BENÉMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Maestría en Ciencias Biológicas

Bacterias asociadas a glándulas metasternales y glándulas de Brindley en *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) y su potencial participación en la producción de semioquímicos.

Tesis que para obtener el título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta

I. Bt. Axel Sampayo Andrade

Director

Dr. José Lino Zumaquero Ríos

Co – director

Dr. César Antonio Sandoval Ruiz

Enero, 2022

Tesis realizada en el Laboratorio de Parásitos y Vectores de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

H. Puebla de Z. a 10 de diciembre de 2021

Asunto: Voto Aprobatorio

Comité Académico del Posgrado
PRESENTE

Por medio de la presente se hace constar que se revisó y aprobó la tesis titulada:

"Bacterias asociadas a glándulas Metasternales y Glándulas de Brindley en *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) y su potencial participación en la producción de semioquímicos."

Que presenta el estudiante **Axel Sampayo Andrade** con número de matrícula **219470577**, aspirante al grado de **Maestro en Ciencias Biológicas,** de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: "**estructura y funcionamiento de los seres vivos**", notificamos que la tesis reúne los requisitos y se aprueba para su réplica oral en el examen de grado.

Por lo tanto, emitimos los **VOTOS APROBATORIOS** como miembros del **Comité de Jurado de Examen de Grado** como a continuación se indica:

Tutor Interno: Dr. Angel Alonso Romero López _____

Tutor Externo: Dr. Alejandro Carabarín Lima _____

Revisor: Dr. Gabriel Manrique _____

Agradecemos de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

DECLARATORIA

Yo, Axel Sampayo Andrade, declaro que el presente trabajo de investigación titulado "**Bacterias asociadas a glándulas Metasternales y Glándulas de Brindley en *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) y su potencial participación en la producción de semioquímicos"** es un trabajo propio y resultado de mi esfuerzo personal, el cual no ha sido copiado ni modificado de otro proyecto de investigación, tampoco se utilizaron ideas, fórmulas, citas ni ilustraciones tomadas de otras fuentes intelectuales y en casos contrarios se mencionan de forma clara y exacta tanto el origen como el autor de la referencia empleada.

Además, declaro que la investigación realizada y puesta a consideración para evaluación no ha sido presentada anteriormente para obtener algún grado académico o título, ni ha sido publicada en sitio alguno. Asimismo, me hago responsable ante la universidad o terceros implicados, de cualquier irregularidad o daño que pudiera ocasionar por el incumplimiento de lo aquí declarado.

Puebla de los Ángeles a 10 de diciembre del 2021.

I. Bt. Axel Sampayo Andrade

“De gente bien nacida es agradecer los beneficios que reciben, y uno de los pecados que más a Dios ofende es la ingratitud …” – **Don Quijote de La Mancha**

Entonces, a razón de la cordura que me atañe:

Agradezco especialmente a quienes me guiaron y dieron su consejo, a quienes estuvieron cerca y también a quienes se alejaron pues si cualquiera de los sucesos vividos hubiera ocurrido de otra manera ¿en qué lugar estaría yo?

En otras palabras, aprecio encarecidamente la comprensión y el apoyo brindados por mi madre y por mi hermana y sobre todo la compañía y el cariño de Pugberto, Greta y Amelia: un can y dos gatitas claramente únicos.

Y sepan lo mucho que valoro el esfuerzo de mis profesores, de mi comisión revisora y de mis directores cuyo consejo y aportaciones permitieron cimentar y continuar este proyecto.

En fin, ¡gracias totales!

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca con número de registro 743482, un gran apoyo para la culminación del programa de posgrado estudiado: Maestría en Ciencias Biológicas (REF: 005671) en la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**.

ÍNDICE

RESUMEN 1
1. INTRODUCCIÓN 2
2. ANTECEDENTES 3
2.1. TRIATOMINOS 3
2.1.1. ALIMENTACIÓN EN TRIATOMINOS 4
2.2. INTERACCIONES TRIATOMINO - BACTERIA 5
2.3. ECOLOGÍA QUÍMICA EN TRIATOMINOS 8
2.3.1. SEMIOQUÍMICOS 8
2.3.2. COMUNICACIÓN QUÍMICA EN TRIATOMINOS 9
2.4.1. GLÁNDULAS EXOCRINAS 10
2.4. BIOLOGÍA SENSORIAL Y COMPORTAMIENTO EN TRIATOMINOS 12
2.4.1. ACTIVIDAD LOCOMOTORA 13
2.4.2. DETECCIÓN DE ESTÍMULOS OLFATIVOS 13
2.4.3. DETECCIÓN DE ESTÍMULOS VISUALES 15
2.4.4. PERCEPCIÓN DE ESTÍMULOS VIBRATORIOS 15
2.4.5. MEMORIA Y APRENDIZAJE 16
2.4.5. MODIFICACIÓN DEL COMPORTAMIENTO 16
2.5. PATRONES DE COMPORTAMIENTO MÁS FRECUENTES EN TRIATOMINOS 17
2.5.1. COMPORTAMIENTO DE AGREGACIÓN 17
2.5.2. COMPORTAMIENTO DISPERSIVO 18
2.5.3. COMPORTAMIENTO DE APAREAMIENTO 18
3. JUSTIFICACIÓN 20
4. HIPÓTESIS 21
5. OBJETIVOS 22
5.1. OBJETIVO GENERAL 22
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 22
6. MÉTODOS 23
6.1. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO 23
6.1.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA 24
6.1.2. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA 24
6.2. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO BACTERIANO 25
6.3. DISEÑO EXPERIMENTAL 26
6.4. Ensayos preliminares 26
6.5. CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA 27

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 29
7.1. EXPLORACIÓN MICROBIOLÓGICA 29
7.2. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA 31
7.3. REGISTROS DE COMPORTAMIENTO 33
7.4. ENSAYOS CON OLFATÓMETRO 37
7.4.1. INTERACCIÓN ENTRE CONESPECÍFICOS HEMBRA: HEMBRA 37
7.4.2. INTERACCIÓN ENTRE CONESPECÍFICOS MACHO: HEMBRA 38
7.4.3. INTERACCIÓN ENTRE CONESPECÍFICOS HEMBRA: MACHO 38
7.4.4. INTERACCIÓN ENTRE CONESPECÍFICOS MACHO: MACHO 39
7.4.5. INTERACCIÓN MEDIADA POR EXTRACTOS DE GLÁNDULAS DE BRINDLEY 40
7.4.7. INTERACCIONES MEDIADA POR EXTRACTOS DE LAS GLÁNDULAS METASTERNALES 42
7.4.8. INTERACCIONES MEDIADAS POR ESTÍMULOS BACTERIANOS 43
8. CONCLUSIONES 46
9. PERSPECTIVAS 47
10. ANEXOS 48
10.1. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y NORMATIVIDAD ASOCIADA 48
10. REFERENCIAS 49

RESUMEN

En Latinoamérica, y principalmente en México, el estudio de los triatominos y particularmente de *Meccus pallidipennis*, un insecto hematófago de hábitos nocturnos, adquiere gran importancia debido a su elevada relevancia epidemiológica al ser el causante de más del 70% de las infecciones con el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* – agente etiológico de la enfermedad de Chagas – en el país y se encuentra ampliamente distribuido en la región centro/sur del estado de Puebla. La capacidad vectorial de los triatominos puede verse influenciada por factores tales como su contexto ambiental, sus fuentes alimentarias e incluso por las asociaciones que forman con sus conespecíficos u otras especies. En varias especies de triatominos se han descrito interacciones con diversas bacterias y con diferentes efectos sobre sus aptitudes como vector. Estas interacciones insecto-bacteria, además de las que forman con el entorno y sus fuentes alimentarias, generalmente son moduladas por compuestos orgánicos (semioquímicos), principalmente los producidos por diversas glándulas exocrinas, siendo las glándulas de Brindley (GB) y las glándulas metasternales (GM) las más estudiadas debido a su participación en procesos tales como la búsqueda y selección de pareja o bien al participar en procesos activos de alarma y defensa. Debido a lo anterior, en este trabajo se evaluó la respuesta comportamental en ejemplares adultos de *M. pallidipennis* expuestos ante extractos bacterianos de las GM y de las GB. Para ello se analizaron los Índices de Preferencia Individual (IPI) y los Índices de Preferencia Grupal (IPG) particulares y correspondientes a dos cepas bacterianas aisladas de las GM y de las GB en adultos de *M. pallidipennis*, M1A2 y B1A1, con el propósito de confirmar su efectos biológicos con base en los efectos comportamentales observados. Los resultados obtenidos de estos ensayos sugieren que las bacterias aisladas de las GM y de las GB de *M. pallidipennis* poseen actividad biológica con efectos comportamentales y por lo tanto podrían ser un componente esencial de su contexto químico-ecológico posiblemente debido a una participación en la producción o modulación de semioquímicos que intervienen en procesos particulares de comunicación química de estos insectos.

Palabras clave: Chagas, vector, endosimbionte, ecología química…

1. INTRODUCCIÓN

Los triatominos son insectos hematófagos de hábitos nocturnos y constituyen parte de los principales vectores del parásito *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), el agente etiológico de la enfermedad de Chagas (Botto *et al*., 2015). En México, *Meccus pallidipennis* (antes *Triatoma pallidipennis*, Stål, 1872) es una de las especies de triatominos con mayor distribución geográfica localizándose principalmente en la región centro/sur del estado de Puebla (Sandoval-Ruiz *et al.*, 2008).

De manera similar a otros artrópodos que se alimentan de un solo tipo de fuente nutrimental, estos insectos a menudo hospedan poblaciones microbianas que complementan su dieta restringida o bien que facilitan sus aptitudes sobre el entorno (Sassera *et al.*, 2013). En algunas especies de triatominos, entre ellas *Triatoma dimidiata* Latreille, 1811; *Triatoma infestans* Klug, 1834 y *Rhodnius prolixus* Stål, 1859, se han descrito endosimbiontes bacterianos colonizando sus tejidos tanto de manera externa como interna, afectando así su capacidad como vectores (Hypša, 1993; Rodríguez-Ruano *et al.*, 2018), aspecto que también puede verse influenciado por las interacciones que forman con el entorno o que exhiben en diferentes niveles tróficos y que son finamente moduladas por compuestos orgánicos (semioquímicos) principalmente producidos por glándulas exocrinas (Leroy *et al.*, 2011; May-Concha *et al.*, 2015). En otras palabras, se observan diferentes esquemas de comunicación química con enfoques intra e interespecíficos.

Considerando lo anterior, se plantea el presente estudio con *M. pallidipennis* dada su alta relevancia epidemiológica en el país y al ser la causa de más del 70% de las infecciones por *T. cruzi* (Vidal-Acosta *et al.*, 2001), a fin de profundizar en el conocimiento sobre las posibles interacciones establecidas entre los microorganismos y las glándulas exocrinas involucradas en sus procesos de ecología química, así como el rol desempeñado por los semioquímicos relacionados con estos procesos. Con ello, a futuro se presenta la posibilidad de abordar temas relacionados con: el control vectorial, mantenimiento y manejo de esta y otras especies relacionadas y, eventualmente, lograr avances en la prevención de la enfermedad de Chagas, la cual actualmente es considerada una enfermedad desatendida (PAHO, 2017).

2. ANTECEDENTES

2.1. TRIATOMINOS

Los triatominos son hemípteros redúvidos pertenecientes a la subfamilia Triatominae, la cual está constituida por al menos 151 especies y contiene a algunos de los principales vectores de la enfermedad de Chagas, siendo el género *Triatoma* el más ampliamente distribuido en el continente americano con aproximadamente 80 especies (Justi & Galvão, 2017).

En México, se ha reportado la presencia de hasta 38 especies distribuidas en ocho géneros: *Dipetalogaster* Usinger, 1894; *Eratyrus* Stål, 1859; *Paratriatoma* Barber, 1938; *Panstrongylus* Berg, 1811; *Belminus* Stål, 1859; *Triatoma* Laporte, 1832; *Meccus* Stål, 1859 y *Rhodnius* Stål, 1859 (Galvão *et al.*, 2003). De las cuales, 28 son endémicas y 23 de ellas se han reportado naturalmente infectadas con *T. cruzi* (Martínez *et al.*, 2006).

Estos insectos son organismos hemimetábolos con 5 estadios ninfales, cuyo ciclo de vida en condiciones de laboratorio (25 ± 1 °C, humedad relativa del 70 ± 5% y un fotoperiodo de 12 horas) está constituido por las siguientes fases: 1° Oviposición, 10 a 20 días luego de la cópula; 2° Incubación, con una duración de hasta 35 días; 3° Desarrollo ninfal, durando alrededor de 236 días distribuidos en Ninfa I (48 días), Ninfa II (56 días), Ninfa III (59 días), Ninfa IV (73 días) y Ninfa V (aproximadamente 73 días) y 4° Fase adulta, con una supervivencia promedio de hasta 184 días (Figura 1) (Tay-Zavala *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2017).

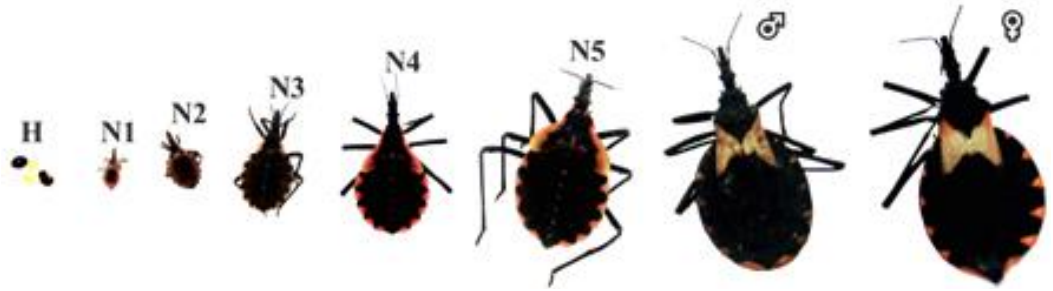


Figura 1. Representación fotográfica del ciclo vital de *M. pallidipennis.*

Es importante destacar que estos insectos presentan dimorfismo sexual sólo en su etapa adulta, siendo las hembras más grandes que los machos y con una genitalia triangular y sobresaliente, mientras que en machos la genitalia es redondeada y poco visible (Salazar-Schettino *et al.*, 2013).

Respecto a la talla de los triatominos, esta se encuentra entre los 5 y 44 mm según la especie y suelen poseer una coloración oscura con manchas amarillas, pardas o rojizas (conexivo) que en conjunto con otros factores pueden ayudar a identificarlos (Castillo & Wollf, 2000). Estos insectos conviven con diversos vertebrados que fungen como sus principales mecanismos de propagación; además, tienen una gran adaptabilidad a diferentes ecotopos lo cual potencializa su capacidad vectorial (Guzmán-Marín *et al.*, 1999).

En cuanto al hábitat, las especies de Triatominae se encuentran en casi cualquier refugio que ofrezca un grado de permanencia, clima y acceso a una fuente de sangre constante y/o suficiente (Jurberg & Galvão, 2006). La mayoría toleran un rango de humedad en el aire de entre 20 y 80%, con un desarrollo óptimo en temperaturas que van de los 26-34°C y escaso en temperaturas inferiores a 16°C, mientras que temperaturas superiores a 40°C les resultan letales (Lorenzo & Lazzari, 1999).

Los triatominos son principalmente selváticos y viven en nidos de pájaros, nidos de animales (e. g. roedores, marsupiales), en la axila de las hojas, huecos o debajo de la corteza de árboles (bromelias y palmeras principalmente). Sin embargo, durante su proceso adaptativo, algunas especies adquirieron la capacidad de colonizar estructuras peridomiciliares hechas por el hombre (e. g. establos, gallineros, porquerizas, etc.), mientras que otras pueden llegar a colonizar el interior de las viviendas humanas, siendo estas especies las de mayor relevancia epidemiológica al explicar la mayoría de los índices de infección en humanos (Jurberg & Galvão, 2006).

2.1.1. ALIMENTACIÓN EN TRIATOMINOS

Generalmente, el proceso de alimentación se inicia luego de la detección del dióxido de carbono procedente de la respiración, así como de otros estímulos presentes en piel, pelos, plumas, glándulas o secreciones, así como el calor emitido por sus hospedadores que constituyen señales capaces de disparar la actividad locomotora del insecto, la cual finaliza con el uso de termorreceptores que facilitan la localización de vasos sanguíneos para poder realizar el proceso de hemosucción en las zonas idóneas (Ferreira *et al.*, 2007). La alimentación suele ocurrir durante las primeras horas de la noche cuando los triatominos abandonan su estado de aquinesis y comienzan a salir de sus refugios y explorar el entorno (Lazzari *et al.* 2013); para precisar la identidad y/o calidad de la fuente alimentaria se requiere no solo

de un alto nivel de sensibilidad sino también de la capacidad de integrar información de distintas modalidades sensoriales (Lazzari & Lorenzo, 2009).

El alimento se constituye por ingestas masivas de sangre y la cantidad varía entre las diferentes especies y etapas de desarrollo, por ejemplo: las ninfas del 5° estadío de *R. prolixus* ingieren hasta 10 veces su peso corporal, mientras que ninfas del 5° estadío de *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911) consumen el equivalente de hasta 5 veces su peso corporal.

Además, se han observado diferencias entre el consumo de hembras y machos: las hembras ingieren entre dos y tres veces su peso corporal, mientras que los machos ingieren cantidades inferiores (Viana-Sant'Anna *et al.*, 2017).

2.2. INTERACCIONES TRIATOMINO - BACTERIA

Las interacciones entre artrópodos y otros organismos abarcan todo el rango de posibles asociaciones, desde el parasitismo estricto hasta el mutualismo obligado. Particularmente, los insectos hematófagos son organismos dependientes de simbiontes microbianos capaces de complementar su dieta desequilibrada o de brindarles ciertas ventajas adaptativas sobre el medio y sus potenciales hospedadores (Pérez-Brocal *et al*., 2011; Sassera *et al*., 2013).

Por ejemplo, en *T. infestans* se han descrito endosimbiontes bacterianos en diversos tejidos, colonizándolos tanto de manera externa como interna y estas comunidades microbianas pueden verse influenciadas por las condiciones y recursos en sus hábitats, tolerancias inmunológicas y mecanismos de transmisión (Hypša, 1993). En la mayoría de las especies de la subfamilia Triatominae, las bacterias del género *Rhodococcus* son de particular interés ya que contribuyen al metabolismo deficiente de estos insectos a través de la síntesis de vitaminas del complejo B o al ser digeridas directamente para proporcionar los nutrientes faltantes (Eichler & Schaub, 1997). Además, se ha observado que el desarrollo de estos y otros simbiontes es indirectamente regulado por la presencia de los parásitos *T. cruzi* y *T. rangeli*. Aunque *T. cruzi* sólo es un subpatógeno para el insecto, *T. rangeli*, afecta fuertemente a las especies del género *Rhodnius* insectos en los que la patogenicidad de este parásito parece basarse en una reducción del número y de la diversidad de los simbiontes microbianos presentes (Vallejo *et al.*,

2009). Se han identificado diversos géneros bacterianos en asociaciones a diferentes niveles con los triatominos (Cuadro 1).

CUADRO 1. Principales géneros bacterianos asociados a triatominos.

Géneros bacterianos (documentados) asociados a triatominos		
Género	**Fuente de Aislamiento**	**Referencia**
Achromobacter	Diversos tejidos.	Rodríguez-Ruano *et al.*, 2018.
Acinetobacter	Diversos tejidos.	Rodríguez *et al.*, 2007; De la Cruz-Pantoja, 2013
Anaerococcus	Diversos tejidos.	Rodríguez-Ruano *et al.*, 2018.
Arsenophonus	Diversos tejidos.	Hypša *et al.*, 1997.
Bacillus	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.
Bartonella	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.
Bradyrhizobium	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.
Brevibacterium	Tejido intestinal.	López *et al.*, 2018.
Burkholderia	Diversos tejidos.	Rodríguez-Ruano *et al.*, 2018.
Clostridium	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.
Corynebacter	Glándulas salivales.	Souza-Lima *et al.*, 2017.
Dechloromonas	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.
Delftia	Tejido intestinal.	López *et al.*, 2018.
Dietzia	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.
Enterobacter	Diversos tejidos.	Rivaldi, 2015.
Enterococcus	Glándulas salivales.	Souza-Lima *et al.*, 2017.
Escherichia	Diversos tejidos.	Rodríguez-Ruano *et al.*, 2018.
Gordonia	Glándulas salivales.	Souza-Lima *et al.*, 2017.
Macrococcus	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.
Micrococcus	Tejido intestinal.	López *et al.*, 2018.
Methylobacter	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.
Mycobacterium	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.
Neisseria	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.
Pectobacterium	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.
Peptoniphilus	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.
Proteus	Glándulas salivales.	Souza-Lima *et al.*, 2017.
Rhodococcus	Glándulas salivales.	Souza-Lima *et al.*, 2017.
Rhodopseudomonas	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.
Salmonella	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.
Serratia	Tejido intestinal.	Rivaldi, 2015.
Shigella	Diversos tejidos.	Rodríguez-Ruano *et al.*, 2018.
Staphylococcus	Glándulas salivales.	Rodríguez-Ruano *et al.*, 2018.

Stenotrophomonas	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.
Sphingobacterium	Diversos tejidos.	Díaz *et al.*, 2016.

Estudios realizados sobre la microbiota asociada con especies de la subfamilia Triatominae indican una diversidad taxonómica relativamente baja y una alta especificidad respecto al hospedador. Entre los taxones dominantes asociados a estos insectos (Figura 2) se encuentran *Acinetobacter spp.*, *Proteiniphilum spp.*, *Arsenophonus triatominarum*, *Serratia spp.*, *Candidatus rohrkolberia y Enterococcus spp.;* estimándose alrededor de 20 especies bacterianas diferentes (Hypša 1993; Rodríguez-Ruano *et al.*, 2018). Un ejemplo de esta especificidad ha sido descrito en *T. dimidiata,* donde se destaca la presencia de diversos géneros bacterianos asociados a su tracto digestivo (Dumonteil *et al.*, 2018).

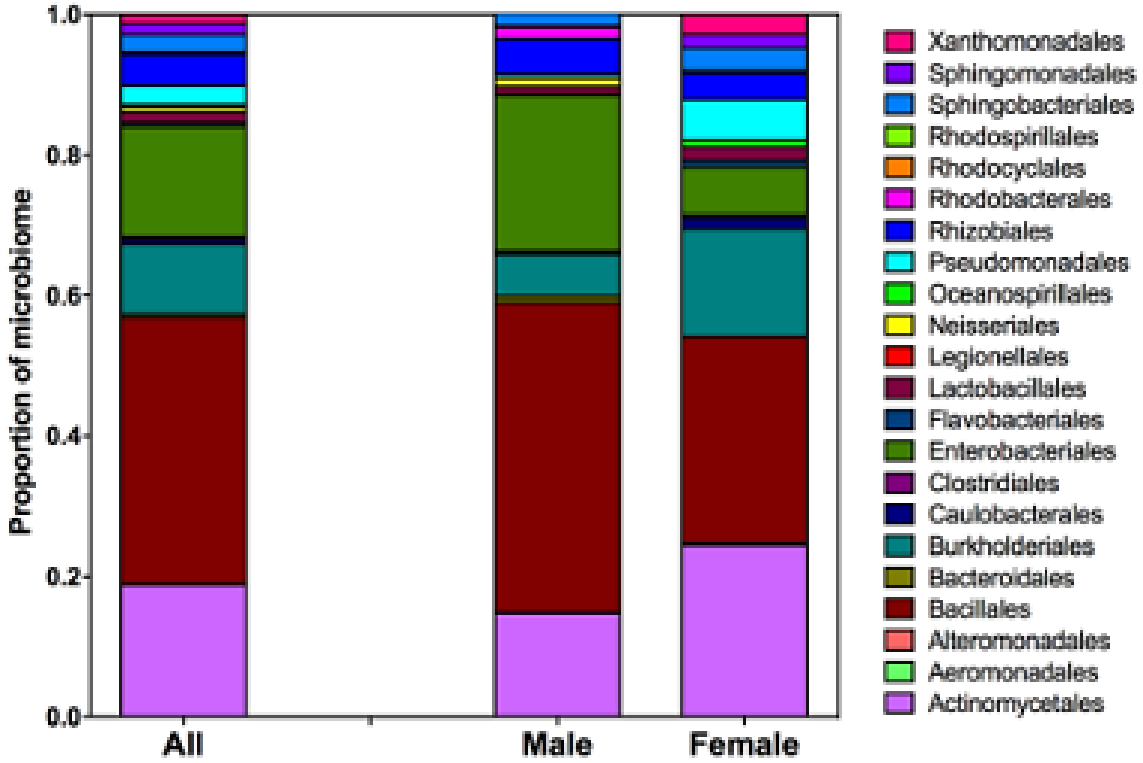


FIGURA 2. Diversidad bacteriana del tracto digestivo en *T. dimidiata.* Resultados basados en secuencias del ARNr 16S (Dumonteil *et al.*, 2018).

Estos simbiontes microbianos contribuyen a la nutrición y al desarrollo del hospedador e incluso producen compuestos bioactivos que lo protegen de condiciones adversas, depredadores, competidores directos o bien, que facilitan su interacción con el entorno o con otros organismos. Para el caso de los triatominos, resulta factible que sean capaces de afectar directamente a su capacidad real para fungir

como vectores (Souza-Lima *et al.*, 2017). En el caso de *T. dimidiata*, se evidenció la presencia de pirazinas en diversas secreciones del insecto, tanto en adultos como en ninfas a partir del tercer estadio estando su producción comúnmente asociada a simbiontes bacterianos. Tales compuestos se relacionan con mecanismos comunales de defensa, así como con sistemas de seguimiento/atracción y han sido detectados en secreciones de simbiontes bacterianos de diferentes insectos, fungiendo como señales químicas o como moduladores del circuito de comunicación (May-Concha *et al.*, 2015).

2.3. ECOLOGÍA QUÍMICA EN TRIATOMINOS

El estudio de las interacciones entre los triatominos y su medio, es influenciado por factores tales como su biología sensorial, disruptores etológicos, la memoria y el aprendizaje, además de diferentes interacciones biológicas establecidas de manera intraespecífica o interespecífica y de aspectos principalmente mediados por moléculas o grupos de moléculas capaces de evocar o modular comportamientos particulares (Cruz-López *et al.*, 2001; Vinauger *et al.*, 2016).

2.3.1. SEMIOQUÍMICOS

Existen diferentes señales químicas que median un amplio rango de interacciones ecológicas y de comportamiento entre los insectos y el medio circundante u otros organismos, particularmente para la comunicación intraespecífica e interespecífica o para el reconocimiento de factores ambientales. Algunas señales son producidas, generalmente, por epitelios especializados y reconocidas por mecanismos sensoriales particulares (Cruz-López *et al.*, 2001). Estas señales químicas o semioquímicos se clasifican según su efecto o función y pueden organizarse en dos supra grupos con sus propias subdivisiones (*Nordlund* & Lewis 1976; Ali & Morgan, 1989; Davis *et al.*, 2013; El-Shafie & Romeno-Faleiro, 2017):

- Feromonas (de agregación, alarma, pista, sexuales): encargadas de mediar la comunicación intraespecífica, pueden ser catalogadas como iniciadoras con efectos fisiológicos o comportamentales a largo plazo o liberadoras cuando provocan una respuesta a corto plazo. Algunos de los tipos principales de feromonas en triatominos, son: las feromonas de agregación que inducen el agrupamiento de individuos en torno a un punto en específico, las feromonas de alarma capaces de “avisar” sobre peligros inminentes o potenciales, las feromonas de pista que

pueden constituir señales de retorno al recinto y las feromonas sexuales que cumplen diferentes finalidades relacionadas con aspectos reproductivos.

- Aleloquímicos (median la comunicación interespecífica). Se clasifican en: kairomonas con efectos favorables para el receptor, alomonas cuando favorecen al emisor; sinomonas al favorecer tanto al emisor como al receptor y Apneumonas si se trata de sustancias producidas por materiales inertes y que pueden evocar una reacción adaptativa, comportamental o fisiológica favorable para el organismo receptor, pero dañina para un segundo organismo que se encuentre en dicho material.

2.3.2. COMUNICACIÓN QUÍMICA EN TRIATOMINOS

Para que se produzca la comunicación química entre dos organismos, son necesarios tres factores: uno de los organismos (emisor) debe emitir un mensaje disponible a través de un medio adecuado para su transmisión y el otro organismo (receptor) debe responder a dicho mensaje (Shorey, 1973). Los triatominos disponen de mecanismos especializados asociados a glándulas exocrinas, por ejemplo, las glándulas metasternales (GM) y las glándulas de Brindley (GB), presentes sólo en el estado adulto, con las que emiten compuestos volátiles moduladores del comportamiento que están involucrados en el contexto sexual y de alarma (Manrique *et al*., 2006).

Las secreciones de las GM (Cuadro 3) están implicadas con el comportamiento sexual del insecto, su principal metabolito secretado en *T. infestans* y *T. brasiliensis* es la 3-pentanona mientras que en *R. prolixus* y *T. dimidiata* es la 3-metil-2-hexanona, compuestos que se relacionan con el comportamiento de agregación de machos en torno a la hembra y promueven la poliandria, jugando así un papel decisivo en el comportamiento sexual de estas especies (Manrique *et al.*, 2006, Crespo & Manrique, 2007; Pontes *et al.*, 2008; Vitta *et al.*, 2009; Pontes & Lorenzo 2012; May-Concha *et al.*, 2018).

CUADRO 3. Composición estimada para secreciones procedentes de las GM en *T. brasiliensis* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Vitta *et al.*, 2009).

Compuesto	Tiempo de Retención Estándar (s)	Hembras		Machos	
		Tiempo de Retención (s)	% Muestra	Tiempo de Retención (s)	% Muestra
2-Butanona	2.60	2.61	0.50	2.61	0.40
3-Pentanona	3.24	3.24	76.5	3.24	84.70
3-Pentanol	4.66	4.60	1.70	4.65	1.50
Desconocido	-	5.23	16.3	5.17	10.80

3-Hexanol	5.69	5.67	0.70	5.68	0.70
2-Metil-1-Butanol	5.82	5.81	4.30	5.82	1.90

En cambio, la secreción de las glándulas de Brindley (Cuadro 4) participa activamente como feromona de alarma (Manrique *et al.*, 2006) y está constituida principalmente por diversos ácidos orgánicos como: acético, butírico, isobutírico (componente principal), isovalérico, propiónico y valérico, y algunas trazas de otros ácidos orgánicos, tales como ácidos isohexanoico y octanoico. También se han encontrado algunos alcoholes como: isobutílico, isoamílico, amílico y 2-feniletanol, además de ésteres carboxílicos (Cruz-López *et al*., 1995).

CUADRO 4. Composición estimada para secreciones procedentes de las glándulas de Brindley en *T. infestans* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Manrique *et al.* 2006).

Compuesto	**Tiempo de retención x̄ (s)**	**% Muestra**
2-butanona	2.59	5.70
Propionato de Isobutilo	4.29	0.80
Alcohol Isobutílico	4.41	9.60
Éster indefinido	5.63	1.70
Éster indefinido	5.71	9.60
2-metilbutil y 3-metilbutil alcohol	5.81	21.10
3-metil-3-buten-1-ol	6.33	0.30
Ácido Acético	8.55	0.50
Ácido Propiónico	9.36	6.80
Ácido Isobutírico	9.61	35.30
Ácido Butírico	10.23	2.20
Ácido 2-metilbutírico	10.61	4.10
Feniletil isobutirato	12.29	0.40
Alcohol feniletílico	12.76	1.80

2.4.1. GLÁNDULAS EXOCRINAS

Como en otros insectos de la familia Reduviidae, las especies de la subfamilia Triatominae tienen habitualmente glándulas exocrinas pareadas, homólogas en forma y estructura con otros hemípteros que participan directa o indirectamente en la modulación del comportamiento de estos insectos. A diferencia de los adultos, las ninfas de los últimos estadios poseen glándulas abdominales dorsales, pero carecen de GM y GB (Cruz-López *et al.*, 2001).

Las GM se encuentran ventralmente en el metatórax y consisten en un pequeño depósito con forma de pera y un túbulo secretor no ramificado. Este reservorio se presiona estrechamente contra el piso del metatórax, mientras que el túbulo se retuerce entre la metendosternita y la cavidad metacoxal. La apertura es diminuta y generalmente se aprecia lateral al hoyo apofisario esternal y se internalizan en pozos secretorios ubicados sobre la tercer coxa (Figura 4). Se han descrito en al menos 12 especies de la familia Triatominae (Manrique *et al.*, 2006).

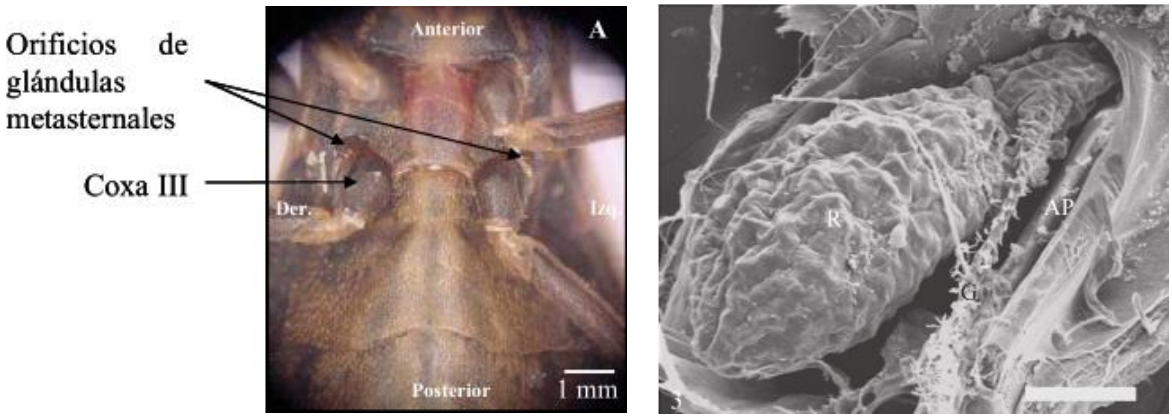
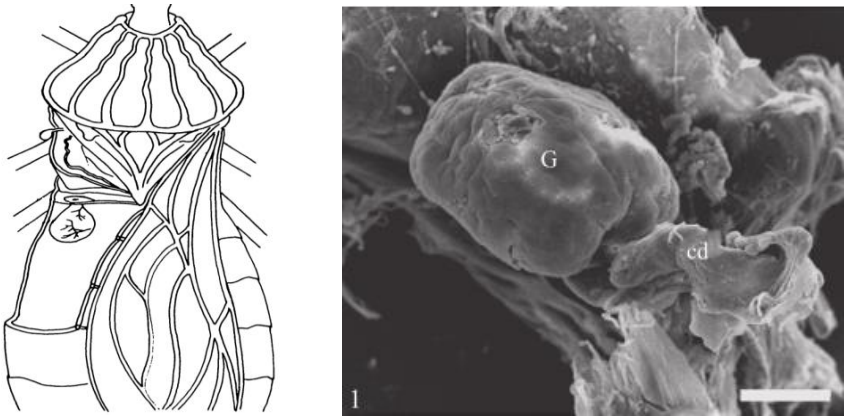


FIGURA 4. Representación gráfica de las Glándulas Metasternales (GM) (Vitta *et al.*, 2009; Zacharias C., 2011).

En cambio, las glándulas de Brindley son estructuras simples en forma de saco y se ubican dorsalmente; se extienden hacia la parte lateral del segundo segmento abdominal, pero son de origen metatorácico, y se abren hacia el episternum metatorácico, justo por encima del lóbulo supracoxal del episternum III (Figura 5). Estas glándulas se han descrito en varias especies de la familia Triatominae y no hay diferencia significativa en el tamaño de estas glándulas entre géneros y constituyen la principal fuente de olores perceptibles por el ser humano en triatominos (Manrique *et al.*, 2006).



GB

FIGURA 5. Representación gráfica de las Glándulas de Brindley (GB) (Kälin & Barret, 1975; Vitta *et al.*, 2009).

2.4. BIOLOGÍA SENSORIAL Y COMPORTAMIENTO EN TRIATOMINOS

Los triatominos exhiben rasgos particulares asociados con el uso y aprovechamiento de su hábitat y fuentes de alimento. Viven en estrecha relación con sus congéneres y hospedadores, por lo que requieren de diferentes adaptaciones morfológicas, fisiológicas y etológicas (Lazzari & Lorenzo, 2009). Estos patrones de comportamiento son influenciados por factores tales como estacionalidad, condiciones climáticas, momento del ciclo circadiano, condición fisiológica del individuo y densidad poblacional (Abrahan *et al.*, 2016). Además, estos insectos también pueden sentirse atraídos por la iluminación artificial en hábitats humanos pese a su marcado fototactismo negativo (Reisenman *et al.*, 1998), siendo un comportamiento aparentemente estereotipado, pero finamente modulado y con cierta plasticidad (Pacheco-Tucuch *et al.*, 2012).

Existen diferentes aspectos que afectan la fototaxia de los triatominos y que son de origen endógeno y exógeno, tales como: relojes circadianos, cambios en la sensibilidad ocelar, interacciones entre las entradas de ojos compuestos y ocelos, composición espectral de la luz y, finalmente, la integración multimodal entre estímulos de otros orígenes (Reisenman *et al.*, 2002). Estos mecanismos aseguran un estado de aquinesis durante la mayor parte del día, en el cual permanecen dentro de sus refugios y condicionan parcialmente la búsqueda y predilección de nuevos hábitats, donde los triatominos deberán encontrar un refugio adecuado para obtener protección contra la luz del día y posibles depredadores. Esta selección estratégica de hábitats es biológicamente importante para encontrar microclimas adecuados para esconderse, realizar mudas y para la oviposición, así como para facilitar las interacciones con sus conespecíficos durante la búsqueda de simbiontes o pareja (Barrozo *et al.*, 2004). Los criterios involucrados en esta elección suelen ser priorizados en términos de humedad relativa y de temperatura, posiblemente con el fin de evitar infecciones por hongos entomopatógenos (Roca & Lazzari, 1994). Además, la termopreferencia puede ser dinámica y diferir según el tiempo transcurrido desde la alimentación y a medida que avanza el día. De hecho, inmediatamente después de la ingesta, estos insectos permanecen en temperaturas relativamente altas y avanzan hacia temperaturas más bajas a medida que aumenta el tiempo de ayuno (Flores, 2001).

2.4.1. ACTIVIDAD LOCOMOTORA

Existen dos formas de actividad locomotora bien definidas en triatominos: una endógena sin interferencia de estímulos externos, y otra que es orientada por estímulos externos. La actividad locomotora en adultos y ninfas se ve intensificada durante las primeras horas del período nocturno y se encuentra asociada a dos comportamientos bien delimitados, búsqueda de alimento ocurrida al final de la tarde o al anochecer y búsqueda de refugio que ocurre algunos momentos antes del amanecer (Lazzari, 1992; Jurberg & Galvão, 2006).

Además de parámetros tales como la búsqueda de alimento y de refugio, hay 3 tipos de estímulos principales que podrían modular su actividad locomotora, como son los olfativos, visuales y mecánicos, así como la integración de estos e incluso factores tales como la memoria, el aprendizaje o modificadores etológicos (Lazzari *et al.*, 2013; Reisenman *et al.*, 2016).

2.4.2. DETECCIÓN DE ESTÍMULOS OLFATIVOS

La detección de estímulos de sus congéneres y/o del hospedador podría inducir a los triatominos al abandono del refugio. La búsqueda de alimento y la orientación de largo alcance se exhiben si se perciben señales olfativas adecuadas (May-Concha *et al.*, 2015). Cuando se detectan a distancia, los estímulos olfativos no proporcionan información direccional por sí mismos, pero pueden desencadenar una anemotaxia positiva. Cuando se detectan señales químicas en las proximidades, estas pueden estimular a los insectos y atraerlos o repelerlos (Lazzari & Lorenzo, 2009).

El dióxido de carbono (CO_2) modifica en cierto grado el comportamiento de los triatominos y las respuestas hacia este gas son moduladas por un ritmo circadiano endógeno que provoca respuestas sólo durante las primeras horas de la escotofase. Durante este período, la motivación para alimentarse también es mayor: largos períodos de ayuno no fortalecen dicha respuesta, sin embargo, la alimentación reciente cambia el efecto del gas y pasa de ser un atractante a constituir un repelente (Cruz-López *et al.*, 2001; Flores, 2001). El umbral de respuesta de los triatominos hacia el CO_2 puro es de entre 300 y 400 ppm por encima de la concentración atmosférica (Barrozo & Lazzari, 2004).

Estímulos tales como el nonanal aumentan la actividad de los triatominos, mientras que algunos que se encuentran en el sudor humano, como el ácido isobutírico y el 1-octen-3-ol inducen atracción (Lazzari

et al., 2013). Además, el amoníaco presente en el sudor y la orina de vertebrados puede provocar la activación y la atracción en triatominos (Barrozo, 2003).

En la naturaleza estos insectos se enfrentan a mezclas de olores, y no a sustancias aisladas. Es decir, los componentes de tales mezclas a menudo interactúan sinérgicamente. El ácido L-láctico y, en general, ácidos grasos de cadena corta (menos de 6 carbonos), son estímulos ineficaces en un amplio rango de concentraciones cuando se presentan solos. Sin embargo, cuando se combinan cantidades por debajo del umbral de CO_2 con ácido L-láctico y otros ácidos grasos en las proporciones adecuadas, el atractivo de la mezcla puede ser similar al de un hospedador vivo (Vinauger, 2012).

Esta información olfativa permite al triatomino discriminar entre estímulos químicos y generar respuestas comportamentales adaptadas a estos (Barrozo *et al.*, 2009). En triatominos, los estímulos químicos (olfativos) son detectados principalmente por las antenas, constituidas por 4 segmentos (escapo, pedicelo y flagelos proximal y distal) (Figura 3), cada segmento presenta diversos receptores sensoriales o sensilias, capaces de detectar estímulos químicos o físicos (Cuadro 2) que desembocan en un comportamiento determinado (Flores, 2001).

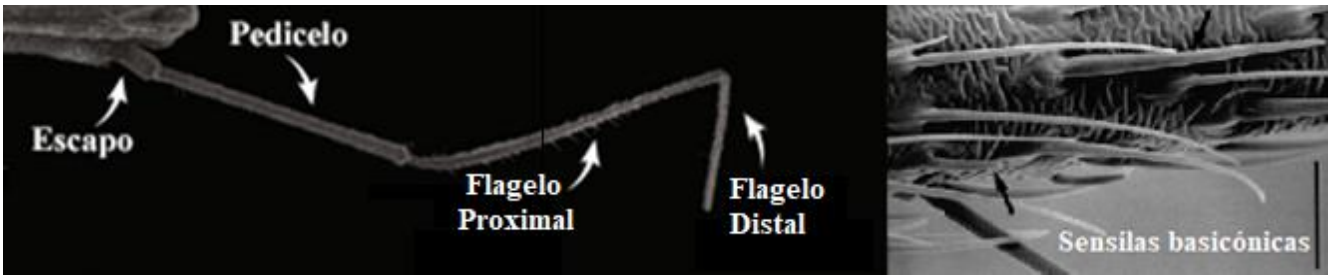


FIGURA 3: Representación gráfica de antenas y sensilas en Triatominae (Flores, 2001; Guerenstein & Guerin, 2001; Carneiro *et al.*, 2019).

CUADRO 2. Sensilias en antenas de triatominos (Catalá, 1997; Taneja & Guerin, 1997; Guerenstein & Guerin, 2001).

Receptores sensoriales en antenas Triatominae		
Tricobotrias	**Células receptoras**	**Estímulo**
Basicónicas	21 – 41	Químico. Piridina, furano, acetato de amila, heptanal, octanal, nonanal. Respuestas moderadas al dióxido de carbono y respuesta moderada o baja: monóxido de carbono, metanol y ciertos aldehídos.
Surcadas	4 – 5	Químico. Humedad, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido dimetilbutírico, ácido isovalérico, ácido 2-metilbutírico, amoníaco,

		isobutilamina. Respuestas bajas a: metilamina, dimetilamina, etilamina, trimetilamina y dietilamina.
Tricoideas	1 – 2	Mecánico. Posiblemente implicadas con la percepción de temperatura, contacto o presión.

2.4.3. DETECCIÓN DE ESTÍMULOS VISUALES

Los triatominos exhiben la capacidad de responder a diversas longitudes de onda del espectro electromagnético en un intervalo estimado entre los 357 y 695 nm, mostrando fototaxia negativa de 397 a 555 nm y una menor sensibilidad a 357 nm (UV cercano) y 621 nm ("zona roja" del espectro visible), con respuestas aun menores entre los 665 nm y 695 nm (Reisenman & Lazzari, 2006).

Los patrones de actividad de triatominos se disparan principalmente al anochecer y al amanecer, por lo tanto, su sistema visual debe operar en una amplia gama de intensidades lumínicas (Insausti & Lazzari, 2002). Poseen dos ocelos bien definidos y separados espacialmente que se localizan tras el par de ojos compuestos y en su conjunto regulan la respuesta fototáctica (Lazzari *et al.*, 1998; Lazzari *et al.*, 2011).

2.4.4. PERCEPCIÓN DE ESTÍMULOS VIBRATORIOS

Algunas especies de triatominos son capaces de emitir sonidos perceptibles por el oído humano. Sin embargo, estos insectos carecen de órganos auditivos obvios y, más bien, responden al componente vibratorio de la señal percibida (Lazzari *et al.*, 2006). Estos insectos son capaces de producir estridulación por medio del raspado del extremo de la proboscis sobre el surco estridulatorio del prosterno y estas vibraciones transmitidas a través del substrato ocurren en dos contextos comportamentales diferentes, el defensivo, en respuesta a perturbación mecánica y el sexual (e. g. comportamiento de rechazo por parte de la hembra) (Roces & Manrique, 1996; Schilman, 1998). Aunque no se conocen completamente los receptores involucrados en la percepción de estímulos vibratorios, posiblemente la sensilia campaniforme, los órganos subgenuales, así como la escoloparia distal de la tibia, el órgano de Johnston, entre otros, podrían estar involucrados (Roces & Manrique, 1996). Las estridulaciones de rechazo y las generadas por perturbación mecánica varían: las respuestas por perturbación se ubican en rangos de 1.9 a 2.9 MHz en las distintas especies en las que se las estudió (Schilman *et al.*, 2001) y las señales implicadas en el contexto sexual se ubican en un rango de frecuencias menores entre 0.7 MHz a 1.5 MHz. Mientras que a las vibraciones por perturbación se las ha sugerido como un mecanismo de defensa ante

predadores (Schilman *et al.*, 2001), las estridulaciones emitidas por las hembras se encuentran involucradas en la comunicación intraespecífica (Roces & Manrique, 1996; Manrique & Schilman, 2001).

2.4.5. MEMORIA Y APRENDIZAJE

Las estrategias de aprendizaje condicionado en *R. prolixus* han demostrado respuestas de doble condicionamiento a un mismo "olor neutro" ya que los insectos de esta especie pueden asociar diversas concentraciones de ácido láctico con la posibilidad de obtener un beneficio o de estar expuestos a perjuicios potenciales, dependiendo de la experiencia individual inducida (Vinauger *et al*., 2011).

De hecho, en otras investigaciones se demostró que la preexposición ante estímulos que generalmente no evocan un comportamiento particular es capaz de modificar la respuesta etológica frente a feromonas de alarma en triatominos (Minoli *et al.*, 2013), lo cual también sugiere que la capacidad dependiente de memoria asociativa que tienen para modificar sus respuestas ante estímulos químicos puede condicionar la selección del hospedador o del refugio (Vinauger *et al.*, 2012).

2.4.5. MODIFICACIÓN DEL COMPORTAMIENTO

Los insectos generalmente responden a mezclas de estímulos incluso cuando incluyen señales o mensajes ubicuos. Tales mezclas tienen la capacidad de perturbar, atraer, confundir o repeler a los partícipes del circuito de comunicación. Además, existen señales de fondo capaces de modular la respuesta comportamental, afectando las relaciones ecológicas dentro y entre especies (Boyd, 2010; Reisenman *et al.*, 2016).

Un caso particular en la modificación comportamental es constituido por los denominados hidrocarburos cuticulares, los cuales son compuestos altamente específicos y heredables que, además de proteger al insecto, pueden fungir como marcadores de apareamiento asortativo e incluso cumplir otras funciones en el contexto social (Kather & Martin, 2012). Los hidrocarburos cuticulares están constituidos principalmente por lípidos, ésteres y alcoholes, además de diversos compuestos alifáticos y aromáticos que varían en cantidad e identidad en relación con la especie, sexo, colonia, casta (en insectos sociales) y estadio de desarrollo. Por sí mismos, pueden funcionar como feromonas de contacto o agregación

(Calderón-Fernández, 2008), es decir, son capaces de modular o interrumpir las respuestas comportamentales en los procesos de comunicación química en los organismos estudiados que también pueden verse afectados por parámetros tales como la memoria y el aprendizaje individual e incluso comunal.

2.5. PATRONES DE COMPORTAMIENTO MÁS FRECUENTES EN TRIATOMINOS

Las GB se encuentran presentes sólo en ejemplares adultos generalmente luego de 60 días en su último estadio de desarrollo y se relacionan activamente con mecanismos de alarma y defensa, evocando diferentes comportamientos que pueden ser estereotípicos o no y que facilitan la respuesta del insecto ante situaciones de perturbación mecánica (Manrique *et al.*, 2006; Tay-Zavala *et al.*, 2008).

En cambio, las GM están implicadas en el comportamiento sexual, sus volátiles promueven la cópula; la agregación de machos alrededor de la pareja en cópula; el inicio del vuelo de machos y la salida de los machos del refugio (Manrique & Lazzari, 1995; Crespo & Manrique, 2007; Pontes et al., 2008; Zacharias *et al.*, 2010; Pontes & Lorenzo, 2012; Manrique & Lorenzo, 2012; Pontes *et al.*, 2014).

2.5.1. COMPORTAMIENTO DE AGREGACIÓN

Esta clase de comportamiento es mediado por la respuesta ante la presencia de señales químicas particulares. Claros ejemplos han sido observados en la agregación activa de adultos en torno a heces o rastros de estas que funcionan como señalamiento de retorno o marcaje hacia el refugio del vector (Lorenzo-Figueiras & Lazzari, 1998; Vitta *et al.*, 2002). Además, como se ha mencionado previamente, se ha reportado el comportamiento de agregación de machos en torno a parejas en cópula (Manrique & Lazzari, 1995; Crespo & Manrique, 2007; Manrique & Lorenzo, 2012; Depickère *et al.*, 2019). Durante el día los triatominos permanecen en estado de aquinesis en estrecho contacto con el sustrato y con otros miembros de la población (tigmotaxis), por lo que, generalmente se encuentran agregados dentro de grietas y diversas superficies como resultado de la detección de estímulos o señales específicas (Lazzari, 1990; Minoli *et al.*, 2007).

2.5.2. COMPORTAMIENTO DISPERSIVO

En los triatominos puede ocurrir el proceso dispersivo de forma pasiva o ser provocado involuntariamente por humanos o diversos animales, o activamente a través del vuelo de los insectos adultos (Galvão *et al.,* 2001). La dispersión activa de estos vectores es un proceso clave en su ecología ya que afecta la dinámica y persistencia de sus poblaciones (Abrahan *et al.,* 2018).

Los insectos aparentemente responden de manera directa a condiciones externas, pero no necesariamente a un reloj interno (Jurberg & Galvão, 2006). En triatominos con afinidad por el hábitat humano, la dispersión activa puede conducir a la recolonización de ecotopos previamente tratados con insecticida (Abrahan *et al.,* 2018). Además, es necesario considerar la estacionalidad, pues varios trabajos documentan este fenómeno e indican que la dispersión de los adultos se realiza durante la época más calurosa y seca del año, posiblemente en busca de alimento o con fines reproductivos o quizás debido a la pérdida de agua por efecto de la temperatura ya que podría generar condiciones de inanición en los individuos (Reyes *et al.,* 2011).

2.5.3. COMPORTAMIENTO DE APAREAMIENTO

La pareja se aparea por iniciativa del macho con un patrón que consiste esencialmente de siete etapas (Manrique & Lazzari, 1994):

1. El macho mueve sus antenas, apuntándolas hacia la hembra (posición vigilante).
2. Salta sobre ella o se coloca lentamente sobre su zona dorsal (monta).
3. Rotación sobre la región dorsal de la hembra.
4. Se posiciona y sujeta lateralmente con sus tres pares de patas a la hembra exponiendo su genitalia (posición dorsolateral).
5. Introduce el aedeago y comienza la cópula, de aproximadamente 10 minutos de duración (y hasta 50 minutos en *R. prolixus*).
6. Separa la genitalia volviendo a colocarse sobre la zona dorsal de la hembra (sujeción).
7. Finalmente desciende hacia el sustrato (separación).

Durante este proceso, por ejemplo en *T. infestans*, se observan machos agregados en torno a la pareja, reduciendo su distancia media respecto al inicio del proceso de cópula (Crespo & Manrique, 2007). La hembra puede desplegar distintos comportamientos de rechazo, cuando no se encuentra receptiva puede rechazar al macho pegando su zona ventral hacia el sustrato (achatamiento), escapando ante el salto del macho (evasión), moviendo el abdomen (movimientos abdominales) o estridulando (Manrique & Lazzari, 1994; Pompilio *et al.*, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

Diversas especies de triatominos han sido estudiadas desde diferentes perspectivas con la finalidad de elucidar principios sobre su capacidad vectorial y también sobre las interacciones que pueden formar con otros organismos. Sin embargo, hasta el momento de plantear esta investigación en *M. pallidipennis*, el principal vector de la enfermedad de Chagas en la región centro-sur del estado de Puebla, no se hallaron estudios que describan las interacciones entre bacterias y las glándulas exocrinas presentes en adultos de esta especie, así como los efectos etológicos que dichas asociaciones pudieran generar debido a la participación de semioquímicos. Los semioquímicos liberados por las bacterias podrían tener una relevancia suficiente sobre diferentes aspectos relacionados con el comportamiento de triatominos y, por tanto: afectarían su capacidad vectorial o bien su predilección sobre ecotopos, pareja o fuentes alimentarias según el grupo glandular con que estas se encuentren asociadas.

Describir tales interacciones permitirá profundizar en el entendimiento de cómo estos vectores interactúan con el medio circundante y de qué modo responden a estímulos particulares que potencialmente evoquen una respuesta locomotora bien definida y con el potencial de ser aplicada en modelos para el control, manejo y mantenimiento de esta especie. Además, los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser extrapolados o empleados para el estudio de otras especies de triatominos (principalmente en aquellas pertenecientes al complejo *Phyllosoma*).

4. HIPÓTESIS

- Existen bacterias asociadas a las glándulas metasternales y a las glándulas de Brindley de *M. pallidipennis* que intervienen en la producción de semioquímicos capaces de modular diferentes aspectos comportamentales en adultos de esta especie.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la respuesta comportamental en adultos de *M. pallidipennis* expuestos a extractos bacterianos procedentes de las glándulas metasternales y de las glándulas de Brindley de esta especie.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el contenido de las glándulas metasternales y de las glándulas de Brindley en adultos de *M. pallidipennis* mediante técnicas microbiológicas, en la búsqueda de bacterias asociadas a estas estructuras.
- Identificar las bacterias aisladas a través de la metodología MS MALDI TOF.
- Probar extractos bacterianos de las glándulas metasternales y de las glándulas de Brindley en adultos de *M. pallidipennis*.

6. MÉTODOS

Para la experimentación se partió de una colonia controlada y monitoreada de *M. pallidipennis* en el Laboratorio de Parásitos y Vectores de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los insectos fueron mantenidos a una temperatura de 26 ~ 29 °C y una humedad relativa del 65 ~ 80% con un ciclo de luz/oscuridad de 16/8 horas, respectivamente. Los ejemplares de experimentación fueron alimentados con ingestas masivas de sangre de conejo cada 15 días en lapsos de 30 minutos.

* Debido a la contingencia causada por SARS-CoV-2, a partir del mes de octubre del año 2020, la fase experimental del proyecto fue realizada en las instalaciones del Laboratorio de Análisis Químicos Alimentos y Aguas Bio-Indu S.C. con ubicación en el estado de Puebla.

6.1. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Esta fase del ensayo inició con la selección de 3 hembras y 3 machos adultos tomados de manera aleatoria de la población general y con 21 días de ayuno. Cada ejemplar fue inmovilizado por enfriamiento a 4°C durante 30 minutos a fin de evitar la formación de cristales de agua en los órganos del insecto (Vitta *et al.*, 2009) y desinfectado superficialmente mediante inmersión en etanol al 96% durante 5 segundos con un posterior enjuague en agua desionizada estéril durante 30 segundos (Rodríguez-Ruano *et al.*, 2018). Después, el ejemplar fue diseccionado en solución Ringer estéril con una temperatura aproximada de 4°C con la finalidad de remover las GM y las GB, para colocar cada grupo a glandular en 2 mL de agua peptonada estéril con agitación en vórtex durante 30 segundos para así generar los inóculos primarios (Vasanthakumar *et al.*, 2006; Souza-Lima *et al.*, 2017). Además, como control del proceso se realizaron siembras con la solución Ringer procedente de la disección.

Posteriormente, se tomaron alícuotas de 100 µL de los inóculos primarios y del control y se cultivaron mediante la técnica de extensión en placa en diferentes medios de cultivo en un rango de temperatura de 25-a 36 °C, revisando los cultivos a las 24 y 48 horas.

6.1.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Partiendo de colonias aisladas y purificadas se realizó la caracterización microbiana a través de observación de criterios morfocoloniales, tinción de Gram/Prueba de KOH 3%, prueba de Catalasa y pruebas fenotípicas (Forbes *et al.*, 2007; Fernández-Olmos *et al.*, 2010).

6.1.2. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La caracterización fenotípica de microorganismos cumple la función de diferenciar las cepas aisladas y, hasta cierto grado, ofrece criterios para una identificación presuntiva. La mayoría de los métodos actuales para la identificación microbiana ofrecen diferentes niveles de certeza en la tipificación hasta el nivel de género y en algunos casos hasta el nivel de especie, sin embargo, poseen diversas limitaciones generalmente asociadas al tipo de organismo estudiado (Bou *et al.*, 2011).

En este campo destacan los métodos moleculares (e. g. ARN 16S/23S), los cuales ofrecen la posibilidad de sobrepasar dichas limitaciones, pero por lo general se trata de metodologías relativamente complejas y con un coste elevado. Ante esto, una alternativa eficiente para la identificación de microorganismos es constituida por la espectrometría de masas y particularmente por la técnica MS MALDI – TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight), la cual es una herramienta frecuentemente empleada en distintos campos de investigación y que tiene un elevado nivel de certeza (93 ~ 100%), superior al de los métodos moleculares que poseen una certidumbre ≈ 90% o la caracterización bioquímica con una precisión variable y que va del 92.5 al 98% (Janda & Abbott, 2002; García *et al.*, 2011; Maldonado *et al.*, 2017).

En esencia, la metodología MALDI TOF MS consta de cuatro etapas (Figura 6): I. Aislamiento de la cepa de trabajo, II. Cálculo del tiempo de vuelo para cada fragmento proteico ionizado en la matriz analizada, III. Comparación con bases de datos y IV. Reporte de resultados. En el equipo de espectrometría de masas: BrukerDaltonics Microflex LT con el software FlexControl 3.0. (García *et al.*, 2011).

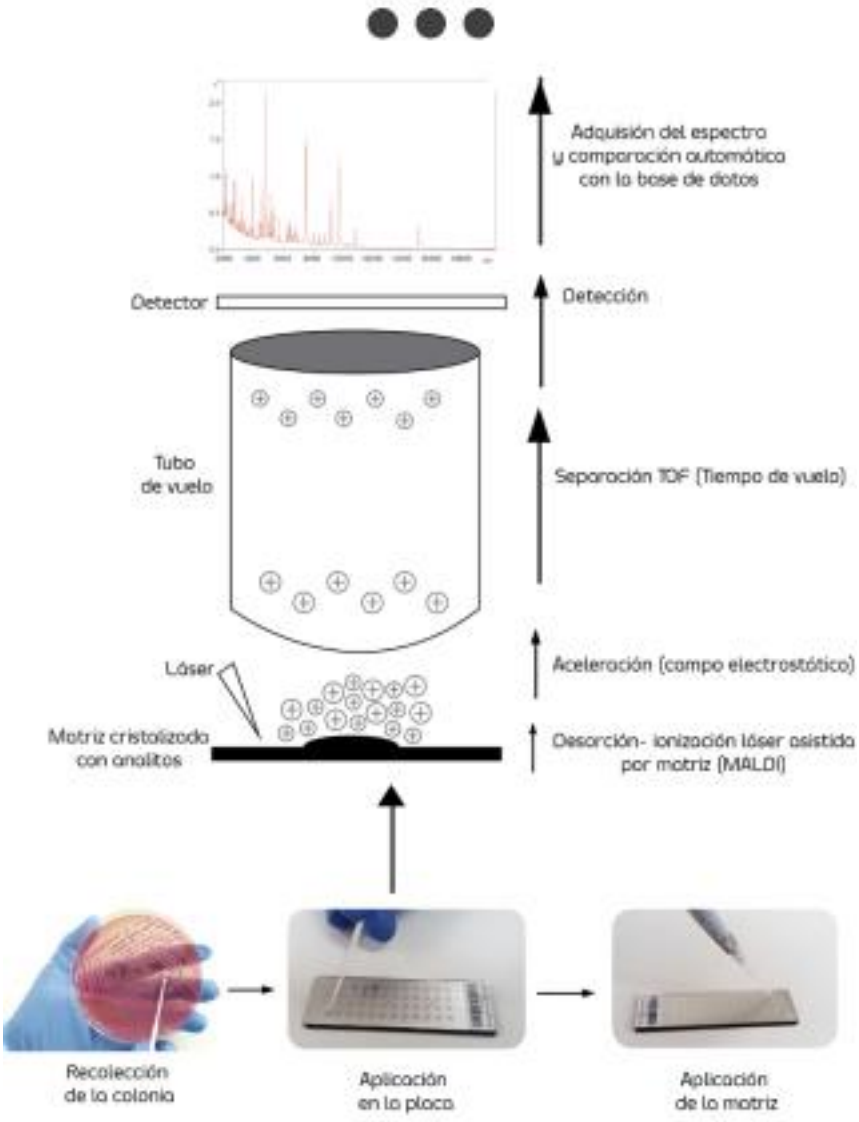


FIGURA 6. Esquematización de la metodología MALDI TOF MS (Maldonado *et al.*,2017).

6.2. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO BACTERIANO

Las cepas aisladas de las GM y las GB fueron empleadas como estímulo en las pruebas realizadas en el olfatómetro. Para tal objetivo, partiendo de la segunda ronda de subcultivos en medio sólido, se lanzaron cultivos líquidos en caldo BHI con agitación constante y a una temperatura de 30°C. Luego de 24 horas los cultivos fueron centrifugados a 1500 RPM durante 10 minutos (Montes-López, 2005) y la biomasa obtenida fue lavada en disolución Ringer ¼ y nuevamente centrifugada a 1500 RPM durante 5 minutos con un posterior decantado de la solución de lavado, eluidas y mantenidas en 500 µl de hexano grado HPLC durante 24 horas a una temperatura promedio de 27°C debido a que probablemente se encontraran

moléculas de naturaleza orgánica y a que este disolvente no funge como un estímulo en triatominos (Montes-López, 2005; Lorenzo-Figueiras *et al,* 2009; Paredes *et al.*, 2018). Todo ello, con la finalidad de extraer los semioquímicos posiblemente producidos por las bacterias aisladas y de no interactuar directamente con organismos potencialmente patógenos.

6.3. Diseño Experimental

Debido a la evidencia de la capacidad de memoria y aprendizaje sostenidos durante 72 horas en otras especies de Triatominae (Vinauger *et al.,* 2012), los ensayos tuvieron una separación de al menos 96 horas. Los tratamientos para el estudio consistieron en Control Negativo (hexano), Extracto bacteriano/glandular en papel filtro (100 µL del extracto), y Túnel vacío.

Se realizaron ensayos con n = 12 (seis machos, seis hembras) y se analizaron las respuestas observadas en 3 bloques constituidos por: bloque 1, ejemplares adultos tomados de manera aleatoria; bloque 2, ejemplares con 2 meses en estadio adulto y no copulados y bloque 3, ejemplares con 2 meses en estadio adulto y con copula verificada visualmente durante el control y mantenimiento de la colonia, así como de los grupos aislados. Cada repetición fue constituida por un periodo de observación fijado en 180 segundos para los ensayos preliminares y hasta 600 segundos para la verificación de la actividad biológica de las cepas aisladas.

Posteriormente, se contrasto la normalidad de los datos obtenidos que posteriormente fueron tabulados y analizados mediante la prueba de Shapiro-Wilk y a través de la prueba de rangos con signo de Wilcoxon (con la finalidad de determinar si existen o no diferencias significativas entre los datos obtenidos), además comparando los coeficientes de variación porcentual en el software RStudio con la versión 4.1.0 del lenguaje R (R Studio Team, 2020).

6.4. Ensayos preliminares

En esta fase experimental se realizaron bioensayos pasivos (sin flujo de aire forzado) en un olfatómetro de dos vías para verificar la actividad biológica de las GM y GB. Posteriormente se verificó la actividad de 5 machos y 5 hembras expuestos ante extractos de las GM y GB, luego de lo cual se registró el bagaje comportamental exhibido por los ejemplares de experimentación. Los datos obtenidos fueron dispuestos en tablas de contingencia con la finalidad de auxiliar en la estimación del

comportamiento de *M. pallidipennis* mediante diagramas cinemáticos y matrices de transición bajo las condiciones experimentales descritas. Y cada experimento fue registrado por una cámara con sensor infrarrojo e iluminación asistida por 6 focos led con emisión luminosa a 940 nm (IR).

6.5. CONFIRMACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Se realizaron ensayos en olfatómetro bajo condiciones de iluminación ≤ 14 cd/m2, ruido ≤ 30 dB y horario coincidente con los ciclos de mayor actividad del insecto según lo descrito para otras especies (Lazzari, 1992). Las bases internas de los brazos del dispositivo de experimentación (Figura 7) fueron cubiertas con papel filtro para evidenciar heces u otras secreciones durante los ensayos (Lorenzo & Lazzari, 1998).

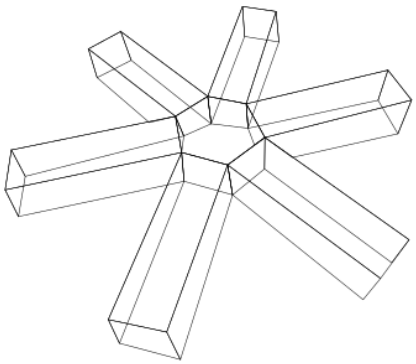


FIGURA 7. Diseño propuesto para la realización de bioensayos con ejemplares adultos de *M. pallidipennis*. Equipo manufacturado en acrílico y constituido por 6 brazos desmontables con medidas internas de: largo 20 cm, ancho 6 cm y alto de 6 cm y un espacio central hexagonal con un perímetro de 36 cm. En los ensayos se utilizó una configuración de tres brazos colocando tapas selladas en los otros accesos.

Luego de cada ensayo, el olfatómetro empleado fue expuesto a una lámpara UV durante 20 minutos en cámara cerrada y posteriormente lavado con Extran® libre de fosfatos y *n*-hexano a fin de eliminar cualquier resto de las actividades previas. Finalmente, se evaluaron los Índices de Preferencia Individual (IPI) y posteriormente fueron ponderados como Índices de Preferencia Grupal (IPG) (Palottini *et al.*, 2014; Palottini *et al.*, 2016; Mengoni *et al.*, 2017).

Los Índices de Preferencia Individual (IPI) fueron calculados mediante la ecuación:

$$IPI = \frac{TE - TC}{TT}$$

Donde TC es el tiempo que el insecto pasa en el sector control, TE es el lapso transcurrido entre la llegada, asentamiento y partida hacia el lado del estímulo y TT es el tiempo total del ensayo o réplica, en cada caso, medido en segundos.

Valores de IPI o IPG de -1, 0 o +1 indican repelencia, distribución azarosa o atracción respectivamente, y son adimensionales. Adicionalmente, estos valores fueron empleados para generar gráficos de dispersión que fueron comparados mediante los coeficientes de variación asociados a cada matriz de datos.

De tal modo, se procedió a evaluar la interacción entre conespecíficos habituados a las condiciones experimentales descritas para lo cual se tomaron 12 ejemplares adultos de manera aleatoria, se ordenaron en parejas y se colocó un ejemplar adulto aislado dentro de uno de los túneles del dispositivo, también se colocó un túnel sin estímulo a fin de funcionar como control durante los ensayos. Después de esto, se introdujo otro ejemplar adulto libre en el centro del dispositivo y se realizaron observaciones en intervalos de 3 minutos. El ensayo fue realizado en el olfatómetro propuesto, con la siguiente distribución: Brazo 1 vacío, Brazo 2 control y Brazo 3 estímulo (Figura 8) y se emplearon 2 grupos de 12 ejemplares adultos (6 Hembras, 6 Machos) cada 1, con 4 semanas de ayuno y seleccionados de manera aleatoria.

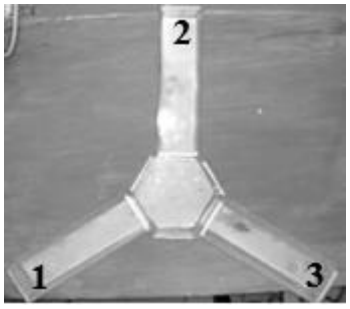


FIGURA 8. Configuración empleada, en el olfatómetro, durante los ensayos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. EXPLORACIÓN MICROBIOLÓGICA

Con la finalidad de aislar las bacterias posiblemente asociadas a las GB y/o a las GM, se realizaron cultivos microbianos utilizando estos grupos glandulares como fuente de inóculo, observando crecimientos óptimos a 30 °C y 36 °C, particularmente en Agar BHI. En estos cultivos se observaron 3 morfotipos, de los cuales uno fue descartado al evidenciar características coloniales propias de *E. coli* en: agar MacConkey, VBB y XLD, dicho microorganismo solamente fue recuperado de los inóculos realizados con la solución de disección. Los otros dos morfotipos encontrados (Cuadros 5 y 6) fueron comparados y diferenciados inicialmente mediante tinción de Gram, KOH 3% y la prueba de catalasa. Estas bacterias fueron encontradas en ambos grupos glandulares tanto en machos como en hembras, lo cual posiblemente implica una relación de mutuo beneficio que pudiera estar relacionada con la producción o modulación de semioquímicos por parte de las bacterias y con efectos "útiles" para el insecto, así como con el consumo de los nutrientes aportados por estos epitelios para el desarrollo de las bacterias.

CUADRO 5. Cultivos primarios de GM y GB en un rango de temperaturas de 25°C a 36°C y condiciones aerobias.

ID	Inóculo	Agar	Temperatura	Desarrollo	Morfotipos
R1A	Ringer ♀	BHI, Chocolate, MacConkey, Nutritivo, SC, VBB y XLD.	25 °C	48 hrs.	1
B1A	GB♀	BHI, Chocolate, Nutritivo y SC.	30 °C	24 hrs.	2
B1B	GB♂	BHI, Chocolate, Nutritivo y SC.	30 °C	24 hrs.	2
B2A	GB♀	BHI, Chocolate, Nutritivo y SC.	36 °C	24 hrs.	2
B2B	GB♂	BHI, Chocolate, Nutritivo y SC.	36 °C	24 hrs.	2
M1A	GM♀	BHI, Chocolate, Nutritivo y SC.	30 °C	24 hrs.	2
M1B	GM♂	BHI, Chocolate, Nutritivo y SC.	30 °C	24 hrs.	2
M2A	GM♀	BHI, Chocolate, Nutritivo y SC.	36 °C	24 hrs.	2
M2B	GM♂	BHI, Chocolate, Nutritivo y SC.	36 °C	24 hrs.	2

CUADRO 6. Colonias bacterianas observadas en subcultivos (diferenciados) a una temperatura de 30°C en agar BHI y condiciones aerobias.

ID	Agar Primario	Forma	Elevación	Margen	Pigmentación	Textura	Tinción/ KOH 3%	Catalasa
B1A1	BHI	Redonda	Convexa	Entero	Traslucida	Suave	G-/+	+
M1A2	BHI	Redonda	Convexa	Entero	Naranja	Seca	G+/-	+!
B1A1	Chocolate	Redonda	Convexa	Entero	Traslucida	Suave	G-/+	+

M1A2	Chocolate	Redonda	Convexa	Entero	Naranja	Seca	G+/-	+!
B1A1	Nutritivo	Redonda	Convexa	Entero	Traslucida	Suave	G-/+	+
M1A2	Nutritivo	Redonda	Convexa	Entero	Naranja	Seca	G+/-	+!
B1A1	SC	Redonda	Convexa	Entero	Traslucida	Suave	G-/+	+
M1A2	SC	Redonda	Convexa	Entero	Naranja	Seca	G+/-	+!
Símbolos empleados: + (reacción positiva), +! (reacción positiva intensa), - (reacción negativa, G (Gram)								

Las cepas B1A1 (G-) y M1A2 (G+) se tratan de bacterias cocoides que fueron aisladas mediante subcultivos sucesivos con una periodicidad de 2 semanas y una temperatura de almacenamiento de 4°C.

Además de la caracterización basada en criterios morfocoloniales, también se realizaron pruebas fenotípicas adicionales – pruebas bioquímicas y observación bajo el microscopio (Cuadro 7), con el fin de auxiliar en una identificación presuntiva. Tales pruebas partieron de la tercera generación de subcultivos y en cada caso se verificaron los siguientes parámetros:

CUADRO 7. Caracterización fenotípica de las cepas aisladas de GM y GB.

Prueba		**B1A1 (G-)**	**M1A2 (G+)**
Catalasa		+	+!
KOH 3%		+	-
SIM	Sulfuro	-	-
	Indol	-	-
	Motilidad	-	-
Urea		+	+
Coagulasa		NR	-
Termonucleasa		NR	-
Oxidasa		-	+
Lecitinasa		-	-
Anaerobiosis		-	-
NaCl 10%		+	+
LIA	Lisina Descarboxilasa	-	NR
	Lisina Desaminasa	+	NR
TSI	Glucosa	+	NR
	Lactosa	+	NR
	Sacarosa	+	NR
	Gas	-	NR
Citrato de Simmons		+	NR
Símbolos empleados: SR (Sin Reacción), + (Positivo), +! (Positivo intenso), - (Negativo) y NR (No Realizado).			

7.2. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Después de la exploración microbiológica presuntiva y tras la descripción de los criterios fenotípicos asociados a cada cepa, se procedió a la identificación bacteriana a través de la técnica MALDI TOF MS, Los valores del espectro 2.09 y 2.15 para las cepas B1A1: *Acinetobacter schindleri* y M1A2: *Micrococcus luteus* respectivamente, permiten la identificación de las mismas hasta el nivel de especie con una certeza de entre el 93 y el 100% (García *et al.*, 2011), lo cual contrasta con la caracterización fenotípica realizada, particularmente con la descripción de criterios morfológicos individuales, donde la cepa B1A1 se observa como un coco bacilo Gram negativo y la cepa M1A2 se describe como una coco bacteria Gram positiva (Figuras 9 y 10).

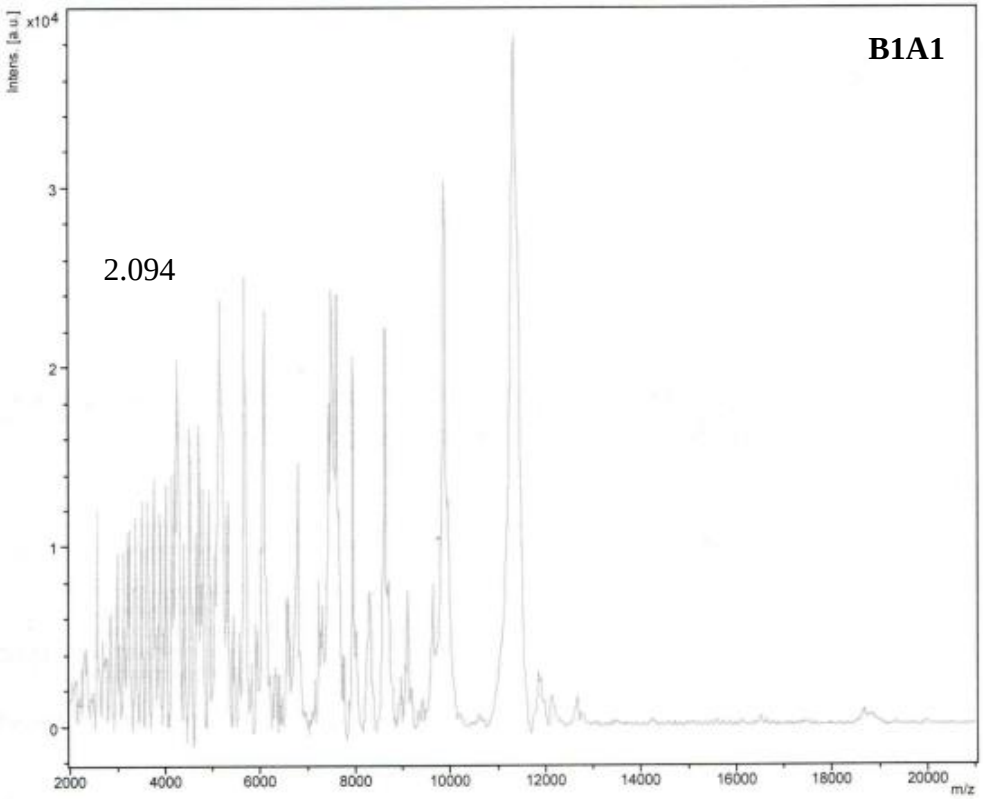


FIGURA 9. Espectrograma característico de la cepa B1A1: *Acinetobacter schindleri*.

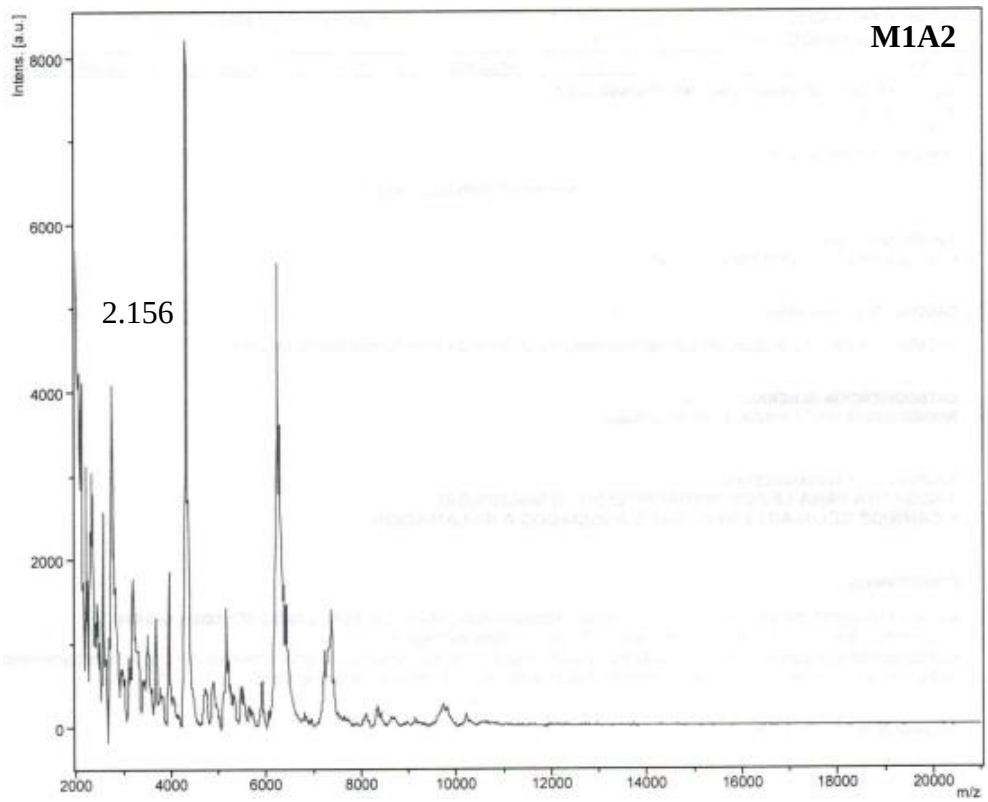


FIGURA 10. Espectrograma característico de la cepa M1A2; *Micrococcus luteus*.

Bacterias del género *Acinetobacter* fueron descritas previamente por Rodríguez y colaboradores en 2007 y por De la Cruz-Pantoja en 2013 asociadas a diversos tejidos de *Triatoma barberi* (Usinger, 1939) y *R. prolixus*, causando diversos efectos sobre su desarrollo e incluso limitándolo, mientras que diversas especies del género *Micrococcus* han sido observadas previamente en tejido intestinal de *T. dimidiata* por López-Ordóñez y colaboradores en 2018 como coadyuvantes en el desarrollo de otros simbiontes bacterianos. Posiblemente ambos grupos bacterianos se asocian con triatominos debido a sus hábitos coprofágicos o bien, por sus interacciones sociales y acompañan el desarrollo de estos insectos en función de si aportan o no un beneficio sustancial para su desarrollo. Debido a que solo se recuperaron estas dos bacterias resulta probable que *M. luteus* favorezca las aptitudes de supervivencia de *A. schindleri* por sobre otros géneros bacterianos que posiblemente estén presentes en las GM o en las GB pero que no forman parte de fracción microbiana recuperable mediante técnicas tradicionales de microbiología. En ambos casos estas bacterias has sido descritas como endosimbiontes de triatominos, pero no necesariamente como participes obvios en un contexto de comunicación química insecto-insecto.

7.3. REGISTROS DE COMPORTAMIENTO

De manera previa a la estimación del comportamiento de ejemplares adultos de *M. pallidipennis* se evaluó su respuesta comportamental ante la presencia de n-hexano grado cromatografía libre de estímulos adicionales, ensayo donde se observó una respuesta nula ante dicho solvente y por lo cual se descarta una influencia significativa sobre los resultados en ensayos subsecuentes. Posteriormente, se registró el comportamiento de los insectos expuestos a los estímulos de extractos de GM y GB simultáneamente y se registraron hasta 70 pautas distribuidas en el tiempo de observación (3 minutos), estas pruebas se realizaron con ejemplares a 4 semanas de haber emergido y 3 semanas sin ingesta de sangre. Donde se observó que de manera posterior al sensado de estímulos percibidos, los insectos se acercaron indistintamente a la fuente y evidenciaron diferentes pautas comportamentales tales como estridulación, movimientos antenales, aparente inmovilidad e incluso movimientos aleatorios de alejamiento o acercamiento respecto al origen de cada estímulo (Cuadro 8A).

CUADRO 8A. Repertorio de patrones comportamentales observados.

Registros ♂					**Registros ♀**				
AcB	Mp	Mp	Es	In	AcM	AcB	In	Ma	In
AcM	Mc	In	Mp	In	In	In	Ma	Es	Mp
Es	Es	AcB	Mp	Ma	AcB	Es	Ma	Ma	Lc
In	In	Mp	In	In	In	In	Ma	In	In
In	Es	Mp	In	Es	AcM	Mp	Es	Mp	Ma
In	Es	Ma	Es	Es	In	Ma	In	Ma	Ma
In	Lc	Mp	Ma	In	Es	In	Ma	Mp	Lc
Ma	Mp	Ma	Ma	In	In	Ma	Mp	Mc	Ma
Mp	Mp	In	In	In	Es	In	Ma	In	Es
Mp	Es	Ma	Mc	Ma	In	Ma	In	Mp	In
In	Es	Mp	Mp	Tc	Es	In	Lc	Lc	Ma
Ma	Mc	Mp	Es	In	Mp	Ma	Ma	In	Es
Ma	In	In	Es	Ma	In	In	Mp	Mp	Tc
Es	Ma	Mp	Ma	Tc	Mp	AcB	Mc	Mc	In

Siendo evidente desde este punto la constancia en los patrones comportamentales exhibidos, similares en identidad y duración en hembras y machos, pero con sutiles diferencias posiblemente asociadas al sexo del ejemplar de experimentación y a la manera en que estos insectos emplean su tiempo para el sensado de estímulos y la actividad particular asociada a estos, los resultados obtenidos fueron dispuestos en tablas de contingencia cuya finalidad fue evaluar la distribución de frecuencias entre los comportamientos observados (Cuadro 8B) para posteriormente generar las matrices de transición comportamental (Cuadro 8C, Figura 11 y Figura 12).

Donde **AcB:** Arrestamiento GB, **AcM:** Arrestamiento a GM, **Es:** Estridulación, **In:** Inmóvil (posición "relajada"), **Lc:** locomoción (aleatoria), **Ma:** Movimientos antenales (scanning), **Mc:** Inmóvil (condición "vigilante") y **Mp:** Posición mantenida ("marcha en su sitio").

CUADRO 8B. Tabla de contingencia para patrones comportamentales observados.

Transiciones observadas en ejemplar hembra										
♀	**AcB**	**AcM**	**Es**	**In**	**Lc**	**Mn**	**Mc**	**Mp**	**Tc**	**Total**
AcB	2	1	8	21	4	17	3	10	1	67
AcM	3	1	8	22	4	17	3	10	1	69
Es	2	0	7	19	4	17	3	10	1	63
In	3	1	8	21	4	17	3	10	1	68
Lc	0	0	3	7	3	8	3	6	1	31
Mn	0	0	4	14	4	16	3	8	1	50
Mc	0	0	3	7	3	7	2	5	1	28
Mp	0	1	5	17	4	17	3	9	1	57
Tc	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Total	10	4	45	129	30	116	23	68	8	434
Transiciones observadas en ejemplar macho										
♂	**AcB**	**AcM**	**Es**	**In**	**Lc**	**Mn**	**Mc**	**Mp**	**Tc**	**Total**
AcB	1	1	13	20	1	13	3	15	2	69
AcM	1	0	13	20	1	13	3	15	2	68
Es	1	0	12	20	1	13	3	15	2	67
In	1	0	12	19	1	13	3	15	2	66
Lc	1	0	8	14	0	10	2	12	2	49
Mn	1	0	12	16	1	12	3	15	2	62
Mc	1	0	11	15	1	10	2	12	2	54
Mp	1	0	12	16	1	12	3	14	2	61
Tc	0	0	0	1	0	1	0	0	1	3
Total	8	1	93	141	7	97	22	113	17	499

CUADRO 8C. Matriz de transiciones para patrones comportamentales observados.

Transiciones observadas en ejemplar hembra										
♀	**AcB %**	**AcM %**	**Es %**	**In %**	**Lc %**	**Mn %**	**Mc %**	**Mp %**	**Tc %**	**Total %**
AcB	2.99	1.49	11.94	31.34	5.97	25.37	4.48	14.93	1.49	100.00
AcM	4.35	1.45	11.59	31.88	5.80	24.64	4.35	14.49	1.45	100.00
Es	3.17	0.00	11.11	30.16	6.35	26.98	4.76	15.87	1.59	100.00
In	4.41	1.47	11.76	30.88	5.88	25.00	4.41	14.71	1.47	100.00
Lc	0.00	0.00	9.68	22.58	9.68	25.81	9.68	19.35	3.23	100.00
Mn	0.00	0.00	8.00	28.00	8.00	32.00	6.00	16.00	2.00	100.00
Mc	0.00	0.00	10.71	25.00	10.71	25.00	7.14	17.86	3.57	100.00
Mp	0.00	1.75	8.77	29.82	7.02	29.82	5.26	15.79	1.75	100.00
Tc	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
Total	1.66	0.69	9.29	36.63	6.60	23.85	5.12	14.33	1.84	100.00
Transiciones observadas en ejemplar macho										
♂	**AcB %**	**AcM %**	**Es %**	**In %**	**Lc %**	**Mn %**	**Mc %**	**Mp %**	**Tc %**	**Total %**
AcB	1.45	1.45	18.84	28.99	1.45	18.84	4.35	21.74	2.90	100.00

AcM	1.47	0.00	19.12	29.41	1.47	19.12	4.41	22.06	2.94	100.00
Es	1.49	0.00	17.91	29.85	1.49	19.40	4.48	22.39	2.99	100.00
In	1.52	0.00	18.18	28.79	1.52	19.70	4.55	22.73	3.03	100.00
Lc	2.04	0.00	16.33	28.57	0.00	20.41	4.08	24.49	4.08	100.00
Mn	1.61	0.00	19.35	25.81	1.61	19.35	4.84	24.19	3.23	100.00
Mc	1.85	0.00	20.37	27.78	1.85	18.52	3.70	22.22	3.70	100.00
Mp	1.64	0.00	19.67	26.23	1.64	19.67	4.92	22.95	3.28	100.00
Tc	0.00	0.00	0.00	33.33	0.00	33.33	0.00	0.00	33.33	100.00
Total	1.45	0.16	16.64	28.75	1.23	20.93	3.92	20.31	6.61	100.00

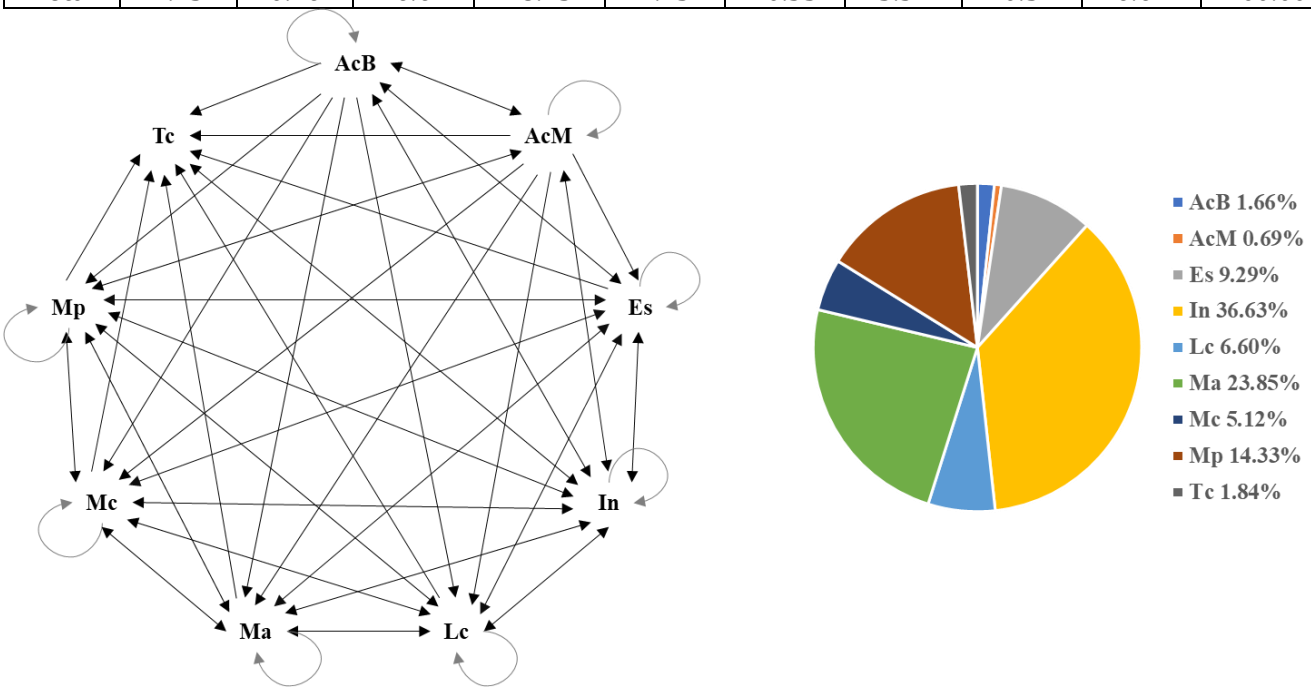


FIGURA 11. Diagrama cinemático y probabilidad transicional para ejemplares adulto de *M. pallidipennis* hembra expuesto ante estímulos de GM y GB.

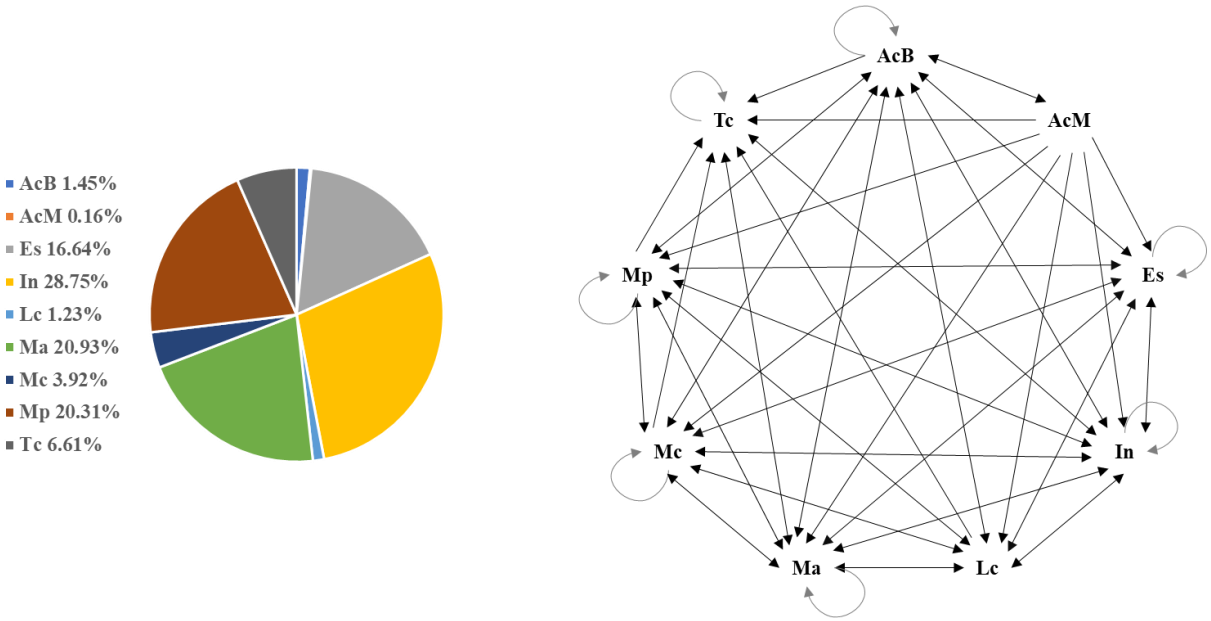


FIGURA 12. Diagrama cinemático y probabilidad transicional para ejemplares adulto de *M. pallidipennis* macho expuesto ante estímulos de GM y GB.

Se observó que los ejemplares de experimentación invierten la mayor parte de su tiempo en un aparente estado de inmovilidad (bajo las condiciones mantenidas en este ensayo) pero con comportamientos discretos tales como: movimientos antenales, posiciones vigilantes y orientadas hacia la fuente del estímulo e incluso estridularon en diversos momentos del experimento, aspectos que posiblemente implican procesos de comunicación con diferentes finalidades asociadas al estímulo dado y/o al contexto experimental.

Al observar y medir los tiempos de estas transiciones comportamentales, se evidenció en cierta medida la manera en que cada ejemplar distribuye sus actividades de percepción sensorial al ser expuesto a señales probablemente relacionadas con aspectos de comunicación sexual en esta especie, dada la naturaleza y función de las glándulas asociadas. Durante los ensayos, el macho ocupó hasta un 8% más de su tiempo agitando sus escapos a diferencia de hembras ante situaciones parecidas donde por lo general permanecen en un aparente estado de aquinesis.

Estas pruebas evidenciaron la necesidad de una experimentación bajo condiciones estrictamente controladas y en función de los requerimientos particulares del insecto, dado que factores tales como la iluminación o señales vibratorias provenientes del ambiente pudieron haber afectado a los resultados obtenidos. Además, no fue posible realizar repeticiones del ensayo durante la misma jornada ya que los ejemplares de experimentación prolongaban sus tiempos de inactividad o bien: no mostraron variaciones comportamentales obvias. Sin embargo, esta información permitió establecer las condiciones finales para la experimentación con los extractos bacterianos provenientes de las GM y de las GB. Cabe destacar que, los extractos glandulares fueron probados en paralelo, por lo que no es posible asociar un comportamiento particular a cada uno de estos grupos glandulares y, en concordancia con la literatura citada (Barrozo *et al.*, 2004; Lazzari *et al.*, 2013) se observó que los insectos se mantuvieron en estado de aquinesis hasta la percepción del estímulo presentado y en ambos casos se acercaron hasta la fuente de este en diferentes momentos del ensayo alternando comportamientos de alejamiento o acercamiento en diferentes momentos.

7.4. ENSAYOS CON OLFATÓMETRO

Además, se evaluaron los efectos del ayuno, realizando los ensayos con ejemplares de 4 y 6 semanas sin ingesta de sangre, observándose efectos mensurables solo en ejemplares con 4 semanas de ayuno y efectos poco distinguibles e incluso nulos en ejemplares con 6 semanas sin ingesta.

7.4.1. INTERACCIÓN ENTRE CONESPECÍFICOS HEMBRA: HEMBRA

En este ensayo se colocó una hembra aislada en uno de los túneles y otra más (libre) en el centro del dispositivo además de un brazo vacío que actuó como control y se realizaron 6 repeticiones con un periodo de observación fijado en 3 minutos. Se observó un ligero grado de atracción con un IPG de 0.2935 (Cuadro 9) entre las hembras dispuestas en el dispositivo, de manera similar a lo ocurrido en el comportamiento de agregación en *T. infestans* según lo descrito por Lazzari en 1990.

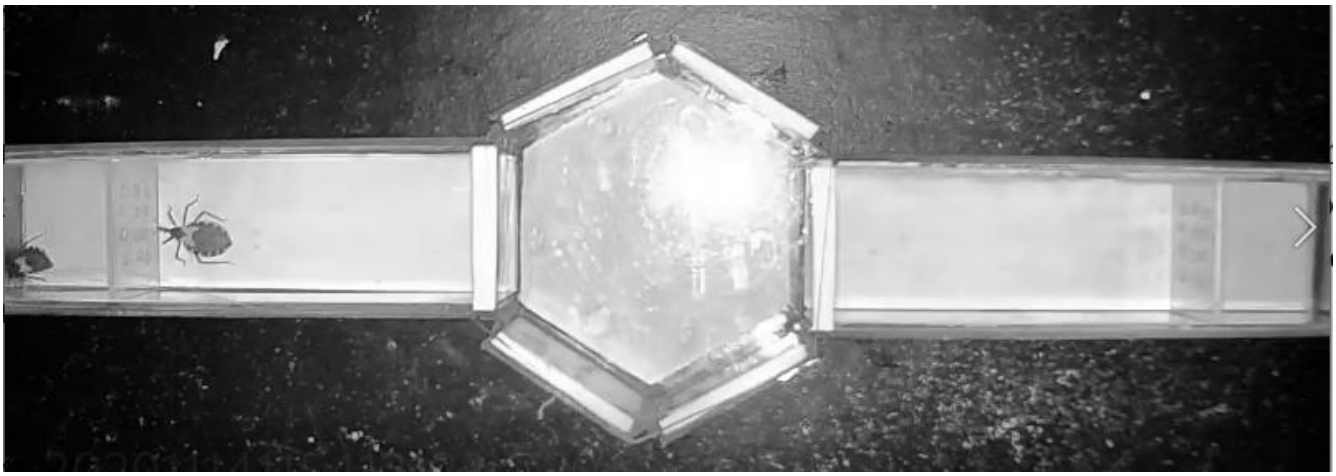
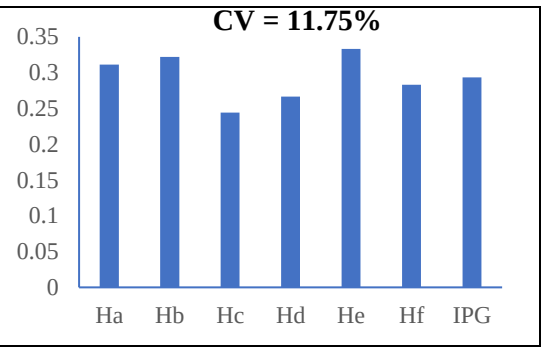


FIGURA 13. Atracción entre conespecíficos: Hembra – Hembra.

CUADRO 9. Índices de Preferencia Individual Hembra: Hembra.

Hembras ABCDEF				
	TC (s)	**TE (s)**	**IPI**	
Ha	62	118	0.3111	
Hb	52	110	0.3222	
Hc	57	101	0.2444	
Hd	52	100	0.2667	
He	60	120	0.3333	
Hf	61	112	0.2833	

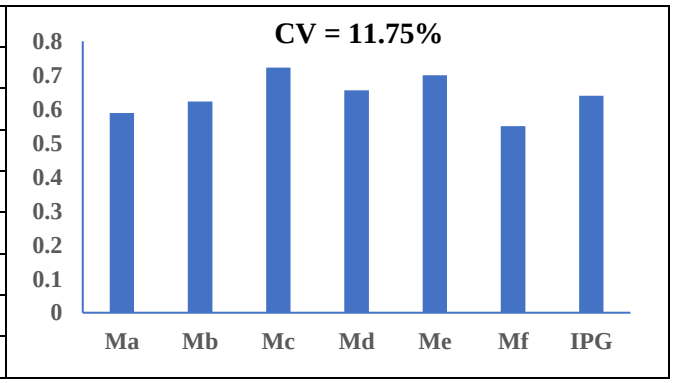
IPG	57.3333	110.1667	0.2935	

7.4.2. INTERACCIÓN ENTRE CONESPECÍFICOS MACHO: HEMBRA

Este ensayo consistió en colocar una hembra aislada en uno de los túneles y un macho al centro del dispositivo y un brazo vacío como control, para lo cual se tomaron 12 ejemplares adultos (6 hembras y 6 machos) y se observaron en intervalos de 3 minutos. Luego de las ponderaciones se estimó un IPG de 0.6398, es decir, se evidencia una marcada atracción de los machos hacia las hembras, tal y como es reportado para *T. infestans* por Manrique & Lazzari en 1994. Además, las respuestas en este ensayo, en promedio, fueron más rápidas que en el experimento previo (Cuadro 10).

CUADRO 10. Índices de Preferencia Individual Macho: Hembra.

Hembras ABCDEF			
	TC (s)	**TE (s)**	**IPI**
Ma	25	131	0.5889
Mb	28	140	0.6222
Mc	22	152	0.7222
Md	32	150	0.6556
Me	21	147	0.7000
Mf	31	130	0.5500
IPG	26.5	141.6667	0.6398



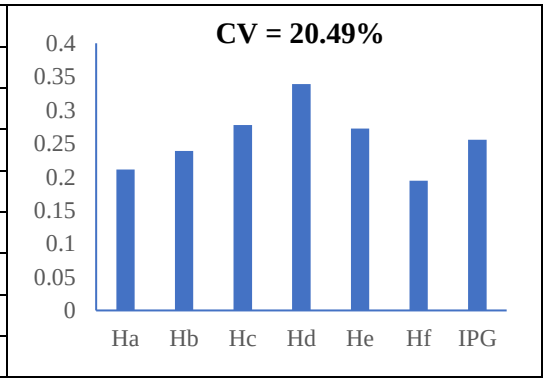
7.4.3. INTERACCIÓN ENTRE CONESPECÍFICOS HEMBRA: MACHO

En esta prueba se tomaron 12 ejemplares adultos (6 machos, 6 hembras) y se procedió de manera similar a los anteriores ensayos, pero colocando un macho aislado e introduciendo una hembra en el receptáculo central del dispositivo. Posteriormente, se realizaron observaciones en intervalos de 3 minutos, encontrando un IPG de 0.2556, similar a lo observado al evaluar la atracción experimentada por las

hembras hacia otras hembras y alrededor de un 11% inferior a dicho valor. Sin embargo, la distancia media de las hembras hacia los machos fue menor y por lo general exhibieron un menor bagaje comportamental, manteniéndose principalmente inmóviles en un sitio especifico. Además, estos datos poseen un coeficiente de variación porcentual del 20.49% lo que indica una mayor dispersión de los datos prácticamente del doble respecto a los anteriores ensayos, lo cual podría estar relacionado con la manera en que hembras y machos interactúan, donde la interacción generalmente es propiciada por iniciativa del macho (Cuadro 11).

CUADRO 11. Índices de Preferencia Individual Hembra: Macho.

Machos ABCDEF			
	TC (s)	**TE (s)**	**IPI**
Ha	70	108	0.2111
Hb	67	110	0.2389
Hc	67	117	0.2778
Hd	59	120	0.3389
He	50	99	0.2722
Hf	43	78	0.1944
IPG	59.3333	105.3333	0.2556



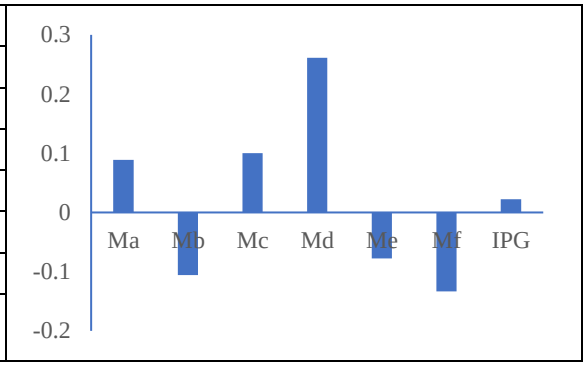
7.4.4. INTERACCIÓN ENTRE CONESPECÍFICOS MACHO: MACHO

En esta prueba se emplearon 12 machos adultos, para lo cual se colocó un 1 macho aislado en uno de los túneles y un macho al centro del dispositivo. Con lapsos de observación de 3 minutos, obteniendo IPI positivos y negativos y una distancia media mayor entre los individuos del ensayo, así como mayores tiempos de exploración en zonas diferentes al túnel con el ejemplar inmovilizado, lo cual además de explicar los valores negativos asociados al experimento posiblemente esté relacionado con la manera en que estos insectos socializan con sus congéneres. En este caso los datos carecen de homogeneidad, presentando un coeficiente de variación porcentual del 691.73%, es decir, podrían estar constituidos por una distribución exponencial donde los tiempos de ocurrencia entre cada evento fueron significativamente mayores (o menores) respecto al anterior: posiblemente debido a la cantidad de datos procesados (Cuadro 12).

CUADRO 12. Índices de Preferencia Individual Macho: Macho.

Machos ABCDEF	CV = 691.73%

	TC (s)	TE (s)	IPI
Ma	80	96	0.0889
Mb	99	80	-0.1056
Mc	72	90	0.1000
Md	63	110	0.2611
Me	90	76	-0.0778
Mf	100	76	-0.1333
IPG	84	88	0.0222



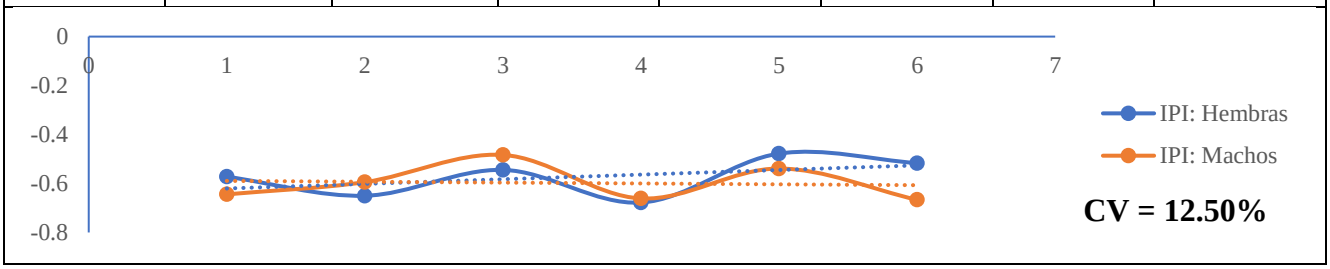
7.4.5. INTERACCIÓN MEDIADA POR EXTRACTOS DE GLÁNDULAS DE BRINDLEY

En este ensayo se emplearon 12 ejemplares adultos (6 Hembras, 6 Machos) seleccionados de manera aleatoria y se evaluaron los IPI e IPG generados por extractos de las GB tomados de hembras y machos respectivamente, a fin de elucidar si existen o no diferencias significativas provocadas en el comportamiento de estos insectos durante intervalos de 3 minutos.

Se obtuvo un coeficiente de variación porcentual del 12.50% comparando los IPI de machos y hembras en su conjunto, lo cual además de indicar una ligera homogeneidad entre los datos, también sugiere mecanismos de respuesta similares (no necesariamente iguales) en hembras y machos bajo las condiciones del ensayo (Palottini *et al.*, 2014) (Cuadros 13 y 14).

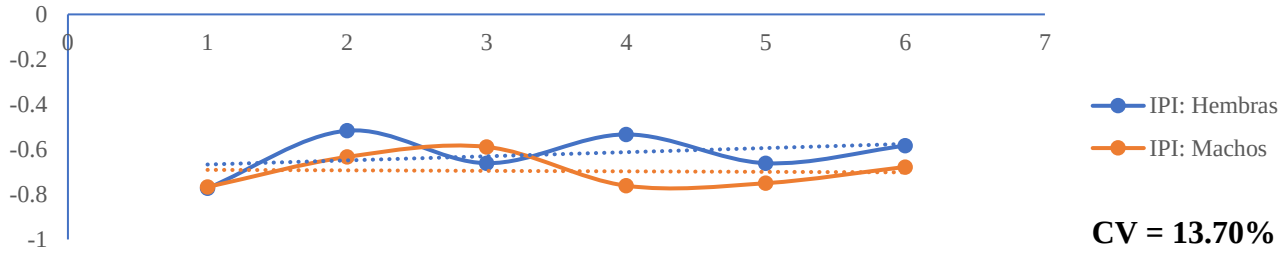
CUADRO 13. Índices de Preferencia Individual GBH: H y M

Glándulas de Brindley H							
	TC (s)	**TE (s)**	**IPI**		**TC (s)**	**TE (s)**	**IPI**
Ha	125	22	-0.5722	**Ma**	130	14	-0.6444
Hb	131	14	-0.6500	**Mb**	127	20	-0.5944
Hc	110	12	-0.5444	**Mc**	133	46	-0.4833
Hd	140	18	-0.6778	**Md**	140	21	-0.6611
He	119	33	-0.4778	**Me**	132	35	-0.5389
Hf	111	18	-0.5167	**Mf**	133	13	-0.6667
IPG	122.6667	19.5000	-0.5731	**IPG**	132.5000	24.8333	-0.5981



CUADRO 14. Índices de Preferencia Individual GBM: H y M

Glándulas de Brindley M							
	TC (s)	**TE (s)**	**IPI**		**TC (s)**	**TE (s)**	**IPI**
Ha	149	10	-0.7722	Ma	150	12	-0.7667
Hb	132	39	-0.5167	Mb	144	30	-0.6333
Hc	139	20	-0.6611	Mc	139	33	-0.5889
Hd	133	37	-0.5333	Md	152	15	-0.7611
He	149	30	-0.6611	Me	151	16	-0.7500
Hf	121	16	-0.5833	Mf	130	8	-0.6778
IPG	137.1667	25.3333	-0.6213	IPG	144.3333	19.0000	-0.6963



CV = 13.70%

Los resultados obtenidos evidencian repelencia probablemente ocasionada por los efectos fisiológicos asociados a las GB, sin embargo, tanto hembras como machos mostraron un comportamiento variable (aunque mínimo) de retorno hacia la fuente del estímulo, es decir, "se alejan mucho más e lo que se acercan", evidenciando así un comportamiento de huida y/o de alarma. Dicho comportamiento podría estar asociado al estrés sufrido por el insecto durante el tiempo en que el ensayo fue desarrollado, generando así un comportamiento de tipo huida o bien, concordando con la función fisiológica-comportamental atribuida a estos grupos glandulares generalmente asociados con el comportamiento de alarma y defensa en otras especies de triatominos. Por ejemplo, en *T. infestans* se han observado respuestas de escape que se atribuyen a la liberación de "altas concentraciones" de ácido isobutírico producido por las GB cuando el insecto es perturbado mecánicamente (Guerenstein & Guerin, 2001; Manrique *et al.*, 2006).

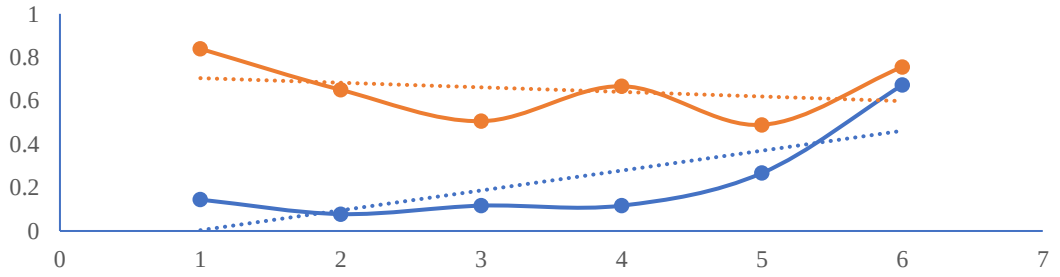
Además, los datos presentan un coeficiente de variación porcentual del 13.70% y una marcada similitud entre los IPI exhibidos por hembras y machos de esta especie, con una respuesta aparentemente más intensa en el caso de los machos.

7.4.7. INTERACCIONES MEDIADA POR EXTRACTOS DE LAS GLÁNDULAS METASTERNALES

En este ensayo se emplearon 12 ejemplares adultos (6 Hembras, 6 Machos) seleccionados de manera aleatoria y se evaluaron los IPI e IPG provocados por extractos de las GM tomados de hembras y machos respectivamente, a fin de elucidar si existen o no diferencias significativas provocadas en el comportamiento de sus congéneres. Como se muestra en el cuadro 15, los machos presentaron una marcada atracción hacia los extractos de las GM provenientes de hembras con un IPG de 0.6569 y se pudo observar que también son atraídos por los extractos procedentes de las GM de otros machos, lo cual sugiere una similar composición, pero diferente cantidad de las secreciones producidas por estas glándulas: aspecto atribuido al sexo y/o a la calidad del espécimen de evaluado (Vitta *et al.*, 2009).

CUADRO 15. Índices de Preferencia Individual GMH: H y M

Glándulas Metasternales H							
	TC (s)	**TE (s)**	**IPI**		**TC (s)**	**TE (s)**	**IPI**
Ha	22	48	0.1444	**Ma**	10	161	0.8389
Hb	17	31	0.0778	**Mb**	23	140	0.6500
Hc	11	32	0.1167	**Mc**	22	113	0.5056
Hd	39	60	0.1167	**Md**	19	139	0.6667
He	42	90	0.2667	**Me**	33	121	0.4889
Hf	32	153	0.6722	**Mf**	23	159	0.7556
IPG	27.1667	69.0000	0.2324	**IPG**	21.6667	138.8333	0.6509

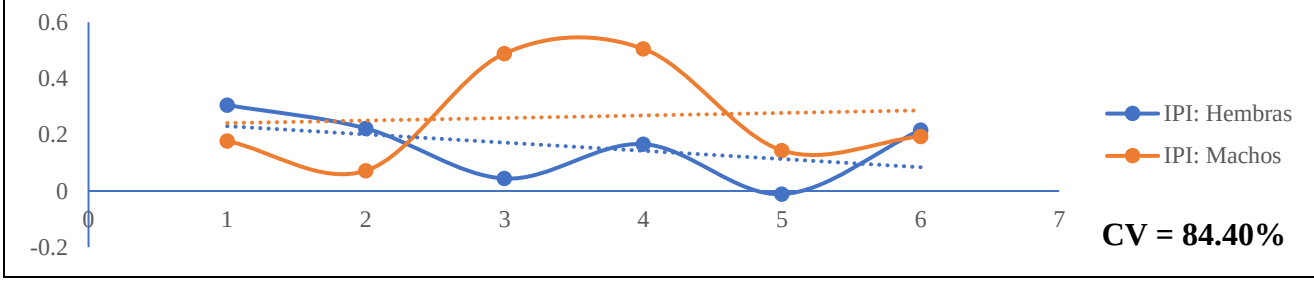


CV = 63.70%

CUADRO 16. Índices de Preferencia Individual GMM: H y M

Glándulas Metasternales M							
	TC (s)	**TE (s)**	**IPI**		**TC (s)**	**TE (s)**	**IPI**
Ha	62	117	0.3056	**Ma**	70	102	0.1778
Hb	42	82	0.2222	**Mb**	82	95	0.0722
Hc	70	78	0.0444	**Mc**	23	111	0.4889

Hd	61	91	0.1667	**Md**	41	132	0.5056
He	90	88	-0.0111	**Me**	62	88	0.1444
Hf	70	109	0.2167	**Mf**	43	78	0.1944
IPG	65.8333	94.1667	0.1574	**IPG**	53.5000	101.0000	0.2639



Además del paralelismo entre los datos, se verifican los coeficientes de variación porcentual asociados a cada experimento siendo de 63.70% y 84.40% respectivamente, lo cual indica una gran dispersión de los datos, posiblemente asociada a la manera en que estos estímulos generalmente asociados al comportamiento sexual, actúan sobre hembras y machos.

7.4.8. Interacciones mediadas por Estímulos Bacterianos

Se evaluaron los IPI e IPG provocados por las bacterias aisladas de las GM y de las GB con el fin de determinar si existe o no algún grado de atracción ante tales estímulos en lapsos de hasta 10 minutos debido al tiempo que los insectos invirtieron durante los ensayos, en la percepción de los estímulos presentados (Cuadro 17).

Se observó cierto efecto "repelente" provocada por la cepa B1A1 en *M. pallidipennis*, tanto en machos como en hembras, lo cual sugiere la producción de compuestos similares a los encontrados en las GB o bien, que el metabolismo de estas bacterias genera compuestos que posiblemente fungen como una señal de alarma. Tales respuestas, al ser más intensas en machos, podrían implicar la participación de los estímulos en el contexto sexual de estos insectos, aspecto soportado por el hecho de que los tejidos de procedencia de las bacterias aisladas participan activamente y en conjunto en dicho proceso. En este experimento el coeficiente de variación fue estimado en un 67.68%, con datos altamente dispersos entre sí, pero con cierto paralelismo entre machos y en hembras. Se aplicó la prueba de Shapiro–Wilk y se confirmó que los datos no siguen una distribución normal ($p = 0.2780$) y por tanto se procedió a analizarlos a través de la prueba Wilcoxon donde se obtuvo un valor $p = 3.728e^{-7}$, es decir, los datos

presentados son significativamente diferentes entre sí y con un IPG= -0.1365 resulta factible considerar que el estímulo empleado funge como una señal repelente o de alarma en ejemplares adultos de *M. pallidipennis*, similar a lo descrito por Manrique *et al.* (2006) en ejemplares perturbados de *T. infestans*.

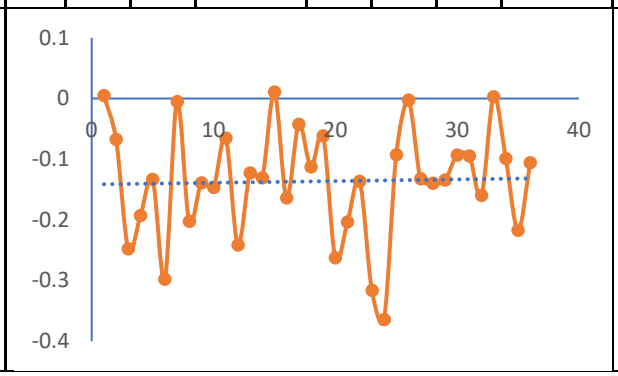
Para el caso de los efectos de la cepa M1A2 sobre ejemplares adultos de *M. pallidipennis*, se observa atracción de los insectos hacia el estímulo bacteriano, significativamente mayor en machos respecto a las hembras. Tal diferencia pudiera estar relacionada con la función de los metabolitos producidos por la bacteria y su efectos sobre los ejemplares del ensayo, sugiriendo así que tal estímulo quizás tenga una participación relevante o al menos suficiente en alguno de los procesos de comunicación química de estos insectos, probablemente fungiendo como una "feromona de contacto o de reconocimiento" puesto que en diversos momentos del ensayo el ejemplar de experimentación se posó directamente sobre la fuente del estímulo y giró sobre este, similar a lo ocurrido durante el proceso de cópula y durante los ensayos de verificación de la actividad biológica de las GM. Lo cual pudiera estar relacionado con el grado de volatilidad de los compuestos extraídos con el n – hexano, pudiendo estar presentes compuestos altamente volátiles (percibidos en la distancia dentro del dispositivo) o compuestos ligeramente volátiles (percibidos hasta el momento de acercamiento y/o contacto con la fuente del estímulo). Se estimó un valor p = 0.2029 en la prueba de Shapiro-Wilk, es decir que los datos poseen una distribución irregular, por lo que se procedió a analizarlos mediante la prueba de Wilcoxon donde se obtuvo un valor $p = 9.752e^{-6}$, por lo que los datos obtenidos en este ensayo son significativamente diferentes entre sí, lo cual es soportado por el coeficiente de variación del 97.78% y con un IPG = 0.0878 resulta valido considerar que este estímulo funge como una señal ligeramente atrayente (Cuadro 17) o bien como un "complemento" de la señal producida por las glándulas de procedencia.

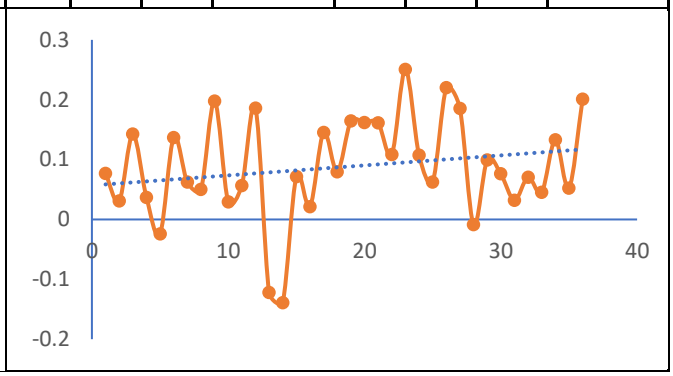
CUADRO 17. Atracción evocada por *Acinetobacter schindleri* (B1A1) y *Micrococcus luteus* (M1A2) en ejemplares adultos de *M. pallidipennis* tomados de manera aleatoria y en 3 tiempos diferentes.

#	B1A1: IPG = -0.1365, CV = 67.68%								M1A2: IPG = 0.0878, CV = 97.78%							
	♀	TC (s)	TE (s)	IPI	♂	TC (s)	TE (s)	IPI	♀	TC (s)	TE (s)	IPI	♂	TC (s)	TE (s)	IPI
A 1	**Ha**	203	205	0.0049	**Ma**	215	190	-0.0617	**Ha**	271	316	0.0767	**Ma**	211	294	0.1644
	Hb	229	200	-0.0676	**Mb**	305	178	-0.2629	**Hb**	282	300	0.0309	**Mb**	220	305	0.1619
	Hc	307	185	-0.2480	**Mc**	275	182	-0.2035	**Hc**	250	333	0.1424	**Mc**	229	317	0.1612
	Hd	281	190	-0.1932	**Md**	245	186	-0.1369	**Hd**	234	252	0.0370	**Md**	255	317	0.1084
	He	255	195	-0.1333	**Me**	335	174	-0.3163	**He**	210	200	-0.0244	**Me**	217	362	0.2504
	Hf	333	180	-0.2982	**Mf**	365	170	-0.3645	**Hf**	186	245	0.1369	**Mf**	274	340	0.1075
A 2	**Ha**	197	195	-0.0051	**Ma**	241	200	-0.0930	**Ha**	278	315	0.0624	**Ma**	218	247	0.0624
	Hb	285	189	-0.2025	**Mb**	194	193	-0.0026	**Hb**	276	305	0.0499	**Mb**	220	344	0.2199

	Hc	258	195	-0.1391	**Mc**	239	183	-0.1327	**Hc**	203	303	0.1976	**Mc**	220	320	0.1852
	Hd	250	186	-0.1468	**Md**	257	194	-0.1397	**Hd**	283	300	0.0292	**Md**	229	225	-0.0088
	He	220	193	-0.0654	**Me**	240	183	-0.1348	**He**	249	279	0.0568	**Me**	241	294	0.0991
	Hf	324	198	-0.2414	**Mf**	217	180	-0.0932	**Hf**	188	274	0.1861	**Mf**	255	297	0.0761
A 3	**Ha**	233	182	-0.1229	**Ma**	231	191	-0.0948	**Ha**	290	227	-0.1219	**Ma**	242	258	0.0320
	Hb	251	193	-0.1306	**Mb**	250	181	-0.1601	**Hb**	283	214	-0.1388	**Mb**	217	250	0.0707
	Hc	190	194	0.0104	**Mc**	198	199	0.0025	**Hc**	227	262	0.0716	**Mc**	232	254	0.0453
	Hd	266	191	-0.1641	**Md**	244	200	-0.0991	**Hd**	253	264	0.0213	**Md**	254	332	0.1331
	He	208	191	-0.0426	**Me**	280	180	-0.2174	**He**	182	244	0.1455	**Me**	281	312	0.0523
	Hf	227	181	-0.1127	**Mf**	224	181	-0.1062	**Hf**	283	332	0.0797	**Mf**	211	317	0.2008

G





8. CONCLUSIONES

- De acuerdo con los bioensayos realizados y los resultados obtenidos en estos, se sugiere que tanto las glándulas metasternales como las glándulas de Brindley de *M. pallidipennis* poseen actividad y función fisiológica-comportamental similares a las descritas para especies tales como *T. infestans* y *R. prolixus.*
- Se aislaron dos cepas bacterianas procedentes de las glándulas metasternales y de las glándulas de Brindley: B1A1 (*A. schindleri*) y M1A2 (*M. luteus*). Tras el análisis de los resultados se concluye que estas cepas provocan actividad biológica (repelente/atrayente, respectivamente) en ejemplares adultos de *M. pallidipennis.*
- Es necesario determinar el grado de asociación entre las bacterias aisladas y los grupos glandulares estudiados para lograr establecer si estas son determinantes o no dentro del circuito de comunicación propuesto por este trabajo.
- Los bioensayos realizados sugieren la presencia de semioquímicos participando dentro del contexto de interacción insecto-bacteria y con repercusiones dentro del circuito de comunicación insecto-insecto, posiblemente como producto del metabolismo de las bacterias sobre las glándulas metasternales y/o las glándulas de Brindley (que constituyen su fuente origen y sustento) o bien como resultado de la modificación química inducida por la interacción de los metabolitos emitidos por las bacterias sobre las señales emitidas por dichos grupos glandulares.
- Considerando el disolvente empleado para la preparación de los extractos bacterianos, los semioquímicos que probablemente participan dentro del circuito de comunicación estudiado son, aparentemente de naturaleza no polar o débilmente polares y, por lo tanto, podrían presentarse moléculas tales como benceno, metano y etileno, entre otros hidrocarburos y moléculas orgánicas (principalmente ácidos grasos).

9. PERSPECTIVAS

- Determinar el grado de asociación entre las bacterias aisladas y los grupos glandulares estudiados para lograr establecer si estas son determinantes o no dentro del circuito de comunicación propuesto por este trabajo.
- Identificar los volátiles producidos por las bacterias aisladas y con estos realizar pruebas electroantenográficas y ensayos olfatométricos, o bien, comparar con la literatura existente con la finalidad de verificar su participación en procesos de comunicación química en triatominos.

10. ANEXOS

10.1. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y NORMATIVIDAD ASOCIADA

Como eje central en la experimentación de este trabajo se requiere de un modelo animal, lo cual genera un contundente dilema ético principalmente relacionado con los siguientes aspectos:

1. Atentar contra la sensibilidad del animal y el daño inherente que pueda sufrir debido a las necesidades experimentales.
2. Atentar contra la integridad del experimentador.
3. La necesidad de realizar la experimentación a fin de elucidar principios de interés particular.

A fin de lograr una experimentación "responsable y ética", se consideran como "idóneos" los principios enunciados por Marshall Hall en 1831:

1. La experimentación no debe realizarse si la observación puede sustituirla.
2. Ningún experimento debe ser realizado sin un objetivo claro.
3. Los científicos deben estar bien informados acerca de los experimentos de sus colegas, para evitar repeticiones innecesarias.
4. Los experimentos justificados deben llevarse a cabo con el menor dolor posible.
5. Cada experimento debe realizarse bajo circunstancias que den lugar a los resultados más claros y eviten la repetición de estos.

Respecto a la legislación, en México, la NOM-062-ZOO-1999 establece "especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio", sin embargo, no posee consideraciones sobre la experimentación con "insectos". Sin embargo, la NOM-032-SSA2-2014; establece consideraciones para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores, que, aunque no habla de consideraciones éticas para la manipulación del vector de estudio (triatominos) si establece principios generales a seguir para su manipulación a fin de evitar la diseminación de enfermedades relacionadas (salvaguardando así, la salud del experimentador o experimentadores y de la población en general).

10. REFERENCIAS

1. Abrahan L., Gorla D. & Catalá S. 2016. Active dispersal of *Triatoma infestans* and other triatomines in the Argentinean arid Chaco before and after vector control interventions. Journal of Vector Ecology, *1* (41)*:* 90 – 91.
2. Abrahan L., López P., Amelotti I., Cavallo M. J., Stariolo R., Catalá S., Cueto G. & Valentinuzzi V. 2018. Activity levels of female *Triatoma infestans.* Parasites & Vectors, *11* (539)*:* 01 – 05.
3. Ali M. F. & Morgan E. D. 1990. Chemical communication in insect communities: a guide to insect pheromones with special emphasis on social insects. Biology Review, *65*: 227 - 240.
4. Arencibia-Arrebola D. F., Rosario-Fernández L. A. & Gámez-Menéndez R. 2008. Métodos generales de conservación de Microorganismos. I Taller Científico de los Laboratorios LIORAD VI Taller de Colecciones de Cultivos Microbianos y otros Materiales Biológicos. Edición 1: 07 - 08.
5. Barrozo R. B. 2003. Orientación al hospedador en la vinchuca *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae): claves sensoriales responsables. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires: 17 – 20.
6. Barrozo R. B. & Lazzari C. R. 2004. The Response of the Blood-sucking Bug *Triatoma infestans* to Carbon Dioxide and other Host Odours. Journal of Comparative Phisiology *192* (8). 319 – 326.
7. Barrozo R. B., Couton L., Lazzari C. R., Insausti T. C., Minoli S. A., Fresquet N., Rospars J. P. & Anton S. 2009. Antennal pathways in the central nervous system of a blood sucking bug, *Rhodnius prolixus.* Arthropod Structure & Development, *2* (38): 101 - 102.
8. Barrozo R. B., Manrique G. & Lazzari C. R. 2003. The role of water vapour in the orientation behavior of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). Journal of Insect Physiology, *49* (4): 320.
9. Barrozo R. B., Minoli S. A. & Lazzari C. R. 2004. Circadian rhythm of behavioural responsiveness to carbon dioxide in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). Journal of Insect Physiology, *50* (2-3): 249 – 253.

10. Botto-Mahan C., Correa J. P., Bacigalupo A., Campos-Soto R., Cattan P. E. & Solari A. 2015. Ecología de los triatominos silvestres endémicos de Chile. Parasitología Latinoamericana, *3* (64): 12.
11. Bou G., Fernández-Olmos A., García C., Sáez-Nieto J. A. & Valdezate S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enfermedades infecciosas - Microbiología Clínica, *29* (8). 602 - 606.
12. Boyd R. S. 2010. Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *Journal of Chemical Ecology, 36* (1): 046 - 048.
13. Calderón-Fernández G. 2008. Hidrocarburos cuticulares de triatominos: su aplicación como marcadores taxonómicos. Facultad de Ciencias Naturales y Museo Universidad Nacional de La Plata: 19 - 24.
14. Carneiro-Freitas S., Santos L. C., Countinho de Souza A. & Verissimo-Junqueira C. 2019. Morphological Aspects of Antennal Sensilla of the *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) from the Negro River, Amazon Region of Brazil. Journal of Parasitology Research, *2020* (ID7687041): 01 – 04.
15. Castillo D. & Wolff M. 2000. Aspectos del comportamiento de los triatominos (Hemiptera: Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. Biomédica, *20* (1): 59 – 62.
16. Catalá S. 1997. Antennal sensilla of *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae): a comparative study of five genera. *Insect Morphology & Embryology*, *2*6 (2): 69.
17. Crespo J. G. & Manrique G. 2007. Mating behavior on the hematophagous bug *Triatoma infestans*: Role of Brindley's and metasternal glands. Journal of Insect Phisiology *53* (7): 708 – 710.
18. Cruz-López L., Malo E. A., Rojas J. C. & Morgan E. D. 2001. Chemical ecology of triatomine bugs: vectors of Chagas disease. Medical and Veterinary Entomology, *15* (4): 351 – 354.
19. Cruz-López L., Morgan E. D. & Ondarza R. N. 1995. Brindley's gland exocrine products of *Triatoma infestans*. Medical and Veterinary Entomology, *9* (4): 403 – 406.
20. Davis T.S., Crippen T.L., Hofstetter R.W. & Tomberlin J. K.. Microbial Volatile Emissions as Insect Semiochemicals. Journal of Chemical Ecology *39***:** 840–855.

21. De la Cruz-Pantoja M. M. 2013. Influencia de endosimbiontes sobre el desarrollo de *Triatoma barberi* y la colonización de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias de la Salud. UAEH. 44 - 52.
22. Davis T. S., Crippen T. L., Hofstetter R. W. & Tomberlin J. K. 2013. Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. Journal of Chemical Ecology, *39* (7): 841 - 844.
23. Díaz L., Covarrubias K., Licón Á., Astorga M., Moreno Y., Martínez-Ibarra J. A. 2017. Parámetros biológicos de *Meccus phyllosomus phyllosomus* (Burmeister) 1835, de *Triatoma recurva* (Stål) 1868 (Hemiptera, Reduviidae) y de sus híbridos de laboratorio. Biomédica, *37* (2): 78.
24. Díaz S., Villavicencio B., Correia N., Costa J. & Haag K. L. 2016. Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. Parasites & Vectors, *9* (636): 05.
25. Depickère S., Ramírez-Ávila G. M. & Deneubourg J. L. 2019. Alteration of the aggregation and spatial organization of the vector of chagas disease, *Triatoma infestans* by the parasite *Trypanosoma cruzi*. Medical and Veterinary Entomology, *9* (1): 01 - 02.
26. Dumonteil E., Ramírez-Sierra M. J., Pérez-Carrillo S., Teh-Poot C., Herrera C., Gourbière S. & Waleckx E. 2018. Detailed ecological associations of triatomines revealed by metabarcoding and next generation sequencing; implications for triatomine behavior and *Trypanosoma cruzi* transmission cycles. Scientific Reports, *8* (1): 04.
27. Eichler S. & Schaub G. 1997. Development of Symbionts in Triatomine Bugs and the Effects of Infections with Trypanosomatids. Experimental Parasitology, *100* (1): 18 - 19.
28. El-Shafie H. A. F & Romeno-Faleiro J. 2017. Semiochemicals and Their Potential Use in Pest Management. Biological Control of Pest and Vector Insects. Chapter 1: 03 – 07.
29. Ferreira R. A., Lazzari C. R., Lorenzo M. G. & Pereira M. H. 2007. Do Haematophagous Bugs Assess Skin Surface Temperature to Detect Blood Vessels? PLOS ONE, *2* (9): 04 - 05.
30. Fernández-Olmos A., García de la Fuente C., Saéz-Nieto J. A. & Valdezate-Ramos S. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades. Infecciosas y Microbiología Clínica. 2. Métodos fenotípicos de identificación bacteriana: 03 – 08.

31. Flores G. B. 2001. Las antenas y el sentido térmico de la vinchuca *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires: 31 - 32.
32. Forbes B. A., Sahm D. F. & Weissfeld A. S. 2007. Diagnostic Microbiology 12th Ed. Chapter 15: 251 – 253.
33. Galvao C., Carcavallo R., Da Silva Rocha D. & Jurberg J. 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatomine Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. Zootaxa, *202* (1): 07 – 23.
34. García P., Allende F., Legarraga P., Huilcaman M. & Solari S. 2011. Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI. Revista Chilena de Infectología, *29* (3): 263 - 265.
35. Guerenstein P. G. & Guerin P. M. 2001. Olfactory and behavioural responses of the bloodsucking bug *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. The Journal of Experimental Biology, *204* (3): 585 – 587.
36. Guzmán-Marín E. S., Barrera-Pérez M. A., Rodríguez-Félix M. E. 1999. Viabilidad del *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma dimidiata* muertos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología, *19* (3): 113 - 114.
37. Hypša V. 1993. Endocytobionts of *Triatoma infestans*: Distribution and Transmission. Journal of Invertebrate Pathology, *61* (1): 32 - 33.
38. Hypša V., Dale C. 1997. *In Vitro* Culture and Phylogenetic Analysis of "*Candidatus Arsenophonus triatominarum*," an Intracellular Bacterium from the Triatomine Bug, *Triatoma infestans*. International Journal of Systematic Bacteriology, *47* (4): 1140 – 1144.
39. Insausti T. C. & Lazzari C. R. 2002. The fine structure of the ocelli of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Tissue and Cell, *34* (6): 437 - 438.
40. Janda J. M. & Abbott S. L. 2002. Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enou*gh?* Journal of Clinical Microbiology, *40* (6): 1887 – 1891.
41. Jurberg J. & Galvão C. 2006. Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease and implications for human health. Denisia, *19* (50): 1101 – 1107.
42. Justi S. A. & Galvão C. 2017. The Evolutionary Origin of Diversity in Chagas Disease Vectors. Trends in Parasitology, *33* (1): 42.

43. Kather R. & Martin S. J. 2012. Cuticular hydrocarbon profiles as a taxonomic tool: advantages, limitations and technical aspects. Physiological Entomology, *37* (1): 025.
44. Lazzari C. R. 1992. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. Journal of insect phisiology, *38* (11): 895.
45. Lazzari C. R. 1990. Fisiología del comportamiento de *Triatoma infestans*, (KLUG, 1834) (Heteroptera: Reduviidae), orientación térmica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires: 10.
46. Lazzari C. R., FIschein D. & Insausti T. C. 2011. Differential control of light dark adaptation in the ocelli and compound eyes of *Triatoma infestans*. Journal of Insect Phisiology, *57* (11): 1547 - 1522.
47. Lazzari C. R., Lorenzo M. G. 2009. Exploiting triatomine behaviour: alternative perspectives for their control. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, *104* (1): 65 – 68.
48. Lazzari C. R., Manrique G. & Schilman P. E. 2006. Vibrational communication in *Triatominae* (Heteroptera). Insects Sounds Communication; Physiology, Behaviour, Ecology and Evolution: 297 - 298.
49. Lazzari C. R., Pereira M. H., Lorenzo M. G. 2013. Behavioural biology of Chagas disease vectors. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, *108* (1): 34 – 44.
50. Lazzari C. R., Reiseman C. E. & Insausti T. C. 1998. The role of the ocelli in the phototactic behaviour of the haematophagous bug *Triatoma infestans.* Journal of Insect Physiology, *44* (12): 1159.
51. Leroy P. D., Sabri A., Verheggen F. J., Francis F., Thonart P. & Haubruge E. 2011. The semiochemically mediated interactions betweem bacteria and insects. Chemoecology, *21*: 113 - 122.
52. López-Ordóñez T., Flores-López C. A., Montejo-López R., Cruz-Hernandez A. & Conners E. E. 2018. Cultivable bacterial diversity in the gut of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*: Identification of possible bacterial candidates for a paratransgenesis Approach. Frontiers in Ecology and Evolution *13* (5):174.
53. Lorenzo Figueiras A. N. & Lazzari C. R. 1998. Aggregation behaviour and interspecific responses in three species of triatominae. Memorias do Instituo Oswaldo Cruz, *93* (1): 133 - 137.
54. Lorenzo Figueiras A. N., Girotti J. R., Mijailovsky S. J. & Juárez M. P. 2009. Epicuticular lipids induce aggregation in chagas disease vectors. Parasites & Vectors, *2* (8): 02 – 05.

55. Lorenzo M. G. & Lazzari C. R. 1998. Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Acta Tropica, *70* (2): 165.
56. Lorenzo M. G. & Lazzari C. R. 1999. Temperature and relative humidity affect the selection of shelters by *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. Acta Tropica, *72* (3): 241 – 248.
57. Maldonado N., Robledo C. & Robleto J. 2017. La espectrometría de masas MALDI TOF en el laboratorio de microbiología clínica. Infectio, *22* (1): 35 – 39.
58. Manrique G. & Lazzari C. R. 1994. Sexual behaviour and stridulation during mating in Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, *89* (4): 629 - 632.
59. Manrique G. & Lazzari C. R. 1995. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, *90* (5): 645 - 647.
60. Manrique G. & Lorenzo M. 2012. The sexual behaviour of Chagas' disease vectors: chemical signals mediating communication between male and female triatomine bugs, *2012*: 1 – 6.
61. Manrique G., Vitta A. C. R., Ferreira R. A., Zani C. L., Unelius C. R., Lazzari C. R., Diotaiuti L. & 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. Journal of Chemical Ecology, *32* (9): 2035 - 2036.
62. Martínez F. H., Villalobos G. C., Cevallos A. M., De la Torre P., Laclette J. P., Alejandre-Aguilar R. & Espinoza B. 2006. Taxonomic study of the *Phyllosoma* complex and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: using ITS-2 and mtCytB sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, *41* (2): 279 - 287.
63. May-Concha I. R.., Rojas J. C., Cruz-López L., Ibarra-Cerdeña C. & Ramsey J. M. 2015. Volatile compound diversity and conserved alarm behavior in *Triatoma dimidiata*. Parasites & Vectors, *8* (84): 10.
64. McCall P. J. & Kelly D. W. 2002. Learning and memory in disease vectors. Trends in Parasitology, *18* (10): 430.

65. Mengoni S. L., Lorenzo-Figueiras A. N. & Minoli S. A. 2017. Experience-dependent modulation of the attraction to faeces in the kissing bug *Triatoma infestans*. Journal of Insect Physiology, *98* (23): 24 - 25.
66. Minoli S. A., Baraballe S. & Lorenzo-Figueiras A. N. 2007. Daily Rhythm of Aggregation in the Haematophagous Bug *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, *102* (4): 449 - 451.
67. Minoli S. A., Palotini F. & Manrique G. 2013. The main component of an alarm pheromone of kissing bugs plays multiple roles in the cognitive modulation of the escape response. Frontiers in Behavioral Neuroscience, *7* (77): 01 – 09.
68. Montes-López M. J. 2005. Estudio taxonómico polifásico de bacterias procedentes de ambientes antártidos: descripción de cuatro nuevas especies. Universitat de Barcelona: 98, 99.
69. Nordlund, D. A., & Lewis, W. J. (1976). Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. Journal of Chemical Ecology, *2* (2): 211–220.
70. Pacheco-Tucuh F. S., Ramírez-Sierra M. J., Gourbiere S. & Dumonteil E. 2012. Public streetlights increase house infestation by the chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. PLoS ONE, *7* (4): 01 - 03.
71. PAHO. 2017. Enfermedad de Chagas en las Américas - Hoja informativa para los trabajadores de salud. Organización Panamericana de la Salud. Recuperado de: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13568:chagas-in-americas-health-workers-2017&Itemid=40721&lang=es
72. Palottini F, Gonzáles A. & Manrique G. 2014. Filling dynamics of the Brindley's glands in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Journal of Insect Physiology *71*: 124 – 126.
73. Palottini F. & Manrique G. 2016. Compounds released by disturbed adults of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae): behavioural effects of single compounds and binary mixtures. Physiological Entomology, *41* (3): 01 – 06.
74. Paredes-González E. A., Álvarez-Hernández G. & Ortega-García J. 2018. Chapter 5. Transmitter Insect of Chagas Disease in Northwest Mexico: A Comparative Study of the Cuticular Hydrocarbons Profile of Three Populations of *Triatoma rubida*: Peridomestic, Domestic and Sylvatic. En IntechOpen (Ed). *Chagas Disease - Basic Investigations and Challenges*: 56 - 57.

75. Pérez-Brocal V., Latorre A., Moya A. 2011. Symbionts and Pathogens: What is the Difference? Current Topics in Microbiology and Immunology, *358* (11): 217.
76. Pompilio L., González Franco M., Chisari L. B. & Manrique G. 2016. Female choosiness and mating opportunities in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. Behaviour, *153* (3): 1 – 14.
77. Pontes G. B., Bohman B., Unelius C. R. & Lorenzo M. G. 2008. Metasternal gland volatiles and sexual communication in the triatomine bug, *Rhodnius prolixus*. Journal of Chemical Ecology, *34* (2008). 450 - 457.
78. Pontes G. B. & Lorenzo M. G. 2012. Female metasternal gland odours mediate male aggregation in *Rhodnius prolixus*, a triatomid bug. Medical and veterinary entomology, *26* (2012): 33 - 36.
79. Pontes G. B., Zacharias C. A., Manrique G. & Lorenzo M. G. 2014. Female odours promote the activation of sheltered kissing bug *Rhodnius prolixus* males and modulate their orientation. Medical and veterinary entomology, *28* (2014): 257 - 263.
80. R Studio Team. 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL http://www.rstudio.com/).
81. Reisenman C. R., Lazzari C. R. & Giurfa M, 1998. Circadian control of photonegative sensitivity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. Journal of Compared Physiology A. 183: 533 - 540.
82. Reisenman C. E., Insausti T. C. & Lazzari C. R. 2002. Light induced and circadian changes in the compound eye of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). The Journal of Experimental Biology, *205* (2): 201 – 209.
83. Reisenman C. E. & Lazzari C. R. 2006. Spectral sensitivity of the photonegative reaction of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). Journal of Comparative Physiology A, *192* (1): 39 – 43.
84. Reisenman C. E., Lei H. & Guerenstein P. G. 2016. Neuroethology of olfactory-guided behavior and its potential application in the control of harmful insects. Frontiers in Physiology, *7* (271): 01 – 13.
85. Rivaldi C. L. 2015. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Texas: Mitochondrial Genome Assembly, *Trypanosoma cruzi* Detection, and Bacterial Community Analysis. University of Texas at Tyler: 23, 24.

86. Roca M. J. & Lazzari C. R. 1994. Effects of relative humidity on the haematophagous bug *Triatoma infestans*: Hygropreference and Eclosion Succes. Journal of Insect Physiology, *40* (10): 901 - 904.
87. Roces F. & Manrique G. 1996. Different Stridulatory Vibrations during Sexual Behavior and Disturbance in the Bloodsucking Bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Journal of Insect Physiology, *42* (03): 237.
88. Rodríguez J., Pavía P., Calderón C., M. Montila, Nicholls R. S. & Puerta C. J. 2007. Estandarización de una prueba de PCR-RFLP para la identificación de Rhodococcus rhodnii en insectos triatominos. Universitas Scientiarum. *12* (3): 19.
89. Rodríguez-Ruano S. M., Škochová V., Rego R. O. M., Schmidt J. O., Roachell W., Hypša V. & Nováková E. 2018. Microbiomes of North American Triatominae: The Grounds for Chagas Disease Epidemiology. Frontiers in Microbiology, *9* (1167): 03 - 06.
90. Salazar-Schettino P. M., Rojas-Wastavino G. E., Rosales-Piña J. S., Vences-Blanco M. O. & Cabrera-Bravo M. 2013. *Triatoma mexicana* Herrich-Schaeffer (Hemiptera Reduviidae: Triatominae) Descripción de la Genitalia Externa del Macho y Morfología Externa de la Hembra. EntomoBrasilis: *6* (1): 70.
91. Sandoval-Ruiz C. A., Zumaquero-Ríos J. L, Rojas-Soto O. R. 2008. Predicting Geographic and Ecological Distributions of Triatomine Species in the Southern Mexican State of Puebla Using Ecological Niche Modeling. Journal of Medical Entomology, *540* (6): 540 – 543.
92. Sassera D., Epis S., Pajoro M., Bandi C. 2013. Microbial symbiosis and the control of vector borne pathogens in tsetse flies, human lice, and triatomine bugs. Pathogens and Global Health, *107* (6): 285 – 290.
93. Schilman, P. E. Factores que afectan la reproducción de las vinchucas: Aspectos fisiológicos y comportamentales". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998: 23 – 56.
94. Schilman P. E., Lazzari C. R. & Manrique G. 2001. Comparison of disturbance stridulations in five species of triatominae bugs. Acta Tropica *79* (2): 171 - 178.
95. Shorey H. H. 1973. Behavioral responses to insect pheromones. Annual Review of Entomology. Department of Entomology, University of California, *18* (1): 349 - 350.
96. Schofield C. J. & Galvão C. 2009. Classification, evolution and species groups within the Triatominae. Acta Tropica, *110* (2-3): 88.

97. Souza-Lima M., Silva Laport M., Seixas Lorosa E., Jurberg J., Netto dos Santos K. R., Cardoso da Silva N. M. A., Tavora C., da Costa Rachid C., Correa Atella G. 2017. Bacterial community composition in the salivary glands of triatomines (Hemiptera: Reduviidae). PloS Neglected Tropical Diseases, *12* (9): 01 – 15.
98. Taneja J., Guerin P. M. 1997. Ammonia attracts the haematophagous bug *Triatoma infestans*: behavioral and neurophysiological data on nymphs. Journal of Comparative Physiology A, *181*: 21 - 34.
99. Tay-Zavala J., Sánchez-Vega J. T., Calderón-Romero L., Romero-Cabello R., Ruiz-Sánchez D. & García-Tay J. 2008. Estudios del ciclo biológico de *Triatoma pallidipennis* (Stål 1872) y otros aspectos sobre su biología. Revista de la Facultad de Medicina UNAM, *51* (2): 58 - 59.
100. Vallejo G. A., Guhl F., Schaub G. A. 2009. Triatominae–*Trypanosoma cruzi/T. rangeli*: Vector–parasite interactions. Acta Tropica, *110* (2-3): 137 – 144.
101. Vasanthakumar A., Delalibera I., Handelsman J., Klepzig K. D., Schloss P. D. & Raffa K. F. 2006. Characterization of gut associated bacteria in Larvae and Adults of the Southern Pine Beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimmermann. Environmental Entomology, *35* (6): 1710 - 1714.
102. Viana-Sant'Anna M. R., Coelho-Soares A., Nascimento-Araujo R., Figueiredo-Gontijo N. & Horácio-Pereira M. 2017. Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) blood intake: Physical constraints and biological adaptations. Journal of Insect Physiology, *3* (97): 21 - 23.
103. Vidal-Acosta V., Ibáñez-Bernal S. & C. Martínez-Campos. 2000. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. Salud Pública de México, *42* (6): 496-503.
104. Vinauger C., Buratti L., Lazzari C. R. 2011. Learning the way to blood: first evidence of dual olfactory conditioning in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. Part I: appetitive learning. The Journal of Experimental Biology, *214* (18): 3032, 3033.
105. Vinauger C., Buratti L., Lazzari C. R. 2012. Learning the way to blood: first evidence of dual olfactory conditioning in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. Part II: aversive learning. The Journal of Experimental Biology, *214* (18): 3039, 3040.
106. Vinauger C., Lahondère C., Cohuet A., Lazzari C. R. & Riffell J. A. 2016. Learning and memory in disease vector insects. Trends in Parasitology, *32* (10): 01 – 07.

107. Vitta A. C. R., Serrão J. E., Lima E. R. & Vilela E. F. 2009. The metasternal and Brindley's glands of *Triatoma brasiliensis* Neiva (Hemiptera: Reduviidae). Neotropical Entomology, *38* (10): 231 – 235.

108. Vitta A. C. R., Lorenzo-Figueiras A. N., Lazzari C. R., Diotaiuti L. & Lorenzo M. G. 2002. Aggregation Mediated by Faeces and Footprints in *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera: Reduviidae) a Chagas Disease Vector. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, *97* (6): 865 – 867.

109. Zacharias C. A. 2011. Comunicación sexual en triatominos (Heteroptera: Reduviidae): claves químicas asociadas al vuelo y al apareamiento. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires: 31 – 63.