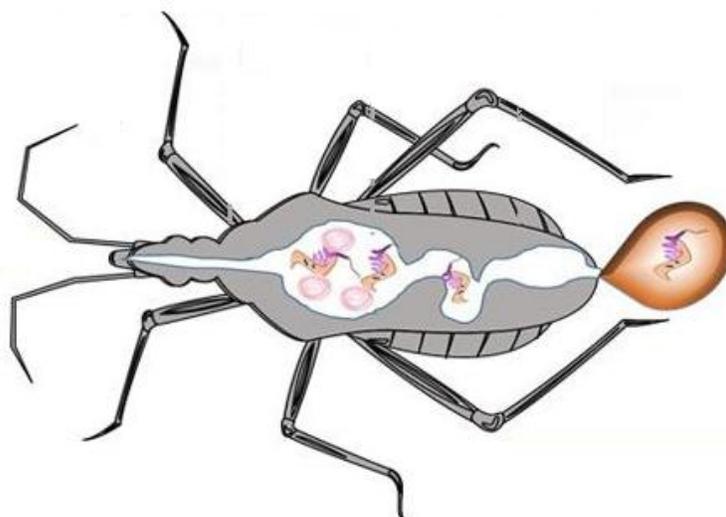




Efecto de la infección con *Trypanosoma cruzi* sobre los patrones de alimentación y de excreción/defecación de *Triatoma infestans*.



Tesinista: Nicolás Alejandro Pereyra Firma:

Director: Dr. Gastón Mougabure-Cueto Firma:

Fecha: 18 de Octubre de 2018

Laboratorio de Investigación en Triatomos (LIT), Centro de Referencia de Vectores (CeReVe).
Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación. Santa María de Punilla, Córdoba.

Efecto de la infección con *Trypanosoma cruzi* sobre los patrones de alimentación y de excreción/defecación de *Triatoma infestans*.

Tribunal Examinador

Nombre y Apellido: *Dra. Liliana Crocco* Firma:

Nombre y Apellido: *Dra. Susana R. Cagnolo* Firma:

Nombre y Apellido: *Dra. Alejandra Ceballos* Firma:

Calificación:

Fecha: 18 de Octubre de 2018

AGRADECIMIENTOS

Para finalizar este trabajo me gustaría agradecer a las distintas personas que de una manera u otra formaron parte de esta etapa en mi vida:

En primer lugar a mi familia, a mis padres que con su sacrificio me otorgaron la posibilidad de completar una carrera universitaria. A mis hermanos por su apoyo, enseñanzas y entendimiento a lo largo de toda mi vida, en especial a mis hermanas Pame y Luci con las que conviví de manera parcial o completa durante estos años como estudiante universitario y soportaron mis cambios de humor durante las semanas de parciales y exámenes. A mis sobrinos Tomi y Juan por alegrarme los días con sus fotos, visitas o llamadas, y por permitirme redescubrir el mundo a través de sus ojos.

A mis amigos, Bartolos, Bioturros y Palanes, los diferentes grupos que me enseñaron lo diversa y divertida que es la vida, me ayudaron a crecer en muchas oportunidades y me brindaron un soporte incondicional en todo momento. Gracias por todas las risas, abrazos y recuerdos que siempre tendré presente, que la vida nos encuentre juntos.

A Patricia y Gastón que me brindaron un espacio en su equipo y me introdujeron al mundo de la ciencia, me enseñaron muchas cosas, ya sea en lo académico como en lo personal, y dedicaron tiempo de sus vidas a formarme como biólogo. También a los becarios del CeReVe (Georgi, Caro, Irving), por su tiempo, por lo mates, por las charlas, por la ayuda en este proceso. Agradezco a Zamo y Gabi, del CeReVe, que si no hubieran atado a las palomas aún seguiría intentando a atrapar alguna. También a Raúl, director del CeReVe, al permitirme realizar mi trabajo en su ámbito laboral. Gracias Rodri y Santi, por las charlas y por las horas de trabajo compartidas.

A todos los docentes de la Escuela de Biología que me enseñaron desde sus distintos lugares lo emocionante y bella que es esta carrera. Y por último a mi Tribunal de Tesina, que de manera altruista formaron parte de este proceso y me obsequiaron parte de sus horas.

ÍNDICE

RESUMEN	5
PALABRAS CLAVES	5
INTRODUCCIÓN	6
<u>Enfermedad de Chagas</u>	6
<u>Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i></u>	7
<u>Los triatomínicos y <i>Triatoma infestans</i></u>	10
<u>Competencia vectorial en triatomínicos</u>	13
<u>Efectos de los parásitos sobre los hospedadores</u>	15
<u>Efectos de <i>Trypanosoma cruzi</i> sobre triatomínicos</u>	18
OBJETIVOS	22
HIPÓTESIS.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
<u>Material Biológico</u>	23
<u>Procedimiento experimental</u>	23
<u>Análisis estadísticos</u>	28
RESULTADOS	30
<u>Variables antes de la alimentación</u>	30
<u>Variables durante la alimentación</u>	32
<u>Variables post-alimentación</u>	33
DISCUSIÓN	45
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXO.....	65

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es producida por *Trypanosoma cruzi* y su principal modo de transmisión es a través de las deyecciones de insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), las cuales se liberan principalmente cuando los insectos se alimentan del hospedador mamífero. Considerando el modo de transmisión, llamativamente pocos estudios evaluaron el efecto del *T. cruzi* sobre los patrones de alimentación y de excreción/defecación de los triatominos y ninguno sobre *Triatoma infestans*, el principal vector en el Cono Sur de América. Así, el objetivo de este trabajo fue estudiar por primera vez el efecto de la infección con *T. cruzi* sobre la alimentación y la excreción/defecación de *T. infestans*. Se trabajó con dos grupos experimentales: insectos infectados con *T. cruzi* e insectos no infectados. La infección se realizó en el 3er estadio ninfal y al llegar al quinto estadio ninfal se las alimentó sobre palomas para describir los patrones de alimentación y de excreción/defecación. Las diferentes variables analizadas fueron determinadas durante la alimentación y durante la siguiente hora posterior a la ingesta. Los resultados mostraron que el patrón de alimentación no difirió entre ambos grupos experimentales. Sin embargo, los insectos infectados comenzaron a defecar antes, defecaron en mayor cantidad y mostraron una mayor proporción de individuos que defecaron en relación con los insectos no infectados durante la primera hora post-alimentación. Estas diferencias fueron observadas en tiempos tan cercanos al fin de la alimentación como 5 y 10 min luego de la misma y determinaron que los insectos infectados presentarían índices de defecación mayores que los no infectados a esos mismos tiempos. Adicionalmente, los individuos parasitados desarrollaron mayor tamaño corporal y estado nutricional que los no parasitados durante el tiempo transcurrido desde la infección hasta la determinación de los patrones antes mencionados. Este es el primer trabajo que demuestra el efecto de *T. cruzi* sobre el patrón de excreción/defecación en *T. infestans*. Este efecto se manifestó en un sentido tal que aumentaría la probabilidad de contacto entre las heces infectivas y el hospedador mamífero, es decir, que aumentaría la probabilidad de transmisión del propio parásito. En términos adaptativos o de causa distales, la manipulación adaptativa del hospedador por parte del parásito emerge como la hipótesis con mayor sustento.

Palabras claves: *Triatoma infestans*, *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, alimentación, defecación, excreción, competencia vectorial, manipulación adaptativa.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Chagas

La Tripanosomiasis americana, más conocida comúnmente como enfermedad de Chagas, se encuentra principalmente en zonas endémicas de 21 países de América Latina. En las últimas décadas, debido a la gran movilidad poblacional humana a nivel mundial, se han reportado en forma creciente casos de la enfermedad en otros países no endémicos, como Estados Unidos, Canadá y en algunos países europeos, modificando las características epidemiológicas de la enfermedad (Organización Mundial de la Salud, 2017; Sanmartino et al., 2015). Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud señalan que, a nivel mundial, existen entre 6 y 7 millones de personas que padecen la enfermedad y en América aproximadamente 70 millones de personas se encuentran en riesgo de contraerla (Organización Panamericana de la Salud, 2017; OMS, 2017). En Argentina, se estima que existen al menos 1,5 millones de personas infectadas y más de 7 millones de personas con riesgo de infección (Ministerio de Salud de la Nación, 2018). Esta enfermedad es considerada una problemática compleja ya que presenta factores de riesgos epidemiológicos asociados con la pobreza y con las malas condiciones de vivienda, principalmente en las áreas rurales de Latinoamérica, siendo múltiples los factores socio-ambientales que exponen a millones de personas a la infección (Guhl, 2009; Morillo, et al., 2015; Bern, 2015; Flores-Ferrer et al., 2017).

Esta enfermedad potencialmente mortal es causada en seres humanos y en otros mamíferos por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Este organismo pertenece a la familia Trypanosomatidae y se caracteriza por la presencia de un solo flagelo y un kinetoplasto (Souza, 1999). La principal vía de transmisión es a través de las heces y orina de insectos hematófagos infectados pertenecientes a la subfamilia Triatominae (Heteroptera: Reduviidae), conocidos comúnmente en Argentina como vinchucas (Schofield, 1994). Sin embargo, existen otros mecanismos de transmisión menos frecuentes, como la transmisión a través de transfusión de sangre infectada, a través del trasplante de órganos proveniente de una persona infectada, la transmisión desde una madre infectada a su hijo durante el embarazo o el parto, accidentes de laboratorio o por consumo de alimentos contaminados con *T. cruzi* (OMS, 2017).

La enfermedad de Chagas se presenta en dos etapas o fases clínicas: la fase aguda y la fase crónica. La fase aguda comienza luego de 10 días de incubación y es generalmente asintomática o presenta síntomas leves como dolor de cabeza, fiebre leve o malestar general (Storino et al., 2003). Esta fase se caracteriza por una alta parasitemia y se diagnóstica mediante métodos parasitológicos o serológicos. Una vez que la parasitemia baja a niveles indetectables y desaparecen los síntomas generales (entre 4 y 8 semanas de la infección) comienza la fase crónica. En esta fase los parásitos se encuentran mayormente dentro de las células del tejido muscular cardíaco y liso y/o del tejido nervioso. Debido a la proliferación intracelular del parásito, la fase crónica puede llevar a lesiones debilitantes en órganos vitales como el corazón y diferentes tramos del sistema digestivo que pueden ocasionar la muerte (Bern, 2015).

Hasta el momento existen dos medicamentos que se utilizan en el tratamiento de la enfermedad de Chagas: el Benznidazol o el Nifurtimox. Estos presentan la mayor eficacia terapéutica cuando son administrados durante la fase aguda de la enfermedad, especialmente en menores de 15 años. En los casos crónicos, la medicación sólo permite retrasar el desarrollo de la enfermedad y se requiere de un tratamiento especializado para las lesiones orgánicas (Organización Panamericana de la Salud, 2016). Como no existe una vacuna contra la enfermedad de Chagas, su control se basa en diferentes modos de prevenir el contacto entre las personas y el parásito como el rociado de las casas y sus alrededores con insecticidas para eliminar el vector; la mejora de las viviendas para prevenir la infestación por el vector; medidas preventivas personales empleando mosquiteros; buenas prácticas higiénicas en la preparación, transporte, almacenamiento y consumo de los alimentos; análisis en recién nacidos de las madres infectadas (para diagnosticar y tratar tempranamente el problema); el cribado de la sangre, órganos, tejidos o células donados y en los receptores de estos (OMS, 2017). Entre estos métodos, el control vectorial mediante el uso de insecticidas ha sido y es una herramienta fundamental e imprescindible para disminuir el avance de la enfermedad (Zerba, 1999; OMS, 2017).

Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida del agente etiológico de la enfermedad de Chagas presenta diferentes estadios morfológicos de acuerdo al momento del desarrollo y el hospedador donde se

encuentre. El desarrollo del parásito transcurre en dos hospedadores, el mamífero y el insecto vector, y en cada uno de ellos se desarrollan los diferentes estadios que van a permitir su replicación y su transmisión de un hospedador al otro. Su ciclo de vida incluye tres formas principales: amastigotas, epimastigotas y tripomastigotas (Fig. 1). La primera corresponde a células esféricas, sin flagelo visible, que se localizan dentro de células de mamíferos donde se replican. Los epimastigotas son alargados, flagelados y presentan el kinetoplasto anterior al núcleo; son extracelulares y se localizan únicamente dentro del tracto digestivo de los triatomíneos donde se replican. Por último, los tripomastigotas también presentan un cuerpo alargado y flagelo pero, a diferencia de los epimastigotas, el kinetoplasto se localiza posterior al núcleo, se encuentran extracelularmente en el tracto digestivo del insecto y en diferentes tejidos en el mamífero, siendo una forma no replicativa (Kollien & Schaub, 2000).

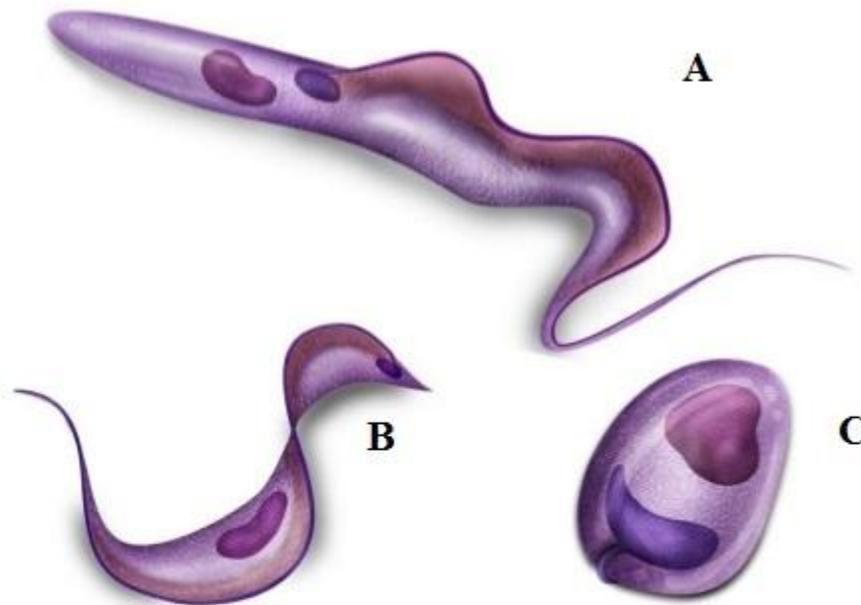


Fig.1: Formas principales de *Trypanosoma cruzi*, epimastigota (A), tripomastigota (B), amastigota (C)
(Consultado 2 de Mayo 2018 de <https://www.pinterest.es/pin/440086194812061375/?lp=true>).

El insecto vector nace libre de parásito y se infecta al ingerir sangre de un hospedador infectado. Al alimentarse de un hospedador infectado, los tripomastigotas infectantes del torrente sanguíneo son transmitidos al insecto conjuntamente con la sangre ingerida. En el lumen del tracto digestivo del vector, los tripomastigotas se transforman en epimastigotas replicativos, que constituirán la forma dominante en la región media de intestino. Tras la replicación en el intestino medio, los epimastigotas pasan al recto donde se transforman en

tripomastigotas metacíclicos, por medio de un proceso que se denomina metacicloogénesis (Schaub & Lösch, 1988; Kollien & Schaub, 2000). Los tripomastigotas metacíclicos constituyen la forma infectante para el mamífero. En los estadios flagelados (epimastigota y tripomastigota), el flagelo además de utilizarse para el movimiento cumple una segunda función que es la adhesión a la pared intestinal del insecto. La adhesión de los tripomastigotas a la pared del intestino es fundamental en la metacicloogénesis (Souza, 1999). Durante la excreción/deyecciones del insecto, por acción de arrastre de la orina o de las heces, los tripomastigotas metacíclicos y los epimastigotas presentes en la zona del recto son liberados (Schaub & Lösch, 1988; Kollien & Schaub, 2000). El proceso de excreción/defecación en los triatominos puede ocurrir, entre otros momentos, durante o inmediatamente después de la alimentación sobre el hospedador mamífero. En esta situación, el parásito liberado puede ingresar al interior del mamífero a través de escoriaciones en la piel o a través de las mucosas. Una vez en el torrente sanguíneo del mamífero los tripomastigotas metacíclicos ingresan a las células de distintos tejidos, donde se transforman en la forma amastigotas y comienzan a replicarse por fisión binaria. Tras la replicación, los nuevos amastigotas se transforman en tripomastigotas, que luego lisan las células y emergen hacia el torrente sanguíneo nuevamente. La liberación de tripomastigotas a la circulación corresponde a la fase aguda de la enfermedad. Los parásitos circulantes pueden dirigirse a otros tejidos, ingresar en nuevas células, transformarse en amastigotas y replicarse nuevamente. Los tripomastigotas que circulan en sangre se corresponde con la forma infectante para el vector. Si un vector sano se alimenta del hospedador infectado, el ciclo vuelve a comenzar (Schaub & Lösch, 1988; Kollien & Schaub, 2000). En la Figura 2 se esquematiza el ciclo de vida del parásito.

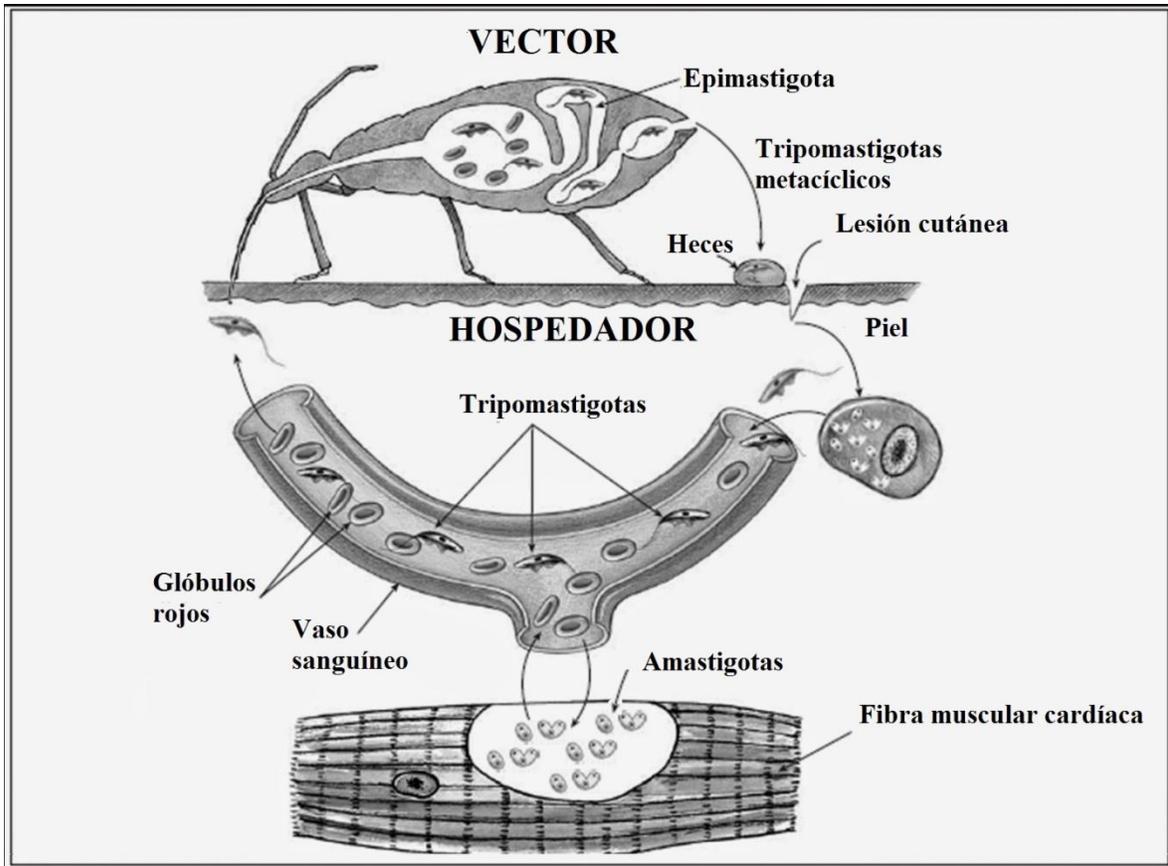


Fig. 2: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (Consultado 2 el Mayo 2018 de <http://biologiaeparasitas.blogspot.com/2014/05/parasitismo-termos-agente-etiologico.html>)

Los triatominos y *Triatoma infestans*

Los triatominos son insectos clasificados como una subfamilia dentro de Reduviidae pertenecientes al orden Hemiptera. Son hematófagos obligados tanto en estado ninfal como en el estado adulto y obtienen su alimento de un amplio rango de animales vertebrados. Presentan desarrollo hemimetábolo y son descriptos como estrategias k, adaptados a medios estables alcanzando altas densidades poblacionales de tamaño similar año a año. El desarrollo ontogenético comprende tres estados: huevo, cinco estadios inmaduros o ninfales y adulto (Fig. 3). Al menos una ingesta de sangre a repleción es necesaria en cada uno de sus 5 estadios ninfales para completar su desarrollo. El tiempo que transcurre desde el estado huevo hasta que el insecto muda al estado adulto varía según la especie y las condiciones ambientales a la que se encuentren expuesta. Las hembras pueden copular varias veces y retener el esperma por un largo periodo de tiempo depositando entre 100 a 600 huevos a lo largo de su vida adulta

(Carcavallo & Martínez, 1972). La ingestión de sangre es determinante para la muda entre los diferentes estadios y para la producción de huevos y la oviposición (Schofield, 1994).

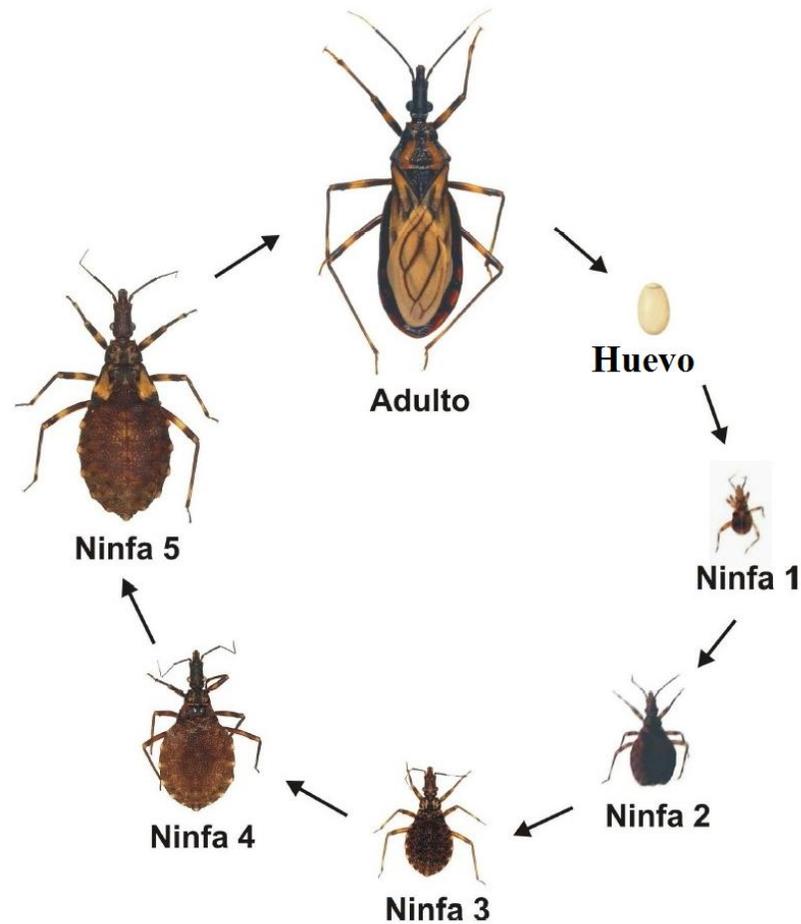


Fig. 3: Ciclo de vida de triatominos (Consultado 2 de Mayo 2018 de <https://www.pinterest.es/pin/47780446019792253/?lp=true>).

La subfamilia Triatominae contiene alrededor de 140 especies agrupadas en 5 tribus (Triatomini, Rhodniini, Alberproseniini, Bolboderini y Cavernicolini) y en 15-17 géneros que se encuentran principalmente en América en diferentes ecosistemas de zonas tropicales y subtropicales entre los 46°N y los 46°S (Galvão et al., 2003; Schofield & Galvão, 2009). Si bien todas las especies son potencialmente capaces de transmitir el *T. cruzi*, desde el punto de vista epidemiológico no todas son igualmente importantes. La importancia epidemiológica de los triatominos como vectores depende de características ecológicas, fisiológicas y comportamentales que determinan su capacidad vectorial (ver abajo). Entre estas características se encuentran el tipo de hábitat, la preferencia de hospedador, el grado de

antropofilia, el tiempo de alimentación, el tiempo entre la alimentación y la defecación/excreción y la capacidad de dispersión (Lent & Wygodzinsky, 1979). Según su importancia epidemiológica las especies se clasifican en primarias o secundarias (Dias et al., 1998). Las especies primarias se caracterizan por colonizar las viviendas humanas usualmente en altas densidades y ser antropofílicas presentando además alta infección natural con *T. cruzi*. Las especies secundarias viven en ambientes silvestres o peridomiciliarios donde se alimentan de aves, mamíferos o reptiles y en consecuencia presentan menor relevancia epidemiológica (Zeledón, 1983; Dias et al., 1998; Schofield & Galvão, 2009; Flores-Ferrer et al., 2017).

En Latinoamérica, los vectores de mayor importancia epidemiológica son *Triatoma infestans* en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Uruguay y Perú; *Rhodnius prolixus* en Colombia, Venezuela y Centroamérica; *Triatoma dimidiata* en Ecuador y América Central; y *Rhodnius pallescens* en Panamá (Galvão et al., 2003; OPS, 2016). Debido a su gran adaptación domiciliar y su amplia distribución geográfica *T. infestans* es el vector de mayor importancia en Argentina (Fig. 4). *T. infestans* presenta un desarrollo embrionario que varía entre 15-17 días bajo condiciones favorables de temperatura y humedad (25-27°C y 50-70 % HR) (Picollo, 1999). A medida que avanza el desarrollo embrionario, los huevos van cambiando de coloración, pasando sucesivamente por un color amarillento, anaranjado, rojo hasta llegar finalmente a color violeta cuando está a punto de eclosionar (Picollo, 1999). El desarrollo ninfal, de ninfa de 1er estadio a adulto, tiene una duración entre 6-7 meses en condiciones ambientales óptimas y la vida adulta es de entre 3-12 meses según las condiciones ambientales (Schaub, 1988; Silva & Silva, 1989). Además de esta especie existen otras que se encuentran en el ambiente silvestre desde donde eventualmente invaden las viviendas y pueden presentar un rol significativo en la transmisión del *T. cruzi* como vectores secundarios, principalmente una vez que el vector principal ha sido eliminado por las acciones de control (Zeledón & Rabinovich, 1981; Vazquez-Prokopec et al., 2005; Giraldez et al., 2009). Entre estas especies, en Argentina se destacan *T. guasayana*, *T. sordida*, *T. garciabesi*, *T. platensis* y *T. patagonica* (Canale, 2005).

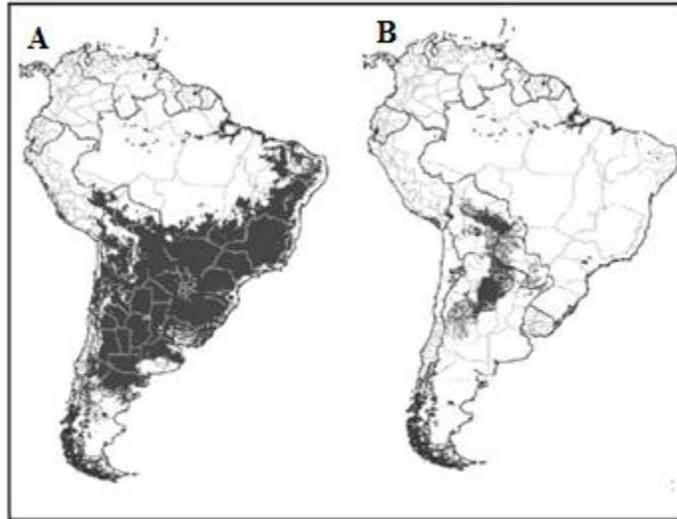


Fig.4: Distribución geográfica de *Triatoma infestans*, máxima distribución estimada en ausencia de medidas de control (A) y distribución estimada a 2006 (B). Extraído de Schofield et al., 2006.

Competencia vectorial en triatominos

Como se mencionó anteriormente la importancia epidemiológica de los vectores depende de su capacidad vectorial. La **capacidad vectorial** describe la relación dinámica entre vectores de agentes infecciosos y hospedadores vertebrados combinando factores intrínsecos y extrínsecos de los vectores. Dentro de los primeros encontramos atributos fisiológicos que determinan la susceptibilidad de infección, permisividad para el desarrollo del patógeno y su habilidad de transmitir el patógeno. Los factores extrínsecos se refieren a características ecológicas y comportamentales de los vectores como longevidad, preferencia de hospedador y abundancia (Eldridge & Edman, 2012). Los factores intrínsecos, es decir, habilidad fisiológica de un vector de ser infectado, desarrollar y posteriormente transmitir un agente patógeno constituye la **competencia vectorial** (Quintero Gil et al., 2010; Eldridge & Edman, 2012; OMS, 2017).

Considerando el modo de transmisión del *T. cruzi*, el comportamiento de alimentación y el patrón de defecación de los triatominos resultan determinantes en su competencia vectorial. Por lo tanto, si bien todas las especies de triatominos son potenciales vectores, las más competentes serán aquellas que eliminan deyecciones infectantes durante o inmediatamente después del evento de alimentación cuando aún se encuentran sobre el

mamífero. Según Zeledón et al. (1977) si la deyecciones ocurren durante los primeros 10 min tras la alimentación existe una alta probabilidad de transmitir *T. cruzi* al hospedador.

Diferentes estudios han abordado la competencia vectorial en triatominos, tanto desde el comportamiento alimenticio (e.g. tiempo de alimentación, volumen de ingesta, número de intentos de alimentación, etc.) como del patrón de excreción/defecación (e.g. tiempo de la primera defecación, número y frecuencia de las deyecciones, etc.) (Wood, 1951; Dias, 1956; Zeledón et al., 1977; Kirk & Schofield, 1987; Trumper & Gorla, 1991; Diotaiuti et al., 1995; Crocco & Catalá, 1996; Braga & Lima, 1999; Nattero et al., 2002; Almeida et al., 2003; Rodríguez et al., 2004; Reisenman et al., 2011; Lobbia et al., 2018). Entre los diferentes estadios de desarrollo las ninfas de quinto estadio son más eficientes como vectores que los adultos y entre estos, las hembras son más competentes con respecto a los machos (Dias, 1956; Zeledón et al., 1977). Con respecto al comportamiento alimenticio, una mayor ingesta de sangre aumenta el volumen y la frecuencia de heces mientras que disminuye el tiempo hasta la primera defecación (Trumper & Gorla, 1991; Crocco & Catalá, 1996). También, a mayor ingesta mayor tiempo de contacto entre el hospedador y el vector, lo que aumenta la probabilidad de deyecciones sobre el hospedador. Por otra parte, a mayor ingesta de sangre mayor probabilidad de ingerir parásitos. Sin embargo, si se prolonga el periodo de hambruna más se tarda en producirse la primera gota fecal, consecuencia que también puede observarse a mayor peso inicial del insecto (Trumper & Gorla, 1991). Existen especies más agresivas al momento de iniciar la alimentación mientras que otras demoran más, aunque este parámetro depende de las condiciones de temperatura y humedad (Wood, 1951; Martínez-Ibarra et al., 2008). Aquellos vectores que completan su alimentación en menor tiempo y/o presentan una mayor tendencia a interrumpir la ingesta por movimientos del hospedador disminuyen las probabilidades de ser detectado y ser predados. Además, estos podrían ser considerados más competentes porque aumentan el número de eventos de contactos entre vector y hospedador. Sin embargo, esto resulta controversial ya que interrumpir la alimentación también reduciría las posibilidades de emitir deyecciones sobre el hospedador en un determinado evento de alimentación (Dias, 1956; Zeledón et al., 1977).

En diferentes trabajos se han comparado los patrones de alimentación y de defecación/excreción de *T. infestans* con otras especies de triatominos, como por ejemplo *R. prolixus*, *T. sordida* y *Pastrongilus megistus*, y se han observado características que sitúan a *T.*

infestans como un vector competente (Dias, 1956; Zeledón et al., 1977). Dentro de estas características se pueden mencionar: tiempos de alimentación medios que varían entre 15,5 min a 25 min, alta probabilidad de excreción dentro de los primeros 10 min post-alimentación y una alta probabilidad de que los insectos produzcan al menos una deyección durante la primera hora post-alimentación (Dias, 1956; Zeledón et al., 1977; Trumper & Gorla, 1991). Si además de estas características se tienen en cuenta otros atributos de *T. infestans* como altas densidades poblacionales, el tipo de hábitat, la adaptación a la variabilidad climática, la preferencia de hospedador, el grado de antropofilia y la extensa área de distribución se entiende su gran importancia como vector de la enfermedad de Chagas (Zeledón et al., 1977; Lent & Wygodzinsky, 1979).

Efectos de los parásitos sobre los hospedadores

Efectos necesarios y adaptativos de la infección. El **parasitismo** es una asociación biológica entre dos organismos, el hospedador y el parásito, estableciendo una relación donde cada uno de ellos desempeña funciones activas. Una condición importante del parasitismo es que el hospedador resulta perjudicado al establecerse la asociación, siendo los daños más o menos perceptibles de acuerdo al sistema parásito-hospedador que se considere (Berenguer, 2007; Rodríguez-Diego et al., 2014). Tras la infección de un parásito se pueden observar diferentes alteraciones en la fisiología o el comportamiento del hospedador (Libersat et al., 2009). Una vez establecida la asociación parásito-hospedador en términos evolutivos, las alteraciones que se observan en el fenotipo del hospedador luego de ser infectado por el parásito pueden ser consecuencia de diferentes escenarios adaptativos. Uno de ellos corresponde a alteraciones que benefician al parásito en términos adaptativos y es clásicamente interpretado como *manipulación adaptativa* del hospedador por parte del parásito. Esta interpretación supone que la alteración está asociada a la variación genética del parásito. Por ejemplo, el parásito *Toxoplasma gondii*, que se transmite del ratón (el hospedador intermedio) al gato (el hospedador definitivo), revierte en el ratón infectado la aversión al olor del gato, en atracción, lo que aumentaría la tasa de transmisión del parásito (Poulin, 2010). Otro escenario corresponde a cambios que afectan negativamente al parásito o disminuyen los efectos negativos de la infección, es decir que benefician adaptativamente al hospedador, y esto representaría una *respuesta compensatoria adaptativa* por parte del

hospedador. Esta interpretación supone que la alteración está asociada a la variación genética del hospedador. La conducta de descanso o el aumento en la temperatura corporal son adaptaciones de los hospedadores que permiten hacer frente a la infección (Poulin, 2010; Gefaell Borrás, 2016). Otro escenario teórico corresponde a alteraciones vinculadas con variación genética del parásito o el hospedador pero adaptativamente neutras para las cuáles su ocurrencia actual es consecuencia del azar. Por último, la alteración puede ser una consecuencia necesaria de la infección (en este contexto "necesario" indica que la modificación no es consecuencia de un proceso adaptativo) ya sea como efecto patológico o un subproducto de la patología. Por ejemplo, la bacteria *Salmonella typhimurium* causa náuseas, vómitos y diarreas en las personas a las que parasita y estas alteraciones son consideradas un subproducto del daño causado en el sistema digestivo por la presencia de la bacteria (Poulin, 2010; Gefaell Borrás, 2016).

Manipulación adaptativa. La manipulación adaptativa puede definirse como cualquier alteración en el fenotipo del hospedador inducida por un parásito que aumenta las probabilidades de supervivencia, reproducción y transmisión de este último (Poulin, 2010; Gefaell Borrás, 2016; Heil, 2016). El término "manipulación" alude a que la alteración fenotípica del hospedador está determinada en parte por los genes del parásito. Esta manipulación puede darse de dos formas: directa o indirecta. La primera está asociada a alteraciones del sistema nervioso del hospedador mientras que la segunda está asociada a modificaciones del sistema inmune, endocrino o procesos metabólicos del hospedador (Líbbersat et al., 2009). Alteraciones específicas en el comportamiento del hospedador infectado que facilitan la dispersión/transmisión del parásito, y por lo tanto permite completar su ciclo vital, son el tipo de manipulación más evidente y también más descripta (Poulin, 2010). Así como la construcción de un dique para un castor o la de un hormiguero para las hormigas son importantes para su supervivencia y reproducción, la modificación del cuerpo del hospedador por parte del parásito podría aumentar el éxito reproductivo del parásito. La modificación del ambiente externo por parte de un organismo y que está bajo su control genético se lo considera el fenotipo extendido del individuo (Gefaell Borrás, 2016). En este contexto, las alteraciones del hospedador manipuladas por parte del parásito son interpretadas como el fenotipo extendido del parásito (Gefaell Borrás, 2016; Heil, 2016). Este fenómeno ha sido descrito para todos los principales grupos taxonómicos de parásitos, que incluye las

clases platelmintos, acantocéfalos, nematodos, nematomorfos y artrópodos, así como en virus, bacterias, hongos y en protistas. En algunos grupos se encuentra ampliamente extendido mientras que en otros ha evolucionado independientemente en distintas familias filogenéticamente distantes unas de otras (Poulin, 2010). La convergencia evolutiva, y su explicación como el resultado de la adaptación a presiones de selección similares, sería la causa de este patrón filogenético. En este sentido, los eventos de transmisión de las formas infectantes entre hospedadores, donde ocurren masivas pérdidas de parásitos, generan una intensa presión de selección sobre los parásitos. Así, similares modos y rutas de transmisión probablemente hayan promovido adaptaciones similares que se distribuyen en diferentes linajes. La manipulación adaptativa sería una de estas adaptaciones que aumentaría la tasa de transmisión durante aquellos eventos (Poulin, 2010). Desde el punto de vista experimental, el criterio más importante para considerar un cambio en la conducta u otro rasgo fenotípico de un hospedador como manipulación por el parásito es la demostración empírica de que el cambio aumenta el fitness del parásito, principalmente mostrando que aumenta la probabilidad de transmisión (Gefael Borrás, 2016).

Dentro de los casos más dramáticos de manipulación adaptativa se encuentran aquellos que tienen lugar en insectos parasitados. Por ejemplo, un hongo parasítico del género *Ophiocordyceps* puede modificar el comportamiento del insecto hospedador haciéndolo subir hasta la punta de las hojas de los árboles donde las condiciones son mejores para la dispersión por aire de las esporas (Maitland, 1994; Andersen et al., 2009; Pontoppidan et al., 2009). Otro ejemplo lo constituye el nematodo parásito *Myrmeconema neotropicum* en cuyo ciclo intervienen hormigas y aves. El ciclo comienza cuando las hormigas recogen heces de aves infectadas con el parásito y alimentan a las larvas con ellas, ingresando así el parásito a las hormigas. Cuando las larvas de las hormigas mudan a adultos, el abdomen cambia de coloración de negro a rojo y el parásito las induce a subir hasta la punta de un árbol y a exponer sus abdómenes rojos que son confundidos por las aves con la frutas de estos árboles que son del mismo color y son su alimento (Gefael Borrás, 2016). Por sus implicancias epidemiológicas, resultan de particular interés las modificaciones en la fisiología o el comportamiento de insectos hematófagos vectores de enfermedades que pueden interpretarse como manipulación adaptativa por parte de los patógenos que transmiten. Los parásitos que inducen alteraciones en el comportamiento de vectores pueden ser virus, protistas (como

Trypanosoma spp y *Plasmodium* spp) y nematodos. En diferentes estudios se han demostrado cambios en el comportamiento de alimentación del vector por parte del parásito que permitiría aumentar su tasa de transmisión entre sus hospedadores. Por ejemplo, en el sistema *Plasmodium falciparum* (parásito causante de la malaria) y el mosquito vector *Anopheles gambiae*, las hembras infectadas mostraron una mayor tendencia a picar a más personas por noche que las hembras no infectadas (Koella et al., 1998) y presentaron un sistema olfativo más sensibles a olores humanos que las hembras no infectadas (Smallengange et al., 2013). La infección con *Leishmania major* en el flebótomo vector, *Lutzomyia longipalpis*, causó un aumento en la tasa de intentos de alimentación y promovió la alimentación en múltiples hospedadores (Rogers & Bates, 2007). Además, se demostró que existe una correlación entre los cambios de comportamiento del vector con los estados de desarrollo del parásito observándose que el vector se alimenta sólo cuando en su interior se ha desarrollado el estadio infectante del parásito (Beach et al., 1985; Rogers & Bates, 2007). El virus del dengue modificó el comportamiento del mosquito vector *Aedes aegypti* donde se observó un incremento de hasta el 50% de la actividad motora en hembras infectadas comparadas con las no infectadas (Lima-Camara et al., 2011).

Efectos de *Trypanosoma cruzi* sobre triatominos

Se han llevado a cabo múltiples estudios sobre la interacción entre *T. cruzi* y triatominos. La mayoría de ellos abordaron las posibles alteraciones del patógeno sobre el vector desde una perspectiva patológica. Los resultados obtenidos en muchos de esos estudios han llevado a establecer la convención de que *T. cruzi* no es patogénico a sus insectos vectores (Fellet et al., 2014; Elliot et al., 2015; Marlière et al., 2015). Schaub (2009) propuso el término sub-patogénico para esta especie y otros tripanosmátidos que no evidencian efectos patológicos bajo condiciones óptimas, pero éstos pueden ocurrir si un factor estresante sinérgico está presente. Sin embargo, en los últimos años se han descrito los efectos de *T. cruzi* sobre la supervivencia, el desarrollo ontogenético, el comportamiento y diferentes procesos fisiológicos en diferentes especies de triatominos (Schaub, 1992, 2006, 2009; Eichler & Schaub, 2002; Vallejo et al., 2009; Oliveira et al., 2010; Fellet et al., 2014; Elliot et al., 2015; Marlière et al., 2015). Por ejemplo, las ninfas de 4to y 5to estadio de *T. infestans* no infectadas sobrevivieron hasta un año sin ingerir sangre, pero en las ninfas infectadas esta

resistencia disminuyó en un 15% (Schaub & Lössch, 1989). Estudios realizados con *Mepraia spinolai* y *R. prolixus* demostraron una reducción en la supervivencia de los insectos infectados, en la última especie de manera dependiente de la temperatura (Botto-Mahan 2009; Elliot et al., 2015). *R. prolixus*, *T. brasiliensis* y *M. spinolai* infectados mostraron una prolongación en el desarrollo ontogenético, tanto en algunos estadios como en el desarrollo total (Botto-Mahan et al. 2008, Botto-Mahan 2009; Oliveira et al., 2010, Elliot et al., 2015). Parejas infectadas de *R. prolixus* y *T. infestans* mostraron una reducción en la fecundidad y la fertilidad, en el caso de *R. prolixus* de manera dependiente de la temperatura (Schaub, 1988, 1992; Fellet et al., 2014). Las hembras de *M. spinolai* infectadas desarrollaron ovarios con menor peso que las hembras no infectadas y diferentes estadios infectados de la misma especie mostraron menor peso corporal, menor longitud corporal y menor ancho del abdomen que insectos no infectados (Botto-Mahan et al., 2008; Botto-Mahan, 2009). *R. prolixus* infectados mostraron una disminución de la actividad locomotora durante determinados períodos de la escotofase (Marlière et al., 2015). Existe evidencia que sugiere que *T. cruzi* provoca una reducción en la respuesta inmune celular y humoral en *T. infestans* y modifica las concentraciones hemolinfáticas de algunos aminoácidos en *R. prolixus* (Schaub, 1992; 2009). En *R. robustus*, *R. prolixus* y *M. spinolai* infectados se observó un mayor número de intentos de ingesta comparado con insectos no infectados (Schaub, 1992; Botto-Mahan et al., 2006). *M. spinolai* infectados detectaron más rápido al hospedador, ingirieron menos sangre durante los estadios inmaduros y comenzaron a defecar antes que los insectos no infectados (Botto-Mahan et al., 2006; Botto-Mahan et al., 2008), sin embargo, otro estudio sobre la misma especie reportó que el parásito no afectó la cantidad de sangre ingerida por el insecto (Botto-Mahan, 2009).

Estos resultados han sido interpretados de diferentes maneras en el contexto de los tipos de alteraciones como explicaciones adaptativas o no de los efectos observados. En general, la discusión de los diferentes trabajos sigue la siguiente lógica: los autores identifican o deducen los beneficios para el parásito o el hospedador de la modificación descrita y, en consecuencia, sugieren que la ocurrencia de la modificación es consecuencia del proceso selectivo correspondiente: manipulación adaptativa (si el beneficiado es el parásito) o respuesta compensatoria adaptativa (si el beneficiado es el hospedador). Paralelamente, los autores sugieren que la existencia de tal modificación podría ser una consecuencia necesaria

de la infección, generalmente descrita como efecto colateral, efecto patológico o subproducto de la infección. Una vez planteados los escenarios teóricos posibles, en algunos casos los autores proponen uno de ellos como el más probable en función trabajos previos y sus propios resultados. Así, Botto-Mahan et al. (2008) y Botto-Mahan (2009) interpretaron el menor peso y tamaño de las gónadas y del adulto, la menor sangre ingerida, el mayor tiempo de desarrollo ontogenético de *M. spinolai* infectados como efecto patológico del parásito. El mecanismo subyacente sería que los insectos infectados tienen menores reservas energéticas debido a la competencia por los nutrientes de la sangre ingerida entre el parásito y el insecto. Sin embargo, también sugieren que el insecto podría relocalizar reservas energéticas que favorece su supervivencia sobre el crecimiento somático. El autor finalmente se inclina por el efecto colateral. Según Elliot et al. 2015, el aumento de mortalidad de *R. prolixus* en el rango de temperatura donde *T. cruzi* muestra mayor crecimiento poblacional indicaría una estrategia adaptativa por la cual el parásito alcanzaría altas densidades poblacionales en el intestino del vector lo que aumentaría la probabilidad de transmisión. Pero como también aumentaría la probabilidad de matar al vector, el aumento poblacional de parásitos podría tratarse de un efecto patológico. Por otro lado, el retraso en la muda beneficiaría al parásito porque permitiría el desarrollo de la forma infectante en el momento que el vector se alimente por lo que la manipulación adaptativa es fácilmente deducida. Pero nuevamente, la competencia entre el parásito y el vector por nutrientes provenientes de la sangre ingerida podría afectar el desarrollo del vector y el efecto colateral sería una interpretación alternativa. Fellet et al. (2014) interpretaron la disminución de la fecundidad y la fertilidad dependiente de la temperatura en *R. prolixus* como a) efectos colaterales de la infección debido a la competencia directa por recursos energéticos entre el parásito y el vector o a la inversión de recursos energéticos por el vector en la respuesta inmune y b) manipulación del parásito por la cual disminuye en el vector la inversión en reproducción dejando recursos disponibles al parásito. Según Marlière et al. (2015), la disminución de la actividad locomotora en *R. prolixus* infectados podría entenderse como una respuesta adaptativa compensatoria del vector que le permitiría preservar su fitness a partir de la energía “ahorrada” disponible pero, por el mismo motivo de energía no utilizada por el vector, también sugirieron el beneficio del parásito al aumentar la energía disponible para su desarrollo. Botto-Mahan et al. (2006) también interpretaron la mayor tasa de intentos de alimentación, la mayor velocidad de detección del

hospedador y la mayor rapidez en comenzar a defecar como a) consecuencia del ayuno por la competencia por nutrientes entre el parásito y el vector (el escenario apoyado por los autores) y b) manipulación adaptativa por el parásito al aumentar la probabilidad de transmisión de parásito.

Entre la gran cantidad de procesos fisiológicos de los triatomíneos que pueden modificarse por la presencia del *T. cruzi* son de especial interés aquellos que determinan la competencia vectorial. En este contexto y considerando el modo de transmisión de *T. cruzi*, resulta de gran relevancia epidemiológica conocer los posibles efectos de la infección con *T. cruzi* sobre los patrones de alimentación y excreción/defecación de los triatomíneos y la relación funcional y temporal entre ellos. Si bien, como se comentó antes muchos autores han estudiado los patrones de alimentación y de defecación/excreción en muchas especies de triatomíneos (Wood 1951; Zeledón et al., 1977; Trumper y Gorla, 1991; Crocco & Catalá, 1996; Nattero et al., 2002; dos Santos et al., 2006; Rodríguez et al., 2008; Reisenman et al., 2011), sólo dos trabajos estudiaron de manera acoplada estos dos patrones en triatomíneos infectados con tripanosomátidos. Uno de estos trabajos estudió el sistema *R. prolixus-T. cruzi* y mostró que los insectos infectados no difirieron significativamente en el número de intentos de alimentación, tiempo de alimentación, tiempo hasta la primera deyección y número de deyecciones después de la alimentación respecto de insectos no infectados (Takano-Lee & Edman, 2002). El otro trabajo, es el ya comentado de Botto-Mahan et al. (2006), en el cual *M. spinolai* infectados mostraron mayor tasa de intentos de alimentación, mayor velocidad de detección del hospedador y tardaron menos tiempo en producir la primera gota fecal.

Es en este contexto de interacción del parásito y el hospedador donde surgen las preguntas que dirigen el presente plan de trabajo: ¿La infección con *T. cruzi* afecta la alimentación y la defecación/excreción de *T. infestans*?, si lo hace, ¿favorece la transmisión del parásito? Si, por ejemplo, insectos infectados defecaran más y más próximo a la alimentación que insectos no infectados entonces la competencia vectorial de los primeros estaría incrementada y no sería difícil interpretar esta modificación bajo el concepto de manipulación adaptativa del hospedador por parte del parásito. Para responder estas preguntas el presente trabajo de tesis estudió los patrones de alimentación y excreción/defecación de *T. infestans* con y sin infección con *T. cruzi*.

OBJETIVOS

- 1) Determinar el efecto de la infección con *T. cruzi* sobre el proceso de alimentación en *T. infestans*.
- 2) Determinar el efecto de la infección con *T. cruzi* sobre el proceso de excreción/defecación en *T. infestans*.

HIPÓTESIS

- 1) La infección con *T. cruzi* modifica los patrones de alimentación y/o excreción/defecación de *T. infestans* de manera que favorece la transmisión del parásito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

-Insectos:

Se trabajó con una colonia de segunda generación de laboratorio de *Triatoma infestans* cuyos insectos fundadores fueron recolectados en viviendas del Paraje 25 de Mayo, del departamento Quitilipi, provincia de Chaco, Argentina (26°52'42" S, 60°13'52" W). La colonia fue mantenida en el insectario del Centro de Referencia de Vectores (CeReVe) bajo condiciones ambientales controladas ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, 50-60% HR, fotoperiodo 12:12) y alimentadas cada 15 días en gallinas (*Gallus gallus domesticus* Linné). Para la determinación de los patrones de alimentación y excreción los insectos fueron alimentados en palomas (*Columba livia*).

-Parásitos:

Se trabajó con *Trypanosoma cruzi* cepa Tulahuén, DTU VI (Zingales et al., 2009), mantenidas por transmisiones cíclicas de manera estandarizada por inoculación intraperitoneal en ratones adultos cepa BALB/c.

-Ratones:

Se utilizaron ratones adultos cepa BALB/c mantenidos en el bioterio del CeReVe bajo condiciones ambientales controladas.

Las palomas, las gallinas y los ratones fueron criados y mantenidos de acuerdo a la resolución 1047/2005 del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) sobre el Marco Nacional de Referencia Ética para la Investigación Biomédica en Laboratorios, Granjas y Animales Naturales Recolectados, y la Ley Nacional N° 14346 sobre Bienestar Animal.

Procedimiento experimental

- Infección de los insectos:

Ninfas de 3er estadio, de entre 15 y 20 días post muda, fueron alimentadas con sangre infectada de ratón. Las infecciones se realizaron en grupo de 20-30 individuos por ratón. Para el procedimiento, el ratón se mantuvo con movilidad restringida y las ninfas se alimentaron *ad libitum*. Sólo se utilizaron las ninfas en las que efectivamente se corroboró la alimentación,

para ello las ninfas fueron pesadas antes y después de la alimentación y se realizó un ANOVA a un factor para ambas variables, y se corroboraron los supuestos de homocedasticidad y normalidad, mediante el test de Levene y el test de Shapiro-Wilks modificado, respectivamente (Tabla 1). Luego de la infección de las ninfas, se corroboró el nivel de parasitemia del ratón por medio del recuento de Pizzi, estableciéndose como mínimo 100.000 parásito/ ml para que el proceso de infección sea considerado válido (Pizzi, 1961). Transcurridos 20 días desde la alimentación se evaluó la infección efectiva de cada insecto mediante análisis microscópico de las heces con magnificación 400X. Aquellos insectos que resultaron positivos formaron parte del grupo experimental y los insectos negativos fueron descartados. Para el grupo control se alimentaron ninfas de 3er estadio sobre ratón no infectado y a los 20 días post alimentación se realizó el protocolo de evaluación de la infección por medio de análisis microscópico. De esta manera se conformaron dos grupos experimentales: insectos infectados e insectos no infectados. Luego de la evaluación de infección, los insectos de los dos grupos experimentales fueron alimentados sobre gallina cada quince días y mantenidos en las condiciones estandarizadas de cría hasta que mudaron al quinto estadio ninfal.

Tabla 1. Valores medios y error estándar para el peso antes y después de la alimentación sobre ratones infectados y no infectados con *Trypanosoma cruzi* de ninfas de 3er estadio de *Triatoma infestans* pertenecientes a los dos grupos experimentales.

	Infectadas Media ± EE	No infectadas Media ± EE
n	88	95
Peso inicial (g)	9,80 ± 0,21 (a)	11,10 ± 0,20 (b)
Peso final (g)	30,86 ± 2,06 (a)	26,70 ± 1,10 (a)

n: número de insectos; EE: error estándar; letras distintas muestran diferencias significativas con $P < 0,05$.

- Determinación de los patrones de alimentación y de excreción/defecación

Se determinaron los patrones de alimentación y de excreción/defecación en los dos grupos experimentales: insectos infectados (n=31) y no infectados (n=48). Se utilizaron ninfas de quinto estadio de entre 15 y 20 días, ayunadas desde la muda.

Se siguió el siguiente procedimiento para cada uno de los individuos: cada insecto fue inmovilizado en una cinta de papel para medir su longitud con un calibre. Luego fue pesado con una balanza analítica (Ohaus PA214) precisión +/- 0,001 g., dentro de un recipiente cilíndrico de plástico transparente de 2,75 x 3,78 cm, previamente pesado (tubo 1). Luego de la medición, cada insecto fue colocado en recipiente cilíndrico (de similar dimensión que el tubo 1) que contenía una tira de cartón, la cual le permitió al insecto moverse dentro del tubo durante el proceso de alimentación. Para la alimentación se utilizó una paloma con movimiento restringido la cual fue colocada sobre un dispositivo que mantuvo su superficie ventral expuesta y a 20 cm de la mesada del laboratorio. Sobre la superficie ventral de la paloma fue apoyado el extremo abierto del recipiente cilíndrico permitiendo al insecto acercarse, acceder a la piel de la paloma y alimentarse a repleción. El recipiente con el insecto dentro fue sostenido durante la alimentación con una estructura de alambre (Fig. 5). Durante la alimentación se registraron diferentes variables que determinaron el patrón de alimentación.



Fig.5: Dispositivo para la alimentación de Ninfa 5ta de *Triatoma infestans* sobre paloma.

Concluida la alimentación, que se determinó por el alejamiento del insecto de la paloma, cada individuo fue pesado y rápidamente colocado sobre un papel de filtro circular de

9 cm de diámetro durante una hora. Para evitar que el insecto se escape, se colocó una placa de Petri. Durante el transcurso de una hora se registraron las deyecciones y el tiempo en el que ocurrieron (Fig. 6). Finalizada la hora, el insecto fue pesado por última vez y se midió su longitud. A los insectos correspondientes al grupo de los infectados, se los colocó dentro de un tubo Eppendorf y a los 5 días posteriores a la alimentación se les efectuó un nuevo análisis parasitológico para confirmar su positividad a *T. cruzi*.



Fig.6: Ninfa 5ta de *Triatoma infestans* durante la primer hora post-alimentación, en observación de deyecciones.

Durante el procedimiento experimental se registraron las siguientes variables (Lobbia et al., 2018):

❖ Previo a la alimentación:

- **Li** (mm): la longitud de cada insecto se midió desde el clípeo hasta la punta del abdomen.
- **Pi** (g): peso del insecto antes de la alimentación.
- **Estado nutricional:** $\frac{Pi}{Li}$ (g/mm) (Schofield, 1980).

❖ Durante la alimentación:

- **Tiempo de ataque** (min): es el tiempo que transcurrió desde que se ubicó el insecto en alimentador hasta que apoyó su probóscide sobre la paloma por primera vez.
- **Tiempo total de alimentación** (min): es el tiempo que transcurrió desde que el insecto se ubicó en la paloma hasta que completó su alimentación.
- **Tiempo hasta el comienzo de alimentación** (min): es el tiempo que transcurrió desde que el insecto se lo ubicó en la paloma hasta que ingiere por primera vez.
- **Tiempo real de alimentación (T1)** (min): es el tiempo que transcurrió el insecto ingiriendo sangre.
- **Intentos de alimentación**: número de veces que el insecto apoyó la probóscide sobre la paloma sin ingerir sangre. Se consideró alimentación cuando el insecto mantuvo por más de un minuto apoyada la probóscide en la misma ubicación sobre la paloma.
- **Eventos de alimentación**: número de veces que el insecto apoyó la probóscide sobre la paloma e ingirió sangre.
- **Número de contactos**: es la suma de los eventos de alimentación y los intentos de alimentación.
- **Número de deyecciones durante la alimentación**.
- **Pd** (g): peso de las deyecciones durante la alimentación

❖ **Post-alimentación:**

- **Pf** (g): peso del insecto después de la alimentación.
- **Peso de ingesta (Pal)** (g): peso de la sangre ingerida durante la alimentación (g).
$$Pal = Pf + Pd - Pi$$
- **Ganancia de peso (Gp)**: peso de sangre ingerida relativizado al peso inicial del insecto.
$$Gp = \frac{Pal}{Pi}$$
- **Tasa de alimentación (Ta)** (g/min): peso de sangre ingerida relativizada al tiempo real de alimentación. Representa la cantidad de sangre que ingiere por minuto de alimentación.
$$Ta = \frac{Pal}{T1}$$

- **Tiempo de la primera deyección:** tiempo que transcurrió desde el fin de la alimentación hasta la aparición de la primera gota fecal.
- Número de deyecciones durante la primera hora post-alimentación.
- **Ph (g):** peso del insecto una hora post-alimentación
- Longitud del insecto una hora post-alimentación (mm).
- Peso de las deyecciones totales emitidas durante la primer hora post alimentación (**Pdh**). $Pdh = Pf - Ph(g)$
- Peso de deyecciones relativizado al peso de ingesta (**Pdal**). $Pdal = \frac{Pdh}{Pi}$
- Índice de deyección a los 5 min post-alimentación: acuerdo a Zeledón et al. (1977) modificado.
 $ID: \% \text{ de insectos que defecaron} \times n^{\circ} \text{ medio de deyecciones por insecto} / 100$
- Índice de deyección a los 10 min post-alimentación: calculado de acuerdo a Zeledón et al. (1977).
 $ID: \% \text{ de insectos que defecaron} \times n^{\circ} \text{ medio de deyecciones por insecto} / 100$

Análisis estadísticos

Las variables estado nutricional, **Pi**, **Li**, tiempo de ataque, tiempo hasta comienzo de la alimentación, tiempo total de alimentación, tiempo real de alimentación, intentos de alimentación, eventos de alimentación, número de contactos, peso de ingesta, ganancia de peso, tasa de alimentación, tiempo de la primera deyección, peso de deyecciones, peso de deyecciones relativizado al peso de la ingesta, número acumulado de deyecciones por insecto a los 5, 10 y 60 min post-alimentación fueron analizadas mediante análisis de la varianza de un factor (ANOVA). Además, se comprobaron los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad mediante el test de Levene y el test de Shapiro-Wilks modificado respectivamente. El porcentaje de insectos que defecaron a cada intervalo de 10 min fueron analizados mediante el test de independencia G con corrección de Williams. El número de defecaciones por insecto en cada intervalo de 10 min fue analizado por medio de un ANOVA de dos factores con medidas repetidas en el tiempo como un factor seguido por el test de Tukey cuando comparaciones a posteriori fueron requeridas. En todos los casos las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas si $P < 0,05$. El ANOVA de medidas repetidas se

realizó con el programa STATISTICA (StatSoft. Inc., 2011). El resto de los test fueron realizados con el programa estadístico InfoStat, versión 2008 (Di Rienzo et al., 2008). Los resultados de todos los análisis estadísticos se muestran en el Anexo (Tabla 1, 2 y 3).

RESULTADOS

VARIABLES ANTES DE LA ALIMENTACIÓN

En la Tabla 2 se muestran los valores de las medias y los errores estándar para las variables que describen las condiciones iniciales de los dos grupos estudiados.

Tabla 2. Valores medio y error estándar para las variables iniciales de ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectadas y no infectadas con *Trypanosoma cruzi*.

	Infectadas	No infectadas
	Media ± EE	Media ± EE
n	31	48
Longitud inicial (mm)	16,66 ± 0,12 (a)	16,03 ± 0,11 (b)
Peso inicial(g)	89,74 ± 2,28 (a)	80,26 ± 2,04 (b)
Estado nutricional (g/mm)	5,37 ± 0,11 (a)	5,00 ± 0,11 (b)

n: número de insectos; EE: error estándar; letras distintas muestran diferencias significativas con $P < 0,05$.

En la Fig. 7 se muestra la longitud inicial de las ninfas de 5to estadio de *T. infestans* infectadas y no infectadas. Los individuos infectados presentaron significativamente mayor longitud inicial que los no infectados. El mismo patrón es observado en la Fig. 8 para el peso inicial. A partir del peso y longitud inicial se calculó el estado nutricional de cada individuo previo a la alimentación (Fig. 9). Los resultados mostraron que los insectos infectados presentaron significativamente un mayor estado nutricional frente a los no infectados.

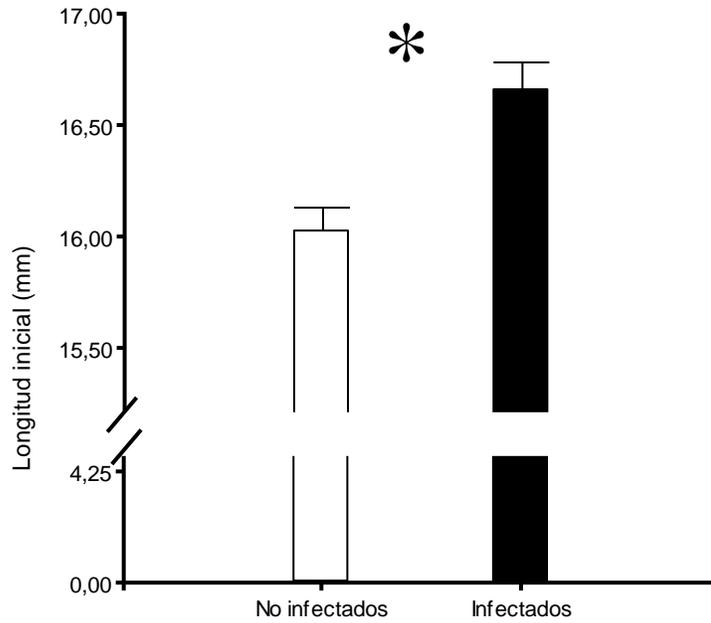


Fig. 7. Longitud inicial de ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectados y no infectados con *Trypanosoma cruzi*. Las barras representan las medias, las líneas verticales representan el error estándar y el asterisco indica diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,05$).

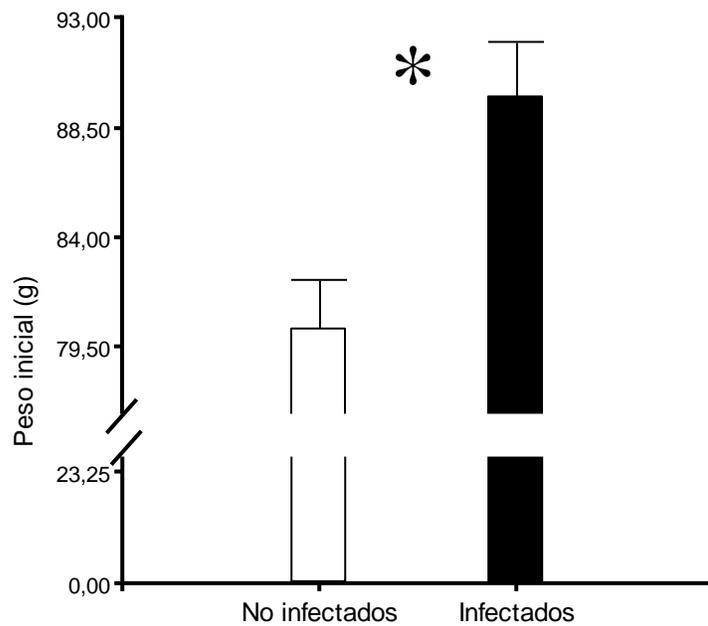


Fig. 8. Peso inicial de ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectados y no infectados con *Trypanosoma cruzi*. Las barras representan las medias, las líneas verticales representan el error estándar y el asterisco indica diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,05$).

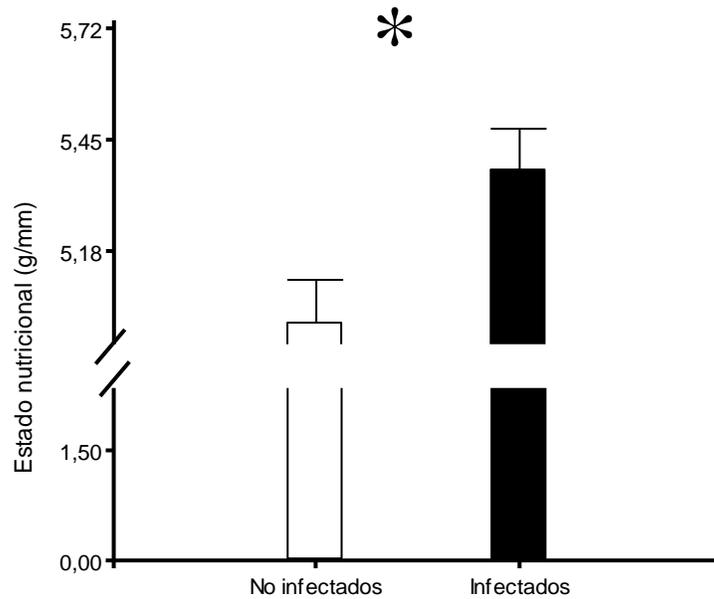


Fig. 9. Estado nutricional en ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectados y no infectados con *Trypanosoma cruzi*. Las barras representan las medias, las líneas verticales representan el error estándar y el asterisco indica diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,05$).

Variables durante la alimentación

En la Tabla 3 se muestran los valores de las medias y los errores estándar para todas las variables que describen la alimentación de ambos grupos. Como se observa en la tabla, no se observaron diferencias significativas para las distintas variables analizadas entre los dos grupos experimentales. Por lo que los insectos infectados muestran un comportamiento similar a los no infectados durante el proceso de alimentación.

Tabla 3. Valores medios y error estándar para las variables alimentarias de ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectadas y no infectadas con *Trypanosoma cruzi* alimentadas sobre paloma.

	Infectadas	No infectadas
	Media ± EE	Media ±EE
n	31	48
Tiempo de ataque (min)	0,35 ± 0,07 (a)	0,42 ± 0,08 (a)
Tiempo hasta comienzo de alimentación (min)	1,13 ± 0,29 (a)	0,87 ± 0,15 (a)
Tiempo real de alimentación (min)	15,72 ± 1,36 (a)	15,39 ± 0,86 (a)
Tiempo total de evento (min)	19,59 ± 1,65 (a)	17,95 ± 1,09 (a)
Intentos de alimentación	6,74 ± 1,58 (a)	6,96 ± 1,43 (a)
Eventos de alimentación	1,71 ± 0,17 (a)	1,77 ± 0,13(a)
Número de contactos	8,45 ± 1,68 (a)	8,73 ± 1,51 (a)

n: número de insectos; EE: error estándar; letras distintas muestran diferencias significativas con $P < 0,05$.

Variables post-alimentación

En la Tabla 4 se muestran los valores de las medias y los errores estándar de las variables registradas durante la hora post-alimentación en insectos infectados y no infectados.

Tabla 4. Valores medios y error estándar para las variables registradas post-alimentación de ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectadas y no infectadas con *Trypanosoma cruzi*.

	Infectadas	No infectadas
	Media ± EE	Media ± EE
n	31	48
Peso de ingesta	224,06 ± 12,04 (a)	193,83 ± 6,21 (b)
Ganancia de peso	2,53 ± 0,15 (a)	2,48 ± 0,10 (a)
Tasa de alimentación (g/min)	16,77 ± 1,30 (a)	14,32 ± 0,86 (a)
Peso deyecciones por insecto (g)	29,53 ± 1,66 (a)	18,36 ± 1,18 (b)
Peso deyecciones/Peso ingesta	0,14 ± 0,01 (a)	0,10 ± 0,01 (b)
Tiempo de la primera deyección (min)	3,30 ± 0,64 (a)	7,77 ± 1,09 (b)
Número de deyecciones a los 5min post-alimentación	0,94 ± 0,11 (a)	0,60 ± 0,09 (b)
Número de deyecciones a los 10min post-alimentación	1,61 ± 0,13 (a)	0,94 ± 0,10 (b)
Número de deyecciones a los 60min post-alimentación	5,19 ± 0,24 (a)	3,06 ± 0,17 (b)
Porcentaje de insectos que defecaron a los 5min post-alimentación	77% (a)	52% (b)
Porcentaje de insectos que defecaron a los 10 min post-alimentación	94% (a)	75% (b)
Índice de deyección a los 5 min	0,72	0,31
Índice de deyección a los 10 min	1,51	0,71

n: número de insectos; EE: error estándar; letras distintas muestran diferencias significativas con P <0,05.

En la Fig. 10 se muestran los valores medio y errores estándar del peso de sangre ingerida por los insectos infectados y no infectados. Se observó que el grupo de los infectados ingirió significativamente mayor cantidad de sangre que los no infectados. Sin embargo, el peso de ingesta relativizado al peso inicial del insecto (i.e. ganancia de peso) no mostró diferencias significativas entre los grupos, en ambos grupos el alimento ingerido fue en promedio una vez y medio su peso corporal (Tabla 3).

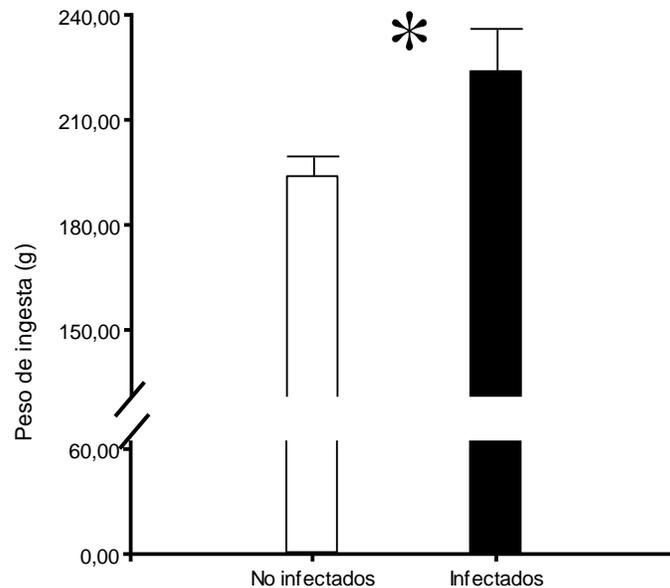


Fig. 10. Peso de ingesta en ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectados y no infectados con *Trypanosoma cruzi*. Las barras representan las medias, las líneas verticales representan el error estándar y el asterisco indica diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,05$).

El tiempo medio de la primera defecación para ambos grupos experimentales se muestra en la Fig. 11. Las diferencias son estadísticamente significativas entre los dos grupos mostrando que los no infectados tardaron el doble de tiempo para comenzar a defecar que los infectados.

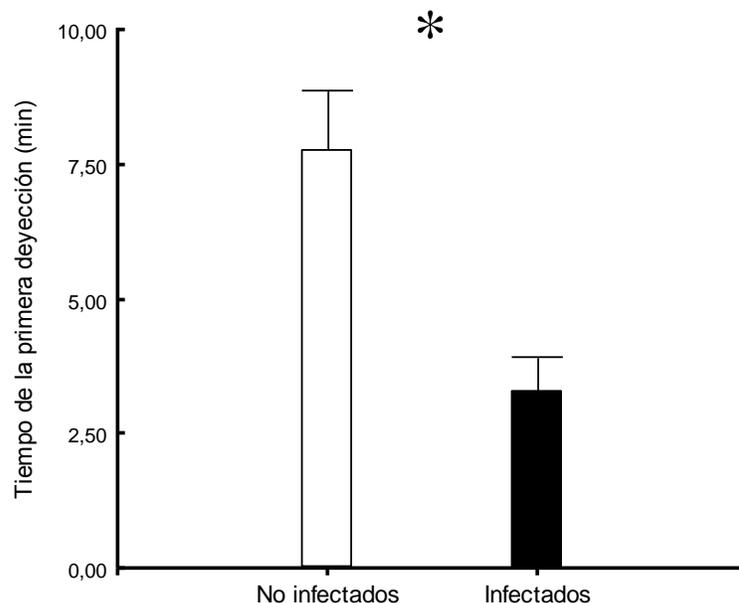


Fig. 11. Tiempo de la primera defecación en ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectados y no infectados con *Trypanosoma cruzi*. Las barras representan las medias, las líneas verticales representan el error estándar y el asterisco indica diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,05$).

En la Fig. 12 se muestra el peso de las deyecciones por insecto de cada grupo experimental durante la primera hora post-alimentación. Se observó que el peso de las deyecciones en los insectos infectados fue significativamente mayor que en los no infectados. Para saber si la diferencia en el peso de las deyecciones radicó en el hecho de que los grupos presentaron diferencias en la cantidad de sangre ingerida, se relativizó el peso de las deyecciones al peso de sangre ingerida. El análisis de medias mostró que el peso relativizado fue significativamente mayor en los insectos infectados (Fig. 13).

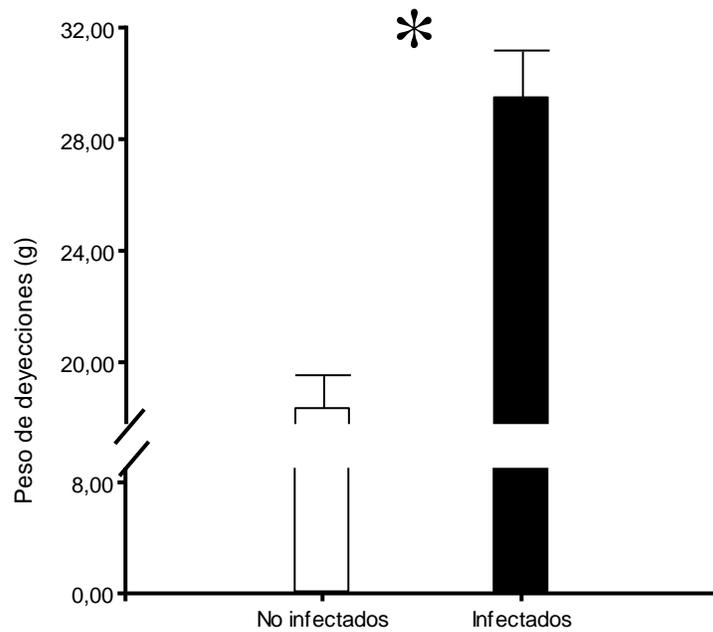


Fig. 12. Peso de las deyecciones emitidas por insecto durante la hora post-alimentación en ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectados y no infectados con *Trypanosoma cruzi*. Las barras representan las medias, las líneas verticales representan el error estándar y el asterisco indica diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,05$).

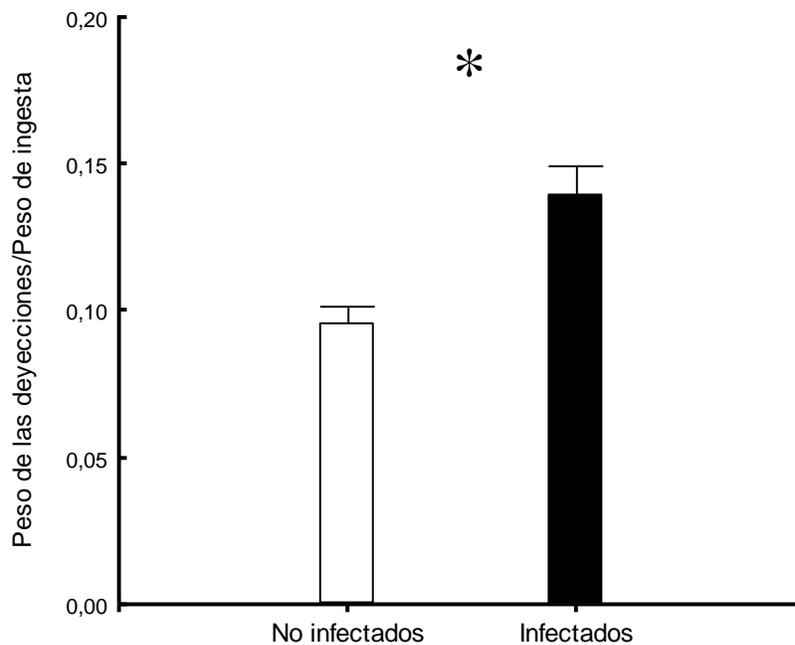


Fig. 13. Peso de las deyecciones/Peso de ingesta en ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectados y no infectados con *Trypanosoma cruzi*. Las barras representan las medias, las líneas verticales representan el error estándar y el asterisco indica diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,05$).

El número de deyecciones por insecto en cada intervalo de 10 min durante la primera hora post-alimentación para cada grupo experimental se muestra en la Fig. 14A. No hubo interacción entre el factor tiempo y el factor infección. Los insectos infectados emitieron significativamente más deyecciones que los insectos no infectados en todos los intervalos. Por otro lado, el número de deyecciones en cada intervalo disminuyó significativamente en el tiempo entre el intervalo 0-10 min y el resto de los intervalos y entre los intervalos 10-20 min/20-30 min y el intervalo 50-60 min. La Fig. 14B muestra número acumulado de deyecciones por insecto durante la primera hora post-alimentación. Para ambos grupos se registró un aumento en el número de deyecciones durante la primera hora tras la alimentación. El número acumulado de deyecciones a los 5, 10 y 60 min post-alimentación difieren significativamente, siendo los insectos infectados los que emitieron un mayor número de deyecciones por insecto para cada uno de esos tiempos con respecto a los no infectados (ver también Fig. 16 y 17).

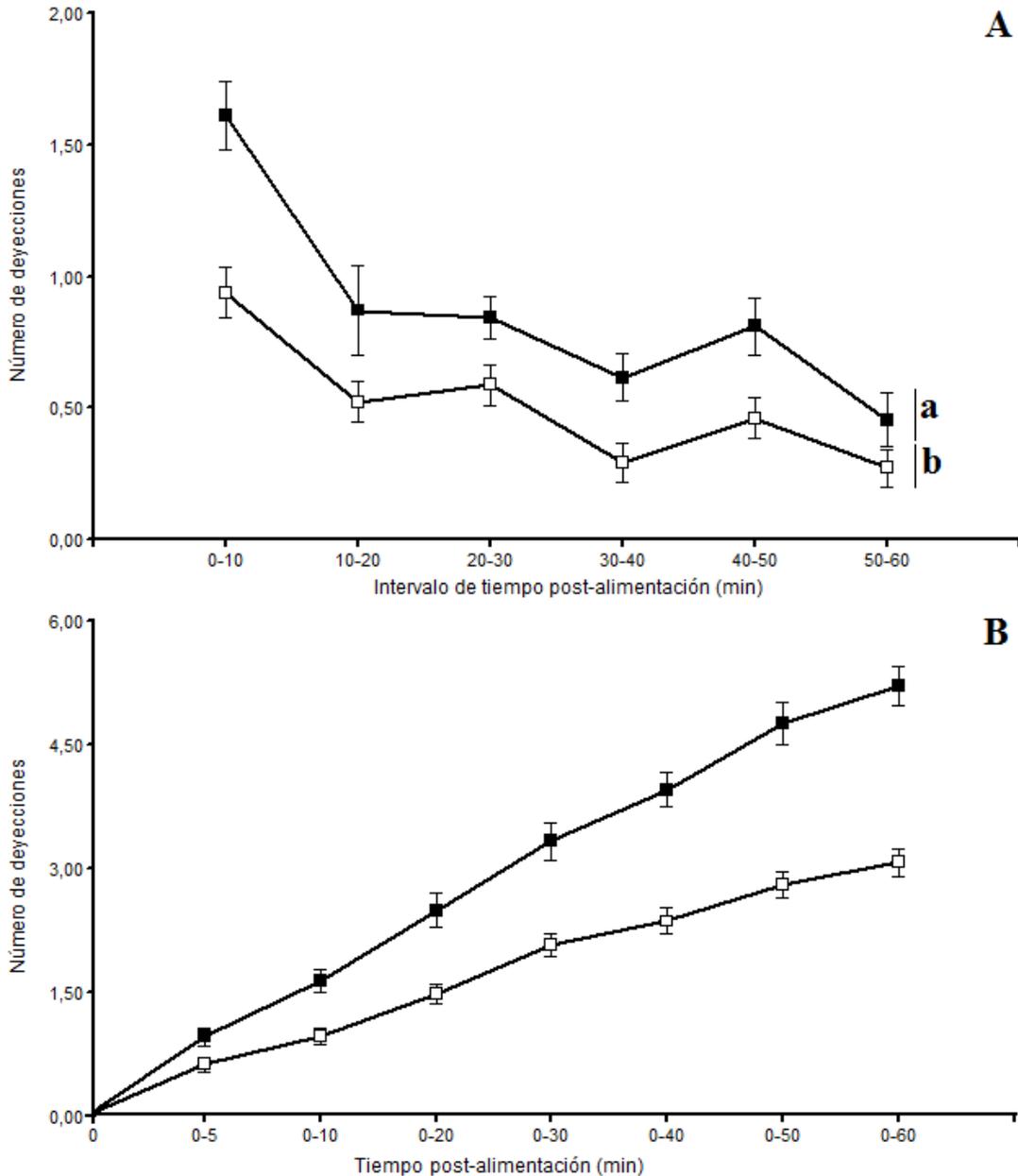


Fig. 14. Número de deyecciones por insectos durante la alimentación y durante la primer hora post-alimentación para ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectados y no infectados con *Trypanosoma cruzi*. Número de deyecciones por insectos: (A) en cada intervalo de 10 min y (B) acumulados cada 10 min. Los cuadrados negros representan las medias en cada tiempo para los insectos infectados, mientras que los cuadrados blancos representan las medias en cada tiempo para los insectos no infectados. La secuencia fue analizada mediante un ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en el efecto principal “Infección”. Las diferencias en el efecto principal “Tiempo” no son mostradas.

En la Fig. 15A se muestra el porcentaje de insectos que defecaron en cada intervalo de 10 min durante la primera hora post-alimentación para cada grupo experimental. En todos los intervalos defecaron más insectos infectados que no infectados, con diferencias significativas en los intervalos 0-10 min, 20-30 min, 30-40 min y 40-50 min. Para los insectos infectados el rango de porcentajes fue de 42-94%, mientras que para los no infectados el rango fue de 25-75%. En la Fig. 15B se muestra el porcentaje acumulado de insectos que defecaron durante la primera hora post-alimentación. A los 5 min luego del fin de la alimentación ya defecaron el 77% de los insectos infectados mientras que los no infectados sólo defecaron el 52%. A los 10 min, casi la totalidad de los infectados (94%) emitieron al menos una deyección mientras que el porcentaje de los no infectados fue de 75%. Finalmente, el 100% de insectos que defecaron se alcanzó a los 20 min para los infectados y a los 30 min para los no infectados.

En las figuras 14B y 15B se observó que ningún insecto, de ambos grupos experimentales, defecó durante la alimentación como lo evidencia el número de defecaciones y la proporción de insectos que defecaron igual a cero al comienzo de la hora post-alimentación (tiempo 0).

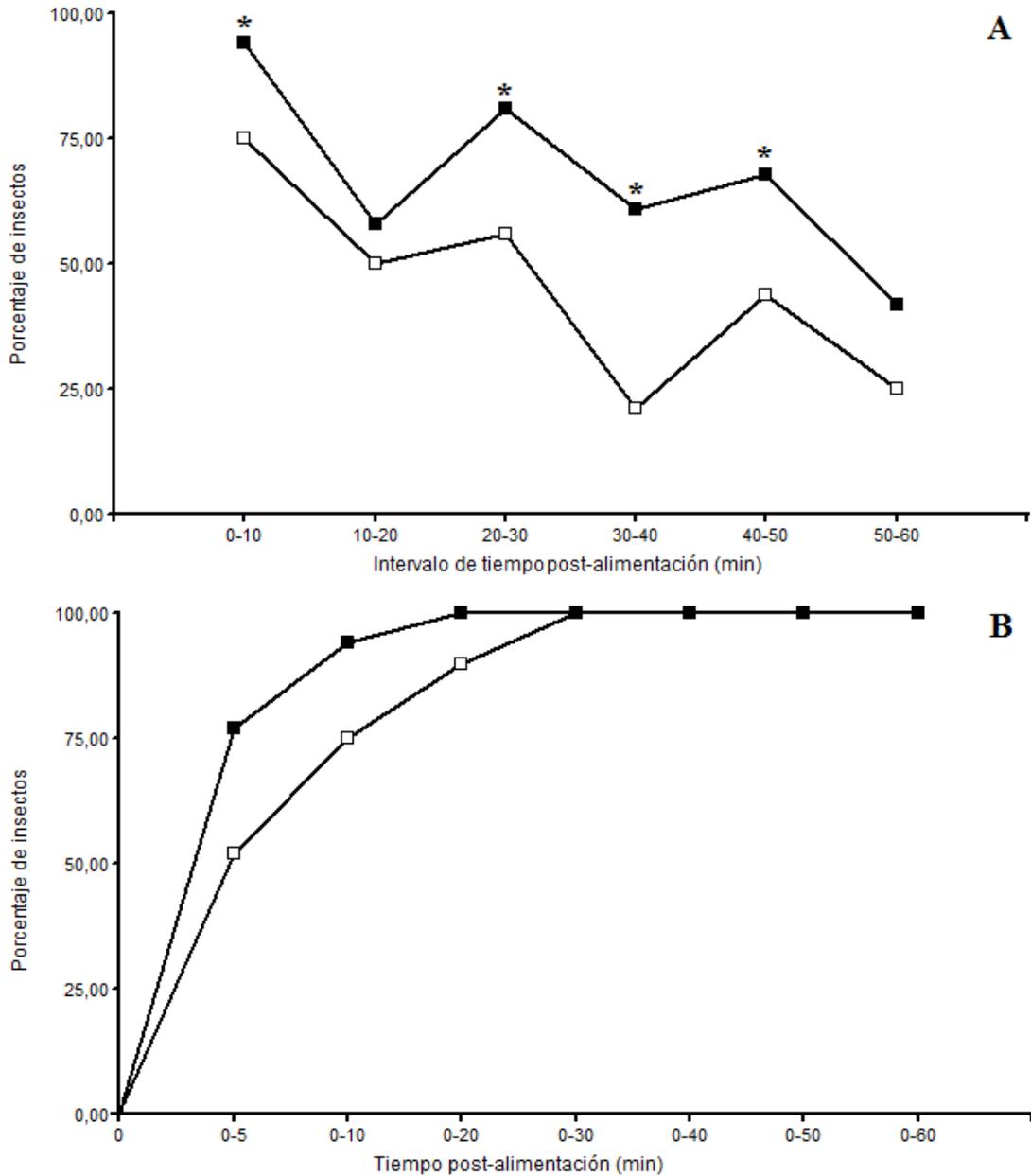


Fig. 15. Porcentaje de insectos que defecaron durante la alimentación y durante la primer hora post-alimentación para ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectados y no infectados con *Trypanosoma cruzi*, (A) en cada intervalo de 10 min y (B) acumulados cada 10 min. Los cuadrados negros representan las medias en cada tiempo para los insectos infectados, mientras que los cuadrados blancos representan las medias en cada tiempo para los insectos no infectados. La secuencia fue analizada mediante un test G ajustado en base a las correcciones por Williams en cada intervalo. Los asteriscos indican los intervalos con diferencias significativas ($P < 0,05$) entre insectos infectados y no infectados.

La Fig. 16 muestra los valores medios y errores estándar del número deyecciones acumulado por insecto (A) y el porcentaje de insectos que defecaron (B) en los primeros 5 min post-alimentación para ambos grupos experimentales. A partir de estos valores medios se calculó el índice de deyección a los 5 min post-alimentación, que se muestra en la Fig. 16C. Para las dos primeras variables se observaron valores significativamente mayores en las ninfas infectadas lo que determinó que el índice de deyección de los insectos infectados haya sido el doble que el de los no infectados.

La Fig. 17 muestra los valores medios y errores estándar del número deyecciones acumulado por insecto (A) y el porcentaje de insectos que defecaron (B) en los primeros 10 min post-alimentación para ambos grupos experimentales. Con estas variables se calculó el índice de deyección a los 10 min para los grupos estudiados, que se muestra en la Fig. 17C. Como en el caso anterior, los insectos infectados mostraron valores significativamente mayores con respecto a los no infectados y el índice de deyección de los infectados también fue el doble que el de los no infectados. Los valores del índice de deyección a 5 y 10 min indican que los insectos infectados tienen mayor capacidad de defecar inmediatamente después de la alimentación, o cerca del final del evento de alimentación, que los insectos no infectados.

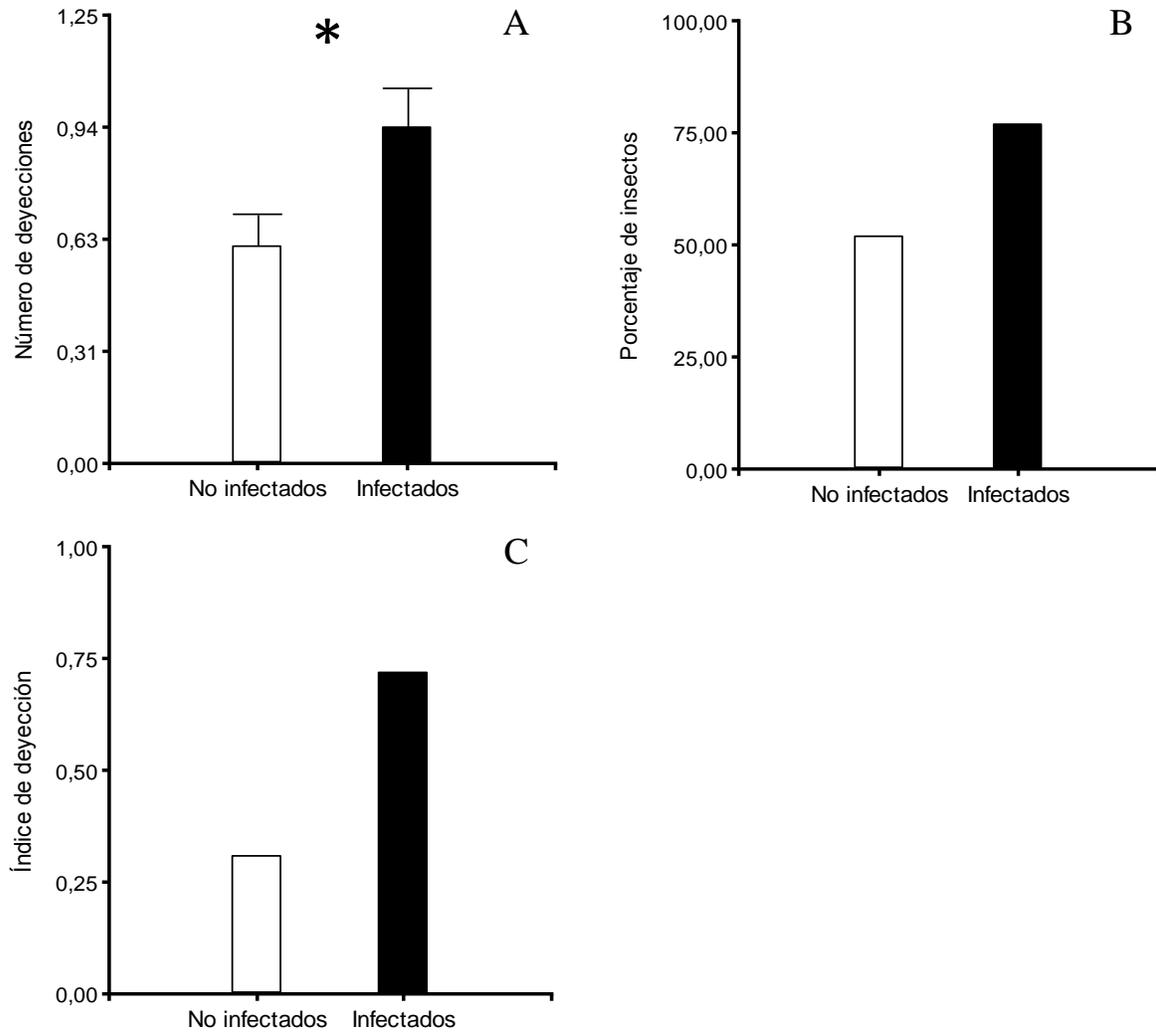


Fig. 16. Número de deyecciones acumuladas por insecto (A), porcentaje de insectos que defecaron (B) y el índice de defecación (C) durante los primeros 5 min post-alimentación en ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectadas y no infectadas con *Trypanosoma cruzi*. Las barras representan las medias (A), los porcentajes (B) y el índice de defecación (C). Las líneas verticales representan el error estándar y el asterisco indica diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,05$).

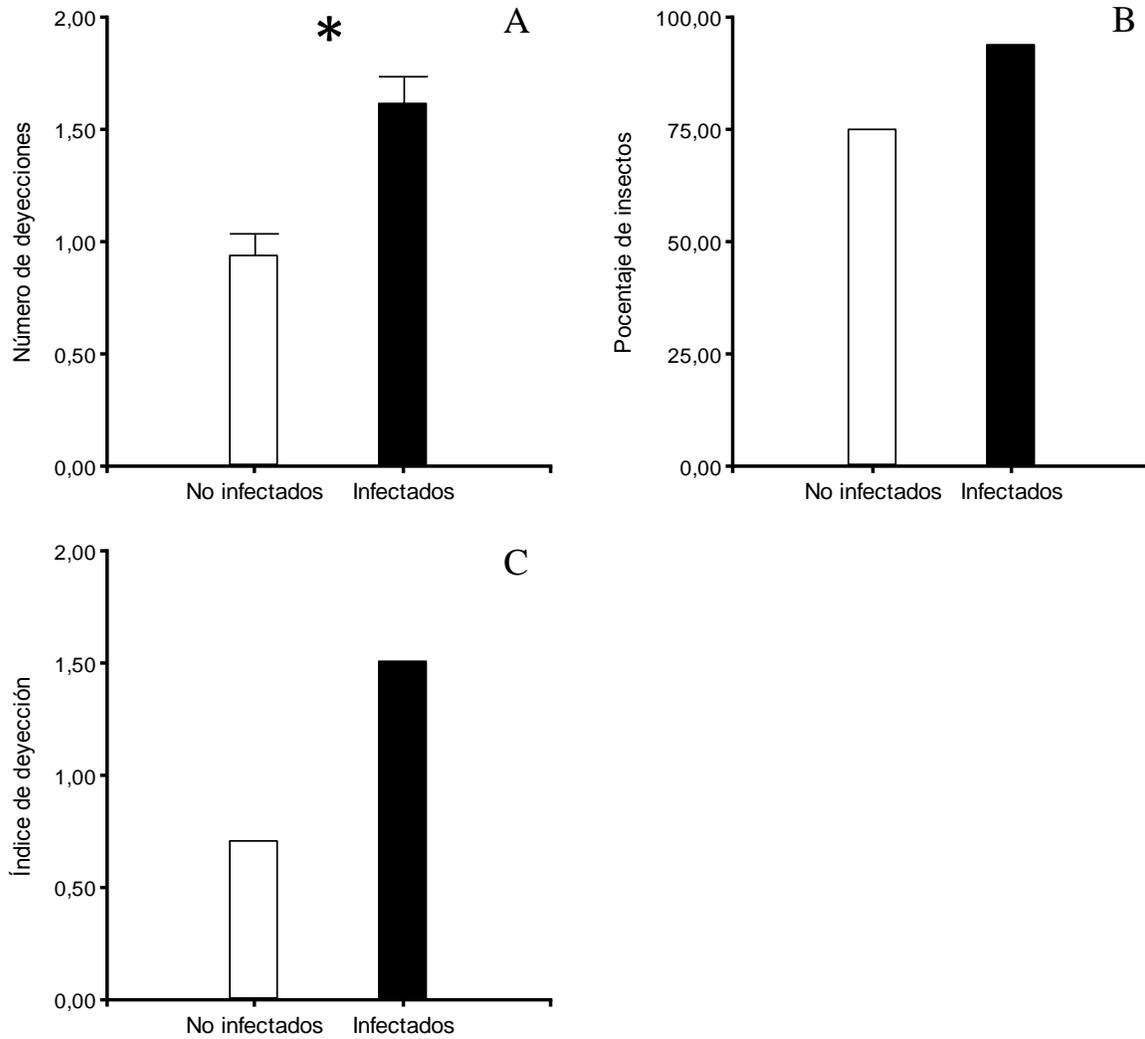


Fig. 17. Número de deyecciones acumuladas por insecto (A), porcentaje de insectos que defecaron (B) y el índice de defecación (C) durante los primeros 10 min post-alimentación en ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectadas y no infectadas con *Trypanosoma cruzi*. Las barras representan las medias (A), los porcentajes (B) y el índice de defecación (C). Las líneas verticales representan el error estándar y el asterisco indica diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se determinaron por primera vez los patrones de alimentación y de excreción/defecación en *T. infestans* infectados y no infectados con *T. cruzi*. Los resultados obtenidos reflejan que los individuos parasitados desarrollaron mayor tamaño corporal y estado nutricional que los insectos no parasitados durante el tiempo transcurrido desde la infección hasta el comienzo de la determinación de los patrones de alimentación y defecación. Por otro lado, el patrón de alimentación no mostró diferencias entre ambos grupos experimentales; consecuentemente, los insectos infectados ingirieron mayor cantidad de sangre de manera proporcional a su mayor tamaño. Finalmente, los insectos infectados comenzaron a defecar antes, en mayor cantidad (tanto en número como en peso de las deyecciones) y mostraron una mayor proporción de individuos que defecaron en relación con los no infectados durante la primera hora post-alimentación. Estas diferencias fueron observadas en tiempos tan cercanos al fin de la alimentación como 5 y 10 min luego de la misma y determinaron que los insectos infectados presentaran índices de defecación mayores que los insectos no infectados en esos mismos tiempos. De esta manera, este es el primer trabajo que muestra el efecto de *T. cruzi* sobre el patrón de excreción/defecación en *T. infestans*.

Al comenzar el estudio, las ninfas de 3er estadio que iban a ser infectadas pesaban menos que las ninfas que conformaron el grupo control. Sin embargo, al analizar el peso inicial (antes de la alimentación) en ninfas de 5to estadio, resultaron ser más pesadas las que se encontraban infectadas presentando también mayor longitud y mayor estado nutricional que las no infectadas. Considerando que los insectos de los dos grupos experimentales fueron mantenidos en las mismas condiciones estandarizadas (i.e. temperatura, humedad relativa, fotoperiodo y régimen de alimentación), estos resultados indicarían que la infección con *T. cruzi* ejerció un efecto sobre el desarrollo de los insectos desde que fueron infectados hasta el momento de la alimentación experimental, período durante el cual ocurrieron dos eventos de muda (i.e. la muda del 3er estadio ninfal al cuarto y la muda del cuarto estadio ninfal al quinto). Estudios realizados sobre *R. prolixus*, *T. brasiliensis* y *M. spinolai* infectados con *T. cruzi* mostraron una prolongación en el desarrollo ontogenético, tanto en algunos estadios como en el desarrollo total (Botto-Mahan et al., 2008; Botto-Mahan, 2009; Oliveira et al., 2010; Elliot et

al., 2015). Profundizando en las explicaciones causales, se ha sugerido la competencia entre el hospedador y el parásito por los nutrientes de la sangre ingerida por el insecto como explicación de diversas alteraciones en triatominos infectados con *T. cruzi* incluyendo la prolongación en los tiempos de muda (Botto-Mahan et al., 2008; Elliot et al., 2015). Por otro lado y en contraste al presente estudio, Botto-Mahan (2009) observó que, en condiciones de ayuno y con sólo una alimentación ofrecida en cada estadio, el peso de cada estadio de *M. spinolai* infectados con *T. cruzi* fue menor que en los no infectados; sin embargo, como el propio autor destaca en la discusión, insectos infectados y mantenidos en condiciones óptimas de alimentación compensarían la competencia por nutrientes con un aumento en el número de alimentaciones o un aumento en la cantidad de sangre ingerida (Schaub 2009). En este contexto, y considerando que el *T. cruzi* no afectó el proceso de ingesta de *T. infestans*, es posible que durante el presente estudio con régimen de alimentación constante los insectos infectados hayan requerido más tiempo y más alimentaciones hasta la ocurrencia de la muda que los no infectados diferenciándose ambos grupos en tamaño corporal y estado nutricional. No se descarta la hipótesis que afirma que el parásito tiene un efecto sobre el procesamiento del alimento ingerido independientemente de la posible competencia por los nutrientes entre ambos organismos. Finalmente, es necesario destacar que el presente trabajo y su diseño experimental no tuvieron como objetivo estudiar el efecto del parásito sobre el desarrollo ontogenético del insecto por lo que los resultados obtenidos no permiten evaluar apropiadamente el efecto observado. Así, se necesitan nuevos experimentos para estudiar específicamente este efecto y contrastar las hipótesis propuestas.

Los resultados de esta investigación muestran que los insectos infectados y los no infectados se comportaron de manera similar durante el proceso de alimentación. La única variable de alimentación que mostró diferencias entre ambos grupos fue el peso de la ingesta. Sin embargo, cuando este peso fue relativizado por el peso del insecto los grupos experimentales no se diferenciaron evidenciando que la mayor ingesta es explicada por el mayor tamaño de los insectos infectados y no por un efecto del parásito sobre el proceso de ingesta. En coincidencia con los resultados del presente trabajo, Trumper & Gorla (1991) y Rodríguez et al. (2008) determinaron que el peso inicial se correlacionó positivamente con la ingesta de sangre en ninfas 5tas de *T. infestans*. Sin embargo, esta correlación fue negativa para adultos de *T. sordida* (Crocco & Catalá, 1996) y no existió correlación para ninfas 5tas

de *T. sordida*, hembras de *T. patagonica* y ninfas 5tas de *T. guasayana* (Crocco & Catalá, 1996; Nattero et al., 2002; Rodríguez et al., 2004). Es posible que las diferencias de resultados, entre los estudios, estén vinculadas a que un peso individual mayor puede ser consecuencia de un tamaño corporal mayor, de un estado nutricional mayor o de ambos. Un insecto de mayor tamaño ingiere más alimento que el de menor tamaño, entonces si el peso refleja el tamaño corporal la correlación peso/ingesta será positiva. Por otro lado, un insecto con mayor estado nutricional ingiere menos alimento que el de menor estado nutricional, entonces si el peso refleja el estado nutricional la correlación peso/ingesta será negativa. Finalmente, si el insecto es más grande y tiene mayor estado nutricional, la cantidad de ingesta dependerá de cuál variable es más determinante en esas condiciones. Sin embargo, no se pueden descartar diferencias relacionadas a la especie y a las condiciones experimentales. Por otro lado, en primera instancia podría establecerse que, si los insectos parasitados ingirieron en promedio mayor cantidad de alimento que los no infectados y ambos tardaron en promedio el mismo tiempo en alimentarse, entonces los insectos infectados se habrían alimentado a mayor velocidad. Sin embargo, el análisis de la variable específica tasa de alimentación de cada insecto mostró que si bien los insectos infectados ingirieron a mayor tasa que los no infectados esta diferencia no fue significativa.

Unos pocos trabajos estudiaron diferentes variables vinculadas al proceso de alimentación en triatomíneos infectados con tripanosomátidos. En concordancia con la presente investigación, *T. cruzi* no afectó el tiempo de alimentación e intentos de ingesta en *R. prolixus* y tampoco afectó el tiempo hasta el primer intento de alimentación y la cantidad de sangre ingerida en *M. spinolai* (Takano-Lee & Edman, 2002; Botto-Mahan et al., 2006; Botto-Mahan, 2009). Sin embargo, otro estudio en *M. spinolai* mostró que los insectos infectados con *T. cruzi* ingirieron menos sangre que los insectos no infectados (Botto-Mahan et al., 2008). En el mismo sentido, el número de intentos de ingesta de *M. spinolai* y *R. robustus* fue mayor en individuo infectados con *T. cruzi* (Schaub, 1992; Botto-Mahan et al. 2006). Especular sobre las posibles causas de las diferencias entre los resultados obtenidos por distintos autores resulta complejo debido a las múltiples diferencias experimentales y de material biológico entre los estudios. Estos difirieron en factores tan determinantes como la especie de triatomíneo, estadio en que el insecto fue infectado, estadio del insecto en el que se observaron los efectos, tiempo en el que el insecto estuvo infectado, cepa de *T. cruzi*, diseño y

arena experimental en los que se evaluaron los posibles efectos. Varios estudios reportaron que el comportamiento y el desarrollo de *T. cruzi* sobre los triatomíneos, incluyendo la transmisibilidad, varía con la cepa o variante genética del parásito y con la especie del vector (Lana et al 1998, Campos et al 2007, Noireau et al. 2009, Vallejo et al. 2009). Por otro lado, como todos los estudios experimentales, las condiciones en las cuales se realizan la infección y los ensayos donde se evalúa la alimentación y la defecación son determinantes en los resultados obtenidos. A pesar de esta dificultad en la posibilidad de obtener conclusiones, es probable que los efectos descritos en los diferentes estudios puedan ser explicados por alguno de los dos mecanismos propuestos por Schaub (1992) por los cuales un parásito puede modificar el comportamiento de alimentación de un insecto hematófago: 1) los parásitos y los insectos compiten por los metabolitos de la sangre ingerida y 2) los parásitos afectan al proceso de alimentación. En los párrafos previos se observa que estos mismos mecanismos fueron considerados en la discusión de los propios resultados del presente estudio. Más aún, con el objetivo de aportar a las posibles explicaciones, un tercer mecanismo fue propuesto según el cual el parásito podría afectar el procesamiento del alimento ingerido independientemente de la posible competencia por los nutrientes entre ambos organismos. Cabe destacar que el primer mecanismo propuesto por Schaub permitiría explicar una amplia variedad de efectos no necesariamente vinculados con la alimentación.

Las principales variables de defecación/excreción en ninfas de quinto estadio de *T. infestans* fueron afectadas por la infección con *T. cruzi*. La modificación del patrón de excreción/defecación en triatomíneos puede tener gran relevancia epidemiológica debido al papel central que tiene en la transmisión natural de *T. cruzi* al hospedador mamífero. Esta relevancia es potenciada cuando el factor que modifica tal patrón es el parásito ya que, dependiendo del tipo de alteración, podría promover su propia transmisión. Debido a que la transmisión vectorial ocurre cuando los triatomíneos defecan durante la alimentación o después de finalizada mientras aún están sobre el hospedador, una de las variables más relevantes es el tiempo transcurrido entre la alimentación y el comienzo de la defecación. De acuerdo a Zeledón et al. (1977), una especie que defeque dentro de los primeros diez minutos de terminada la alimentación tiene altas probabilidades de transmitir el parásito al hospedador. Además del tiempo de la primera gota fecal, también resulta de gran relevancia epidemiológica la cantidad de deyecciones que emite cada insecto y la proporción de insectos

que defecan a diferentes tiempos ya que determinan la cantidad de eventos de liberación de parásitos que ocurriría en una población de insectos mientras se alimenta o en los tiempos posteriores. En el presente trabajo se observó que ambos grupos experimentales comenzaron a defecar antes de los diez min, pero los insectos infectados lo hicieron 4,47 min antes que los insectos no infectados. Además, los insectos infectados emitieron más deyecciones que los insectos no infectados durante toda la hora post-alimentación y particularmente en tiempos tan cercanos al fin de la alimentación como 5 y 10 min post-ingesta. Este efecto también se evidenció en el peso del total de las deyecciones emitidas durante la hora post-alimentación el cual fue mayor en los insectos infectados. Finalmente, la proporción de insectos infectados que defecaron fue mayor que la proporción de insectos no infectados a los 5 y 10 min post-ingesta, diferencia que se mantuvo durante el resto de la hora post-alimentación. Estas diferencias se evidenciaron en el índice de defecación, una medida de la cantidad de eventos de liberación de parásitos que ocurriría en un determinado tiempo, el cual fue el doble para los insectos infectados que para los no infectados tanto a los 5 como a los 10 min post-ingesta. En resumen, el presente estudio muestra que el *T. cruzi* afectó el patrón de defecación/excreción en ninfas 5tas de *T. infestans*, y lo hizo en un sentido que aumentaría la probabilidad de contacto entre las deyecciones infectivas y el hospedador mamífero o, dicho de otra manera, aumentaría la probabilidad de transmisión del parásito.

Las diferencias recién discutidas podrían ser debidas a la mayor ingesta observada en las ninfas infectadas o al efecto de *T. cruzi* sobre el proceso de defecación/excreción propiamente dicho. El procesamiento del alimento y los procesos derivados de tal procesamiento, como es la excreción/defecación que sigue a una alimentación, no serían diferentes entre insectos de diferente tamaño si la alimentación en todos los insectos fuera proporcional al tamaño del individuo y si no hubiera otro factor que aporte variación. Debido a que efectivamente en el presente estudio el alimento ingerido fue proporcional al tamaño individual, las diferencias en el tiempo y el número de las deyecciones entre ambos grupos experimentales no serían consecuencia de los diferentes tamaños de ingesta sino que sería una modificación del propio proceso de defecación/excreción por parte del parásito. Diferente es el análisis del peso de las deyecciones las cuales claramente serían proporcionales al tamaño de la ingesta absoluta. Sin embargo, las diferencias entre ambos grupos se mantienen cuando el peso de las deyecciones es relativizado al peso de la ingesta indicando que la variación en el peso de las deyecciones

no es explicada totalmente por el tamaño del alimento ingerido sino que en parte es consecuencia de la presencia del parásito. De esta manera, las diferencias observadas en el patrón de defecación/excreción podrían ser atribuidas a un efecto de *T. cruzi* sobre el propio proceso de defecación/excreción. Las dos estructuras involucradas en el proceso de formación de la orina y posterior deyección, los túbulos de Malpighi y el recto, son colonizados en altas densidad por el *T. cruzi* (Kollien & Schaub, 2000; Schaub, 2009). De esta manera, y si bien hasta ahora no se han reportado efectos patológicos sobre la estructura o funcionamiento de los túbulos de Malpighi o el recto, es posible proponer que las modificaciones descritas en el presente estudio podrían estar vinculadas con algún efecto del parásito sobre el funcionamiento de aquellas estructuras.

Sólo dos trabajos analizaron el efecto de la infección con tripanosomátidos sobre el proceso de excreción en triatomíneos. Ambos trabajaron con *T. cruzi*, en un caso infectando a *M. spinolai* y en otro a *R. prolixus* y sólo este último describió el patrón de defecación en una manera similar a la presente tesis. En la especie *M. spinolai* se demostró que ninfas 5tas infectadas con *T. cruzi* defecaron en promedio 3 min más rápido que las ninfas no infectadas (Botto-Mahan et al., 2006). Sin embargo, Takano-Lee & Edman (2002) no encontraron diferencias en el tiempo de aparición de la primera gota fecal entre *R. prolixus* (ninfas 4tas, 5tas y adultos) infectados y no infectados. Estos autores también mostraron que los insectos infectados no difirieron significativamente en el número de intentos de alimentación, tiempo de alimentación y número de deyecciones después de la alimentación respecto de insectos no infectados; y si bien destaca que el índice de defecación tiende a ser menor en los infectados, esta diferencia es marginal y no ocurre en todos los estadios y condiciones experimentales estudiadas (i.e. alimentación artificial vs alimentación sobre ratón y diferente número de alimentaciones previas para evaluar el patrón de excreción). Como fue mencionado arriba, si bien se puede asegurar que la explicación de los diferentes resultados radica en la variación experimental y/o en el material biológico (i.e. diferentes cepas de parásitos y especies de triatomíneos) entre los estudios citados, la multiplicidad de factores diferentes impide precisar las causas.

Como fue discutido, en el presente estudio los insectos infectados evidenciaron modificaciones en el desarrollo somático y en el patrón de defecación/excreción. ¿Cómo podrían ser interpretadas estas modificaciones desde el punto de vista adaptativo?, es decir,

¿podrían interpretarse en términos de adaptación del parásito o del hospedador? o, por el contrario, ¿sólo son efectos necesarios o colaterales de la infección? Un vector que se encuentra infectado por un parásito puede presentar alteraciones en diferentes procesos fisiológicos a causa de la infección. De acuerdo a Heil (2016) estas modificaciones pueden ser consecuencias necesarias de la infección o consecuencias adaptativas de la infección. Este último caso podría ser una respuesta del hospedador que disminuye los efectos negativos de la infección o afecta al parásito (i.e. respuesta compensatoria por parte del hospedador) o una modificación de algún aspecto del fenotipo del hospedador por parte del parásito cuyo resultado es un incremento en la tasa de transmisión del parásito (i.e. manipulación adaptativa del hospedador por parte del parásito). Resulta complejo clasificar un determinado efecto de un parásito sobre un hospedador dentro de estas categorías; incluso cuando la clasificación de un determinado efecto parezca obvia podría interpretarse de otra manera o, más aún, su causa distal (la que explica su origen, ya sea adaptativo o no) podría ser otra. La identificación de posibles ventajas o beneficios que un determinado efecto significaría para el parásito o el hospedador permitiría proponer la hipótesis por la cual aquel efecto se trata efectivamente de una consecuencia adaptativa y además, adaptativa para cuál de los dos organismos (i.e. manipulación adaptativa si el beneficiado es el parásito o respuesta compensatoria si el beneficiado es el hospedador). Existen ejemplos claros como el de las hormigas zombis donde el efecto de la infección sobre el comportamiento de la hormiga resulta en un evidente beneficio para el parásito ya que aumenta su probabilidad de transmisión y por lo tanto la manipulación adaptativa por parte del parásito parece ser la hipótesis con mayor sustento. Sin embargo, en otros casos donde la interpretación del beneficio también parece evidente, pueden establecerse otras interpretaciones. Un ejemplo es la tos. Esta reacción es claramente beneficiosa para el hospedador porque evita que el agente patógeno siga ingresando por el tracto respiratorio y, en este sentido, puede entenderse como una respuesta compensatoria adaptativa para el hospedador. Por otro lado, también sería beneficioso al patógeno porque le permite dispersarse y, bajo esta interpretación, la manipulación adaptativa parece un escenario evolutivo probable. Sin embargo, al considerar que se trata de una respuesta compleja, inespecífica (i.e. ocurre ante la presencia de diferentes patógenos y partículas inertes) y que los beneficios para el hospedador son muy evidentes, la hipótesis que afirma que la tos es una

respuesta adaptativa del hospedador a la presencia del patógeno emerge como la más probable (Brooks, 2011).

Este marco teórico permite discutir las modificaciones descritas durante este estudio en *T. infestans* infectados con *T. cruzi* ya no en términos mecanísticos (i.e. las causas proximales) o en sus consecuencias epidemiológicas, como en los párrafos anteriores, sino en términos de su origen (i.e. las causas distales). En primer lugar, la interpretación de los efectos de la infección sobre el desarrollo somático no resulta tan evidente. Como ya fue comentado, se ha postulado la existencia de una competencia por los nutrientes de la sangre ingerida entre el parásito y el insecto (Schaub, 2009). Se puede sugerir que esta competencia pudo haber ejercido una presión de selección sobre el insecto que haya permitido la evolución de una reacción fisiológica compensatoria (por ejemplo, un mayor número de alimentaciones) cuya consecuencia es un mayor tamaño y estado nutricional. Sin embargo, el mayor número de alimentaciones podría ser consecuencia del incremento en el tiempo de desarrollo en los insectos infectados y, en este sentido, pueda interpretarse como un efecto colateral de la infección. Por otro lado, las modificaciones en la dinámica de defecación son de interpretación más evidente. Considerando el modo natural de transmisión vectorial del *T. cruzi*, las deyecciones cercanas al final de la alimentación en insectos infectados aumentarían las probabilidades de transmisión del parásito al hospedador vertebrado. A su vez, el aumento en la cantidad de deyecciones o en el volumen de las mismas también aumentarían las probabilidades de transmisión del parásito ya que se liberarían más parásitos del insecto pero, justamente por la misma razón, estas modificaciones también beneficiarían al vector. En general, cualquier efecto que incremente la liberación del parásito podría interpretarse como una ventaja para el parásito (manipulación adaptativa) o bien como un beneficio para el hospedador (respuesta compensatoria). Para distinguir entre estas dos alternativas, un criterio de importancia es si el parásito completa su ciclo de vida dentro del vector antes de que el evento modificado ocurra. Al completar el ciclo, los estadios infectantes ya desarrollaron y el aumento en la liberación de parásitos resulta en un incremento en la transmisión. En esta situación, la manipulación adaptativa sería la hipótesis más probable. En triatomíneos, las deyecciones ocurren cuando se libera la orina que arrastra los contenidos que se localizan en el recto (principalmente residuos de la digestión de la sangre y ácido úrico) y es en esta región donde se desarrolla el estadio infectante de *T. cruzi*. Entonces, un aumento en el número de

deyecciones arrastraría un mayor número de tripomastigotas metacíclicos que se exponen al ambiente circundante donde aumentaría la tasa de contacto entre estos y el hospedador. Adicionalmente, al ser *T. cruzi* no patogénico o sub-patogénico para *T. infestans*, se podría especular que la presión de selección para una respuesta compensatoria adaptativa por parte del insecto no sería tan intensa. De esta manera, y si bien no se descarta una consecuencia necesaria de la infección, este estudio propone la hipótesis que afirma que las modificaciones en el proceso de defecación/excreción *T. infestans* por parte de *T. cruzi* son el resultado del proceso adaptativo denominado manipulación adaptativa por parte del parásito. Los futuros estudios que contrasten esta hipótesis deberían considerar que el criterio fundamental para establecer la ocurrencia de manipulación adaptativa es la verificación empírica de que la alteración observada aumenta el fitness o la probabilidad de transmisión del parásito (Poulin 2010). Además, sería clave determinar si el comportamiento/efecto estudiado muestra variación individual asociada a variación genética aditiva en las poblaciones de parásitos lo que hablaría de su heredabilidad y en consecuencia de su posible selección. Por último, los beneficios de las conductas manipuladas variarían de acuerdo a las condiciones ambientales y ecológicas donde sean estudiadas, y el estudio de estas condiciones permitirá entender su posible origen y desarrollo evolutivo (Gefael Borrás, 2016). Existe escasa bibliografía sobre el estudio de manipulación por parte de parásitos en general desde estos puntos de vista, y la existente es considerada muy laxa por no considerarse lo suficientemente realistas.

Siguiendo una lógica similar a la del párrafo anterior, i.e. identificar los beneficios para el parásito o el hospedador y sugerir el proceso selectivo correspondiente sin descartar la ocurrencia de efectos necesarios, los autores de los trabajos previos han hecho diferentes interpretaciones de los efectos del *T. cruzi* en triatominos. De esta manera, el menor peso y tamaño de las gónadas y del adulto de *M. spinolai* infectados fueron interpretados como respuesta compensatoria por parte del insecto quien relocalizaría las reservas energéticas favoreciendo su supervivencia sobre el crecimiento somático. Sin embargo, el efecto patológico del parásito también es sugerido. El mecanismo subyacente sería la competencia entre ambos organismos por los nutrientes de la sangre ingerida que disminuiría las reservas energéticas utilizadas por el vector (Botto-Mahan et al., 2008). El retraso en la muda observado en *R. prolixus* y en *M. spinolai* sería ventajoso para el parásito ya que aumentaría el número de alimentaciones hasta la muda al siguiente estadio y, en consecuencia, aumentaría el

número de contactos entre hospedador y vector. Además, este mismo retraso en la muda permitiría el desarrollo de la forma infectante en el momento que el vector se alimente por lo que el beneficio para el parásito, y la manipulación adaptativa, es fácilmente deducida. Aunque nuevamente, la competencia entre el parásito y el vector por nutrientes provenientes de la sangre ingerida podría afectar el desarrollo del vector y el efecto colateral sería una interpretación alternativa. (Botto-Mahan, 2009; Elliot et.al., 2015). Según Fellet et al. (2014) la disminución de la fecundidad y la fertilidad en *R. prolixus* podría entenderse como manipulación del parásito ya que este efecto dejaría mayores recursos disponibles al parásito. Sin embargo, los autores también sugieren efectos colaterales de la infección como consecuencia de la competencia por recursos energéticos entre el parásito y el vector o la inversión de recursos energéticos por el vector en la respuesta inmune. Botto-Mahan et al. (2006) interpretaron la mayor tasa de intentos de alimentación, la mayor velocidad de detección del hospedador y la mayor rapidez en comenzar a defecar como manipulación adaptativa al aumentar la probabilidad de transmisión de parásito, pero también consideraron a estos efectos como consecuencia del ayuno causado por la competencia por nutrientes entre ambos organismos. Según Elliot et al. (2015), el aumento de mortalidad de *R. prolixus* en el rango de temperatura donde *T. cruzi* muestra mayor crecimiento poblacional indicaría una estrategia adaptativa por la cual el parásito alcanzaría altas densidades poblacionales en el intestino del vector lo que aumentaría la probabilidad de transmisión. Sin embargo, como también aumentaría la probabilidad de matar al vector, el aumento poblacional de parásitos podría tratarse de un efecto patológico. Marlière et al. (2015) interpretaron la disminución de la actividad locomotora en *R. prolixus* infectados como una respuesta compensatoria del vector que le permitiría preservar su fitness a partir de la energía “ahorrada” disponible pero, también sugirieron el beneficio del parásito al aumentar la energía disponible para su desarrollo.

En conclusión, este es el primer trabajo que describe el efecto de *T. cruzi* sobre los patrones de alimentación y defecación/excreción en *T. infestans*. Estos patrones resultan de gran importancia epidemiológica ya que la transmisión vectorial del parásito depende del contacto infectivo entre el vector y el mamífero a través de las heces del insecto, y este contacto ocurre mayormente cuando el insecto defeca mientras se alimenta o inmediatamente después. Este estrecho vínculo entre la alimentación y la defecación/excreción con la

transmisión del parásito determina que estos procesos sean componentes relevantes de la competencia vectorial de los triatomíneos. Otros componentes son el grado de antropofilia, la adaptación al hábitat doméstico, capacidad de dispersión, el desarrollo de la infección, etc. (Lent & Wygodzinsky, 1979). El presente estudio demostró que el *T. cruzi* modificó la dinámica del proceso de excreción/defecación en *T. infestans* en un sentido en que aumentaría la probabilidad de contacto entre las heces y el mamífero. De esta manera, considerando sólo el patrón de defecación/excreción, el *T. cruzi* aumentó la competencia vectorial de las ninfas de *T. infestans* sugiriendo que la infección aumenta la probabilidad de transmisión del parásito. Finalmente, en términos adaptativos o de causa distales, la manipulación adaptativa del hospedador por parte del parásito emerge como la hipótesis con mayor sustento.

BIBLIOGRAFÍA

- Almeida, C. E., Folly-Ramos, E., Agapito-Souza, R., Magno-Esperança, G., Pacheco, R. S., & Costa, J. (2005). *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) IV: bionomic aspects on the vector capacity of nymphs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100 (3), 231-235.
- Andersen, S. B., Gerritsma, S., Yusah, K. M., Mayntz, D., Hywel-Jones, N. L., Billen, J. & Hughes, D. P. (2009). The life of a dead ant: the expression of an adaptive extended phenotype. *The American Naturalist*, 174 (3), 424-433.
- Beach, R., Kiilu, G., & Leeuwenburg, J. (1985). Modification of sand fly biting behavior by *Leishmania* leads to increased parasite transmission. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 34 (2), 278-282.
- Berenguer, J. G. (2007). *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario* (Vol. 31). Edicions Universitat Barcelona. Pag: 30-49.
- Bern, C. (2015). Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, 373(5), 456-466.
- Botto-Mahan, C. (2009). *Trypanosoma cruzi* induces life-history trait changes in the wild kissing bug *Mepraia spinolai*: implications for parasite transmission. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9 (5), 505-510.
- Botto-Mahan, C., Ossa, C. G., & Medel, R. (2008). Direct and indirect pathways of fitness-impact in a protozoan-infected kissing bug. *Physiological entomology*, 33 (1), 25-30.
- Botto-Mahan, C., Cattán, P. E., & Medel, R. (2006). Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. *Actatropica*, 98 (3), 219-223.
- Braga, M. V., & Lima, M. M. (1999). Feeding and defecation patterns of nymphs of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773)(Hemiptera: Reduviidae), and its potential role as vector for *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 (1).
- Brooks, S. M. (2011). Perspective on the human cough reflex. *Cough*, 7 (1), 10.

- Campos, R., Acuna-Retamar, M., Botto-Mahan, C., Ortiz, S., Cattán, P. E., & Solari, A. (2007). Susceptibility of *Mepraia spinolai* and *Triatoma infestans* to different *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected rodent hosts. *Acta Tropica*, *104* (1), 25-29.
- Canale D. (2005). Triatomíneos, vinchucas en Artrópodos de interés médico. *Publicación Monográfica 6 Mundo Sano*. Pag: 31-37.
- Carcavallo, R. U., & Martínez, A. (1972). Life cycles of some species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae). *The Canadian Entomologist*, *104* (5), 699-704.
- Crocco, L. B., & Catalá, S. S. (1996). Feeding and defaecation patterns in *Triatoma sordida*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *91* (4), 409-413.
- Dias E., 1956. Observação sobre eliminação de dejeções e tempo de sucçãoem algún triatomíneos sulamericanos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *54*: 115-124.
- Dias, J. C. P., Diotaiuti, L., Guhl, F., & Jaramillo, C. A. (1998). Vectores secundarios de la enfermedad de Chagas en el Brasil y perspectivas para su control. *Control de Tripanosomiasis Americana y Leishmaniosis: Aspectos Biológicos, Genéticos y Moleculares*, 154-159.
- Diotaiuti, L., Pereira, A. S., Loiola, C. F., Fernandes, A. J., Schofield, J. C., Dujardin, J. P., & Chiari, E. (1995). Inter-relation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanoso macruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *90* (4), 443-448.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Eichler, S., & Schaub, G. A. (2002). Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Experimental parasitology*, *100* (1), 17-27.
- Eldridge, B. F., & Edman, J. D. (Eds.). (2012). *Medical entomology: a textbook on public health and veterinary problems caused by arthropods*. Springer Science & Business Media.

Elliot, S. L., Rodrigues, J. D. O., Lorenzo, M. G., Martins-Filho, O. A., & Guarneri, A. A. (2015). *Trypanosoma cruzi*, etiological agent of Chagas disease, is virulent to its triatomine vector *Rhodnius prolixus* in a temperature-dependent manner. *PLoS neglected tropical diseases*, 9 (3), e0003646.

Enfermedad de Chagas (19 de Septiembre de 2016). *Organización Panamericana de la Salud*. Consultado el 14 de Febrero de 2018, de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics & view=article & id=10 & Itemid=40743 & lang=es

Enfermedad de Chagas en las Américas para los trabajadores de salud pública; 2017 (2017). *Organización Panamericana de la Salud*. Consultado el 14 de Febrero de 2018, de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content & view=article & id=13568%3Achagas-in-the-americas-for-public-health-workers-2017 & catid=6648%3Afact-sheets & Itemid=40721 & lang=es

Fellet, M. R., Lorenzo, M. G., Elliot, S. L., Carrasco, D., & Guarneri, A. A. (2014). Effects of infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the reproductive performance of the vector *Rhodnius prolixus*. *PloS one*, 9 (8), e105255.

Flores-Ferrer, A., Marcou, O., Waleckx, E., Dumonteil, E., & Gourbière, S. (2017). Evolutionary ecology of Chagas disease; what do we know and what do we need? *Evolutionary Applications*.

Galvão, C., Carcavallo, R., Rocha, D. D. S., & Jurberg, J. (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, 202 (1), 1-36.

Gefaell Borrás, J. (2016). Manipulación de la conducta del hospedador por el parásito en las relaciones interespecíficas de parasitismo: revisión y perspectivas.

Giraldez, E., López Ureta, M. P., & Nepote, M. (2009). Colonización domiciliar por *Triatoma patagonica* en el departamento San Cristóbal, provincia de Santa Fe. *Rev Méd Rosario*, 75, 38.

Guhl, F. (2009). Enfermedad de Chagas: realidad y perspectivas. *Revista Biomédica*, 20 (3), 228-234.

Heil, M. (2016). Host manipulation by parasites: cases, patterns, and remaining doubts. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 4, 80.

Hurd, H. (2003). Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annual Review of Entomology*, 48 (1), 141-161.

Kirk, M. L., & Schofield, C. J. (1987). Density-dependent timing of defaecation by *Rhodnius prolixus*, and its implications for the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81 (2), 348-349.

Koella, J. C., SÖrensen, F. L., & Anderson, R. A. (1998). The malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265 (1398), 763-768.

Kollien, A. & Schaub, G. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitology today*, 16 (9), 381-387.

La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) (Marzo de 2017). *Organización mundial de la salud*. Consultado el 14 de Febrero de 2018, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>

Lana, M. D., Pinto, A. D. S., Barnabé, C., Quesney, V., Noël, S., & Tibayrenc, M. (1998). *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*.

Lent, H., & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American museum of Natural History*, 163 (3), 123-520. Zeledón et al. 1977

Libersat, F., Delago, A. & Gal, R. (2009). Manipulation of host behavior by parasitic insects and insect parasites. *Annualreview of entomology*, 54, 189-207.

- Lima-Camara, T. N., Bruno, R. V., Luz, P. M., Castro, M. G., Lourenço-de-Oliveira, R., Sorgine, M. H., & Peixoto, A. A. (2011). Dengue infection increases the locomotor activity of *Aedes aegypti* females. *PLoS One*, 6 (3), e17690.
- Lobbia, P., Calcagno, J. & Mougabure-Cueto, G. (2018). Excretion/defecation patterns in *Triatoma infestans* populations that are, respectively, susceptible and resistant to deltamethrin. *Medical and veterinary entomology*, 31 (3), 311-322.
- Maitland, D. P. (1994). A parasitic fungus infecting yellow dungflies manipulates host perching behaviour. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 258 (1352), 187-193.
- Marlière, N. P., Latorre-Estivalis, J. M., Lorenzo, M. G., Carrasco, D., Alves-Silva, J., de Oliveira Rodrigues, J., & Guarneri, A. A. (2015). Trypanosomes modify the behavior of their insect hosts: effects on locomotion and on the expression of a related Gene. *PLoS neglected tropical diseases*, 9 (8), e0003973.
- Martínez-Ibarra, J. A., Grant-Guillén, Y., Morales-Corona, Z. Y., Haro-Rodriguez, S., Ventura-Rodríguez, L. V., Noguera-Torres, B., & Bustos-Saldaña, R. (2008). Importance of species of Triatominae (Heteroptera: Reduviidae) in risk of transmission of *Trypanosoma cruzi* in western Mexico. *Journal of medical entomology*, 45 (3), 476-482.
- Morillo, C. A., Marin-Neto, J. A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi Jr, A., Rosas, F. & Guhl, F. (2015). Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 373 (14), 1295-1306.
- Nattero, J., Crocco, L. B., & Rodríguez, C. S. (2002). Feeding and defaecation behaviour of *Triatoma patagonica* (Del Ponte, 1929) (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97 (7), 1063-1065.
- Noireau, F., Diosque, P. & Jansen, A. M. (2009). *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary research*, 40 (2), 1-23.
- Oliveira, T. G., Carvalho-Costa, F. A., Gomes, T. F., Sarquis, O., Sposina, R., & Lima, M. M. (2010). Developmental and reproductive patterns of *Triatoma brasiliensis* infected with

Trypanosoma cruzi under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105 (8), 1057-1060.

Picollo, M.I. (1999). Biología de los Parásitos. En *Dermatología Infantil en la Clínica Pediátrica (editado por Pueyo de Casabé, S.T. y J.A. Máximo)*, Capítulo 18, 535-538.

Pizzi, P. (1961). Inmunología de la enfermedad de Chagas: estado actual del problema.

Pontoppidan, M. B., Himaman, W., Hywel-Jones, N. L., Boomsma, J. J. & Hughes, D. P. (2009). Graveyards on the move: the spatio-temporal distribution of dead *Ophiocordyceps*-infected ants. *PloS one*, 4 (3), e4835.

Poulin, R. (2010). Parasite manipulation of host behavior: an update and frequently asked questions. En *Advances in the Study of Behavior* (Vol. 41, pp. 151-186). Academic Press.

Quintero Gil, D. C., Osorio Benítez, J. E. & Martínez-Gutiérrez, M. (2010). Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del Dengue. *Iatreia*, 23 (2).

Reisenman, C. E., Gregory, T., Guerenstein, P. G., & Hildebrand, J. G. (2011). Feeding and defecation behavior of *Triatoma rubida* (Uhler, 1894) (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions, and its potential role as a vector of Chagas disease in Arizona, USA. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 85 (4), 648-656.

Rodríguez, C. S., Carrizo, S. A., & Crocco, L. B. (2008). Comparison of feeding and defecation patterns between fifth-instar nymphs of *Triatoma patagonica* (Del Ponte, 1929) and *Triatoma infestans* (Klug, 1934) under laboratory conditions. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41 (4), 330-333.

Rodríguez, C. S., Crocco, L. B., & Nattero, J. (2004). Competencia vectorial de *Triatoma guasayana* (Hemiptera: Reduviidae): patrón de alimentación y excreción. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 63 (1-2), 11-16.

Rodríguez Diego, J. G., Pedroso Reyes, M., Olivares, J. L., Sánchez-Castilleja, Y. M., & Arece García, J. (2014). La interacción hospedero-parásito. Una visión evolutiva. *Revista de Salud Animal*, 36 (1), 1-6.

Rogers, M. E. & Bates, P. A. (2007). *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathogens*, 3 (6), e91.

Sanmartino, M., Saavedra, A. A., Barba, M., Parada, C. & Albajar-Viñas, P. (2015). Do not be afraid of us: Chagas disease as explained by people affected by it. *Interface-Comunicação, Saúde, Educação*, 19 (55), 1063-1075.

Santos, C. B. D., Leite, G. R., Sessa, P. A. & Falqueto, A. (2006). Dynamics of feeding and defecation in *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859)(Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and its potential in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101 (5), 543-546.

Schaub, G. A. (1988). Developmental time and mortality of larvae of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82 (1), 94-96.

Schaub, G. A. (1992). The effects of trypanosomatids on insects. En *Advances in parasitology* (Vol. 31, pp. 255-319). Academic Press.

Schaub, G. A. (2006). Parasitogenic alterations of vector behaviour. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 37-40.

Schaub, G. A. (2009). Interactions of trypanosomatids and triatomines. *Advances in insect physiology*, 37, 177-242.

Schaub, G. A. & Lösch, P. (1988). *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. *Experimental parasitology*, 65 (2), 174-186.

Schaub, G. A., & Lösch, P. (1989). Parasite/host-interrelationships of the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Blastocrithidia triatomae* and the reduviid bug *Triatoma infestans*: influence of starvation of the bug. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 83 (3), 215-223.

Schofield, C. J. (1980). Nutritional status of domestic populations of *Triatomainfestans*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74 (6), 770-778.

- Schofield, C. J. (1994). *Triatominae: biology & control*. Eurocommunica Publications.
- Schofield, C. J., & Galvão, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta tropica*, *110* (2-3), 88-100. Lent & Wygodzinsky, 1979
- Silva, I. G. D., & Silva, H. H. G. D. (1989). Estudo comparado do ciclo evolutivo de triatomíneos a duas temperaturas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, *84* (supl. 4), 499-500.
- Smallegange, R. C., van Gemert, G. J., van de Vegte-Bolmer, M., Gezan, S., Takken, W., Sauerwein, R. W., & Logan, J. G. (2013). Malaria infected mosquitoes express enhanced attraction to human odor. *PloS one*, *8* (5), e63602.
- Souza, W. D. (1999). A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *94*, 17-36.
- StatSoft. Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system). Versión 10. www.statsoft.com
- Storino, R., Jörg, M., & Auger, S. (2003). Atención médica del paciente chagásico. *Manual práctico. Un enfoque biológico, antropológico y social*. Buenos Aires: Ed. Ediprof.
- Takano-Lee, M., & Edman, J. D. (2002). Lack of manipulation of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) vector competence by *Trypanosoma cruzi*. *Journal of medical entomology*, *39* (1), 44-51.
- Trumper, E. V., & Gorla, D. E. (1991). Density-dependent timing of defaecation by *Triatoma infestans*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *85* (6), 800-802.
- Vallejo, G. A., Guhl, F. & Schaub, G. A. (2009). Triatominae–*Trypanosoma cruzi*/T. rangeli: Vector–parasite interactions. *Acta tropica*, *110* (2-3), 137-147.
- Vazquez-Prokopec, G. M., Cecere, M. C., Canale, D. M., Gürtler, R. E., & Kitron, U. (2005). Spatiotemporal patterns of reinfestation by *Triatoma guasayana* (Hemiptera: Reduviidae) in a rural community of northwestern Argentina. *Journal of medical entomology*, *42* (4), 571-581.

Wood, S. F. (1951). Importance of Feeding and Defecation Times of Insect Vectors in Transmission of Chagas' Disease. *Journal of Economic Entomology*, 44 (1), 52-4.

Zeledón, R., & Rabinovich, J. E. (1981). Chagas disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annual review of entomology*, 26 (1), 101-133.

Zeledón, R., Alvarado, R., & Jiron, L. F. (1977). Observations on the feeding and defecation patterns of three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). *Actatropica*, 34 (1), 65-77.

Zerba, E. N. (1999). Past and present of Chagas vector control and future needs: position paper.

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. D. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles, M. A., Romanha, A. J., Sturm, N. R., Tibayrenc, M. & Schijman A. G (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (7), 1051-1054.

ANEXO

Tabla 1. Resultados del ANOVA a un factor de variables registradas sobre ninfas de 3er y 5to estadio de *Triatoma infestans* infectadas y no infectadas con *Trypanosoma cruzi*.

Variable	F	g.l.	P
Peso inicial ninfas 3	20,05	1, 181	<0,0001
Peso final ninfas 3	0,07	1, 181	0,7879
Longitud inicial	15,43	1, 77	0,0002
Peso inicial	9,16	1, 77	0,0034
Estado Nutricional	5,35	1, 77	0,0235
Tiempo de ataque	0,36	1, 77	0,5478
Tiempo total de la alimentación	0,75	1, 77	0,3893
Tiempo hasta comienzo de la alimentación	0,76	1, 77	0,3859
Tiempo real de alimentación	0,05	1, 77	0,8296
Intentos de alimentación	0,01	1, 77	0,9214
Eventos de alimentación	0,08	1, 77	0,7797
Número de contactos	0,01	1, 77	0,9047
Peso de ingesta	4,86	1, 77	0,0304
Ganancia de peso	0,09	1, 77	0,7609
Tasa de alimentación	2,69	1, 77	0,1048
Tiempo de la primera deyección	10,82	1, 77	0,0015
Peso de las deyecciones	31,75	1, 77	<0,0001
Peso de las deyecciones relativizado al peso de ingesta	16,97	1, 77	0,0001
Número de deyecciones por insecto a los 5 min post-	5,08	1, 77	0,0271

Número de deyecciones por insecto a los 10 min post-	17,33	1, 77	0,0001
Número de deyecciones por insecto a los 60 min post-	55,05	1, 77	0,0001

F: estadístico F; g.l.: grados de libertad; P: probabilidad, las diferencias son significativas si $P < 0,05$.

Tabla 2. Resultados del ANOVA de medidas repetidas del número de deyecciones por insecto a cada intervalo de 10 min post-alimentación registrados sobre ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectadas y no infectadas con *Trypanosoma cruzi*.

Interacción (Tiempo×Infección)			Infección			Tiempo		
F	g.l.	P	F	g.l.	P	F	g.l.	P
1,4445	5	0,2074	55,0473	5	0,0001	20,4759	1	0,0001

F: estadístico F; g.l.: grados de libertad; P: probabilidad, las diferencias son significativas si $P < 0,05$.

Tabla 3. Resultados del análisis de independencia del porcentaje de insectos que defecaron registrados sobre ninfas de 5to estadio de *Triatoma infestans* infectadas y no infectadas con *Trypanosoma cruzi*.

Intervalo de tiempo	G	g.l.	P
0-5 min	5,33	1	0,0210
0-10 min	4,99	1	0,0254
10-20 min	0,49	1	0,4825
20-30 min	5,22	1	0,0224
30-40 min	9,20	1	0,0024
40-50 min	4,42	1	0,0354
50-60 min	2,47	1	0,1161

g.l.: grados de libertad; P: probabilidad, las diferencias son significativas si $P < 0,05$; G: estadístico G.