

APLICACIÓN DE TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS DE DEPREDACIÓN EN *TRIATOMA INFESTANS* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE)

Carmen Marta BONETTO *

SUMMARY: Immunological techniques applicable to the study of *Triatominae* biological control.

An immunological technique used to study the interrelation between prey and predator is described.

Immune serum was obtained by injecting extracts of eggs of *Triatoma infestans* of one week of age into rabbits and rats. The presence of antibodies was verified with Ouchterlony test.

The specificity of the serum and antiserum was tested in extracts of all stages of *Triatoma infestans*, in eggs and 1st. instar nymphs of *Rhodnius proxilus* and in adults of *Periplaneta americana*.

Only triatomines showed a positive reaction in Ouchterlony test, indicated by clear precipitation bands. No positive reaction was obtained for *Periplaneta americana*.

These results suggest that the antiserum used presents a marked specificity towards the subfamily *Triatominae*. This immunological method can be used, therefore, in the study of triatomophagy by cockroaches and in the study of the role of common predator of triatomines and cockroaches.

INTRODUCCIÓN

La utilización de técnicas inmunológicas aplicadas a la valoración y cuantificación de depredadores no ha sido frecuentemente incorporada a los estudios poblacionales de *Triatoma infestans* (Klug).

Sin embargo, el uso del modelo inmunológico es habitual en la investigación del comportamiento alimentario en insectos hematófagos (Wisnivesky-Colli *et al.*, 1980).

* Becaria del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Neurobiología, Departamento de Entomología, Serrano 665, 1414 Buenos Aires (Argentina).

| | | | | | | |
|--------|-----------|---------------------|-----|------|-----------------|-------------------|
| ECOSUR | Argentina | ISSN 0325 — 106X | v.9 | n.18 | pág. 133-140 | setiembre 1982 |
|--------|-----------|---------------------|-----|------|-----------------|-------------------|

Estas técnicas permitieron además conocer la tasa de depredación natural que soportan numerosas especies de insectos (Boreham *et al.*, 1978). En el caso de *Triatoma*, detectar y cuantificar los depredadores domiciliarios y peridomiciliarios es de gran importancia para planificar su control y posible erradicación.

Es el objetivo de este trabajo, por lo tanto, ofrecer un método que haga posible la identificación por técnicas inmunológicas de las proteínas presentes en huevos, ninfas y adultos de Triatominos que representen fuentes de alimentación de otros artrópodos a través de las cuales se pueda detectar y cuantificar a estos depredadores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron huevos procedentes de nuestro insectario, el cual a su vez tuvo por origen planteles cedidos por la colonia del Instituto "Fátala Chaben" (Buenos Aires), la que cuenta con once años de antigüedad.

Con el objeto de mantener el vigor de nuestros ejemplares para evitar el efecto de la endocría, fueron incorporados a la colonia a intervalos regulares, huevos colectados en el campo.

La alimentación de los insectos se realizó con gallinas ya que las aves no constituyen reservorios del *Tripanosoma cruzi* y, por lo tanto, no intervienen en la transmisión de la enfermedad de Chagas (Minter-Goedbloed y Croon, 1981). La dieta de las gallinas fue de maíz y lechuga, evitando la presencia de antibióticos en la sangre de las aves, dado que los simbiosis presentes en el tubo digestivo de *Triatoma infestans* podrían resultar dañados y, por ende, la producción de algunas vitaminas que ellos elaboran (Nyiradi, 1973).

Los especímenes de la colonia fueron seleccionados, descartándose aquéllos anormales, de menor tamaño, etc, a fin de contar con un stock de individuos aptos, de alta fecundidad y con características fenotípicas asimilables a las halladas en la naturaleza.

A los efectos de desarrollar los estudios programados se efectuaron los siguientes procedimientos y técnicas: a) dosaje de componentes químicos; b) preparación de los antígenos; c) planificación de las inoculaciones; d) desarrollo de técnicas de Ouchterlony; y e) pruebas de especificidad.

a) Dosaje de componentes químicos

En una primera etapa fue necesario valorar las proteínas presentes en una muestra tipo, representada por huevos de *Triatoma infestans* de 4 a 6 días de desarrollo embrionario, color blanco amarillento, forma elipsoide y hundimiento lateral de corion (Villar *et al.*, 1979).

De este modo, 125 mg de huevos se homogeneizaron en 5 ml de solución fisiológica. El homogenato fue centrifugado a 12 000 x g durante media hora, siendo el sobrenadante valorado según Lowry *et al.*, (1951). La concentración obtenida fue de 5 mg de proteína por ml.

b) Preparación de los antígenos

La concentración de proteínas por ml de muestra resultó la adecuada para iniciar las inoculaciones, de modo que se prepararon extractos de 5 y 10 mg de proteínas por ml para inyectar en ratas y conejos, respectivamente.

c) Planificación de las inoculaciones

Obtenidos los antígenos, se utilizaron a razón de 1 ml en conejos, o sea, 10 mg de proteína y 0,5 ml en ratas, lo que es igual a 2,5 mg proteicos más adyuvante de Freund completo, en partes iguales.

La secuencia de inoculaciones fue la siguiente: dos inyecciones del antígeno en conejos, mediando 7 días entre la primera y la segunda, en tanto que en ratas fueron necesarias 3 dosis, las dos primeras distanciadas en 7 días y en 15, la segunda y la tercera. Tres semanas después de la última inoculación se realizaron reestimulaciones cada 30 días con el objeto de mantener elevado el tenor de anticuerpos circulantes en los ejemplares.

d) Técnica de Ouchterlony (1958; 1962)

Los animales fueron sangrados a los 6 días de finalizadas las inoculaciones, obteniéndose el suero correspondiente a cada ejemplar. Suero y antisuero se sembraron en placas de agar según la técnica de Ouchterlony, basada en la posibilidad de hacer migrar Ag y Ac de modo que al encontrarse interaccionen formando bandas de precipitación (Margni, 1972).

e) Pruebas de especificidad

Teniendo por objeto verificar la especificidad de los antígenos, así como de los anticuerpos obtenidos, se aplicó la técnica de Ouchterlony que permite establecer interrelaciones entre antígenos que comparten todos, algunos o ninguno de sus componentes.

En tal sentido se prepararon extractos totales de los distintos estadios de *Triatoma infestans* (T.i.), de huevos (H) y ninfas (N) de 1^{er}. estadio de *Rhodnius prolixus* (R.p.) vector de la enfermedad de Chagas en otras regiones de América, así como de la cucaracha *Periplaneta americana* (P.a.) (tabla I). El material fue procesado según lo descrito en los puntos a y b.

Al obtenerse una respuesta inmunológica semejante para los dos sueros, ratas y conejos, se utilizó preferentemente este último debido a su más sencilla extracción.

TABLA I

Pruebas de especificidad realizadas con extractos de los distintos estadios de *T. infestans*, huevos y ninfas de primer estadio de *Rhodnius prolixus* y adultos de *Periplaneta americana*.

| Extracto | Valores correspondientes al homogenato | | | mg de proteínas por individuo | Test de Ouchterlony |
|---|--|----------------------------|--------------------|-------------------------------|---------------------|
| | Nº de ejemplares | ml de solución fisiológica | mg de proteínas/ml | | |
| <u>T. infestans</u> Huevos | 55 | 5 | 5,9 | 0,107 | ++ |
| Ninfa 1 | 100 | 5 | 3,7 | 0,037 | ++ |
| Ninfa 2 | 30 | 5 | 2,0 | 0,066 | + |
| Ninfa 3 | 10 | 5 | 2,1 | 0,210 | + |
| Ninfa 4 | 10 | 5 | 2,7 | 0,270 | + |
| Ninfa 5 | 30 | 5 | 22,0 | 0,733 | + |
| Machos | 6 | 5 | 10,0 | 1,666 | + |
| Hembras | 6 | 5 | 11,0 | 1,833 | + |
| <u>Rhodnius prolixus</u> Huevos | 200 | 5 | 7,0 | 0,035 | ++ |
| Ninfa 1 | 300 | 5 | 1,7 | 0,005 | + |
| <u>Periplaneta americana</u> Adultos | 6 | 5 | 28,5 | 4,750 | - |

++ positivo
+ débilmente positivo

RESULTADOS

Como era de prever, realizando extractos totales de ninfas y adultos de *Triatoma infestans*, numerosas características proteicas podrían ser compartidas con el antígeno utilizado en las inoculaciones y preparado en base a huevos de la misma especie, o sea, los anticuerpos del suero deberían reaccionar frente a los distintos homogenatos formando bandas continuas o parcialmente continuas. El test de Ouchterlony mostró la formación de bandas continuas o, lo que es igual, una reacción de total identidad para los extractos de huevo y ninfa de primer estadio, tanto en *Rhodnius* como en *Triatoma*, evidenciándose para los restantes extractos reacciones de identidad parcial.

- Reacción de identidad inmunológica parcial entre los extractos H (T.i.), N (T.i.), elaborados a partir de huevos y ninfas de primer estadio de *Triatoma infestans* y N₂ (T.i.), o sea, ninfas de segundo estadio de la misma especie.
- Reacción de identidad inmunológica parcial entre los extractos H (R.p.), N₁ (R.p.), elaborados a partir de huevos y ninfas de primer estadio de *Rhodnius prolixus* y N₂ (T.i.).
- Reacción de identidad inmunológica parcial entre los extractos H (R.p.), H (T.i.) y N₄ (T.i.), elaborados a partir de huevos de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*, así como de ninfas de cuarto estadio de la misma especie.
- Reacción de identidad inmunológica parcial entre los extractos H (T.i.), N₃ (T.i.) y N₅ (T.i.), elaborados a partir de huevos y ninfas de tercer y quinto estadio de *Triatoma infestans*.
- Reacción de identidad inmunológica parcial entre los extractos m (T.i.) y h (T.i.), elaborados a partir de machos y hembras de *T. infestans*.

Estos resultados indican que los anticuerpos obtenidos a partir del extracto de huevos son capaces de reconocer como propias todas o algunas de las proteínas presentes en la hemolinfa de ninfas y adultos de *Triatoma infestans*, así como de ninfas de primer estadio y huevos de *Rhodnius prolixus*.

La especificidad manifiesta a nivel de subfamilia se expresó tanto en el tipo de reacciones obtenidas (identidad total y parcial) como en la nitidez de dichas bandas caracterizadas como Ouchterlony positivas y débilmente positivas (tabla I).

En cambio, no se detectaron bandas de precipitación para el extracto de *Periplaneta americana* (fig. 5). resultado previsible tratándose de dos especies tan distantes taxonómicamente pero que a los efectos de este estudio representa una gran ventaja operativa.

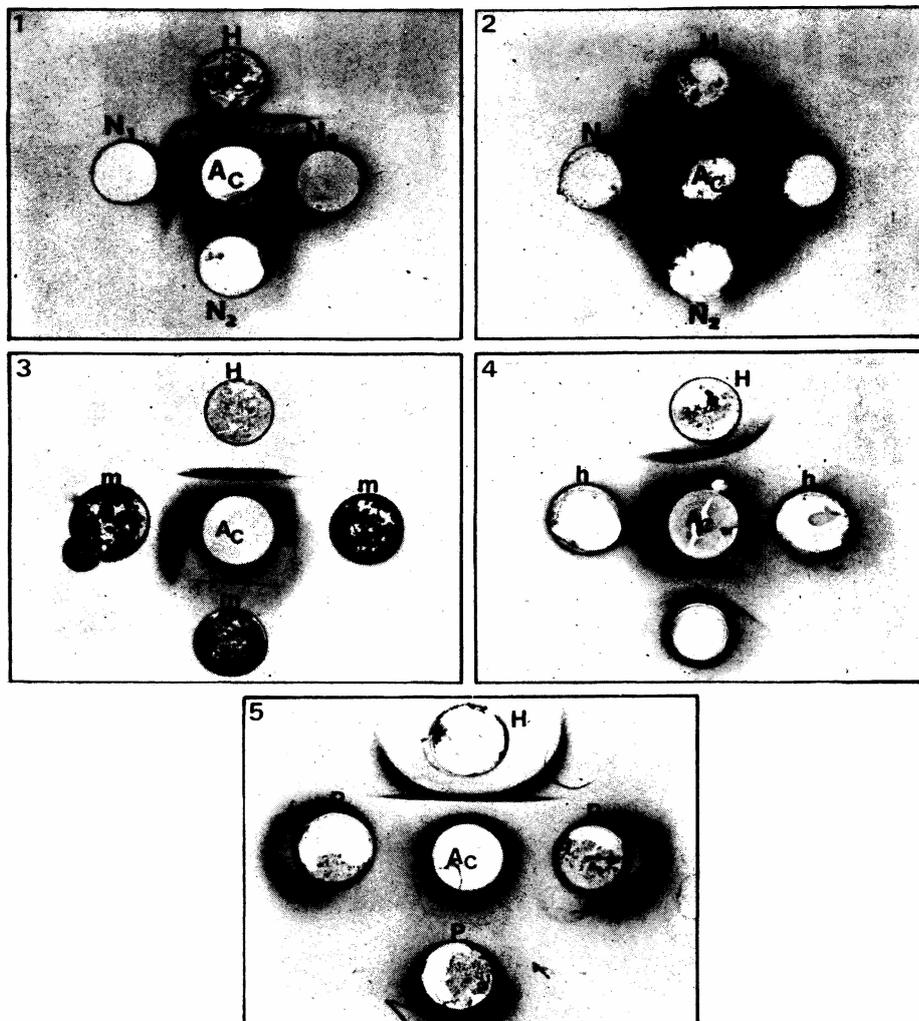


Fig. 1: Reacción de identidad inmunológica total entre los extractos H (T.i) y N₁ (T.i) elaborados a partir de huevos y ninfas de primer estadio de *Triatoma infestans*.

Reacción de identidad inmunológica parcial entre los ya mencionados extractos y N₂ (T.i), o sea, ninfas de segundo estadio de la misma especie.

Fig. 2: Reacción e identidad inmunológica total entre los extractos H (R.p) y N₁ (R.p) elaborados a partir de huevos y ninfas de primer estadio de *Rhodnius prolixus*.

Reacción de identidad inmunológica parcial entre dichos extractos y N₂ (T.i).

Fig. 3: Reacción de identidad parcial inmunológica entre los extractos H (T.i) y M (T.i) elaborados a partir de huevos y machos de *Triatoma infestans*, post-alimentación.

Fig. 4: Reacción de identidad inmunológica parcial entre los extractos H (T.i) y h (T.i) elaborados a partir de huevos y hembras de *Triatoma infestans*, post-alimentación.

Fig. 5: Reacción de no identidad inmunológica entre los extractos H (T.i) y P (P.a), elaborados a partir de huevos de *T. infestans* y adultos de *Periplaneta americana*.

DISCUSIÓN

De las numerosas técnicas cualitativas y cuantitativas basadas en el principio de difusión de macromoléculas a través de geles, fue elegido el sistema de Ouchterlony. Su utilización permitió comparar antígenos que comparten algunas, todas, o ninguna característica, pudiéndose así establecer a las 24 horas el grado de especificidad de extractos y anticuerpos.

Perassi (1972), utilizando métodos electroforéticos, estudió la hemolinfa de huevos, ninfas y adultos de *T. infestans*, hallando semejante composición proteica en huevos y ninfas de primer estadio, así como diferencias entre los distintos estadios ninfales y los adultos.

A pesar de las citadas variaciones en cuanto a composición proteica, la formación de bandas a partir de todos los extractos del *Triatoma*, el tipo de reacciones obtenidas y la nitidez de las mismas muestran la eficiencia del sistema propuesto para diferenciar proteínas de huevos, ninfas y adultos de vinchucas en el tracto digestivo del probable depredador.

De igual modo, las reacciones de identidad inmunológica parcial obtenidas para los extractos de *R. prolixus* y *T. infestans*, indican una especificidad manifiesta a nivel subfamilia, dato que se encuentra avalado por estudios electroforéticos de hemolinfa en distintos Triatominos (Zeledón y Morúa, 1963).

Por otra parte, la ausencia de bandas de precipitación para el extracto de *Periplaneta americana*, supone una ventaja operativa al impedir el enmascaramiento de los resultados por reacción cruzada en caso de que ambas especies, por coexistir en el domicilio y peridomicilio de áreas endémicas, pudieran ser presas de un mismo depredador.

También es de importancia que, tanto observaciones efectuadas en nuestro laboratorio como estudios de triatominofagia en Blatarios (Zerpa y Yépez, 1967), revelan la capacidad de estos insectos para capturar e ingerir Triatominos vivos o muertos en estado de repleción.

En el caso de *Triatoma infestans*, un estado nutricional superior al normal (de más de 13 mg/mm) expresado por la relación P/L: peso del cuerpo en mg sobre longitud en mm (Schofield, 1980), podría implicar la intervención de dos factores:

- Muerte por repleción
- Marcada disminución de la movilidad y, por ende, mayores posibilidades de ser tomados como presa.

Pueden ser muchas las circunstancias condicionantes de la triatominofagia en Blatarios. Consecuentemente, cabe aún preguntarse cuál es el rol que le incumbe a la cucaracha doméstica como depredador activo del vector.

Sería a su vez interesante que estos estudios se hicieran extensivos a diferentes artrópodos depredadores que cohabiten con *Triatoma* en áreas endémicas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado bajo la supervisión del Dr. C. J. Schofield y contó con los aportes del Bioquímico Oscar Crespo.

BIBLIOGRAFÍA

- BARRETT, T. V. 1975. Parasites and predators of Triatominae. American Trypanosomiasis Research. Scientific Publication n° 318.
- BOREHAM, P. F. L. y OHIAGU, C. E. 1978. The use of serology in evaluating invertebrate pre-predator relationships: a review. *Bull. Ent. Res.* 68: 171-194.
- GALLARDO ZERPA, M. y YEPEZ, M. S. 1967. Probable acción vectora de Blatarios contaminados con el *Tripanosoma cruzi* Chagas, 1909 mediante triatominofagia. *Acta Biol. Ven.* 5, art. 6: 255-266.
- HINTON, H. E. y SLIFER, E. H. 1981. *Biology of insect eggs*. Pergamon Press. Oxford.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L. y RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MARGNI, R. A. 1972. *Inmunología e Inmunología química*. Ed. G. Fernández, Argentina, 423.
- MINTER-GOEDBLOED, E. y CROON, J. J. A. B. 1981. The insusceptibility of chickens to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75: 350-353.
- NYIRADI, S. 1973. The germfree culture of three species of Triatominae: *Triatoma protracta* (Uhler), *T. rubida* (Uhler) and *Rhodnius prolixus* Stal. *J. Med. Ent.* 10: 417-448.
- OUCHTERLONY, O. 1958, 1962. Diffusion in gel methods for immunological analysis. I. II. *Progress in Allergy* 5: 1; 6: 30.
- PERASSI, R. 1972. Antigenic components en *Triatoma infestans* haemolymph. *Insect. Physiol.* 18: 1961-1966.
- 1973. Female specific proteins in *Triatoma infestans* haemolymph. *J. Insect. Physiol.* 19: 663-671.
- SCHOFIELD, C. J. 1980. Nutritional status of domestic populations of *Triatoma infestans*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 74: 770-777.
- VILLAR, M. I. P. de; ZERBA, E. N.; WOOD, E. J. y LICASTRO, S. A. de. 1979. Neurogénesis and occurrence of cholinesterase in eggs of *Triatoma infestans*. *Comp. Biochem. Physiol.* 65 C: 65-70.
- WISNIVESKY-COLLI, C.; FREY, C. y SOLARZ, N. 1980. Detection of host proteins in the intestine of *Triatoma infestans* by agar double diffusion test. *Rev. Med. Trop.* 22 (3): 118-123.
- ZELEDÓN, R. y MORÚA, E. I. 1963. Análisis electroforético de la hemolinfa de algunas especies de triatominos (Hemiptera: Reduviidae). *Rev. Biol. Trop.* 11 (2): 185-195.