia existente sugiere fuertemente que en *T. infestans* las glándulas metasternales y no las de Brindley están involucradas en el comportamiento sexual, al menos en la ocurrencia de cópula, y en el comportamiento de agregación de machos alrededor de la pareja en cópula. Sin embargo, para poner a prueba esta hipótesis, sería necesario analizar en particular los volátiles específicos emitidos en este contexto. Además, queda abierta la posibilidad de que en otros aspectos del comportamiento sexual otras fuentes de volátiles puedan estar involucradas.

La pregunta que subyace es cuál podría ser el significado biológico del comportamiento de agregación. Una vez agregados los machos se aparean sucesivamente con la hembra. Este comportamiento sugiere la existencia de un sistema poliándrico para *T. infestans* (Manrique & Lazzari, 1995). Esto no siempre ocurre así en todos los triatominos. En *Panstrongylus megistus* los machos no se agregan alrededor de la pareja en cópula y además la hembra de esta especie usualmente se aparea una única vez rechazando los intentos de cópula posteriores, lo que evidencia la existencia de distintas estrategias reproductivas en Triatominae (Pires et al., 2004).

La chinche hematófaga, *T. infestans*, es el principal vector del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la enfermedad de Chagas en Sudamérica. Los estudios sobre diversos aspectos del comportamiento de esta especie podrían ayudar a encontrar nuevas herramientas que sean

útiles para el control vectorial de esta enfermedad. En particular, a largo plazo el estudio del comportamiento sexual puede potencialmente contribuir al desarrollo de nuevas herramientas que ayuden a los programas de control, como por ejemplo a través de la aplicación de métodos de disrupción del apareamiento o de técnicas de confusión sexual como se emplean en otras especies de insectos.

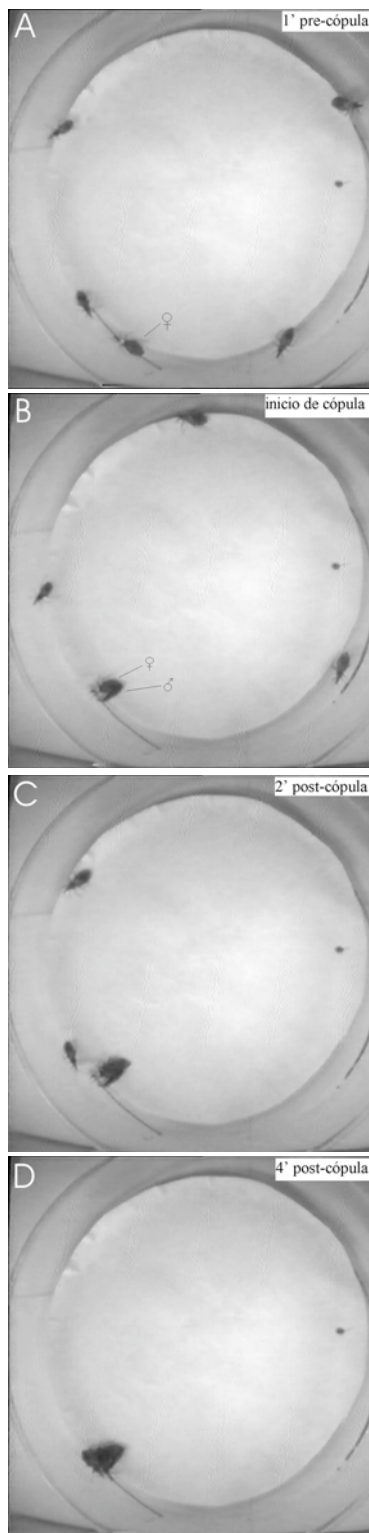


Figura 1: Ejemplo que ilustra el comportamiento de agregación de machos de *T. infestans* a una pareja en cópula, en función del tiempo. (A) Uno de los machos se aproxima a la hembra para intentar aparearse. (B) Al comienzo de la cópula el resto de los machos en la arena experimental se encuentran a cierta distancia de la pareja. (C) Al

cabo de 2 minutos de iniciada la cópula, la distancia de los machos circundantes va disminuyendo hasta hacerse mínima. (D) Luego de 4 minutos de iniciada la cópula, todos los machos se encuentran agregados sobre la pareja (Tomado de Crespo, 2005).

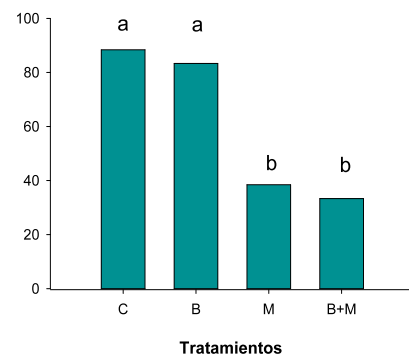


Figura 2: Porcentaje de cópula exhibido por los insectos sometidos a distintos tratamientos. C: individuos control; B: hembras con las glándulas de Brindley ocluidas; M: hembras con las glándulas metasternales ocluidas; B+M: hembras con las glándulas de Brindley y metasternales ocluidas. Se encontraron diferencias altamente significativas entre los grupos experimentales (prueba de G, G = 28,2; g.l.: 3; p < 5 E⁻⁶). Letras diferentes evidencian diferencias significativas (comparaciones *a posteriori*). Toda vez que se ocluyeron las glándulas metasternales de la hembra disminuyó el porcentaje de cópula sugiriendo que la eventual emisión de sus volátiles promueve la cópula (Modificado de Crespo & Manrique, 2007).

Tratamiento	media ± error estándar de intentos de cópula por ensayo	N
C	1,7 ± 0,3	34
B	1,9 ± 0,4	12
M	1,9 ± 0,2	26
B+M	1,5 ± 0,2	24

C: Orificios de salida de volátiles de las glándulas de Brindley y metasternales sin ocluir
 B: Orificios de salida de volátiles de las glándulas de Brindley ocluidos
 M: Orificios de salida de volátiles de las glándulas metasternales ocluidos
 B+M: Orificios de salida de volátiles de las glándulas de Brindley y metasternales ocluidos (Modificado de Crespo & Manrique, 2007)

Tabla: Número medio de intentos de cópula por ensayo ± error estándar, de machos de *T. infestans* sobre la hembra, para cada una de las series experimentales. No se encontraron diferencias significativas en la motivación de los machos para copular en las diferentes series experimentales (ANOVA, F_(3, 92) = 0.93; p > 0.05).

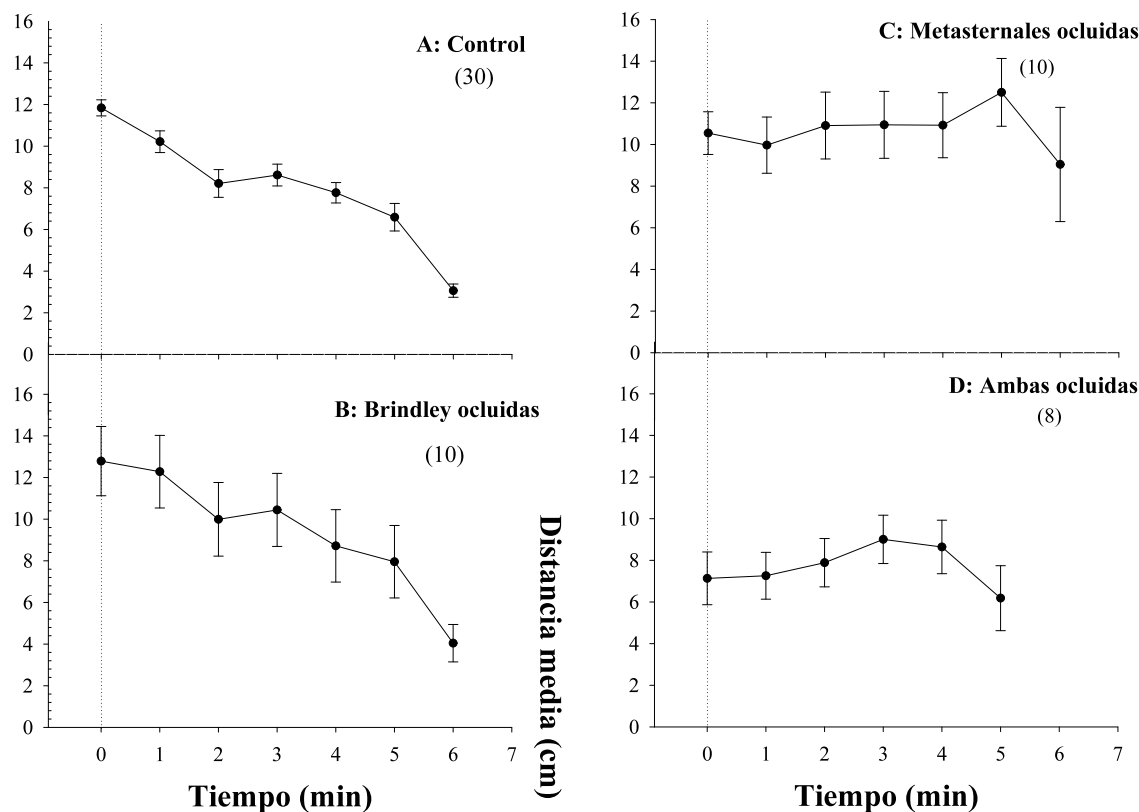


Figura 3: Distancia media \pm error estándar de los machos a la pareja en cópula en función del tiempo. A) serie control, B) glándulas de Brindley de la hembra ocluidas; C) glándulas metasternales de la hembra ocluidas; D) glándulas de Brindley y metasternales de la hembra ocluidas. Los números entre paréntesis representan el número de ensayos de cada tratamiento. La línea punteada indica el tiempo de inicio ($t = 0$) de la cópula. Las series C y B no difirieron significativamente entre sí y evidenciaron la agregación de los machos a la pareja luego del inicio de la cópula (LSD test, $p > 0,05$). Las series M y B+M no difirieron significativamente entre sí y no mostraron una variación en la distribución espacial de los machos con el tiempo (LSD test, $p > 0,05$). Toda vez que se ocluyeron las glándulas metasternales de la hembra no varió la distribución espacial de machos, mientras que los machos se agregaron cuando la hembra tuvo las glándulas metasternales sin ocluir sugiriendo que la eventual emisión de sus volátiles promueve este comportamiento. (Modificado de Crespo & Manrique, 2007).

Bibliografía citada

- Fontán A., P.G. Audino, A. Martínez, R. A. Alzogaray, E.N. Zerba, F. Camps, & A. Cork. (2002). Attractant volatiles released by female and male *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of chagas disease: Chemical analysis and behavioral bioassay. *J. Med. Entomol.* 39: 191–197.
- Guerenstein P.G. & P.M. Guerin. (2004). A comparison of volatiles emitted by adults of three triatomine species. *Entomol. Exp. Appl.* 111: 151–155.
- Crespo J.G. (2005). Comportamiento sexual de la vinchuca *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae): papel de las glándulas de Brindley y metasternales en la cópula. Tesis de Licenciatura. Universidad de Buenos Aires, Argentina. p. + 57.
- Crespo J.G. & G. Manrique. (2007). Mating behavior of the haematophagous bug *Triatoma infestans*: Role of Brindley's and metasternal glands. *J. Insect Physiol.* 53: 708-714.
- Lazzari C.R., G. Manrique, & P.E. Schilman. (2006). Vibratory communication in Triatominae (Heteroptera). In: Drosopoulos, S. & Claridge, M. (eds.) *Insect Sounds and Communication*. Chapter 22, pp. 297-304. CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, FL, USA. ISBN 0-8493-2060-7.*Authors: Equal contribution.*
- Manrique G. & C.R. Lazzari. (1994). Sexual behaviour and stridulation during mating in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. O. Cruz.* 89(4): 629-633.
- Manrique G. & C.R. Lazzari. (1995). Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): I Behavioural evidences. *Mem. Inst. O. Cruz.* 90(5): 645-648.
- Manrique G., A.C.R. Vitta, R.A. Ferreira, C.L. Zani, C.R. Unelius, C.R. Lazzari, L. Diotaiuti, & M.G. Lorenzo. (2006). Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity and potential function of volatiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. *J. Chem. Ecol.* 32: 2035-2052.
- Pires H.H.R, M.G. Lorenzo, C.R. Lazzari, L. Diotaiuti, & G. Manrique. (2004). The sexual behaviour of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): an experimental study. *Mem. Inst. O. Cruz.* 99(3): 295-300.
- Roces F. & G. Manrique. (1996). Different stridulatory vibrations during sexual behaviour and disturbance in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Insect Physiol.* 42(3): 231-238.
- Rojas J.C., E. Rios-Candelaria, L. Cruz López, A. Santiesteban, J.G. Bond-Compean, Y. Brindis, & E.A. Malo. (2002). A reinvestigation of Brindley's gland exocrine compounds of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 39: 256 –265.