

Tesis Doctoral

Feromona de alarma de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Aspectos químicos y comportamentales

Palottini, Florencia

2014-06-30

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

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

Cita tipo APA:

Palottini, Florencia. (2014-06-30). Feromona de alarma de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Aspectos químicos y comportamentales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Palottini, Florencia. "Feromona de alarma de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Aspectos químicos y comportamentales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-06-30.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**“Feromona de alarma de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae).
Aspectos químicos y comportamentales”**

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

Lic. Florencia Palottini

Director de Tesis: Dr. Gabriel Manrique
Director Asistente: Dr. Andrés González Ritzel
Consejero de Estudios: Dr. Gabriel Manrique

Laboratorio Fisiología de Insectos
Departamento de Biodiversidad y Biología experimental
Ciudad Universitaria Pab. II.

Buenos Aires, 2014

Fecha de Defensa: 30 de Junio de 2014

“Feromona de alarma de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Aspectos químicos y comportamentales”

Resumen

El objetivo general de esta Tesis fue analizar la feromona de alarma de la vinchuca *Triatoma infestans* y la respuesta de escape asociada. El estudio se realizó a través de experimentos comportamentales de olfatometría complementados con técnicas de química analítica (e.g. SPME y GC-MS). Adicionalmente, se estudiaron procesos cognitivos asociados a la respuesta de escape. Hasta el presente, no se ha descrito en estadios larvales de Triatominae la presencia de glándulas exocrinas que típicamente se encuentran en estadios inmaduros de Heteroptera con funciones de alarma o defensa. Sin embargo, en nuestros experimentos encontramos una clara respuesta de escape de larvas de 4° estadio enfrentadas a olores provenientes de larvas del 5° estadio mecánicamente perturbadas; y una tendencia similar frente a olores de larvas del 3^{er} y 4° estadio perturbadas. Al analizar químicamente estos olores, se identificó un compuesto volátil sugerido como, o parte de, una feromona de alarma emitida por estadios inmaduros de *T. infestans* (Capítulo 1). En adultos, el componente principal de la feromona de alarma, el ácido isobutírico, es liberado por las glándulas de Brindley. Se analizó la dinámica de llenado de estas glándulas, a partir de la cuantificación de la masa de dicho compuesto en insectos con distintos estados de desarrollo y condiciones de ayuno y perturbación. El contenido de ácido isobutírico en glándulas llenas de adultos sin perturbar (1 equivalente a adulto= 1EA) fue de 11,36 µg. Este contenido fue alcanzado gradualmente desde la ecdisis del imago hasta el endurecimiento de su cutícula. Luego, fue disminuyendo gradualmente al aumentar el número de perturbaciones, siendo posible la recuperación de dicho contenido luego de una alimentación. Esta dependencia de la alimentación también se evidenció con la ausencia de la respuesta de escape de larvas frente a volátiles emitidos por adultos perturbados ayunados (Capítulo 2). Con el fin de determinar qué compuestos volátiles de la feromona de alarma resultan activos, se analizó la respuesta de escape de larvas frente a distintas dosis de volátiles individuales. Se encontró que las larvas fueron repelidas por ácido isobutírico, ácido butírico, ácido acético y 2-metil-1-butanol. Frente a distintas mezclas de estos compuestos activos, se observaron respuestas de repelencia o de atracción (Capítulo 3). Finalmente, se analizó la plasticidad comportamental controlada por la experiencia previa en *T. infestans*, bajo un contexto de escape mediado por la feromona de alarma. Se pusieron a prueba distintas formas de aprendizaje, incluyendo protocolos asociativos y no asociativos, condicionamientos clásicos y operantes, y en todos los casos se obtuvo en mayor o menor grado algún tipo de modulación cognitiva en la respuesta de escape de las larvas frente al ácido isobutírico (Capítulo 4).

Palabras clave: *Triatoma infestans*, glándulas exocrinas, glándulas de Brindley, feromona de alarma, ácido isobutírico, respuesta de escape, plasticidad.

“Alarm pheromone of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Chemical and behavioral aspects”

Abstract

The general aim of this Thesis was to analyze the alarm pheromone of the kissing bug *Triatoma infestans* and the associated escape response. The study was carried out through behavioural experiments of olfactometry complemented by analytical chemistry techniques (e.g. SPME and GC-MS). In addition, we studied cognitive processes associated to the escape response. Until now, the presence of exocrine glands typically found on immature stages of Heteroptera with alarm or defence functions, has not been described in the larval stages of Triatominae. However, in our experiments we found a clear escape response of 4th instar larvae against odours coming from mechanically disturbed 5th instar larvae, and a similar trend against odours from disturbed 3rd and 4th instar larvae. A volatile suggested as, or part of, the alarm pheromone released by *T. infestans* larvae was identified by chemical analyses (Chapter 1). In adults, the main component of the alarm pheromone, the isobutyric acid, is released by the Brindley's glands. We analyzed the filling dynamics of these glands by quantifying this compound in insects with different states of development and conditions of starvation and disturbance. The isobutyric acid content in full glands of undisturbed adults (1 adult equivalent= 1AE) was 11.36 µg per adult. This content was achieved gradually from the imaginal ecdysis up to the hardening of the cuticle. Then, it decreased gradually with the number of disturbance events, and fully recovered after feeding. This feeding dependence was also evidenced with the absence of escape response by the larvae when they were submitted to volatiles emitted by starved disturbed adults (Chapter 2). In order to determine which volatile compounds of the alarm pheromone are active, we analyzed the escape response of larvae exposed to individual compounds at different doses. We found that larvae were repelled by isobutyric acid, butyric acid, acetic acid and 2-methyl-1-butanol. When tested against different mixtures of these active compounds, we observed both attraction and rejection responses (Chapter 3). Finally, we analyzed the behavioural plasticity of the escape response of larvae as determined by previous exposure to the alarm pheromone. Different forms of learning were tested, including associative and non-associative protocols, classic and operant conditioning, and in all cases there was at least some degree of cognitive modulation in the escape response of larvae exposed to isobutyric acid (Chapter 4).

Keywords: *Triatoma infestans*, exocrine glands, Brindley's glands, alarm pheromone isobutyric acid, escape response, plasticity.

Agradecimientos

-A los Doctores Josens, González-Audino y Zavala por aceptar ser parte del comité evaluador de la presente Tesis Doctoral.

-A los Dres. Gabriel Manrique y Andrés González-Ritzel por dirigir el trabajo de investigación, por sus aportes, por sus largas jornadas de trabajo.

-A los organismos (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Conicet y Fundación de Ciencias Exactas y Naturales) que hicieron económicamente posible la realización de esta tesis. Además, al Comité organizador de VIII CAE y al Instituto Max Planck, por las becas otorgadas para asistir a congresos.

-A la FCEyN-UBA por ser mi “casa” de estudios.

-A todos los integrantes del Laboratorio de Fisiología de Insectos y del Laboratorio de Ecofisiología de Insectos por estar directamente involucrados en mi formación académica. Por las charlas, los consejos, las sabidurías compartidas.

-A todos los integrantes del LEQ de Uruguay y sus alrededores, por hacerme sentir tan parte. Por compartir mates, costumbres, seminarios, problemas y carcajadas. A Lu y a Caro por abrirme las puertas de sus casas. A Umpi por sus risas. A Lu por ser tremenda compañera, por ser tremenda amiga.

-A Angel y a Martín del 2° piso por tantas tardes de intentar hacer funcionar el equipo de electrofisiología.

-Al Servicio Nacional de Chagas, de la provincia de Córdoba, por el envío constante de insectos, tan necesarios para la realización de los bioensayos de la Tesis. En especial a Raúl Stariolo, tan idóneo en su labor. A <http://www.educhagas.com.ar/>, porque de esa página tomé el dibujo de la vinchuca.

-A Bar, Marinette y Co, por la amistad y la continua compañía en el proceso de crecimiento académico.

-En especial a Ali, Car, Clau, Sebas, Lu, Umpi, Pau, Bar, Pam, Mechi, Cori, Sol, Gerard, Andrés y Guille por tener y dar la palabra, la sonrisa, la idea, el abrazo, el reto, el apoyo, la oreja o el pañuelo en el preciso momento. Al grupo de Perspectiva tan necesario.

-A mis amigas de la vida, Pam, Cori, Mechi y Sol, por acompañarme eternamente, en cada paso de la vida. Porque son tremendo sostén.

-A mis papás y mis hermanos, por acompañarme, escucharme, aconsejarme. Por estar absolutamente presentes en el día a día. Por sufrirme, por bancarme, por apoyarme. Por vivir conmigo esta hermosa locura que tengo por los insectos. Porque soy esto, gracias a ellos!

-A mis sobris Dafi y Lui, porque son mi luz. Porque una sonrisa de ellas me devuelve el eje.

-A Gastón, mi Verde. Porque la Vida es buena. Y lo bueno es Verde. Y por el porotito...

... es posible echarle en cara al hombre el estar ciego en su vida cotidiana con respecto a tales casualidades y dejar así que su vida pierda la dimensión de la belleza.

La insoportable levedad del ser,
Milan Kundera, 1984.

... ella no terminó de peinarse, ni nosotros nuestra tesis de doctorado...

Prosa del Observatorio,
Julio Cortázar, 1972.

Índice:

Resumen.....	2
Abstract.....	3
Agradecimientos.....	4
Introducción General.....	10
-Comunicación. Diferentes canales.....	12
-Comunicación química y semioquímicos.....	12
-Parsimonia semioquímica y feromonas de alarma.....	14
-Glándulas exocrinas.....	14
-Glándulas exocrinas en Heteroptera.....	15
-Glándulas exocrinas en la Familia Reduviidae.....	16
-Glándulas metasternales y de Brindley.....	16
-Aspectos biológicos de los insectos de la subfamilia Triatominae.....	18
- <i>Triatoma infestans</i> . Glándulas exocrinas y volátiles asociados.....	19
-Habilidades cognitivas en vinchucas.....	21
-Objetivo general y objetivos particulares.....	23
Capítulo 1: “Respuesta de escape y emisión de volátiles de larvas de <i>Triatoma infestans</i> (Hemiptera: Reduviidae) luego de un evento de perturbación”.....	27
-Introducción.....	28
- <i>Parte 1: Respuesta comportamental de larvas de T. infestans enfrentadas a volátiles liberados por larvas perturbadas</i>	30
Materiales y Métodos.....	30
-Animales.....	30
-Dispositivo experimental y Procedimiento.....	31
-Series experimentales.....	32
-Análisis de datos.....	33
Resultados.....	34
-Respuesta comportamental frente a volátiles emitidos por larvas de <i>T. infestans</i> perturbadas.....	34
- <i>Parte 2: Muestreo y caracterización química de los volátiles emitidos por larvas de T. infestans en respuesta a perturbación mecánica</i>	36
Materiales y Métodos.....	36
-Animales.....	36
-Procedimiento de Muestreo. Estrategias de extracción y análisis químico.....	36
✓ Headspace de larvas.....	36
✓ Regurgitado de larvas.....	38
✓ Glándulas salivales.....	40
-Instrumentos analíticos.....	41
✓ Cromatografía gaseosa (GC).....	41
✓ Cromatografía Gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	41
✓ Espectrometría de masas (MS) por inyección directa...42	
Resultados.....	43
-Headspace de larvas.....	43

-Regurgitado.....	45
-Glándulas salivales.....	47
-Discusión.....	48
<i>Apéndice I: Técnicas y análisis químicos.....</i>	<i>51</i>
Capítulo 2: “Dinámica de llenado de las glándulas de Brindley de adultos de <i>Triatoma infestans</i> (Hemiptera: Reduviidae)”.....	57
- Introducción.....	58
- <i>Parte 1: Estimación cualitativa del estado de las glándulas de Brindley.....</i>	<i>61</i>
Materiales y Métodos.....	61
-Animales.....	61
-Estimación cualitativa de la presencia de la feromona de alarma en glándulas de Brindley de adultos de <i>T. infestans</i>	61
-Análisis de datos.....	63
Resultados.....	64
- <i>Parte 2: Estimación cuantitativa del contenido de las glándulas de Brindley.....</i>	<i>67</i>
Materiales y Métodos.....	67
-Animales.....	67
-Extracción de las glándulas.....	68
-Cromatografía gaseosa.....	69
-Determinación del contenido de ácido isobutírico.....	70
-Series experimentales.....	71
-Análisis de datos.....	72
Resultados.....	73
-Contenido de las glándulas de Brindley y su relación con el desarrollo del adulto.....	73
-Dinámica de recarga de las glándulas de Brindley luego de un único evento de perturbación.....	74
-Dinámica de recarga de las glándulas de Brindley luego de varios eventos de perturbación.....	75
-Efecto del estado nutricional en el llenado de las glándulas de Brindley luego de un evento de perturbación.....	76
- <i>Parte 3: Respuestas comportamentales de larvas de <i>T. infestans</i> enfrentadas a la feromona de alarma de adultos.....</i>	<i>78</i>
Materiales y Métodos.....	78
-Animales.....	78
-Dispositivo experimental y procedimiento.....	79
-Series experimentales.....	80
-Análisis de datos.....	80
Resultados.....	81
-Respuesta comportamental de las larvas frente a olores provenientes de adultos perturbados bajo diferentes regímenes de alimentación.....	81
-	
Discusión.....	83

Capítulo 3: “Identificación de compuestos activos de la feromona de alarma liberada por los adultos de <i>Triatoma infestans</i> (Hemiptera: Reduviidae)”	87
- Introducción	88
- <i>Parte 1: Percepción de la feromona de alarma en larvas de T. infestans: registros electrofisiológicos a nivel de la antena</i>	91
Materiales y Métodos	91
-Animales	91
-Dispositivo experimental	91
-Procedimiento	93
-Estímulos químicos puestos a prueba	94
Resultados	96
-Respuesta electroantenográfica de las antenas de las larvas frente a la feromona de alarma liberada por los adultos	96
-Respuesta electroantenográfica de las antenas de las larvas frente a volátiles sintéticos, componentes de la feromona de alarma liberada por los adultos perturbados	97
- <i>Parte 2: Respuesta comportamental de larvas de T. infestans frente a componentes sintéticos de la feromona de alarma presentados individualmente o en mezclas</i>	99
Materiales y Métodos	99
-Animales	99
-Dispositivo y procedimiento experimental	99
-Estímulos químicos utilizados	100
-Análisis de datos	103
Resultados	104
-Respuesta comportamental de larvas de <i>T. infestans</i> frente a volátiles individuales de la feromona de alarma	104
-Respuesta comportamental de larvas de <i>T. infestans</i> frente a mezclas binarias de volátiles de la feromona de alarma: dosis activas	106
-Respuesta comportamental de larvas de <i>T. infestans</i> frente a mezclas binarias y complejas de volátiles de la feromona de alarma: dosis naturales	108
-Discusión	110
 <i>Apéndice II: Conceptos teóricos de las técnicas utilizadas</i>	116
 Capítulo 4: “Plasticidad comportamental de la respuesta de escape de larvas de <i>Triatoma infestans</i> (Hemiptera: Reduviidae) generada por la feromona de alarma liberada por los adultos”	121
-Introducción	122
- <i>Parte 1: Modulación no asociativa de la respuesta de escape de las vinchucas: pre-exposición olfativa</i>	125

Materiales y Métodos.....	125
-Animales.....	125
-Procedimiento de Entrenamiento.....	125
-Medición de la respuesta de escape en un olfatómetro de doble elección.....	127
-Análisis de datos.....	128
Resultados. Plasticidad comportamental no asociativa: pre- exposición olfativa.....	129
-Modulación de la respuesta de escape al ácido isobutírico luego de una pre-exposición química corta (1 minuto) o larga (10 minutos), medida a corto (10 minutos) o largo plazo (24 horas).....	129
-Modulación de la respuesta de escape frente a la 3-pentanona luego de una pre-exposición olfativa corta.....	132
-Modulación selectiva de la respuesta de escape al ácido isobutírico y a la feromona de alarma liberada por los adultos: pre-exposición olfativa lineal y cruzada.....	133
- <i>Parte 2: Modulación asociativa de la respuesta de escape de las vinchucas:</i> <i>Condicionamiento clásico</i>	135
Materiales y Métodos.....	135
-Animales.....	135
-Procedimiento de Entrenamiento.....	135
-Medición de la respuesta de escape en un olfatómetro de doble elección.....	136
-Análisis de datos.....	136
Resultados. Plasticidad comportamental asociativa: condicionamiento clásico o Pavloviano.....	137
-Modulación de la respuesta de escape al ácido isobutírico luego de una asociación clásica con una perturbación mecánica.....	137
- <i>Parte 3: Modulación asociativa de la respuesta de escape de las vinchucas:</i> <i>Condicionamiento operante</i>	140
Materiales y Métodos.....	140
-Animales.....	140
-Procedimiento de Entrenamiento.....	140
-Medición de la preferencia espacial en una arena experimental en ausencia de olores.....	141
-Análisis de datos.....	141
Resultados. Plasticidad comportamental asociativa: condicionamiento operante o Skinneriano.....	142
-Evitación de una zona neutral luego de una asociación operante con una perturbación química como el ácido isobutírico.....	142
-Discusión.....	144
Conclusiones finales	149
Bibliografía	152
<i>Apéndice III: La Casita del Río</i>	173



Introducción

General:

La presente Tesis analiza aspectos comportamentales y químicos de la feromona de alarma de la vinchuca *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) y la respuesta de escape que ésta promueve. Se define a las feromonas como señales químicas producidas por un organismo que las emite al medio ambiente y que, aún en pequeñas cantidades, promueven una respuesta fisiológica o comportamental en otro individuo de la misma especie (Karlson y Lusher, 1959; Symonds y Elgar, 2008). Esta definición comprende la existencia de transferencia de información, en este caso transmitida a través del canal químico, entre un individuo emisor y otro receptor. Al tratarse de una feromona, la interacción entre el emisor y receptor es el resultado de la comunicación entre miembros de la misma especie, *i.e.*, de la comunicación intraespecífica.

La metodología general que se empleará en esta Tesis es la clásica utilizada en Fisiología de Comportamiento, la cual consiste en analizar las relaciones funcionales entre los elementos componentes del sistema que media entre una entrada sensorial y una salida de comportamiento. En particular, se analizarán aspectos comportamentales relacionados con la feromona de alarma de *T. infestans* bajo condiciones controladas de laboratorio. Esta metodología se complementará con técnicas de química analítica utilizando herramientas de Ecología Química. Además, se llevarán a cabo procedimientos para el estudio de procesos cognitivos asociados a la respuesta de escape promovida por la feromona de alarma.

En este capítulo introductorio se realiza una síntesis sobre la comunicación química, semioquímicos y glándulas exocrinas en insectos; para luego profundizar en aspectos relacionados con las glándulas exocrinas de Heteroptera, particularmente las que se encuentran en triatominos y sus volátiles asociados, como así también en los contextos en los cuales estas glándulas están involucradas. Además, se describe brevemente la biología y la importancia sanitaria de *T. infestans* como vector de la enfermedad de Chagas. Por otra parte, se abordan aspectos relacionados con las habilidades cognitivas de las vinchucas. Por último, se plantean los objetivos y las hipótesis planteadas en este trabajo de Tesis.

-Comunicación. Diferentes canales

El estudio de aspectos relacionados con la feromona de alarma de *T. infestans* hace necesario discutir el concepto de comunicación. La comunicación ocurre cuando la acción o clave dada por un organismo, el emisor, es percibida, alterando la probabilidad de ocurrencia de un patrón de comportamiento en otro organismo, el receptor, de una manera adaptativa para uno o ambos organismos (Wilson, 1975). Si bien los animales producen diversas señales, no se considera que todas forman parte de la “comunicación”, ya que algunos autores apuntan a que el intercambio entre estos dos organismos debe darse a través de algún tipo de código cuya estructura haya sido forjada por el proceso de selección natural para considerar a una señal como formando parte de la comunicación (Klowden, 2002). De este modo, el término señal es utilizado para los casos en que un estímulo ha sido modelado o mantenido por selección natural debido a que lleva información a otros organismos (Otte, 1974). En cambio, a las características que llevan información pero que no se encuentran modeladas o mantenidas por selección o a las características del ambiente físico que pueden ser percibidas, este autor indica la conveniencia de referirlas con expresiones más neutrales como, información, claves, signos o estímulos disparadores.

Los animales están bien adaptados a obtener información sobre el ambiente, incluidos los conespecíficos, considerando el número y a su vez la fina puesta a punto de las estructuras sensoriales que poseen. La información externa que juega un rol crucial en la supervivencia de los animales incluye la disponibilidad de alimento y pareja, factores abióticos (como por ejemplo, la temperatura, disponibilidad de refugio), como así también la presencia de competidores y enemigos naturales. La información externa es típicamente adquirida por tres vías o canales de comunicación: visual, mecánica y química (Dicke y Grostal, 2001).

-Comunicación química y semioquímicos

La información química puede ser adquirida por los animales a través de la olfacción o el gusto o incluso a través de una combinación de ambos. Típicamente, la olfacción consiste en la detección de señales que están disueltas en medios como el aire y el agua, lejos de su fuente original (Mustaparta, 1984), mientras que el gusto comprende la adquisición de señales por contacto directo con la fuente (Städler, 1984) o con un

producto no disuelto. Aunque algunas formas de información química pueden ser de corta vida (*i.e.*, volátiles), otras formas pueden ser detectadas por un período de tiempo relativamente largo, luego de ser depositados o liberados (*i.e.*, productos denominados no volátiles).

Law y Regnier (1971) propusieron el término *semioquímicos* (del griego *semeion*: señal) para referirse a señales químicas que transmiten información entre individuos. Considerando que el término "señal" pre-supone que el producto químico es emitido en forma deliberada y, por tanto, que la comunicación se lleva a cabo; Nordlund y Lewis (1976) re-definieron el término como químicos involucrados en interacciones químicas entre organismos. Posteriormente, Dicke y Sabelis (1988) propusieron el término *infoquímicos* refiriéndose a aquellos compuestos químicos que, en un contexto natural, transmiten información en una interacción entre dos individuos (emisor y receptor), evocando una respuesta fisiológica o comportamental que es adaptativa para uno o ambos individuos. En la actualidad, ambos términos (*semioquímicos* e *infoquímicos*) son indistintamente utilizados (*e.g.*, Dewhirst y Pickett, 2010 y Bohman *et al.*, 2012).

Dependiendo de si se trata de compuestos químicos que median interacciones entre individuos de la misma o de diferentes especies a los *semioquímicos* se los denomina *feromonas* o *aleloquímicos*, respectivamente.

Los *aleloquímicos* pueden distinguirse en *alomonas*, *kairomonas* o *sinomonas*, dependiendo de cuál organismo se favorece en la interacción; siendo la especie beneficiada la que emite el compuesto químico, la que lo recibe o ambas especies, respectivamente (Heuskin *et al.*, 2011).

Como se destacó previamente, las *feromonas*, son señales químicas producidas por un organismo que pueden promover una respuesta fisiológica o comportamental en otro individuo de la misma especie. Existen distintos tipos de feromonas que suelen ser clasificadas según la respuesta biológica que evocan, *i.e.*, sexuales, de agregación, de marcado, de alarma, entre otras.

-Parsimonia semioquímica y feromonas de alarma

La versatilidad de los insectos como comunicantes químicos es particularmente evidente ya que diferentes especies son capaces de regular una diversidad de comportamientos con relativamente pocas feromonas. Este fenómeno, llamado *parsimonia semioquímica*, refleja la utilización de tan pocos productos exocrínicos como sea posible favoreciendo múltiples funciones (Blum, 1985). Las feromonas de alarma, las cuales generalmente son producidas en mayor cantidad que otras clases de feromonas, parecen particularmente adecuadas para ser utilizadas en múltiples contextos. Más aún, debido a que estos compuestos son secretados en respuesta a una estimulación traumática, a menudo funcionando como disuasivos, poseen muchas de las mismas propiedades como alomonas defensivas de las que se cree que derivan (Blum, 1996).

Por otro lado, también se conocen algunos casos en donde los atrayentes sexuales claramente funcionan también como alomonas de defensa. Es así que ciertos componentes del arsenal defensivo en artrópodos han evolucionado funcionando como feromonas sexuales conservando sus funciones originales de alomonas (*e.g.*, como repelentes) (Blum, 1996).

-Glándulas exocrinas

En la mayoría de los insectos, las feromonas son producidas por células glandulares epidérmicas concentradas en áreas discretas por abajo de la cutícula formando glándulas exocrinas. Sin embargo, en algunas especies las células glandulares están dispersas a lo largo de la epidermis (Chapman, 1998). Es así que las glándulas exocrinas de los insectos pueden ser encontradas en diferentes regiones del cuerpo, variando su posición de acuerdo al sexo, al estado de desarrollo e incluso dependiendo de la función de los volátiles liberados. En áfidos, por ejemplo, la feromona de alarma es producida por glándulas asociadas a los cornículos (Nault *et al.*, 1973), mientras que la feromona sexual es liberada por glándulas presentes en la tibia posterior de las hembras con reproducción sexual (Zhu *et al.*, 2006). Existe en la bibliografía una inmensa cantidad de trabajos que ejemplifican la variedad de glándulas y semioquímicos asociados en los insectos. En la **figura 1** se observan los distintos tipos

de glándulas presentes en una hormiga obrera, ejemplificando la variedad existente. En este insecto se encuentran presentes, entre otras, la glándula de Dufour, la glándula pigidial, la glándula mandibular y la glándula de veneno, responsables de la liberación de feromonas de alarma y/o alomonas de defensa, dependiendo de la especie de hormiga (Witte *et al.*, 2007).

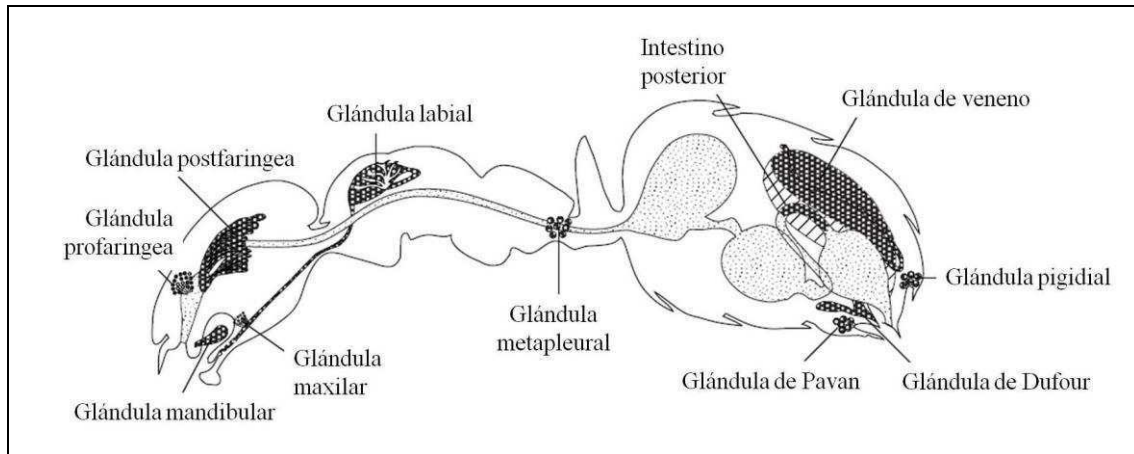


Figura 1: Representación esquemática de una hormiga obrera donde se señalan las distintas glándulas exocrinas, secretoras de distintos semioquímicos (Modificado de Chapman, 1998).

-Glándulas exocrinas en Heteroptera

Los heterópteros son insectos hemimetábolos. Dependiendo de la escuela, hay quienes denominan a los estadios inmaduros de estos insectos como *ninfas* o como *larvas* (Blum, 1985). A lo largo de esta Tesis a los estadios inmaduros se los denominará *larvas* dado que lo consideramos un término que no proporciona ambigüedades.

Centrándonos en el antiguo suborden Heteroptera (actualmente dividido en siete infraórdenes), se sabe que existe un sistema de glándulas formado por las glándulas abdominales y las metatorácicas, que constituye una de las características que definen al grupo (Carayon, 1962), debido a que las glándulas metatorácicas de los adultos y el desarrollo de las glándulas dorso-abdominales (uno, dos y/o tres pares) de los estadios inmaduros son consideradas como una autapomorfía de este taxón monofilético (Sorensen *et al.*, 1995).

La mayoría de los adultos y de las larvas de heterópteros terrestres emiten sustancias volátiles desde sus glándulas exocrinas cuando estos insectos son perturbados o atacados por predadores (Staddon, 1979; Staples *et al.*, 2002). Por

ejemplo, las típicas chinches verdes, de la familia Pentatomidae, son conocidas por producir mezclas de compuestos volátiles olorosos que funcionan principalmente en la disuasión de predadores o como feromonas de alarma (Pavis *et al.*, 1994; Ho y Millar, 2001). Las chinches producen estos olores en dos tipos diferentes de glándulas, dependiendo del estadio de desarrollo (Aldrich, 1988): los adultos producen estos compuestos en las glándulas metatorácicas mientras que las larvas los producen en las glándulas dorsales abdominales. Sin embargo, en muchas especies de Pentatomidae, como así también en otras familias de Heteroptera, los adultos pueden retener las glándulas dorsales abdominales como funcionales (Aldrich, 1988, Aldrich *et al.*, 1995; Davidová-Vilímová y Podoubsky, 1999; Staddon, 1999). Incluso, existen varios estudios que detallan las diferencias cualitativas en la mezcla de volátiles producidos por larvas y adultos (Lusby y Kochansky, 1986; Aldrich y Yonke, 1975; Borges y Aldrich, 1992; Farine *et al.*, 1992; Blatt *et al.*, 1998), y entre machos y hembras (Aldrich *et al.*, 1993; Ho *et al.*; 2003).

-Glándulas exocrinas en la Familia Reduviidae

El sistema de glándulas de la familia Reduviidae es particularmente diferente al presente en el resto de las familias de Heteroptera. Este sistema está formado por las glándulas dermales abdominales típicas de las larvas, aunque también se han observado en adultos de algunas especies (Carayon *et al.*, 1958; Barth, 1960; James *et al.*, 1994; Weirauch, 2006b), las glándulas metatorácicas (también denominadas metasternales) y las glándulas de Brindley (Brindley, 1930), ambas típicas de los adultos. Estas últimas están ausentes en algunas subfamilias (Carayon *et al.*, 1958).

-Glándulas metasternales y de Brindley

Las glándulas metasternales son glándulas pares localizadas ventralmente en el margen anterior de cada cavidad metacoxal (Brindley, 1930) (**figuras 2 y 3**). Cada glándula consiste en un tubo secretor no ramificado y un pequeño reservorio en forma de pera cuyo orificio de salida se encuentra lateralmente en la fosa esternal apofisaria (Weirauch, 2006a; Vitta *et al.*, 2009). Las glándulas de Brindley (**figuras 2 y 3**) consisten en un par de glándulas en forma de saco ubicadas dorsalmente, que se extienden por la porción lateral hasta el segundo segmento abdominal. Su orificio de

salida se encuentra en el epímero metatorácico (Brindley, 1930; Kálin y Barrett, 1975; Staddon, 1979).

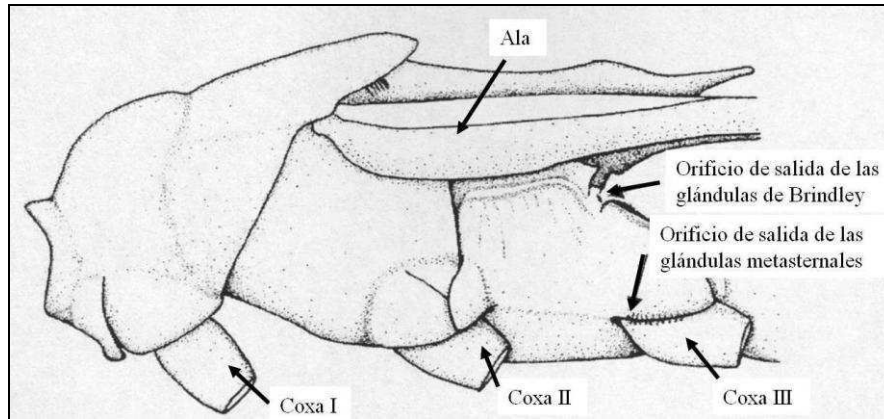


Figura 2: Representación esquemática en vista lateral del tórax de un adulto de Triatominae donde se observa la disposición de los orificios de salida de las glándulas de Brindley y metasternales (modificado de Weirauch, 2006a).

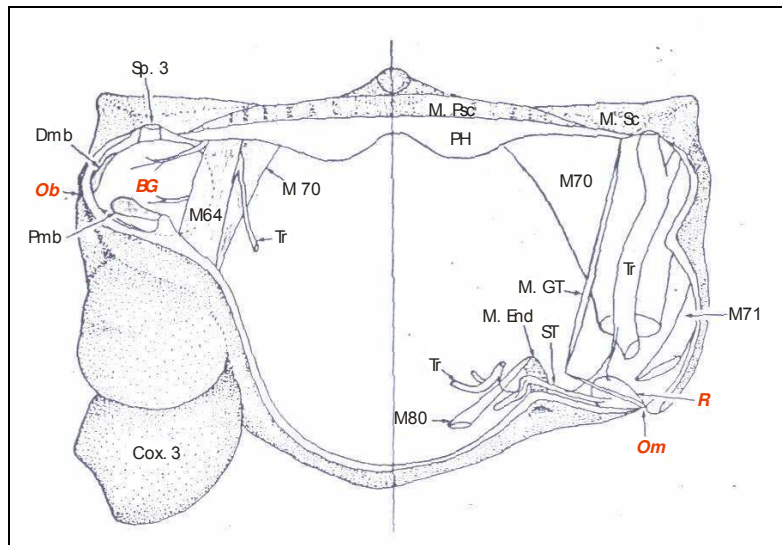


Figura 3: Representación esquemática del metatórax de triatominos en corte transversal observado desde una vista posterior. La metacoxa (Cox 3), los músculos M70, M71, M80 y la glándula de Brindley han sido removidos en el lado derecho. **BG:** glándulas de Brindley; Cox. 3: metacoxa; Dmb: músculo anterior dorsal de la glándula de Brindley; M. End: endosternito metasternal; M. Sc: metascutelo; M. Psc: postmetascutelo; M64: *músculo noto-coxalis*; M70: *músculo noto-trochanteralis*; M71: *músculo pleura-trochanteralis*; M80: *músculo ventralis-abdominalis*; MGT: *músculo glandulae thoracicae*; **Ob:** orificio de salida de la glándula de Brindley izquierda; **Om:** orificio de salida de la glándula metasternal derecha; Pmb: músculo posterior de la glándula de Brindley; PH: fragma metatorácico; **R:** reservorio de la glándula metasternal; Sp. 3: 3er espiráculo; ST: túbulo secretor de la glándula metasternal; Tr: tráquea (modificado de Schofield y Upton, 1978).

-Aspectos biológicos de los insectos de la subfamilia Triatominae

Los insectos triatominos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) son un grupo de aproximadamente 140 especies, muchas de las cuales son vectores o potenciales vectores de la enfermedad de Chagas, causada por el parásito flagelado *Trypanosoma cruzi*. Se estima que entre 7 y 8 millones de personas están infectadas y entre 75 y 90 millones se encuentran en riesgo de contraerla en Latinoamérica (Coura y Dias, 2009; WHO, 2014). La mayoría de las especies se alimentan de mamíferos arbóreos y terrestres, otras están asociadas a murciélagos y a aves y en algunos casos a reptiles y anfibios (Schofield, 1988; Dujardin *et al.*, 2000).

Los triatominos son insectos hemimetábolos. Cada uno de los cinco estadios larvales y los adultos de Triatominae, son hematófagos obligados, lo que significa que necesitan una fuente de sangre para poder alimentarse y subsistir. Las larvas requieren ingestas masivas de alimento para disparar la muda, mientras que los adultos requieren cantidades significativas de sangre para actividades que consumen energía, tales como la reproducción y la dispersión (Lazzari *et al.*, 2013).

El hábitat natural de triatominos incluye palmeras, troncos de árboles huecos, madrigueras, pilas de rocas y otros refugios, donde viven en asociación con sus hospedadores. Se sugiere que el contacto con el hombre surgió en áreas de vegetación o cuando los insectos llegaron mediante el vuelo a zonas más urbanizadas, colonizando viviendas humanas. Las casas rurales de adobe, típicas del norte de Argentina donde la enfermedad de Chagas tiene gran prevalencia, presentan muchas grietas en las cuales los insectos pueden encontrar refugios. Durante las horas del día, estos insectos se mantienen inmóviles (*i.e.*, en akinesis) en el interior de sus refugios debido a un reloj circadiano que reduce la actividad general de los insectos (Lazzari, 1992). Es allí, en los refugios, donde permanecen agregados por la acción de feromonas de agregación presentes en sus heces (Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994; Lorenzo y Lazzari, 1996; Lorenzo Figueiras y Lazzari, 2000) manteniéndose protegidos de potenciales predadores. Durante la noche, las vinchucas dejan sus refugios para, mediante claves químicas (Taneja y Guerin, 1997; Guerenstein y Guerin, 2001; Barrozo y Lazzari, 2004a y b; Guerenstein y Lazzari, 2009; Ortiz y Molina, 2010) o claves físicas como el calor (Lazzari, 2009), encontrar un hospedador, *i.e.*, una fuente de alimento. Es interesante tener en cuenta, que los hospedadores de

estos insectos son potenciales predadores, lo que significa que la búsqueda de alimento implica de alguna manera la exposición al peligro.

Triatoma infestans ***Glándulas exocrinas y volátiles asociados***

Triatoma infestans (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), modelo experimental de la presente Tesis, es el principal vector de *Trypanosoma cruzi* Chagas 1909, agente causante de la enfermedad de Chagas en el cono sur de Latino América. Los adultos y las larvas de esta especie ocupan predominantemente hábitats domésticos en contacto directo con el hombre (Lent y Wygodzinsky, 1979; Zeledón, 1983), aunque se encuentran también asociados a áreas peri-domésticas como gallineros y corrales (Schofield, 1994; Gürtler *et al.*, 1996). También, *T. infestans* fue encontrada en hábitats silvestres en la región de Cochabamba, en pequeñas colonias asociadas al cuis o conejillo de India (*Cavia* sp.) en el Chaco boliviano (Noireau, 1997).

El comportamiento de *T. infestans*, junto con otras especies de triatominos, ha sido estudiado ampliamente durante las últimas décadas. Actualmente existe consenso en que los semioquímicos juegan un rol importante en diversos aspectos de la biología de esta especie, tales como la búsqueda de hospedador, el comportamiento de agregación en refugios, el comportamiento sexual, el comportamiento de alarma y defensa (Ward, 1981; Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994; Manrique y Lazzari, 1995; Cruz-López *et al.*, 2001; Fontán *et al.*, 2002; Barrozo, 2003; Manrique *et al.*, 2006; Crespo y Manrique, 2007; Guerenstein y Lazzari, 2009; Cocchiararo-Bastías *et al.*, 2011; Manrique y Lorenzo, 2012).

En cuanto a los posibles contextos en donde puede ocurrir la emisión de compuestos desde las glándulas exocrinas presentes sólo en adultos, las glándulas metasternales y de Brindley, se ha sugerido el posible papel de los volátiles emitidos por éstas, adjudicándoseles funciones en el comportamiento sexual y/o ante perturbación mecánica, *i.e.*, como feromonas de alarma o alomonas de defensa.

Desde un comienzo, a las glándulas de Brindley se les ha asignado funciones de alarma (Schofield, 1979; Ward, 1981) y de defensa, esto último, debido a la naturaleza corrosiva de su principal componente, el ácido isobutírico. Ward (1981), a partir de la respuesta comportamental de los adultos de *T. infestans* frente a ácido isobutírico

sintético, sugirió que los compuestos emitidos por estas glándulas actuarían como una feromona de alarma a ciertas dosis.

Posteriormente, a través de la identificación química de los volátiles emitidos por las glándulas metasternales y de Brindley, se ha sugerido que ambos tipos de glándulas liberan su contenido cuando se perturba a los adultos, describiéndose al menos catorce volátiles entre los que se encuentran cetonas, alcoholes y ácidos de cadena corta (Manrique *et al.*, 2006). A su vez, estos mismos autores encontraron que cuando se estimuló con olores emitidos por adultos perturbados a larvas de *T. infestans* se observó un incremento en la actividad locomotora y también una respuesta de orientación en dirección opuesta a la fuente de emisión, apoyando la hipótesis sobre la función de alarma de estos volátiles.

Por otro lado, se ha sugerido que parejas en cópula de *T. infestans* emiten una señal química que promueve la agregación de varios machos alrededor de la pareja (de Brito Sánchez *et al.*, 1995, Manrique y Lazzari, 1995). Este comportamiento estaría mediando, al parecer, un sistema reproductivo poliándrico, ya que los machos una vez agregados copulan sucesivamente con la misma hembra (Manrique y Lazzari, 1995). A partir de estos resultados y para poner a prueba si ambos tipos de glándulas están involucradas en diversos aspectos del comportamiento sexual, Crespo y Manrique (2007), realizaron experimentos de oclusión selectiva de ambos tipos de glándulas de la hembra de *T. infestans*, analizando el comportamiento de machos. De esta manera, estos autores demostraron que las glándulas metasternales juegan un papel preponderante en el comportamiento sexual de *T. infestans*. Por un lado promueven la ocurrencia de cópula y por otro lado también promueven el comportamiento de agregación de machos descrito en esta especie. En ese mismo trabajo los autores demostraron que las glándulas de Brindley no afectan la ocurrencia de cópula ni tampoco el comportamiento de agregación de machos. Sin embargo, el origen de los volátiles relacionados con el comportamiento sexual ha sido motivo de controversia ya que Fontán *et al.* (2002), presentaron resultados que muestran que parte de los compuestos de las glándulas de Brindley podrían ser recolectados alrededor de grupos de parejas en cópula de *T. infestans*, sugiriendo que estas glándulas también están involucradas en el contexto sexual.

En resumen, a pesar de algunos trabajos que se contradicen, según distintos estudios realizados sobre varias especies de triatominos, incluyendo a *R. prolixus*, *Triatoma phyllosoma*, *T. infestans*, *Triatoma maculata*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma vitticeps* y *Pastrongylus megistus*, parecería ser que las glándulas de Brindley son la fuente de emisión de las feromonas de alarma (Schofield, 1979; Ward, 1981; Manrique *et al.*, 2006; Manrique y Lorenzo, 2012), mientras que las glándulas metasternales estarían involucradas en la comunicación sexual (Crespo y Manrique, 2007; Pontes *et al.*, 2008; Vitta *et al.*, 2009; Zacharias *et al.*, 2010; Pontes y Lorenzo, 2012).

-Habilidades cognitivas en vinchucas

El aprendizaje es para los animales un proceso fuertemente adaptativo, evidenciado en la enorme cantidad de trabajos que demuestran las capacidades cognitivas de muchos animales, incluidos los menos complejos. Si bien es cierto que actualmente no existe una definición que describa inequívocamente al aprendizaje, clásicamente ha sido definido como un cambio comportamental causado por una experiencia previa.

En insectos, existen numerosos trabajos que estudian el aprendizaje y la memoria, considerando incluso la adquisición de reglas y conceptos (Lewis y Tumlinson, 1988; Vet y Groenewold, 1990; Papaj y Lewis, 1993; Vet *et al.* 1995; Chivers *et al.*, 1996; Dukas, 1998; Deisig *et al.*, 2001; Giurfa *et al.*, 2001; Cunningham *et al.*, 2003; Giurfa, 2004; Avarguès-Weber *et al.*, 2010). Sin embargo, muy poco se sabe acerca de las habilidades cognitivas de los insectos hematófagos. Existen trabajos realizados sobre mosquitos, donde se evidencian cambios comportamentales en cuanto a elección de hospedador y sitios de oviposición, modulados por la experiencia (McCall y Eaton, 2001; McCall *et al.*, 2001; McCall y Kelly, 2002; Alonso *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2003). Respecto a los triatominos, en los últimos años, se han publicado trabajos en *R. prolixus* en los que se demostró la capacidad cognitiva de esta especie en el contexto de búsqueda de alimento (Abramson *et al.*, 2005; Aldana *et al.*, 2008; Vinauger *et al.*, 2011a; 2011b; 2012).

Resumen de antecedentes y objetivos

A partir de los antecedentes previos surge que se conoce la existencia de glándulas dermales abdominales en larvas de otras especies de Heteroptera, pero no existen trabajos que evidencien la existencia de glándulas exocrinas o la presencia de volátiles asociados liberados en un contexto de alarma en estadios inmaduros de *T. infestans*.

Además, respecto a la feromona de alarma liberada por adultos frente a perturbación mecánica, los trabajos previos sugieren que ambos tipos de glándulas, metasternales y/o de Brindley cumplirían un rol en el contexto de alarma; sin embargo, sólo existe evidencia comportamental de respuesta de escape de adultos frente al ácido isobutírico (Ward, 1981) y de larvas frente a olores emitidos por adultos perturbados (Manrique *et al.*, 2006), desconociéndose si en forma individual y específica los volátiles o sus mezclas evocan una respuesta comportamental en larvas de *T. infestans*. También, de los antecedentes surge que no existen trabajos que describan la dinámica de descarga-recarga de dichas glándulas, como así tampoco su relación con el desarrollo del imago y con el número de descargas debidas a perturbación. Asimismo, se desconoce si la alimentación tiene algún efecto en la dinámica de llenado de las glándulas y si ésta afecta la respuesta de escape de las larvas. Con respecto a las capacidades cognitivas de las vinchucas, si bien existen algunos trabajos que demuestran estas habilidades, no se ha estudiado aún si distintos procesos cognitivos (asociativos y/o no asociativos) pueden desarrollarse en un contexto de alarma, *i.e.*, si el comportamiento de escape puede ser modulado o no por la experiencia previa.

El presente trabajo de Tesis propone analizar a los volátiles emitidos por distintos estadios de *T. infestans* luego de un evento de perturbación y la respuesta de escape asociada a dichos volátiles. En un primer capítulo, se propone dilucidar tanto química como comportamentalmente la existencia de volátiles emitidos por estadios inmaduros de *T. infestans*. En un segundo capítulo, se estudiará cualitativamente el estado de las glándulas de Brindley a partir de la observación y/o percepción de la secreción liberada luego de una perturbación mecánica. Asimismo, se estudiará cuantitativamente el contenido del ácido isobutírico de las glándulas de Brindley como un indicador del estado de las glándulas y su relación con el desarrollo del imago, el número de perturbaciones y la alimentación. En un tercer capítulo, mediante técnicas

electrofisiológicas, se analizará la capacidad de las larvas de percibir a nivel periférico, los volátiles individuales que componen la feromona de alarma. Conjuntamente, se analizará la respuesta comportamental de larvas frente a estos volátiles, presentados individualmente o en mezclas. Por último, en el cuarto capítulo, se analiza la plasticidad comportamental de la respuesta de escape de larvas de *T. infestans* generada por el ácido isobutírico y por la feromona de alarma liberada por adultos de la especie.

Objetivo General

El objetivo general de esta Tesis fue analizar la feromona de alarma de la vinchuca *Triatoma infestans* y la respuesta de escape asociada, considerando tanto el estudio de su emisión por parte de los estadios inmaduros, como así también por las glándulas de Brindley y metasternales presentes en los adultos.

Objetivos Particulares

1- Determinar si estadios inmaduros de *T. infestans* emiten volátiles en respuesta a perturbación mecánica y si existe una respuesta de escape asociada a dichos compuestos.

2- Iniciar la búsqueda de la fuente emisora e identificar, mediante diversas técnicas y procedimientos de química analítica, el/los volátil/es eventualmente liberado/s por las larvas.

3- Estudiar la dinámica de descarga-recarga de las glándulas de Brindley a partir de la cuantificación de la masa de su componente principal, el ácido isobutírico, en insectos en diferentes estados de desarrollo, distinto número de perturbaciones y, condiciones de ayuno.

4- Analizar si existe una dependencia entre el estado de llenado de las glándulas de Brindley, secretoras de la feromona de alarma, y la respuesta de escape asociada.

5- Identificar mediante técnicas electrofisiológicas estímulos químicos asociados a las glándulas de Brindley y metasternales, que sean capaces de ser detectados por los

órganos sensoriales (las sensilias) localizados en las antenas de las larvas de *T. infestans*.

6- Analizar el comportamiento de las larvas de *T. infestans* ante compuestos volátiles de la feromona de alarma, tanto en forma individual como en mezclas de los mismos, de modo de determinar si algún/os compuesto/s de las glándulas de Brindley y/o metasternales evoca/n una respuesta de orientación en las vinchucas.

7- Explorar posibles interacciones sinérgicas o antagónicas entre distintos estímulos químicos presentes en los compuestos de las glándulas de Brindley y/o metasternales, que modifiquen el eventual comportamiento de orientación de las vinchucas.

8- Analizar las capacidades cognitivas de *T. infestans*, sometiéndolas a diferentes protocolos de aprendizaje, asociativos y no asociativos, en el contexto de alarma.

Se trabajará en el marco de las siguientes hipótesis:

- Los estadios larvales liberan compuestos volátiles que funcionan como feromona de alarma.
- Los adultos farados poseen las glándulas de Brindley no funcionales.
- La recarga de las glándulas de Brindley presentes en los adultos luego de una perturbación mecánica es gradual.
- El incremento de las perturbaciones mecánicas en el tiempo genera una disminución gradual del contenido de las glándulas de Brindley.
- La recarga de las glándulas de Brindley en los adultos depende de la alimentación, viéndose reflejada dicha dependencia en la respuesta de escape de sus conespecíficos.
- Las antenas de *T. infestans* son capaces de detectar volátiles emitidos por los adultos durante un evento de perturbación.

- Las larvas de *T. infestans* son capaces de percibir compuestos de la feromona de alarma como entidades diferentes, siendo posible encontrar respuestas diferentes frente a distintas dosis y volátiles evaluados individualmente o en mezclas.
- Las vinchucas son capaces de aprender y de modular la respuesta de orientación frente a la feromona de alarma y en particular de su componente principal, el ácido isobutírico, dependiendo de su experiencia previa.

... el efímero mundo de los olores.

... el perfume iba directamente al corazón y allí decidía de modo categórico entre inclinación y desprecio, aversión y atracción, amor y odio. Quien dominaba los olores, dominaba el corazón de los hombres.

El Perfume,
Patrick Süskind, 1985.



Capítulo 1:

“Respuesta de escape y emisión de volátiles de larvas de Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae) luego de un evento de perturbación”

Introducción

Las larvas de los insectos pertenecientes al antiguo suborden Heteroptera poseen uno, dos y/o tres pares de glándulas dermales abdominales; mientras que en general los adultos poseen un par de glándulas metasternales. A pesar de que las secreciones liberadas por las glándulas dermales de las larvas pueden estar relacionadas con comportamientos de agregación y de alarma (Levinson y Barilan, 1971; Staddon 1979; Kuwahara *et al.*, 2011) o incluso con el cuidado maternal (Maschwitz y Gutmann, 1979), su función más común parece ser la de defensa frente al ataque de predadores (Henrici, 1938; Remold, 1963; Staddon, 1979, Aldrich, 1988; Borges y Aldrich, 1992; Farine *et al.*, 1992; Pavis *et al.*, 1994; Pareja *et al.*, 2007), de igual manera que las glándulas metasternales en la mayoría de los adultos (Krall *et al.*, 1999; Moraes *et al.*, 2008). Consecuentemente, las glándulas dermales abdominales a menudo han sido descritas como no funcionales en el adulto, ya que su papel defensivo es tomado por las glándulas metasternales en la mayoría de los casos (Aryeetey y Kumar, 1973). Como Davidová-Vilímová y Podoubsky (1999) y Staddon (1999) mostraron en sus trabajos, existe evidencia a favor de que las glándulas dermales, o algunos de sus componentes, persistan en el estadio adulto en muchas familias de Heteroptera. Tal es el caso del trabajo de Aldrich *et al.* (1978), cuando estos autores se refieren a los volátiles emitidos por las glándulas dermales abdominales presentes en los adultos de la familia Pentatomidae.

En Reduviidae, varios autores describieron las glándulas dermales abdominales en adultos (Carayon *et al.*, 1958; Barth, 1960; James *et al.*, 1994, Weirauch, 2006b). Sin embargo, según Schofield y Upton (1978), las glándulas dermales abdominales características de las larvas no parecen estar presentes en los adultos de la subfamilia Triatominae. Más aún, al analizar especímenes de *Rhodnius prolixus* (especie incluida en Triatominae), Weirauch (2006b) señaló la falta de estas glándulas en los adultos de esta especie, demostrando coherencia con la bibliografía existente que plantea la ausencia de las glándulas dermales abdominales incluso en las larvas de la subfamilia (Lent y Wygodzinsky, 1979).

Por otro lado, en la mayoría de las especies de la familia Reduviidae, los adultos poseen bien desarrolladas las glándulas de Brindley y las glándulas metasternales, de las cuales se plantea, según distintos autores, una función de defensa y/o de alarma

(Pattenden y Staddon, 1972; Ward, 1981; Rossiter y Staddon, 1983; Cruz Lopez *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 2002; Guerenstein y Guerin, 2004; Manrique *et al.*, 2006;) y/o sexual (Fontán *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2002; Guerenstein y Guerin, 2004; Manrique *et al.*, 2006; Crespo y Manrique, 2007; Pontes *et al.*, 2008; Vitta *et al.*, 2009; Zacharias *et al.*, 2010; May-Concha *et al.*, 2012; Pontes y Lorenzo, 2012). Siendo así, la persistencia del sistema glandular defensivo de las larvas parecería no ser necesaria en los adultos. La presencia de los hemiélitros y del 2^{do} par de alas, que forman una cubierta sobre el abdomen, también parecería complicar la evaporación de los productos de las glándulas dermales abdominales (Weirauch, 2006b).

Pese a que los trabajos previos sugieren su ausencia, las glándulas secretoras asociadas a la liberación de volátiles con función defensiva y/o de alarma podrían presentarse en las larvas de *T. infestans*, considerando por un lado, la presencia de glándulas dermales y sus feromonas de alarma asociadas en estadios inmaduros de heterópteros, y por otro lado, la existencia de una feromona de alarma liberada por las glándulas de Brindley y las metasternales en los adultos de *T. infestans* en respuesta a una perturbación mecánica. Además, el hecho de que los individuos de la especie permanezcan agregados en el interior de un refugio durante las horas de luz (Lorenzo Figueiras *et al.*, 1994; Lorenzo y Lazzari, 1996; Lorenzo Figueiras y Lazzari, 1998; Lorenzo Figueiras y Lazzari, 2000), para luego exponerse a predadores durante la salida desde sus refugios durante la búsqueda de alimento, hace pensar que sería funcional la posible existencia de dichas secreciones defensivas y/o de alarma en las larvas, de la misma manera que existen en los adultos de *T. infestans*.

En este capítulo se puso a prueba la existencia de volátiles con función de alarma, liberados por larvas de *T. infestans* luego de una perturbación mecánica. En primer lugar se analizó, utilizando un olfatómetro, la respuesta comportamental de larvas de 4^{to} estadio frente a volátiles emitidos por individuos de 3^{er}, 4^{to} y 5^{to} estadio larval luego de un evento de perturbación. Posteriormente, mediante la realización de diferentes técnicas de extracción y análisis químico, se inició el estudio sobre la composición de los volátiles liberados por las larvas perturbadas.

Parte 1: Respuesta comportamental de larvas de T. infestans enfrentadas a volátiles liberados por larvas perturbadas

Trabajos previos muestran la existencia de una respuesta de escape de larvas de *T. infestans* expuestas a los volátiles liberados por adultos perturbados, expresada como un aumento en la actividad locomotora y una respuesta direccional de evitación (Manrique *et al.*, 2006). Sin embargo, hasta el presente no existía evidencia sobre la existencia de comunicación química olfativa entre estadios larvales de triatominos en el contexto de alarma. En esta parte del capítulo, se realizaron ensayos en un olfatómetro de doble elección para evaluar el comportamiento de larvas enfrentadas a volátiles provenientes de larvas de *T. infestans* mecánicamente perturbadas y analizar su función como feromona de alarma.

Materiales y Métodos

-Animales

Se utilizaron insectos de 3^{er}, 4^{to} y 5^{to} estadio larval de *T. infestans* con 10-15 días de ayuno post-ecdisis. Las larvas fueron obtenidas a partir de huevos provenientes del Servicio Nacional de Chagas, Córdoba, Argentina y criados en nuestro laboratorio a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 30-60% HR, bajo un fotoperíodo de 12:12 horas Luz/Oscuridad. Hasta alcanzar el estadio deseado para la realización de los ensayos, las larvas fueron alimentadas sobre gallinas vivas. Todos los animales fueron manipulados de acuerdo con las reglas de bioseguridad del Servicio de Higiene y Seguridad de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Se usó un total de 1980 larvas.

Todos los experimentos fueron realizados durante las primeras horas de la escotofase (*i.e.*, 1-5h luego de que la luz se apagara) abarcando el período de máxima actividad observada para las vinchucas (Lazzari, 1992). A su vez, los experimentos fueron llevados a cabo en condiciones de oscuridad funcional, respetando así la fase del fotoperíodo en la cual los animales se encontraban y evitando, además, la posible utilización de señales visuales por parte de las vinchucas durante los ensayos. La temperatura y la humedad relativa del cuarto experimental utilizado fueron mantenidas a $25^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ y $40 \pm 10\%$, respectivamente.

-Dispositivo experimental y Procedimiento

Para los ensayos comportamentales se utilizó un olfatómetro de doble elección sin corrientes de aire (**figura 1.1**). Este olfatómetro consiste en una caja de acrílico rectangular (15 x 10 x 2cm, llamada de aquí en adelante arena experimental) con orificios en su base (2mm de diámetro), en la cual se libera una larva y se analiza su comportamiento de preferencia espacial. Por debajo, y de las mismas dimensiones, se encuentra unida una sub-cámara inferior (15 x 10 x 2cm) que se encuentra dividida en dos secciones de igual tamaño por una placa transversal impermeable a olores. A su vez, en cada sección de la sub-cámara se encuentra unido un frasco (10ml) portador del estímulo el cual se conecta a través de una abertura en la base.

La arena experimental se cubría con papel de filtro con pequeños orificios coincidentes con los de la base de la misma. Dicho sustrato ofrecía una superficie adecuada para el movimiento de las larvas. Asimismo, dicho papel fue cambiado luego de cada ensayo para evitar cualquier rastro químico eventualmente dejado por las larvas.

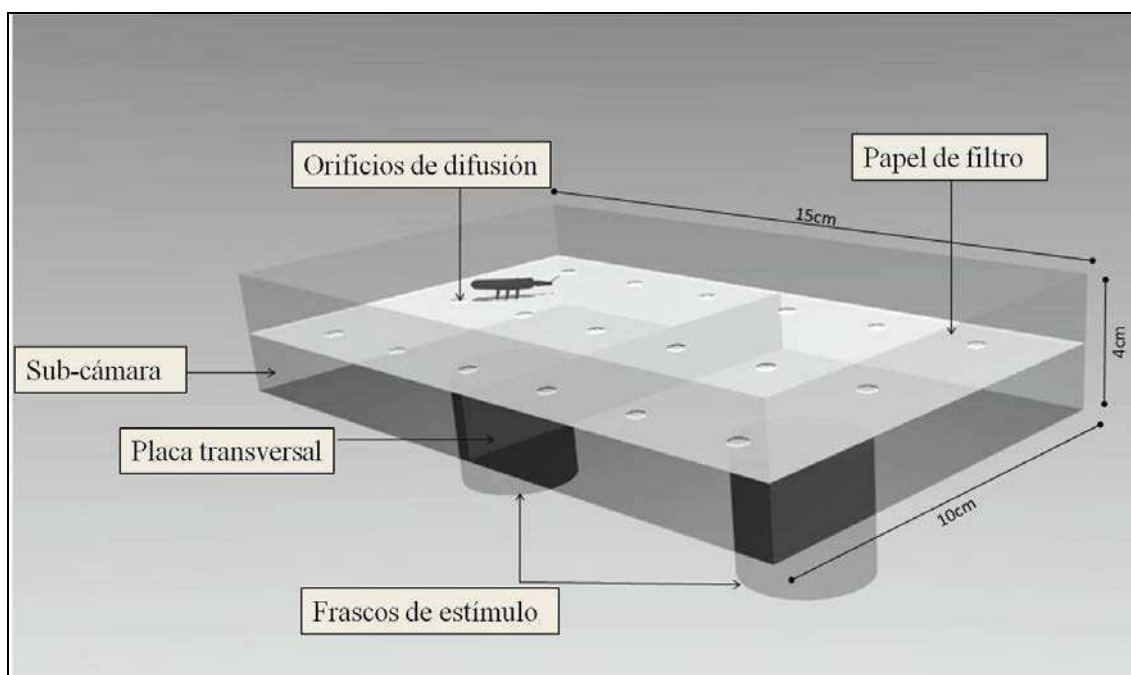


Figura 1.1: Olfatómetro de doble elección. Esquema de la arena experimental utilizada para analizar la respuesta comportamental de las larvas frente a volátiles emitidos por conoespecíficos.

En cada ensayo individual, un frasco fue utilizado como control (*i.e.*, conteniendo un grupo de cinco larvas sin perturbar) y el otro frasco fue utilizado como estímulo (*i.e.*, con un grupo de cinco larvas perturbadas inmediatamente antes de

comenzar el experimento). De esta manera, los estímulos volátiles provenientes de los insectos perturbados o sin perturbar ingresaban por difusión en cada una de las sub-cámaras independientes y continuaban difundiendo a través de los pequeños orificios hacia la arena experimental, creando así un gradiente químico.

Una vez que ambos frascos eran conectados a la sub-cámara, una larva era ubicada en el centro de la arena experimental (**figura 1.1**) cubierta con un pequeño frasco invertido durante un minuto para permitir la familiarización con el contexto y la difusión de los olores. Luego, la larva era liberada con delicadeza retirando el pequeño frasco que la cubría y su comportamiento registrado durante cuatro minutos mediante una video cámara sensible a luz infrarroja conectada a una grabadora digital (Videoman®).

Para evitar la perturbación de las larvas cuando eran colocadas en el frasco portador de estímulos, se utilizó una tira de papel de filtro pequeña en forma de rampa. Se acercó el papel, sujetado con pinzas, a las patas de los insectos y se esperó que asciendan y que luego descendan voluntariamente dentro del frasco. Este frasco era luego ubicado en la arena experimental evitando cualquier tipo de manipulación brusca. Para las series donde los insectos eran perturbados se procedió de la misma forma hasta el momento en que las larvas se encontraran en el interior del frasco portador de estímulos. Una vez allí colocadas, antes de comenzar el ensayo experimental, se batió manualmente el frasco durante 10 segundos y se lo conectó al olfatómetro. En experimentos piloto previos este método de perturbación permitió la percepción de olores por parte del experimentador. Una vez terminado cada ensayo, los insectos utilizados como fuente de volátiles y los evaluados eran descartados. El dispositivo experimental fue lavado dejando circular una corriente de aire durante 10 minutos entre ensayos.

Para evitar el posible efecto de una heterogeneidad espacial en la distribución de las larvas sobre la arena experimental, la posición de los estímulos fue alternada al azar entre los ensayos.

-Series experimentales

Para analizar la respuesta frente a la presencia de volátiles emitidos por larvas de *T. infestans*, se definieron seis series experimentales en las que se colocaba en los frascos

estímulo grupos de 5 larvas de 3^o, 4^o o 5^o estadio, ya sea sin perturbar o perturbadas durante el ensayo según el siguiente esquema:

- 1- 3^{er} estadio sin perturbar vs. 3^{er} estadio sin perturbar (Control)
- 2- 3^{er} estadio sin perturbar vs. 3^{er} estadio perturbadas
- 3- 4^{to} estadio sin perturbar vs. 4^{to} estadio sin perturbar (Control)
- 4- 4^{to} estadio sin perturbar vs. 4^{to} estadio perturbadas
- 5- 5^{to} estadio sin perturbar vs. 5^{to} estadio sin perturbar (Control)
- 6- 5^{to} estadio sin perturbar vs. 5^{to} estadio perturbadas

Se realizaron un total de 30 réplicas por serie experimental.

-Análisis de datos

Una vez finalizado cada ensayo, se analizaron los videos mediante el uso de un programa de análisis de datos (del tipo *The Observer 2.01*, Noldus Information Technology, The Netherlands). Luego, se analizó la preferencia olfativa de los insectos, *i.e.*, la preferencia espacial en la arena experimental a lo largo de los cuatro minutos de ensayo.

Como medida de la preferencia olfativa de los insectos, se registró el tiempo transcurrido en cada uno de los lados de la arena experimental. Un índice de preferencia (*IP*) que va de -1 a 1 fue calculado como $IP = (TC - TE)/(TC + TE)$, donde *TC* es el tiempo, en segundos, transcurrido en el lado del control de la arena experimental y *TE* es el tiempo transcurrido en el lado del estímulo. En las series control, es decir, dos grupos de cinco larvas sin perturbar en cada frasco estímulo, *TE* es el tiempo transcurrido a un lado o al otro de la arena experimental elegido por el experimentador en forma aleatoria. Valores de *IP* cercanos a -1, 0, o 1 indican repelencia, distribución al azar o atracción al estímulo respectivamente. Las desviaciones de una distribución al azar (es decir $IP=0$) de las larvas sobre la arena experimental se evaluaron para cada tratamiento con un *T-Test* de 1 muestra.

Resultados

*-Respuesta comportamental frente a volátiles emitidos por larvas de *T. infestans* perturbadas*

La respuesta comportamental de las larvas de 4^{to} estadio *T. infestans* enfrentadas a volátiles provenientes de larvas perturbadas mecánicamente dependió del estadio utilizado como fuente de olores (**figura 1.2**). Las larvas no mostraron una preferencia olfativa cuando en uno de los lados de la arena experimental se las sometió a olores provenientes de larvas de 3^{er} estadio perturbadas (IP= -0,13; *T-Test* de 1 muestra = -1,51; $p > 0,05$); lo mismo ocurrió frente a larvas no perturbadas (IP= 0,03; *T-Test* de 1 muestra = 0,25; $p > 0,05$) (**figura 1.2**). Tampoco mostraron una preferencia olfativa al utilizar como estímulo olores provenientes de larvas de 4^{to} estadio, ya sea perturbadas (IP= -0,07; *T-Test* de 1 muestra = -0,56; $p > 0,05$) o no perturbadas (IP= 0,08; *T-Test* de 1 muestra = 0,83; $p > 0,05$). Sin embargo, cuando se presentaron los volátiles provenientes de larvas de 5^{to} estadio perturbadas, las larvas evitaron el lado de la arena experimental que contenía a dicho estímulo olfativo, mostrando una distribución espacial significativamente diferente de una distribución al azar (IP= -0,24; *T-Test* de 1 muestra = -2,72; $p = 0,01$, señalado con asterisco en **figura 1.2**). Nuevamente, en el tratamiento control (larvas de 5^{to} estadio sin perturbar en ambos sectores), las larvas no mostraron una diferencia significativa respecto de una distribución al azar (IP= -0,02; *T-Test* de 1 muestra = -0,26; $p > 0,05$).

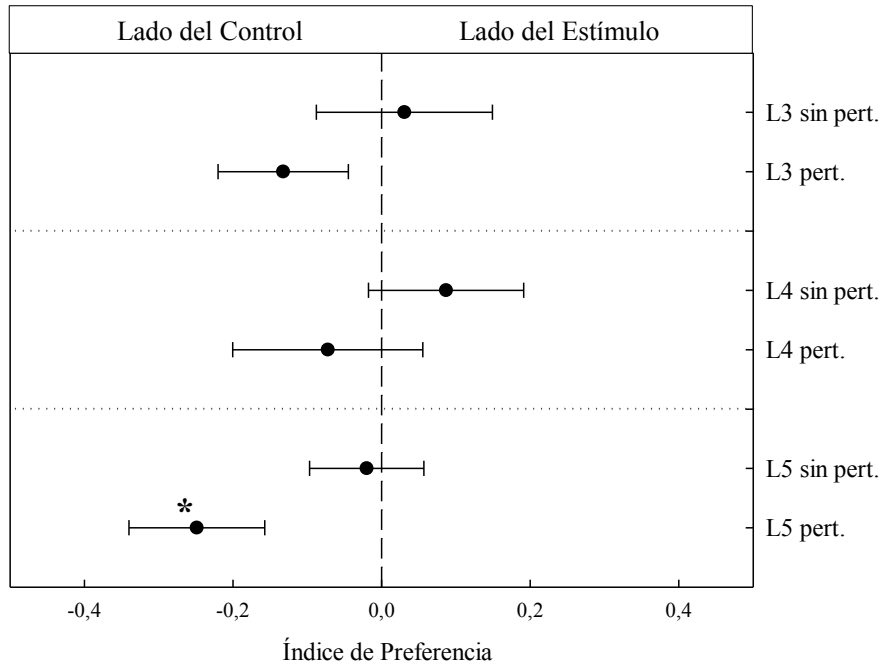


Figura 1.2: Preferencia olfativa de larvas de 4^{to} estadio de *T. infestans* enfrentadas individualmente a grupos de 5 larvas de 3^{er}, 4^{to} o 5^{to} estadio, perturbadas o no perturbadas. Las larvas fueron repelidas cuando fueron expuestas a olores provenientes de larvas de 5^{to} estadio perturbadas. N=30 para cada tratamiento. El asterisco indica diferencias significativas de IP = 0 (*T-Test* de 1 muestra, $p < 0,05$).

L3: larvas de 3^{er} estadio; L4: larvas de 4^{to} estadio; L5: larvas de 5^{to} estadio
sin pert.: sin perturbar; *pert.*: perturbadas.

Parte 2: Muestreo y caracterización química de los volátiles emitidos por larvas de *T. infestans* en respuesta a perturbación mecánica

Los resultados comportamentales descriptos en la sección anterior sugieren la existencia de una secreción volátil emitida por larvas de *T. infestans* ante un evento de perturbación, la cual evoca una respuesta de escape sugiriendo una función de alarma. Como una aproximación a la caracterización química de esta clave, se realizaron diversas técnicas de muestreo y análisis de estos compuestos volátiles, ante la ausencia de estudios previos tanto en cuanto a su naturaleza química como de su origen anatómico. Las técnicas utilizadas incluyen la colecta de volátiles por microextracción en fase sólida (SPME), el análisis químico de un regurgitado liberado por el insecto en el momento de la perturbación (que se consideró como posible fuente de la secreción), y el análisis de glándulas salivales disecadas. El análisis se basó fundamentalmente en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), y en otras técnicas de espectrometría de masas relacionadas (para una descripción general ver *Apéndice I: Técnicas y análisis químicos*, al final de este capítulo).

Materiales y Métodos

-Animales

En estos ensayos se utilizaron insectos de 4^{to} y 5^{to} estadio larval de *T. infestans* con una semana de ayuno post-ecdisis, las cuales fueron criadas en nuestro laboratorio bajo condiciones controladas (ver sección *-Animales* de la Parte I).

-Procedimiento de Muestreo. Estrategias de extracción y análisis químico

✓ *Headspace de larvas*

Se colocaron grupos de larvas de 4^{to} o 5^{to} estadio en cantidad variable (5, 10, 15, 20 o 100 insectos), sin perturbar, en el interior de viales (de 4 o 30 ml) (**figura 1.3AyB**) o en un dispositivo formado por tubos de vidrio (40 cm de largo y 5 cm de diámetro) (**figura 1.3C**), dependiendo del número de insectos. En todos los casos se trabajó con aire estático y recipientes cerrados, utilizando cinta de teflón y Parafilm® de modo de permitir el ingreso de la fibra de SPME pero no la salida de los volátiles emitidos por las larvas. Para evitar la perturbación de las larvas, se procedió de igual forma que la

descrita para los ensayos comportamentales, mediante la ayuda de una pieza de papel de filtro sostenida con pinzas que permitió el ascenso y descenso voluntario de los insectos dentro del frasco de vidrio.

Una vez ubicados los insectos en el frasco o tubo de vidrio, se expuso una fibra SPME semipolar (Carboxen®/Polydimethylsiloxane, 75 µm, Supelco®) en el interior, evitando el contacto de la fibra con los insectos. Para los ensayos con 5-20 insectos, la fibra fue expuesta durante 15 minutos e inmediatamente analizada por GC-MS. Una vez desorbidos los volátiles de la fibra, los mismos insectos fueron perturbados agitando manualmente el frasco durante 10 segundos, y la fibra fue nuevamente expuesta durante 15 minutos para realizar un nuevo análisis por GC-MS. Para el caso de 100 insectos, se realizaron dos perturbaciones de 10 segundos, exponiendo la fibra durante 10 minutos posteriores a cada perturbación, de modo de acumular compuestos volátiles adsorbidos en la fibra. Luego del segundo período de adsorción, la fibra fue desorbida inmediatamente en el GC-MS para el análisis de los volátiles. En todos los casos, el tiempo de desorción de la fibra en el puerto de inyección del GC-MS fue de un minuto, y entre ensayos se realizó una limpieza de la fibra en el inyector de otro cromatógrafo, durante 30 minutos a 300°C.

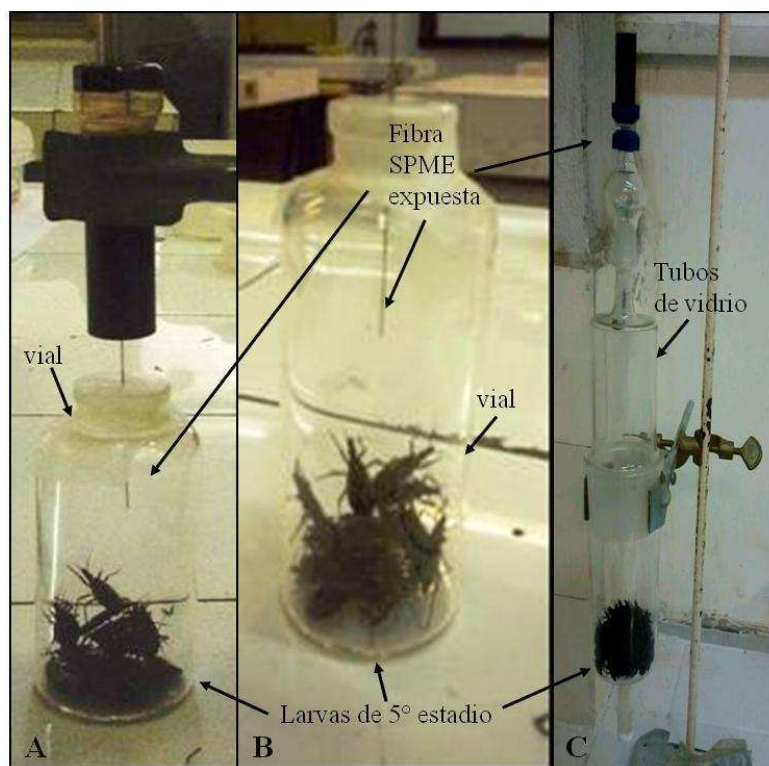


Figura 1.3: Colecta de volátiles por SPME. La fibra fue expuesta en el *headspace* de larvas *T. infestans*. Dependiendo del número de insectos, 5-100, se utilizaron viales de 4 o 30 ml (A y B), o un dispositivo formado por tubos de vidrio (40 cm de largo y 5 cm de diámetro) (C).

✓ *Regurgitado de larvas*

Al perturbar a las larvas, las mismas liberan una pequeña gota transparente, fácilmente observable, desde su probóscide (en adelante, regurgitado). La ausencia aparente de glándulas exocrinas candidatas a ser la fuente de olores emitidos frente a perturbación de larvas, llevó a considerar a este regurgitado como posible fuente de estos compuestos volátiles, por lo cual se decidió analizar este regurgitado de diversas formas:

- **SPME/GC-MS por contacto directo:** Se utilizó la misma fibra de SPME ya descrita, pero en este caso se puso en contacto directo la fibra con la gota proveniente de la probóscide de una larva. Para esto se perturbó la larva bajo lupa presionando sus patas con una pinza entomológica y luego se expuso la fibra para recuperar el regurgitado. Inmediatamente, la fibra fue desorbida en el GC-MS durante un minuto.
- **SMPE/GC-MS del *headspace*:** En iguales condiciones que el procedimiento anterior, en este caso se recolectó el regurgitado en un capilar de vidrio,

transfiriéndolo a 50 µl de agua destilada en un vial de vidrio (4ml). La fibra fue entonces expuesta durante 30 minutos en el *headspace* de la solución acuosa termostaticada a 40 °C en un baño de agua y luego analizada por GC-MS.

- **EI/MS por inyección directa:** Manipulando los insectos de modo similar, se colectó el regurgitado en un pequeño capilar de vidrio y se colocó el mismo en el puerto de inyección directa de un espectrómetro de masas, en ausencia de solvente. En este caso se obtuvo un espectro de masas sin separación previa de compuestos, de modo de visualizar componentes no volátiles o termolábiles en el regurgitado.
- **Derivatización química:** El regurgitado obtenido también se sometió a un procedimiento de derivatización química para su análisis por GC-MS e identificación de posibles grupos funcionales. La derivatización química facilita el análisis de compuestos de baja volatilidad, pobre comportamiento cromatográfico, o datos espectroscópicos ambiguos. En este caso, la búsqueda de grupos carbonilo (cetonas y aldehídos) similares a los encontrados en la feromona de alarma liberada por los adultos, se realizó mediante derivatización del regurgitado con fenilhidracina. Esta reacción resulta en la obtención de la fenilhidrazona correspondiente (**figura 1.4**), la cual puede analizarse por GC-MS en forma más conveniente para el caso de cetonas o aldehídos de bajo peso molecular. El regurgitado se colectó en un capilar de vidrio y se lo depositó en un vial cónico (3ml) con 50 µl de hexano (Sigma-Aldrich) y 20 µl de fenilhidracina (Sigma-Aldrich). La mezcla se calentó en estufa durante 30 minutos a 50°C y luego se analizó por GC y GC-MS la fase orgánica (superior, 1 µl). La reacción se realizó primeramente con dos modelos sintéticos (3-pentanona y 2-butanona), derivatizando 10 µl de estos compuestos con 20 µl de fenilhidracina.

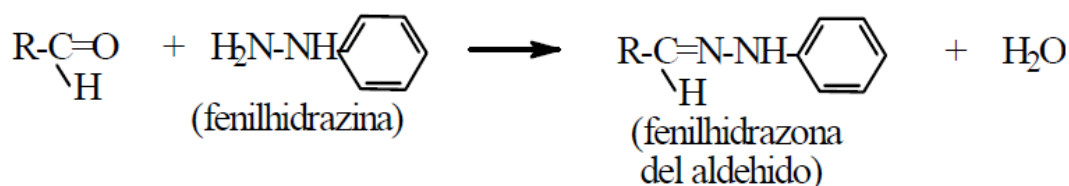


Figura 1.4: Reacción general de derivatización de un grupo carbonilo, en este caso un aldehído, para la obtención de la fenilhidrazona correspondiente.

✓ *Glándulas salivales*

Además del análisis del regurgitado de larvas perturbadas, se realizó una disección de larvas de 5^{to} estadio de *T. infestans* y sus glándulas salivales fueron extraídas para su posterior análisis. Para evitar la perturbación de los insectos durante la manipulación, los mismos fueron mantenidos durante 10 minutos a 10 °C. Una vez anestesiados, se los mantuvo inmóviles en una caja de Petri mediante el uso de plastilina (Modeling Clay, Model, Buenos Aires, Argentina), dejando el tórax expuesto ventralmente. La disección se realizó con una tijera de microcirugía bajo solución Ringer (Case, 1957). Se realizó un corte medio a lo largo del tórax, desde la cabeza hasta el abdomen. Luego la cutícula ventral fue removida junto con las patas, dejando el interior del insecto expuesto. Una vez identificadas las glándulas según Reis *et al.* (2003) (**figura 1.5B**), se realizó un corte transversal en la parte anterior, a nivel de los estiletes, junto con el aparato digestivo, y un corte transversal en la parte posterior, a nivel del promesenteron (Ramírez Pérez, 1969). Por último, las glándulas fueron removidas junto con el aparato digestivo, este último en la menor proporción posible y almacenadas en un vial de vidrio (2 ml) con 0,5 ml de diclorometano (DCM) (Merck® Química, Argentina). Cada muestra fue inmediatamente guardada a -20° C durante no más de 48 h para su posterior análisis químico. Para el análisis del contenido de las glándulas, las muestras fueron previamente tratadas en un sonicador (Branson® 200, Taiwan) durante 10 minutos, de modo de facilitar la interacción entre el solvente y los contenidos de la glándula, y posteriormente analizadas por GC-MS.

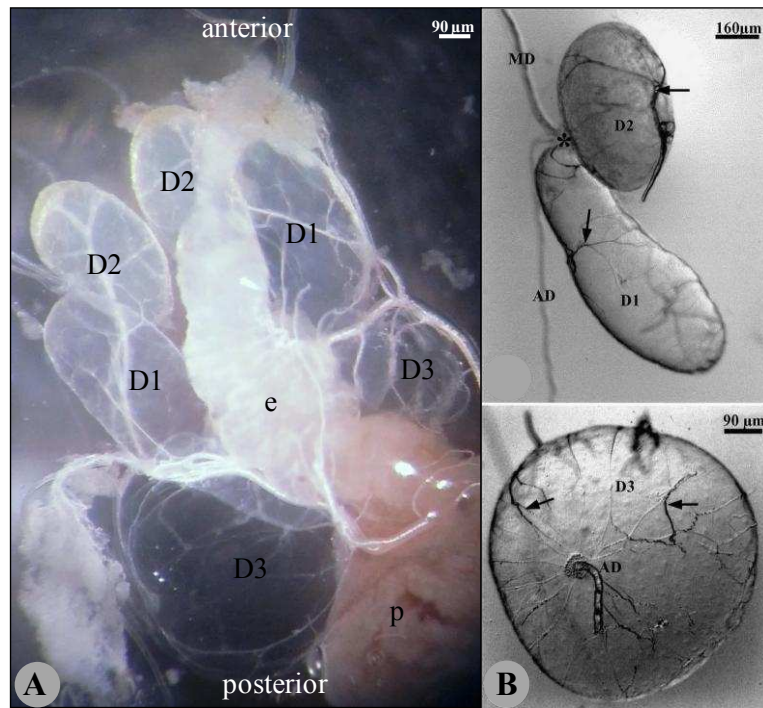


Figura 1.5: Glándulas salivales de larvas de 5° estadio de *T. infestans*. En A) se observa lo extraído durante la disección: un par de glándulas salivales, cada una formada por 3 unidades, a cada lado del sistema digestivo. En B) se observan detalles de las glándulas (tomado de Reis *et al.*, 2003, utilizado como referencia). *D1*, *D2* y *D3* indican las unidades de cada glándula; *e*: esófago, *p*: promesenteron, *MD* y *AD*: ductos principal y accesorio, respectivamente. Las flechas indican el sistema traqueal.

-Instrumentos analíticos

✓ *Cromatografía gaseosa (GC)*

Se utilizó un cromatógrafo gaseoso (HP 5890 Series II) equipado con un inyector *split/splitless* y una columna capilar polar (DB-WAX, 30 m x 0.25 mm diám. int., 0.25 μm de espesor de película de fase estacionaria). Se utilizó hidrógeno (H₂) como gas portador (carrier) (1 ml/min), el inyector en modo *splitless* a 220 °C, y un detector FID (Flame Injector Detector) a 250 °C. El programa de temperatura del horno fue 40 °C durante un minuto para luego calentar hasta 280 °C a 7 °C/min. Por último, se mantuvo la temperatura a 280°C durante un minuto.

✓ *Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)*

Se utilizó un GC-MS Shimadzu-QP2010, equipado con una columna apolar de tipo DB5 (25 m x 0.25 mm diám. int., 0.25 μm de espesor de película de fase estacionaria), utilizando helio (He) como gas portador (1 ml/min), el inyector en modo *splitless* a 250 °C, y la línea de transferencia a 250 °C. El programa de temperatura del horno fue

40 °C durante un minuto para luego calentar hasta 280 °C a 7 °C/min. Por último, se mantuvo la temperatura final durante un minuto. El espectrómetro de masas se operó en modo EI (Electronic Impact) a 70 eV, con la fuente de iones a 200 °C, y con adquisición en modo SCAN desde m/z 30 a m/z 350.

✓ ***Espectrometría de masas (MS) por inyección directa***

Se utilizó un equipo Shimadzu QP-2010-Ultra equipado con un puerto de inyección directa (ID). El espectrómetro de masas se operó en modo EI a 70 eV, con la fuente de iones a 200 °C, y con adquisición en modo SCAN desde m/z 28 a m/z 600. La muestra se colectó en un capilar de vidrio que se dispone en el puerto de ID, el cual se calentó desde 30 °C a 350 °C a 40 °C/min.

Resultados

-Headspace de larvas

Se realizaron muestreos y análisis en tres instancias, diciembre 2011, agosto 2012 y diciembre 2013. En una primera serie de muestras, cuatro de cinco pares de extractos de volátiles del *headspace* de larvas (perturbadas y no perturbadas) mostraron algunos compuestos diferenciales en tiempos de retención entre 9 y 10,5 min. Estas muestras correspondieron a larvas de 5º (3 muestras) y 4º estadio (1 muestra): entre 10 y 20 larvas por muestra. Los compuestos aparecieron en muy baja cantidad, apenas detectable y como picos de forma irregular (**figura 1.6A**). Los espectros de masas de estos compuestos fueron similares en todos los casos, con iones característicos de m/z 97, 69, 57, 55 y 41 (**figura 1.6B**). En el caso del ion m/z 57 es posible que provenga de otro compuesto, ya que el mismo ion está presente en muestras de larvas no perturbadas (**figura 1.6C**). La baja cantidad de los compuestos no permitió lograr una identificación, aunque el ion de m/z 97 es consistente con un fragmento conteniendo una cetona α,β -insaturada, de seis átomos de carbono, fragmento que con la subsecuente pérdida de 28 unidades de masa ($C=O$), daría lugar al ion m/z 69. Este tipo de sistema (cetona α,β -insaturada) en moléculas volátiles de bajo peso molecular, resulta en compuestos extremadamente olorosos para el olfato humano, aún en cantidades muy pequeñas y está presente en varias secreciones defensivas de artrópodos, por ejemplo opiliones (Hara *et al.*, 2005). Estos compuestos, sin embargo, no fueron detectados en muestras posteriores.

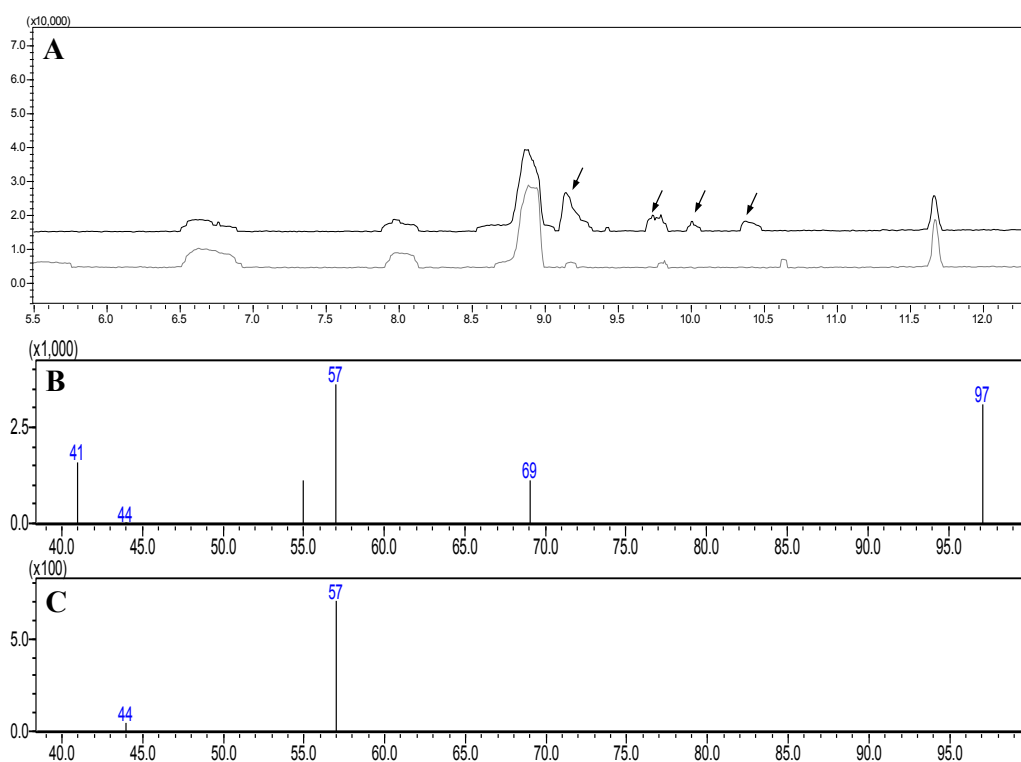


Figura 1.6: A) Comparación de cromatogramas (TIC) de extractos de volátiles del *headspace* de larvas de *T. infestans* de 5^o estadio una vez perturbadas (línea negra, superior) y antes de la perturbación (línea gris, inferior). Se indican con flechas los compuestos diferentes en los extractos. B) Espectro de masas de uno de los compuestos diferentes (Tiempo de Retención: 9,13 min) en el extracto de larvas perturbadas. C) Espectro de masas de la misma región del cromatograma (9,13 min) para el extracto del *headspace* de larvas sin perturbar.

En las muestras de *headspace* de larvas obtenidas y analizadas en agosto de 2012 no se lograron detectar diferencias entre volátiles en larvas antes y después de una perturbación. Sin embargo, en diciembre de 2013 se colectó una única muestra a partir de una cantidad mayor de larvas (100) y se la analizó de igual forma que las anteriores, resultando en este caso un compuesto interesante cuyo espectro de masas coincidió con el correspondiente a 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona en la base de datos NIST08 (**figura 1.7**). Por su estructura, que guarda similitudes con algunos compuestos de la secreción defensiva de adultos, este compuesto aparece como un candidato a ser el producto de la secreción de alarma de las larvas. Sin embargo, no se realizó en esta instancia un control adecuado y la presencia de una cantidad importante de acetona (**figura 1.7A**) en el *headspace* de estas larvas, lleva a tomar este resultado con cautela. La 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona puede ser un compuesto natural, pero también puede ser el producto de la condensación aldólica de dos moléculas de acetona, o una impureza en la propia acetona. Este solvente es de uso común en el lavado de material de vidrio y había sido utilizado en esta instancia previa al muestreo

de las larvas. La emisión de 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona por parte de las larvas de *T. infestans* como resultado de un evento de perturbación requiere por lo tanto confirmación experimental.

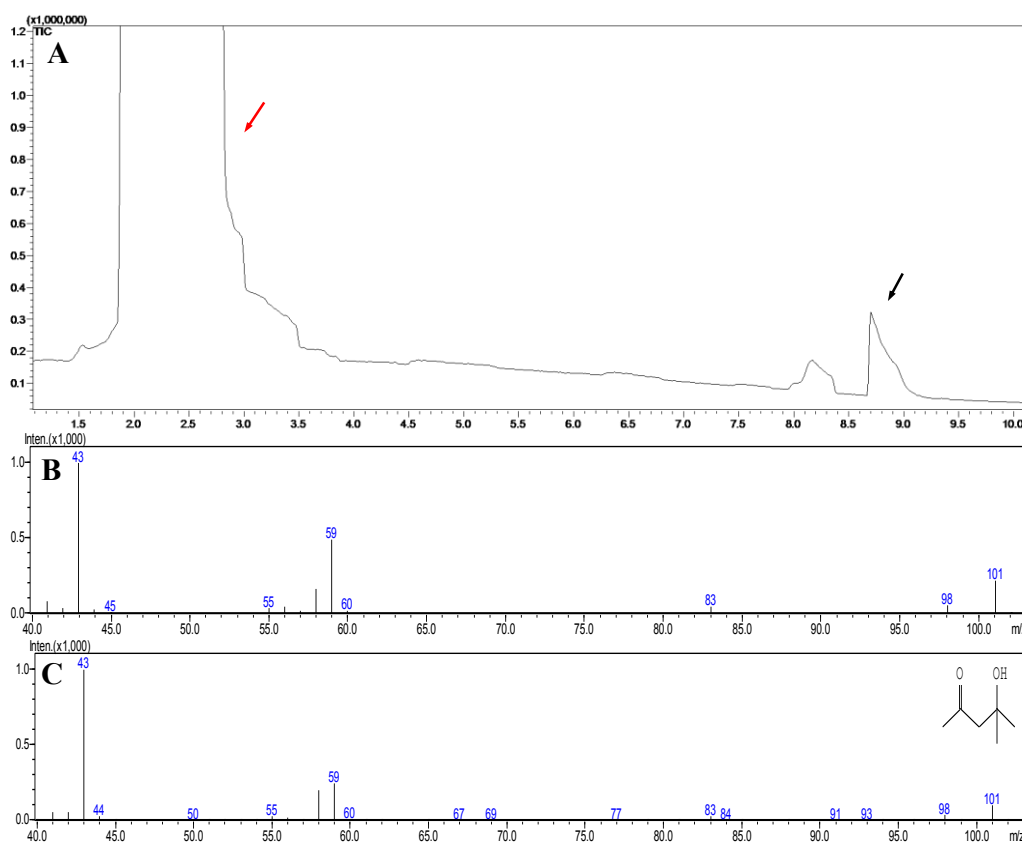


Figura 1.7: A) Cromatograma (TIC) del extracto de volátiles del *headspace* de 100 larvas de *T. infestans* de 5^{to} estadio, una vez perturbadas. Se indican con flechas el compuesto tentativamente identificado como 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona (flecha negra), y el pico correspondiente a la acetona (flecha roja, ver texto). B) Espectro de masas del compuesto 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona en la muestra. C) Espectro de masas de la 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona según base de datos (índice de similitud 95%).

-Regurgitado

El análisis del regurgitado por SMPE/GC-MS de compuestos volátiles del *headspace* del mismo no mostró diferencias claras con el blanco de fibra realizado inmediatamente antes del muestreo del regurgitado. Al analizar el regurgitado por contacto directo de la fibra con el mismo, se observó en dos muestras de las cuatro réplicas realizadas (4^o y 5^o estadio), un compuesto con espectro de masas similar al 2-metil-1-butanol, uno de los componentes de la secreción de alarma y defensiva de adultos (Manrique *et al.*, 2006) (**figura 1.8**). La identificación de este compuesto se confirmó adsorbiendo en la fibra de SPME el estándar correspondiente, desde el *headspace* de una solución de diclorometano. Los tiempos de retención y espectros de

masas de los compuestos natural y sintético coincidieron, indicando la presencia de 2-metil-1-butanol en el regurgitado.

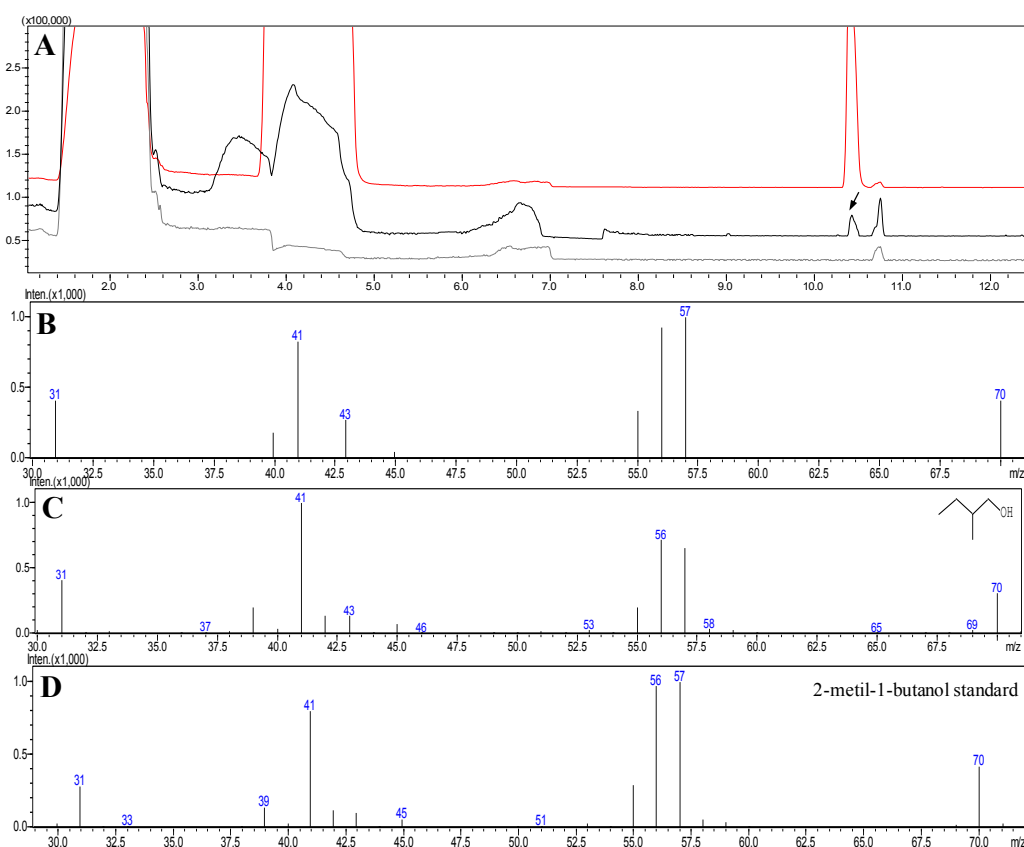


Figura 1.8: A) Comparación de cromatogramas (TIC) del regurgitado emitido tras la perturbación de una larva de 5^{to} estadio de *T. infestans*, adsorbido en una fibra de SPME por contacto directo con la fibra (línea negra, medio), el blanco de fibra correspondiente (línea gris, inferior), y el estándar de 2-metil-1-butanol adsorbido desde el *headspace* de una solución en diclorometano (línea roja, superior). Se indica el compuesto identificado como 2-metil-1-butanol en la muestra del regurgitado (flecha negra). B) Espectro de masas de 2-metil-1-butanol en la muestra de regurgitado. C) Espectro de masas de 2-metil-1-butanol según base de datos NIST08 (índice de similitud 90%). D) Espectro de masas de 2-metil-1-butanol estándar, adquirido en iguales condiciones que la muestra.

Por otro lado, al analizar el regurgitado por espectrometría de masas por inyección directa, se observaron diferencias entre la corrida preliminar del equipo que actuó como blanco o control, y la muestra del regurgitado. Específicamente la muestra de regurgitado mostró un pico ancho, que al no haber cromatografía previa, no puede asignarse a un compuesto sino a la mezcla que compone el regurgitado. En este pico se observó un ion dominante de m/z 84, el cual no puede asignarse a un compuesto específico observado anteriormente, pero que se ha observado en varias muestras de volátiles analizadas previamente. Se observó asimismo un ion m/z 70, el cual es característico del espectro de masas de 2-metil-1-butanol (PM 88), por la pérdida de una molécula de agua (18 unidades de masa) típica de alcoholes primarios.

En cuanto a las derivatizaciones con fenilhidracina, los compuestos sintéticos estándares de 2-butanona y 3-pentanona dieron como producto las fenilhidrazonas correspondientes, las que fueron claramente identificadas en el GC-MS a tiempos de retención de 22,6 y 23,9 min, por sus iones moleculares m/z 162 y m/z 176, respectivamente. La derivatización de la muestra de regurgitado sin embargo no mostró resultados claros.

-Glándulas Salivales

El extracto obtenido de glándulas salivales de un individuo del 5° estadio mostró por GC-MS una serie de compuestos, con *N,N*-dimetil formamida y benzaldehído como los más abundantes. Estos compuestos fueron identificados de la base de datos de espectros de masas (NIST08), con buenos índices de similitud entre los espectros. Dado que este tipo de compuestos o derivados similares no habían sido detectados en todos los muestreos anteriores, se asume que provienen de contaminación del extracto, durante el proceso de disección o extracción de las glándulas.

Discusión

De acuerdo a la bibliografía, no existen trabajos previos que reporten presencia de glándulas exocrinas en larvas de *T. infestans*, como así tampoco trabajos acerca de secreciones liberadas por los estadios inmaduros de esta especie que podrían actuar como feromonas de alarma o alomonas de defensa durante un evento de perturbación. Tanto la ausencia de secreciones liberadas en un contexto de peligro como la falta de glándulas exocrinas en estadios inmaduros parecería ocurrir en las especies de triatomos (Schofield y Upton, 1978; Lent y Wygodzinsky, 1979). Por otro lado, las glándulas de Brindley y las metasternales sólo se encuentran en adultos y según varios trabajos citados anteriormente, los compuestos volátiles producidos por ambos tipos de glándulas, estarían involucrados en la comunicación sexual y/o de alarma y/o defensa (Manrique y Lorenzo, 2012). Dado este escenario, es complejo entender en términos adaptativos, que las larvas puedan responder a la feromona de alarma liberada por los adultos durante un evento de perturbación, pero no producir una feromona de alarma para alertar a sus conespecíficos de un potencial peligro (Lazzari *et al.*, 2013). Más aún, teniendo en cuenta que, según la literatura, en muchas especies de Hemiptera mientras que los adultos presentan glándulas metasternales y/o glándulas dermales abdominales cuyos volátiles liberados presentan funciones sexuales y/o de alarma y/o defensa, los estadios inmaduros presentan glándulas dermales abdominales involucradas en funciones de alarma y/o de defensa (Staddon, 1979).

En este capítulo de la tesis se demostró en ensayos comportamentales que las larvas de 4^{to} estadio de *T. infestans* mostraron una respuesta de escape cuando se las estimuló con volátiles provenientes de larvas perturbadas del 5^{to} estadio. Si bien no se obtuvieron respuestas significativamente diferentes del azar, se observó una tendencia hacia una respuesta de escape similar cuando las larvas fueron estimuladas con larvas perturbadas de 3^{er} y 4^{to} estadio. En estos últimos tratamientos, la falta de respuestas diferentes del azar, pero con cierta tendencia al escape, podría deberse a tres factores combinados: el tamaño de los insectos (larvas 3 < larvas 4 < larvas 5), el tamaño del frasco portador de estímulo y el equilibrio de los volátiles en difusión, siendo más difícil estimular a la larva puesta a prueba en la arena experimental y por lo tanto, necesario un mayor número de insectos. Esto último, bajo el supuesto de que la cantidad de secreción liberada es proporcional al tamaño de las larvas.

Entonces, del mismo modo que en el estadio adulto, las larvas de *T. infestans* parecerían liberar algún tipo de secreción en respuesta a una perturbación mecánica. Este olor liberado, si bien no es tan intenso y evidente para el olfato humano como lo es el olor liberado por los adultos de la especie, puede ser reconocido fácilmente cuando varias larvas conjuntamente son perturbadas.

Se realizaron diversas técnicas de extracción y análisis químico con el objetivo de identificar la secreción volátil que las larvas de *T. infestans* emiten en un evento de perturbación; ya que, las evidencias comportamentales presentadas en este capítulo, sumadas a nuestra propia percepción olfativa al manipular los insectos, indicarían la presencia de tal secreción. Sin embargo, los diversos esfuerzos por caracterizar químicamente la secreción y su origen en el insecto, no resultaron en datos claros que permitan concluir una posible composición de la misma.

En diferentes etapas del trabajo se detectaron diferencias en los análisis de muestras provenientes de larvas perturbadas y sus controles. La presencia del 2-metil-1-butanol es sin dudas la más clara, y el hecho de que este compuesto forme parte de la secreción de alarma de los adultos (Manrique *et al.*, 2006) apoya el resultado obtenido, ya que claramente existe la capacidad biosintética en el insecto para producir este compuesto. Sin embargo, en otras instancias se detectaron otro tipo de compuestos, los que no pudieron ser identificados, o su identificación presenta dudas por aspectos metodológicos. La presencia de 4-metil-4-hidroxi-2-pentanona es posible, pero debe ser verificada con los controles adecuados, evitando el contacto del material de vidrio con acetona y comparando los resultados analíticos con una solución del compuesto sintético, ya que éste es comercialmente asequible. El compuesto sintético podría, asimismo, utilizarse en bioensayos de olfatometría, de manera de analizar comportamentalmente la respuesta evocada en las larvas frente a distintas dosis de este compuesto. Este compuesto químico, el 4-metil-4-hidroxi-2-pentanona, ha sido reportado por Hefetz y Lloyd (1983) como parte de la feromona de alarma liberada por las glándulas anales de la hormiga *Tapinoma simrothi pheonicium*.

Por otro lado, bioensayos como los presentados en la primera parte de este capítulo también podrían realizarse para determinar el origen anatómico de esta señal química, utilizando como estímulos el regurgitado recolectado ante un evento de perturbación, o extractos de las glándulas salivales disecadas. Si bien, parece poco

parsimonioso el hecho de sugerir a las glándulas salivales como la fuente de dicha secreción; existen trabajos en otros insectos que muestran que dichas glándulas emiten su contenido luego de ser atacados (Blum, 1981). Además, los soldados de algunas termitas (Termitidae) tienen sus glándulas mandibulares modificadas para defensa (Chapman, 1998) o emiten una secreción liberada desde la glándula frontal que junto con la saliva tiene función defensiva y de feromona de alarma (Moore, 1968; Bordereau *et al.*, 1997). Por otro lado, en hormigas (Chapman, 1998) y en obreras de abejas meliponinas (Schorkopf *et al.*, 2009), las glándulas mandibulares son secretoras de feromona de alarma. En *T.infestans*, existen distintos trabajos que analizan las glándulas salivales (Reis *et al.*, 2003), las células de las glándulas salivales (Anhê y Azeredo-Oliveira, 2008) y el sialoma, *i.e.*, el conjunto de proteínas y enzimas existentes en las glándulas salivales (Ribeiro *et al.*, 2012), siempre desde el análisis de la hematofagia y los mecanismos involucrados para contrarrestar los sistemas inmunológicos, inflamatorios y hemostáticos impuestos por el hospedador. Sin embargo, no existen trabajos en los que se ha tomado en cuenta a las glándulas salivales de triatomíneos como posible fuente de volátiles químicos involucrados en la comunicación intra o interespecífica.

Las técnicas analíticas utilizadas son extremadamente sensibles, produciendo resultados claros en una escala de nanogramos. Sin embargo, en todos los estudios realizados en este trabajo, los compuestos relevantes encontrados aparecieron en cantidades muy pequeñas, apenas detectables. Es posible entonces concluir que la secreción es biológicamente activa y perceptible por el olfato humano, pero que está compuesta por compuestos volátiles en cantidades menores que en los adultos, o por compuestos lábiles que se descomponen en las condiciones de muestreo/análisis utilizadas. No obstante, a pesar de no haber podido identificar el/los compuestos químico/s involucrado/s, en este trabajo de Tesis se evidenció por primera vez la existencia de algún tipo de señal química liberada por las larvas de *T.infestans* perturbadas, que evoca una respuesta de escape en sus conoespecíficos, sugiriendo la existencia de una feromona de alarma larval.

Apéndice I: Técnicas y análisis químicos

Existen distintos métodos que permiten la recolección de compuestos volátiles liberados por las plantas o animales para su posterior análisis e identificación. Este procedimiento es esencial para el estudio de feromonas y otros semioquímicos que pueden ser responsables de procesos de defensa o de comunicación entre organismos. Al ser generalmente compuestos volátiles, los semioquímicos suelen ser analizados por cromatografía gaseosa (GC) acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), lo que permite una separación e identificación de los mismos, así como un análisis cuantitativo (Millar y Haynes, 1998).

Para la recolección de volátiles emitidos desde glándulas exocrinas se han implementado distintas técnicas tales como la disección y extracción de las glándulas (Rossini *et al.*, 1997; Durak y Kalender, 2007; Durak, 2008; Schorkopf *et al.*, 2009), la inmersión de las exuvias en solvente de polaridad adecuada (Aldrich *et al.*, 1991; Borges y Aldrich, 1992; Feldlaufer *et al.*, 2010), la utilización de filtros/trampas para la adsorción en sistemas de aireación dinámica, tales como Porapak Q, Super Q o Tenax GR (Fontán *et al.*, 2002; Wyatt, 2003; Zarbin *et al.*, 2003; Bonacci *et al.*, 2011; Liedtke *et al.*, 2011), la microextracción en fase sólida (SPME, Solid Phase Microextraction) (Manrique *et al.*, 2006; González Audino *et al.*, 2007) o la utilización de capilares de vidrio para la obtención de una secreción líquida (Ho y Millar, 2001; Eisner *et al.*, 2004). Entre estas técnicas de muestreo y análisis, el SPME y el análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas fueron las más utilizadas en este estudio, por lo que se describen a continuación en forma general.

-SPME (Solid Phase Microextraction)

La técnica de SPME se basa en el uso de una fibra cubierta con un absorbente que puede extraer compuestos orgánicos volátiles de una matriz líquida o sólida, o de una de mezcla en fase gaseosa (Millar y Haynes, 1998; Jones y Oldham, 1999). Brevemente, la fibra consiste en una varilla de vidrio recubierta por el material adsorbente, el cual varía según el tipo de compuesto de interés, en particular su polaridad. La fibra se encuentra protegida dentro de una aguja hueca de acero inoxidable, la cual, a su vez, se encuentra contenida en el extremo de un dispositivo

tipo jeringa (**figura I.1A**). Al presionar el émbolo del dispositivo, la fibra sale de la aguja para ser expuesta a la matriz que se quiere estudiar. Si esta matriz es sólida, suele rasparse la superficie con la fibra; si es líquida se introduce en el líquido por un tiempo determinado, y si es gaseosa (aire por ejemplo) simplemente se expone en contacto con la fase gaseosa. La adsorción resulta de un equilibrio en el cual los compuestos de interés se reparten entre la fibra y la matriz, de modo que esta técnica se utiliza en forma estática; esto es, si se pretende obtener compuestos orgánicos volátiles del aire, se utiliza un sistema cerrado para favorecer el establecimiento de dicho equilibrio. El término *headspace* suele utilizarse en este contexto, ya que la técnica de SPME es frecuentemente utilizada para obtener compuestos volátiles liberados al aire por un organismo vivo u otro tipo de matriz, pero sin contactar el organismo, sino el aire que lo rodea.

Una vez realizada la adsorción de los compuestos, la cual puede optimizarse por el tipo de fibra, el tiempo de exposición, y la temperatura de trabajo, se retrae el émbolo y la fibra se introduce nuevamente en la aguja, quedando así protegida e impidiendo la desorción espontánea de los compuestos extraídos (analitos). Posteriormente, los analitos son desorbidos térmicamente al exponer la fibra al calor del inyector de un cromatógrafo de gases (GC) para su posterior separación cromatográfica y análisis (**figura I.1B**).

Esta técnica posee ventajas interesantes; es rápida y simple, y las muestras se encuentran libres de solvente, de manera tal que al ser inyectadas en un GC, los compuestos más volátiles no son enmascarados por el solvente, el cual además puede aportar impurezas. En cuanto al trabajo con secreciones de insectos, esta técnica no es destructiva o invasiva, por lo que permite repetir el muestreo con un mismo insecto sin ocasionarle daño. Este método de extracción combinado con el acoplamiento: cromatografía de gases-electroantenografía (GC-EAG) se ha convertido en una herramienta muy útil para el análisis e identificación de compuestos activos sobre los receptores antenales de los insectos (ver Capítulo 3).

Presenta asimismo algunas desventajas, principalmente la dificultad de obtener resultados cuantitativos reproducibles, la adsorción diferencial de volátiles determinada por diferentes afinidades por la fase sólida adsorbente, y la imposibilidad

de repetir análisis cromatográficos sobre una misma muestra (Lord y Pawlisyn, 1998; Millar y Haynes, 1998).

La primera descripción del uso de SPME para el análisis de feromonas data del año 1995 (Malosse *et al.*, 1995), y consistió en analizar la emisión de volátiles del gorgojo de la caña de azúcar *Metamasius hemipterus* (Coleoptera: Curculionidae). Actualmente, en la literatura se encuentra una vasta diversidad de trabajos que emplean esta técnica para el análisis de semioquímicos relacionados con insectos (Robacker y Bartelt, 1996; Mozuraitis *et al.*, 1996; Rochat *et al.*, 2000; Augusto y Pires Valente, 2002; Bordereau *et al.*, 2002; Levi-Zada *et al.*, 2013).

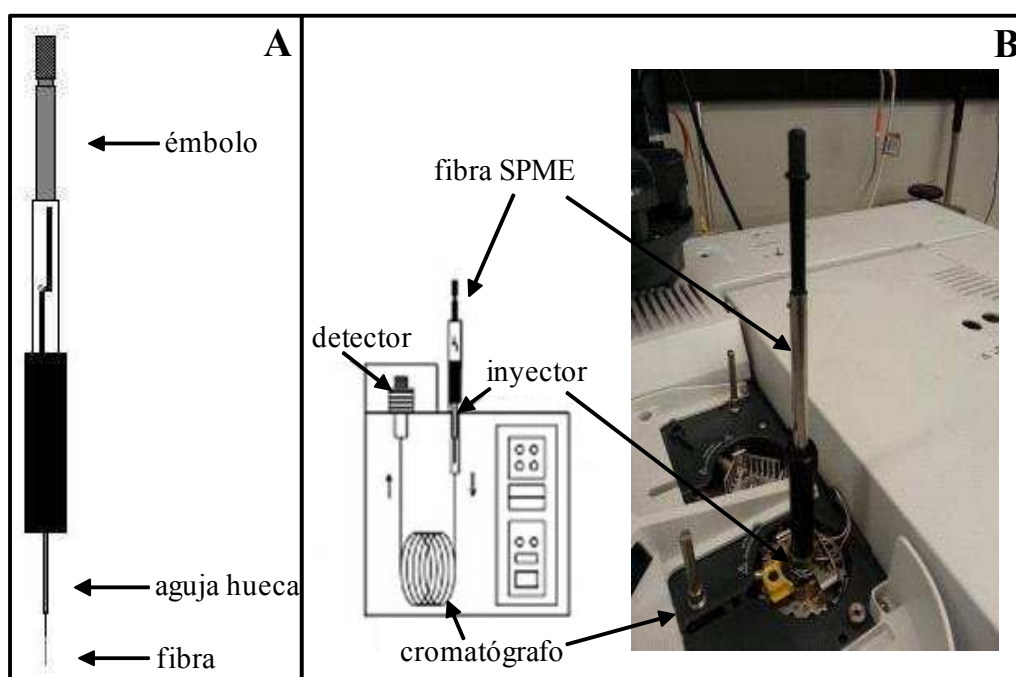


Figura I.1: Técnica SPME (micro-extracción en fase sólida). En A) se muestra un esquema de la fibra en el interior del soporte. En B) se muestra el momento de la desorción (inyección) en el cromatógrafo de gases.

-Cromatografía gaseosa (GC)

Existen reportes de separaciones rudimentarias realizadas por GC que datan de los años '40; sin embargo, fue en la década siguiente que las limitaciones instrumentales fueron resueltas para convertirse en una técnica útil que revolucionó el análisis de compuestos orgánicos volátiles (Willett, 1987).

La cromatografía es un conjunto de técnicas para separar sustancias químicas en una mezcla. En general, un sistema cromatográfico consta de una fase móvil y de una fase estacionaria que separan los componentes de una mezcla por una afinidad

diferencial de cada compuesto hacia una o ambas fases. En un cromatógrafo de gases, la fase móvil es un gas inerte (helio, nitrógeno o hidrógeno), que simplemente arrastra (gas portador o *carrier*) los compuestos cuando éstos no están adsorbidos en la fase estacionaria. Esta adsorción es diferencial y depende de las características químicas de cada compuesto y de la temperatura (**figura I.2**). La muestra (mezcla) es inyectada, ya sea mediante una jeringa o una fibra SPME, y se volatiliza en el inyector. La fase estacionaria, de diversa composición química, se encuentra en un tubo de acero o vidrio (columna), de longitud y espesor variable, como un sólido o como una delgada película en las paredes interiores del tubo. Los componentes de la muestra se mueven a distintas velocidades influenciadas por el grado de interacción de cada componente con la fase estacionaria de la columna, eluyendo así en el extremo de la columna a distintos tiempos desde la inyección, referidos como tiempos de retención. Las sustancias que tengan una interacción más favorable con la fase estacionaria tardarán más en salir de la columna; es decir, presentarán tiempos de retención mayores.

La columna se encuentra en el interior de un horno, que permite programar la temperatura con etapas isotermas y rampas de aumento de temperatura, permitiendo así una separación de componentes más eficiente de acuerdo a la naturaleza química de los compuestos de interés. A medida que las sustancias son eluidas a la salida de la columna, las mismas deben ser detectadas por diversos sistemas de detección que pueden presentar distinto grado de sensibilidad o especificidad. Finalmente, se obtiene como resultado un cromatograma que muestra distintos picos, es decir, un aumento en la respuesta del detector, en relación al tiempo (**figura I.2**).

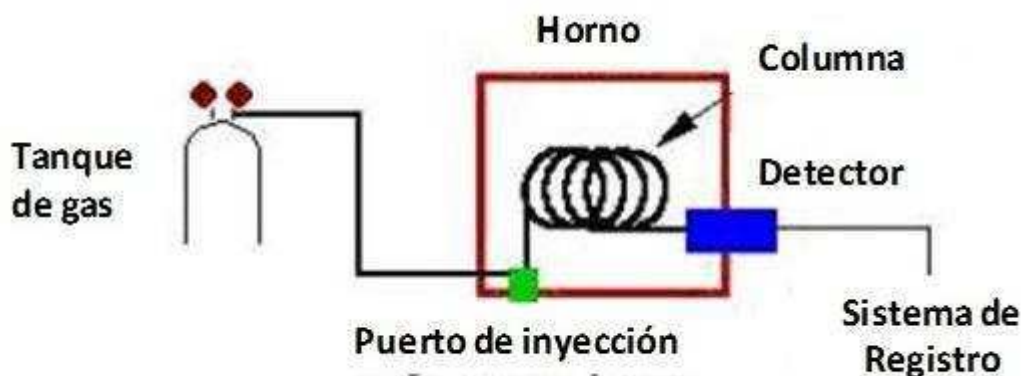


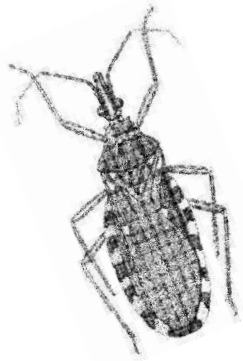
Figura 1.2: Esquema de un Cromatógrafo de Gases (GC) utilizado para el análisis de volátiles.

La columna es un componente esencial de un GC, y existen decenas de tipos de columna que varían principalmente en el material que compone la fase estacionaria, el espesor de la fase estacionaria, el diámetro interno y la longitud de la columna. El detector es otro elemento importante y existen distintos tipos que pueden dividirse en universales y específicos. Los primeros ofrecen la ventaja de responder prácticamente ante cualquier compuesto orgánico volátil y termoestable. Sin embargo, esta misma propiedad puede convertirse en un inconveniente cuando se trata de un análisis de mezclas muy complejas. Para este caso, la utilización de detectores específicos resulta ventajosa, ya que al responder únicamente frente a un grupo limitado de compuestos, los cromatogramas que ofrecen resultan ser mucho más simples. La utilización de uno u otro depende de conocer previamente, o no, el tipo de compuesto de interés en el estudio. Uno de los detectores más ampliamente utilizado en cromatografía gaseosa es el detector de ionización por llama (FID). Este tipo de detector es de respuesta universal, ya que responde a compuestos con enlaces C-H, por la combustión de los mismos en una llama. En el otro extremo, un tipo de detector muy específico y ampliamente utilizado en el estudio de semioquímicos en insectos es el detector de electroantenograma (EAG), el cual se utiliza acoplado a un cromatógrafo de gases (GC-EAD) para registrar la respuesta sensorial periférica de un insecto, generalmente basada en sus antenas, a compuestos volátiles para los que posee receptores específicos (ver Capítulo 3).

-Cromatografía gaseosa (GC)- Espectrometría de masas (MS)

Las técnicas de cromatografía ofrecen enormes posibilidades para la separación de mezclas, pero no para la identificación química de sus componentes, ya que la información cualitativa que proporcionan, por ejemplo los tiempos de retención, no pueden ser utilizados como criterio, al menos único, para la identificación de compuestos. El acoplamiento entre un cromatógrafo de gases y un espectrómetro de masas es, probablemente, la técnica combinada de separación/identificación de más amplia utilización, ya que combina la capacidad separativa del cromatógrafo con una técnica que aporta información estructural de los compuestos. Cuando se trabaja con este sistema acoplado, la identificación se basa generalmente en utilizar el espectro de masas de cada compuesto a modo de “huella dactilar”, comparando los espectros de

masa obtenidos con espectros en bases de datos informatizadas que incluyen miles de compuestos. La obtención del espectro de masas depende de un factor fundamental que es la ionización de cada compuesto, es decir, transformar un compuesto eléctricamente neutro en un ion positivo o negativo, el cual puede trasladarse de forma controlada en un sistema de alto vacío, mediante campos electromagnéticos. Existen diversas técnicas de ionización disponibles, las cuales se conocen por siglas que las describen, como EI (*electron impact*) o ES (*electospray*).



Capítulo 2:

“Dinámica de llenado de las glándulas de Brindley de adultos de Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae)”

Introducción

Las glándulas de Brindley, presentes en los adultos de la subfamilia Triatominae, se encuentran ubicadas dorsalmente, extendiéndose hacia la porción lateral del segundo segmento abdominal con su orificio de salida localizado en el epímero metatorácico (Brindley, 1930; Kälin y Barrett, 1975; Staddon, 1979) (ver Figuras 2 y 3 de la Introducción General).

El desarrollo de las glándulas de Brindley ocurre durante el último estadio larval (5^{to} estadio) y aparentemente finaliza justo antes de la ecdisis del imago (Millen *et al.*, 1979). Estas glándulas son descargadas luego de una perturbación mecánica y suelen estar asociadas con funciones de alarma y defensa (Schofield, 1979; Ward, 1981; Cruz López *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 2002; Manrique *et al.*, 2006). Particularmente, cuando los adultos de *Triatoma infestans* son mecánicamente perturbados, las glándulas de Brindley emiten componentes volátiles (responsables de un olor repugnante fácilmente percibido por el olfato humano), los cuales se postula, funcionarían como defensa y/o feromona de alarma (Ward, 1981; Cruz López *et al.*, 1995; Manrique *et al.*, 2006; González-Audino *et al.*, 2007) ya que generan un comportamiento de escape en los estadios inmaduros de la especie (Manrique *et al.*, 2006).

En las últimas décadas se ha investigado tanto la composición química de la secreción de las glándulas de Brindley como la de los volátiles liberados por insectos perturbados. En *T. infestans*, la secreción de las glándulas de Brindley fue descrita como ácido isobutírico (Schofield, 1979), o como una mezcla compleja de compuestos volátiles con el ácido isobutírico (Hack *et al.*, 1980; Cruz López *et al.*, 1995; Guerenstein y Guerin, 2004) o el ácido acético (Juárez y Brenner, 1981) como componentes principales. Con respecto a la composición química de la mezcla emitida por adultos perturbados, en los primeros trabajos, sólo se detectaron ácidos grasos de cadena corta (Hack *et al.*, 1980; Juárez y Brenner, 1981) o ácido isobutírico, como el único componente ácido de la mezcla, junto con alcoholes y ésteres (Cruz López *et al.*, 1995; Guerenstein y Guerin, 2004). Sin embargo, Manrique *et al.* (2006) describieron que la mezcla de volátiles incluye tanto a ácidos grasos de cadena corta como a ésteres, alcoholes y componentes nuevos como por ejemplo cetonas. Cabe destacar que, en la mayoría de los trabajos sobre triatominos, el ácido isobutírico fue descrito

como el componente principal, tanto de la secreción de las glándulas de Brindley, como del espacio circundante (*headspace*) de adultos perturbados.

Mientras que la composición química y la función de las glándulas defensivas han sido estudiadas en profundidad en una gran cantidad de artrópodos (Davidson *et al.*, 1989; Dettner y Reissenweber, 1991; Attygalle *et al.*, 2004; Byers, 2006), la información referida a la dinámica de llenado de las glándulas exocrinas de secreciones defensivas es escasa (Carrel, 1984; Baldwin *et al.*, 1990; Whitman *et al.*, 1992; Rossini *et al.*, 1997). En particular, Jones *et al.* (1987) mostró en un estudio realizado sobre la langosta *Romalea guttata* (Orthoptera: Acrididae) que la alimentación tiene un efecto en la cantidad y en la calidad de la secreción defensiva liberada por esta especie generalista. El estudio de los factores que intervienen en la dinámica de llenado de las glándulas representa un componente importante para comprender la capacidad defensiva de un insecto en un entorno natural y permite una visión más amplia del valor adaptativo y el costo de la defensa química en insectos.

Particularmente en los triatomíneos, Kälin y Barrett (1975), basándose en estudios cualitativos mediante observación visual de la secreción y percepción olfativa del experimentador, sugirieron que *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) recupera la capacidad para una segunda liberación de los compuestos dentro de las cinco horas luego de una primera perturbación. Según lo observado por estos autores, cuando se realizó la perturbación diariamente, los adultos disminuyeron la respuesta de secreción en un 50% luego de 10 días. A su vez, estos autores no observaron ninguna diferencia en cuanto a la emisión de secreción entre insectos no alimentados durante 30-40 días y aquellos alimentados 1 o 2 días antes de la perturbación. Por otro lado, Reis Dos Santos-Mallet y De Souza (1990), en un estudio histológico en *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) observaron una variación en la forma, tamaño y aspecto de las glándulas de Brindley en insectos con diferente estado de ayuno post-ingesta.

De los antecedentes surge que en los triatomíneos la información existente, con respecto a la dinámica de llenado de las glándulas de Brindley y los factores que la afectan, es escasa y está basada en datos cualitativos. En este capítulo se realizó, inicialmente, una estimación cualitativa de la dinámica de llenado y vaciado de estas glándulas en *T. infestans*. En una segunda parte, se analizó la dinámica de llenado

mediante una evaluación cuantitativa de las glándulas de Brindley de esta especie a partir de la medición, con cromatografía gaseosa, de la masa de su componente principal, el ácido isobutírico, en insectos con distintos estados de desarrollo y condiciones de ayuno y de perturbación. Por último, se estudió comportamentalmente la respuesta de escape de las larvas frente a olores provenientes de adultos con distinto grado de llenado de las glándulas de Brindley.

Parte 1. Estimación cualitativa del estado de las glándulas de Brindley

Como ya fuera descrito por Kálin y Barrett (1975) para *R. prolixus*, la emisión de las secreciones de las glándulas de Brindley de *T. infestans*, luego de una perturbación mecánica de los adultos, puede observarse bajo una lupa binocular, e incluso a ojo desnudo. Paralelamente, a través del olfato humano es posible percibir la presencia del típico olor desagradable de dicha secreción. Si bien este es un método puramente cualitativo, nos permitió realizar una primera aproximación sobre la dinámica de llenado y vaciado de estas glándulas, que secretan la feromona de alarma, en función de la frecuencia de descarga y del estado nutricional de las vinchucas, para luego en la segunda parte de este capítulo, realizar un estudio cuantitativo más preciso.

Materiales y Métodos

-Animales

Los insectos utilizados en estos ensayos fueron obtenidos a partir de huevos de *T. infestans* obtenidos del Servicio Nacional de Chagas, Córdoba, Argentina y criados en el laboratorio a $28\pm 1^\circ\text{C}$, 30-60% HR, bajo un fotoperíodo de 12:12 horas Luz/Oscuridad. Todos los estadios fueron alimentados con gallinas vivas. Tanto las gallinas como los insectos fueron manipulados de acuerdo a las reglas de bioseguridad del Servicio de Higiene y Seguridad de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los adultos eran separados de la cría común del insectario, individualizados en un pequeño frasco con un papel de filtro como sustrato y tapas de malla de tul que permiten tanto una aireación continua como la alimentación de los insectos, cuando fuera necesario, y luego sometidos a distintos tratamientos según la serie experimental.

-Estimación cualitativa de la presencia de la feromona de alarma en glándulas de Brindley de adultos de T. infestans

Durante la manipulación periódica de los insectos en el laboratorio se observó que frente a una perturbación mecánica los adultos de *T. infestans* emiten cantidades diferentes de la secreción que contiene a la feromona de alarma. A partir de esta observación se consideró la hipótesis que postula que la capacidad de las glándulas de Brindley de liberar la feromona de alarma puede estar modulada por diversos factores

ambientales y/o fisiológicos. En primer lugar, un individuo que acaba de descargar el contenido de sus glándulas necesitaría de un tiempo determinado para conseguir cargarlas nuevamente, por lo que se realizaron ensayos con adultos perturbados una o más veces. Además, conjeturamos que el grado de ayuno que experimenta un adulto podría ser un factor relevante para la producción de los distintos componentes de la feromona de alarma, por lo que podríamos encontrar adultos ayunados incapaces de recargar sus glándulas inmediatamente luego de una perturbación, de manera tal de no poder liberar la secreción. De ser así, una alimentación debería promover la recarga de las glándulas recientemente vaciadas.

Del mismo modo que Kälín y Barrett (1975) en *R. prolixus*, se realizaron una serie de ensayos comportamentales sobre *T. infestans* adultos, hembras y machos, con diferente grado de ayuno (*i.e.*, alimentados o no) y distinta cantidad de eventos de perturbación. La manipulación de los insectos previa a los experimentos se realizó cuidadosamente, de manera tal de asegurarse que no hubiese descargas no deseadas de la feromona de alarma. Luego a partir de una perturbación mecánica controlada (*i.e.* realizada para generar que los individuos descarguen el contenido de las glándulas), donde las patas de cada individuo eran presionadas, de a una por vez, con una pinza entomológica durante 30 segundos bajo lupa (Leica Wild M3C 10X), el estado de las glándulas fue inferido y categorizado cualitativamente en 3 grupos: *llenas*, *parcialmente llenas* o *vacías*. Se consideró que las glándulas se encontraban *llenas*, previo a la perturbación, cuando la secreción fue observada en la superficie de evaporación cercana a los orificios de salida de las mismas (**figura 2.1**) y se percibió el olor de la feromona; *parcialmente llenas* cuando no fue observada la secreción pero se percibió el olor y *vacías* cuando ni la secreción ni el olor fueron observados o percibidos.



Figura 2.1: Vista lateral del tercer segmento torácico de un adulto de *T. infestans*. La flecha indica la posición del orificio de salida de la secreción liberada por la glándula de Brindley izquierda junto a la zona de evaporación, sitio donde se observó la secreción liberada cuando la glándula se encuentra llena, durante un evento de perturbación (Foto: Autor desconocido).

-Análisis de datos

Para los adultos no alimentados y alimentados, se determinó el porcentaje de insectos que presentaron sus glándulas llenas, parcialmente llenas o vacías en función del número de perturbaciones.

Se partió de un total de 88 adultos, los cuales fueron seguidos a lo largo del tiempo en el que recibieron una perturbación por semana. Este número fue variando a lo largo de las semanas debido a la muerte de los ejemplares o al descarte de insectos que no se alimentaban.

Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante un análisis de frecuencia (X^2 de independencia) para estudiar si el porcentaje de los distintos estados de las glándulas de adultos es independiente del número de perturbaciones.

Resultados

En una primera serie experimental se trabajó con un grupo de insectos adultos (machos y hembras) de una semana de edad post-ecdisis, no alimentados, que fueron manipulados cuidadosamente para evitar que descarguen sus glándulas antes del experimento. De ellos (N=88), 87% presentaron sus glándulas *llenas*, el 12% poseían sus glándulas *parcialmente llenas* y una mínima cantidad *vacías* (**figura 2.2**).

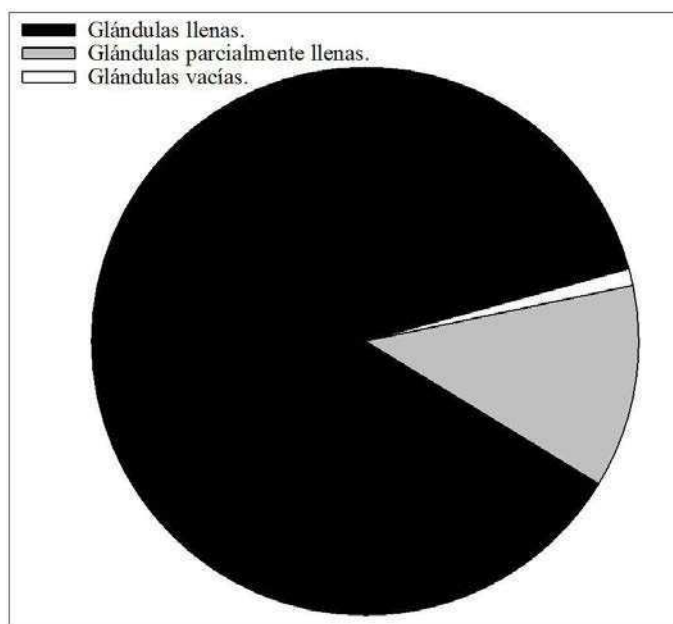


Figura 2.2: Porcentaje de adultos de *T. infestans* de 1 semana de vida adulta, no alimentados, que presentaron sus glándulas de Brindley llenas, parcialmente llenas o vacías. El 87% de los adultos presentaron sus glándulas llenas. (N=88).

Para analizar la dinámica de llenado de las glándulas de Brindley, perturbamos a los adultos de *T. infestans*, con una semana de edad, sin alimentar y nunca antes perturbados, una vez por semana durante 6 semanas, evaluando en cada evento la presencia de secreción y la percepción de olor, como se explicó anteriormente.

Observamos que a medida que aumentaba el número de eventos de perturbación, el porcentaje de adultos con sus glándulas llenas disminuyó significativamente y la proporción de insectos con las glándulas vacías aumentó ($X^2 = 213,69$, $p < 0,05$, **figura 2.3**), sugiriendo que si bien las vinchucas parecen ser capaces de recargar las glándulas, luego de varias perturbaciones es más difícil conseguirlo.

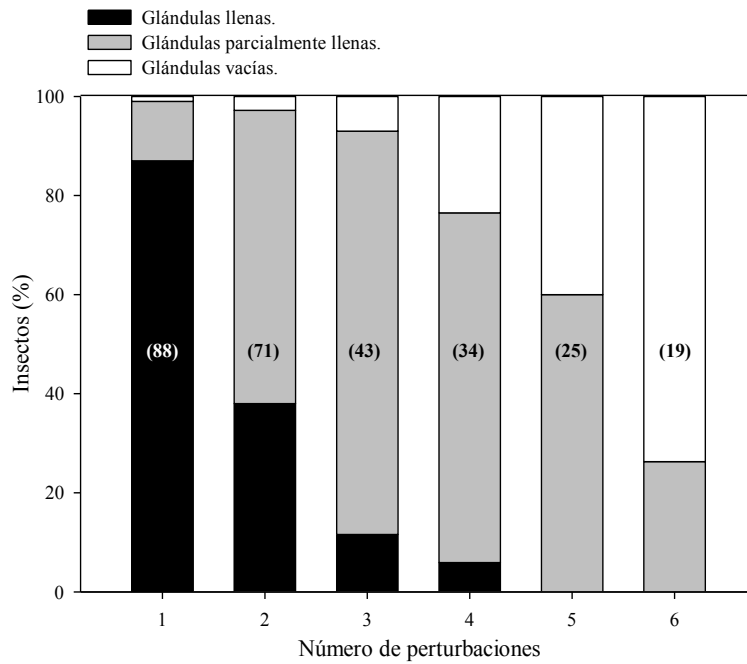


Figura 2.3: Porcentaje de adultos de *T. infestans* no alimentados, perturbados semanalmente, que presentaron sus glándulas de Brindley llenas, parcialmente llenas o vacías, en función del número de perturbaciones. A medida que aumentaba el número de eventos de perturbación, el porcentaje de adultos con sus glándulas llenas disminuyó y la proporción de insectos con las glándulas vacías aumentó ($\chi^2 = 213,69$, $p < 0,05$). Los números entre paréntesis indican el número total de insectos sobre los que se calculó el porcentaje para cada evento de perturbación.

Cuando se analizó el estado de las glándulas en aquellos adultos que fueron alimentados semanalmente luego de la respectiva perturbación, se observó que a medida que aumentaba el número de eventos de perturbación el porcentaje de adultos con sus glándulas llenas se mantuvo alto, por encima de 85% del total de adultos analizados ($\chi^2 = 2,41$, $p = 0,66$, **figura 2.4**). Esto sugiere que la alimentación cumple un papel en la recarga de las glándulas.

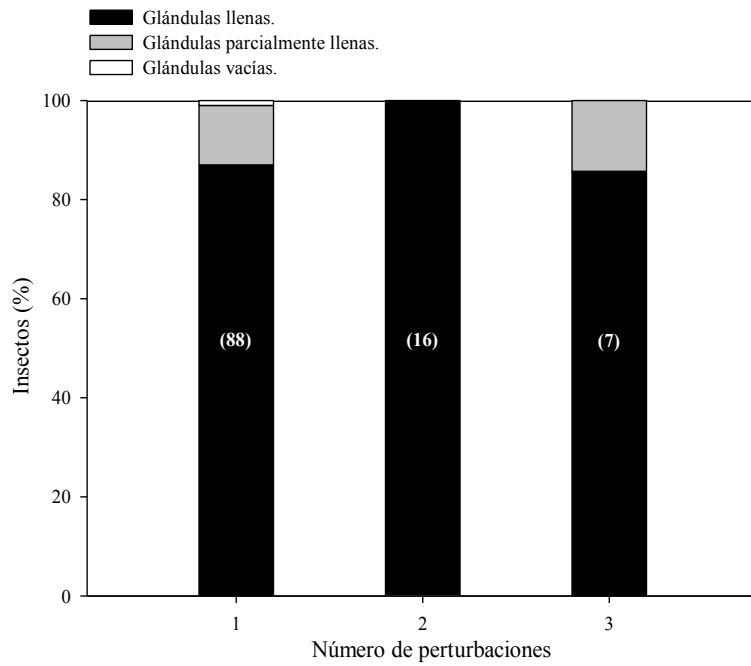


Figura 2.4: Porcentaje de adultos de *T. infestans* alimentados, perturbados semanalmente, que presentaron sus glándulas de Brindley llenas, parcialmente llenas o vacías, en función del número de perturbaciones. A medida que aumentaba el número de eventos de perturbación, el porcentaje de adultos con sus glándulas llenas se mantuvo alto ($\chi^2 = 2,41$, $p=0,66$). Los números entre paréntesis indican el número total de insectos sobre los que se calculó el porcentaje para cada evento de perturbación.

Parte 2. Estimación cuantitativa del contenido de las glándulas de Brindley

A partir de los resultados cualitativos previos y considerando que hasta el momento sólo existen trabajos experimentales que describen la composición química de las secreciones y que proponen la función de las glándulas exocrinas de los triatomíneos, en este capítulo se incorpora la aplicación de técnicas cuantitativas de química analítica para estudiar distintos factores involucrados en la dinámica de llenado de las glándulas de Brindley de los adultos de *T. infestans*.

Los trabajos previos describen la composición química e incluso la proporción relativa de cada compuesto presente en estas glándulas. El ácido isobutírico es claramente el componente mayoritario de las glándulas de Brindley de *T. infestans*. Por ello, se analizó la dinámica de llenado de estas glándulas, a partir de la cuantificación de la masa de dicho compuesto en insectos con distintos estados de desarrollo y condiciones de ayuno y perturbación. Es así que en esta sección, tomando en cuenta solamente al ácido isobutírico como un indicador cuantitativo del grado de llenado de las glándulas de Brindley, se estudió: 1) el estado de las glándulas de Brindley anterior y posteriormente a la ecdisis del imago; 2) el tiempo necesario para que los adultos recarguen sus glándulas luego de una perturbación mecánica; 3) el efecto de la perturbación repetida de adultos en la recarga de las glándulas y; 4) el efecto del estado nutricional de los adultos sobre la capacidad de recarga de dichas glándulas.

Materiales y Métodos

-Animales

Se utilizaron adultos de *T. infestans* criados en nuestro laboratorio bajo condiciones controladas (ver sección *-Animales* de la Parte I). Para estudiar el efecto del estado nutricional sobre la liberación de la feromona de alarma, algunos adultos fueron alimentados individualmente *ad libitum* sobre gallinas vivas, cuando lo requirió el tratamiento.

-Extracción de las glándulas

Los adultos de *T. infestans* fueron disecados, en distintos momentos dependiendo del tratamiento, y sus glándulas de Brindley fueron removidas intactas para la posterior cuantificación del contenido de ácido isobutírico. Para evitar que los individuos descarguen el contenido de las glándulas durante la manipulación y la disección, los insectos fueron previamente colocados durante 10 minutos a 10°C. Una vez anestesiados, se los mantuvo inmóviles en una caja de Petri mediante el uso de plastilina (Modeling Clay, Model, Buenos Aires, Argentina), dejando el tórax y el abdomen expuestos ventralmente. Las glándulas de Brindley fueron disecadas con una tijera de microcirugía bajo solución Ringer (Case, 1957). Se realizaron cortes laterales desde el 2° esternito abdominal hasta el tórax y un corte medio de lado a lado en el abdomen. Luego, la cutícula ventral fue removida, dejando expuestas las glándulas (**figura 2.5**), de manera tal de poder extraerlas para luego introducirlas en un vial (2 ml) con 0,5 ml de diclorometano (DCM) (Merck® Química, Argentina). Cada muestra fue inmediatamente guardada a -20° C durante no más de 48 horas para su posterior análisis químico.

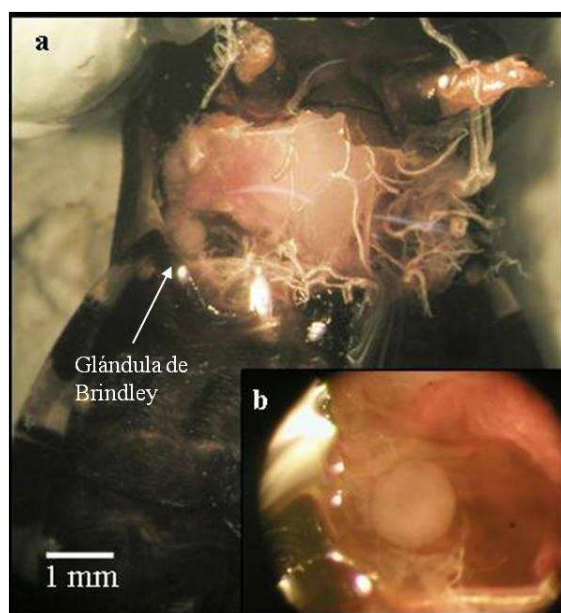


Figura 2.5: Disección de adultos de *T. infestans* para remover las glándulas de Brindley. a) Vista ventral del adulto, con esternitos removidos, se observa la glándula de Brindley derecha en el interior del tórax. b) Detalle de la glándula de Brindley.

Además de extraer las glándulas de los adultos, se realizaron disecciones de larvas de 5° estadio cercanas al momento de la ecdisis del imago. A diferencia de las

demás larvas de 5° estadio, estos individuos presentan en su interior un adulto farado, fácilmente reconocible, con su cutícula sin esclerotizar y con sus glándulas de Brindley totalmente desarrolladas (**figura 2.6**).

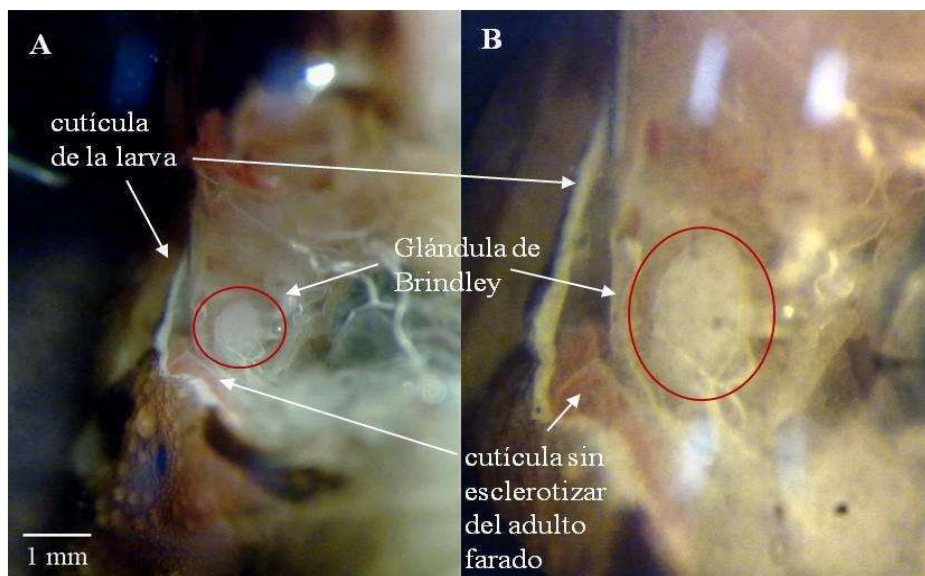


Figura 2.6: Disección de larvas de 5° estadio de *T. infestans*. A) En vista ventral, con patas y esternitos removidos. Se observa la cutícula del adulto farado en el interior de la larva de 5° estadio, con su glándula de Brindley derecha ya desarrollada. B) En detalle se observa la glándula de Brindley ya desarrollada en el interior del adulto farado con su cutícula aún sin esclerotizar, dentro de la cutícula de la larva de 5° estadio.

-Cromatografía gaseosa

El análisis cuantitativo es uno de los usos más importantes de la cromatografía gaseosa y se basa principalmente en la medición del área por debajo del pico de un compuesto determinado. La medición del área se realiza mediante programas de integración para luego cuantificarla a partir de una curva de calibración obtenida con un compuesto químico estándar sintético (Willett, 1987).

En este estudio, la cuantificación de la masa de ácido isobutírico se realizó en un cromatógrafo gaseoso (GC) (HP 5890 Series II) equipado con un inyector split/splitless y una columna capilar polar (DB WAX, 30 m x 0,25 mm diám. interno, 0,25 μ m de espesor de película). Se utilizó hidrógeno (H_2) (1 ml/min) como gas portador (*carrier*), el inyector sin divisor de flujo (modo *splitless*) a 220°C, para determinar mejor pequeñas cantidades o trazas, con un detector de ionización de llama (FID: *Flame Ionization Detector*) a 250°C. El programa de temperatura del horno de la columna fue 40°C durante 4 minutos y luego se elevó hasta 250°C a

7°C/min. Por último, se mantuvo la temperatura durante un minuto a 250°C. Estas condiciones cromatográficas fueron seleccionadas en base a la bibliografía previa, teniendo en cuenta la naturaleza química de los volátiles que componen la secreción producida por las glándulas de Brindley.

Para el análisis del contenido de ácido isobutírico, las glándulas extraídas fueron previamente tratadas con un sonicador (Branson® 200, Taiwan) durante 10 minutos. En este procedimiento se asume que la membrana del reservorio de la glándula se rompe y, de esta manera, el solvente en el cual está sumergida la muestra se lleva consigo todo el contenido. Posteriormente, 1 µl de esta solución fue inyectada en el puerto de inyección del cromatógrafo gaseoso bajo las condiciones cromatográficas descriptas.

-Determinación del contenido de ácido isobutírico

Dado que el ácido isobutírico es el componente principal liberado por las glándulas de Brindley de adultos de *T. infestans* durante un evento de perturbación mecánica (Hack *et al.*, 1980; Cruz López *et al.*, 1995; Guerenstein y Guerin, 2004; Manrique *et al.* 2006), su cantidad en las muestras de las glándulas de insectos sometidos a diferentes condiciones (*i.e.*, estado de desarrollo y edad del adulto, estado nutricional, número de perturbaciones), fue utilizada como un indicador del grado de llenado de las mismas.

Una vez inyectadas las muestras en el GC y obtenidos los cromatogramas (**figura 2.7**), el área bajo el pico del ácido isobutírico se calculó mediante el programa ChemStation® de HP y subsecuentemente fue comparada, con una curva de calibración realizada previamente, para estimar la concentración de ácido isobutírico presente en las muestras de las glándulas.

Se utilizó ácido isobutírico sintético (Sigma- Aldrich®, Alemania, 98% pureza) para realizar las diluciones con DCM y así obtener la curva de calibración. Las concentraciones utilizadas fueron: 4, 10, 20, 50 y 75 ppm. Luego, 1 µl de cada una fue inyectada en el cromatógrafo bajo las mismas condiciones descriptas anteriormente. La concentración de ácido isobutírico de las muestras de las glándulas fue calculada a partir de la ecuación ($y = 575,232x - 4298,8$; $R^2 = 0,9992$) obtenida a partir de la regresión lineal de la curva de calibración, donde y = concentración de ácido isobutírico (mg/ml) y x = área del pico.

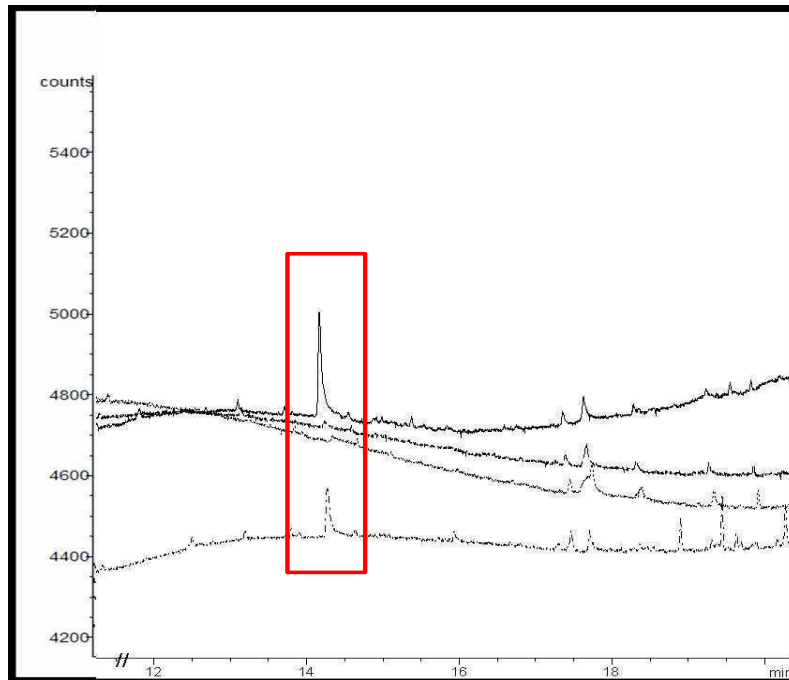


Figura 2.7: Ejemplo de los cromatogramas resultantes (en este caso 4) luego de la inyección de las muestras en el cromatógrafo. En rojo se indican los picos pertenecientes a ácido isobutírico, sobre los cuales se calculó el área para luego calcular la masa de dicho compuesto químico presente en las glándulas de Brindley de adultos de *T. infestans*.

-Series experimentales

Para estudiar la dinámica de llenado de las glándulas de Brindley y su modulación por factores como el desarrollo y la edad del adulto, el estado nutricional y la ocurrencia de perturbaciones múltiples, se definieron los siguientes grupos experimentales:

- 1- adultos farados no alimentados ni perturbados, (en el interior de larvas de 5° estadio antes de la ecdisis del imago) (N = 11);
- 2- adultos no alimentados ni perturbados, recién mudados, antes del endurecimiento de la cutícula (N = 10)
- 3- adultos no alimentados ni perturbados, recién mudados, luego del endurecimiento de la cutícula (N = 17);
- 4- adultos no alimentados ni perturbados, de 1 mes de edad (N = 7);
- 5- adultos no alimentados, perturbados una única vez, disecados a las 3 horas (N = 14), a las 24 horas (N = 9) o 1 semana (N = 9) después de la perturbación;

- 6- adultos no alimentados, perturbados semanalmente 3 (N = 9), 4 (N = 9) o 5 veces (N = 6), disecados 1 semana después a la última perturbación;
- 7- adultos alimentados, perturbados semanalmente 3 veces (N = 9), disecados 1 semana después de la última perturbación.

-Análisis de datos

La cantidad de ácido isobutírico de cada par de glándulas de Brindley de los adultos recién mudados con su cutícula ya esclerotizada y nunca antes perturbados se tomó como el valor estándar del contenido de dichas glándulas y se lo categorizó como un equivalente de adulto (EA). Luego, para cada individuo, el contenido de cada par de glándulas de Brindley fue registrado y relativizado a la cantidad de ácido isobutírico presente en 1 equivalente de adulto (EA). De este modo, se presenta en los gráficos la cantidad de ácido isobutírico presente en las glándulas de los distintos individuos como una proporción en función de 1 EA. Valores de EA cercanos a 0; 0,5 o 1 indicarían que las glándulas están vacías, con la mitad de su contenido o llenas, respectivamente. Se realizaron *T-Test* de 1 muestra para evaluar la existencia de diferencias significativas con el valor esperado de EA = 1 (valor que indicaría que la glándula está llena). Valores significativamente menores a 1 indicarían que la glándula no se encuentra llena. Por otro lado, se realizó un *T-Test* o un análisis de varianza (ANOVA) de 1 factor para analizar diferencias entre tratamientos, seguido de comparaciones a posteriori (*Test* de Fisher) cuando fue necesario.

Resultados

-Contenido de las glándulas de Brindley y su relación con el desarrollo del adulto

Los adultos recién mudados con su cutícula ya esclerotizada nunca antes perturbados ni alimentados deberían tener sus glándulas de Brindley llenas al máximo. La cantidad de ácido isobutírico promedio que una glándula de los adultos de este grupo presentó, medida a través de la cromatografía gaseosa, fue de 5,7 μg . Teniendo en cuenta que se trata de estructuras pares que liberan sus volátiles en simultáneo, se calculó que el contenido total de un adulto o Equivalente de Adulto (EA) es de 11,36 μg (**figura 2.8**, línea horizontal punteada). Los restantes resultados obtenidos para los distintos tratamientos fueron relativizados a dicho valor.

Al cuantificar el contenido de ácido isobutírico de los adultos farados en el interior de larvas de 5° estadio cercanas a la muda, se obtuvo un EA = 0,2, resultado que al ser significativamente distinto de 1EA (*T-Test* de 1 muestra, $p < 0,05$) (**figura 2.8**) evidencia que sus glándulas se encontraban vacías. Sin embargo, al analizar el contenido de ácido isobutírico de las glándulas de adultos recién mudados con su cutícula aún no esclerotizada, no se observaron diferencias significativas con respecto a 1EA (*T-Test* de 1 muestra, $p > 0,05$). El mismo resultado se observó para adultos de un mes de edad nunca antes perturbados (*T-Test* de 1 muestra, $p > 0,05$) (**figura 2.8**), demostrando que en estos dos grupos sus glándulas están llenas.

Además, el análisis estadístico mostró que el contenido de ácido isobutírico de las glándulas varió significativamente entre los tratamientos (ANOVA de 1 factor, $p = 0,049$), siendo el contenido de ácido isobutírico del adulto farado significativamente menor que el contenido del adulto recién mudado sin esclerotizar (*Test* de Fisher, $p = 0,031$) pero no difirió del contenido del adulto esclerotizado de un mes de edad (*Test* de Fisher, $p > 0,05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el contenido de ácido isobutírico de adultos sin esclerotizar y de adultos esclerotizados de un mes de edad (*Test* de Fisher, $p > 0,05$) (**figura 2.8**). Si bien no se observaron diferencias significativas entre el contenido de ácido isobutírico de las glándulas de los adultos esclerotizados de un mes de edad con los otros dos tratamientos, el llenado de las glándulas parecería ocurrir de manera gradual con el desarrollo del adulto.

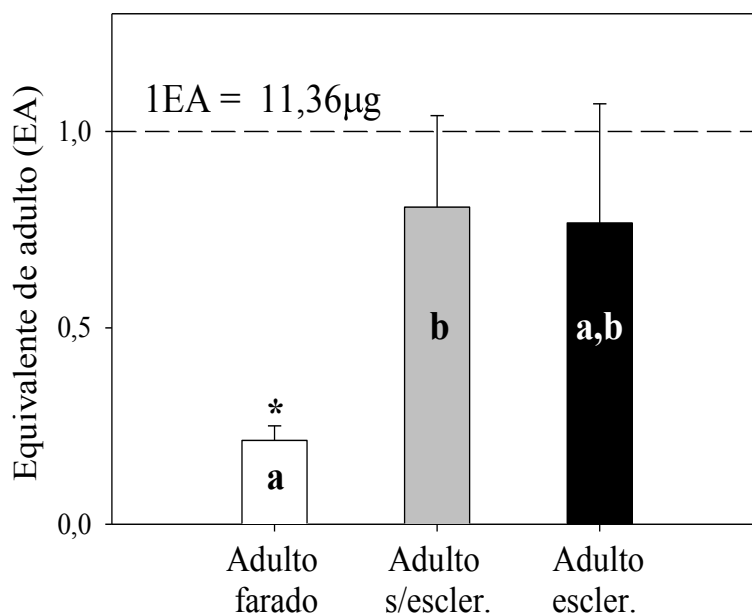


Figura 2.8: Contenido de ácido isobutírico de las glándulas de Brindley en función del desarrollo del adulto de *T. infestans*. Los adultos farados presentaron sus glándulas de Brindley ya desarrolladas pero aún no llenas, ocurriendo el llenado aparentemente en forma gradual con el desarrollo del adulto.

1 EA representa la cantidad de ácido isobutírico que presentó un adulto recién mudado, esclerotizado sin perturbación previa. *Adulto farado*: adulto en el interior de larva del 5^o estadio, antes de la ecdisis del imago (N=11); *Adulto s/escler.*: adulto recién mudado sin esclerotizar y sin perturbar (N=10); *Adulto escler.*: adulto esclerotizado y sin perturbar de un mes de edad (N=7). El asterisco representa diferencias significativas con respecto a 1EA (*T-Test* de 1 muestra, $p < 0,05$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (*Test* de Fisher, $p = 0,031$).

-Dinámica de recarga de las glándulas de Brindley luego de un único evento de perturbación

Al analizar el tiempo requerido para que el adulto recupere el contenido de sus glándulas de Brindley (EA = 1) luego de una única descarga, se observó que no pudieron completar el llenado de las mismas, ni siquiera luego de una semana desde la perturbación (**figura 2.9**). Tanto el EA luego de 3 horas, 1 día o 1 semana luego de la perturbación fueron significativamente menores que 1EA (*T-Test* de 1 muestra, $p > 0,05$ para todos los tratamientos). Sin embargo se observó una tendencia a que los individuos las recarguen a lo largo del tiempo ya que el contenido de ácido isobutírico del adulto perturbado disecado 3 horas después de la perturbación fue significativamente menor al contenido de las glándulas del adulto perturbado disecado 7 días después de la perturbación (*Test* de Fisher, $p = 0,003$). Por otro lado, el contenido de ácido isobutírico de las glándulas de los adultos disecados 1 día después de la perturbación no fue significativamente diferente de los otros dos tratamientos (*Test* de

Fisher, $p > 0,05$ para ambos casos), demostrando que la recarga de las glándulas parecería ocurrir gradualmente (**figura 2.9**).

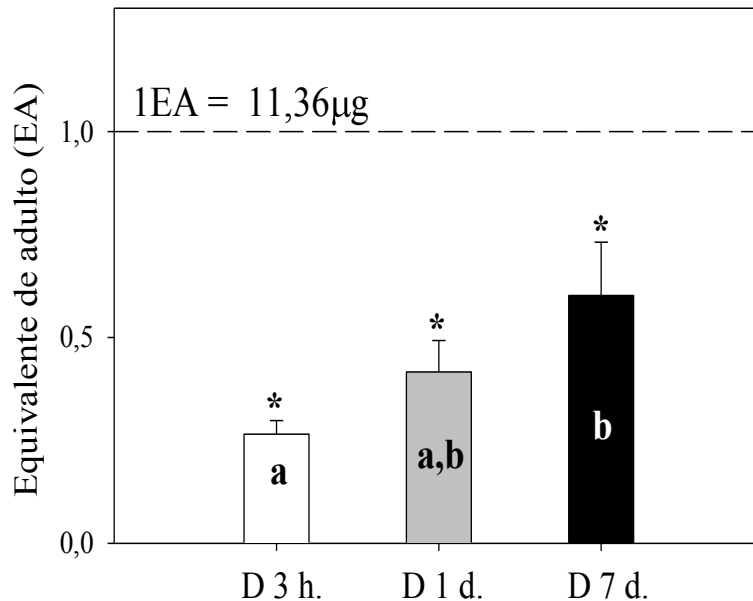


Figura 2.9: Dinámica de recarga de las glándulas de Brindley de adultos de *T. infestans* luego de un único evento de perturbación. Luego de 1 semana transcurrida desde la perturbación, los adultos no recuperan el contenido total de sus glándulas. La recuperación parecería ser gradual.

1 EA representa la cantidad de ácido isobutírico que presentó un adulto recién mudado, esclerotizado sin perturbación previa. *D 3 h*: adulto perturbado, disecado 3 horas después de la perturbación (N=14); *D 1 d*: adulto perturbado, disecado 1 día después de la perturbación (N=9); *D 7 d*: adulto perturbado, disecado 7 días después de la perturbación (N=9). Los asteriscos indican diferencias significativas con 1 EA (*T-Test* de 1 muestra, $p < 0,05$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (*Test* de Fisher, $p = 0,003$).

-Dinámica de recarga de las glándulas de Brindley luego de varios eventos de perturbación

En el punto anterior se mostró que aún 7 días después de una perturbación los adultos no fueron capaces de recuperar el contenido total original (1EA) de ácido isobutírico de sus glándulas. En esta parte se analizó si además, luego de varios eventos de perturbación independientes el poder de recuperación disminuye aún más o no. Se observó que el contenido de ácido isobutírico varió significativamente entre tratamientos cuando la capacidad de recarga, luego de distinto número de eventos de perturbación, fue analizada (**figura 2.10**) (ANOVA de 1 factor, $p = 0,022$). Como se mostró anteriormente, un solo evento de perturbación fue suficiente para disminuir significativamente el contenido de ácido isobutírico con respecto a 1EA (*T-Test* de 1 muestra, $p > 0,015$). Además, si bien no se encontraron diferencias significativas en el

contenido que presentan las glándulas de adultos con 1, 3 y 4 perturbaciones (*Test* de Fisher, $p > 0,05$ para todas las comparaciones), sí se observó una disminución gradual en dicho contenido, siendo evidente entre los adultos con 1 y 5 perturbaciones, donde se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácido isobutírico entre ambos tratamientos (*Test* de Fisher, $p = 0,002$).

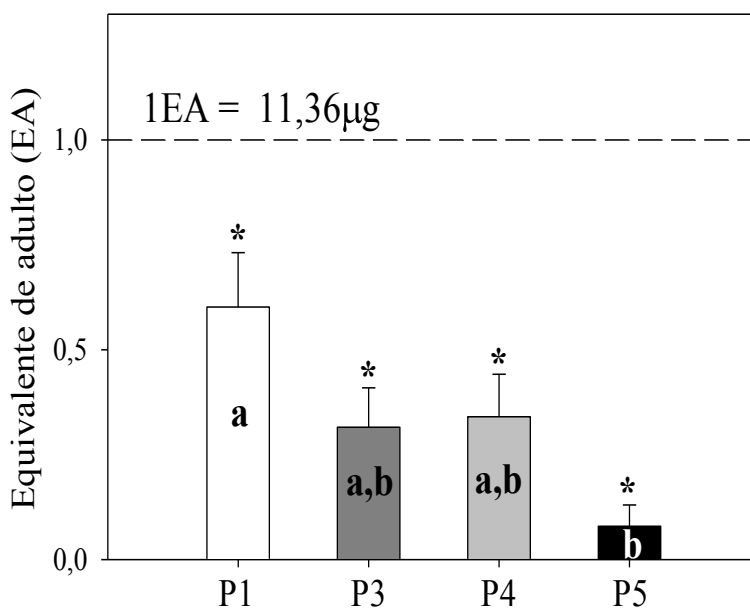


Figura 2.10: Dinámica de recarga de las glándulas de Brindley de adultos de *T. infestans* luego de varios eventos de perturbación. Una perturbación es suficiente para disminuir significativamente el contenido de ácido isobutírico de las glándulas. Al aumentar el número de perturbaciones, disminuye gradualmente el contenido de ácido.

1 EA representa la cantidad de ácido isobutírico que presentó un adulto recién mudado, esclerotizado sin perturbación previa. P1: adulto 1 vez perturbado (N=9); P3: adulto 3 veces perturbado (N=9); P4: adulto 4 veces perturbado (N=9); P5: Adulto 5 veces perturbado (N=6). En todos los casos, 1 perturbación por semana. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a 1 EA (*T-Test* de 1 muestra, $p < 0,05$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (*Test* de Fisher, $p = 0,002$).

-Efecto del estado nutricional en el llenado de las glándulas de Brindley luego de un evento de perturbación

Cuando se analizó la capacidad de recarga de las glándulas como una función del estado nutricional de los insectos, se encontró que el contenido de ácido isobutírico fue significativamente afectado por el tratamiento (*T-Test*, $p = 0,001$, **figura 2.11**). Luego de haber perturbado tres veces (1 vez por semana) a un adulto no alimentado, el contenido de ácido isobutírico en sus glándulas fue significativamente diferente a 1EA (*T-Test* de 1 muestra, $p < 0,05$). No obstante, el contenido de las glándulas de Brindley

de un adulto alimentado a repleción luego de ser perturbado tres veces, logró ser recuperado, al no presentar diferencias significativas con 1EA (*T-Test* de 1 muestra, $p > 0,05$).

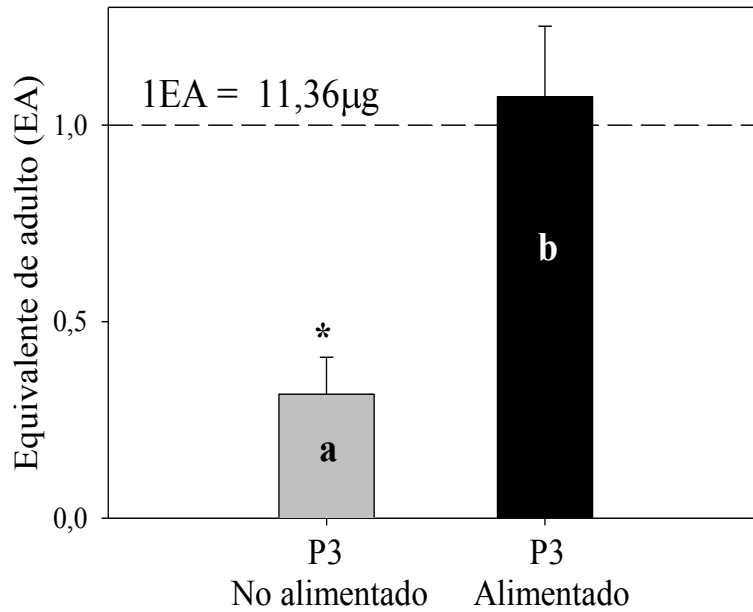


Figura 2.11: Efecto del estado nutricional en el llenado de las glándulas de Brindley de adultos de *T. infestans*. La alimentación luego de las perturbaciones permitió recuperar el contenido de 1EA. 1 EA representa la cantidad de ácido isobutírico que presentó un adulto recién mudado, esclerotizado sin perturbación previa. P3: adulto 3 veces perturbado. N=9 para ambos tratamientos. El asterisco indica diferencias significativas con respecto a 1 EA (*T-Test* de 1 muestra, $p < 0,05$). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (*T-Test*, $p = 0,001$).

Parte 3. Respuestas comportamentales de larvas de T. infestans enfrentadas a la feromona de alarma de adultos

Previamente ha sido demostrada la existencia de una respuesta de escape de larvas de *T. infestans* expuestas a los volátiles liberados por adultos perturbados, expresada como un aumento en la actividad locomotora y una respuesta direccional de evitación (Manrique *et al.*, 2006). Partiendo de los resultados presentados en secciones anteriores del presente capítulo, que nos permitió conocer con precisión cuál es la carga de ácido isobutírico de las glándulas de Brindley de adultos sometidos a distintos tratamientos relacionados con el número de perturbaciones y el estado nutricional de los insectos, se analizó en esta parte la relación entre el grado de llenado de las glándulas de los adultos y la respuesta comportamental de escape de las larvas. Para este último punto se asumió como válida la función de alarma de los volátiles liberados por las glándulas de Brindley de *T. infestans*, sugerida previamente (Ward, 1981; Manrique *et al.*, 2006).

Materiales y Métodos

-Animales

Se utilizaron larvas de 4º estadio con un ayuno de 10 a 15 días post-ecdisis y adultos no perturbados con ayuno de 5 a 10 días post-ecdisis de *T. infestans* criados en nuestro insectario bajo condiciones controladas (ver sección *-Animales* de la Parte I). Para estudiar el efecto del estado nutricional sobre la liberación de la feromona de alarma, algunos adultos fueron alimentados individualmente *ad libitum* sobre gallinas vivas, cuando así lo requirió el tratamiento.

Todos los experimentos fueron realizados durante las primeras horas de la escotofase (*i.e.*, 1-5h luego de que la luz se apagara) abarcando el período de máxima actividad observada para las vinchucas (Lazzari, 1992). A su vez, los experimentos fueron llevados a cabo en condiciones de oscuridad funcional, respetando así la fase del fotoperíodo en el cual los animales se encontraban, y evitando además la posible utilización de señales visuales por parte de las vinchucas durante los ensayos. La temperatura y la humedad relativa del cuarto experimental utilizado fueron mantenidas a $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ y $40 \pm 10\% \text{HR}$, respectivamente.

-Dispositivo experimental y procedimiento

Para evaluar la respuesta de escape de larvas de 4° estadio de *T. infestans* enfrentadas a volátiles provenientes de adultos perturbados, se utilizó el mismo olfatómetro descrito en el Capítulo 1 (**figura 1.1**). Brevemente, el dispositivo consta de una arena experimental rectangular de 10x5 cm, a la cual se conectan dos frascos-estímulo, uno conteniendo un adulto, que al ser estimulado mecánicamente liberaba el contenido de sus glándulas y el otro era utilizado como control (ver abajo). De esta forma se conseguía un gradiente químico al nivel del piso de la arena. El comportamiento de evitación espacial de las larvas era registrado con una video cámara y grabado digitalmente.

En cada ensayo individual, un frasco estímulo fue utilizado como control, es decir, conteniendo un adulto sin perturbar, y el otro frasco fue utilizado para el estímulo, es decir, un adulto perturbado. Ambos frascos fueron conectados a la sub-cámara inferior y una larva fue luego ubicada en el centro de la arena experimental, cubierta con un pequeño frasco invertido durante un minuto para permitir la familiarización con el contexto y la difusión de los olores. De esta manera, los volátiles provenientes del insecto, perturbado o sin perturbar, ingresaban por difusión independientemente en cada una de las partes de la sub-cámara y continuaban difundiendo a través de los pequeños orificios hacia la arena experimental donde se encontraba la larva a testear. Luego, la larva fue liberada con delicadeza retirando el pequeño frasco que la cubría y su comportamiento fue registrado durante 4 minutos mediante una video-cámara sensible a luz infrarroja conectada a una grabadora digital.

Para evitar la perturbación de los adultos se procedió de manera similar que en el Capítulo 1 para el caso de las larvas, permitiendo que los insectos asciendan voluntariamente a una pequeña tira de papel de filtro para luego esperar que también voluntariamente descendan del papel en el interior del frasco estímulo. Para la perturbación, una vez en el interior del frasco estímulo, mediante la utilización de una pinza entomológica se sujetaron las patas del adulto durante 30 segundos, tiempo suficiente para generar la liberación de la secreción.

Como sustrato de la arena experimental se utilizó un papel de filtro con pequeños orificios coincidentes con los orificios del piso del dispositivo. El mismo fue cambiado luego de cada ensayo para evitar cualquier tipo de contaminación química

eventualmente dejada por las larvas. Para evitar el posible efecto de una heterogeneidad espacial en la distribución de las larvas sobre la arena experimental, la posición de los estímulos fue alternada al azar entre los ensayos.

-Series experimentales

Según la condición de los adultos que se utilizaron como estímulo, se definieron series experimentales en las que se colocaba en un frasco estímulo siempre un adulto sin perturbar y en el otro frasco estímulo un adulto tratado de la siguiente manera:

- 1- Un adulto no alimentado, nunca antes perturbado que se mantenía sin perturbar durante el ensayo (Control) (N=40).
- 2- Un adulto no alimentado, nunca antes perturbado que era perturbado durante el ensayo (N=40) (equivalente a 1EA de la parte 2, P en **figura 2.12**).
- 3- Un adulto no alimentado, anteriormente perturbado 3 veces (1 perturbación/semana) que era perturbado durante el ensayo (N=20) (P3 No Alimentado en **figura 2.12**).
- 4- Un adulto alimentado, anteriormente perturbado 3 veces (1 perturbación/semana) que era perturbado durante el ensayo (N= 9) (P3 Alimentado en **figura 2.12**).

-Análisis de datos

Del mismo modo que en el Capítulo 1, se analizaron los videos mediante el uso de un programa de análisis de datos (e.g. tipo *The Observer 2.01*, Noldus Information Technology, The Netherlands). Para cada individuo se registró su preferencia olfativa sobre la arena experimental en función del gradiente de olores formado por la presencia de un adulto perturbado colocado en uno de los lados de la arena experimental. Se registró así el tiempo transcurrido en cada uno de los lados de la arena experimental y se calculó un índice de preferencia, $IP = (TC - TE)/(TC + TE)$, cuyos valores se encuentran entre -1 y 1. Los valores de IP cercanos a -1, 0, o 1 indican repelencia, distribución al azar o atracción al estímulo, respectivamente. Las desviaciones frente a una distribución al azar (es decir $IP=0$) de las larvas sobre la arena experimental se evaluaron para cada tratamiento con un *T-Test* de 1 muestra.

Resultados

-Respuesta comportamental de las larvas frente a olores provenientes de adultos perturbados bajo diferentes regímenes de alimentación

Los resultados obtenidos en el análisis de la respuesta comportamental de las larvas frente a volátiles provenientes de adultos perturbados con distinto grado de ayuno se muestran en la **figura 2.12**. Las larvas enfrentadas a olores provenientes de adultos sin perturbar mostraron una distribución al azar sobre la arena experimental (IP=-0,13) (N= 40, *T-Test* de 1 muestra =-1,33, $p=0,19$). Contrariamente, las larvas evitaron el lado de la arena experimental con mayor concentración de volátiles provenientes de adultos no alimentados perturbados por primera vez durante el ensayo (P en **figura 2.12**) (IP=-0,18, N= 40, *T-Test* de 1 muestra = -2.58, $p=0,014$). Sin embargo, se observó que las larvas que fueron enfrentadas a volátiles provenientes de adultos no alimentados que habían sido perturbados 3 veces antes de ser perturbados durante el ensayo, mostraron una distribución al azar sobre la arena experimental (P3 No Alimentado en **figura 2.12**) (IP=0,031, N= 20, *T-Test* de 1 muestra = 0,34, $p=0,75$). Contrariamente, las larvas enfrentadas a olores provenientes de adultos alimentados que habían sido perturbados 3 veces antes de ser perturbados durante el ensayo, mostraron una clara respuesta de escape (P3 Alimentado en **figura 2.12**) (IP=-0,45, N=9, *T-Test* de 1 muestra = -3,22, $p=0,012$), denotando la importancia de la alimentación en la recarga de la glándulas luego de una perturbación mecánica.

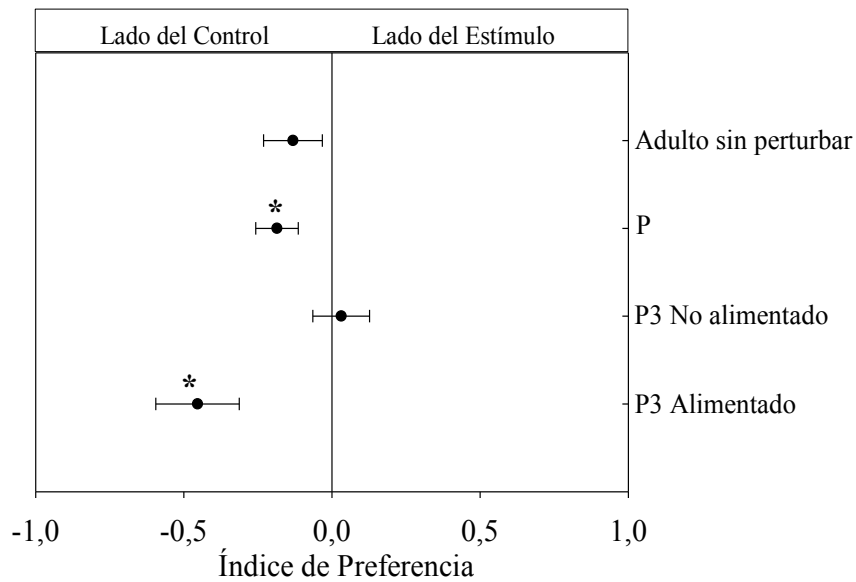


Figura 2.12: Respuesta comportamental de larvas de 4° estadio de *T. infestans* enfrentadas a volátiles provenientes de adultos bajo diferentes regímenes de alimentación. Las larvas mostraron repelencia al ser expuestas a volátiles liberados por adultos perturbados 1 vez y por adultos perturbado 3 veces y posteriormente alimentados.

P: adulto perturbado, que equivale a 1EA; *P3*: adulto 3 veces perturbado. Los asteriscos indican diferencias significativas de un $IP = 0$ (*T-Test* de 1 muestra, $p < 0,05$).

Discusión

En este capítulo se analizó la dinámica de llenado de las glándulas de Brindley de los adultos de *T. infestans*. En particular, utilizando métodos cualitativos, cuantitativos y evaluando el propio comportamiento de conoespecíficos, se estudió la recarga de dichas glándulas en función de diversos factores, como el estado de las glándulas antes y después de la ecdisis imaginal, el número de veces que fuera descargada, el estado nutricional de los adultos y el tiempo transcurrido desde la última descarga.

En relación al desarrollo, se encontró que el llenado de las glándulas ocurre gradualmente desde el adulto recién mudado al adulto ya esclerotizado. Si bien el desarrollo de las glándulas de Brindley ocurre durante el 5° estadio larval y finaliza justo antes de la ecdisis del imago (Millen *et al.*, 1979), en este capítulo se encontró que las glándulas de los adultos farados poseen en su interior una cantidad muy baja de ácido isobutírico, sugiriendo que aún no son funcionales. Como a esta altura del desarrollo la cutícula de la larva de 5° estadio aún cubre al adulto farado y, como no existe conexión con el exterior desde los orificios de salida de las glándulas, resulta lógico pensar que se mantengan no funcionales. Además, estos resultados son congruentes con trabajos previos de Henrici (1938, 1940) sobre otras especies de Hemiptera, que muestran que las glándulas abdominales y metatorácicas se terminan de formar antes de la ecdisis pero las células secretoras de las glándulas comienzan a descargar su secreción luego de la ecdisis. Los resultados obtenidos parecen sugerir que el llenado de las glándulas de Brindley luego de la ecdisis, ocurre gradualmente a medida que la cutícula se va endureciendo desde el adulto recién mudado sin esclerotizar hasta el adulto esclerotizado. Una vez alcanzado el punto máximo definido en este trabajo como un equivalente adulto o EA, se observó que las glándulas se mantendrían llenas a lo largo del tiempo en ausencia de eventos de perturbación.

En el análisis del curso temporal del llenado de las glándulas de Brindley luego de una perturbación se observó que las glándulas recuperan el contenido de ácido isobutírico de manera gradual, ya que el contenido de ácido isobutírico aumentó progresivamente de 3 horas a 1 semana luego de una perturbación. Sin embargo, luego de 1 semana no fue posible recuperar el contenido íntegro inicial de las glándulas, al menos en adultos sin alimentar.

Considerando la descarga de las glándulas en relación al número de eventos de perturbación, se demostró que una única perturbación sería suficiente para descargar las glándulas. Sin embargo, esto no significa que estén totalmente vacías. De hecho, observamos que 3 o más perturbaciones reduciría aún más el contenido de ácido isobutírico, siendo esta reducción dependiente del número de perturbaciones. A partir de este resultado, uno podría plantearse si una pequeña cantidad de ácido, la que se supone permanece en la glándula luego de la perturbación, podría ser comportamentalmente funcional como para disparar la respuesta de escape. Partiendo de este interrogante planeamos los experimentos de comportamiento. Cuando la respuesta comportamental de las larvas frente a olores de adultos no alimentados perturbados semanalmente 3 veces fue evaluada, no se observó respuesta de escape. Parecería ser que la secreción resultante de este bajo contenido glandular no es suficiente para funcionar como alarma. Sin embargo, esto fue revertido cuando estos insectos 3 veces perturbados fueron posteriormente alimentados y su secreción liberada fue utilizada como estímulo para las larvas. En este caso, las larvas mostraron en el olfatómetro una clara respuesta de escape. Conjuntamente, el contenido de ácido isobutírico en las glándulas mostró un aumento cuando los adultos bajo el mismo tratamiento fueron alimentados, lo que refleja la dependencia del estado nutricional con la capacidad de recarga de las glándulas de Brindley. Esta recarga del contenido de ácido isobutírico alcanzó valores similares a aquellos obtenidos de las glándulas llenas de adultos no perturbados, alrededor de 11 μg , un valor comparable al máximo contenido de ácido isobutírico obtenido de glándulas llenas. Estos resultados sugieren un claro papel de la alimentación en la producción de los compuestos que componen la feromona de alarma de las vinchucas, o por lo menos del componente mayoritario, el ácido isobutírico.

Sin embargo, al momento de relacionar la dinámica de llenado de las glándulas de Brindley con la alimentación, es necesario tener en cuenta la frecuencia de alimentación de los adultos de *T. infestans* en condiciones naturales. De acuerdo a diferentes autores, la tasa de alimentación de los adultos de esta especie podría estar afectada por diferentes factores, tales como la especie hospedadora (a través del comportamiento defensivo diferencial entre distintos hospedadores), la disponibilidad del hospedador (mediada por las prácticas de manejo de los animales domésticos), el

período reproductivo y la temperatura, entre otros (Catalá, 1991; Lehane, 1991; López *et al.* 1999; Ceballos *et al.*, 2005). Particularmente, Ceballos *et al.* (2005) afirmaron que en poblaciones peridomésticas de *T. infestans*, los adultos se alimentan cada 2,9 días en primavera, cada 4,3 días en verano, cada 7 días en otoño y cada 5,6 días en invierno. Por su lado, en adultos de la misma especie pero de poblaciones domésticas, las tasas de alimentación oscilan entre 2 y 3 días (Ricardo Gurtler, comunicación personal). Esta información refleja una alta tasa de alimentación de los adultos de esta especie. Las feromonas de alarma funcionan alertando a la población sobre la presencia de un potencial peligro y promoviendo distintos tipos de respuestas que llevan a la evitación de los posibles predadores. Los triatominos son negativamente fototrópicos y durante las horas del día, estos insectos usualmente se mantienen inactivos, agregados en sitios protegidos. Para alimentarse, deben dejar su refugio exponiéndose a potenciales peligros ya que la búsqueda y ubicación del hospedador son actividades particularmente peligrosas, de manera que podría ser importante para estos insectos tener sus glándulas de Brindley funcionales. Para los triatominos, una fuente de peligro son los predadores, incluyendo sus hospedadores, los cuales, aunque son la fuente de alimento de estos insectos, pueden comportarse también como predadores al intentar evitar la picadura de los triatominos. Considerando los resultados obtenidos en este capítulo de la tesis, con al menos cuatro eventos de perturbación en adultos no alimentados, la función de alarma podría no ser cumplida debido al estado de las glándulas, ya que la respuesta de escape podría no ser evocada en larvas estimuladas con olores provenientes de adultos bajo estas condiciones. Sin embargo, una alimentación frecuente en adultos de *T. infestans* probablemente permitiría la recarga de las glándulas. Además, es de esperar que no todos los adultos que salen de sus refugios para alimentarse sean perturbados por sus hospedadores o por sus predadores, proporcionando así a la población del insecto con un número de adultos capaz de liberar la feromona de alarma.

En resumen, en este capítulo se demostró que, tomando al contenido de ácido isobutírico como un indicador cuantitativo del estado de las glándulas, la dinámica de llenado de las glándulas de Brindley depende de la alimentación. El llenado de las glándulas ocurre gradualmente desde adultos recién mudados a adultos esclerotizados. Una vez que la cutícula se encuentra esclerotizada, la recarga de las glándulas luego de

una perturbación ocurrió gradualmente y disminuyó luego de sucesivos eventos de perturbación. El grado de ayuno podría limitar la capacidad de recarga de las glándulas de Brindley para una eventual liberación de la secreción frente a una nueva perturbación lo cual podría verse reflejado en el comportamiento de las larvas.



Capítulo 3:

“Identificación de compuestos activos de la feromona de alarma liberada por los adultos de Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae)”

Introducción

Las feromonas son sustancias químicas emitidas por un individuo y que promueven una modificación fisiológica o del comportamiento de otro individuo de la misma especie. En algunos casos, la feromona consiste en un único compuesto, como la feromona sexual liberada por la hembra del gusano de seda *Bombyx mori*, formada únicamente por un alcohol, el bombicol, que atrae a los machos de esa especie (Butenandt *et al.*, 1961). Sin embargo, en la gran mayoría de las especies de insectos las feromonas están constituidas por mezclas de compuestos (Schulz, 2004; Symonds y Elgar, 2008) con identidad específica dada no solo por la calidad (*i.e.*, composición química) sino también por la proporción de cada uno de los compuestos en la mezcla. Al ser presentados de manera individual, los diferentes componentes de una feromona pueden evocar un comportamiento determinado o carecer completamente de efecto. Al ser presentados juntos, pueden actuar sinérgicamente en algunos casos y, en otros, evocar respuestas diferentes a la evocada por la mezcla completa que forma la feromona liberada por el emisor (Chapman, 1998).

La identificación de los componentes biológicamente activos dentro de estas mezclas requiere el uso de técnicas relativamente sofisticadas y variadas que permitan abordar la misma problemática desde diversas aproximaciones. En general un enfoque multidisciplinario de este tipo debería combinar: 1) estudios de cromatografía gaseosa de alta resolución (Wadhams, 1990) del contenido de las glándulas secretoras y de la mezcla liberada por los individuos, para determinar los componentes individuales y las proporciones de los mismos; 2) registros electrofisiológicos del sistema sensorial periférico y/o de centros superiores de integración olfativa del sistema nervioso central, para determinar cuáles son los compuestos detectados y percibidos por los insectos; 3) estudios comportamentales con los compuestos presentados de manera individual o de forma combinada, para estudiar cómo cada compuesto o combinación de ellos puede modular el comportamiento de los individuos, y entender así posibles interacciones sensoriales, como por ejemplo sinérgicas o inhibitorias.

Mientras las respuestas electrofisiológicas registradas desde la antena del insecto ocurren a nivel periférico, las respuestas comportamentales dependen mayormente del procesamiento de esta entrada periférica dentro del sistema nervioso central. Es por eso que para un estudio completo y caracterización de una feromona,

además de obtener la información acerca de la sensibilidad a cierto compuesto mediante técnicas electrofisiológicas, es necesario la realización de ensayos comportamentales para entender cómo el animal se comportará en respuesta frente a dicho compuesto (Bruce *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, al igual que en la mayoría de los triatominos, los adultos de *T. infestans* poseen dos pares de glándulas exocrinas, metasternales y de Brindley. Ante una perturbación mecánica, los adultos de esta especie liberan una feromona de alarma cuya composición química ha sido ya descrita en varios trabajos que identificaron, por medio de distintas técnicas, los componentes volátiles individuales que la conforman (Schofield, 1979; Hack *et al.*, 1980; Juárez y Brenner, 1981; Cruz-López *et al.*, 1995; Guerenstein y Guerin, 2004; Manrique *et al.*, 2006; González Audino *et al.*, 2007; Bohman *et al.*, 2011). En la gran mayoría de estos trabajos se ha reportado al ácido isobutírico como componente mayoritario de la mezcla de olores liberada, acompañado en menor proporción de otros ácidos grasos de cadena corta, cetonas, alcoholes y ésteres. En particular, Manrique *et al.* (2006) utilizando una fibra SPME (micro-extracción en fase sólida) para la colecta de volátiles y GC-MS (cromatografía de gases asociado a espectrómetro de masas) para su identificación, analizaron los volátiles de adultos de *T. infestans* perturbados, encontrando que liberan una secreción compuesta por 14 compuestos volátiles provenientes de ambos pares de glándulas exocrinas, entre los que se encuentran el ácido isobutírico, el ácido butírico, el ácido 2-metilbutírico, el ácido acético, las cetonas 3-pentanona y 2-butanona, y los alcoholes 2-metil-1-butanol y 2 -metil-1-propanol, compuestos que fueron objeto de estudio en el presente capítulo.

Existen diversos trabajos que analizan la actividad electrofisiológica de la antena de triatominos y/o la respuesta comportamental que genera la estimulación con algunos de los volátiles de las glándulas de Brindley y metasternales. González Audino y colaboradores (2007) estudiaron la respuesta comportamental y electrofisiológica de adultos de *T. infestans* frente a compuestos liberados por las glándulas de Brindley, encontrando respuesta, con ambas metodologías, a los isobutiratos de 2-metil-butilo y 3-metil-butilo, aunque no encontraron respuestas electrofisiológicas al ácido isobutírico ni al 2-metil-1-butanol. Por su parte, Vitta y colaboradores (2009) reportaron que las antenas de los machos adultos de *T.*

brasiliensis presentaban respuestas electrofisiológicas al ser estimuladas con volátiles liberados por las glándulas metasternales, como la 3-pentanona y el 2-metil-1-butanol, entre otros compuestos. Además, según otros autores, las antenas de *T. infestans*, son capaces de detectar los ácidos isobutírico, butírico y propiónico (Guerenstein y Guerin, 2001; Barrozo, 2003, Barrozo y Lazzari, 2004a), que son liberados tanto por las glándulas de Brindley de adultos perturbados, como por hospedadores de las vinchucas en menor cantidad. Más aún, diversos autores demostraron a través de experimentos comportamentales que el ácido isobutírico puede actuar como repelente en altas dosis y como atrayente en menores dosis (Schofield, 1975; Ward, 1981; Guerenstein y Guerin, 2001). A su vez, Barrozo y Lazzari (2004a) demostraron en ensayos de orientación olfativa realizados en un compensador de marcha, que las larvas de *T. infestans* no mostraron una respuesta diferente del azar al ser enfrentadas a distintas dosis de ácido propiónico o butírico.

Hasta el momento se sabía, y también se verificó en el Capítulo 2 de esta Tesis, que la secreción liberada por los adultos *T. infestans* durante un evento de perturbación cumple una función de alarma. Además, la composición química de la feromona de alarma ya es conocida. En este capítulo se analizó la contribución individual de diversos componentes volátiles de la feromona a la respuesta de las vinchucas. En una primera parte el análisis se centró en el estudio de los componentes de la feromona de alarma a nivel de la percepción sensorial de los quimiorreceptores antenales. Se determinó si la antena detectaba compuestos previamente seleccionados luego de su estimulación, a partir de registros electrofisiológicos del tipo electroantenograma acoplado a cromatografía gaseosa (GC-EAG). En la segunda parte, se realizó un análisis de la respuesta comportamental de las vinchucas en un olfatómetro de doble elección, determinando la respuesta de orientación de las vinchucas frente a distintas dosis de dichos volátiles seleccionados y a combinaciones de los mismos, para evaluar una posible interacción entre dichas claves sensoriales.

Parte 1- Percepción de la feromona de alarma en larvas de T. infestans: registros electrofisiológicos a nivel de la antena

Mediante el uso de la técnica de electrofisiología acoplada a cromatografía de gases, se evaluó la respuesta antenal de larvas de 4° estadio de *T. infestans* frente a diferentes componentes volátiles de la feromona de alarma emitida por adultos de la especie luego de una perturbación mecánica (ver *Apéndice II: Conceptos teóricos de las técnicas utilizadas*, al final de este capítulo).

Materiales y Métodos

-Animales

Para cada registro electroantenográfico se utilizaron larvas del 4° estadio con 5-10 días de ayuno post-ecdisis y adultos con una semana de ayuno post-ecdisis, nunca antes perturbados. Los insectos utilizados en estos ensayos se obtuvieron a partir de huevos de *T. infestans* obtenidos del Servicio Nacional de Chagas, Córdoba, Argentina y criados en el laboratorio a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, 30-60% HR, bajo un fotoperíodo de 12:12 horas Luz/Oscuridad. Todos los estadios fueron alimentados sobre gallinas vivas. Las mismas fueron manipuladas de acuerdo a las reglas de bioseguridad del Servicio de Higiene y Seguridad de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Se usó un total de 72 larvas. Los insectos fueron utilizados una única vez y luego descartados.

-Dispositivo experimental

Para la realización de los registros electroantenográficos se trabajó con un equipo de GC-EAG, es decir, un cromatógrafo de gases acoplado a un equipo de electroanteno-detección (EAG o EAD). El GC (HP 5890 Series II) se equipó con una columna capilar polar (DB WAX, 30 m x 0,25 mm diám. interno, 0,25 μm de espesor de película de fase estacionaria). Se utilizó hidrógeno (H_2 , 1 mL/min) como gas *carrier*, el inyector en modo *splitless* a 220°C con un detector de ionización de llama (FID) a 250°C . El programa de temperatura de la columna fue 40°C durante 4 minutos para luego alcanzar los 250°C a $7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en una rampa de temperatura. Por último, se mantuvo la temperatura durante un minuto a 250°C .

En el equipo de EAG (SYNTECH®) se trabajó con micro-manipuladores para el montaje de la antena, y con electrodos conectados a un pre-amplificador (10X) (**figura 3.1A**) que amplifica la señal de la antena. Para la obtención de respuestas electroantenográficas, se utilizaron, como electrodos, dos variantes: por un lado se usaron capilares de vidrio asociados a electrodos de plata-plata clorinada rellenos con solución 0,1M KCl o con solución Ringer (**figura 3.2**). Por otro lado, también se utilizó una sonda o *probe* (SYNTECH®) donde se colocaba la antena con un gel conductor neutro (**figura 3.1B**). Dicha variación en el tipo de electrodos utilizados responde a reportes previos con otros insectos, en los que el uso de los electrodos de capilares de vidrio puede generar ruido eléctrico no deseado, preparaciones poco estables, o incluso movimientos de la antena dentro de los capilares que generan la producción de pequeñas burbujas.

La adquisición de datos se realizó a través de una computadora conectada al GC-EAG mediante una interfase, usando el programa ChemStation® de HP que permite adquirir, analizar y exportar fácilmente los datos obtenidos de la eventual despolarización de la antena, acoplados temporalmente al cromatograma de la muestra inyectada.

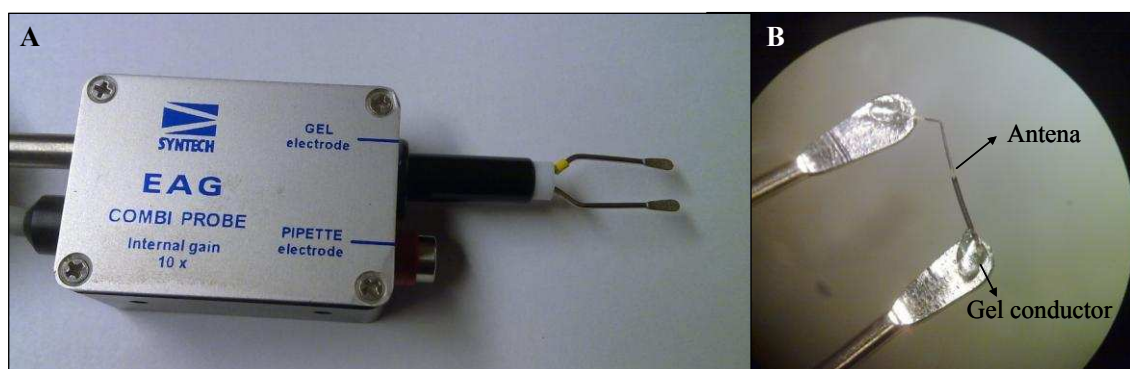


Figura 3.1: Sonda o *probe* utilizada, como alternativa a los electrodos de capilares de vidrio.

A) Sonda junto al preamplificador.

B) Preparación electroantenográfica lista para la realización del registro; se observa la antena montada sobre el gel neutro conductor sobre la sonda.

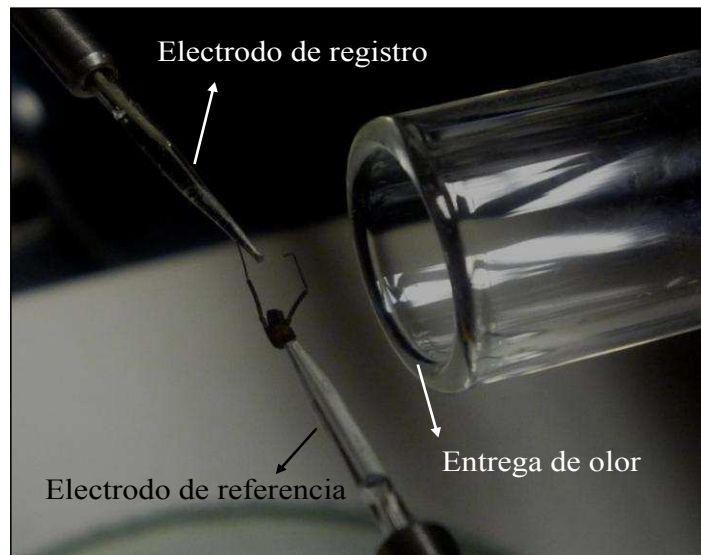


Figura 3.2: Preparación electroantenográfica. En este caso se utilizaron electrodos dentro de capilares de vidrio rellenos con solución Ringer. Como una de las variantes a la preparación electroantenográfica, se utilizó la cabeza entera del insecto con ambos extremos de las antenas conectadas al electrodo de registro y el electrodo de referencia fijado en la base de la cabeza.

-Procedimiento

Para llevar a cabo cada ensayo, se anestesió a la larva durante 2-5 minutos en hielo y luego se la manipuló bajo lupa. Se seccionó la antena del insecto por la base del pedicelo, donde se colocó el electrodo de referencia, y luego se colocó el extremo del flagelo en el electrodo de registro. Cuando se utilizó la sonda, la antena fue cortada bajo lupa y luego cada extremo depositado sobre el gel neutro conductor, éste último previamente colocado sobre cada terminal de la sonda.

Con el objetivo de lograr preparaciones electroantenográficas más estables y minimizar el ruido eléctrico, se ensayaron diversas preparaciones de antenas:

- una antena montada en forma completa (N=51).
- una antena completa con el extremo del flagelo cortado para asegurar una correcta conducción de la señal eléctrica (N=7).
- solamente el flagelo montado entre los electrodos (N=8).
- la cabeza entera del insecto montada en su base en el electrodo de referencia, ubicando los extremos de ambas antenas en el electrodo de registro (N=3) (**figura 3.2**).
- el insecto entero en el interior de una punta de micropipeta, utilizada como cebo, insertando el electrodo de referencia en el ojo y el electrodo de registro en los flagelos de ambas antenas (N=3) (**figura 3.3**).

Una vez que la preparación electrofisiológica se encontraba lista, una corriente continua de aire limpio, con un flujo de 300 ml/min, era suministrada sobre la antena.

El aire que provenía de un compresor libre de aceite atravesaba un filtro de carbón activado, con el objetivo de extraer todas las impurezas del ambiente, para luego ser humedecido por borbotado en agua.

Al inyectar en el cromatógrafo la fibra SPME (microextracción en fase sólida) para la desorción de los volátiles previamente colectados, éstos atravesaban la columna y luego se bifurcaban en dos vías. Una de las vías impregnaba a la antena y la otra llegaba al detector del cromatógrafo (FID) que analizaba la naturaleza química de cada compuesto. El acoplamiento GC-EAG permite simultáneamente la identificación de los compuestos de mezclas complejas y la estimulación de las sensillas olfativas de un insecto, *i.e.*, es posible conocer qué sustancia química específica es detectada fisiológicamente por la antena del insecto.



Figura 3.3: Preparación electroantenográfica.

A) Vista lateral: se observa el cuerpo entero del insecto inmovilizado en el interior de una punta de micropipeta, con el electrodo de referencia inserto en el ojo y el de registro en contacto con los extremos de las dos antenas.

B) Vista superior: se observa la corta distancia que existe entre las antenas y la salida del olor.

-Estímulos químicos puestos a prueba

Para determinar si las antenas de las larvas de 4° estadio de *T. infestans* son capaces de detectar componentes de la feromona de alarma liberada por los adultos perturbados, se realizaron registros electroantenográficos estimulando a las antenas con diferentes variantes que se describen a continuación.

-En una primera serie experimental, se puso a prueba la respuesta de las antenas frente a los volátiles liberados por 8 adultos (4♂ + 4♀), perturbados en el momento de la exposición de una fibra semipolar SPME (Carboxen®/Polydimethylsiloxane, 75 µm, Supelco®). Con la ayuda de un papel de filtro sostenido mediante pinzas y con suma delicadeza para evitar la perturbación antes del momento deseado, se colocó a

los adultos en un frasco de vidrio (30 ml). Una vez ubicados en el frasco, los insectos fueron perturbados (como ya fuera descrito en el Capítulo 2) para luego inmediatamente tapar el frasco y exponer, durante 15 minutos, la fibra SPME para la recolección de los volátiles. A continuación, durante un minuto se realizó la desorción de la fibra en el puerto de inyección del equipo GC-EAG.

-Por otro lado, de los 14 compuestos liberados por los adultos de *T. infestans* durante un evento de perturbación (según Manrique *et al.*, 2006), se evaluó la respuesta de las antenas frente a: ácido isobutírico, ácido butírico, ácido propiónico, 3-pentanona, 2-butanona y 2-metil-1-butanol. Para la elección de los compuestos a poner a prueba se consideró el origen (*i.e.*, tipo de glándula de la cual proviene el compuesto volátil), la naturaleza química (*i.e.*, el grupo funcional) y la proporción presente en la feromona de alarma (ver **Tabla 3.1** de la Parte 2 de este Capítulo).

Para todos los compuestos sintéticos puestos a prueba, se utilizó una fibra semi-polar SPME (Carboxen®/Polydimethylsiloxane, 75µm, Supelco®). Previo a la desorción en el puerto de inyección del equipo GC-EAG, se expuso la fibra durante un minuto al *headspace* (*i.e.*, porción volátil del aire circundante en equilibrio dentro de un vial cerrado, de 4ml.) de 1µl de compuesto sintético puro.

Para todos los casos, la inyección en el equipo se realizó inmediatamente luego de la exposición de la fibra. Para evitar cualquier tipo de contaminación química, luego de cada desorción, la fibra SPME fue calentada durante 30 minutos a 280°C.

Resultados

-Respuesta electroantenográfica de las antenas de las larvas frente a la feromona de alarma liberada por los adultos

Con el objetivo de encontrar moléculas activas y descartar aquellas sin actividad fisiológica, analizamos la respuesta de las antenas de larvas de *T. infestans* frente a la feromona de alarma liberada por adultos perturbados. A pesar de haber variado el modo de montaje de la preparación electroantenográfica, e incluso haber logrado identificar en el cromatograma a los distintos componentes de la feromona, como las cetonas, los alcoholes y los ácidos, no se encontraron respuestas de las antenas para ningún volátil componente de la feromona de alarma (**figura 3.4**). De acuerdo a la existencia de claras evidencias a nivel comportamental sobre la función de estos volátiles como se mencionó previamente, era esperable encontrar alguna respuesta antenal. Una explicación posible ante la ausencia total de respuesta es una estimulación insuficiente de la antena para lograr una detección, aunque no pueden descartarse otras posibilidades relacionadas con el modelo experimental y/o la preparación en sí, u otros factores que se discuten más adelante.

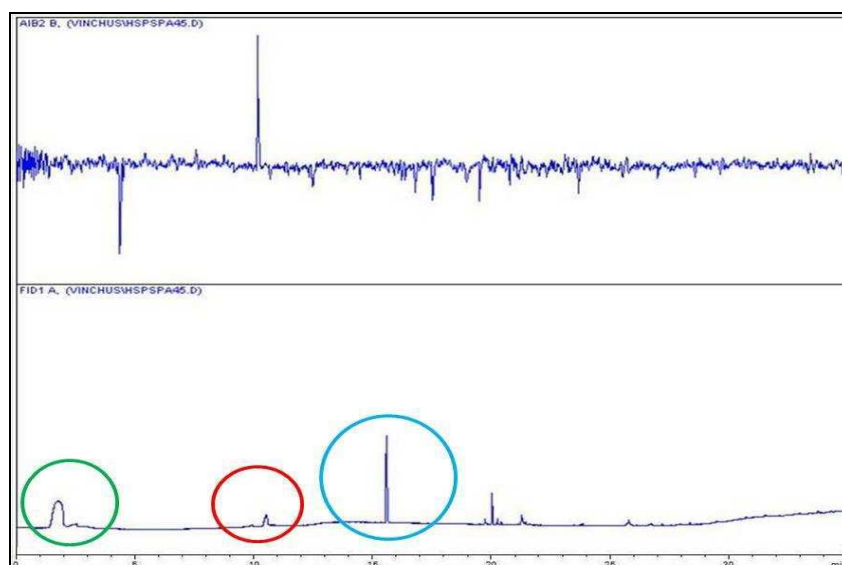


Figura 3.4: Ejemplo de una señal electroantenográfica (panel superior) acoplada al cromatograma resultante (TIC) (panel inferior) luego de la inyección de los volátiles colectados del *headspace* de adultos perturbados a través de una fibra SPME. No se obtuvieron respuestas de las antenas. El círculo verde indica la zona de las cetonas, el rojo la de los alcoholes y el azul la de los ácidos.

-Respuesta electroantenográfica de las antenas de las larvas frente a volátiles sintéticos, componentes de la feromona de alarma liberada por los adultos perturbados

Luego de analizar las respuestas de las antenas frente a la feromona de alarma liberada por los adultos y de no obtener respuestas para ningún componente puesto a prueba en la sección anterior, realizamos un análisis de la respuesta de las antenas frente a distintos compuestos sintéticos, componentes de la feromona, los cuales fueron evaluados individualmente.

A pesar de haber logrado buenas preparaciones electroantenográficas, con antenas estables y escaso ruido eléctrico, no se encontraron respuestas de las antenas en la gran mayoría de los ensayos (**figura 3.5**). En la figura se observa en la parte superior, la señal de la antena y en la parte inferior el cromatograma con los picos correspondientes de cada uno de los seis compuestos evaluados.

Sin embargo, en algunas réplicas fue posible evidenciar un cambio en la línea de base de la señal electroantenográfica, denotando una respuesta de la antena frente al ácido isobutírico utilizando como preparación electroantenográfica una única antena montada (**figura 3.6**). En esta figura se muestran cuatro réplicas con una clara respuesta de la antena (señalado en rojo) en la parte superior de los gráficos y los cromatogramas con los picos de los compuestos representados en la parte inferior.

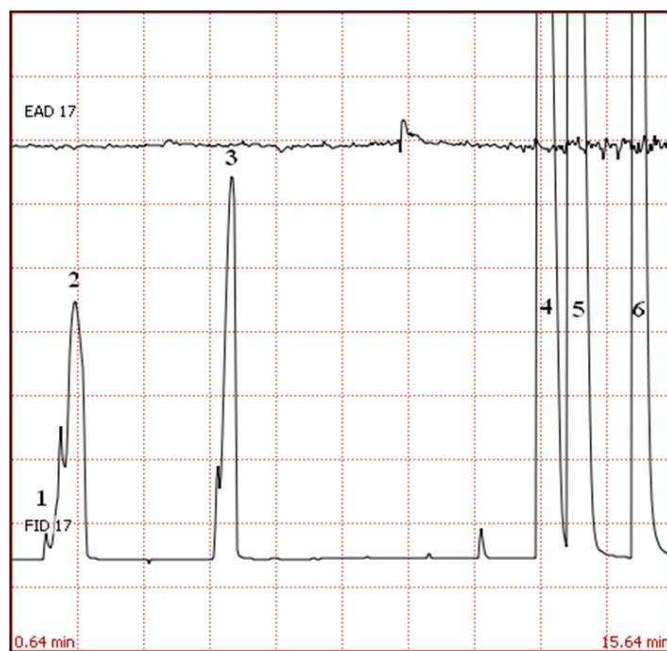


Figura 3.5: Ejemplo de una señal electroantenográfica (curva superior) acoplada al cromatograma (TIC) (curva inferior) de cada uno de los 6 compuestos sintéticos puestos a prueba. En este caso no se obtuvieron respuestas de las antenas. 1: 2-butanona, 2: 3-pentanona, 3: 2-metil-1-butanol, 4: ácido propiónico, 5: ácido butírico, 6: ácido isobutírico. La escala de la señal del EAD es 1 mV/cuadrado de la grilla.

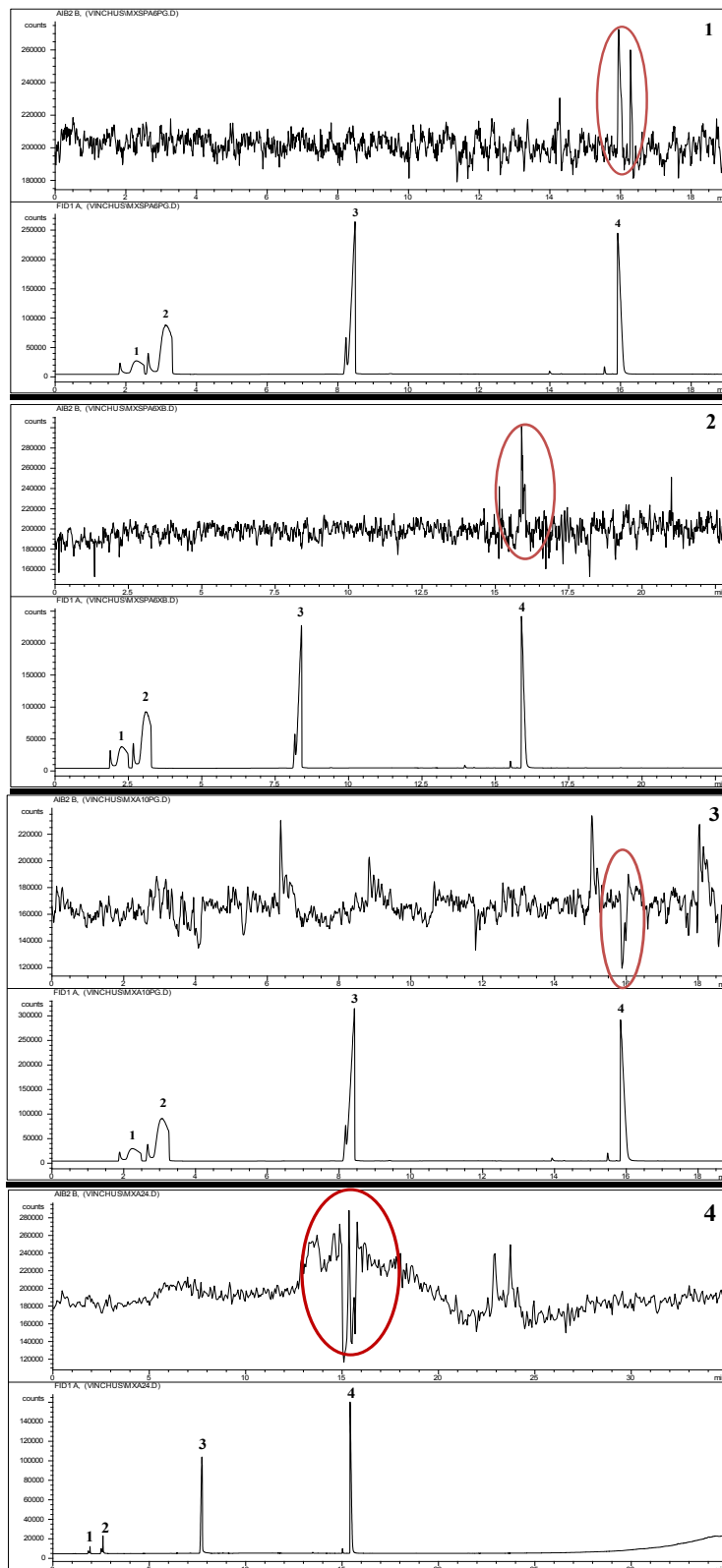


Figura 3.6: Ejemplos de señales electroantenográficas acopladas a cromatogramas (TIC) de los volátiles puestos a prueba. En la parte inferior de cada gráfico (1-4), se observan los picos de cada uno de los compuestos: *1*: 2-butanona, *2*: 3-pentanona, *3*: 2-metil-1-butanol y *4*: ácido isobutírico. En la parte superior de cada gráfico, se observa la señal electroantenográfica y en la inferior los correspondientes cromatogramas. Las antenas respondieron al ácido isobutírico, indicado con un círculo rojo.

Parte 2- Respuesta comportamental de larvas de T. infestans frente a componentes sintéticos de la feromona de alarma presentados individualmente o en mezclas

En la sección anterior se estudió a nivel periférico la respuesta antenal de larvas de *T. infestans* frente a varios componentes individuales de la feromona de alarma liberada por los adultos. En esta parte se evaluó la respuesta comportamental de larvas del 4^{to} estadio de *T. infestans* frente a diferentes volátiles sintéticos previamente identificados como parte de la secreción liberada por los adultos frente a un evento de perturbación. Dichos estímulos olfativos se presentaron individualmente, en mezclas binarias o en mezclas más complejas.

Materiales y Métodos

-Animales

Para todos los ensayos, se utilizaron larvas de 4^o estadio de *T. infestans* con 15-25 días de ayuno post-ecdisis, las cuales fueron criadas en nuestro laboratorio bajo condiciones controladas (ver sección *-Animales* de la Parte I). Se usó un total de 1080 larvas. Los insectos fueron utilizados una única vez y luego descartados.

Todos los experimentos fueron realizados durante las primeras horas de la escotofase (*i.e.*, 1-5h luego de que la luz se apagara) abarcando el período de máxima actividad observada para las vinchucas (Lazzari, 1992). A su vez, los experimentos fueron llevados a cabo en condiciones de oscuridad funcional, respetando así la fase del fotoperíodo en el cual los animales se encontraban y evitando, además, la posible utilización de señales visuales por parte de las vinchucas durante los ensayos. La temperatura y la humedad relativa del cuarto experimental utilizado fueron mantenidas a $25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ y $40 \pm 10\%$, respectivamente.

-Dispositivo y procedimiento experimental

Para medir la respuesta comportamental de larvas de 4^o estadio de *T. infestans* enfrentadas a volátiles sintéticos presentados individualmente o en mezclas, se usó el mismo olfatómetro utilizado en los Capítulos 1 y 2 (**figura 1.1**). Brevemente, el dispositivo consiste en una arena experimental rectangular de 10x15x4 cm, a la cual se le pueden conectar dos frascos-estímulo (10 ml), portadores de distintos estímulos

químicos que eran sembrados sobre un papel de filtro (0,5 x 2,5 cm). En cada ensayo individual, un frasco fue utilizado como control, es decir sólo el solvente (50 µl de diclorometano (DCM) Merck®) era colocado sobre el papel, y el otro frasco fue utilizado para el estímulo, es decir, diferentes dosis de alguno de los volátiles sintéticos probados (disueltos en 50 µl de DCM) eran colocados sobre el papel de filtro. Como sustrato de la arena experimental se utilizó un papel de filtro con pequeños orificios coincidentes con los orificios (2 mm) de la base del dispositivo. De esta forma se conseguía un gradiente químico al nivel de la base de la arena. El comportamiento de las larvas era registrado con una video cámara. El sustrato de papel fue cambiado luego de cada ensayo para evitar cualquier tipo de contaminación química dejada por las larvas, *e.g.*, las heces. Para evitar el posible efecto de una heterogeneidad espacial en la distribución de las larvas sobre la arena experimental, la posición de los estímulos fue alternada al azar entre los ensayos. Para comenzar el registro comportamental, ambos frascos estímulo eran conectados a la sub-cámara y una larva de 4° estadio era luego ubicada en el medio de la arena experimental, cubierta con un pequeño frasco invertido durante un minuto para permitir la familiarización con el contexto y la difusión de los olores. De esta manera, los volátiles provenientes de los frascos estímulo ingresaban por difusión independientemente en cada una de las partes de la sub-cámara y continuaban difundiendo a través de los pequeños orificios hacia la arena experimental donde se encontraba la larva a testear, creando un gradiente químico. Luego, la larva era liberada con delicadeza retirando el pequeño frasco que la cubría y su comportamiento era registrado durante cuatro minutos mediante una video cámara sensible a luz infrarroja conectada a una grabadora digital (Videoman®).

La posición de los estímulos químicos fue alternada al azar entre los ensayos, evitando una eventual heterogeneidad espacial.

-Estímulos químicos utilizados

En los experimentos comportamentales se utilizaron como estímulo compuestos volátiles identificados como componentes de la secreción liberada por las vinchucas adultas perturbadas. Se eligieron 8 compuestos químicos (ver **tabla 3.1**) utilizando 3 criterios conjuntamente: 1) la naturaleza química o grupo funcional, eligiendo ácidos,

cetonas y alcoholes, 2) el origen del compuesto químico, eligiendo aquellos liberados por las glándulas de Brindley, por las metasternales y por ambas; y 3) la proporción presente en la secreción liberada por los adultos perturbados, eligiendo los más representados según Manrique *et al.* (2006). De cada uno de estos volátiles se prepararon diferentes soluciones (0,1; 10 y 1000 µg/50 µl), utilizando DCM como solvente. Para cada una de las dosis se realizaron 40 réplicas.

Además, se llevaron a cabo tratamientos control, colocando DCM en ambos frascos portadores de estímulo, realizados paralelamente junto con los ensayos de los compuestos volátiles a evaluar, a fin de advertir cualquier comportamiento inherente a los insectos independiente de la respuesta a los volátiles sometidos a prueba.

Tabla 3.1: Volátiles sintéticos utilizados en el análisis comportamental de las larvas de *T. infestans*

Compuesto	Naturaleza química	Origen (glándula)	Proporción presente (%) ^a	Masa (µg)	Nº C	Procedencia Compuesto
Ácido isobutírico	ácido	Brindley	48,25	11,36 ^b	4	Sigma-Aldrich®, Alemania, 98% pureza
Ácido butírico	ácido	Brindley	0,4	0,09 ^c	4	Fisher®, U.S.A., 98 % pureza
Ácido propiónico	ácido	Brindley	3,95	0,92 ^c	3	E. Merck®, Alemania, 98 % pureza
Ácido acético	ácido	Brindley	1,8	0,42 ^c	2	Anedra®, Argentina, 98% pureza
3-pentanona	cetona	Metast.	0,35	0,08 ^c	5	Sigma®, Alemania, 98% pureza
2-butanona	cetona	Brindley y Metast.	0,4	0,09 ^c	4	Sigma®, Alemania, 99% pureza
2-metil-1-butanol	alcohol	Brindley y Metast	28,2	6,64 ^c	5	Sigma®, Alemania, 99% pureza
2-metil-1-propanol	alcohol	Brindley	4,8	1,13 ^c	4	Sigma®, Alemania, 98% pureza

^a Proporción presente en el *headspace* de adultos perturbados según Manrique *et al.* (2006).

^b Masa obtenida de la cuantificación realizada mediante cromatografía gaseosa en el capítulo 2 de esta Tesis (1EA).

^c Masas estimadas a partir de la masa del ácido isobutírico (1 EA) y de la proporción presente en el *headspace* de adultos perturbados.

Metast.: Metasternales

Nº C: número de carbonos

Luego de la primera serie experimental de ensayos comportamentales utilizando compuestos individuales, se realizaron mezclas binarias con aquellos volátiles que generaron una respuesta de escape significativa en las larvas. Para cada mezcla, se fijó uno de los compuestos activos comportamentalmente en la dosis en la cual la respuesta de escape fue observada y se la combinó con 0,1; 10 o 1000 μg de los otros volátiles activos. Las soluciones de mezclas binarias se prepararon en DCM manteniendo el volumen de líquido sembrado en el papel de filtro, es decir 50 μl , asegurándose que una vez que el solvente se haya evaporado la cantidad de soluto de cada compuesto de interés que queda en el papel para estimular a la larva sea la deseada. Para cada una de las combinaciones binarias se realizaron 20 réplicas.

Por otro lado, se realizaron mezclas binarias de compuestos activos manteniendo la proporción entre ellos presente en la secreción liberada por los adultos perturbados reportada por Manrique *et al.* (2006). En el Capítulo 2 de esta Tesis, a través del estudio cuantitativo con cromatografía de gases, se demostró que un adulto sin perturbar de esta especie presenta sus glándulas de Brindley llenas con 11,36 μg de ácido isobutírico (=1EA). Al disponer únicamente de dicho valor absoluto de masa contenida en las glándulas de adultos para el ácido isobutírico, se estimó la masa de cada uno de los otros compuestos utilizados para realizar mezclas considerando las proporciones descritas por Manrique y colaboradores (2006). Las soluciones de las mezclas también se prepararon manteniendo el volumen sembrado en el papel de filtro, es decir 50 μl , asegurándose que una vez que el solvente (DCM) se haya evaporado, la cantidad de soluto de cada compuesto de interés sea la buscada. En este caso, dicha masa dependerá de la proporción presente de cada compuesto (ver **tabla 3.1**, masa).

Por último se realizaron 2 mezclas complejas: una con los 4 compuestos que resultaron activos individualmente y otra con los 8 compuestos puestos a prueba, en ambos casos respetando las proporciones encontradas en secreciones de adultos perturbados (Manrique *et al.*, 2006). Un total de 20 réplicas fue realizado para cada tratamiento.

-Análisis de datos

Del mismo modo que en el Capítulo 1 y 2, se analizaron los videos mediante el uso de un programa de análisis de datos (del tipo “The Observer 2.01”, Noldus Information Technology, The Netherlands). Para cada individuo se registró su preferencia olfativa en función del gradiente químico formado por la presencia de olores individuales o mezclas de los mismos colocados en uno de los lados de la arena experimental. Se registró así el tiempo transcurrido en cada lado de la arena experimental y se calculó el índice de preferencia (IP) descrito anteriormente. Este índice podía tomar valores de -1 a 1, correspondiendo -1, 0, o 1, a repelencia, una distribución al azar o atracción al estímulo, respectivamente. Las desviaciones de una distribución al azar (es decir, $IP=0$) de las larvas sobre la arena experimental para cada tratamiento fueron evaluadas con *T-Test* de 1 muestra. Además, se compararon las respuestas de escape generadas por los compuestos individuales o mezclas de compuestos activos (*i.e.*, aquellos que generaron una distribución distinta del azar) con la respuesta observada en las larvas enfrentadas a la feromona de alarma completa (resultados obtenidos en el capítulo 2) a través de *T-Test*.

Resultados

-Respuesta comportamental de larvas de T. infestans frente a volátiles individuales de la feromona de alarma

Si bien la respuesta de escape de las vinchucas a la feromona de alarma y al componente mayoritario de la misma (*i.e.*, el ácido isobutírico) ya ha sido reportada, presentamos aquí evidencias de la función de otros componentes químicos presentes en menor proporción y su aporte relativo como componentes funcionales del comportamiento de escape generado sobre las vinchucas. Las diferentes dosis de los principales componentes de la secreción liberada por los adultos frente a un evento de perturbación presentadas individualmente generaron diferentes respuestas comportamentales (**figura 3.7**). De las tres dosis probadas para cada uno de los ocho compuestos, las larvas de *T. infestans* evitaron el sector de la arena experimental donde se habían liberado 10 µg de ácido isobutírico (*T-Test* de 1 muestra, IP = -0,09; $p=0,04$, **figura 3.7A**), 10 µg de ácido butírico (*T-Test* de 1 muestra IP = -0,35; $p=0,0001$, **figura 3.7B**), 10 µg de ácido acético (*T-Test* de 1 muestra IP = -0,27; $p=0,004$, **figura 3.7D**) y 10 µg de 2-metil-1-butanol (*T-Test* de 1 muestra IP = -0,21; $p=0,02$, **figura 3.7G**). Sin embargo, las larvas de *T. infestans* mostraron una distribución al azar frente a la presencia del resto de las dosis puestas a prueba de estos compuestos (*T-Test* de 1 muestra, $p>0,05$ para todos los casos). El mismo resultado se obtuvo para todas las dosis evaluadas de los demás compuestos, es decir 0,1, 10 y 1000 µg. de ácido propiónico, 3-pentanona, 2-butanona y 2-metil-1-propanol (*T-Test* de 1 muestra, $p>0,05$ para todos los casos, **figura 3.7C, E, F y H**, respectivamente).

Paralelamente a cada serie experimental se realizaron las series experimentales control (*i.e.*, DCM en ambos frasco estímulo). En todos los casos las larvas de *T. infestans* exhibieron una distribución al azar sobre la arena experimental (*T-Test* de 1 muestra, $p>0,05$ para todos los casos).

Por otro lado, ninguna de las respuestas de escape obtenidas (*i.e.*, 10 µg de ácido isobutírico, butírico, acético y de 2-metil-1-butanol) resultó ser diferente de la respuesta generada por la feromona de alarma completa (Resultados obtenidos en el Capítulo 2) (*T-Test*, $p>0,05$ en todos los casos).

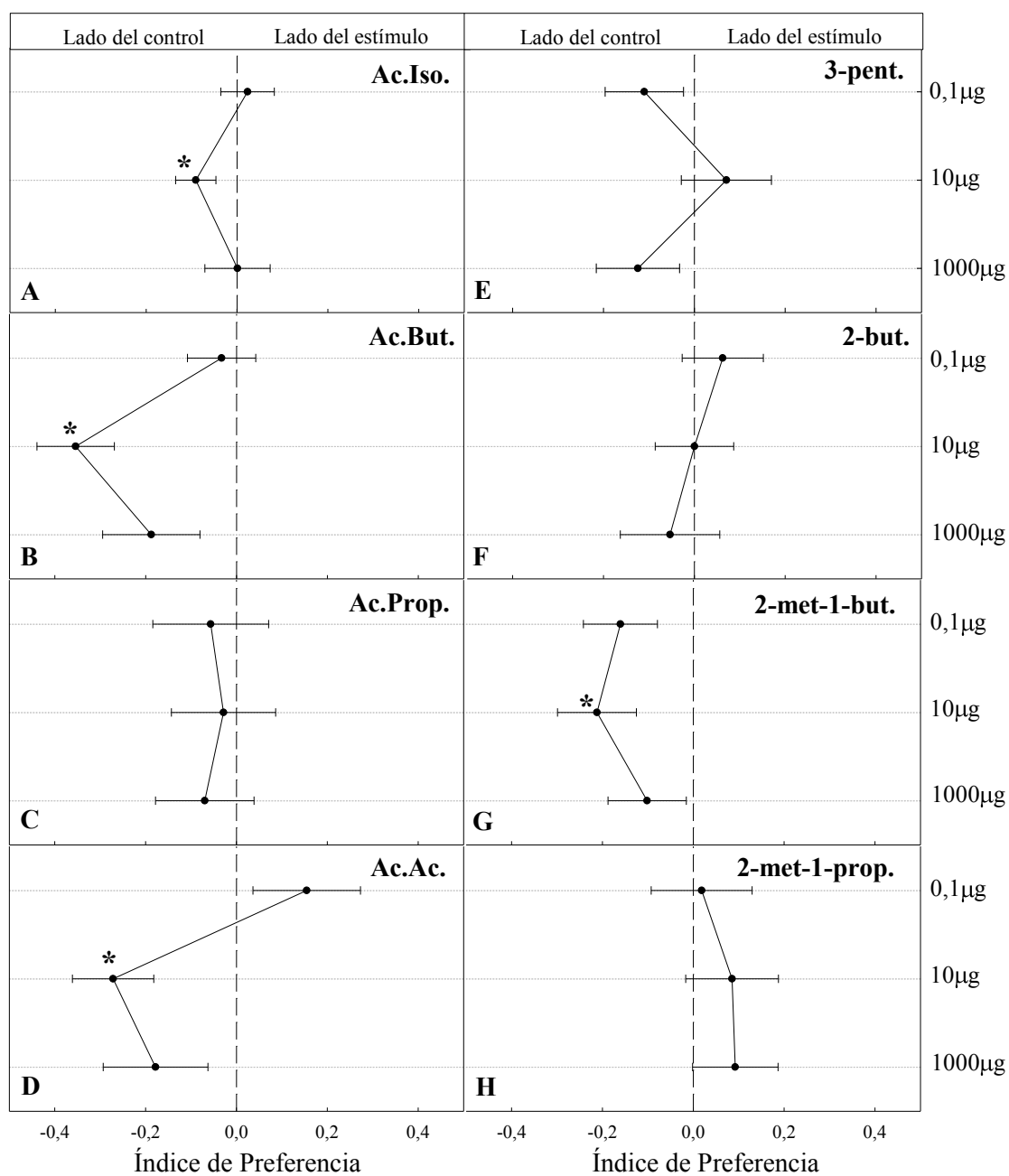


Figura 3.7: Preferencia espacial de larvas de *T. infestans* enfrentadas a volátiles individuales de la feromona de alarma. Las larvas mostraron una respuesta de escape frente a las dosis de 10 μg de ácido isobutírico, 10 μg de ácido butírico, 10 μg de ácido acético y 10 μg de 2-metil-1-butanol. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a una distribución al azar, *i.e.* IP = 0 (*T-Test* de 1 muestra, $p < 0,05$). N=40 para cada tratamiento. A) *Ac.Iso.*: ácido isobutírico, B) *Ac. But.*: ácido butírico, C) *Ac.Prop.*: ácido propiónico, D) *Ac.Ac.*: ácido acético, E) *3-pent.*: 3-pentanona, F) *2-but.*: 2-butanona, G) *2-met-1-but.*: 2-metil-1-butanol, H) *2-met-1-prop.*: 2-metil-1-propanol. En el eje de las ordenadas están representadas las dosis evaluadas.

-Respuesta comportamental de larvas de T. infestans frente a mezclas binarias de volátiles de la feromona de alarma: dosis activas

Las respuestas comportamentales a mezclas de estímulos suelen ser complejas y no lineales, efecto causado por diferentes procesos e interacciones ya sea a nivel químico o a nivel sensorial. Para evaluar posibles efectos combinados entre los compuestos volátiles activos, es decir, aquellos en los cuales se observó una respuesta de escape significativa (*i.e.*, ácido isobutírico, butírico, acético y 2-metil-1-butanol, ver **figura 3.7**), se analizó el comportamiento de la larvas expuestas a mezclas de los mismos. Fijando uno de los cuatro compuestos activos en la dosis en la cual se observó respuesta de evitación, se realizaron mezclas binarias combinándolo con todas las dosis de los otros 3 compuestos activos. De esta manera, se estimuló a los insectos con las siguientes mezclas binarias de olores:

- 10 µg de ácido isobutírico + 0,1; 10 o 1000 µg de ácido butírico, ácido acético o 2-metil-1-butanol.
- 10 µg de ácido butírico + 0,1; 10 o 1000 µg de ácido isobutírico, ácido acético o 2-metil-1-butanol.
- 10 µg de ácido acético + 0,1; 10 o 1000 µg de ácido isobutírico, ácido butírico o 2-metil-1-butanol.
- 10 µg de 2-metil-1-butanol + 0,1; 10 o 1000 µg de ácido isobutírico, ácido butírico o ácido acético.

Los resultados de estas series experimentales muestran que las larvas presentaron una respuesta de escape frente a la mezcla formada por 10 µg de ácido isobutírico + 0,1 µg de 2-metil-1-butanol (*T-Test* de 1 muestra, $IP = -0,19$; $p=0,002$, **figura 3.8A**) y, sorprendentemente, ningún comportamiento de orientación se observó frente a las otras mezclas de 10 µg de ácido isobutírico + las otras sustancias (*T-Test* de 1 muestra, $p>0,05$ para todos los casos).

A su vez, de las mezclas que contenían 10 µg de 2-metil-1-butanol fijo (**figura 3.8B**), las larvas sólo evitaron el lado de la arena experimental que contenía dicho compuesto + 0,1 µg de ácido acético (*T-Test* de 1 muestra, $IP = -0,29$; $p=0,02$). En los tratamientos con las mezclas de 10 µg de 2-metil-1-butanol + los otros compuestos

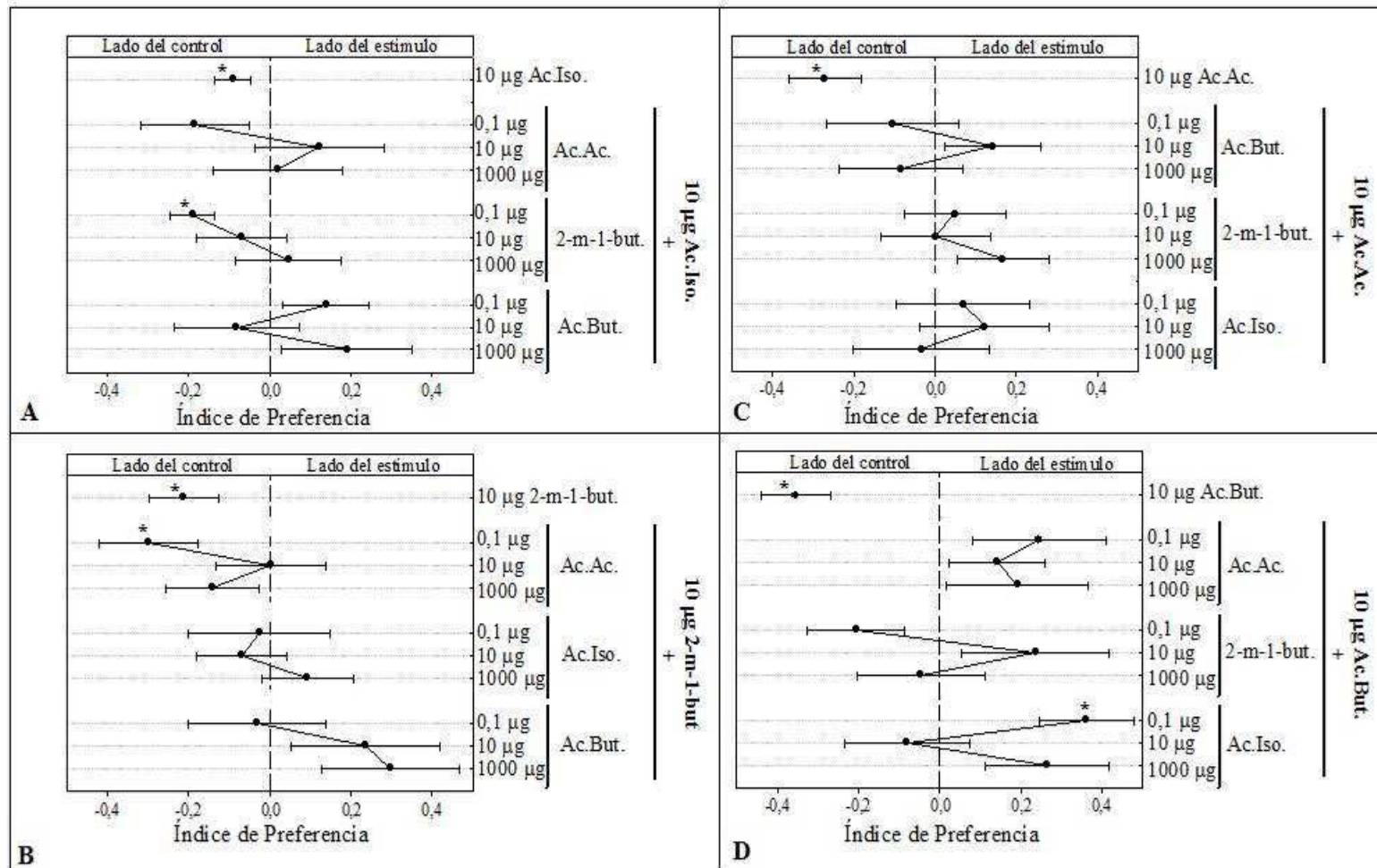


Figura 3.8: Preferencia espacial de larvas de *T. infestans* frente a mezclas binarias de los componentes activos de la feromona de alarma. Las larvas evitaron el lado de la arena que contenía:: 10 µg de ácido isobutírico + 0,1 µg de 2-metil-1-butanol (A) y 10 µg de 2-metil-1-butanol + 0,1 µg de ácido acético (B) y fueron atraídas por 10 µg de ácido butírico + 0,1 µg de ácido isobutírico (D). Un total de 20 réplicas fue realizado para cada tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas de una distribución al azar, *i.e* IP = 0 (*T-Test* de 1 muestra, $p < 0,05$). *Ac.Iso.*: ácido isobutírico, *Ac. But.*: ácido butírico, *Ac.Ac.*: ácido acético, *2-met-1-but.*: 2-metil-1-butanol.

volátiles, no se observó respuesta de orientación (*T-Test* de 1 muestra, $p > 0,05$ para todos los casos, **figura 3.8B**).

Si bien en las series experimentales donde se pusieron a prueba los compuestos individualmente, las larvas mostraron una respuesta de escape frente a 10 μg de ácido acético (**figura 3.7D**), el agregado de todas las dosis de los otros 3 compuestos activos hizo desvanecer dicha respuesta (*T-Test* de 1 muestra, $p > 0,05$ para todos los casos) (**figura 3.8C**).

En contraste con las respuestas observadas en el resto de las mezclas evaluadas, las larvas mostraron un comportamiento de atracción cuando fueron expuestas a la mezcla de 10 μg de ácido butírico + 0,1 μg de ácido isobutírico (*T-Test* de 1 muestra, $IP = 0,36$, $p = 0,005$, **figura 3.8D**). No se encontró una orientación diferente del azar con el resto de las mezclas de 10 μg de ácido butírico y los otros volátiles (*T-Test* de 1 muestra, $p > 0,05$ para todos los casos).

*-Respuesta comportamental de larvas de *T. infestans* frente a mezclas binarias y complejas de volátiles de la feromona de alarma: dosis naturales*

En el punto anterior se realizaron mezclas binarias seleccionando las dosis que presentadas individualmente resultaron ser comportamentalmente activas. En esta parte, las mezclas fueron realizadas a partir de datos presentados en esta misma Tesis (ver Capítulo 2) que describen la cantidad de ácido isobutírico presente en las glándulas de los adultos de *T. infestans*, y de Manrique y colaboradores (2006) que describen las proporciones de los compuestos aquí evaluados presentes en la secreción liberada durante un evento de perturbación. De acuerdo a dichos resultados, se llevaron a cabo series experimentales con mezclas binarias y cuaternarias utilizando los compuestos que resultaron activos al ser presentados individualmente (ver **figura 3.7**). Además se probó una mezcla incluso más compleja incluyendo los 8 compuestos probados individualmente, siempre manteniendo la proporción presente en la feromona de alarma (ver **tabla 3.1**). De este modo, las larvas fueron enfrentadas a las siguientes mezclas:

-11,36 μg de ácido isobutírico + 0,09 μg de ácido butírico

-11,36 μg de ácido isobutírico + 0,42 μg de ácido acético

-11,36 μg de ácido isobutírico + 6,64 μg de 2-metil-1-butanol

-0,09 μg de ácido butírico + 0,42 μg de ácido acético

Discusión

En este capítulo se analiza la contribución individual de distintos volátiles, componentes de la feromona de alarma liberada por los adultos de *T. infestans* durante un evento de perturbación. En una primera parte, mediante técnicas electrofisiológicas se intentó determinar la percepción de las vinchucas a nivel periférico en relación a diversos componentes individuales de la feromona de alarma. Aunque nuestra intención era utilizar la técnica de electroantenografía olfativa para realizar un primer filtro que nos ayude a seleccionar experimentalmente los compuestos activos de la feromona de alarma que podrían generar una respuesta comportamental de escape, fue baja la eficiencia de registros electrofisiológicos obtenidos. A pesar de esto, se obtuvieron datos en los que se observó una respuesta clara al ácido isobutírico.

En la bibliografía existen varios trabajos que muestran que la respuesta de la antena podría depender de muchos factores como la naturaleza y concentración del estímulo, el modo de montar la preparación electroantenográfica (Park y Hardie, 1998), el tiempo de vida útil de la preparación electroantenográfica (Park *et al.*, 2002), el número de estimulaciones previas, *i.e.*, la pre-exposición a ciertos volátiles (Stelinski *et al.*, 2003) y la calidad del amplificador. Más aún, la respuesta es también dependiente de la temperatura y de la humedad, como así también del estado fisiológico del insecto (Syntech, 2004). Alguno o más de uno de estos factores pudo haber sido la causa de la escasa respuesta de las antenas en nuestros registros, si bien no puede descartarse la ausencia de verdadera actividad fisiológica de alguno de los volátiles evaluados.

Otro factor importante involucrado en la obtención de respuestas por parte de la antena, es la cantidad de sensilias que ésta posee (Park y Hardie, 1998), dependiendo de la especie y del hábitat que ésta ocupa (Carbajal de la Fuente y Catalá, 2002; Catalá *et al.*, 2004). En particular, en *T. infestans*, Bernard (1974) describió dos tipos de sensilias olfativas: basicónicas y *grooved-peg* en las antenas de las larvas de esta especie. Posteriormente, otros autores estudiaron su función realizando registros de sensilia única, demostrando que las sensilias “*grooved-peg*” son capaces de responder a ácidos de cadena corta como el ácido isobutírico y el ácido butírico, y a la secreción liberada por adultos perturbados (Taneja y Guerin, 1997; Guerenstein y Guerin, 2001).

De los antecedentes bibliográficos surge que los registros electrofisiológicos antennales de triatominos son escasos y, además, en su gran mayoría no se hace referencia a la proporción de respuestas negativas y positivas obtenidas. Aunque esto es generalmente habitual en estudios de electrofisiología, sugiere que los triatominos y heterópteros en general constituyen un modelo experimental difícil que requiere de una mayor puesta a punto para este tipo de estudios.

Por otro lado, en los ensayos comportamentales del presente capítulo, se pusieron a prueba distintas dosis de varios componentes de la feromona de alarma; considerando diversos grupos funcionales, procedencia del tipo de glándula (metasternales y/o de Brindley) y abundancia en la feromona de alarma. Observamos que las respuestas de escape obtenidas fueron variables. Es decir, las larvas mostraron una respuesta de escape frente a algunos ácidos, pero no a todos; sólo a un alcohol y a ninguna cetona. A su vez, todas las respuestas de escape se observaron frente a algunos compuestos provenientes de las glándulas de Brindley (ácido isobutírico, ácido butírico, ácido acético), frente a 2-metil-1-butanol proveniente de ambos tipos de glándulas, pero no presentaron respuesta frente a los compuestos exclusivos de las glándulas metasternales. Estos resultados revelan que las glándulas metasternales no estarían asociadas a la función de alarma; apoyando las evidencias que sostienen que estas glándulas estarían envueltas en la comunicación sexual y las de Brindley en la de alarma y/o defensa (Crespo y Manrique, 2007; Pontes *et al.*, 2008; Vitta *et al.*, 2009; Zacharias *et al.*, 2010; May-Concha *et al.*, 2012; Manrique y Lorenzo, 2012; Lazzari *et al.*, 2013).

Cabe destacar que ningún compuesto activo evocó una respuesta de escape mayor que la promovida por la feromona de alarma completa liberada por el adulto perturbado, sugiriendo que en la respuesta están involucrados varios volátiles y que no es sólo un compuesto el responsable del rol de feromona de alarma, como se postula, en general, para el ácido isobutírico. Además, al realizar las mezclas de los compuestos activos, intentando analizar posibles interacciones sinérgicas, en ningún caso se logró aumentar la respuesta de escape obtenida frente a los volátiles evaluados individualmente. Adicionalmente, se observó que dos volátiles individualmente activos y repelentes, resultaron no ser activos al presentarlos en una mezcla, desvaneciéndose el efecto por completo. Más aún, las larvas mostraron un

comportamiento de atracción cuando fueron expuestas a la mezcla de 10 µg de ácido butírico + 0,1 µg de ácido isobutírico, dos compuestos individualmente repelentes. Posteriormente, al analizar mezclas con dosis que se encuentren en una relación de proporciones similar a la conocida para la feromona de alarma de *T. infestans* según Manrique *et al.* (2006), no se observó ningún tipo de respuesta., *i.e.*, las larvas se distribuyeron al azar en la arena experimental utilizada.

La percepción de una mezcla de olores es un proceso extremadamente complejo y que para entenderlo en profundidad requiere de la utilización de técnicas electrofisiológicas no sólo a nivel periférico, sino también a nivel de centros superiores del sistema nervioso central, como los lóbulos antenales o cuerpos pedunculados. Podría ocurrir que los componentes de una mezcla sean detectados en primera instancia por un solo receptor o por más de uno. Si existe más de un receptor entonces podría ocurrir que en el primer centro de integración olfativa de los insectos, el lóbulo antenal, exista algún tipo de integración tanto excitatoria o inhibitoria. Incluso podría ocurrir que la información que llegue a los cuerpos pedunculados y lóbulos laterales sea nuevamente procesada en estos centros nerviosos. Toda esta posible red neuronal hace que no se pueda explicar con certeza porqué obtuvimos casos en los que dos dosis de compuestos repelentes, por ejemplo, se conviertan en neutras al presentarse juntas.

Nuestro trabajo, sin embargo, constituye el primer reporte que describe el comportamiento de larvas de *T. infestans* enfrentadas a otros componentes individuales de la feromona de alarma, además del ácido isobutírico. A su vez, es el primer trabajo que analiza el efecto de mezclas binarias de estos compuestos, ya sea, con dosis comportamentalmente activas o con dosis que respetan las proporciones naturales de la feromona de alarma, mezclas cuaternarias e incluso una mezcla que incluye a ocho compuestos liberados por adultos perturbados.

Con respecto a los compuestos volátiles que se evaluaron en ensayos comportamentales en este capítulo, existen trabajos que describen su rol en diferentes especies de insectos. Si bien nosotros no observamos respuestas diferentes del azar frente a las cetonas, la 2-butanona forma parte de la feromona de alarma liberada por la chinche de cama *Cimex lectularius*, un hemíptero hematófago (Levinson *et al.*,

1974). Por otro lado, la 3-pentanona es uno de los compuestos liberados por la cucaracha *Periplaneta americana*, componente de la alomona de defensa (Brossut, 1983). Además, ambas cetonas forman parte de los volátiles emitidos por las glándulas metasternales de *T. infestans*, entre otros compuestos, siendo la 3-pentanona el componente principal, estando estas glándulas involucradas en la promoción de la cópula y en el comportamiento de agregación de machos en torno a la pareja en cópula descrito en esta especie (Manrique y Lazzari, 1995; Manrique *et al.*, 2006; Crespo y Manrique, 2007).

De los dos alcoholes puestos a prueba en este trabajo, sólo observamos una respuesta frente al 2-metil-1-butanol. Según la bibliografía, este compuesto no está muy asociado a la comunicación entre insectos; aunque fue descrito en el trabajo de Dettner y Reissenweber (1991) como parte de la secreción defensiva liberada por dos especies de coleópteros, además de formar parte tanto de los volátiles de las glándulas de Brindley como de las metasternales en *T. infestans* (Manrique *et al.*, 2006).

En lo que respecta a los ácidos grasos, posiblemente por su naturaleza ácida, éstos se encuentran en muchas especies de insectos como componentes de secreciones defensivas; *i.e.*, alomonas de defensa o feromonas de alarma. Incluso, el ácido acético, el ácido butírico, el ácido isobutírico y el ácido 2-metilbutírico suelen encontrarse actuando conjuntamente (Aldrich y Yonke, 1975; Burguer *et al.*, 1986; Davidson *et al.*, 1989; Fortunato *et al.*, 2001; Attygale *et al.*, 2004).

Si bien es clara la diferencia que existe entre una feromona de alarma y una alomona de defensa; involucrada la primera en la comunicación intraespecífica alertando sobre un potencial peligro y la segunda, como compuesto defensivo contra predadores; muchas veces un único compuesto puede cumplir ambas funciones. Esta dualidad funcional, denominada *Parsimonia semioquímica*, *i.e.*, el uso de un mismo producto químico como un generador de diferentes comportamientos, es común en artrópodos (Blum, 1996). Por otra parte, se conoce que ocurren cambios funcionales de compuestos defensivos en muchas especies de insectos donde los compuestos han sido cooptados funcionando como feromonas de agregación, sexuales, de alarma y de marcado (Steiger *et al.*, 2011). Esto podría haber ocurrido con las cetonas de *T. infestans* y su función asociada a feromonas sexuales.

Los ácidos grasos de cadena corta, tales como el ácido isobutírico, el ácido butírico y el ácido acético están comúnmente presentes en los olores de los vertebrados, hospedadores de los triatominos, como en los olores de perros domésticos (Preti *et al.*, 1976), en el aliento (Cork y Park, 1996) y en las axilas (Zeng *et al.*, 1991) de los humanos. Aunque el ácido isobutírico puede evocar respuestas de escape cuando es liberado a altas dosis desde las glándulas de Brindley de adultos perturbados, este compuesto puede tener otra función como clave para la localización de la fuente de alimento a dosis bajas, relacionadas con olores de hospedadores (Schofield, 1975; Ward, 1981; Guerenstein y Guerin, 2001). Esto también podría estar ocurriendo con los ácidos butírico y acético, ya que están presentes en olores de hospedadores (Barrozo y Lazzari, 2004a) y en feromonas de agregación presentes en las heces de triatominos (el ácido acético) (Cruz-López y Morgan, 1995; Mota *et al.*, 2014) y a su vez, evocan una respuesta de escape en las larvas de *T. infestans*, como se observó en los resultados de este capítulo.

En contraste con otros insectos, parece ser que en triatominos, los desencadenantes biológicos específicos, tales como encontrar pareja, buscar refugio y la presencia de peligro y de alimento, no están asociados a compuestos específicos, sino que están asociados a una combinación particular de señales químicas, definida por la mezcla y la dosis de compuestos específicos (Lazzari *et al.*, 2013).

El desarrollo de métodos precisos y fiables de detección temprana en las viviendas infestadas con triatominos es necesario para la prevención efectiva de la enfermedad de Chagas a través del control del vector (Gürtler *et al.*, 2001); ya que el control vectorial es actualmente el único modo factible de reducir la transmisión de esta enfermedad debido a la falta de vacunas y drogas terapéuticas suficientemente efectivas (Coura y Dias, 2009).

En la actualidad, la detección de infestaciones domiciliarias en los programas de control es llevada a cabo por búsqueda manual de insectos triatominos y/o señales de colonización tales como heces, huevos y exuvias (Dias, 2002). En casos de infestación baja, el uso de agentes desalojantes químicos, como por ejemplo Tetrametrina 0,2%, ha sido introducido para generar que los insectos abandonen sus refugios, quedando de este modo expuestos (SUCAM, 1980).

Desde un punto de vista práctico, en un contexto amplio, mezclas químicas basadas en feromonas u olores de hospedadores han sido propuestas como herramientas de costo efectivo y ambientalmente benignas para la detección y control de muchos insectos plagas (Vale *et al.*, 1988; Kline, 2007; El-Sayed *et al.*, 2009). Particularmente para las vinchucas, sus compuestos químicos producidos durante las interacciones intra e interespecíficas podrían ser útiles en el desarrollo de estrategias nuevas para monitorear y/o controlar las poblaciones de triatominos domésticos (Lazzari y Lorenzo, 2009). Los adultos y las larvas de *T. infestans* ocupan predominantemente hábitats domésticos viviendo en contacto directo con los humanos, aunque estos insectos están también asociados a ambientes peridomésticos tales como criaderos de gallinas, pavos y otras aves de corral (Schofield, 1994; Gürtler *et al.*, 1996). Considerando que estos insectos son de hábitos nocturnos encontrándose refugiados en hendiduras de las viviendas durante el día, los componentes activos de la feromona de alarma, liberados por los adultos durante un evento de perturbación, podrían ser utilizados como agentes desalojantes naturales, reemplazando a los agentes químicos, esparciéndolos en los refugios de los triatominos.

A partir de los resultados obtenidos en este capítulo de la Tesis, donde se demostró que varios volátiles componentes de la feromona de alarma generan una respuesta de escape en las larvas de *T. infestans*, se podría plantear un estudio a campo, similar al realizado por Minoli *et al.* (2013), quienes trabajaron en condiciones pseudo-naturales con el fin de analizar su efecto desalojante de manera tal de encontrar una herramienta de monitoreo y control que reemplace a los agentes químicos utilizados hasta el momento.

Apéndice II: Conceptos teóricos de las técnicas utilizadas.

Electrofisiología

Las técnicas electrofisiológicas han sido muy útiles en el aislamiento, identificación y dilucidación de los roles comportamentales y fisiológicos de los semioquímicos, sobre todo en los insectos, en los cuales los quimiorreceptores son de fácil acceso. Estas técnicas incluyen el electroantenograma para registros de la antena entera del insecto (EAG), la técnica de corte de sensilia- única para el registro de una única célula (SCR sigla en inglés: *single cell recording*) de los quimiorreceptores olfativos, la técnica de microelectrodo de tungsteno para el registro de SCR de los quimiorreceptores olfativos y la técnica del registro en el extremo distal de sensilias de quimiorrecepción de contacto (Millar y Haynes, 1998).

-Electroantenografía (EAG)

La electroantenografía es una técnica ampliamente utilizada en entomología experimental para la detección de volátiles percibidos por el sistema olfatorio ubicado principalmente en las antenas de los insectos. El método está basado en el trabajo de Schneider (1957), quien registró pequeñas fluctuaciones de voltaje entre el extremo y la base de la antena del macho del gusano de seda *Bombyx mori* durante la estimulación con feromona de la hembra. Aunque el mecanismo preciso que existe detrás de la señal electroantenográfica es desconocido, se asume generalmente que la fluctuación de voltaje medida es causada por despolarizaciones eléctricas de las neuronas olfatorias que perciben el estímulo en la antena de los insectos. Al recibir un estímulo químico activo, los receptores olfativos específicos presentes en las dendritas de las neuronas sensoriales correspondientes desencadenan un proceso de intercambio iónico que termina con la generación de potenciales de acción, los cuales transmiten la señal olfativa a diferentes centros de integración olfativa como los lóbulos antenales, los cuerpos pedunculados y los lóbulos laterales (Chapman, 1998; Hansson, 1999; Hansson, 2002; Van der Goes van Naters y Carlson, 2006) (**figura II.1**).

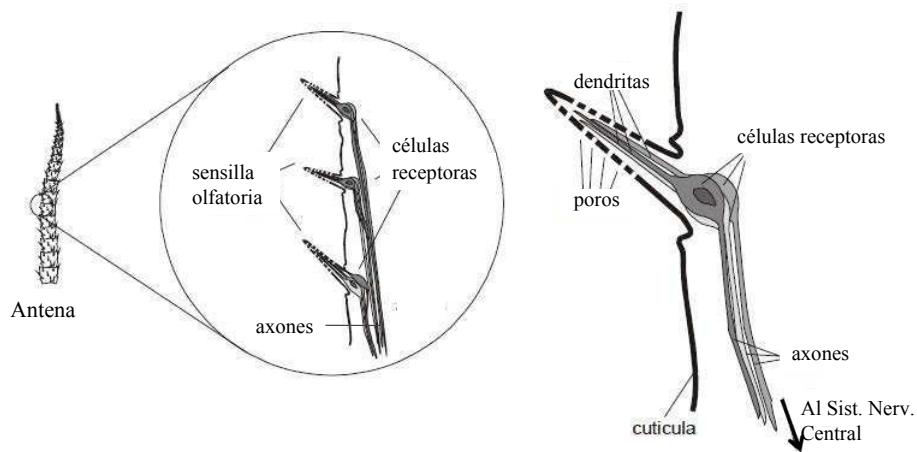


Figura II.1: Representación esquemática de la antena de insecto. Se muestra en detalle una sensilla olfatoria y las células receptoras asociadas que transmiten la señal al sistema nervioso central al recibir un estímulo químico. (Modificado de Syntech, 2004).

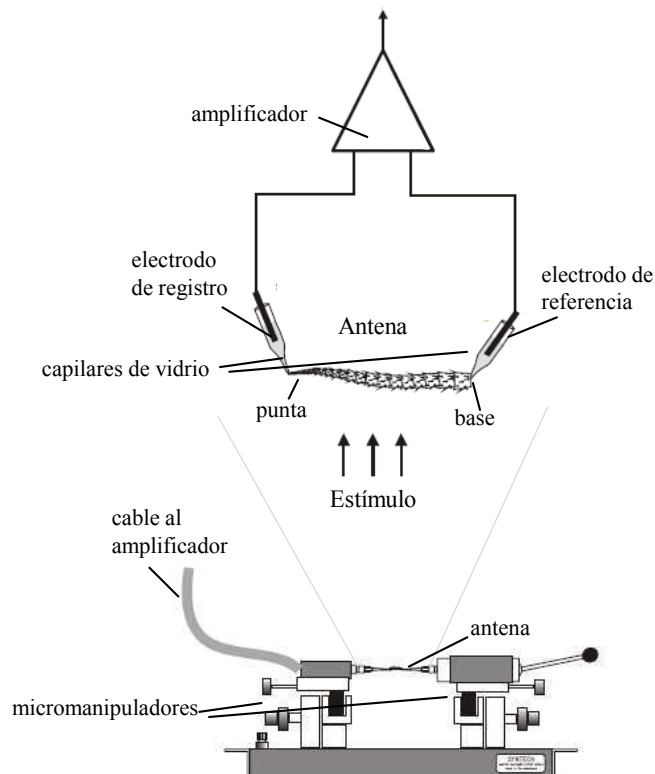


Figura II.2: Montaje de la antena del insecto para la realización de la técnica electroantenográfica. La antena del insecto es montada entre capilares de vidrio. Los mismos presentan en su interior a los electrodos y están rellenos de solución eléctricamente conductiva. Modificado de Syntech, 2004.

Existen distintos métodos para el registro electroantenográfico. En un sistema electroantenográfico convencional, la antena es montada entre dos electrodos insertados dentro de capilares de vidrio rellenos con una solución eléctricamente conductiva, solución Ringer o 0,1M KCl (Kaissling, 1995). Dichos electrodos se encuentran conectados a un amplificador de alta impedancia que permite detectar diferencias de potencial que normalmente varían entre 0,1 y 10 mV. El sistema más simple consiste en trabajar únicamente con la antena del insecto, conectando la base de la antena al electrodo de referencia y el extremo de la antena al electrodo de registro (Larsson *et al.*, 2003) (**figura II.2**).

Dependiendo de varios factores, tales como el tipo de insecto, la morfología y el tamaño de la antena, el ruido eléctrico generado por el sistema en sí mismo, etc.; la preparación electroantenográfica puede resultar más o menos conveniente a la hora de obtener un consistente y satisfactorio registro antenográfico. Como alternativa al sistema más simple, también se puede utilizar la cabeza entera del insecto (**figura II.3 B**) o bien el insecto vivo convenientemente inmovilizado, con el electrodo de referencia ubicado en alguna parte del cuerpo, por ejemplo el ojo o el abdomen (Cork y Park, 1996; Park y Hardie, 1998) (**figura II.3 C**). Por otro parte, existe una técnica en la cual las pipetas de vidrio son reemplazadas por electrodos de alambre de acero inoxidable directamente en contacto con la antena a través de un gel conductor (**figura II.3 A**).

Desde su desarrollo, la técnica de EAG se ha utilizado ampliamente en el estudio de los mecanismos olfativos de los insectos y en la caracterización de los componentes de feromonas y atrayentes sintéticos (Roelofs, 1984; Malo *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2000), así como en electroantenografía de campo (Karg y Sauer, 1995). El EAG también ha resultado ser una técnica muy útil en el estudio del efecto de insecticidas (Lucas y Renou, 1992), análogos fluorados de feromonas (Prestwich y Streinz, 1988; Parrilla y Guerrero, 1994; Renou *et al.*, 1997; Sans *et al.*, 1998) u otros compuestos sintéticos (Berger y Estes, 1987) sobre la percepción feromonal de los insectos.

-Cromatografía gaseosa acoplada a electroantenograma (GC-EAG)

La técnica de acoplamiento cromatografía de gases-electroantenografía (GC-EAG) consiste en instalar un divisor a la salida de la columna de un cromatógrafo de gases (ver Capítulo 1) que separe una parte de la muestra inyectada hacia el detector del cromatógrafo y la otra parte hacia el EAG. De esta manera, se puede medir de forma independiente y a su vez, acoplada tanto la respuesta de la antena ante un determinado compuesto volátil como así también la detección de ese compuesto al cual dicha antena está respondiendo (**figura II.4**).

Una de las ventajas de la técnica GC-EAG es que permite descartar compuestos sin actividad biológica y, especialmente, sugerir nuevas moléculas activas para ser evaluadas en estudios de comportamiento.

El GC-EAG se ha convertido en una herramienta muy útil en estudios dirigidos a la identificación de nuevas feromonas de insectos (Cossé *et al.* 1995; Malo *et al.* 2000; Maida y Ziesmann, 2001; Drijfhout *et al.*, 2002; Kong *et al.*, 2007; Salerno *et al.*, 2012) y otros compuestos semioquímicos activos (Cossé *et al.*, 1995; Qiu *et al.*, 2004).

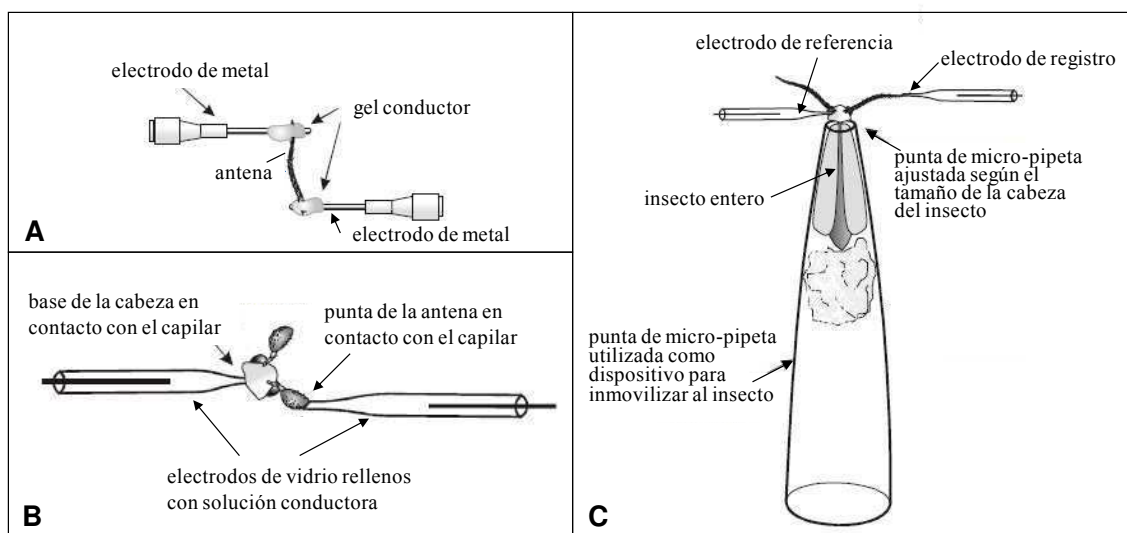


Figura II.3: Diferentes maneras de realizar la preparación de la antena para llevar a cabo el registro antenográfico. A) La antena en contacto directo con los electrodos por medio de un gel conductor para ecografías. B) La cabeza del insecto con un electrodo dentro de un capilar de vidrio con solución Ringer, actuando como electrodo de referencia, conectado a la base de la cabeza y el otro electrodo de registro conectado al extremo de la antena. C) El insecto entero inmovilizado, con el electrodo de referencia en el ojo y el electrodo de registro en la antena. (Modificado de Syntech, 2004).

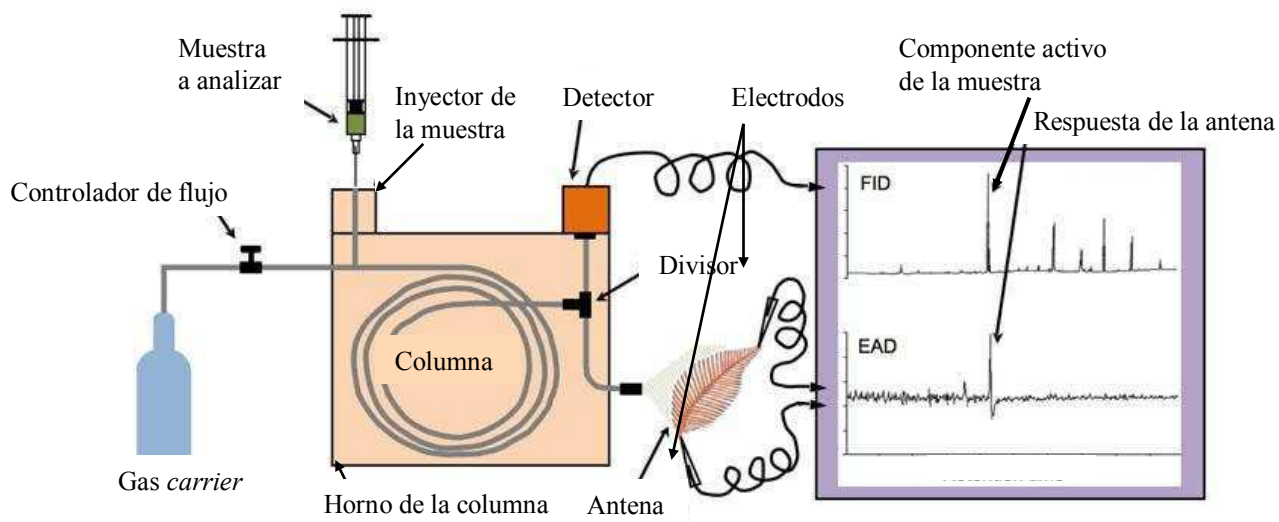


Figura II.4: Esquema del equipo de GC-EAG. De manera muy simplificada se muestra el cromatógrafo de gases, el cual a la salida de la columna posee un divisor de modo tal que la muestra a analizar pueda ser detectada simultáneamente por la antena (montada en el equipo de electroantenografía) y por el detector del cromatógrafo (FID). Modificado de Bradbury y Vehrencamp (2011).



Capítulo 4:

“Plasticidad comportamental de la respuesta de escape de larvas de Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae) generada por la feromona de alarma liberada por adultos”

Introducción

Aunque las respuestas innatas son esenciales para la supervivencia de cualquier individuo enfrentado a un estímulo percibido por primera vez, los procesos cognitivos le confieren la aptitud de adquirir o aumentar la capacidad de responder a estímulos que, siendo *a priori* irrelevantes, toman valor biológico luego de una experiencia previa. Esta capacidad de modificar el comportamiento en función de la experiencia puede variar entre especies, individuos, e incluso a lo largo de la vida y puede ser modulada por la forma en que la nueva información es adquirida. El aprendizaje es para los animales un proceso fuertemente adaptativo, evidenciado en la enorme cantidad de trabajos que demuestran las capacidades cognitivas de muchos animales, incluidos los menos complejos. Si bien es cierto que no existe al día de hoy una definición que describa inequívocamente al aprendizaje, clásicamente ha sido definido como un cambio comportamental causado por una experiencia previa. Sin embargo, dicha experiencia previa puede ser tan variada como tipos de aprendizajes han sido descritos.

La **sensibilización** y la **habituación** son procesos cognitivos que involucran condicionamientos no asociativos, los cuales causan un cambio en el comportamiento como resultado de una primera experiencia sensorial la cual no está asociada con ninguna otra señal o recompensa.

La **sensibilización** es un proceso simple en el que la mera presencia de un estímulo sensorial provoca un incremento de la atención a dicho estímulo (Monteith, 1963; Rakitin *et al.*, 1991; Braun y Bicker, 1992), aumentando así la probabilidad de encontrarlo o evitarlo (Rakitin *et al.*, 1991; Hammer *et al.*, 1994; Aggio *et al.*, 1996; Walters *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2003; Grubb y Thompson, 2004; Anderson *et al.*, 2007; Anton *et al.*, 2011; Guerrieri *et al.*, 2012; Minoli *et al.*, 2012). Opuestamente, la **habituación** es un proceso mediante el cual el cerebro filtra información que, luego de una exposición sensorial previa, deja de ser relevante (Duerr y Quinn, 1982). Generalmente, tiempos cortos de pre-exposición al estímulo disparan un proceso de sensibilización, mientras que tiempos largos de pre-exposición provocan una habituación de la respuesta.

El aprendizaje asociativo es el proceso por el cual una asociación entre dos estímulos o un comportamiento y un estímulo es consolidada, si es adecuadamente

reforzada (Bitterman *et al.*, 1983; Heisenberg *et al.*, 1985; Menzel y Muller, 1996). Dos principales formas de aprendizaje asociativo han sido descritas en animales. En el condicionamiento clásico de tipo Pavloviano (Pavlov, 1927) un estímulo previamente neutro es repetidamente presentado junto con un refuerzo, hasta que finalmente el estímulo neutro genera una respuesta por sí mismo. En el condicionamiento operante de Skinner (Skinner, 1937) un determinado comportamiento es seguido de un refuerzo, resultando en un cambio en la probabilidad de que el comportamiento ocurra nuevamente.

Aunque el aprendizaje y la memoria han sido extensamente estudiados en muchas especies de insectos, incluyendo la adquisición de reglas y conceptos (Lewis y Tumlinson, 1988; Vet y Groenewold, 1990; Papaj y Lewis, 1993; Vet *et al.* 1995; Chivers *et al.*, 1996, Dukas, 1998; Deisig *et al.*, 2001; Giurfa *et al.*, 2001; Cunningham *et al.*, 2003; Giurfa, 2004; Avarguès-Weber *et al.*, 2010), mucho menos se sabe acerca de las habilidades cognitivas de los insectos hematófagos. En mosquitos se demostró que la preferencia por un hospedador y por los sitios de oviposición puede ser modulada por la experiencia (McCall y Eaton, 2001; McCall *et al.*, 2001; McCall y Kelly, 2002; Alonso *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2003). A su vez, se han publicado recientemente trabajos en triatominos en los que se demostró por primera vez la capacidad cognitiva de las vinchucas en varios contextos diferentes de sus vidas. En estos trabajos se muestra que bajo un paradigma de condicionamiento clásico, *R. prolixus* es capaz de responder comportamentalmente a un olor neutro luego de ser reforzado positiva (Vinauger *et al.*, 2011a) o negativamente (Vinauger *et al.*, 2011b). Más aún, se demostró que luego de una primera experiencia, individuos de esta especie aprendieron a evitar los olores de hospedador negativamente reforzados (Vinauger *et al.*, 2012). También, se han publicado otros trabajos en los que se reporta que las vinchucas no fueron capaces de asociar diferentes olores neutros relacionados con plantas con un refuerzo alimenticio (Abramson *et al.*, 2005; Aldana *et al.*, 2008).

En este capítulo de la Tesis se analiza si la respuesta de escape de larvas de *T. infestans*, al ser confrontadas a la feromona de alarma liberada por los adultos de la misma especie y/o por componentes individuales de la misma, puede ser modulada por un proceso cognitivo. Habiendo descrito en el Capítulo 2 de la presente Tesis, la respuesta innata de escape de las larvas a la feromona de alarma, se estudió aquí cómo

varía dicho comportamiento luego de un condicionamiento previo, que podía ser no asociativo (Parte 1) o asociativo (Partes 2 y 3).

En la Parte 1 se analizó si una pre-exposición olfativa no asociativa a compuestos individuales de la feromona de alarma puede cambiar la respuesta de escape de las larvas a el/los mismo/s compuesto/s. Tiempos cortos y largos de pre-exposición fueron aplicados para investigar si existe una relación entre la duración de la pre-exposición y la ocurrencia de un proceso de sensibilización o de habituación. A su vez, se aplicaron protocolos diferentes variando el tiempo entre la pre-exposición y la medición de la respuesta de escape para determinar el tiempo de retención de la información adquirida o memoria. Además, se analizó si el componente mayoritario de la feromona de alarma y la feromona completa son percibidos como entidades químicas diferentes o no realizando pre-exposiciones y *tests* cruzados.

En la Parte 2 se estudió el condicionamiento clásico asociativo de la respuesta de escape de las vinchucas en presencia del componente mayoritario de la feromona de alarma, el ácido isobutírico. Para ello se presentó de forma pareada un pulso de aire de ácido isobutírico con un refuerzo negativo y se midieron cambios en la respuesta de escape frente al ácido isobutírico.

En la Parte 3 se aplicó un condicionamiento operante asociativo de la respuesta de escape, entregando un pulso de ácido isobutírico a las larvas cada vez que entraban en una zona determinada de una arena experimental. De esta manera, en posteriores ensayos sin la presencia de olores, se determinó si las larvas fueron capaces de asociar una zona de la arena experimental con un refuerzo negativo.

Parte 1. Modulación no asociativa de la respuesta de escape de las vinchucas: pre-exposición olfativa.

Se llevó a cabo una pre-exposición olfativa, con distintos componentes de la feromona de alarma, para luego analizar la existencia de una modulación no asociativa de la respuesta de escape de las larvas de *T. infestans* frente a los mismos estímulos químicos.

Materiales y Métodos

-Animales

Los insectos utilizados en todas las series experimentales (Partes 1, 2 y 3) fueron obtenidos a partir de huevos de *T. infestans* obtenidos del Servicio Nacional de Chagas, Córdoba, Argentina y criados en el insectario del laboratorio a $28 \pm 1^\circ \text{C}$, 30-60% HR, bajo un fotoperíodo de 12:12 horas Luz/Oscuridad. Todos los estadios se alimentaron semanalmente sobre gallinas vivas. Los animales fueron manipulados de acuerdo a las reglas de bioseguridad del Servicio de Higiene y Seguridad de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Para los ensayos, larvas de 4° estadio de *T. infestans* eran separadas semanalmente y luego de 15-25 días de ayuno post-ecdisis eran utilizadas en los experimentos. Se utilizó un total de 1440 larvas en los experimentos presentados en este capítulo. Los insectos fueron utilizados una única vez y luego descartados.

Todos los experimentos (entrenamientos y procedimientos de *test*) se realizaron durante las primeras horas de la escotofase (*i.e.*, 1-5h luego de que la luz se apagara) abarcando el período de máxima actividad observada para las vinchucas (Lazzari, 1992). A su vez, los experimentos fueron llevados a cabo en condiciones de oscuridad funcional, respetando así la fase del fotoperíodo en el cual los animales se encontraban y evitando, además, la posible utilización de señales visuales por parte de las vinchucas durante los ensayos. La temperatura y la humedad relativa del cuarto experimental utilizado fueron mantenidas a $25^\circ \pm 1^\circ \text{C}$ y $40 \pm 10\%$, respectivamente.

-Procedimientos de Entrenamiento

La pre-exposición a los diferentes estímulos químicos fue llevada a cabo utilizando un frasco cilíndrico de acrílico (**figura 4.1A**, 6cm de alto, 2,5cm de diámetro) dividido

horizontalmente por una malla plástica (0,5mm diámetro de poro). Las larvas eran ubicadas sobre la malla y los diferentes estímulos debajo de la misma. De esta manera, distintos protocolos temporales (**figura 4.1**: P1, P2, P3 y P4) de pre-exposición fueron aplicados en los que los individuos fueron químicamente expuestos a volátiles liberados por un papel de filtro cargado con 10µg de ácido isobutírico o 10µg de 3-pentanona o por un adulto perturbado (feromona de alarma completa).

La pre-exposición a 3-pentanona se realizó sólo por un período corto (1min, **figura 4.1**: P1), mientras que la pre-exposición al ácido isobutírico se realizó por un período corto (1min, **figura 4.1**: P1 o P3) o por un período largo (60min, **figura 4.1**: P2 o P4). Para la pre-exposición corta, 10µg de ácido isobutírico o 10µg de 3-pentanona en 50µl de diclorometano (DCM) eran cargados en un papel de filtro (2 × 1cm) ubicado debajo de la malla del frasco de pre-exposición. Luego, una larva era colocada sobre la malla, exponiéndola a los volátiles liberados durante 1 minuto. Para la pre-exposición larga, un procedimiento similar fue llevado a cabo, salvo que la larva era mantenida sobre la malla durante 60 minutos y que, para asegurar la presencia del estímulo olfativo durante dicho período largo de pre-exposición, el papel de filtro cargado con la solución estímulo se cambiaba cada 15 minutos por uno nuevo cargado inmediatamente antes de ubicarlo en el frasco de pre-exposición (*i.e.* se utilizaban 4 piezas de papel de filtro cargadas equitativamente). Los ensayos control (insectos naive) fueron llevados a cabo cargando solamente 50µl del solvente utilizado (DCM) en el papel de filtro.

Por otro lado, se realizó una pre-exposición de larvas a la feromona de alarma liberada por adultos perturbados de *T. infestans*. Para evitar la perturbación del adulto-estímulo durante la manipulación previa, que podría vaciar las glándulas productoras de feromona de alarma, se le permitía al insecto el ascenso voluntario a un papel de filtro que era luego ubicado en la parte inferior del frasco de pre-exposición. Una vez en el frasco, el adulto-estímulo era mecánicamente perturbado para generar la liberación de la feromona de alarma presionando sus patas con una pinza entomológica (ver Capítulo 2, pág. 79). Cada larva era ubicada sobre la malla durante 1 minuto, pre-exponiéndola al olor liberado por el adulto perturbado (feromona de alarma) por un periodo corto (**figura 4.1**: P1). Los ensayos control fueron llevados a cabo aplicando un protocolo similar pero dejando los adultos sin perturbar (insectos naive).

Luego de los protocolos de pre-exposición, los animales fueron mantenidos individualmente en frascos de transferencia cilíndricos (**figura 4.1B**, $3 \times 2,5\text{cm}$) en oscuridad, durante 10 minutos (memoria corta, P1 o P2) o 24 horas (memoria larga, P3 o P4) antes del comienzo de los ensayos de respuesta de escape, los cuales fueron realizados en un olfatómetro de doble elección (**figura 4.1C**, ver más adelante). Para los ensayos de pre-exposición a 3-pentanona y a feromona de alarma, el tiempo de transferencia fue de 10 minutos. Para el caso del ácido isobutírico, este tiempo de transferencia fue de 10 minutos (memoria corta) o de 24 horas (memoria larga).

-Medición de la respuesta de escape en un olfatómetro de doble elección

La respuesta de escape generada por la feromona de alarma de los adultos de *T. infestans* o por compuestos individuales de la misma como el ácido isobutírico o la 3-pentanona, fue cuantificada utilizando un olfatómetro de doble elección en ausencia de corrientes de aire (**figura 4.1C**). Esta arena experimental es la misma utilizada anteriormente (ver Capítulo1, **figura 1.1**). Brevemente, el olfatómetro utilizado consiste de una caja acrílica rectangular superior ($15 \times 10 \times 4\text{cm}$) con orificios en su base (2mm. de diámetro) unida a una cámara inferior de igual tamaño, que se encuentra verticalmente dividida en 2 partes iguales o sub-cámaras por un tabique transversal impermeable a los olores. Cada una de estas sub-cámaras independientes se conecta por debajo a un frasco desmontable portador del estímulo (10ml). Un papel de filtro con orificios coincidentes con los de la base de la caja superior se utilizó como sustrato para los insectos experimentales, permitiendo la correcta difusión de los olores y a su vez evitando una posible contaminación química de la caja de acrílico entre los ensayos, ya que era cambiado por uno nuevo en cada ensayo. De esta manera, los volátiles liberados por las distintas fuentes de estímulo (adultos perturbados o papeles cargados con soluciones artificiales de ácido isobutírico o 3-pentanona - 0,1; 10 o $1000\mu\text{g}$ en $50\mu\text{l}$ de DCM- colocados en los frascos estímulo) salen por difusión simple desde los frascos estímulo, entran en la sub-cámara y comienzan a difundir por los orificios de la base de la arena superior y del papel que actúa como sustrato, donde se encuentran los insectos experimentales, generando un gradiente químico.

Luego de que ambos frascos estímulo fueran conectados a cada sub-cámara, una larva era ubicada en el centro de la arena experimental superior y mantenida cubierta

con un pequeño frasco invertido durante 1 minuto para permitir la familiarización con el contexto y la difusión del olor. Luego, la larva era liberada retirando el frasco que la cubría y su comportamiento registrado durante 4 minutos mediante una video-cámara conectada a una grabadora digital. Para evitar el posible efecto de una heterogeneidad espacial en la distribución de las larvas sobre la arena experimental, la posición de los estímulos fue alternada al azar entre los ensayos. Los ensayos control fueron realizados agregando DCM en ambos frascos portadores de estímulos.

-Análisis de datos

Al igual que en los capítulos anteriores, el tiempo transcurrido durante los *tests* a cada uno de los lados de la arena experimental fue registrado como una medida de la preferencia olfatoria de los insectos. Un índice de preferencia (*IP*) que varía entre -1 y 1 fue calculado como $IP = (TC - TE)/(TC + TE)$, donde *TC* es el tiempo (en segundos) transcurrido del lado del control de la arena y *TE* es el tiempo transcurrido del lado del estímulo. En las series control (es decir, sin estímulo agregado) *TE* es el tiempo transcurrido a un lado o al otro de la arena experimental elegido al azar. Valores de *IP* cercanos a -1, 0, o 1 indican repelencia, distribución al azar o atracción al estímulo, respectivamente. Las desviaciones de una distribución al azar (es decir, $IP = 0$) de las larvas sobre la arena experimental fueron analizadas mediante un *T-Test* de 1 muestra.

Por otro lado, las diferencias entre pre-exposiciones fueron analizadas a través de un *T-Test* para comparaciones entre dos tratamientos y de un análisis de varianza (ANOVA) de 1 factor para varios tratamientos, seguido de comparaciones *a posteriori* (Test de Tukey) cuando fue necesario. Un total de 40 réplicas fue realizado para cada tratamiento.

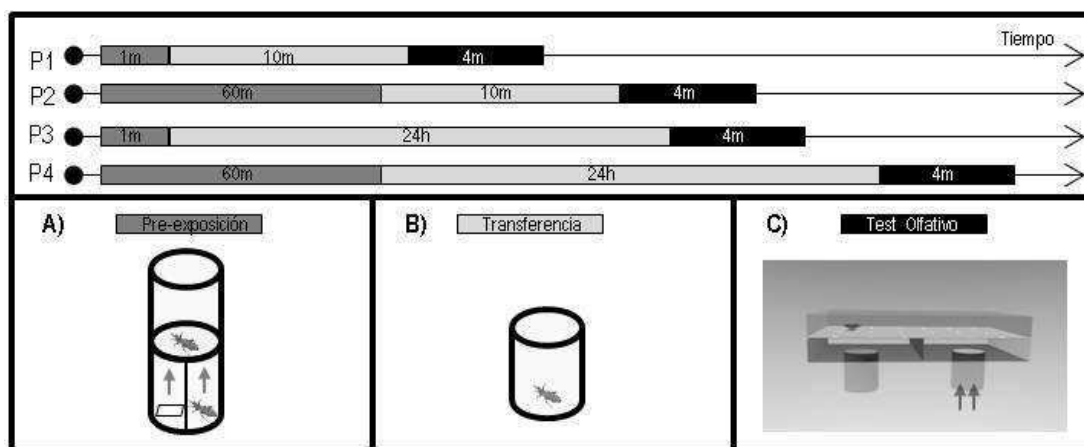


Figura 4.1: Protocolos y dispositivos experimentales utilizados para analizar los efectos de una exposición no asociativa en la respuesta de escape de larvas de *T. infestans*. P1, P2, P3 y P4: protocolos de pre-exposición y *test*. El rectángulo gris oscuro representa la pre-exposición (1 o 60 min), el gris claro la transferencia (10 min o 24 hs) y el negro el *test* olfativo de 4 min. A) La exposición química fue realizada en un frasco de pre-exposición. B) Entre la pre-exposición y el *test* las larvas eran mantenidas en un frasco de transferencia. C) Los *tests* olfativos se realizaron en un olfatómetro de doble elección.

Resultados. Plasticidad comportamental no asociativa: pre-exposición olfativa

-Modulación de la respuesta de escape al ácido isobutírico luego de una pre-exposición química corta (1 minuto) o larga (60 minutos), medida a corto (10 minutos) o largo plazo (24 horas)

Ward (1981) demostró que el principal componente de la feromona de alarma liberada por los adultos de *T. infestans*, el ácido isobutírico, promueve repelencia en adultos de la misma especie. Similarmente, nuestros resultados muestran que las larvas de 4° estadio son repelidas cuando se colocan 10 μ g de ácido isobutírico como estímulo (**figura 4.2A**; *T-Test* de 1 muestra, $p = 0,04$) y no con otras dosis del mismo compuesto ($p > 0,05$ para todos los casos). Además, se mostró que cuando las larvas fueron expuestas durante un período corto de tiempo (1 min) a 10 μ g de ácido isobutírico justo antes del *test* (10 min), la respuesta fue similar en dosis-dependencia (**figura 4.2B**; *T-Test* de 1 muestra, $p = 0,001$ para 10 μ g de ácido isobutírico, $p > 0,05$ para las otras dosis), aunque más intensa, ya que el rechazo por 10 μ g de ácido isobutírico de las larvas pre-expuestas resultó ser significativamente mayor que el de las naives (**figuras 4.2A, B**; *T-Test*, $p = 0,0002$; la comparación se muestra con la línea vertical). Estos resultados sugieren la existencia de un proceso de sensibilización asociado a la pre-exposición olfativa.

Contrariamente, el efecto de una pre-exposición larga (60 min) al ácido isobutírico resultó en un cambio drástico de repelencia a atracción frente a 10 μ g de

ácido isobutírico (**figura 4.2C**; *T-Test* de 1 muestra, $p=0,00005$) evidenciado 10 minutos después.

Por otro lado, luego de 24 horas transcurridas desde una pre-exposición corta (1 min) a $10\mu\text{g}$ de ácido isobutírico, las larvas mostraron una respuesta de escape significativamente diferente de una distribución al azar (**figura 4.3B**, *T-Test* de 1 muestra, $p=0,04$) pero que no difirió del comportamiento de las larvas naives (**figuras 4.3A, B**; *T-Test*, $p=0,2$; la comparación se muestra con la línea vertical). Estos resultados sugieren que el efecto de sensibilización observado anteriormente dura por lo menos 10 minutos pero menos de 24 horas.

En el caso de una pre-exposición larga (60 min) de las larvas al ácido isobutírico, la respuesta de escape medida luego de 24 horas se desvaneció completamente, mostrando los insectos una indiferencia completa a todas las dosis puestas a prueba de ácido isobutírico (**figura 4.3C**; *T-Test* de 1 muestra, $p>0,05$, en todos los casos).

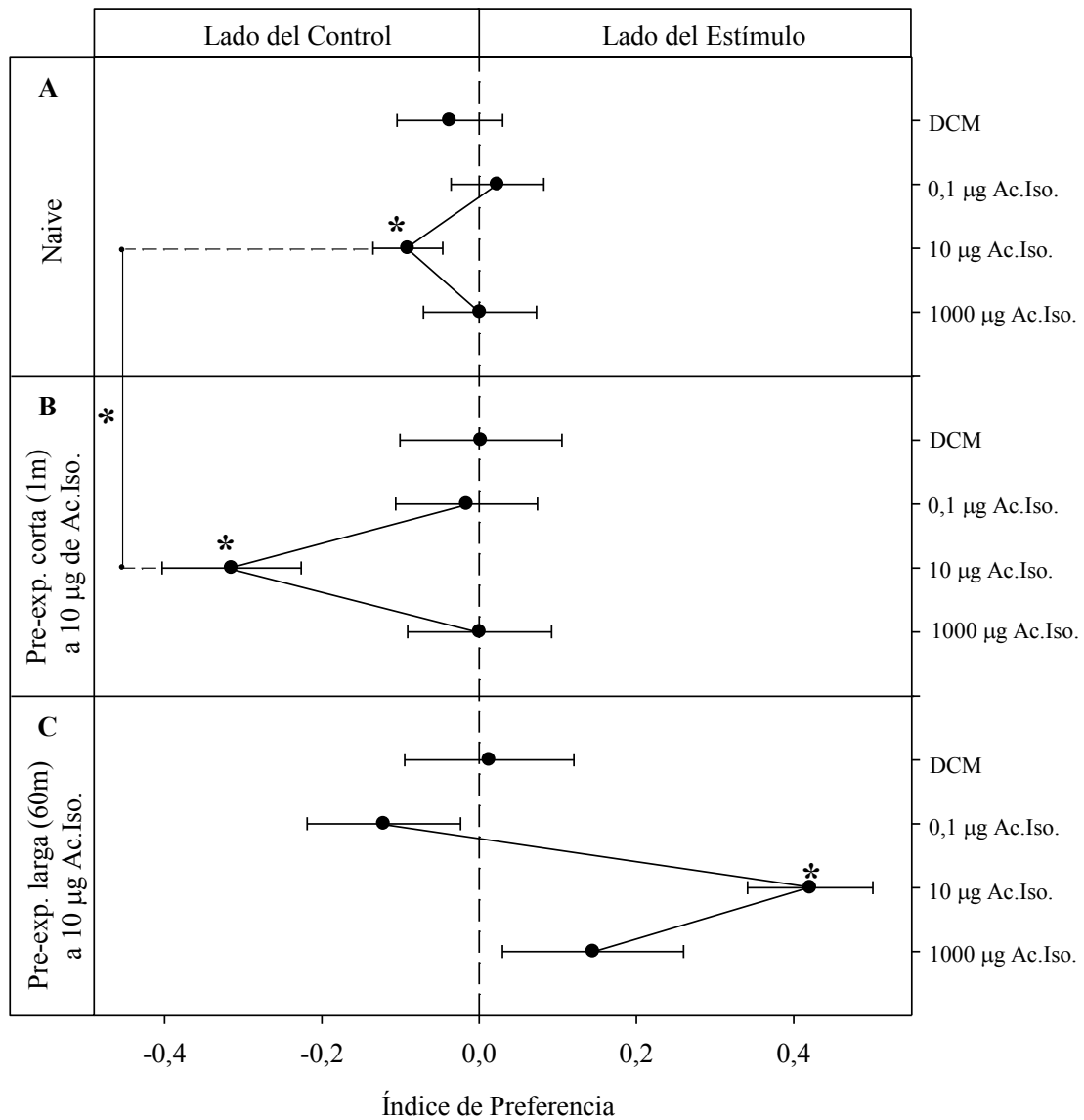


Figura 4.2. Modulación a corto plazo (memoria a 10m) de la respuesta de escape al ácido isobutírico luego de una pre-exposición química corta (1m) o larga (60m). (A) Las larvas naive evitaron 10µg de ácido isobutírico y no otras dosis. (B) Un claro efecto de sensibilización luego de la pre-exposición corta fue evidenciado en la dosis de 10µg de ácido isobutírico. (C) Una pre-exposición larga invirtió el significado del ácido isobutírico que pasó de ser repelente a atractivo.

$N = 40$ ensayos para cada dosis. Los asteriscos indican diferencias significativas de una distribución aleatoria (IP = 0, T -Test de 1 muestra, $p < 0,05$). El asterisco sobre la línea vertical indica diferencias significativas entre tratamientos (T -Test, $p < 0,05$). *Pre-exp*= Pre-exposición. *Ac.Iso*= ácido isobutírico. *DCM*= diclorometano.

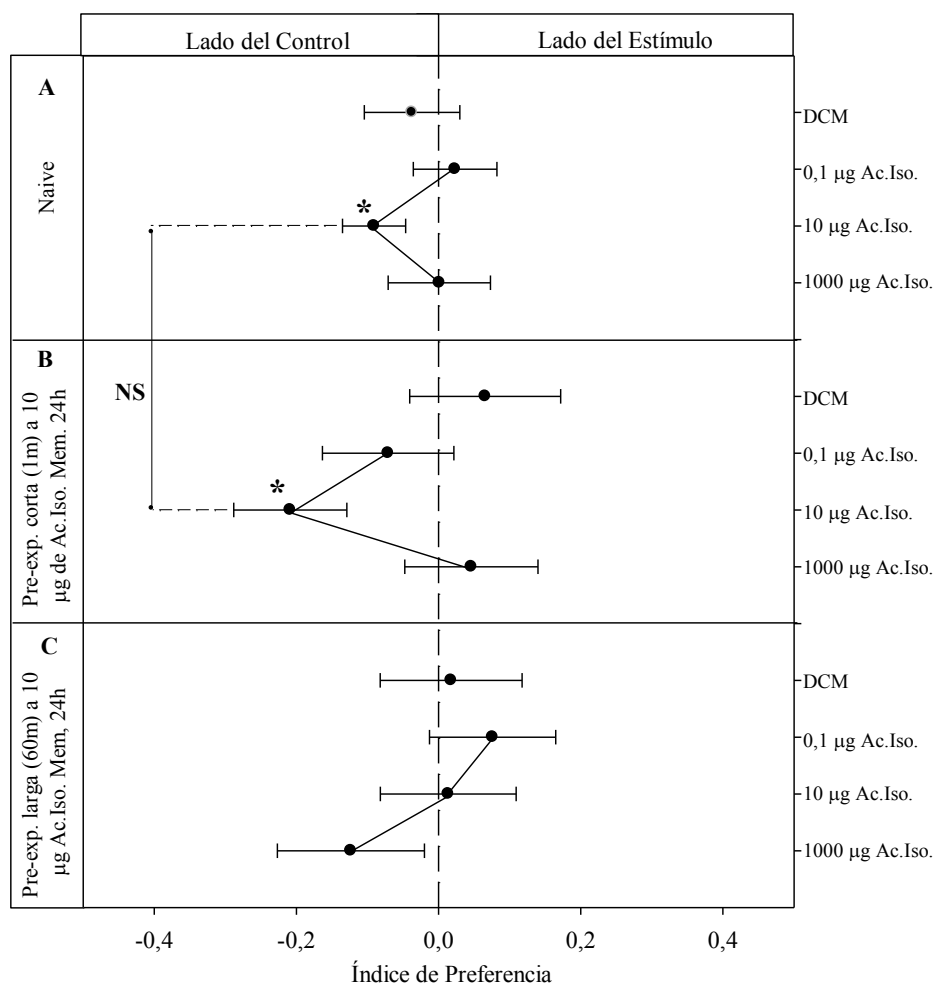


Figura 4.3. Modulación a largo plazo (memoria a 24h) de la respuesta de escape al ácido isobutírico luego de una pre-exposición química corta (1m) o larga (60m). (A) Las larvas naive evitaron 10µg de ácido isobutírico y no otras dosis. (B) 24 horas luego de una pre-exposición corta se observó una respuesta de escape exactamente igual a la de las larvas naive (*i.e.* se revirtió la sensibilización observada en Fig. 4.2 B). (C) Un protocolo de pre-exposición larga luego de 24 horas generó una respuesta al azar frente al ácido isobutírico en todas las dosis puestas a prueba.

$N = 40$ ensayos para cada dosis. Los asteriscos indican diferencias significativas de una distribución aleatoria (IP = 0, T -Test de 1 muestra, $p < 0,05$). "NS" sobre la línea vertical indica que no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (T -Test, $p < 0,05$). Pre-exp.= Pre-exposición. Ac.Iso= ácido isobutírico. DCM= diclorometano. Mem= memoria.

-Modulación de la respuesta de escape frente a la 3-pentanona luego de una pre-exposición olfativa corta.

Como se demostró en el Capítulo 3, las larvas naive no mostraron una respuesta de escape frente a las distintas dosis de 3-pentanona puestas a prueba (**figura 3.1E**). Con el objetivo de analizar si el efecto de la pre-exposición a dicho compuesto neutro (es decir que no presenta una respuesta comportamental asociada en nuestro dispositivo) podría generar un cambio en la repuesta de las larvas (*e.g.*, una sensibilización que

provoque que comiencen a reaccionar), se realizó una pre-exposición corta (1 minuto) a 10µg de 3-pentanona y se puso a prueba la respuesta a las mismas concentraciones que antes, 10 minutos después. Se observó que luego de la pre-exposición, las larvas no fueron repelidas ni atraídas por ninguna dosis, mostrando una distribución al azar sobre la arena experimental (**figura 4.4**, *T-Test* de 1 muestra, $p>0,05$ para todos los casos).

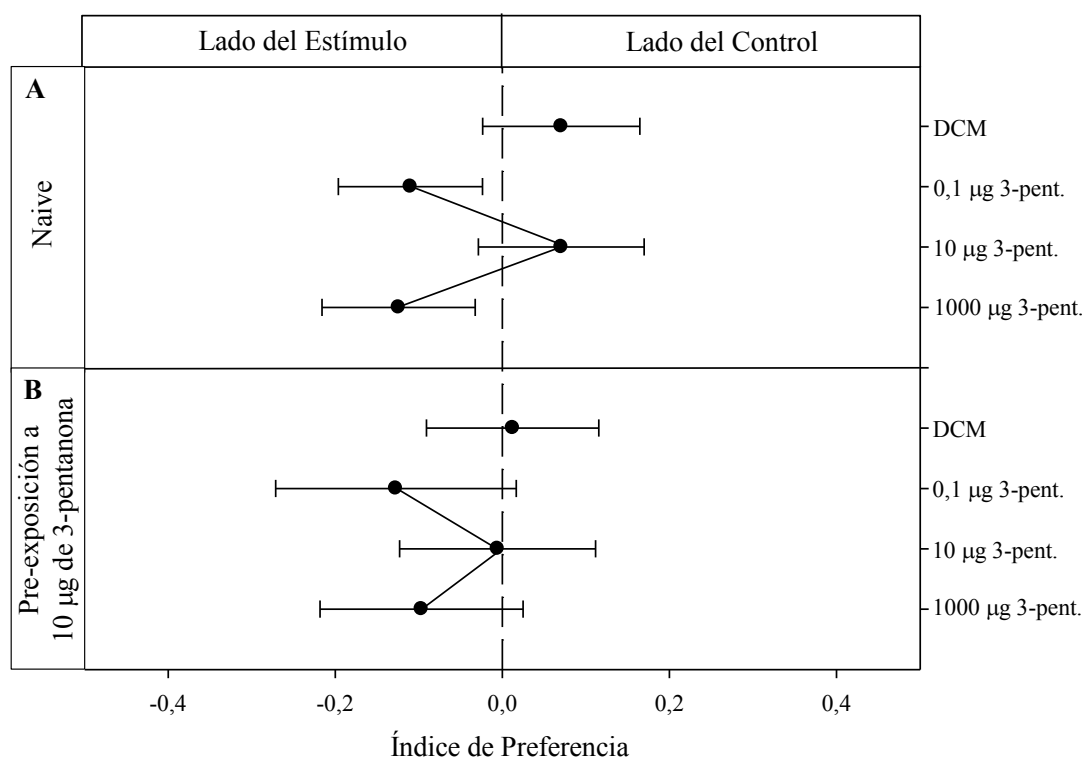


Figura 4.4. Modulación de la respuesta a la 3-pentanona luego de una pre-exposición química. (A) Las larvas naïve no mostraron una distribución sobre la arena experimental diferente del azar para ninguna de las dosis puestas a prueba. (B) La pre-exposición no generó un cambio en dicha distribución. $N = 40$ ensayos para cada dosis. *T-Test* de 1 muestra, $p>0,05$ en todos los casos. *3-pent.*= 3-pentanona. *DCM*= diclorometano.

-Modulación selectiva de la respuesta de escape al ácido isobutírico y a la feromona de alarma liberada por los adultos: pre-exposición olfativa lineal y cruzada.

De acuerdo a Manrique *et al.* (2006) y/o a capítulos anteriores de esta Tesis (Capítulos 2 y 3) se desprende que las larvas de *T. infestans* evitan zonas en donde perciben la feromona de alarma o su componente principal, el ácido isobutírico. Se mostró, además, que una pre-exposición química a 10µg de ácido isobutírico incrementa la respuesta de escape al mismo compuesto (ver **figura 4.2**). En esta parte de la Tesis se

estudió si la respuesta de escape a la feromona de alarma está también modulada por una pre-exposición química a la mezcla de olores de la misma o a su componente mayoritario solo, el ácido isobutírico. En otras palabras, se analizó el efecto lineal y cruzado de una pre-exposición breve a la feromona de alarma (*i.e.*, una mezcla de volátiles liberada por adultos perturbados) o a su componente principal solo (el ácido isobutírico) en la respuesta de escape generada por los mismos dos olores.

Como se esperaba, las larvas naives evitaron el lado de la arena que contenía 10µg de ácido isobutírico o la feromona de alarma completa (**figura 4.6**; *T-Test* de 1 muestra, $p < 0,05$, para los dos casos). Una pre-exposición al ácido isobutírico generó un aumento en la repelencia al mismo compuesto (como fuera mostrado anteriormente) y no modificó la respuesta a la feromona de alarma, ya que las larvas continuaron evitándola de igual manera que las naives. Por otro lado, una pre-exposición a la feromona de alarma causó que las larvas dejen de evitar el lado de la arena experimental con la feromona de alarma durante el test (*T-Test* de 1 muestra, $p > 0,05$) y no moduló la respuesta de escape al ácido isobutírico.

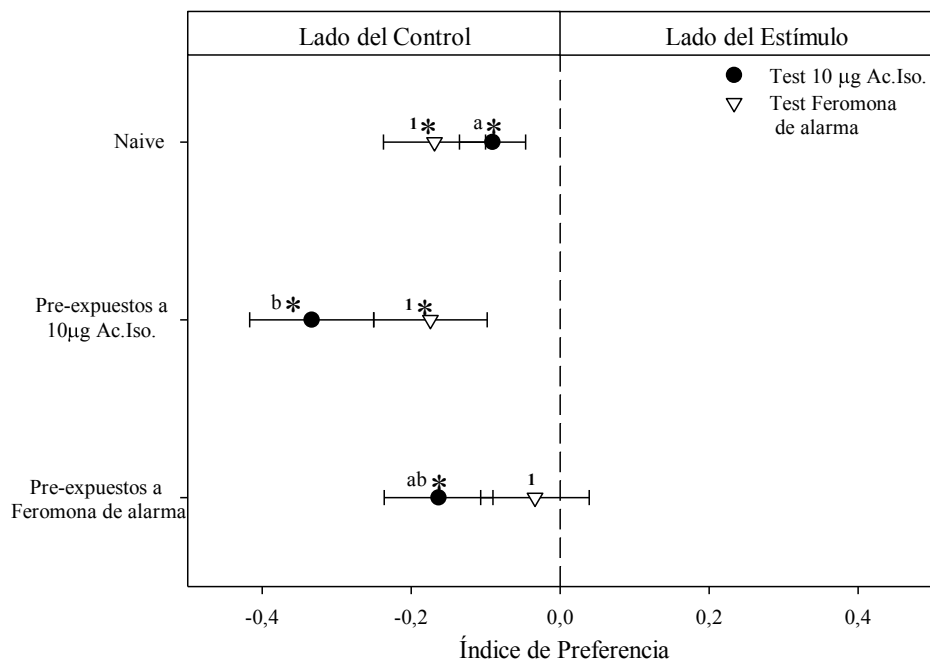


Figura 4.6. Modulación de la respuesta de escape al ácido isobutírico o a la feromona de alarma luego de una pre-exposición química lineal o cruzada a los mismos compuestos. Las larvas naive evitaron el ácido isobutírico y la feromona de alarma. La pre-exposición a ácido isobutírico aumentó la respuesta de escape frente al mismo compuesto pero no modificó la respuesta de las naive a la feromona de alarma. La pre-exposición a la feromona de alarma no moduló la respuesta innata de escape al ácido isobutírico pero promovió que las larvas dejen de escapar de la feromona de alarma.

$N = 40$ ensayos para cada dosis. Los asteriscos indican diferencias significativas de una distribución aleatoria ($IP = 0$, *T-Test* de 1 muestra, $p < 0,05$). Letras o números diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (*T-Test*, $p < 0,05$). *Ac.Iso*= ácido isobutírico.

Parte 2. Modulación asociativa de la respuesta de escape de las vinchucas: condicionamiento clásico.

Un arreglo de condicionamiento clásico fue diseñado para las larvas del 4^{to} estadio de *T. infestans* en el cual se esperaba que la respuesta de escape al ácido isobutírico aumentara al asociar la presencia de este compuesto aversivo con una perturbación mecánica.

Materiales y Métodos

-Animales

Se utilizaron larvas del 4^{to} estadio de *T. infestans* criadas en nuestro laboratorio bajo las mismas condiciones descritas previamente (ver sección *-Animales* de la parte 1).

-Procedimiento de Entrenamiento

El entrenamiento fue llevado a cabo colocando una larva dentro de un frasco de vidrio cerrado (**figura 4.7A**, 5cm de altura, 3cm de diámetro) conectado a un tubo de entrada (5mm de diámetro) que llevaba una corriente de aire limpio, a la cual se le podían agregar dosis controladas de ácido isobutírico manualmente mediante un interruptor electrónico. El ácido isobutírico se agregaba sobre una pieza de papel de filtro cargando 10µg o 1000µg (en solución con DCM). Un tubo de salida (5mm de diámetro) llevaba los olores a un extractor externo. El frasco conteniendo la larva en su interior estaba apoyado sobre un mezclador (Vortex1000rpm) que generaba una perturbación mecánica electrónicamente controlada. El tiempo de entrega de ácido isobutírico y la perturbación mecánica causada por el mezclador fue manipulado para generar diferentes protocolos de aprendizaje asociativo (**figura 4.7: P5 y P6**).

Un protocolo de condicionamiento (**figura 4.7: P5**) consistió de 5 minutos de entrenamiento durante los cuales la larva percibió una vez cada 1 minuto un ensayo de 5 segundos de un pulso de aire portador de ácido isobutírico (10 o 1000µg) pareado con un pulso de 5 segundos de perturbación mecánica, desfasados en 2 segundos. Así, cada individuo recibía un entrenamiento consistente de 6 eventos pareados, separados entre sí por 53 segundos en los que se les presentaba una corriente de aire limpio y sin vibración.

Un protocolo de pseudo-condicionamiento (**figura 4.7: P6**) fue llevado a cabo en el cual 6 ensayos de pulsos de aire de ácido isobutírico y 6 perturbaciones mecánicas fueron entregadas de manera azarosa (*i.e.*, no pareada). A los insectos del grupo naïve no se les presentó ni ácido isobutírico ni perturbación mecánica.

Luego del entrenamiento, los animales fueron transferidos a frascos cilíndricos de acrílico individuales (**figura 4.7 B**, 3 × 2,5cm) en oscuridad, durante 2 minutos, antes del comienzo de los *tests* realizados en un olfatómetro de doble elección (**figura 4.7 C**, ver más adelante).

-Medición de la respuesta de escape en un olfatómetro de doble elección

La respuesta de escape generada por el ácido isobutírico fue puesta a prueba utilizando un olfatómetro de doble elección en ausencia de corrientes de aire (**figura 4.7 C**; ver más detalles en **figura 1.1** del Capítulo 1 y/o Parte 1 de este capítulo). En cada ensayo individual, un frasco portador fue utilizado como control (cargando 50µl de DCM en un papel de filtro de 2,5 × 0,5cm) y el otro fue utilizado para el estímulo (10 o 1000µg de ácido isobutírico en 50µl de DCM cargados en el papel de filtro). Para evitar el posible efecto de una heterogeneidad espacial en la distribución de las larvas sobre la arena experimental, la posición de los estímulos fue alternada al azar entre los ensayos.

-Análisis de datos

Para cada *test*, el tiempo transcurrido en cada lado de la arena experimental fue registrado durante 4 minutos. De igual manera que lo presentado en capítulos anteriores y que en la sección anterior de este mismo capítulo, se calculó el índice de preferencia (IP). Las desviaciones de una distribución al azar (es decir, un IP = 0) fueron evaluadas para cada tratamiento mediante un *T*-Test de 1 muestra. Un total de 40 réplicas fue realizado para cada tratamiento.

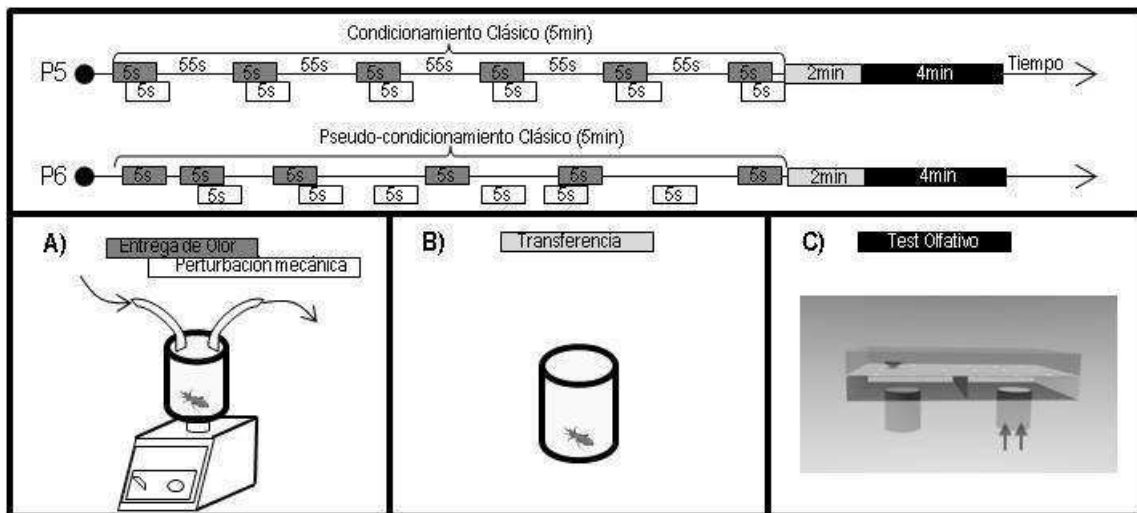


Figura 4.7. Protocolos y dispositivos experimentales utilizados para analizar los efectos de un condicionamiento clásico (asociativo) en la respuesta de escape de las larvas *T. infestans*. P5 y P6: protocolos de condicionamiento y *test*. El rectángulo gris oscuro representa un pulso de ácido isobutírico (5 seg), el blanco un pulso de vibración mecánica (5 seg), el gris claro la transferencia (2 min) y el negro el *test* olfativo (4 min). A) El condicionamiento clásico fue realizado en un frasco con entrada y salida de corriente de aire (a la cual se le podía agregar olores) apoyado en un mezclador de mesada. B) Entre el condicionamiento y el *test* las larvas eran mantenidas en un frasco de transferencia. C) Los *tests* olfativos se realizaron en un olfatómetro de doble elección.

Resultados. Plasticidad comportamental asociativa: condicionamiento clásico o Pavloviano

-Modulación de la respuesta de escape frente al ácido isobutírico luego de una asociación clásica con una perturbación mecánica

Ya demostramos que ciertas dosis de ácido isobutírico generan, en nuestra arena experimental, una respuesta de escape dosis dependiente por parte de las larvas de *T. infestans*. En estos ensayos, se aplicó un condicionamiento clásico pareando la entrega de pulsos de aire cargadas con ácido isobutírico con una perturbación mecánica. Las larvas naive presentaron una respuesta de escape innata frente a 10 μ g de ácido isobutírico (**figura 4.8A**; *T-Test* de 1 muestra, $p=0,04$). Aunque se esperaba que este efecto repelente aumentara luego del entrenamiento en el cual el valor hedónico de los 10 μ g de ácido isobutírico podría ser aún más negativo luego de una asociación con un segundo estímulo aversivo (la perturbación mecánica), no se observó una respuesta de escape para el grupo de condicionamiento (**figura 4.8A**; *T-Test* de 1 muestra, $p>0,05$). Lo mismo ocurrió con el pseudo-condicionamiento con 10 μ g de ácido isobutírico (en el cual la entrega de ácido isobutírico no estaba pareada con la perturbación mecánica) donde se observó una falta de respuesta frente a 10 μ g de ácido isobutírico durante el *test* (**figura 4.8A**; *T-Test* de 1 muestra, $p>0,05$). El desvanecimiento de la respuesta de

escape podría ser un efecto de habituación al ácido isobutírico entregado durante el entrenamiento.

Posteriormente se realizó un condicionamiento similar al descrito pero utilizando 1000 μ g de ácido isobutírico durante el entrenamiento y el *test*. Se observó que aunque los animales naive no evitaron la zona de la arena experimental con esta dosis de ácido isobutírico (**figura 4.8B**; *T-Test* de 1 muestra, $p>0,05$), una vez sometidos a un condicionamiento en el cual se pareó la entrega de 1000 μ g de ácido isobutírico con una perturbación mecánica, las larvas comenzaron a evitarlo (**figura 4.8B**; *T-Test* de 1 muestra, $p=0,02$). En su correspondiente pseudo-condicionamiento, no se observó una respuesta de escape (**figura 4.8B**; *T-Test* de 1 muestra, $p>0,05$). Estos resultados muestran que las larvas de *T. infestans* son capaces de asociar una clave química con un estímulo aversivo, por lo menos a ciertas dosis de ácido isobutírico.

Estos resultados también muestran que la falta de respuesta de escape observada en las larvas cuando 1000 μ g de ácido isobutírico fueron presentados en un lado de la arena experimental (**figura 4.2**) no es por una limitación del dispositivo (por ejemplo, debido a una homogeneización química de la arena causada por las altas dosis), pero, sin embargo, sí es un resultado de la preferencia de los insectos, como lo observado en esta sección en donde las larvas evitaron la misma dosis.

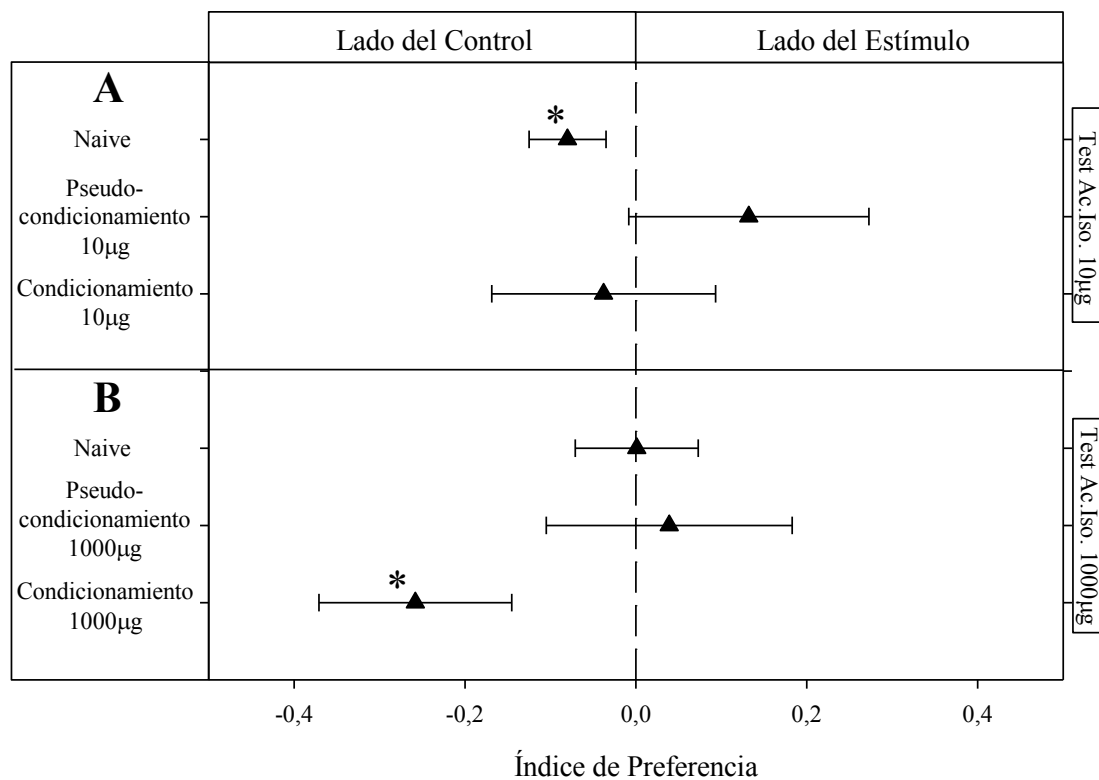


Figura 4.8. Modulación de la respuesta de escape al ácido isobutírico luego de un condicionamiento clásico aversivo. (A) Las larvas naive evitaron 10µg de ácido isobutírico pero el condicionamiento aversivo no incrementó la respuesta de escape. B) Las larvas naive no evitaron 1000µg de ácido isobutírico. Sin embargo, luego del entrenamiento fueron fuertemente repelidas por esta dosis. $N = 40$ ensayos para cada tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a un $IP = 0$ (T -Test de 1 muestra, $p < 0,05$). *Ac.Iso*= ácido isobutírico.

Parte 3. Modulación asociativa de la respuesta de escape de las vinchucas: condicionamiento operante

Un entrenamiento de condicionamiento operante fue diseñado en el cual las larvas de *T. infestans* fueron entrenadas a evitar una zona de una arena experimental castigándola con un pulso de ácido isobutírico cada vez que entraban a dicha zona durante el entrenamiento. Durante *tests* posteriores en ausencia de olor, se espera que las larvas eviten el lado de la arena experimental donde el ácido isobutírico fue entregado durante el entrenamiento.

Materiales y Métodos

-Animales

Se utilizaron larvas del 4^{to} estadio de *T. infestans* criadas en nuestro laboratorio bajo las mismas condiciones descritas previamente (ver sección *-Animales* del Parte 1).

-Procedimiento de Entrenamiento

El entrenamiento se realizó utilizando una arena experimental rectangular (8 × 5 × 4cm) con la mitad de su piso cubierto con papel de filtro liso y la otra mitad cubierto con papel de filtro rugoso (**figura 4.9A**). Un tubo de silicona conectado a un difusor plano triangular al nivel del suelo podía entregar continuamente a la arena experimental completa aire limpio o cargado con ácido isobutírico. El ácido isobutírico se cargaba en un papel de filtro (2,5 × 0,5cm) agregando 50µl de DCM con 10 o 1000µg de ácido isobutírico que se interponía en la corriente de aire limpio. Antes de cada ensayo, un lado de la arena (y por lo tanto una textura) fue establecido como el lado “castigado” y el otro lado como el lado “seguro” de una manera pseudo-aleatoria (*i.e.*, al azar pero balanceada a lo largo de 40 ensayos). El tiempo de entrega de ácido isobutírico era definido por la posición del insecto en cada ensayo de condicionamiento (**figura 4.9**: P7) o manipulada por el experimentador en los ensayos de pseudo-condicionamiento (**figura 4.9**: P8).

Para los ensayos de condicionamiento, una larva era liberada en el centro de la arena experimental y durante 5 minutos de entrenamiento se agregaba el ácido isobutírico a la corriente cada vez que la larva entraba al lado “castigado”

(previamente determinado). Los ensayos de pseudo-condicionamiento fueron realizados agregando ácido isobutírico al aire limpio independientemente de la posición en la que se encontrara el animal en la arena experimental durante 5 minutos. El tiempo total de entrega de ácido isobutírico durante los ensayos de pseudo-condicionamiento fue calculado a partir de las series de condicionamiento.

Luego del entrenamiento los animales fueron transferidos a un frasco cilíndrico de acrílico (**figura 4.9B**; 3 × 2,5cm) en oscuridad durante 1 minuto, antes del comienzo de los *tests* para medir preferencia espacial en ausencia de olor (**figura 4.9C**).

-Medición de la preferencia espacial en una arena experimental en ausencia de olores

La preferencia espacial (guiada por la textura del piso) fue registrada sobre la misma arena experimental utilizada durante el entrenamiento (**figura 4.9C**), pero en este caso sin la adición de ácido isobutírico en la corriente de aire (*i.e.*, una corriente continua portadora de 50µl de DCM únicamente). En cada ensayo una larva fue ubicada en el centro de la arena experimental y cubierta con un frasco de acrílico invertido. Luego de un minuto de familiarización con el contexto, el frasco fue suavemente retirado permitiendo la liberación de la larva. Su comportamiento fue registrado utilizando una video-cámara conectada a una grabadora digital. Para evitar el posible efecto de una heterogeneidad espacial en la distribución de las larvas sobre la arena experimental, el agregado de ácido isobutírico fue alternadamente pareado al sustrato rugoso y liso de manera pseudo-aleatoria (*i.e.* al azar pero balanceada a lo largo de 40 ensayos).

-Análisis de datos

El tiempo transcurrido a cada lado de la arena experimental fue registrado durante el entrenamiento (5 minutos) y durante el *test* (5 minutos). Un índice de preferencia (IP) que varía de -1 a 1 fue calculado como $IP = (TS - TC) / (TS + TC)$, donde *TS* es el tiempo (en segundos) transcurrido en el lado “seguro” y *TC* es el tiempo transcurrido en el lado “castigado” de la arena experimental. Valores de IP cercanos a -1, 0, o 1 indican preferencia a permanecer en el lado “castigado”, distribución al azar sobre la

arena experimental o preferencia a permanecer en el lado “seguro” de la arena experimental, respectivamente.

Las desviaciones de una distribución al azar de las larvas sobre la arena experimental (es decir, $IP = 0$) fueron analizadas por medio de un *T-Test* de 1 muestra. Un total de 40 réplicas se realizaron para cada tratamiento.

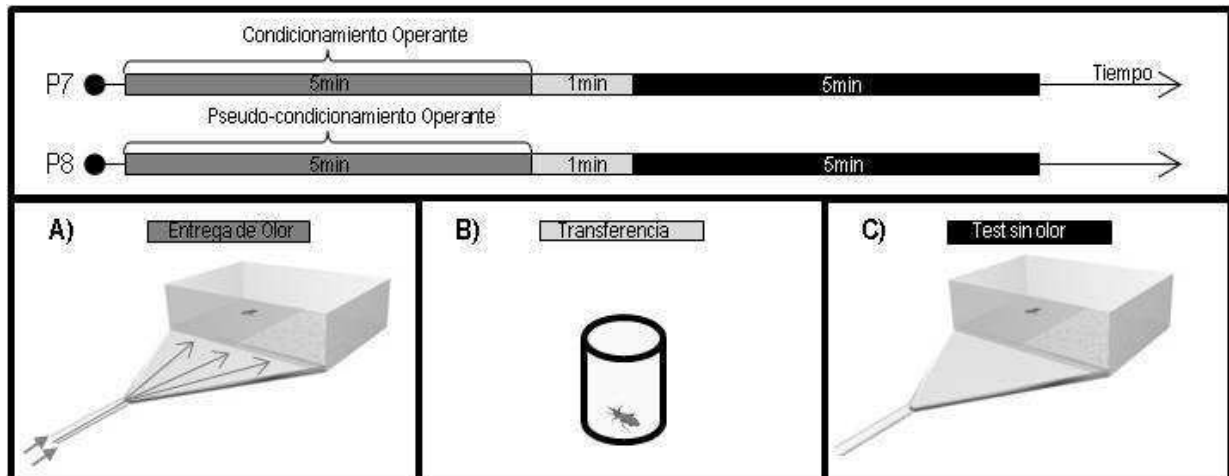


Figura 4.9. Protocolos y dispositivos experimentales utilizados para analizar los efectos de un condicionamiento operante (asociativo) en la respuesta de escape de las larvas *T. infestans*. P7 y P8: protocolos de condicionamiento y pseudo-condicionamiento y *test*. El rectángulo gris oscuro representa el condicionamiento y pseudo-condicionamiento operante (5 min), el gris claro la transferencia (1 min) y el negro el *test* de memoria (5 min). A) El condicionamiento operante fue realizado en una caja con una entrada de aire que entregaba aire limpio o cargado de ácido isobutírico dependiendo si las larvas ocupaban el lado “seguro” o “castigado”, respectivamente. B) Entre el condicionamiento y el *test* cada larva era mantenida en un frasco de transferencia. C) Los *tests* de memoria se realizaron en la misma caja con piso rugoso o liso y sin agregado de ácido isobutírico.

Resultados. Plasticidad comportamental asociativa: condicionamiento operante o Skinneriano

-Evitación de una zona neutral luego de una asociación operante con una perturbación química como el ácido isobutírico

Un paradigma de condicionamiento operante fue aplicado entregando un castigo (ácido isobutírico agregado a la corriente de aire) cuando la larva ingresaba al lado “castigado” de la arena experimental. A diferencia de los experimentos previos, este protocolo permite calcular el índice de preferencia (IP) durante el entrenamiento además de calcularlo durante los *tests*. Cuando el entrenamiento se realizó utilizando 10 μ g de ácido isobutírico como refuerzo negativo, aunque se observó cierta tendencia a evitar el lado “castigado” tanto en el entrenamiento como en el *test*, las larvas

mostraron una distribución al azar sobre la arena experimental (**figura 4.10A**; *T-Test* de 1 muestra, $p > 0,05$, para ambos casos).

Sin embargo, cuando se utilizó 1000 μ g de ácido isobutírico, se observó ya durante el entrenamiento una evitación del lado “castigado” (**figura 4.10B**; *T-Test* de 1 muestra, $p = 0,01$). Luego de la transferencia de 1 minuto, las larvas continuaron evitando el lado previamente definido como “castigado”, aún en ausencia de olor durante el *test* (**figura 4.10B**; *T-Test* de 1 muestra, $p = 0,009$). Como era de esperar, las larvas de los grupos pseudo-condicionados presentaron una distribución al azar durante ambos, el entrenamiento y el *test* de las series de 10 μ g y 1000 μ g de ácido isobutírico (**figura 4.10A, B**; *T-Test* de 1 muestra, $p > 0,05$ para todos los casos).

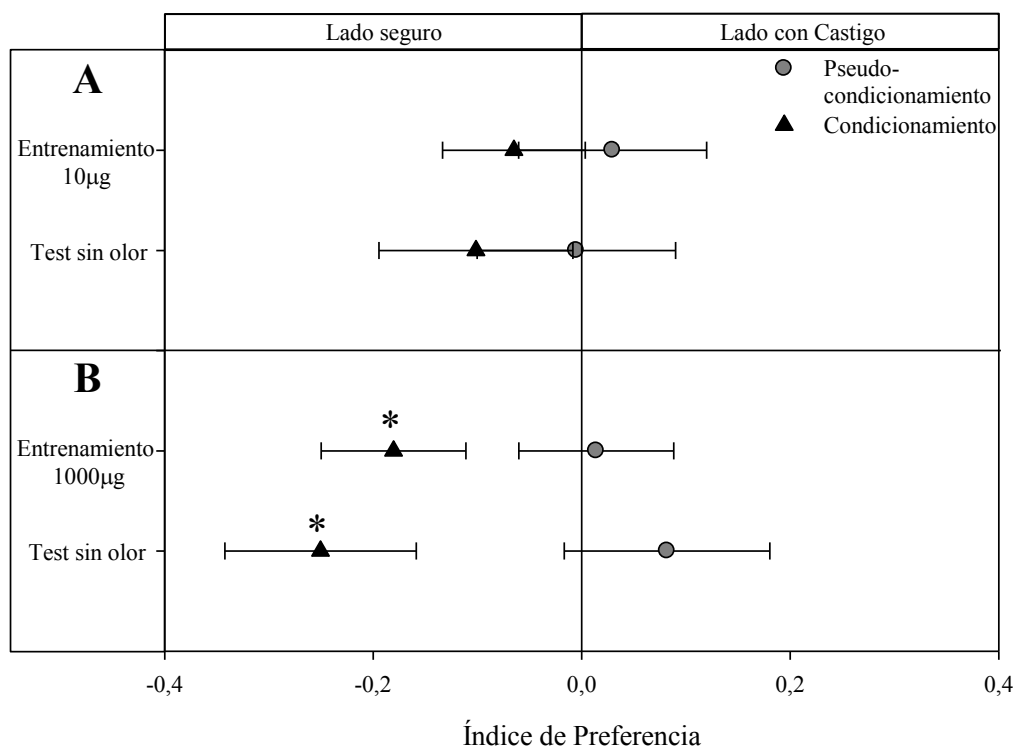


Figura 4.10: Modulación de la respuesta de escape al ácido isobutírico luego de un condicionamiento operante aversivo. (A) Las larvas no evitaron la zona castigada con 10 μ g de ácido isobutírico ni durante el entrenamiento ni durante el *test*. (B) Cuando se utilizó 1000 μ g de ácido isobutírico como “castigo” durante el entrenamiento, las larvas aprendieron a evitar el lado “castigado”, tanto durante el entrenamiento como en el *test* sin olor, $N = 40$ ensayos para cada tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas con un IP = 0 (*T-Test* de 1 muestra, $p < 0,05$).

Discusión

En este capítulo de la Tesis se analizó la plasticidad comportamental controlada por la experiencia previa en la vinchuca *T. infestans*, bajo un contexto de escape mediado por una feromona de alarma. Se pusieron a prueba distintas formas de aprendizaje y se mostró una modulación de la respuesta de escape de las larvas frente al ácido isobutírico. Aunque un comportamiento tan relevante para la supervivencia como lo es escapar de un peligro potencial generalmente requiere de una base genética, se mostró en este capítulo que es fuertemente modulado por la experiencia. Se utilizaron distintos enfoques cognitivos incluyendo protocolos asociativos y no asociativos, condicionamientos clásicos y operantes, y en todos los casos se obtuvo en mayor o menor grado algún tipo de modulación cognitiva.

La sensibilización es un proceso mediante el cual luego de una breve percepción de un estímulo, un individuo incrementa su respuesta comportamental en presencia del mismo. En los experimentos de pre-exposición realizados en esta Tesis, los individuos pre-expuestos brevemente al ácido isobutírico lograron una mayor atención a este compuesto y una mayor propensión a escapar del mismo durante los *tests*. En sus ambientes naturales, una breve percepción de la feromona de alarma podría significar que el peligro se encuentra aún en las cercanías. Por ello, permanecer más sensible a la feromona de alarma podría favorecer a realizar un escape rápido y representar, por lo tanto, la diferencia entre sobrevivir o morir.

Por otro lado, la habituación es un proceso a través del cual un estímulo presentado de manera continua y/o intensa causa un decremento de la respuesta comportamental asociada, debido a una des-sensibilización a dicho estímulo. En otras palabras, el individuo deja de percibir al estímulo, permitiéndole dejar de reaccionar a un estímulo que ya no es informativo. En los experimentos de pre-exposición al ácido isobutírico se esperaba una habituación expresada como la falta de respuesta de escape luego de una pre-exposición larga. Sin embargo, se obtuvo como resultado una inversión del significado de la señal, convirtiéndose en un estímulo que no solo dejaba de ser repulsivo sino que también comenzaba a atraer a las larvas. Para comprender qué proceso podría ser el responsable de dicho cambio comportamental es importante recalcar que el ácido isobutírico ha sido ya reportado por otros autores como un repelente a altas dosis y como attractante a bajas dosis en triatominos (Schofield, 1975;

Ward, 1981; Guerenstein y Guerin, 2001). Además de ser liberado por las glándulas de Brindley, el ácido isobutírico es un componente del sudor humano (Cork y Park, 1996) y probablemente de otros hospedadores de los triatominos. Sin embargo, la cantidad de este compuesto liberado por la piel de los vertebrados es mucho menor comparada con el contenido de ácido isobutírico presente en la feromona de alarma liberada por los adultos. Podría ocurrir entonces que luego de una pre-exposición larga se dispare un proceso de habituación que no suprima por completo la sensibilidad a dicho compuesto sino que la disminuya drásticamente, resultando en la sub-estimación de la dosis real detectada. Si esto ocurriera, las larvas podrían estar estimando la presencia de un hospedador en lugar de una feromona de alarma. Sin embargo, esta es solo una de las posibles explicaciones. Otro proceso alternativo como el “*priming*” sensorial podría también explicar la atracción luego de una pre-exposición larga (Schacter y Buckner, 1998).

En general, una disminución de una respuesta comportamental luego de una exposición química puede deberse tanto a una habituación (*i.e.*, modulación a nivel central) como a una adaptación sensorial (*i.e.*, modulación a nivel periférico). En base a los resultados aquí presentados, se puede descartar que los cambios de comportamiento de escape debidos a una pre-exposición larga se deban a una adaptación sensorial al ácido isobutírico, ya que se observó una inversión de la respuesta, y no una falta de respuesta, como cabría de esperar si una adaptación sensorial ocurriese. Del mismo modo, la fatiga motora es otra explicación posible descartada ya que una disminución en la respuesta locomotora podría también causar una falta de respuesta.

Como era de esperar, la duración de la pre-exposición especificó en estos resultados el signo de la modulación cognitiva no asociativa: la pre-exposición corta generó una sensibilización, mientras que la pre-exposición larga generó una habituación. Aunque no fue el objetivo de esta parte de la Tesis, se podría pensar que debería existir algún punto entre la pre-exposición corta y la larga en el cual ambos fenómenos, la sensibilización y la habituación, se encontraran luchando uno contra el otro, llegando incluso a anularse mutuamente. Sin embargo, basándose en estos resultados no se puede informar si los mecanismos fisiológicos envueltos en ambos procesos son independientes o no.

En este capítulo de la Tesis, se demostró, además, que una pre-exposición al ácido isobutírico puede modular la sensibilidad al mismo compuesto en larvas de *T. infestans*, evidenciando cambios en la respuesta de escape dosis-dependiente luego de una pre-exposición corta o larga. Sin embargo, la relevancia de la dosis de ácido isobutírico utilizada para la pre-exposición no fue estudiada en este trabajo. Para llevar a cabo los tratamientos de pre-exposición se eligió 10 µg de ácido isobutírico debido a su relevancia biológica, ya que esta dosis es similar a la cantidad presente en las glándulas de Brindley, estimada por cromatografía gaseosa (ver resultados Capítulo 2). Futuros estudios deberían focalizarse en analizar si los efectos de la pre-exposición están modulados por la concentración y si el cambio de sensibilización a habituación podría estar modulado no sólo por la duración de la pre-exposición sino también por la concentración del compuesto utilizado durante la pre-exposición. Además, no se puede saber con estos resultados si el efecto de la pre-exposición es dosis-dependiente, es decir, si la pre-exposición a cierta dosis provoca un cambio en la sensibilidad a la misma dosis o a otras dosis también. En este trabajo, sólo se encontró una modulación de la respuesta de escape cuando las larvas fueron testeadas a la misma dosis a la que fueron expuestas.

Como se mencionó previamente, el ácido isobutírico es el componente principal de la feromona de alarma emitida por los adultos *T. infestans* perturbados (Games *et al.*, 1974; Schofield, 1979; Manrique *et al.*, 2006). En esta Tesis se demostró por un lado que la pre-exposición a una dosis biológicamente relevante de ácido isobutírico aumenta la respuesta de los insectos frente al mismo compuesto. Además, se demostró que la pre-exposición a la feromona de alarma provocó una falta de respuesta a la misma. Sin embargo, no se obtuvo modulación cruzada de ningún tipo. Es decir, ni la pre-exposición a la feromona de alarma moduló la respuesta al ácido isobutírico ni la pre-exposición al ácido isobutírico moduló la respuesta a la feromona de alarma. Estos resultados sugieren que cuando un individuo percibe la feromona de alarma, no es sólo el componente principal el responsable de la respuesta de escape sino más bien una combinación con otros compuestos volátiles liberados durante la perturbación. Esto se evidencia en los resultados presentados en el capítulo 3 de este trabajo de Tesis.

El ácido isobutírico *per se* es percibido de manera innata por las larvas de *T. infestans* como un estímulo aversivo, ya que en la naturaleza este compuesto es utilizado como una herramienta para comunicar la presencia de algún tipo de peligro a con-específicos. En este trabajo, aplicando un protocolo de condicionamiento clásico en el cual el ácido isobutírico fue utilizado como estímulo condicionado y una vibración mecánica como incondicionado aversivo, el valor negativo del ácido isobutírico fue aumentado logrando una mayor respuesta de escape al mismo compuesto. La perturbación mecánica fue aplicada como un estímulo aversivo ya que en ambientes naturales de las vinchucas, la acción de un predador que intenta capturarla o la defensa de un hospedador irritado podrían generar estímulos vibratorios similares al generado en estos experimentos. Por esta razón, el aumento en la respuesta de escape de las larvas luego de la co-ocurrencia de la contingencia ácido isobutírico/perturbación mecánica muestra cómo la correcta asociación entre estos dos estímulos debe ser relevante para la supervivencia. Las larvas podrían, de esta manera, responder escapando innatamente a la feromona de alarma pero responder más intensamente si además de la presencia de la feromona de alarma encuentra otras evidencias más directas de la presencia de un peligro. (*e.g.*, un indicador de riesgo más directo como una vibración mecánica).

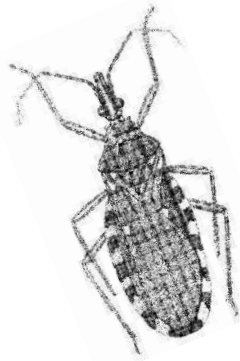
Fue demostrado aquí y en trabajos previos que el ácido isobutírico genera un comportamiento de repelencia en las vinchucas; Sin embargo, el ácido isobutírico *per se* no es el peligro real, sino una señal química que advierte de la presencia de un peligro potencial como lo es un predador o la defensa de un hospedador. En experimentos realizados en este capítulo de la Tesis, se puso a prueba si el ácido isobutírico podría actuar como un castigo para las larvas en un contexto de condicionamiento operante. Se demostró con resultados contundentes que las vinchucas son capaces de evitar zonas *a priori* neutras (en este caso piso rugoso o piso liso) castigándolas con la sola presencia del ácido isobutírico. De acuerdo a la bibliografía existente, este es el primer trabajo en el cual un olor aversivo es utilizado como un refuerzo negativo en animales. En estos experimentos, las larvas aprendieron a evitar zonas con mayor presencia de ácido isobutírico. Este comportamiento aprendido podría permitirle a los triatominos evitar zonas donde previamente hubo

ácido isobutírico presente, es decir, zonas con mayor probabilidad de encontrar un peligro potencial.

Para ambos protocolos asociativos aplicados en este trabajo (*i.e.*, condicionamiento clásico y operante), mayores concentraciones del estímulo químico resultaron en una mejor consolidación de la asociación presentada. Aún si una mejor respuesta innata de escape fue obtenida cargando 10 μ g de ácido isobutírico en la pieza de papel de filtro, la mejor marca de memoria fue obtenida cuando 1000 μ g ácido isobutírico fueron utilizados para ambos protocolos de condicionamiento, el clásico y el operante. Se sabe de trabajos anteriores que la saliencia o prominencia de los estímulos es un parámetro clave para una mejor consolidación de la memoria en muchos animales (Pelz *et al.*, 1997). Nuestros resultados parecerían confirmar dicha afirmación.

Por todo lo expuesto en este capítulo de la Tesis se demostró que un compuesto particular, el ácido isobutírico, puede ocupar diferentes roles en la modulación cognitiva de un comportamiento particular. En un principio se demostró que el ácido isobutírico es un estímulo incondicionado, ya que genera una respuesta de escape innata (*i.e.*, una respuesta incondicionada) en estos insectos. Además, se demostró, en la parte 1, que el ácido isobutírico puede actuar como agente de sensibilización cuando es entregado bajo un protocolo de pre-exposición corta. A su vez, una larga pre-exposición a este compuesto puede invertir su significado biológico para los triatominos, sugiriendo un proceso de habituación involucrado. Además, en la parte 2, se mostró que el ácido isobutírico puede actuar como un estímulo condicionado bajo un paradigma clásico, ya que la respuesta de las vinchucas al mismo varía luego de asociarlo con otro estímulo innatamente negativo como lo es la vibración mecánica (que sería el estímulo incondicionado). Y finalmente, en la parte 3, el ácido isobutírico toma el rol de estímulo incondicionado aversivo en un contexto operante, refuerzo negativo que fue suficiente para lograr que las vinchucas eviten una zona *a priori* neutra (que sería el estímulo condicionado).

Teniendo en cuenta la bibliografía existente, éste es el primer trabajo en el que se informa de la existencia de una única molécula que tiene varias y diferentes funciones cognitivas.



Conclusiones finales:

-Estadios inmaduros de T. infestans y volátiles liberados durante un evento de perturbación

Los resultados presentados en este trabajo de Tesis evidencian, por primera vez, la existencia de una clave química liberada por las larvas de 5^{to} estadio de la vinchuca *T. infestans* perturbadas, que media el comportamiento de escape de larvas de la especie. Si bien no fue posible la identificación precisa de los compuestos químicos involucrados como así tampoco la determinación de la fuente de liberación, sí se logró una aproximación en cuanto a los compuestos químicos que podrían ser responsables.

Para profundizar y completar este estudio, sería conveniente la repetición del muestreo de volátiles en el *headspace* de un número elevado de larvas perturbadas, acoplado a su control correspondiente con el fin de confirmar la presencia de 4-metil-4-hidroxi-2-pentanona en la secreción liberada. Además, se deberían realizar ensayos para analizar la respuesta comportamental que este volátil podría evocar en las larvas.

A su vez, es necesario profundizar el análisis de las glándulas salivales y del regurgido liberado por las larvas luego de una perturbación. En el Capítulo 3 se observó que las larvas mostraron una respuesta de escape a 2-metil-1-butanol, un compuesto que además de ser componente de la feromona de larva liberada por los adultos, fue encontrado en el regurgitado de las larvas perturbadas.

-Dinámica de llenado de las glándulas de Brindley presentes en los adultos de T. infestans

Cuando el adulto se encuentra farado en el interior de la larva de 5^{to} estadio, posee sus glándulas de Brindley completamente desarrolladas, sin embargo, aún no se encuentran llenas. Luego de la ecdisis imaginal, parecería ocurrir que a medida que la

cutícula se va endureciendo, las glándulas de Brindley se llenan gradualmente hasta alcanzar un contenido de ácido isobutírico de 11,36 µg. Este valor fue considerado como un equivalente de adulto, lo cual representa el estado de las glándulas llenas. Se demostró también que luego de una perturbación, dicho contenido es recuperado de manera gradual, requiriendo aproximadamente una semana hasta alcanzar el contenido inicial. A su vez, se evidenció que sucesivas perturbaciones generan una disminución gradual del contenido de las glándulas de Brindley y que el grado de ayuno podría limitar la capacidad de recarga de estas glándulas para una eventual liberación de la secreción frente a una nueva perturbación. Esta dependencia de la alimentación en el llenado de las glándulas se vio reflejada en el comportamiento de escape de las larvas.

-Respuesta de las larvas T. infestans frente a volátiles liberados por los adultos de la especie luego de una perturbación

El análisis de la respuesta comportamental de las larvas frente a volátiles liberados por las glándulas metasternales y de Brindley de los adultos durante un evento de perturbación demostró que además del ácido isobutírico, otros volátiles son capaces de evocar una respuesta de escape. Las larvas evitaron la dosis de 10 µg de los ácidos isobutírico, butírico y acético y el alcohol 2-metil-1-butanol, evaluados individualmente. Frente a otras dosis evaluadas de estos compuestos y a las cetonas 3-pentanona y 2-butanona, al ácido propiónico y al alcohol 2-metil-1-propanol, las larvas no mostraron una respuesta de orientación diferente del azar. Por otro lado, en el análisis de mezclas, ya sea binarias, cuaternarias, en dosis activas o presentes en la secreción, se observaron distintas respuestas, tanto repelencia como atracción.

Es interesante destacar que nuestros resultados parecerían indicar que sólo las glándulas de Brindley cumplen una función de alarma, excluyendo de este contexto a las glándulas metasternales; ya que el volátil exclusivo de estas últimas (3-pentanona) no generó respuesta de escape en las larvas.

-Capacidades cognitivas de las larvas de T. infestans en contexto de alarma

Las larvas de *T. infestans* son capaces de aprender bajo un contexto de escape mediado por la feromona de alarma. Se mostró en nuestro estudio que, bajo distintos enfoques

cognitivos, asociativos y no asociativos, clásicos y operantes, el comportamiento de escape es fuertemente modulado por la experiencia.

Los resultados obtenidos mostraron que la pre-exposición a una dosis biológicamente relevante de ácido isobutírico aumenta la respuesta de los insectos frente al mismo compuesto. Además, se demostró que la pre-exposición a la feromona de alarma provocó una falta de respuesta a la misma

Es interesante resaltar que en esta Tesis se demostró que un único compuesto, el ácido isobutírico, puede ocupar diferentes roles en la modulación cognitiva de un comportamiento particular. El ácido isobutírico puede ser un estímulo incondicionado, ya que genera una respuesta innata de escape (*i.e.*, una respuesta incondicionada); o puede actuar como un estímulo condicionado bajo un paradigma clásico, ya que la respuesta de las vinchucas al mismo varía luego de asociarlo con otro estímulo innatamente negativo como lo es una vibración mecánica (que sería el estímulo incondicionado); y, por último, el ácido isobutírico toma el rol de estímulo incondicionado aversivo en un contexto operante, refuerzo negativo que fue suficiente para lograr que las vinchucas eviten una zona *a priori* neutra (que sería el estímulo condicionado).



Bibliografía

- Abramson, C.I.; Romero, E.S.; Frasca, J.; Fehr, R.; Lizano, E. & Aldana, E. 2005. Psychology of learning: a new approach to study behavior of *Rhodnius prolixus* Stal under laboratory conditions. *Psychol. Rep.* 97: 721-731.
- Aggio, J.; Rakitin, A. & Maldonado, H. 1996. Serotonin-induced short- and long-term sensitization in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 53: 441-448.
- Aldana, E.; Abramson, C.I.; Lizano, E.; Vegas, R. & Sulbaran-Romero, E. 2008. Learning and orientation to odor in the bug *Rhodnius prolixus* Stal 1859 under laboratory conditions. *Parasitol. Res.* 103: 587-594.
- Aldrich, J.R. 1988. Chemical ecology of the Heteroptera. *Annu. Rev. Entomol.*, 33: 211-238.
- Aldrich, J.R. & Yonke, T.R. 1975. Natural-products of abdominal and metathoracic scent glands of coreoid bugs. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 68: 955-960.
- Aldrich, J.R.; Blum, M.S.; Lloyd, H. & Fales, H.M. 1978. Pentatomid natural products. Chemistry and morphology of the III and IV dorsal abdominal glands of the adults. *J. Chem. Ecol.*, 4: 161—172.
- Aldrich, J.R.; Neal, J.W.Jr.; Oliver, J.E. & Lusby, W.R. 1991. Chemistry vis-à-vis maternalism in lace bugs (Heteroptera: Tingidae): alarm pheromone and exudates defense in *Corythucha* and *Gargaphia* species. *J. Chem. Ecol.*, 17: 2307-2322.
- Aldrich, J.R.; Waite, G.K.; Moore, C.; Payne, J.A.; Lusby, W.R. & Kochansky, J.P. 1993. Male-specific volatiles from nearctic and australasian true bugs (Heteroptera, Coreidae and Alydidae). *J. Chem. Ecol.*, 19: 2767-2781.
- Aldrich, J.R.; Rosi, M.C. & Bin, F. 1995. Behavioral correlates for minor volatile compounds from stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). *J. Chem. Ecol.*, 21: 1907-1920.
- Alonso, W.J.; Wyatt, T.D. & Kelly, D.W. 2003. Are vectors able to learn about their hosts. A case study with *aedes aegypti* mosquitoes. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 98: 665-672.
- Anderson, P.; Sadek, M.M. & Hansson, B.S. 2003. Pre-exposure Modulates Attraction to Sex Pheromone in a Moth. *Chem. Senses*, 28: 285-291.
- Anderson, P.; Hansson, B.S.; Nilsson, U.; Han, Q.; Sjöholm, M.; Skals, N. & Anton, S. 2007. Increased Behavioral and Neuronal Sensitivity to Sex Pheromone after Brief Odor Experience in a Moth. *Chem. Senses*, 32: 483-491.
- Anhê, A.C.B. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. 2008. Cytochemical characterization of *Triatoma infestans* and *Pastronylus megistus* salivary gland cells (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Micron* 39: 1126-1133.

Anton, S.; Evengaard, K.; Barrozo, R.B.; Anderson, P. & Skals, N. 2011. Brief predator sound exposure elicits behavioral and neuronal long-term sensitization in the olfactory system of an insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108(8): 3401-5.

Aryeetey, E.A. & Kumar, R. 1973. Structure and function of the dorsal abdominal gland and defence mechanism in cocoa-capsids (Miridae : Heteroptera). *J. Entomology A* 47: 181-189.

Attygalle, A.B.; Wu, X.; Ruzicka, J.; Rao, S.; Garcia, S.; Herath, K.; Meinwald, J.; Maddison, D.R. & Will, K.W. 2004. Defensive chemicals of two species of *Trachypachus* Motschulski. *J. Chem. Ecol.*, 30:577-588.

Augusto, F. & Luiz Pires Valente, A. 2002. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *Trends in Analytical Chemistry* . 21(6-7): 428-438.

Avarguès-Weber, A., de Brito Sanchez, M.G., Giurfa, M. & Dyer, A.G. 2010. Aversive reinforcement improves visual discrimination learning in free-flying honeybees. *PlosOne*, 5(10): e15370. Doi: 10.1371/journal.pone.0015370.

Baldwin, I.T.; Dusenbery, D.B. & Eisner, T. 1990. Squirtting and refilling: Dynamics of *p*-benzoquinone production in defensive glands of *Diploptera punctata*. *J. Chem. Ecol.*, 10: 2823-34. doi: 10.1007/BF00979476.

Barrozo, R. 2003. Orientación al hospedador en la vinchuca *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae): Claves sensoriales responsables. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. 180 pp.

Barrozo, R. & Lazzari, C.R. 2004a. Orientation Behaviour of the Blood-sucking Bug *Triatoma infestans* to Short-chain Fatty Acids: Synergistic Effect of L-Lactic Acid and Carbon Dioxide. *Chem. Senses*, 29:833-841.

Barrozo, R.B. & Lazzari, C.R. 2004b. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. *Chem Senses*, 29: 319-329.

Barth, R. 1960. Sôbre o órgão abdominal glandular de *Arilus carinatus* (Forster, 1771) (Heteroptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 59: 37-43.

Berger, R.S. & Estes, P.M. 1987. Blockage of pheromone reception in *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) males with N-alkylmaleimides. *Environ. Entomol.*, 16:1130-1134.

Bernard, J. 1974. Étude électrophysiologique de récepteurs impliqués dans l'orientation vers l'hôte et dans l'acte hématophage chez un Hémiptère: *Triatoma infestans*. Tesis Doctoral, Universidad de Rennes, Francia.

- Bitterman, M.E.; Menzel, R.; Fietz, A. & Schafer, S. 1983. Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Psychol.*, 97: 107-19.
- Blatt, S.E.; Borden, J.H.; Pierce, H.D.; Gries, R. & Gries, G. 1998. Alarm pheromone system of the western conifer seed bug, *Leptoglossus occidentalis*. *J. Chem. Ecol.*, 24: 1013-1031.
- Blum, M.S. 1981. Chemical Defenses of Arthropods. Academic Press Inc.
- Blum, M.S. 1985. Fundamentals of Insect Physiology. John Wiley & Sons publication. Georgia, USA.
- Blum, M.S. 1996. Semiochemical parsimony in the arthropoda. *Annu. Rev. Entomol.*, 41:353-374.
- Bohman, B.; Tröger, A.; Franke, S.; Lorenzo, M.G.; Francke, W. & Unelius, C.R. 2011. Structure elucidation and synthesis of dioxolanes emitted by two *Triatoma* species (Hemiptera: Reduviidae). *J. of Natural Products*, 74(4): 690-694.
- Bohman, B.; Jeffares, L.; Flematti, G.; Phillips, R.D.; Dixon, K.W.; Peakall, R.; Russell A. & Barrow, R.A. 2012. The Discovery of 2-Hydroxymethyl-3-(3-methylbutyl)-5-methylpyrazine: A Semiochemical in Orchid Pollination. *Org. Lett.*, 14 (10): 2576–2578. doi:10.1021/ol300864u
- Bonacci, T.; Brandmayr, P.; Zetto, T.; Perrotta, I.; Guarino, S.; Peri, E. & Colazza, S. 2011. Volatile compounds released by disturbed and undisturbed adults of *Anchomenus dorsalis* (Coleoptera, Carabidae, Platynini) and structure of the pygidial gland. *Zookeys* 81: 13-25.
- Bordereau, C.; Canello, E.M.; Sémon, E.; Courrent, A. & Quennedey, B. 2002. Sex pheromone identified after Solid Phase Microextraction from tergal glands of female alates in *Cornitermes bequaerti* (Isoptera, Nasutitermitinae). *Insectes Sociaux*. 49(3): 209-215.
- Borges, M. & Aldrich, J.R. 1992. Instar-specific defensive secretions of stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae). *Experientia* 48: 893-896.
- Bradbury, J. W. & Vehrencamp, S.L. 2011. Web Topic 6.1: How are pheromones identified?. Principles of Animal Communication, Second Edition Companion Website. <<http://sites.sinauer.com/animalcommunication2e>>
- Braun, G. & Bicker, G. 1992. Habituation of an appetitive reflex in the honeybee. *J. Neurophysiol.*, 67: 588-98.
- Brindley, M.D.H. 1930. On the metasternal scent glands of certain Heteroptera. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 78 (2): 199–208.
- Brossut, R. 1983. Allomonal secretions in cockroaches. *J. Chem. Ecol.*, 9:143-158.

Bruce, T.J.A.; Wadhams, L.J. & Woodcock, C.M. 2005. Insect host location: a volatile situation. *Trends in plant science*, 10 (6): 269-274.

Burger, B.V., Munro, Z., Roth, L.M., Geertsema, L.H., & Habich, A. 1986. The chemical nature of the adult defensive secretion of the tip wilter, *Elasmopoda valga*. *Insect Biochem.* 16:687-690.

Butenandt, A.; Beckamnn, R. & Hecker, E. 1961. Über den Sexual-lockstoff des Seidenspinners .1. Der biologische Test und die Isolierung des reinen Sexual-lockstoffes Bombykol. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie* 324: 71. doi:10.1515/bchm2.1961.324.1.71

Byers, J.A. 2006. Production and predator-induced release of volatile chemicals by the plant bug *Lygus hesperus*. *J. Chem. Ecol.*, 32:2205-2218.

Carayon, J.; Usinger, R.L. & Wygodzinsky, P. 1958. Notes on the higher classification of the Reduviidae, with the description of a new tribe of the Phymatinae. *Rev. Zool. Bot. Afr.*, 57: 256-281.

Carayon, J. 1962. Observations sur l'appareil odorifique des Héteroptères particulièrement celui des Tingidae, Vianaididae et Piesmatidae. *Cah. Nat.*, 18:1-16.

Carbajal de la Fuente, A.L. & Catalá, S. 2002. Relationship between Antennal Sensilla Pattern and Habitat in Six Species of Triatominae. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 97(8): 1121-1125.

Carrel, J.E. 1984. Defensive secretion of the pill millipede *Glomeris marginata*: I. Fluid production and storage. *J. Chem. Ecol.*, 10(1): 41-51. doi: 10.1007/BF00987642

Case, J.F. 1957. Differentiation of the effects of pH and CO₂ on spiracular function of insects. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 49, 103-113.

Catalá, S. 1991. The biting rate of *Triatoma infestans* in Argentina. *Med. Vet. Entomol.*, 5: 325-333.

Catalá, S.; Maida, D.M.; Caro-Riaño, H.; Jaramillo, N. & Moreno, J. 2004. Changes Associated with Laboratory Rearing in Antennal Sensilla Patterns of *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, and *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 99(1): 25-30.

Ceballos, L.E.; Vazquez-Prokopec, G.M.; Cecere, M.C.; Marcet, P.L. & Gürtler, R.E. 2005. Feeding rates, nutritional status and flight dispersal potential of peridomestic populations of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta Tropica* 95: 149-159.

- Chapman, R.F. 1998. The Insects. Structure and Function. Chapman R.F. (ed.), Londres.
- Chivers, D.P.; Wisenden, B.D. & Smith, R.J.F. 1996. Damselfly larvae learn to recognize predators from chemical cues in the predator's diet. *Anim. Behav.*, 52:315-320.
- Cocchiararo-Bastias, L.M.; Mijailovsky, S.J.; Calderon-Fernández, G.M.; Lorenzo Figueiras, A.N. & Juarez, P. 2011. Epicuticle lipids mediate mate recognition in *Triatoma infestans*. *J. Chem. Ecol.*, 37: 246-252.
- Cork, A. & Park, K.C. 1996. Identification of electrophysiologically-active compounds for the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, in human sweat extracts. *Med. Vet. Entomol.*, 10: 269-276.
- Cossé, A.A.; Todd, J.L.; Millar, J.G.; Martínez, L.A. & Baker, T.C. 1995. Electroantennographic and coupled gas chromatographic—electroantennographic responses of the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, to male-produced volatiles and mango odor. *J. Chem. Ecol.*, 21: 1823-1836.
- Coura, J. & Dias, J. 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Men. Inst. Osw. Cruz*, 104 (1): 31-40.
- Crespo, J.G. & Manrique, G. 2007. Mating behavior of the hematophagous bug *Triatoma infestans*: role of Brindley's and metasternal glands. *J. Insect Physiol.*, 53: 708-714.
- Cruz-López, L. & Morgan, E.D. 1995. Chemical investigation of aggregation behaviour of *Triatoma* bugs (Hemiptera: Reduviidae). *J. Chem. Ecol.*, 21 (12):2069-2078.
- Cruz-López, L.; Morgan, E.D. & Ondarza, R.N. 1995. Brindley's gland exocrine products of *Triatoma infestans*. *Med. Vet. Entomol.* 9(4):403-406
- Cruz-Lopez, L.; Malo, E.A.; Rojas, J.C. & Morgan, E.D. 2001. Chemical ecology of triatomine bugs: vectors of Chagas disease. *Med. Vet. Entomol.*, 15: 351-357.
- Cunningham, J.P., Moore, C.J., Zalucki, M.P. & West, S.A. 2003. Learning, odour preference and flower foraging in moths. *J. Exp. Biol.*, 207: 87-94.
- Davidová-Vilímová & Podoubsky. 1999. Larval and adult dorso-abdominal scent glands and androconia of Central European Pentatomoidea (Heteroptera). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* 63: 37-69.
- Davidson, B.S.; Eisner, T.; Witz, B. & Meinwald, J. 1989. Defensive secretion of the carabid beetle, *Pasimachus subsulcatus*. *J. Chem. Ecol.*, 15:1689-1697.

de Brito Sanchez, M.G.; Manrique, G. & Lazzari, C.R. 1995. Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): II. Electrophysiological correlates. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 90 (5): 649-651.

Deisig, N.; Lachnit, H.; Giurfa, M. & Hellstern, F. 2001. Configural olfactory learning in honeybees: negative and positive patterning discrimination. *Learn. Mem.* 8(2):70-78. doi: 10.1101/ilm.3830 I

Dettner, K. & Reissenweber, F. 1991. The defensive secretion of Omaliinae and Proteininae (Coleoptera: Staphylinidae): its chemistry, biological and taxonomic significance. *Biochem. Syst. Ecol.* 19:291-303.

Dewhurst, S.Y. & Pickett, J.A. 2010. Production of semiochemical and allelobiotic agents as a consequence of aphid feeding. *Chemoecology*, 20(2): 89-96.

Dias, J.C.P. 2002. O controle da doença de Chagas do Brasil. En: Silveira A.C., editor. El control de la enfermedad de Chagas en los países del cono sur de América. Uberaba, Brazil: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. 145-250.

Dicke, M. & Sabelis, M.W. 1988. Infochemical terminology: Base don cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Funct. Ecol.*, 2 (2):131-139.

Dicke, M. & Grostal, P. 2001. Chemical detection of natural enemies by arthropods: An ecological perspective. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 32: 1-23.

Drijfhout, F.P.; Groot, A.T.; Posthumus, M.A.; Beek, T.A. & Groot, A. 2002. Coupled gas chromatographic-electroantennographic responses of *Lygocoris pabulinus* (L.) to female and male produced volatiles. *Chemoecology*, 12(2): 113-118.

Duerr, J.S. & Quinn, W.G. 1982. Three *Drosophila* mutations that block associative learning also affect habituation and sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 3646-3650.

Dujardin, J.P.; Schofield, C.J. & Panzera, F. 2000. Les vecteurs de la maladie de Chagas: recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Academie Royale des Sciences d'Outre-Mer. Belgium.

Dukas, R. 1998. Ecological relevance of associative learning in fruit fly larvae. *Behav. Ecol, Sociobiol.*, 19: 195-200.

Durak, D. & Kalender, Y. 2007. Morphology and chemical analysis of the metathoracic scent glands of *Coreus marginatus* (Linnaeus, 1758) (Heteroptera: Coreidae) from Turkey. *Entomological News*, 118 (3):227-234.

Durak, D. 2008. Morphology and chemical composition of metathoracic scent glands in *Dolycoris baccarum* (Linnaeus, 1758) (Heteroptera: Pentatomidae). *Acta Zoologica* (Stockholm) 89: 193–199. doi: 10.1111/j.1463-6395.2007.00313.x

Eisner, T.; Rossini, C.; González, A. & Eisner, M. 2004. Chemical defense of an opilionid (*Acanthopachylus aculeatus*). *J. Exp. Biol.* 207: 1313-1321 doi:10.1242/jeb.00849

El-Sayed, A.M.; Suckling, D.M.; Byers, J.A.; Jang, E.B. & Wearing, C.H. 2009. Potential of “Lure and Kill” in Long-Term Pest Management and Eradication of Invasive Species. *J. Econ. Entomol.*, 102: 815-835.

Farine, J.P.; Bonnard, O.; Brossut, R. & Le Quere, J.L. 1992. Chemistry of pheromonal and defensive secretions in the nymphs and the adults of *Dysdercus-cingulatus* Fabr. (Heteroptera, Pyrrhocoridae). *J. Chem. Ecol.*, 18: 65-76.

Feldlaufer, M.F.; Domingue, M.J.; Chauhan, K.R. & Aldrich, J.R. 2010. 4-oxo-aldehydes from the dorsal abdominal glands of the bed bug (Hemiptera: Cimicidae). *J. Med. Entomol.* 47(2): 140-143; doi: 10.1603/ME09210.

Fontán, A.; González Audino, P.; Martínez, A.; Alzogaray, R.A.; Zerba, E.N.; Camps, F. & Cork, A. 2002. Attractant Volatiles Released by Female and Male *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), a Vector of Chagas disease: Chemical Analysis and Behavioral Bioassay. *J. Med. Entomol.*, 39 (1): 191-197.

Fortunato, A., Maile, R., Turillazzi, S., Morgan, E.D., Moneti, G., Jones, G.R., & Pieraccini, G. 2001. Defensive role of secretion of ectal mandibular glands of the wasp *Polistes dominulus*. *J. Chem. Ecol.*, 27:569-579.

Games, D.E.; Schofield, C.J. & Staddon, B.W. 1974. The secretion from Brindley's scent gland in Triatominae. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 67: 820-829.

Giurfa, M.; Zhang, S.; Jenett, A.; Menzel, R. & Srinivasan, M.V. 2001. The concepts of “sameness” and “difference” in an insect. *Nature*, 410: 930-933.

Giurfa, M. 2004. Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften*, 91 (5): 228-231.

Gonzalez Audino, P.; Alzogaray, R.A.; Vassena, C.; Masuh, H.; Fontan, A.; Gatti, P.; Martinez, A.; Camps, F.; Cork, A. & Zerba, E. 2007. Volatile compounds secreted by Brindley's glands of adult *Triatoma infestans*: identification and biological activity of previously unidentified compounds. *J. Vector Ecol.*, 32 (1): 75-82.

Grubb, M.S. & Thompson, I.D. 2004. The influence of early experience on the development of sensory systems. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 14: 503-512.

Guerenstein, P.G. & Guerin, P.M. 2001. Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. *J. Exp. Biol.* 204: 585-597.

Guerenstein, P.G. & Guerin, P.M. 2004. A comparison of volatiles emitted by adults of three triatomine species. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 111: 151–155.

- Guerenstein, P.G. & Lazzari, C.R. 2009. Host-seeking: how triatomines acquire and make use of information to find blood. *Acta Tropica*, 110 (2-3): 148-158.
- Guerrieri, F.; Gemeno, C.; Monsempes, C.; Anton, S.; Jacquín-Joly, E.; Lucas, P. & Devaud, J.M. 2012. Experience-dependent modulation of antennal sensitivity and input to antennal lobes in male moths (*Spodoptera littoralis*) pre-exposed to sex pheromone. *J. Exp. Biol.*, 215: 2334-2341.
- Gürtler, R.E.; Cecere, M.C.; Vázquez, D.P.; Chuit, R. & Cohen, J.E. 1996. Host-feeding patterns of domiciliary *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in northwest Argentina: seasonal and instar variations. *J. Med. Entomol.*, 33: 15-26.
- Gürtler, R.E.; Oneto, M.L.; Cecere, M.C.; Castañera, M.B. & Canale, D.M. 2001. A Simple method to identify triatomine (Hemiptera: Reduviidae) feces in sensing devices used in vector surveillance programs. *Entomol. Soc. Am.*, 38(2): 147-152.
- Hack, W.H.; Ricciardi, A.I.; Oscherov, B.; Olivetti, deB., 1980. Composición de la secreción de las glándulas de Brindley en Triatominae. *Medicina* (Buenos Aires), 40 (I): 178–180.
- Hammer, M.; Braun, G. & Mauelshagen, J. 1994. Food-induced arousal and non-associative learning in honeybees: dependence of sensitization on the application site and duration of food stimulation. *Behav. Neural. Biol.*, 62: 210-23.
- Hansson, B.S. 1999. Insect olfaction. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York ISBN 3-540-65034-2. +457.
- Hansson, B.S. 2002. A bug's smell – research into insect olfaction. *Trends Neurosci.* 25: 270-274.
- Hara, M.R.; Cavalheiro, A.J.; Gnaspini, P. & Santos, D.Y.A.C. 2005. A comparative analysis of the chemical nature of defensive secretions of Gonyleptidae (Arachnida: Opiliones: Laniatores). *Biochem. Syst. Ecol.*, 33: 1210-1225.
- Heisenberg, M.; Borst, A.; Wagner, S. & Byers, D. 1985. *Drosophila* Mushroom Body Mutants are Deficient in Olfactory Learning. *J. Neurogen.*, 2: 1-30.
- Henrici, H. 1938. Die Hautdrüsen der Landwanzen (Geocorisae), ihre mikroskopische Anatomie, ihre Histologie und Entwicklung. Teil 1. Die abdominalen Stinkdrüsen, die Drüsenpakete und die zerstreuten Hautdrüsen. *Zoologische Jahrbücher, Anatomie* 65: 141-228.
- Henrici, H. 1940. Die Hautdrüsen der Landwanzen (Geocorisae), ihre mikroskopische Anatomie, ihre Histologie und Entwicklung. Teil 2. Die thorakalen stinkdrüsen, die Drüsenpakete und die zerstreuten Hautdrüsen. *Zoologische Jahrbücher, Anatomie* 66: 371-402.

- Hefetz, A. & Lloyd, H.A. 1983. Identification of new components from anal glands of *Tapinoma simrothi pheonicium*. *J. Chem. Ecol.*, 9:607-613
- Heuskin, S.; Verheggen, F.J.; Haubruge, E.; Wathélet, J.P & Lognay, G. 2011. The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 15(3):459-470.
- Ho, H.Y. & Millar, J.G. 2001. Compounds in Metathoracic Glands of Adults and Dorsal Abdominal Glands of Nymphs of the Stink Bugs, *Chlorochroa uhleri*, *C. sayi*, and *C. ligata* (Hemiptera: Pentatomidae). *Zoological Studies* 40(3): 193-198.
- Ho, H.Y.; Kou, R. & Tseng, H.K. 2003. Semiochemicals from the predatory stink bug *Eocanthecona furcellata* (Wolff): components of metathoracic gland, dorsal abdominal gland, and sternal gland secretions. *J. Chem. Ecol.* 29: 2101-2114.
- James, D.G.; Moore, C.J. & Aldrich, J.R. 1994. Identification, synthesis, and bioactivity of a male-produced aggregation pheromone in assassin bug, *Pristhesancus plagipennis* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Chem. Ecol.*, 20(12): 3281-3295. Doi: 10.1007/BF02033726.
- Jones, C.G.; Hess, T.A.; Whitman, D.W.; Silk, P.J. & Blum, M.S. 1987. Effects of diet breadth on autogenous chemical defense of a generalist grasshopper. *J. Chem. Ecol.*, 13(2): 283-297.
- Jones, G.R. & Oldham, N.J. 1999. Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. *J. Chromatography A*, 843 (1-2): 199-236.
- Juárez, P. & Brenner, R.R.; 1981. Bioquímica del ciclo evolutivo de *Triatoma infestans* (vinchuca). V. Emisión de ácidos grasos volátiles. *Acta Fisiológica Latino-Americana*, 31: 113–117.
- Kälin, M & Barrett, F.M. 1975. Observations on the anatomy, histology, release-site, and function of Brindley's gland in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Annals Entomol. Soc. Am.*, 68: 126–134.
- Kaissling, K.E. 1995. Single unit and electroantennogram recordings in insect olfactory organs. In Spielman, A.I. and Brand, J.G. (eds), *Experimental Cell Biology of Taste and Olfaction. Current Techniques and Protocols*. CRC Press, FL,: 361–377.
- Karg, G. & Sauer, A.E. 1995. Spatial distribution of pheromone in vineyards treated for mating disruption of the grape vine moth *Lobesia botrana* measured with electroantennograms. *J. Chem. Ecol.*, 21 (9): 1299-1314.
- Karlson, P & Lüscher, M. 1959. Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183: 55-56.

- Kaur, J.S.; Lai, Y.L. & Giger, A.D. 2003. Learning and memory in the mosquito *Aedes aegypti* shown by conditioning against oviposition deterrence. *Med. Vet. Entomol.*, 17: 457-460.
- Kline, D.L. 2007. Semiochemical, traps/targets and mass trapping technology for mosquito management. *J. Am. Mosquito Contr.*, 23: 241-251.
- Klowden, M.C. 2002. Physiological systems in Insects. Chapter 12: Communication Systems, 351-386. Academic Press.
- Kong, X.B.; Zhang, Z.; Zhao, C.H. & Wang, H.B. 2007. Female sex pheromone of the Yunnan pine caterpillar moth *Dendrolimus houi*: first (E,Z)-isomers in pheromone components of *Dendrolimus* spp. *J Chem Ecol.*, 33(7): 1316-27.
- Krall, B.S.; Bartelt, R.J.; Lewis, C.J. & Whitman, D.W. 1999. Chemical defense in the stink bug *Cosmopepla bimaculata*. *J. Chem. Ecol.*, 25(11): 2477-2494.
- Kuwahara, Y.; Kawai, A.; Shimizuru, N.; Tokumaru, S. & Ueyama, H. 2011. Geraniol, *E*-3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol, as the Alarm Pheromone of the Sycamore Lace *Corythucha ciliata* (Say). *J. Chem. Ecol.*, 37:1211-1215. doi:10.1007/s10886-011-0025-2.
- Larsson, M.C.; Hedin, J.; Svensson, G.P.; Tolasch, T & Francke, W. 2003. Characteristic odor of *Osmoderma eremite* identified as a male-released pheromone. *J. Chem. Ecol.*, 29 (3).
- Law, J.H. & Regnier, F.E. 1971. Pheromones. *Annual Review Biochem.*, 40: 533-548.
- Lazzari, C.R. 1992. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Insect Physiol.*, 38: 895-903.
- Lazzari, C.R. 2009. Orientation towards hosts in haematophagous insects: an integrative perspective. *Adv. Insect Physiol.*, 37: 1-58.
- Lazzari, C.R. & Lorenzo, M.G. 2009. Exploiting triatominae behaviour: alternative perspectives for their control. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 104: 65-70.
- Lazzari, C.R.; Pereira, M.H. & Lorenzo, M.G. 2013. Behavioural biology of Chagas disease vectors. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 1-14.
- Lehane, M.J. 1991. Location of the host. En: Lehane MJ, editor. *Biology of Blood-sucking Insects*. Harper Collins Academic; London. pp: 25–51.
- Lent, H. & Wygodzinsky, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Revisión de los Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) y su significado como vectores del mal de Chagas. 163 (3): 123-520.

- Levinson, H.Z. & Barilan, A.R. 1971. Assembling and alerting scents produced by bedbugs *Cimex lectularius*. *Experientia* 27: 102.
- Levinson, H.Z., Levinson, A.R., & Maschwitz, U. 1974. Action and composition of the alarm pheromone of the bedbug *Cimex lectularius* L. *Naturwissenschaften*, 61:684-685.
- Levi-Zada, A.; Sadowsky, A.; Dobrinin, S.; David, M.; Ticuchinski, T.; Fefer, D.; Greenberg, A. & Blumberg, D. 2013. Reevaluation of the sex pheromone of the lesser date moth, *Batrachedra amydraula*, using autosampling SPME-GC/MS and field bioassays. *Chemoecology*, 23(1): 13-20.
- Lewis, W.J. & Tumlinson, J.H. 1988. Host detection by chemically mediated associative learning in a parasitic wasp. *Nature*, 331: 257-259.
- Liedtke, H.C.; Abjörnsson, K.; Harraca, V.; Knudsen, J.T.; Wallin, E.A.; Hedenström, E. & Ryne, C. 2011. Alarm Pheromones and Chemical Communication in Nymphs of the Tropical Bed Bug *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). *PLoS ONE*, 6(3): e18156. doi:10.1371/journal.pone.0018156
- López, A.; Crocco, L.; Morales, G. & Catalá, S. 1999. Feeding frequency and nutritional status of peridomestic populations of *Triatoma infestans* from Argentina. *Acta Tropica*, 73: 275-281.
- Lord, H. L. & Pawliszyn, J. 1998. Recent Advances in Solid-Phase Microextraction. Currents Trends and Developments in Sample Preparation; Supplement to LC-GC. *The Magazine of Separation Science*: S41-S46.
- Lorenzo, M.G. & Lazzari, C.R. 1996. The spatial pattern of defecation in *Triatoma infestans* and the role of faeces as a chemical mark of the refuge. *J. Insect Physiol.*, 42:903-907.
- Lorenzo Figueiras, A.N. & Lazzari, C.R. 1998. Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: a novel assembling factor. *Physiol. Entomol.*, 23: 33-37.
- Lorenzo Figueiras, A.N.; Kenigsten, A. & Lazzari, C.R. 1994. Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: chemical signals and temporal pattern. *J. Insect. Physiol.*, 40: 311-316.
- Lorenzo Figueiras, A.N. & Lazzari, C.R. 2000. Temporal Change of the Aggregation Response in *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 95 (6): 889-892.
- Lucas, P. & Renou, M. 1992. Electrophysiological study of the effects of deltamethrin, bioresmethrin, and DDT on the activity of pheromone receptor neurones in two moth species. *Pesticide Biochem. and Physiol.*, 43 (2): 103–115.

Lusby, W.R. & Kochansky, J.P. 1986. Identification of male-specific exocrine secretions from predatory stink bugs (Hemiptera, Pentatomidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 3: 1-12.

Maida, R. & Ziesmann, J. 2001. Female *Attacus atlas* Respond to Pheromones of *Antheraea polyphemus*: a Comparative Electrophysiological and Biochemical Study. *Chem. Senses*, 26(1): 17-24.doi: 10.1093/chemse/26.1.17.

Malo, E.; Renou, M. & Guerrero, A. 2000. Analytical studies of *Spodoptera littoralis* sex pheromone components by electroantennography and coupled gas chromatography–electroantennographic detection. *Talanta*, 52: 525–532.

Malosse, C.; Ramirez-Lucas P.; Rochat, D. & Morin, J.P. 1995. Solid-phase microextraction, an alternative method for the study of airborne insect pheromones (*Metamasius hemipterus*, Coleoptera, Curculionidae)..*HRC. J. High Resol. Chromat.*, 18(10): 669-670.

Manrique, G. & Lazzari, C.R. 1995. Existence of a sex pheromone in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): I. Behavioural evidence. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 90: 645-648.

Manrique, G.; Vitta, A.C.R.; Ferreira, R.A.; Zani, C.L.; Unelius, C.R.; Lazzari, C.R.; Diotaiuti, L.G. & Lorenzo, M.G. 2006. Chemical communication in Chagas disease vectors. Source, identity, and potential function of volatiles released by the metasternal and Brindley's glands of *Triatoma infestans* adults. *J. Chem. Ecol.*, 7: 9106-9116.

Manrique, G. & Lorenzo, M.G. 2012. The sexual behaviour of Chagas' disease vectors: Chemical signals mediating communication between male and female triatomine bugs. *Psyche*, 1-8. Article ID: 862891. doi: 10.1155/2012/862891.

Maschwitz, U. & Gutmann, Ch. 1979. Spur- und Alarmstoffe bei der gefleckten Brutwanze *Elasmucha grisea* (Heteroptera: Acanthosomatidae). *Insectes Sociaux*, 26:101-111.

May-Concha, I.; Rojas, J.C.; Cruz-Lopez, L.; Millar, J.G. & Ramsey, J.M. 2012. Volatile compounds emitted by *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease: chemical analysis and behavioural evaluation. *Med. Vet. Entomol.*, 27: 165-174.

McCall, P.J. & Eaton, G. 2001. Olfactory memory in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Med. Vet. Entomol.*, 15: 197-203.

McCall, P.J.; Mosha, F.W.; Njunwa, K.J. & Sherlock, K. 2001. Evidence for memorized site-fidelity in *Anopheles arabiensis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 95: 587-590.

McCall, P.J. & Kelly, D.W. 2002. Learning and memory in disease vectors. *Trends Parasitol.*, 18: 429-433.

- Menzel, R. & Muller, U. 1996. Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu. Rev. Neurosci.*, 19: 379-404.
- Millar, J.G. & Haynes, K.F. 1998. Methods in chemical ecology, Volume I: Chemical Methods, Springer, 420p.
- Millen, B.F.; Barrett, F.M. & Lai-Fook, J. 1979. The Brindley's glands of *Rhodnius prolixus*. II. Development of the glands during the fifth instar. *Can. J. Zool.*, 57:1120-1128.
- Minoli, S.; Kauer, I.; Colson, V.; Party, V.; Renou, M.; Anderson, P.; Gadenne, C.; Marion-Poll, F.d.r. & Anton, S. 2012. Brief Exposure to Sensory Cues Elicits Stimulus-Nonspecific General Sensitization in an Insect. *PLoS ONE*, 7, e34141.
- Minoli, S.A.; Palottini, F.; Crespo, J.G. & Manrique, G. 2013. Dislodgement effect of natural semiochemicals released by disturbed triatomines: a possible alternative monitoring tool. *J. Vect. Ecol.*, 38 (2).
- Monteith, L.G. 1963. Habituation and Associative Learning in *Drino bohemica* Mesn. (Diptera: Tachinidae). *Can. Entomol.*, 95: 418-426.
- Moore, B.P. 1968. Studies on the chemical composition and function of the cephalic gland secretion in Australian termites. *J. Insect Physiol.*, 14 (1): 33–39.
- Moraes, M.C.B; Pareja, M.; Laumann, R.A. & Borges, M. 2008. The Chemical volatiles (semiochemicals) produced by neotropical stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomol.*, 37(5):489-505.
- Mota, T.; Vitta, A.C.R.; Lorenzo-Figueiras, A.N.; Barezani, C.P.; Zani, C.L.; Lazzari, C.R.; Diotaiuti, L.; Jeffares, L.; Bohman, B. & Lorenzo, M. 2014. A multi-species bait for Chagas disease vectors. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 8(2):e2677. doi: 10.1371/journal.pntd.0002677.
- Mozuraitis, R., Borg-Karlson A.K., Eiras, A., Witzgall, P., Kovaleski, A., Vilela, E.F. & Unelius, C.L. 1996. Solid phase microextraction technique used for collecting volatiles released by individual signalling *Bonagota cranaodes* moths. Abstracts of the ISCE 13th Annual Meeting. Agosto 18-22. Praga, República Checa.
- Mustaparta, H. 1984. Olfaction. En *Chemical Ecology of Insects*, ed. Bell, W.J. & Cardé, R.T. pp: 37-72. London: Chapman & Hall.
- Nault, L.R.; Edwards, L.J.; Styer, W.E. 1973. Aphid Alarm Pheromones: Secretion and Reception. *Environm. Entomol.*, 2 (1): 101-105(5).
- Noireau, F.; Flores, R.; Gutierrez, T. & Dujardin, J.P. 1997. Detection of sylvatic dark morphs of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 92, 583-584.

Nordlund, D.A. & Lewis, W.J. 1976. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *J. Chem. Ecol.*, 2(2): 211-220.

Ortiz, M.I. & Molina, J. 2010. Preliminary evidence of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Triatominae) attraction to human skin odour extracts. *Acta Trop.*, 113: 174-179.

Otte, 1974. Effects and functions in the evolution of signaling systems. *Annual Review Ecol. System.*, 5: 385-417.

Papaj, D.R. & Lewis, A.C. (eds.) 1993. Insect Learning: Ecological and Evolutionary Perspectives. New York. Chapman & Hall. 398 pp.

Pareja, M.; Borges, M.; Laumann, R.A. & Moraes, M.C.B. 2007. Inter- and intraspecific variation in defensive compounds produced by five neotropical stink bug species (Hemiptera: Pentatomidae). *J. Insect Physiol.* 53: 639-648.

Park, K.C. & Hardie, J. 1998. An improved aphid electroantennogram. *J. Insect Physiol.* 44: 919-928.

Park, K.C.; Elias, D.; Donato, B. & Hardie, J. 2000. Electroantennogram and behavioural responses of different forms of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*, to sex pheromone and plant volatiles. *J. Insect Physiol.*, 46: 597-604.

Parrilla, A. & Guerrero, A. 1994. Trifluoromethyl ketones as inhibitors of the processionary moth sex pheromone. *Chem Senses.*, 19(1):1-10.

Pattenden, G. & Staddon, B.W. 1972. Identification of isobutyric acid in secretions from Brindley's scent glands in *Rhodnius prolixus*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 65: 1240-1241.

Pavis, C.; Malosse, C.; Ducrot, P.H. & Descoins, C. 1994. Dorsal abdominal glands in nymphs of southern green stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae): Chemistry of secretions of five instars and role of (*E*)-4-oxo-2-decenal, compound specific to first instars. *J. Chem. Ecol.*, 20(9): 2213-2227.

Pavlov, I.P. 1927. Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. Ed: Oxford University Press: Humphrey Milford, London.

Pelz, C.; Gerber, B. & Menzel, R. 1997. Odorant intensity as a determinant for olfactory conditioning in honeybees: roles in discrimination, overshadowing and memory consolidation. *J. Exp. Biol.*, 200: 837-847.

Preti, G.; Muetterties, E.L.; Furman, J.M.; Kennelly, J.J. & Johns, B.E. 1976. Volatile constituents of dog (*Canis familiaris*) and coyote (*Canis latrans*) anal sacs. *J. Chem. Ecol.*, 2: 177-186.

Pontes, G.B.; Bohman, B.; Unelius, C.R. & Lorenzo, M.G. 2008. Metasternal gland

volatiles and sexual communication in the triatomine bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Chem. Ecol.*, 34: 450-457.

Pontes, G.B. & Lorenzo, M.G. 2012. Female metasternal gland odours mediate male aggregation in *Rhodnius prolixus*, a triatomid bug. *Med.Vet. Entomol.*, 26: 33-36.

Prestwich, G.D. & Streinz, L. 1988. Haloacetate analogs of pheromones: Effects on catabolism and electrophysiology in *Plutella xylostella*. *J. Chem. Ecol.*, 14 (3): 1003-1021.

Qiu, Y.T.; Smallegange, R.C.; Smid, H.M.; Loon, J.J.A. van; Galimard, A.M.S.; Posthumus, M.A.; Beek, T.A. van & Takken, W. 2004. GC-EAG analysis of human odours that attract the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting* 15; ISSN: 1874-9542.

Rakitin, A., Tomsic, D. & Maldonado, H. 1991. Habituation and sensitization to an electrical shock in the crab *Chasmagnathus*. Effect of background illumination. *J. Physiol. Behav.*, 50: 477-487.

Ramírez Pérez, J. 1969. Estudio sobre la Anatomía de *Rhodnius prolixus*. *Rev. Venezolana Sanidad Asistencia Social*, 34:9-38.

Reis, M.M.; Meirelles, R.M.S. & Soares, M.J. 2003. Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Tissue & Cell*, 35:293-400.

Reis Dos Santos-Mallet, J. & De Souza, W. 1990. Histological and ultrastructural aspects of the Brindley's glands of *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 85 (2): 141-152.

Remold, H. 1963. Scent-glands of Land- bugs, their physiology and biological function. *Nature*, 198: 764-768.

Renou, M.; Lucas, P.; Malo, E.; Quero, C. & Guerrero, A. 1997. Effects of Trifluoromethyl Ketones and Related Compounds on the EAG and Behavioural Responses to Pheromones in Male Moths. *Chem. Senses*, 22: 407-416.

Ribeiro, J.M.C.; Assumpção, T.C. & Francischetti, I.M.V. 2012. An Insight into the Sialomes of Bloodsucking Heteroptera. *Psyche*, Article ID 470436, doi:10.1155/2012/470436

Robacker, D.C. & Bartelt, R.J. 1996. Solid-phase microextraction analysis of static-air emissions of ammonia, methylamine, and putrescine from a lure for the Mexican fruit fly (*Anastrepha ludens*). *J. Agric. Food Chem.*, 44: 3554-3559.

Rochat, D.; Ramirez-Lucas, P.; Malosse, C.; Aldana, R.; Kakul, T. & Morin, J.P. 2000. Role of solid-phase microextraction in the identification of highly volatile

pheromones of two Rhinoceros beetles *Scapanes australis* and *Strategus aloeus* (Coleoptera, Scarabaeidae, Dynastinae). *J. Chromatography A.*, 885(1-2): 433-444.

Roelofs, W. L. 1984. Electroantennogram Assays: Rapid and Convenient Screening Procedures for Pheromones en Techniques in Pheromone Research; Springer-Verlag: New York, pp.: 131-159.

Rojas, J.C.; Ríos-Candelaria, E.; Cruz-López, L.; Santiesteban, A.; Bond-Compean, J.G.; Brindis, Y. & Malo, E.A. 2002. A reinvestigation of Brindley's gland exocrine compounds of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Ent.*, 39 (2): 256–265.

Rossini, C.; Attygalle, A.B.; González, A. ;Smedley, S.R.; Eisner, M.; Meinwald, J. & Eisner, T. 1997. Defensive production of formic acid (80%) by a carabid beetle (*Galerita lecontei*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 94(13): 6792–6797.

Rossiter, M. & Staddon, B.W. 1983. 3-Methyl-2-hexanone from the bug *Dipetalogaster maximus* (Uhler) (Heteroptera: Reduviidae). *Experientia*, 39: 380-381.

Salerno, G.; Iacovone, A.; Carlin, S.; Frati, F.; Conti, E. & Anfora, G. 2012. Identification of sex pheromone components in *Trissolcus brochymenae* females. *J. Insect Physiol.*, 58(12):1635-42. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.10.003.

Sans, A.; Prados, M.; Eizaguirre, M.; López, C. & Riba, M. 1998. Utilización de análogos fluorados de la feromona sexual de *Sesamia nonagrioides* Lef. como inhibidores de su actividad biológica. *Bol. San. Veg. Plagas*, 24: 435-442.

Schacter, D.L. & Buckner, R.L. 1998. Priming and the Brain. *Neuron*, 20:185-195.

Schofield, C.J. 1975. The behavioural biology of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae) with special reference to intra-specific communication mechanisms. PhD thesis, London University, London, UK.

Schofield, C.J. & Upton, C.P. 1978. Brindley's scent glands and metasternal scent glands of *Panstrongylus megistus*. *Rev. Bras. Biol.*, 38: 665-678.

Schofield, C.J. 1979. Demonstration of isobutyric acid in some triatomine bugs. *Acta Trop.* 36: 103-105.

Schofield, C.J. 1988. Biosystematics of the Triatominae. *Biosystematics of Haematophagous Insects*, 37: 285-312.

Schofield, C.J. 1994. Triatominae, Biology and control. Sussex: Eurocommunica Publications.

Schneider, D. 1957. Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 40(1): 8-41.

Schorkopf, D.L.; Hrncir, M.; Mateus, S.; Zucchi, R.; Schmidt, V.M. & Barth, F.G. 2009. Mandibular gland secretions of meliponine worker bees: further evidence for their role in interspecific and intraspecific defence and aggression and against their role in food source signalling. *J. Experim. Biol.*, 212: 1153-1162. doi:10.1242/jeb.021113

Schulz, S. (Ed.). 2004. The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I. Topics in Current Chemistry. Volume 239:51-96. Springer Berlin Heidelberg.

Skinner, B.F. 1937. Two types of conditioned reflex: a reply to Konorski and Miller. *J. Gen. Psychol.*, 16: 272-279.

Steiger, S.; Schmitt, T. & Schaefer, H.M. 2011. The origin and dynamic evolution of chemical information transfer. *Proceedings of the Royal Society B: Biol. Sciences*, 278: 970-979.

Sorensen, J.T.; Campbell, B.C.; Gill, R.J. & Steffen-Campbell, J.D. 1995. Non-monophyly of Auchenorrhyncha ("Homoptera"), based upon 18S rDNA phylogeny: eco-evolutionary and cladistic implications with pre-Heteropteroidea Hemiptera (s.l.) and a proposal for new monophyletic suborders. *Pan-Pacific Entomologist*, 71(1): 31-60.

Staddon, B. W. 1979. The scent glands of Heteroptera. En *Advances in Insect Physiology* 14: 351-418

Staddon, B. W. 1999. Note on pregenital abdominal glandular structures of British Pentatomoidea (Hem.). *Entomologist's Monthly Magazine*, 135: 177-182.

Städler, E. 1984. Contact chemoreception. En *Chemical Ecology of Insects*. Ed.: Bell. W.J. & Cardé, R.T. pp: 3-36. London, Chapman & Hall.

Staples, J.K.; Krall, B.S.; Bartelt, R.J. & Whitman, D.W. 2002. Chemical defense in the plant bug *Lopidea robiniae* (Uhler). *J. Chem. Ecol.*, 28(3): 601-615.

Stelinski, L.L.; Miller, J.R.; Ressa, N.E. & Gut, L.J. 2003. Increased EAG responses of tortricid moths after prolonged exposure to plant volatiles: evidence for octopamine-mediated sensitization. *J. Insect Physiol.*, 49: 845-856.

SUCAM. 1980. Manual de normas técnicas da campanha de controle da doença de Chagas.; Saúde SdCdSP-Md, editor. Brasília, Brasil. Centro de Documentação do Ministério da Saúde.: 43-45.

Symonds, M.R.E. & Elgar, M.A. 2008. The evolution of pheromone diversity. *Trends in Ecol. Evol.*, 23(4): 220-228.

Syntech, 2004. Electroantennography, a practical introduction. Hilversum, The Netherlands.

Taneja, J. & Guerin, P.M. 1997. Ammonia attracts the haematophagous bug *Triatoma infestans*: behavioural and neurophysiological data on nymphs. *J. Comp. Physiol. A* 181: 21-34.

Vinauger, C.; Buratti, L. & Lazzari, C.R. 2011a. Learning the way to blood: first evidence of dual olfactory conditioning in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. II. Appetitive learning. *J. Exp. Biol.*, 214: 3032-3038.

Vinauger, C.; Buratti, L. & Lazzari, C.R. 2011b. Learning the way to blood: first evidence of dual olfactory conditioning in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. II. Aversive learning. *J. Exp. Biol.*, 214: 3039-3045.

Vinauger, C., Pereira, M.H., & Lazzari, C.R. 2012. Learned host preference in a Chagas disease vector, *Rhodnius prolixus*. *Acta Trópica*, 122: 24-28.

Vale, G.A.; Lovemore, D.F.; Flint, S. & Cockbill, G.F. 1988. Odour-baited targets to control tsetse flies, *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae) in Zimbabwe. *B. Entomol. Res.*, 78: 31-49.

Van der Goes van Naters, W. & Carlson, J.R. 2006. Insects as chemosensors of humans and crops. *Nature*, 444: 302-307.

Vet, L.E.M. & Groenewold, A.W. 1990. Semiochemicals and learning in parasitoids. *J. Chem. Ecol.*, 16: 3119-3135.

Vet, L.E.M.; Lewis, W.J. & Cardé, R.T. 1995. Parasitoid foraging and learning. En *Chemical Ecology of Insects*. Ed.: Cardé, R.T.; Bell, W.J., pp: 65-101. New York, Chapman & Hall.

Vitta, A.C.R.; Serrao, J.E.; Lima, E.R. & Vilela, E.F. 2009. The Metasternal and Brindley's Glands of *Triatoma brasiliensis* Neiva (Hemiptera: Reduviidae). *Neotropical Entomology*, 38 (2): 231–236.

Wadhams, L.J. 1990. The use of coupled gas chromatography-electrophysiological techniques in the identification of insect pheromones. En *Chromatography and Isolation of Insect hormones and pheromones*. McCaffrey, I.D. and Wilson, A.R., eds., pp: 281-288. Plenum Press.

Walters, E.; Illich, P.; Weeks, J. & Lewin, M. 2001. Defensive responses of larval *Manduca sexta* and their sensitization by noxious stimuli in the laboratory and field. *J. Exp. Biol.*, 204: 457-469.

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

Weirauch, C. 2006a. Metathoracic glands and associated evaporatory structures in Reduviidae (Heteroptera: Cimicomorpha), with observation on the mode of function of the metacoxal comb. *Eur. J. Entomol.* 103: 97–108.

Weirauch, C. 2006b. Dorsal abdominal glands in adult Reduviidae (Heteroptera, Cimicomorpha). *Mitt. Mus. Nat. kd. Berl., Dtsch. Entomol. Z.* 53 (1): 91-102/doi 10.1002/mmnd.200600009.

Whitman, D.W.; Jones, C.G. & Blum, M.S. 1992. Defensive Secretion Production in Lubber Grasshoppers (Orthoptera: Romaleidae): Influence of Age, Sex, Diet, and Discharge Frequency. *Annals of the Entomol. Soc. Am.*, 85(1): 96-102.

WHO (Organización Mundial de la Salud). 2014. Chagas disease (American trypanosomiasis). <http://www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Se accedió en mayo 2014.

Willett, J. 1987. Gas Chromatography. Analytical Chemistry by Open Learning. London, Inglaterra. John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-91331-6

Wilson, E.O. 1975. Sociobiology: The New Synthesis. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Witte, V.; Abrell, L.; Attygalle, A.B.; Wu, X. & Meinwald, J. 2007. Structure and function of Dufour gland pheromones from the crazy ant *Paratrechina longicornis*. *Chemoecology*, 17(1): 63-69.

Wyatt, T.D. 2003. Pheromones and Animal Behaviour. Communication by Smell and Taste. Cambridge University Press. Cap. 2: Discovering pheromones pp: 23-36.

Zacharias, C.A.; Pontes, G.B.; Lorenzo, M.G. & Manrique, G. 2010. Flight initiation by male *Rhodnius prolixus* is promoted by female odors. *J. Chem. Ecol.*, 36: 449-451.

Zarbin, P.H.G.; De Beni Arrigoni, E.; Reckziegel, A.; Moreira, J.A.; Baraldi, P.T. & Vieira, P.C. 2003. Identification of male-specific chiral compound from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. *J. Chem. Ecol.*, 29(2): 377-386.

Zeledón, R. 1983. Vectores de la enfermedad de Chagas y sus características ecofisiológicas. *Interciencia*, 8(6): 384-395.

Zeng, X.N.; Leyden, J.J.; Lawley, H.J.; Sawano, K.; Nohara, I. & Preti, G. 1991. Analysis of characteristic odors from human male axillae. *J. Chem. Ecol.*, 17: 1469-1490.

Zhu, J.; Zhang, A.; Park, K.; Baker, T.; Lang, B.; Jurenka, R.; Obrycki, J.J.; Graves, W.R.; Pickett, J.A.; Smiley, D.; Chauhan, K.R. & Klun, J.A. 2006. Sex Pheromone of the Soybean Aphid, *Aphis glycines* Matsumura, and Its Potential Use in Semiochemical-Based Control. *Environ. Entomol.* 35(2):249-257. doi: <http://dx.doi.org/10.1603/0046-225X-35.2.249>

Apéndice III: “La casita del Río”

(Modificado de: Silvana Santiago, de la Redacción de lanacion.com, Jueves 09 de diciembre de 2010)

Desde la ventana del laboratorio 51, en el 4° piso de la FCEyN, pasaron muchos soles y días diáfanos, numerosas lunas llenas, grandes tormentas, infinitos aviones, y una pregunta: ¿Qué es esa casita que está en el Río?



... Porque mientras la vida cotidiana allá, del otro lado de la ventana, corría, yo me doctoraba pero tratando de no perder la dimensión de la belleza...

Cuentan que la idea de construirla empezó tras un gran pánico cuando las amenazas en Buenos Aires eran el cólera y la peste amarilla. La construcción de esta “casita” fue parte de un proyecto que en 1874 buscaba proveer de agua potable para 400.000 porteños.

Básicamente, lo que hacía era tomar agua del río para enviársela a la planta de potabilización que en ese momento se encontraba en lo que hoy es el Museo de Bellas Artes. Tuvo una vida efímera, dada la expansión geométrica de la población en Buenos Aires de esos tiempos, por lo que fue dada de baja apenas cuatro décadas después de su inauguración.

Estaba ubicada a 800 metros de la costa con una estructura que combinaba el cemento armado y los bloques de granito. Por fuera, mostraba cuatro caras de lo que los expertos llaman una "sobria arquitectura neoclásica", algo que la Ilustración y el Progreso habían impuesto por esos años, y que significaba la vuelta a las formas simples de la Antigua Grecia y Roma. Estaba coronada con una torre de metal que en el momento en que fue creada sostenía en la parte superior una baliza de gas, porque en Buenos Aires todavía no había iluminación eléctrica. Los mismos parámetros estéticos dominantes hacían impensable que una obra de esa importancia no rematara en una obvia veleta de hierro.

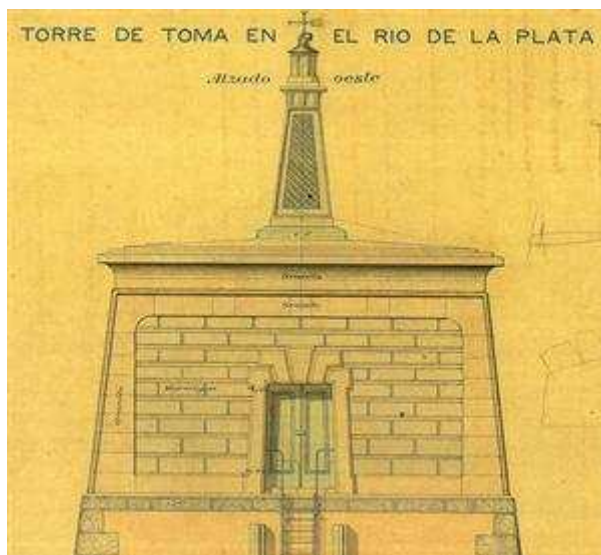
En el interior, un revoque austero cubría las paredes que se prolongaban bajo el nivel del agua en rejas que habilitaban la entrada del agua. Detrás de la puerta que hoy permanece cerrada, una pequeña pasarela recorría todo el perímetro de la casa, bordeada de una simple baranda metálica. Desde allí partía una escalera marinera para acceder a la baliza. En el centro del ambiente, un cilindro de 3 metros de diámetro, ubicado por sobre 2,60 metros del nivel máximo de crecidas y 10 metros por debajo del lecho del río, canalizaba las aguas para su potabilización en la Planta Recoleta.

Como todo lo que se compraba o ideaba en esa época se recurrió a Europa para la proyección del diseño. El elegido fue un ingeniero hidráulico inglés, John Bateman, quien envió al sueco Carl Nystromer a estas tierras para la puesta en marcha de su idea.

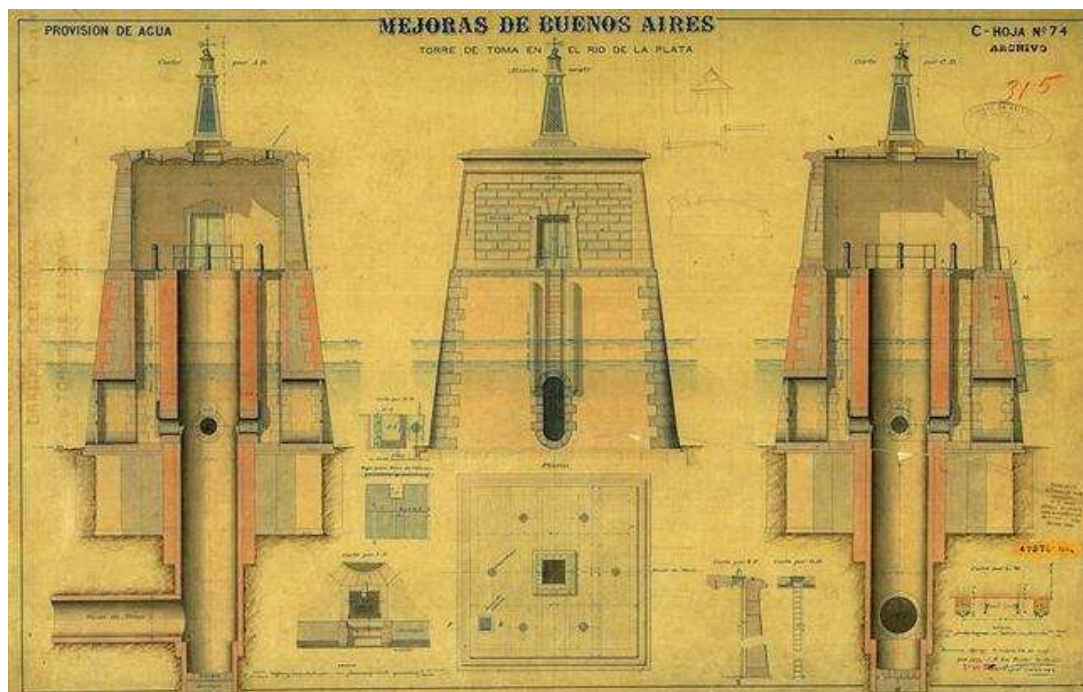
Él resolvió que se ampliara la planta potabilizadora y que se construyera el palacio, todavía en pie en la avenida Córdoba y Riobamba, para contener en su interior un tanque en el que se almacenara todo el líquido a distribuir entre los habitantes de la ciudad.

A más de un siglo de su construcción, las cuatro caras recubiertas de ladrillo vista están tan oscuras como el agua del río. El avance de la ciudad hizo que esté a pocos metros de la costa, mientras que con la llegada de la electricidad y de las nuevas tecnologías, la veleta y la baliza fueron reemplazadas por sustitutos de menor estilo arquitectónico.

Pocos registros quedaron de los años en que funcionó. En los archivos de AySA (heredados de la ex Obras Sanitarias) sólo se conservan las copias de los planos originales y el Archivo General de la Nación no almacenó imágenes de la torre en su tiempo de operaciones.



Copia del plano del ingeniero John Bateman, firmado en su nombre por Karl Nystromer en 1885. Foto:Gza AySA.



Copia del plano del ingeniero John Bateman, firmado en su nombre por Karl Nystromer en 1885. Foto:Gza AySA.