

## Tesis de Posgrado

# Inhibición alimentaria y alteraciones poblacionales producidos por el bloqueo de la recepción sensorial en *Triatoma infestans*

Vassena, Claudia Viviana

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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

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

**Cita tipo APA:**

Vassena, Claudia Viviana. (1996). Inhibición alimentaria y alteraciones poblacionales producidos por el bloqueo de la recepción sensorial en *Triatoma infestans*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2889\\_Vassena.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2889_Vassena.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Vassena, Claudia Viviana. "Inhibición alimentaria y alteraciones poblacionales producidos por el bloqueo de la recepción sensorial en *Triatoma infestans*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2889\\_Vassena.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2889_Vassena.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**"Inhibición Alimentaria y Alteraciones Poblacionales Producidos por el  
Bloqueo de la Recepción Sensorial en *Triatoma infestans*"**

*Claudia Viviana Vassena*

Director de Tesis: Dra. María Inés Picollo

Lugar de Trabajo: Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas  
CIPEIN-CITEFA/CONICET

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires

-1996-

12386

172



---

## Inhibición Alimentaria y Alteraciones Poblacionales Producidos por el Bloqueo de la Recepción Sensorial en *Triatoma infestans*.

C. V. Vassena

La tendencia actual en el control químico y racional de plagas es el uso de compuestos de acción específica. Los inhibidores alimentarios preingestivos producen en insectos bloqueo de receptores sensoriales responsables de la selección de la fuente de alimento. Teniendo en cuenta que dicho bloqueo puede ser producido por compuestos que reaccionan con grupos -SH de estructuras sensoriales de insectos, se evaluó la inhibición alimentaria producida por compuestos reactivos de sulfhidrilo (N-alkil maleamatos de metilo) sobre *Triatoma infestans* (vinchuca), principal vector de la enfermedad de Chagas en nuestro país.

El tratamiento de ninfas V de *T. infestans* con los compuestos sintetizados produjo bloqueo total de la percepción de la fuente de alimento. La efectividad fue mayor para los isómeros *cis* puros respecto a los correspondientes *cis-trans*. Cuando predomina la vía de ingreso cuticular, la mayor efectividad fue para los compuestos de cadena sustituyente más larga ( $DL_{50}=1.9\mu\text{g}/\text{l}$  para *cis* octilo vs  $16.3\mu\text{g}/\text{l}$  para *cis* etilo por aplicación tópica) ( $DL_{50}=3.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$  para *cis* octilo vs  $136.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$  para *cis* etilo por interposición de tela tratada). La exposición continua de poblaciones experimentales de *T. infestans* produjo disminución poblacional significativa durante 250 días (para *cis* butilo) hasta más de 400 días (para *cis* etilo).

El estudio de la respuesta de vinchucas tratadas a fuentes de estímulo químico y térmico demostró correlación de efecto antialimentario con bloqueo de termoreceptores. El uso de inhibidores alimentarios en el control de poblaciones de *Triatoma infestans*, representan una alternativa promisoría en el control de insectos plaga con compuestos selectivos de bajo riesgo ambiental.

**Palabras claves:** *Triatoma infestans*, inhibición alimentaria, bloqueo sensorial, reactivos de sulfhidrilo, control insectos.

## Feeding Inhibition and Experimental Population Reduction Caused by Receptor Blockage on *Triatoma infestans*.

C. V. Vassena

There is an increased interest in managing pest populations with reduced amounts of specific compounds. Preingestive feeding inhibitors act through sensorial receptors involved in host selection. As sulfhydryl reagents produce receptor blockage, the feeding inhibition caused by some of them, the N-alkyl methyl maleamates, was determined against *Triatoma infestans* a principal vector of Chagas' Disease in Argentina.

Nymph V exposure to these compounds blocked food selection. Feeding inhibition of *cis* isomers was greater than *cis-trans* isomers. When cuticular via was predominant, the best effectivity was observed for the longest alkyl chain ( $LD_{50}=1.9\mu\text{g}/\text{l}$  for *cis* octyl vs  $16.3\mu\text{g}/\text{l}$  for *cis* ethyl by topical application) ( $LD_{50}=3.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$  for *cis* octyl vs  $136.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$  for *cis* ethyl by impregnated gauze interposition).

The continuous exposure of *T. infestans* experimental populations produced significant decrease from 250 days (for *cis* buthyl) to 400 days (for *cis* ethyl). Treated nymph response to thermo and chemical stimulus showed correlation between antifeeding inhibition and receptor blockage. These results suggest a specific alternative method to pest insect control.

**Key words:** *Triatoma infestans*, feeding inhibition, sensorial blockage, sulfhydryl reagents, insect control.

---

**A Mis Padres  
A Mi Esposo  
A los que  
Siempre Están**

Deseo expresar mi sincero agradecimiento a la Dra. *María Inés Picollo* por acompañarme en todos estos años en el camino de la Entomotoxicología, por su constante apoyo en el trabajo diario, por su dedicación en esta tesis y la sincera amistad brindada.

Agradezco

Al Dr. *Eduardo Zerba* por su interés en mi trabajo, su apoyo y sus enseñanzas en el área de la química, por sus consejos y por brindarme todos los medios necesarios para la realización de este trabajo.

Al Dr. *Raúl Alzogaray* por su permanente ayuda con las computadoras y sus múltiples programas, por corregir mis faltas de ortografía, por su humor y su cariño.

A la Sra. *Susana Figueredo* que con paciencia y cariño me transmitió su conocimiento en la cría de insectos (y por darme bichos sin pedirlos con anticipación).

A la Dra. *Andrea Fontán* por la importante colaboración y amena compañía durante los experimentos realizados, por la corrección de este trabajo y por su cariño.

A la Lic. *Paola Gonzalez Audino* por sus abundantes síntesis, a la Lic. *Adriana Martínez* por sus cromatogramas y al Lic. *Hector Masuh* por su colaboración en el manejo de los programas de computación y a los tres por el humor y el afecto con que matizaron estos años.

A la Dra. *Adriana Casadío* y a las Sras. *María Segovia* y *Emilia Seccacini* por cuidarme los bichos en el verano y por el apoyo administrativo pero sobre todo por su afecto y cariño en todos estos años, por las alegrías y porque no, las tristezas compartidas.

A las Dras. *Norma Casabé* y *Susana Licastro* por su colaboración en el campo de la química y sus ayudas gramaticales.

Al Dr. *Claudio Lazzari* por sus opiniones, consejos, corrección del manuscrito y por su labor como consejero de estudios.

A los Dres. *Bachmann* , *Bernacchi*, *De Carlo*, *Esnal*, *Thiel* y *Wood* porque gracias a sus generosas referencias sobre mí el Conicet evaluó favorablemente mis presentaciones a Beca.

A la Dra. *Carmen de la Serna* mi primera consejera e iniciadora en el camino de la Entomología.

A *Gladis*, *Gustavo*, *Natalia*, *Oscar* y *Susana* por su apoyo y amor y a mis muchos amigos y a mi familia política porque cada uno me ayudó a su manera a enfrentar los incontables problemas cotidianos.

A mi esposo *Guillermo Guarducci* por su amor, su respeto y confianza en lo que hago y a *Florencia Guarducci* por su alegría, su sonrisa y por el amor especial que nos une.

Por último y sobre todo deseo agradecer a mi familia, mis papás, *Tato* y *Pichi* porque me enseñaron todo aquello que no se aprende con instrucción porque me inculcaron amor a la naturaleza, por su comprensión y apoyo moral y porque les debo mucho de lo que soy. Y a *Karina* mi hermanita por su amor en todo momento.

Y a las Palomas.

Agradezco a las Sigüientes Instituciones

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Conicet) y al Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas de las Fuerzas Armadas (Citefa) instituciones a las que pertenece el Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas, lugar donde desarrollé mis actividades y en especial al Conicet ya que a través de sus becas se concretó este trabajo. La financiación del trabajo provino de subsidios otorgados a nuestro laboratorio por Chemotecnica Sintyal, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) y el Conicet.

I.	INTRODUCCION.	pag.
1.	Enfermedad de Chagas.	1
	1.1. <i>Síntomas de la Enfermedad de Chagas.</i>	2
2.	Los Triatominos como Vectores de la Enfermedad de Chagas.	2
	2.1. <i>Ciclo de Vida de <u>Triatoma infestans</u>.</i>	4
3.	Control de la Enfermedad de Chagas en Argentina.	5
4.	Control Químico.	7
	4.1. <i>Modo de Acción de Insecticidas Neurotóxicos.</i>	7
5.	Transmisión del Impulso Nervioso.	7
	5.1. <i>Transmisión Neuronal.</i>	7
	5.2. <i>Transmisión Sináptica.</i>	11
6.	Alteraciones de la Transmisión Nerviosa.	12
7.	Modo de Acción de Compuestos Neurotóxicos en Insectos.	13
	7.1. <i>Insecticidas que Afectan la Membrana Nerviosa.</i>	13
	7.2. <i>Insecticidas Anticolinesterásicos.</i>	15
8.	Receptores Sensoriales en Triatominos.	17
	8.1. <i>Generalidades de Receptores Sensoriales.</i>	17
	8.2. <i>Clasificación General de los Receptores.</i>	19
	8.3. <i>Tipos de Sensilias y Receptores Sensoriales en <u>Triatoma infestans</u>.</i>	20
	8.4. Receptores y Neuronas Sensoriales.	21
	8.4.1. <i>Receptores Olfatorios.</i>	22
	8.4.2. <i>Receptores Gustativos.</i>	23
9.	Antecedentes de Inhibición Alimentaria.	24
	9.1. <i>Bloqueo de Receptores Sensoriales.</i>	25
	9.2. <i>Importancia de los Antialimentarios para el Control de Insectos.</i>	28
II.	OBJETIVOS.	29



III.	MATERIALES Y MÉTODOS.	30
1.	Material.	30
	1.1. <i>Biológico.</i>	30
	1.2. <i>Químico.</i>	30
2.	Métodos.	31
	2.1. Evaluación del Efecto Antialimentario.	31
	2.1.i. <i>Aplicación por Tópico.</i>	31
	2.1.ii. <i>Exposición a Papeles Impregnados.</i>	32
	2.1.iii. <i>Interposición de Telas Impregnadas.</i>	33
	2.1.iv. <i>Determinación de Efecto Residual de Papeles Impregnados.</i>	33
	2.2. Evaluación del Efecto sobre Poblaciones Experimentales.	34
	2.2.i. <i>Tratamiento Estadístico de los Resultados.</i>	35
	2.3. Medición de la Respuesta a Estímulo Térmico y Químico.	36
	2.3.i. <i>Diseño de los Ensayos.</i>	36
	2.3.ii. <i>Medición de Actividad General de los Insectos.</i>	36
	2.3.iii. <i>Medición de Actividad hacia Fuentes de Estímulo Térmico y Químico.</i>	37
	2.3.iv. <i>Tratamiento Postensayo de los Insectos.</i>	39

IV.	RESULTADOS Y DISCUSION.	40
1.	Efecto Antialimentario en <i>Triatoma infestans</i> .	40
	1.i. <i>Aplicación por Tópico.</i>	40
	1.ii. <i>Exposición a Papeles Impregnados.</i>	42
	1.iii. <i>Interposición de Telas Impregnadas.</i>	43
2.	Efecto Sobre Poblaciones Experimentales.	46
	2.1. <i>Efecto de cis-trans Maleamatos Sobre Poblaciones Experimentales.</i>	46
	2.2. <i>Efecto de cis Maleamatos Sobre Poblaciones Experimentales.</i>	51
3.	Efecto Sobre la Actividad de los insectos.	58
	3.1. <i>Efecto de BMM en la Actividad Espontánea.</i>	58
	3.2. <i>Efecto de BMM en la Actividad de Respuesta a Estímulos Térmicos y Químicos.</i>	59
V.	CONCLUSIONES.	68
VI.	BIBLIOGRAFIA.	71
VII.	APENDICE.	80

## I. INTRODUCCION

---



## 1. Enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas es una zoonosis endémica en América del Sur y América Central, transmitida por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (WHO/TDR Report, 1989-1990). Los triatominos pertenecen a la familia Reduviidae. Presentan una amplia distribución en América y su mayor importancia radica en que son los vectores de *Trypanosoma cruzi*, protozoo parásito causal de la enfermedad de Chagas. Se estima que hay alrededor de 18 millones de personas que están infectadas por *Trypanosoma cruzi* y que 90 millones corren el riesgo de contraer la enfermedad.

Con el objetivo de interrumpir antes del año 2000 la transmisión de esta enfermedad la Organización Mundial de la Salud organizó en los años 80 la llamada "Iniciativa del Cono Sur". En los seis países que forman parte de dicha iniciativa (Argentina, Brasil, Chile, Uruguay, Paraguay y Bolivia) viven algo más de 60 millones de personas con alto riesgo de adquisición de la enfermedad y donde se contabilizan 11 millones de infectados. De las cifras anteriores se puede derivar una incidencia de infecciones humanas de 1 millón de casos nuevos por año y un total de 45.000 muertes anuales por lesiones cardíacas irreversibles. El impacto económico de la enfermedad es muy alto ya que las lesiones cardíacas afectan en su mayoría a personas jóvenes en edad laboral productiva. Si utilizamos como un indicador de la carga económica impuesta por la enfermedad los años de vida discapacitante perdidos por los pacientes, vemos que éstos suman u\$s 2.700.000, lo cual coloca a la Enfermedad de Chagas en el tercer lugar en el mundo entre las enfermedades tropicales después de la Malaria y la Esquistosomiasis. Mas aún, es la cuarta causa del total de las enfermedades transmisibles en América Latina y el Caribe después de las infecciones respiratorias infantiles, las enfermedades diarreicas y el SIDA (Moncayo, 1994).

### 1.1. *Síntomas de la Enfermedad de Chagas.*

La infección con *Trypanosoma cruzi* tiene un período de incubación de 4 a 10 días, donde el paciente presenta una parasitemia relativamente alta en general acompañada de fiebre, adenopatía y una llaga o chagoma en la zona de penetración del parásito (Schofield, 1994). La manifestación primaria de la enfermedad a menudo es suave aunque puede ser fatal en niños, ya que el 50 % muere por miocarditis o meningoencefalitis (Moncayo, 1993).

Al estado agudo de la enfermedad se sucede la infección inicial y pasados 2 a 4 meses se entra en la fase crónica. Durante esta etapa los parásitos penetran y se multiplican en las células de los órganos vitales causando daños irreversibles en los tejidos, en particular al sistema nervioso autónomo y a la musculatura no estriada originando lesiones digestivas o megavisceras y cardiomiopatías severas (Schofield, 1994). Sin embargo la complicación más importante de la enfermedad se desarrolla dentro de los 10 a 20 años posteriores a la infección primaria. En estos pacientes la enfermedad se manifiesta como cardiopatías crónicas que progresan hasta producir la muerte del enfermo (Moncayo, 1993).

## 2. Los Triatominos Como Vectores de la Enfermedad de Chagas.

En la actualidad se conocen 118 especies de triatominos, de los cuales la mitad pueden ser portadores de *Trypanosoma cruzi* (Schofield, 1985). De todas ellas *Triatoma infestans* es el vector más importante relacionado con la biología y la transmisión de *T. cruzi* por su condición estrictamente domiciliaria (Carcavallo, 1987) y el vector más ampliamente distribuido en áreas endémicas de Argentina, Chile, Bolivia, Brasil, Paraguay, Perú y Uruguay. Tan amplia distribución cubre una gran variedad de climas, por ejemplo desde menos de 10°C en el sur de Argentina a 27°C en el Noreste de Brasil, lugares casi desérticos y lugares con un amplio régimen de lluvias. *Triatoma infestans* sobrevive a estas fluctuaciones estacionarias y climáticas ya que encuentra un excelente microclima en las casas y el ambiente doméstico.

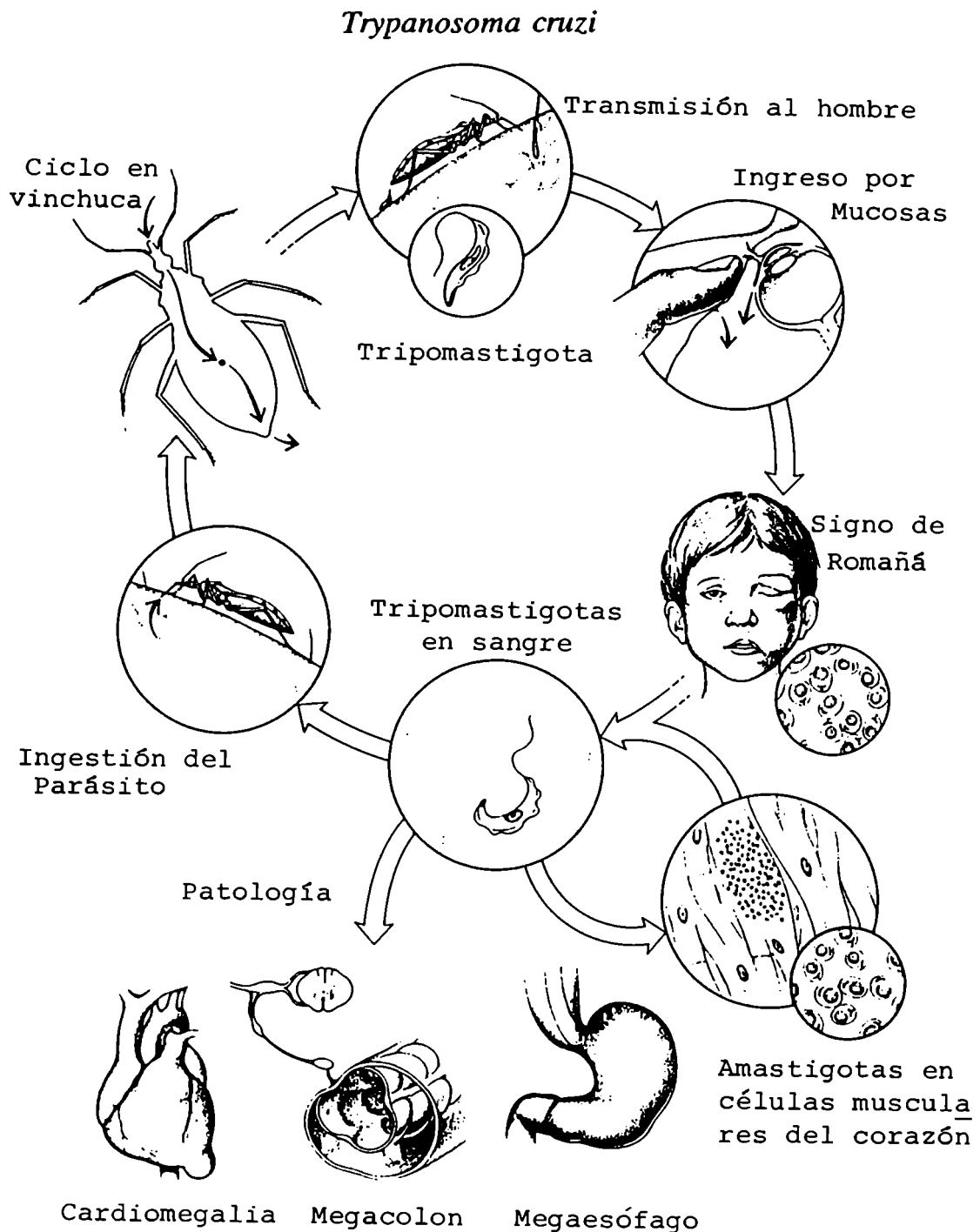
La mayoría de las especies de triatomíneos ocupan hábitats selváticos. Dichos hábitats pueden incluir nidos de aves, madrigueras de zarigüeyas, nidos de pequeños roedores y cuevas con murciélagos. Algunas especies también invaden y colonizan los hábitats peridomésticos tales como los gallineros y corrales de cabras y vacas, así también como viviendas humanas (Schofield, 1994).

Hay tres especies perfectamente adaptadas a los hábitats humanos y son las que tienen prevalencia en la transmisión de *T. cruzi* al hombre. Dichas especies son *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*. *Triatoma infestans* en Argentina, Uruguay, Brasil, Bolivia, Paraguay, Chile y Perú tiene predominio en zonas rurales. *Triatoma dimidiata* es el principal vector en Ecuador y América Central y *Rhodnius prolixus* en Venezuela y Colombia (Carcavallo, 1987).

Los insectos triatomíneos usualmente viven en las grietas de las paredes de las casas, en su mayoría del área rural y periurbana. Durante la noche emergen de dichas grietas y se acercan al hospedador para succionar su sangre mientras éste duerme.

El parásito, *Trypanosoma cruzi*, no se transmite por la picadura del insecto, sin embargo en el momento en que se está alimentando, la vinchuca puede defecar, evacuando los parásitos junto con sus deyecciones. De esta forma, los parásitos penetran por la herida cuando la persona se rasca. Las vinchucas contraen la infección alimentándose de algún mamífero o ser humano infectado, y conservan la infección durante toda su vida. A partir de la década de los años 1970, la enfermedad se ha urbanizado, a causa de donaciones de sangre de personas infectadas, provenientes de zonas endémicas. Se conocen entonces dos formas principales de transmisión: vectorial y transfusional (Moncayo, 1994).

En la Fig. 1 se muestra en forma detallada el ciclo completo de transmisión (Despommier, et al., 1995).



**Fig. 1. Esquema del ciclo de transmisión de la enfermedad.**

### 2.1. *Ciclo de Vida de Triatoma infestans (vinchuca).*

La vinchuca pasa por cinco estados ninfales y una etapa adulta reproductiva. Este desarrollo se completa en 5 a 12 meses, tiempo relativamente largo en comparación con otros insectos vectores.



Esta chinche hematófaga en su estado adulto mide 3 cm de largo, posee color oscuro (marrón a negro) y bandas claras amarillentas a lo largo del conxivo del abdomen. Su cabeza es alargada con un par de ojos grandes, un par de ocelos y un rostro fuerte doblado por debajo y a lo largo de la cabeza. Todos los adultos poseen dos pares de alas rebatidos sobre la parte dorsal del abdomen. El primer par de alas tiene la mitad basal coriácea y la mitad distal membranosa. Se denomina hemiélitro y es el responsable del nombre del grupo hemípteros (*hemi*: mitad, *pteros*: alas).

Los huevos son ovales y amarillentos, tornando a rojizos a medida que avanza en su desarrollo embrionario y presentan un opérculo por donde la ninfa emerge. En nuestro laboratorio y en condiciones favorables de temperatura y humedad (28°C - 50% HR) las ninfas pequeñas eclosionan en 15-17 días (Zerba y Picollo, 1987).

Las vinchucas son muy eficaces en la búsqueda de alimento y son capaces de detectar al huésped a largas distancias y orientarse hacia él (Nuñez, 1987), pero pueden sobrevivir al ayuno varios meses.

### **3. Control de la Enfermedad de Chagas en Argentina**

Las acciones para controlar la transmisión de la parasitemia en Argentina tienen como inicio actividades efectuadas por Cecilio Romaña en Chaco, Carlos Soler en La Rioja y Carlos Bravo en Catamarca en los años 50. A partir de 1962 se organiza el Servicio Nacional de Control de Chagas y el Instituto Nacional de Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chabén", con el objetivo de efectuar el control de la transmisión vectorial en diez provincias Argentinas y el control de la transmisión por transfusión sanguínea. A partir de 1974 todas las provincias fueron incluidas en este programa (Chuit, 1994).

Como resultados alentadores, entre 1982 y 1993 se observó una disminución de alrededor de 75% en los índices generales de infestación domiciliar en 13 de las 15 provincias endémicas. La tasa de incidencia anual en jóvenes de 18 años que realizan el Servicio Militar, bajó de 4,8 % en 1982 a 1,2 % en 1993 (Moncayo, 1994).

Con respecto al tratamiento de la infección primaria se pueden utilizar quimioterápicos, pero éstos presentan fuertes efectos colaterales y además el diagnóstico primario de la parasitemia es dificultoso de realizar.

Por otra parte la perspectiva de una vacuna efectiva es aún distante (WHO/TDR Report, 1989-1990).

Por lo expuesto se puede observar que hasta el presente la forma más efectiva de controlar la enfermedad es interrumpiendo la transmisión vectorial. Esta transmisión es dependiente de la densidad de insectos y, por lo tanto, la educación sanitaria y el uso de insecticidas para interferir el ciclo reproductivo ayudaría a mantener la población de Triatomíneos por debajo de los niveles en los cuales la probabilidad de transmisión de *T. cruzi* se torne significativa (Salomón, 1988).

Afortunadamente, los métodos de control basados en tratamientos con insecticidas han demostrado ser altamente efectivos, no sólo porque reducen la densidad de la población de vectores, sino también porque interrumpen la transmisión doméstica y por lo tanto la incidencia de la enfermedad (Moncayo, 1993).

La primera dificultad histórica en el control de triatomíneos, fue el fracaso del DDT, resultado inesperado ya que en las décadas del '40 y '50 este insecticida parecía ser la panacea que resolvía todos los problemas de plagas sanitarias. En la actualidad se sabe que el DDT tiene bajo efecto triatomicida a causa de una vía metabólica degradativa mediada por glutatión (Agosin, 1964) y de una dificultosa penetración cuticular dependiente del estado nutricional del insecto (Fontán y Zerba, 1992).

Descartado el DDT, las acciones de control se inician con insecticidas clorados en la década del '40 en Argentina y Brasil con el Hexaclorociclohexano (HCH) y en Venezuela con el dieldrin. Los cuestionamientos toxicológicos y ecotoxicológicos hacia los insecticidas clorados y la evolución tecnológica y comercial en materia de insecticidas condujo, durante la década del '60, al reemplazo de los clorados por compuestos anticolinesterásicos como el carbamato propoxur y los fosforados malatión y fenitrotión. En la década del '70 los insecticidas piretroides llegan como una alternativa segura y efectiva (WHO/TDR Report, 1989-1990),

realizándose las primeras evaluaciones de efectividad del triatomicida deltametrina en el CIPEIN en la Argentina (Zerba, 1989, 1994).

Dos nuevas herramientas de control han sido desarrolladas: pinturas insecticidas en Brasil y pote fumígeno insecticida en Argentina (Zerba, 1988). Los tratamientos a campo utilizando estos nuevos métodos de control se han llevado a cabo en Argentina, Bolivia, Chile, Honduras, Paraguay y Uruguay (Moncayo, 1993).

#### **4. Control Químico.**

##### **4.1. *Modos de Acción de Insecticidas Neurotóxicos.***

El control químico de insectos se dirigió inicialmente a la interrupción de las funciones primarias del sistema nervioso. Con el descubrimiento del DDT y más tarde los organofosforados, carbamatos y piretroides se estableció el uso de estos compuestos químicos neurotóxicos para la protección de la salud y las cosechas. El uso de neurotóxicos no es novedoso y no sorprende, ya que la naturaleza ha explotado este recurso por miles de años, demostrando ser los neurotóxicos naturales los compuestos más venenosos de todos los conocidos. Esto sugiere que el sistema nervioso es un blanco inequívocamente vulnerable. Las bases de esta vulnerabilidad se encuentran en el complejo funcionamiento del sistema nervioso y podremos apreciarlo conociendo mejor su fisiología.

#### **5. Transmisión del Impulso Nervioso.**

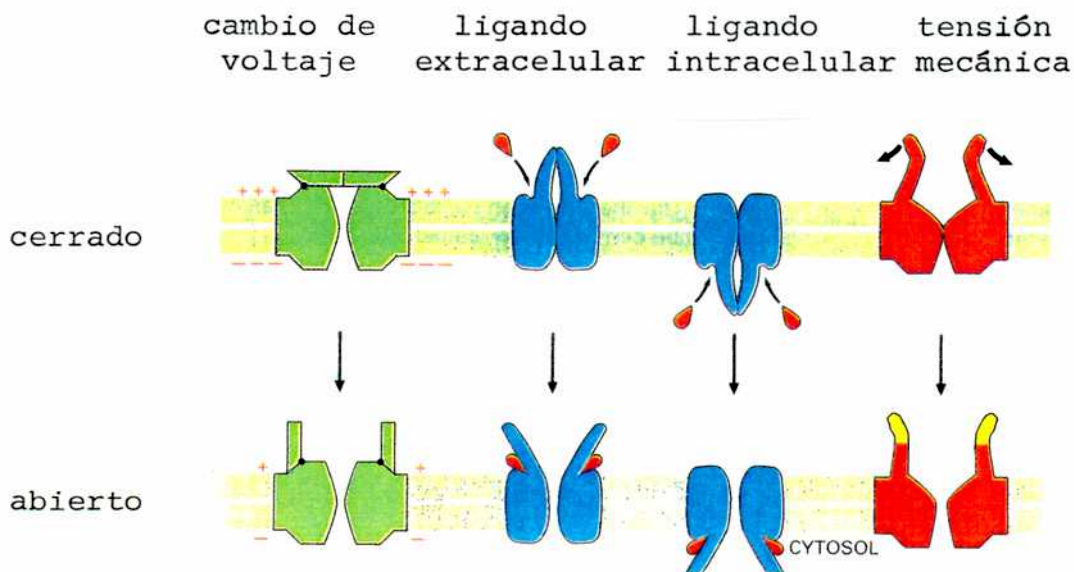
Uno de los roles fundamentales del sistema nervioso es tomar la información del medio ambiente que rodea al organismo y procesarla para dar como resultado un determinado comportamiento. Este comportamiento está adecuado a sus programas neuronales y bioquímicos y la información es codificada a través de señales eléctricas y químicas.

##### **5.1. *Transmisión Neuronal.***

En la membrana plasmática se encuentran canales proteicos que forman poros hidrofílicos, que conectan el citosol con el exterior de la célula. Algunos canales cumplen funciones específicas tales como ser permeables a iones inorgánicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Cl}^-$ ).

Los canales iónicos permiten que los iones difundan rápidamente siguiendo su gradiente electroquímico a través de la bicapa lipídica, lo que no significa que el transporte de canales iónicos no sea regulada.

Dos propiedades importantes de los canales iónicos que los distinguen de poros simples, es que son selectivos a iones, permitiendo que algunos iones pasen y otros no, y que no están abiertos continuamente. En la mayoría de los casos se abren en respuesta a estímulos específicos. El principal tipo de estímulo conocido como causa de apertura es el cambio en el voltaje a través de la membrana (canales dependientes de voltaje), tensión mecánica por canales dependientes de estimulación mecánica o la unión de un ligando (canales dependientes de ligando) como se observa en la Fig. 2.



**Fig. 2. Dibujo esquemático de los diferentes mecanismos de apertura de los canales iónicos.**

El ligando puede ser un mediador extracelular (neurotransmisor) o un mediador intracelular (iones o nucleótidos). La actividad de algunos canales iónicos está regulada por fosforilación o desfosforilación de proteínas. Se sabe que los canales iónicos son responsables de la excitación eléctrica de células musculares y mediadores de estímulos eléctricos en el sistema nervioso.

Un potencial de membrana se establece debido a una diferencia de cargas eléctricas a ambos lados de una membrana, producida por un ligero exceso de iones positivos a un lado de la membrana y a un ligero déficit en el otro. Esta diferencia de cargas puede ser el resultado de la acción de bombas electrogénicas activas y difusión pasiva de iones. La bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPasa ayuda a mantener el equilibrio osmótico a través de la membrana celular manteniendo baja la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ . Dada la baja concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ , otros cationes deben balancear el exceso de aniones fijos correspondientes a moléculas orgánicas cargadas negativamente. Este equilibrio está mantenido por  $\text{K}^+$  el cual es bombeado en forma activa (esto es con gasto de energía en forma de ATP) al interior de la célula por la bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPasa. También puede moverse libremente por medio de canales de fuga de  $\text{K}^+$  presentes en la membrana plasmática.

Estos canales permiten que el  $\text{K}^+$  llegue a un equilibrio donde una fuerza eléctrica ejercida por un exceso de cargas negativas atrae al  $\text{K}^+$  hacia el interior de la célula equilibrando la tendencia del  $\text{K}^+$  a fugar a favor de su gradiente de concentración. El potencial de membrana es la manifestación de esta fuerza eléctrica.

Las señales transmitidas por el axón en actividad son los potenciales de acción. Estos potenciales conducen a un rápido cambio en la permeabilidad de la membrana nerviosa a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  mediados por canales iónicos (Rought, 1985). El potencial de acción se inicia con una depolarización de la membrana plasmática, dada por un cambio de potencial de membrana a valores menos negativos.

Como veremos más adelante esto puede ser causado por acción de neurotransmisores (Bruce et al., 1994).

La membrana plasmática de células excitables, no sólo neuronas, sino también células musculares, endocrinas y ovocitos contienen canales iónicos dependientes de voltaje, que son los responsables de generar potenciales de acción (Bruce et al, 1994).

En el nervio o célula muscular esquelética el estímulo que causa suficiente depolarización abre los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje permitiendo una entrada pequeña de  $\text{Na}^+$  a la célula a favor de su gradiente electroquímico. El flujo de cargas positivas depolariza la membrana con lo cual se abren más canales de  $\text{Na}^+$  admitiendo más  $\text{Na}^+$  que causa una mayor depolarización. Este proceso continúa amplificándose por sí mismo durante una fracción de segundos; de esta forma el potencial eléctrico en la región local de la membrana ha cambiado de su valor de reposo de  $-70$  mV hasta un valor cercano al potencial de equilibrio del  $\text{Na}^+$  de  $+50$  mV. En este punto cuando la fuerza electroquímica neta dada por el flujo de  $\text{Na}^+$  es cercana a cero, la célula podría alcanzar un nuevo estado de reposo con los canales de  $\text{Na}^+$  permanentemente abiertos, si la conformación abierta de canales fuera estable.

La célula es resguardada de estos espasmos eléctricos permanentes porque los canales de  $\text{Na}^+$  tienen un mecanismo automático de inactivación, lo que permite que los canales se recuperen rápidamente mientras que la membrana está aún despolarizada. Los canales de  $\text{Na}^+$  permanecen en este estado inactivo incapaces de re-abrirse, hasta unos pocos milisegundos después que el potencial de membrana retorna a su valor negativo inicial.

Sumado a la inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  en algunas células nerviosas un mecanismo secundario opera para que la membrana plasmática activada retorne más rápidamente a su potencial negativo original y de esta forma está lista para transmitir un segundo impulso. Los canales  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje se abren de modo tal que el flujo momentáneo de  $\text{Na}^+$  es rápidamente interrumpido por el flujo de  $\text{K}^+$ , esto conduce rápidamente a que la membrana retorne al potencial de equilibrio del  $\text{K}^+$  antes de que la inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  esté completa (Bruce et al., 1994).

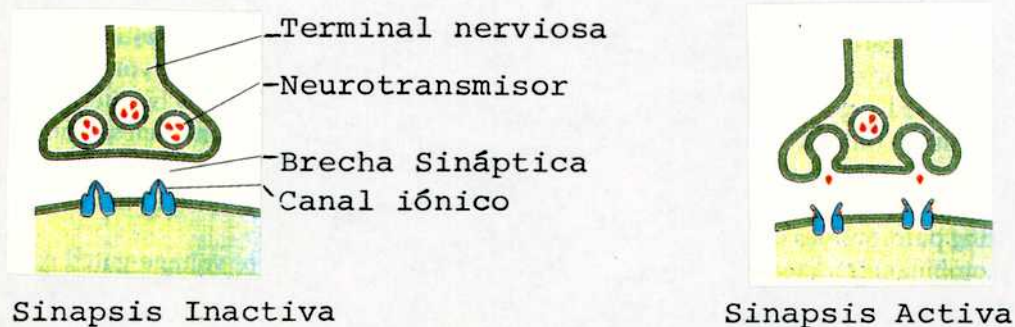
La descripción dada para un potencial de acción incluye sólo una pequeña parte de la membrana plasmática. La despolarización amplificada en cada sector sin embargo es suficiente para depolarizar regiones vecinas de la membrana, esto se repite a través de ciclos similares. De esta forma el potencial de acción se propaga como una onda que viaja desde el sitio inicial de despolarización.



## 5.2. Transmisión Sináptica.

La comunicación intercelular en el sistema nervioso se lleva a cabo a través de la transmisión sináptica y ésta es la principal comunicación entre neuronas y también entre neuronas y células musculares y glandulares.

Toda la transferencia de información involucra mecanismos químicos y eléctricos. La terminal de la célula presináptica está especializada en almacenar los neurotransmisores (mensajeros moleculares) en vesículas y liberarlos por exocitosis cuando es estimulada (Fig. 3).



**Fig. 3. Esquema de la sinápsis química.**

Esta terminal presináptica se separa de la terminal postsináptica por medio de una brecha sináptica de 200 a 500 Å (Lund, 1985). Este mecanismo de transmisión es indirecto ya que el neurotransmisor difunde rápidamente, cruza la brecha sináptica y produce un cambio eléctrico en la célula postsináptica por unión con el canal dependiente de ligando. Después de que el neurotransmisor fue secretado es removido rápidamente por enzimas específicas que se encuentran en la brecha sináptica o por re-capturación mediada por proteínas transportadoras ( $\text{Na}^+$  dependientes) de neurotransmisores. La rápida remoción temporo-espacial asegura la precisión de la señal en la sinapsis. Por lo tanto se asegura que no haya influencia del neurotransmisor sobre células vecinas y limpia la brecha sináptica antes que el siguiente pulso de neurotransmisor sea liberado.

Los canales iónicos activados por neurotransmisores están especializados en transformar rápidamente estímulos químicos extracelulares en estímulos eléctricos. Los canales están concentrados en la membrana plasmática de la célula postsináptica y se abren momentáneamente en respuesta a la unión con neurotransmisores moleculares, produciendo un breve cambio de permeabilidad en la membrana. A diferencia de los canales dependientes de voltaje responsables de los potenciales de acción, los canales iónicos activables por neurotransmisores son relativamente insensibles a los potenciales de membrana y por lo tanto no pueden por ellos mismos producir amplificación de excitación. En lugar de eso producen un cambio local de la permeabilidad y cambios en los potenciales de membrana. Los canales iónicos activados por neurotransmisores funcionan como receptores. El sitio de unión de los neurotransmisores liberados por la membrana presináptica como los canales iónicos son muy selectivos. Esta selectividad determina la naturaleza de la respuesta postsináptica (Bruce et al., 1994). Algunos neurotransmisores liberados por la neurona presináptica abren canales catiónicos causando un flujo de  $\text{Na}^+$  que despolariza la membrana postsináptica hacia el potencial umbral que descarga el potencial de acción, otro grupo abre canales de  $\text{Cl}^-$  que suprimen la descarga manteniendo la membrana postsináptica polarizada, lo que lleva a la hiperpolarización de la membrana (Callec, 1985). De esta forma es más difícil despolarizar la membrana y excitar la célula. La importancia de los neurotransmisores inhibidores es demostrada por los efectos de toxinas que bloquean su acción, por ejemplo la estricnina se une a los receptores de glicina y bloquea su acción que provoca espasmos musculares, convulsiones y muerte (Bruce et al., 1994).

## **6. Alteraciones de la Transmisión Nerviosa.**

Las neuronas sensoriales transducen diferentes formas de energía luminosa, mecánica, calórica o química provenientes del ambiente en impulsos nerviosos que se transmiten al sistema nervioso central. Otro tipo de neuronas generan señales que manejan músculos del sistema motor. La modificación del programa motor por la entrada del sistema sensorial es realizada por una compleja interacción entre la sinapsis química y la conducción eléctrica y para



un buen funcionamiento del sistema nervioso es fundamental una buena relación temporal entre los eventos eléctricos y químicos. La mayoría de los insecticidas neurotóxicos modifican esta relación temporal lo que da como resultado lesiones bioquímicas. El mal funcionamiento del circuito neuronal altera el comportamiento del organismo, presentando hiperactividad, temblores, movimientos motores incoordinados, convulsiones y finalmente la muerte (Alzogaray, 1996).

## **7. Modo de Acción de Compuestos Neurotóxicos en Insectos.**

La acción primaria de muchos insecticidas es el resultado de un ataque a algún sitio de acción, siendo éste una enzima o un receptor (Zerba, 1988). Las lesiones bioquímicas están dadas por la interacción de la molécula insecticida con enzimas, neurotransmisores o receptores. Por ejemplo, la interferencia con la función de los canales iónicos da como resultado el mal funcionamiento de axones, dendritas y membrana sináptica. La interferencia con receptores de acetilcolina dan como resultado el mal funcionamiento de la membrana postsináptica (Lund, 1985).

La mayor parte de los esfuerzos por entender la interacción blanco-insecticida en la vinchuca fueron dirigidos a los insecticidas organofosforados, cuyo blanco es la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Esta enzima tiene un rol fundamental en la transmisión nerviosa (Zerba, 1988) ya que su inhibición resulta en la acumulación de acetilcolina en la brecha sináptica, dando como resultado la estimulación repetida de los receptores de acetilcolina. Intentaremos describir someramente el modo de acción de algunos insecticidas.

### **7.1. *Insecticidas que Afectan la Membrana Nerviosa.***

El DDT y el lindane están comprendidos en un grupo de insecticidas llamados hidrocarburos clorados, que se dividen en tres grupos:

- DDT y sus análogos
- Isómeros de HCH y
- Ciclodienos que incluyen aldrin y dieldrin.

Los primeros signos de envenenamiento por DDT están dados por movimientos incoordinados, lo cual evidencia su acción sobre nervios motores. El DDT produce en insectos temblores en todo el cuerpo, hiperexcitabilidad y pérdida de movimiento (ataxia) posterior. La parálisis ocurre después de varias horas de envenenamiento (Narahashi, 1983). Shanes (1949) postuló que el DDT afecta la transmisión axonal porque prolonga las caídas del potencial de acción. Se encontró que tiene efectos inhibidores directos de varias enzimas, pero también puede producir su aumento. Es conocido el caso del cerebro de la cucaracha *Gromphadorhina portentosa* donde el DDT produce un 60 % de inhibición de adenil ciclasa y un 29 % de incremento de fosfodiesterasa (Rojakovich y March, 1976).

En la actualidad se considera que el DDT (y piretroides) actúa prolongando el tiempo de apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  durante el potencial de acción, lo que produce hiperexcitabilidad (Narahashi et al., 1994).

Más tarde algunos estudios en vertebrados e invertebrados (Matsumura, y Narahashi, 1971; Campbell et al., 1974; Neufeld y Pritchard, 1979) indicaron que sólo una proporción de actividad ATPasa fue susceptible a inhibición a pesar de la concentración de DDT presente. Esta confusión sobre la posible inhibición se debe a la presencia de diferentes tipos de ATPasa. Posteriores estudios en cerebro de rata, de bovino (Schneider, 1975) y tejido nervioso de crustáceos (Almeida y Pritchard, 1980) concluyen que la actividad enzimática es reducida pero por un camino indirecto y que sólo la interferencia del DDT con los lípidos de membrana es suficiente para alterar todas las propiedades de modo tal que logra la inhibición de la actividad enzimática.

Los insecticidas ciclodienos como el dieldrin y el aldrin suprimen la actividad de los canales de  $\text{Cl}^-$  activables por GABA causando hiperactividad (Narahashi, et al., 1994).

El  $\gamma$ -HCH o lindane es un inconfundible neurotóxico y hay evidencias que sugieren la perturbación de la cinética del potencial de acción. En 1974 Uchida demuestra el bloqueo de la conducción axonal en cordón nervioso de cucaracha. En animales y plantas se demostró que puede modificar el flujo de iones, afectando el transporte de  $\text{Na}^+$  y reduciendo la permeabilidad de la membrana (Webb, 1979; Schefczik y Simonis, 1980).

En insectos produce síntomas similares al DDT: temblor, ataxia, convulsiones y parálisis pero no produce la irritabilidad característica del DDT (Osborne, 1985).

Los piretroides constituyen una nueva generación de insecticidas sintéticos altamente activos. Sus estructuras se basan en las de las piretrinas, las cuales son extraídas de flores de *Chrysanthemum sp.* pero son muy lábiles en el medio ambiente ya que se degradan rápidamente. Después de modificar estas moléculas naturales para que fueran más estables, los piretroides aparecieron como una familia de insecticidas económicamente importantes, tanto como los organoclorados, organofosforados y carbamatos. En la actualidad es el grupo insecticida conocido más efectivo y de mejores cualidades, esto se debe a que está asociado a una muy buena selectividad además de no acumularse en la ecósfera.

Con los avances electrofisiológicos y técnicas bioquímicas se determinó que las proteínas de los canales de  $\text{Na}^+$  en la membrana nerviosa es uno de los blancos primarios de piretroide. Se observa que el piretroide induce una actividad repetitiva, llamada tren de impulsos nerviosos que domina la actividad y reemplaza los patrones normales de impulsos simples que conducen a un completo disturbio del sistema nervioso. Los órganos sensoriales, las terminales nerviosas y los órganos neurosecretores son especialmente afectados, provocando hiperexcitación, incoordinación y parálisis (Ruigt, 1985).

Los compuestos hasta aquí vistos afectan la permeabilidad iónica, organofosforados y carbamatos son insecticidas anticolinesterásicos.

## **7.2. Insecticidas Anticolinesterásicos.**

Dentro de este grupo se encuentran los insecticidas pertenecientes al grupo de los organofosforados y carbamatos.

Estos insecticidas actúan a nivel del espacio sináptico donde la acetilcolina interviene como "transmisor" del impulso nervioso. La acumulación de acetilcolina en el organismo provoca la aparición de síntomas tóxicos que conducen a incoordinación y muerte. De ahí que en cuanto la acetilcolina ha cumplido su misión sea destruída inmediatamente por la enzima acetilcolinesterasa (AChE) que la hidroliza a colina y ácido acético.

El complejo formado por AChE y acetilcolina es de vida muy breve. Cuando existe en el medio un sustituto de la acetilcolina, la acetilcolinesterasa actúa sobre éste, no hidroliza la acetilcolina, ésta se acumula y se presentan los efectos tóxicos (Barberá, 1989).

Los insecticidas organofosforados se unen a la colinesterasa actuando como sustitutos de la acetilcolina. El complejo formado por el inhibidor y la acetilcolinesterasa es en general más estable y menos hidrolizable que el formado por acetilcolina-colinesterasa. El complejo formado por los "etil"derivados fosfóricos es más estable y consecuentemente menos hidrolizable que el formado por los "metil"derivados. Esto determina la mayor toxicidad de los primeros (O'Brien, 1970).

Existen numerosas pruebas que avalan la hipótesis de este modo de acción y de modo cualitativo se comprueba que la toxicidad en insectos y animales se corresponde con la inhibición de la colinesterasa. No sólo los efectos tóxicos observados coinciden con los típicos de la acumulación de acetilcolina, sino que tal acumulación fue comprobada en varios casos. Los antagonistas de la intoxicación por acetilcolina lo son también de las intoxicaciones por derivados fosfóricos como son atropina, yoduro de metilpiridinio-2-aldoxima:PAM y yoduro de dodecilpiridin-2-aldoxima:PAD (O'Brien, 1970).

Los insecticidas carbámicos al igual que los fosforados ejercen su acción tóxica inhibiendo la colinesterasa. En esta acción tiene gran importancia la estructura molecular y estérica del carbamato. Así los derivados con grupos orgánicos no ionizables son capaces de reemplazar a la acetilcolina frente a la colinesterasa, mientras que los derivados ionizables como las sales de amonio cuaternario no poseen acción insecticida.

Respecto a la configuración estérica de los carbamatos resulta bastante generalizado que en los N-metilcarbamatos de fenilo, la sustitución en posición "meta" (posiciones 3, 5) se asemeja a la configuración acetilcolínica y por ello la acción insecticida de los mismos es superior a la de análogos "orto" y "para".

Contrariamente a lo que ocurre en la intoxicación con insecticidas fosforados el PAM ni el PAD son antídotos. Solamente la atropina es efectiva (O'Brien, 1970).

Los síntomas más comunes por envenenamiento con organofosforados son hiperexcitabilidad, temblores, convulsiones y parálisis aunque la causa última de la muerte en insectos es difícil de probar. Por otro lado los carbamatos son potentes inhibidores de la colinesterasa como los organofosforados, la gran diferencia entre ellos es que la inhibición de la colinesterasa por carbamatos es reversible (Matsumura, 1976). La intensidad de las descargas repetitivas y la actividad relativa del sistema nervioso depende del tipo de insecticida, dosis, especie de insecto y temperatura.

La tendencia actual es la búsqueda de compuestos con blancos de acción más específicos de insectos para lograr máxima selectividad y mínimo riesgo toxicológico en mamíferos. Dentro de este contexto sustancias capaces de bloquear la recepción sensorial del insecto y alterar su comportamiento representan alternativas muy promisorias de nuevas formas de control más selectivas.

## **8. Receptores Sensoriales en Triatominos.**

### **8.1. Generalidades de Receptores Sensoriales.**

En el comportamiento de los insectos la orientación es una etapa fundamental, ya que determina la dirección de los movimientos del animal en respuesta a estímulos externos (Wigglesworth, 1934). La orientación y la alimentación en *Rhodnius prolixus* fueron descritos como una cadena de eventos en la cual la iniciación de la respuesta está condicionada por el estado fisiológico del insecto. Estos insectos son arrancados de su estado de akinesis respondiendo a corrientes de aire o calor (Nuñez, 1982).

La orientación de los insectos hematófagos hacia su fuente de alimento está guiada por distintos estímulos tales como corrientes de aire (anemotaxis) (Kennedy, 1977) y compuestos químicos como dióxido de carbono (Nuñez, 1982, 1987). De esta forma los insectos se van acercando a la zona donde el gradiente de concentración de moléculas odoríferas es bien percibido (quimiotaxis); ya en la proximidad, el calor emitido por el animal de sangre caliente parece ser la clave necesaria y suficiente para la orientación y para desencadenar la respuesta de picar (Lazzari, 1990).

Los insectos indagan la superficie a picar con la punta del labio y posteriormente las mandíbulas y maxilas penetran la piel, inyectan saliva y succionan sangre. Esta ingestión continúa en presencia de un fagoestimulante apropiado hasta que el abdomen alcanza un volumen crítico; esto es controlado por receptores de estiramiento abdominales. Las ninfas pueden aumentar nueve veces su peso corporal en una sola picada y los adultos tres (Friend y Smith, 1977).

Muchos insectos seleccionan el tipo de alimento a ingerir por los olores característicos que éstos generan (Frankel, 1969).

Los olores atractantes de insectos a la distancia contribuyen al reconocimiento final y desencadenan el comportamiento alimentario, oviposición y otras respuestas. Compuestos volátiles como el dióxido de carbono liberados por el hospedador probaron ser estímulos muy importantes en la activación y orientación de *Triatoma infestans*. El ácido láctico, un buen attractante en mosquitos (Bar-Zeev, 1977) no es un buen estímulo para *Triatoma infestans* (Nuñez, 1982).

La detección de un estímulo como el olor se realiza principalmente por medio de las sensilias de las antenas y en menor grado por la de los palpos (Wigglesworth, 1934). La especificidad de sustancias odorantes se estudiaron por electrofisiología y comportamiento. A las células receptoras se las puede clasificar en especialistas y generalistas (Schneider, 1964). Las células especialistas tienen una muy alta especificidad por los odorantes mientras que las generalistas reciben un amplio espectro de moléculas odorantes (Morita and Shiraishi, 1984). La discriminación de estímulos, demuestra que los insectos tienen varios tipos de células receptoras (Morita and Shiraishi, 1985).

Además del estímulo odorífero, es muy importante en insectos hematófagos el estímulo térmico. Wigglesworth (1934) midió en *Rhodnius* la respuesta a una fuente de calor, constituida por un tubo de ensayo con agua a 35 - 38°C ubicado a 5, 5 cm. de distancia. Esta respuesta se mantuvo al cubrir ojos y ocelos con barniz opaco y al amputar la proboscis por su base, pero no al amputar ambas antenas, lo que indicaría que los termorreceptores estarían principalmente ubicados en las mismas.

Por otro lado Lazzari y Nuñez (1989) atribuyen a los termorreceptores antenales de *Triatoma infestans* su orientación hacia determinadas fuentes de calor. Ellos encontraron que *Triatoma infestans* puede percibir radiación infrarroja emitida por una fuente de calor y que puede discriminar las temperaturas acercándose significativamente a los 32°C y repeliendo a fuentes de 50°C. Cuando una vinchuca se acerca a una fuente de calor, se desencadenan una serie de eventos comportamentales que culminan con el intento de picar (Lazzari, 1990).

Estos eventos de comportamiento cubren siete pasos que muestran el siguiente orden de umbral creciente:

- Sale del estado de akinesis (separa el cuerpo del sustrato y mueve las antenas),
- Se orienta y realiza movimientos locomotores de aproximación a la fuente,
- Extiende la proboscis (reflejo rostral),
- Contacta con la piel,
- Perfora la membrana con los estiletes,
- Prueba el alimento y succiona.

Cuando el insecto no puede localizar la fuente de calor se limpia las antenas, posiblemente para disminuir el 'ruido' o bloqueo de los receptores por partículas de suciedad y de este modo recibir mejor la señal (Lazzari, 1990). La preferencia es por fuente caliente cubierta por piel. Pero si falta el estímulo térmico, la estimulación química de la piel no es suficiente para evocar una respuesta (Wigglesworth, 1934).

## 8.2. Clasificación General de los Receptores.

Históricamente, varios tipos de sensilias fueron identificadas sobre la cutícula. La clasificación de nueve tipos básicos fueron descritos por Snodgrass (1926, 1935). Schneider en 1964 realizó una revisión de sensilias de antena, agregó otros tipos a los que posteriormente se sumaron dos o tres más que aparecieron en la literatura a posteriori. Pero exceptuando algunas divisiones en subtipos las bases dadas por Snodgrass siguen siendo muy usadas hoy en día.

La morfología básica fue interpretada principalmente por medio de microscopía óptica. Con el paso de los años se vió la necesidad de atribuirle funciones a los distintos tipos de sensilias. Inicialmente la función fue inferida por la estructura y posición o por el comportamiento del insecto después de incapacitarlo en algunos de sus campos sensoriales (por ejemplo cortando o pintando las antenas). Más recientemente las funciones específicas de los distintos tipos de sensilia se identificaron por electrofisiología en algunos insectos y a partir de estos estudios se infirieron sus funciones en otros insectos por asociación de estructuras con los tipos conocidos. Posteriormente estas suposiciones fueron corroboradas por electrofisiología confirmándose en algunos casos pero no en otros. De igual manera la inferencia por asociación ultraestructural con tipos conocidos puede ser errónea (Zacharuk, 1985).

En 1983, Lazzari realizó un estudio de reconocimiento de receptores sensoriales de las antenas de *Triatoma infestans* utilizando microscopía óptica y electrónica de barrido, junto con experiencias de comportamiento. De esta forma estableció la morfología y posibles funciones de las sensilias antenales; las caracterizó y las denominó siguiendo la clasificación de Wigglesworth y Guillet y los tipos morfológicos de acuerdo a lo expuesto por Snodgrass (1926, 1935).

### 8.3. *Tipos de Sensilias y Receptores Sensoriales en Triatoma infestans.*

A las sensilias de antena de *Triatoma infestans* Lazzari(1983) las clasificó en distintos subtipos, de I a XV.

*Tipo I:* sensilia táctil de tipo quético con función mecanorreceptora.

*Tipo II:* estructura tricoide interpretada como quimiorreceptor por Wigglesworth y Gillet (1934). Mayer (1968) demostró que responden a respiración humana por electrofisiología.

*Tipo III:* estructura tricoide posiblemente quimiorreceptora, aunque no se descarta función termorreceptora.

*Tipo IV:* sensilia basicónica similar a la de tipo III excepto por su tamaño y forma según Wigglesworth y Gillet (1934). En *Triatoma infestans* la estructura no es idéntica a la de *Rhodnius*.



*Tipo V:* estructura quética que se considera mecanorreceptora.

*Tipo VI:* sensilia quética corta de inserción profunda que permite considerarla como mecanorreceptora.

*Tipo VII:* mecano y quimiorreceptora.

*Tipo VIII:* quimiorreceptora.

*Tipos IX y X:* celocónicas visibles solo por microscopia electrónica con probable función termorreceptora.

*Tipo XI:* visible al microscopio óptico con función de sentido químico general.

*Tipo XII:* tricobotrias típicas posiblemente para detectar vibraciones o corrientes de aire.

*Tipo XIII:* quimiorreceptores.

*Tipo XIV:* propiorreceptores.

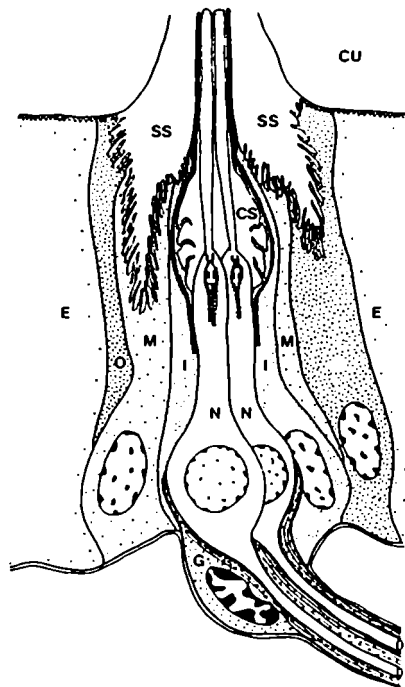
*Tipo XV:* mecanorreceptores.

En algunos casos las sensilias pueden tener función mixta ya que están inervadas por varias neuronas (Lazzari, 1983). Las sensilias simples de muchos insectos presentan varios tipos de células receptoras, corroborado por electrofisiología ya que dan registros diferentes (Altner y Loftus, 1985). En *Triatoma infestans* esto fue observado por Bernard (1974), quien también estudió sensilias del último artejo del rostro, a las que describió como: grandes sensilias que entran en contacto con la piel del hospedador antes que el rostro mismo y pequeñas sensilias puntiagudas situadas en la proximidad de la abertura que permite el pasaje de los estiletes. Dentro de los estiletes mandibulares observó receptores capaces de responder a estimulación mecánica más evidente a temperaturas entre 30 a 35°C. No se observó respuesta a estimulación química por glucosa, solución salina y sangre fresca. Dentro de los estiletes maxilares los receptores no parecen responder a estímulo químico. En cambio muestran fuerte respuesta a estímulo mecánico y a variaciones de humedad relativa del aire.

#### **8.4. *Receptores y Neuronas Sensoriales.***

Las células sensoriales nerviosas que inervan a todos los tipos de sensilias son básicamente similares en forma y estructura.

Son típicas células bipolares con el cuerpo celular localizado periféricamente dentro o justo debajo de la epidermis cercana a la cutícula sensorial que inerva. El axón se extiende desde el ahusado y usualmente poco diferenciado polo proximal del cuerpo celular hacia el nervio más cercano. La dendrita emerge del polo opuesto al axón y se dirige hacia la cutícula sensorial, que también tiene forma ahusada aunque varía su tamaño según las diferentes sensillas (Fig. 4) (Zacharuk, 1985).

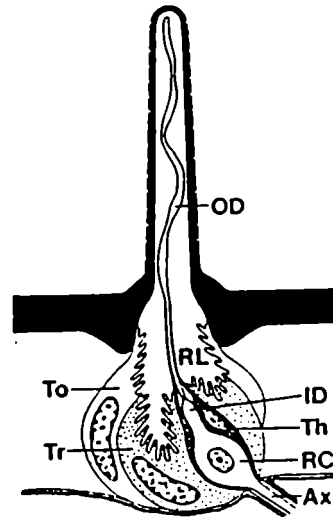


**Fig. 4. Esquema de una típica sensilla de insecto.** CS, cavidad ciliar; CU, cutícula; E, epidermis; G, célula glial envolvente basal; I, célula envolvente interna o dendrítica; M, célula envolvente intermedia; N, célula nerviosa; O, célula envolvente externa; SS, cavidad sensiliar.

#### 8.4.1. Receptores Olfatorios.

A pesar de los diferentes subtipos de sensillas olfatorias existe un esquema general donde el receptor cuticular abarca siempre el segmento exterior de la dendrita de la célula olfatoria, rodeada por un medio extracelular o linfa receptora confinada en la pared cuticular de la sensilla (Steinbrech, 1987).

En contraste con otras sensilias la pared de la sensilia olfatoria está siempre perforada por un gran número de poros (Schneider y Steinbrecht, 1968; Steinbrecht, 1984) para permitir el pasaje de las moléculas odorantes como se muestra en la Fig. 5.



**Fig. 5. Esquema de la organización general de la sensilia olfatoria de insecto.** RR, una o varias células sensoriales bipolares; TH, célula tectógena; TR, célula tricógena; TO, célula tormógena; AX, axón; ID, segmento interno de la dendrita; OD, segmento externo de la dendrita; RL, linfa receptora.

La molécula odorante debe atravesar la linfa receptora acuosa en la cual se ha informado la presencia en alta concentración proteínas “binding” de dos tipos PBP (pheromone-binding proteins) o GOBP (general odorant-binding proteins) en insectos (Pelosi y Maida, 1990; Vogt et al., 1990) capaces de unirse con el odorante facilitando su llegada a la membrana de la dendrita (Pelosi y Maida, 1995).

#### 8.4.2 Receptores Gustativos.

Compuestos de plantas hospedadoras o no, entran a la sensilia a través del poro terminal y difunden en el fluido interno de la sensilia para luego alcanzar al receptor molecular inserto en la membrana plasmática distal de la dendrita una vez que se produce la unión a estas proteínas se inicia el proceso

de transducción de la señal gustativa. Cambios en la configuración de la proteína receptora pueden abrir los canales iónicos que son parte de esta molécula (canales iónicos dependientes de ligando) o a través de sistemas de segundos mensajeros que amplifican la señal, abren un grupo distante de canales iónicos insensibles a voltaje. De esta forma una corriente iónica despolariza o hiperpolariza la membrana plasmática de la neurona gustativa.

La propagación del impulso en el sistema nervioso central es por canales iónicos sensibles a voltaje de los axones. La acción de los ligandos gustatorios probablemente termina por una desactivación enzimática presente en la linfa de la sensilia (Prestwich y Blomquist, 1987; Stengl et. al., 1992). Los mecanismos propios de las neuronas gustatorias dependen de los cambios en el potencial de membrana que da como resultado un gradiente de iones que son estabilizados y mantenidos por bombas iónicas (Frazier y Chyb, 1995).

## 9. Antecedentes de Inhibición Alimentaria.

En 1968, Ascher y Moscowitz, informaron que los fentinos (acetato de trifenil estaño) usados hasta ese momento como fungicidas, alguicidas y molusquicidas producían una moderada inhibición alimentaria en larvas de *Musca domestica vicina* produciendo un marcado descenso en el peso de la pupa. Riddiford (1970) informó que los receptores para feromonas sexuales del macho de *Antheraea pernyi* (gusano de seda) podrían ser bloqueados por vapores de formaldehído en forma reversible. Berger y Estes (1987) comprobaron el bloqueo de los receptores para feromonas sexuales en *Trichoplusia ni* con N-alquilmaleimidias con grupos alquilo de 2 a 12 átomos de carbono, siendo los más activos los que tienen 2 a 6 carbonos. Este bloqueo sensorial con los maleámicos produjo un daño permanente y acumulativo. Como antecedente previo, Ma (1977, 1981) observó que los sistemas quimiorreceptores eran sensibles a compuestos que reaccionan con grupos sulfhidrilos. Sugirió que los mecanismos de interferencia eran similares en todos los receptores gustativos y que se realizaban a nivel de los grupos sulfhidrilos de las proteínas de la membrana del receptor afectando en algunos casos no sólo las funciones sensoriales sino también la actividad alimentaria.

Esta hipótesis fue sostenida por otros autores (Frazier y Heitz, 1975; Singer et al., 1975; Ma, 1981).

El aldehído sesquiterpenoide warburganal, aislado de una planta (*Warburgia*) produjo inhibición alimentaria en *Spodoptera sp.* (Kubo y Nakanishi, 1977). Estudios posteriores sobre *Pieris brassicae* usando otros terpenoides (polygodial, warburganal y muzigadial) también fueron inhibidores de la alimentación (Schoonhoven y Yan Fu-Shun, 1989).

Una tendencia importante en el uso de los inhibidores alimentarios es su obtención a partir de extractos de plantas. Dentro de este grupo la azadiractina, compuesto extraído del árbol de la India *Azadirachta indica*, es uno de los hallazgos más importantes (Ascher, 1992), ya que demostró ser un potente inhibidor de la alimentación de los insectos.

### **9.1. Bloqueo de Receptores Sensoriales.**

La alimentación es uno de los comportamientos básicos más importantes para la supervivencia de un animal y una especie. El animal ingiere sustancias químicas necesarias para la producción de energía, para crecimiento y desarrollo (de Boer, 1995).

Los últimos 400 millones de años mostraron un complejo proceso de coevolución entre plantas e insectos fitófagos (Ehrlich y Raven, 1964; Futuyma y Keese, 1992). Las plantas crean barreras mecánicas y químicas de protección contra insectos tales como terpenoides, alcaloides y fenoles que inhiben la alimentación (Harborne, 1993; Rosenthal y Berenbaum, 1992; Rosenthal y Janze, 1979).

El uso práctico de productos naturales que inhiben la alimentación del insecto para su control se ha convertido en una realidad. Avances recientes en el aislamiento, determinación estructural y síntesis de estructuras parciales de antialimentarios han permitido obtener estudios de modo de acción que han llevado a un incremento en la lista de productos comerciales basados en la inhibición alimentaria. Esto nos da una idea clara de las aplicaciones en este campo de estudios (Frazier y Chyb, 1995).

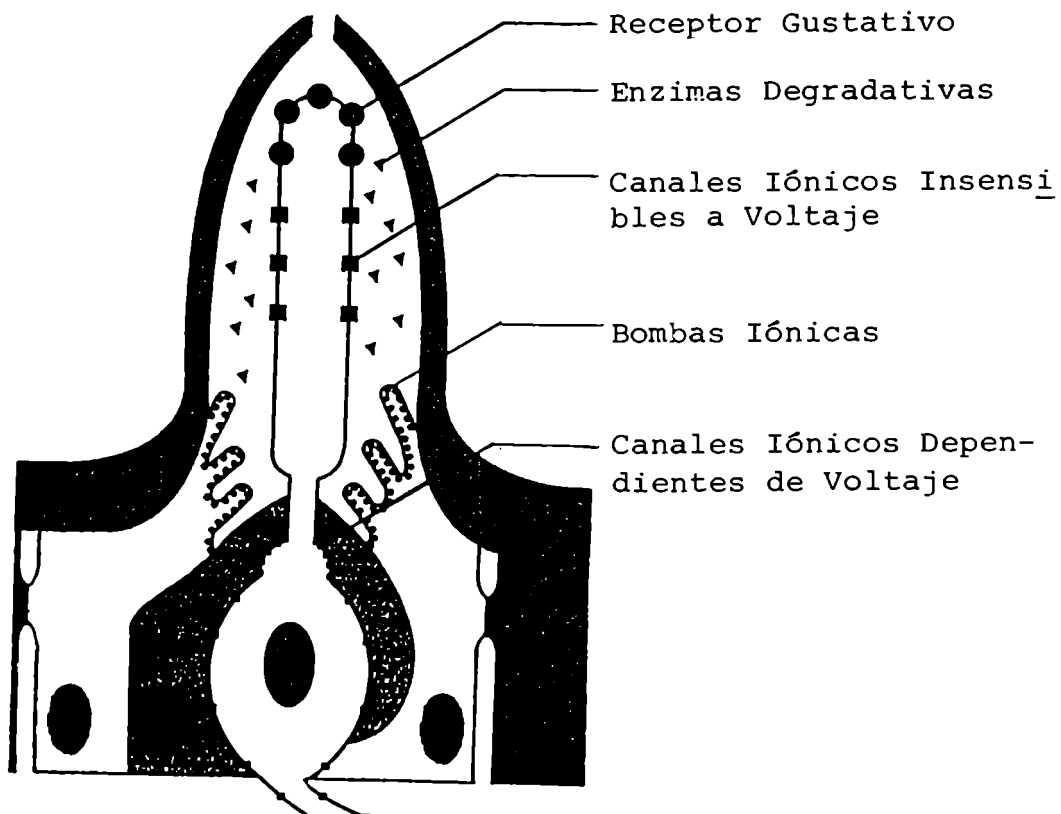
Los antialimentarios en insectos están definidos someramente como compuestos químicos que inhiben la alimentación, lo que determina la consecuente muerte del animal. En una definición más detallada podemos decir que cuando un compuesto impide, bloquea o de alguna manera interfiere con la selección de alimento y el consumo posterior se llama inhibidor alimentario. En el cuadro siguiente se observan diferentes mecanismos de inhibición alimentaria en las diferentes etapas del comportamiento alimentario (Cuadro 1).

	mecanismo fisiológico	comportamiento alimentario	probable blanco de acción
PRE INGESTIVO	recepción sensorial SNC movimiento de patas	ORIENTACIÓN ⇓	
	recepción sensorial SNC mov. de partes bucales	ELECCIÓN DEL HUÉSPED ⇓	receptores sensoriales
INGESTIVO	quimio y mecanorec. SNC salivación mov. partes bucales	INGESTIÓN ⇓	receptores sensoriales músculos estomodeo enzimas salivares
POST INGESTIVO	mecanorecepción SNC mov. intestinales	ALMACENAMIENTO ⇓	cél. mecanoreceptoras músculos estomodeo enzimas digestivas
	inducción enzimática	DIGESTIÓN ⇓	epitelio y músculos del mesenterón enzimas digestivas
	transporte de agua y nutrientes SNC	ABSORCIÓN ⇓	epitelio y músculos del proctodeo túbulos de Malpighi
		METABOLISMO ⇓	
		EXCRECIÓN	

**Cuadro 1. Pasos del comportamiento alimentario y mecanismos de inhibición alimentaria. Adaptado de Frazier and Chyb.**

La inhibición preingestiva podría estar asociada con mecanismos fisiológicos involucrados en la orientación, búsqueda y selección del hospedador. La inhibición de la actividad alimentaria preingestiva es rápida y ocurre en los primeros momentos de contacto con la potencial fuente de alimento (Frazier y Chyb, 1995). Los blancos de acción para la inhibición alimentaria preingestiva está localizada en la sensilia quimiorreceptora que manda mensajes al sistema nervioso central y determina una falta de aceptabilidad. Antialimentarios o disuasivos alimentarios constituyen una clase de inhibición alimentaria que actúa a través de receptores gustativos y provoca rechazo hacia el alimento cambiando el código sensorial de aceptable a inaceptable (Frazier y Chyb, 1995).

En la Fig. 6 vemos un esquema más detallado del bloqueo de quimiorrecepción donde el potencial blanco molecular para la inhibición alimentaria actúa a nivel de quimiorreceptores de contacto. Mucho de esta descripción se basa en nuestro conocimiento de sistemas quimiorreceptores en otros animales con algunas evidencias directas sobre insectos (Frazier, 1992).



**Fig. 6. Esquema de potenciales blancos moleculares de inhibidores alimentarios en sensilias de contacto en insectos. Se muestran cinco clase de blancos: receptor gustativo, canales iónicos dependientes de voltaje, canales iónicos insensibles a voltaje, enzimas degradativas o bombas iónicas.**

## **9.2.Importancia de los Antialimentarios Para el Control de Insectos.**

Desde algunos años atrás, a nivel público y gubernamental aumentó el interés en realizar control de insectos reduciendo el uso de insecticidas neurotóxicos limitando el impacto en el ambiente y la salud humana. En la última década se dio un gran impulso al uso de insecticidas no convencionales.

Esta nueva alternativa incluye el uso de feromonas y el uso de organismos que producen enfermedades en el insecto plaga, por ejemplo, bacterias, virus, nematodos, hongos (Ghassemi, et. al., 1983) como una aproximación racional al control integrado de plagas (Avé, 1995).

Los insecticidas neurotóxicos en general son tóxicos en mamíferos y actualmente su uso está limitado por el desarrollo de resistencia en numerosas especies plaga. Los compuestos inhibidores de la alimentación tienen en cambio modos de acción específicos para insectos y usados racionalmente y a dosis mínimas se podría demorar la aparición de resistencia (Frazier y Chyb, 1995).

Ventajas adicionales de los antialimentarios son la baja actividad residual, bajo impacto ambiental (Griffiths, 1988, 1990; Norris, 1986), inhibición alimentaria altamente selectiva y dosis efectivas muy bajas.

Dado que los blancos de la inhibición alimentaria son diferentes a los de los insecticidas tradicionales, estos compuestos podrían ser muy útiles en el control de poblaciones resistentes a los insecticidas clásicos, representando de este modo una táctica utilizable en programas de manejo integrado de plagas. Muchas poblaciones resistentes a estos insecticidas podrían ser controladas con ellos (Holloway y McCaffery, 1988). La probabilidad de desarrollar resistencia en insectos blanco podría ser más baja que con los agroquímicos clásicos, principalmente porque la interrupción del comportamiento alimentario es seguido por una amplia variedad de factores de mortalidad (Griffith, 1990).

La aceptación o rechazo del alimento es mediada por estructuras sensoriales localizadas en el aparato bucal, el canal alimentario o las antenas (Zacharuk, 1980; Frazier, 1985).



## II. OBJETIVOS



La mayoría de los insecticidas sintéticos que se han usado y se usan actualmente en el control de plagas, son compuestos neurotóxicos. A pesar de la buena selectividad que poseen algunos de ellos, siguen representando un riesgo toxicológico para el hombre y los animales que él protege.

La tendencia actual en el control químico y racional de plagas es el uso de compuestos con blancos de acción específicos de insectos. Dentro de este contexto los modificadores del comportamiento de los insectos en general y los inhibidores del comportamiento alimentario en particular, resultan una alternativa muy promisoría en el control de insectos plaga.

Los avances recientes en el aislamiento, determinación de estructuras y síntesis de compuestos antialimentarios han dado valiosa información para el estudio de modos de acción. Se distinguen así los inhibidores preingestivos cuyo modo de acción está asociado al bloqueo de receptores sensoriales responsables de la orientación, búsqueda y selección de la fuente de alimento. Teniendo en cuenta que dicho bloqueo sensorial puede ser producido por compuestos que reaccionan con grupos -SH de estructuras sensoriales de insectos, se sintetizó en el CIPEIN una serie de compuestos reactivos de sulfhidrilo, los N-alkil maleamatos de metilo.

El propósito de esta Tesis fue estudiar el efecto de estos maleamatos en el comportamiento alimentario de *Triatoma infestans* (vinchuca), principal vector de la enfermedad de Chagas en nuestro país.

Una vez determinada la inhibición alimentaria, fue de interés estudiar si la exposición permanente de poblaciones experimentales de *Triatoma infestans* a dichos compuestos antialimentarios, producía alteraciones en la curva de crecimiento poblacional.

En un intento por realizar aportes al entendimiento del modo de acción se estudió mediante técnicas de actometría, las alteraciones en la respuesta a estímulos térmicos y/o químicos en vinchucas con presunto bloqueo sensorial debido al tratamiento con maleamatos.

El uso de inhibidores alimentarios en el control de poblaciones de *Triatoma infestans*, representa una alternativa al uso de "insecticidas clásicos" mediante el manejo de poblaciones del insecto plaga con dosis reducidas de compuestos más selectivos que produzcan menor impacto en el medio ambiente y en la salud humana.

### **III. MATERIALES Y METODOS**

---



## 1. **Material.**

### 1. 1. ***Biológico.***

Huevos, ninfas y adultos de *Triatoma infestans* cepa CIPEIN, obtenidos de una colonia mantenida en nuestro laboratorio durante 20 años a 28 - 30°C y 50 - 60% HR y 12 :12 hs luz : oscuridad.

Los insectos se criaron en cajas de acrílico de 30 x 30 cm de base y 40 cm de altura con soportes internos entre los que se colocó papeles de filtro (Cerisola, et al., 1974). Todos los insectos se alimentaron semanalmente introduciendo una paloma inmovilizada durante 60 minutos dentro de las jaulas de cría (Picollo et al., 1976).

Los distintos estados de desarrollo se determinaron de acuerdo a la clasificación de Brewer y colaboradores (1981).

Para la determinación de efecto antialimentario se utilizaron ninfas de 5º estadio, de 10 - 12 días de edad, ayunadas desde la última alimentación en el estadio anterior.

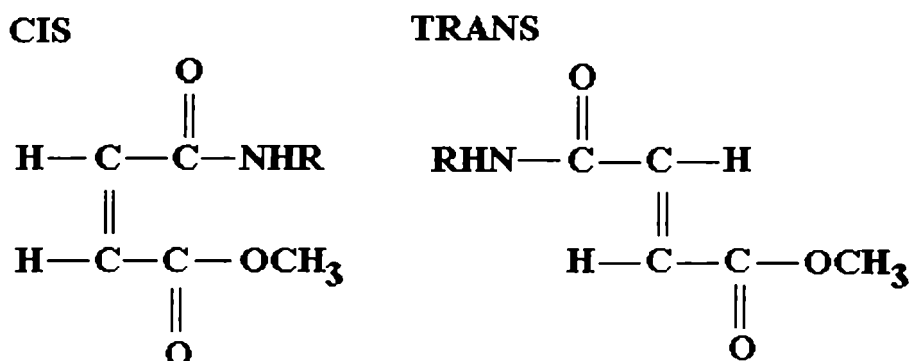
Para preparar las poblaciones experimentales se utilizaron insectos adultos y ninfas de todos los estadios de 10 días de edad y ayunadas desde la última comida en el estadio anterior. Las ninfas del 1er estadio tenían 5 días de edad y los huevos 9-12 días de desarrollo.

### 1. 2. ***Químico.***

Se utilizó una serie de metil ésteres de ácidos maleámicos N-sustituídos (mezclas de isómeros *cis-trans*) sintetizados por la Lic. Paola González Audino en el Lab. de Química Orgánica del CIPEIN. Estas mezclas de isómeros se obtuvieron por esterificación de los ácidos N-alkilmaleámicos. Los sustituyentes alquílicos utilizados fueron etilo, propilo, butilo, hexilo, heptilo, octilo, decilo y dodecilo. Los compuestos finalmente obtenidos fueron:

- N - etil maleamato de metilo (EMM),
- N - propil maleamato de metilo (PMM),
- N - butil maleamato de metilo (BMM),
- N - hexil maleamato de metilo (HMM),
- N - heptil maleamato de metilo (HpMM),
- N - octil maleamato de metilo (OMM),
- N - decil maleamato de metilo (DeMM),
- N - dodecil maleamato de metilo (DMM).

La obtención de los isómeros *trans* y *cis* puros se logró por la esterificación de los ácidos maleámicos N-sustituídos en condiciones ácidas y alta temperatura o neutras y baja temperatura respectivamente (González Audino, 1996). Los distintos isómeros fueron analizados por cromatografía gas líquido por la Lic. Adriana Martínez del CIPEIN y su estructura identificada por resonancia magnética nuclear (Varian 60 Mhz) por el grupo de química Orgánica del CIPEIN. La estructura general de los dos isómeros geométricos sintetizados es:



R: etil (EMM), propil (PMM), butil (BMM), hexil (HMM), heptil (HpMM), octil (OMM), decil (DeMM), dodecil (DMM).

Todas las drogas y solventes utilizados fueron de grado analítico (Merk Química, Bs. As., Argentina).

## 2. Métodos.

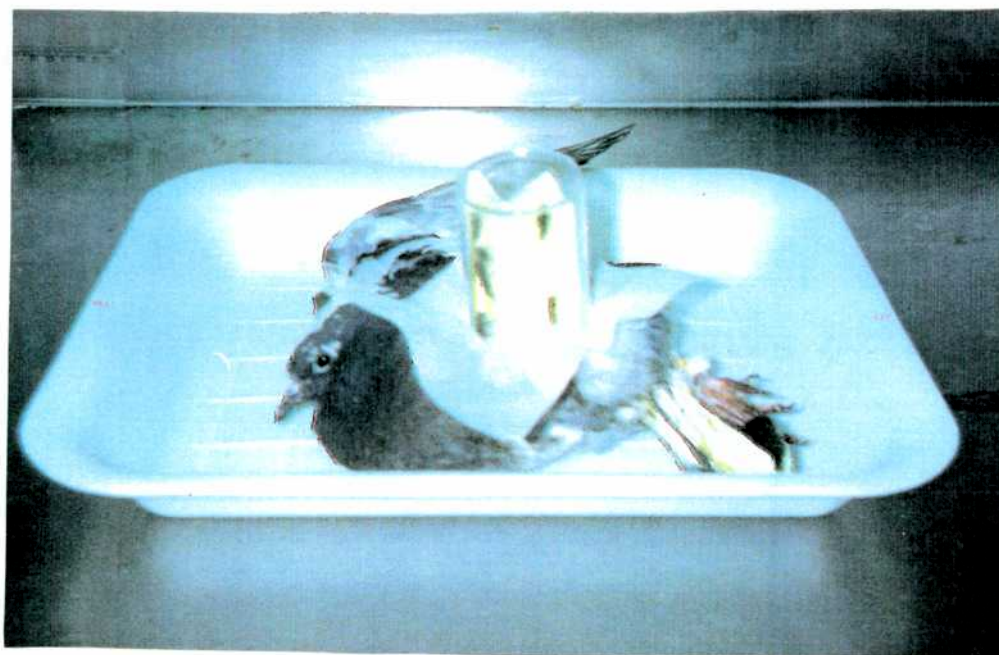
### 2. 1. *Evaluación del Efecto Antialimentario.*

#### 2. 1. I. *Aplicación Tópica.*

Un microlitro de las distintas diluciones acetónicas de los compuestos a testear, se aplicó (empleando una jeringa Hamilton de 50 µl con microaplicador) sobre la superficie dorsal de la cabeza de ninfas V de *Triatoma infestans*, de acuerdo a lo descrito en material biológico (con un peso promedio de 60 mg) (Picollo et al., 1987). Para cada compuesto se aplicaron por duplicado 5 dosis diferentes sobre grupos de 5 a 6 vinchucas. Se trató a un grupo control con la misma técnica pero solamente con solvente.

A las 24 horas postratamiento se ofreció una paloma inmovilizada como fuente de alimento dejándolos expuestos a la paloma el mismo tiempo que se

dejó expuestos a los insectos controles para que se alimentaran (aproximadamente 20 minutos) como se observa en la siguiente fotografía:



Al cabo de ese tiempo se registró el número de insectos alimentados y no alimentados. Esta determinación se realizó visualmente ya que las ninfas, en las condiciones utilizadas, cuando se alimentaron lo hicieron a repleción distendiendo al máximo los abdómenes con un aumento significativo de peso entre 5 y 7 veces (Fontán and Zerba, 1992).

En todo momento las condiciones ambientales fueron 25°C y 50% HR.

Los resultados se expresan como  $DE_{50}$  (dosis efectiva para inhibir la alimentación en el 50 % de los individuos en ensayo). Los valores de  $DE_{50}$  se calculan mediante un programa de probabilidad estadística, basado en el método PROBIT (Litchfield y Wilcoxon, 1949; Zerba, et al., 1987).

### **2. 1. II. Exposición a Papeles Impregnados.**

Ninfas V de *Triatoma infestans*, de edad y ayuno descrito en material biológico fueron expuestas durante 24 horas a papeles de filtro Whatman N° 1 de 72 cm<sup>2</sup> de superficie (4 x 18 cm) impregnados con 1 ml de solución acetónica de cinco dosis de cada uno de los distintos compuestos, ensayándose por duplicado grupos de 5 ó 6 vinchucas. Después de impregnado el papel se dejó evaporar el solvente durante una hora antes de



exponer los insectos. A las 24 horas de exposición al papel tratado se ofreció una paloma inmovilizada como fuente de alimento.

Se determinó el número de insectos alimentados después de estar expuestos a la fuente de alimento el mismo tiempo que se dejó expuestos a los insectos controles (topcados con solvente según el punto 2.1.I. de la metodología) para que se alimentaran (20 minutos). Todo el ensayo se realizó a 25°C y 50 - 60% HR. Los resultados se expresan como CE<sub>50</sub> (concentración efectiva necesaria para inhibir la alimentación del 50 % de los insectos). Los valores de CE<sub>50</sub> se calculan mediante un programa de probabilidad estadística, basado en el método PROBIT.

### **2. 1. III. *Interposición de Telas Impregnadas.***

Trozos de 7 x 9 cm de telas de gasa (malla 0,2 mm) se impregnaron con 1 ml de solución acetónica de las distintas concentraciones de los compuestos, ensayándose por duplicado grupos de 5 ó 6 ninfas de 5º estadio. Se dejó evaporar el solvente durante 1 hora y se interpusieron las telas entre los insectos y la fuente de alimento. Se determinó el número de insectos alimentados después de estar expuestos a la paloma el mismo tiempo que se dejó expuestos a los controles para que se alimentaran (Picollo et al., 1993). Los insectos utilizados fueron ninfas V de *Triatoma infestans* en las condiciones descritas en material biológico. Las condiciones ambientales se mantuvieron a 25°C y 50% HR. Los resultados se expresan como CE<sub>50</sub> (concentración de compuesto sobre la tela que interrumpe la alimentación del 50 % de las ninfas expuestas). Los valores de CE<sub>50</sub> se calculan mediante un programa de probabilidad estadística, basado en el método PROBIT.

### **2. 1. IV. *Determinación del Efecto Residual de Papeles Impregnados.***

Papeles de filtro Wathman N° 1 de 4 x 14 cm de lado, se impregnaron con 1 ml de la solución acetónica de los *cis* maleamatos BMM y HpMM en concentraciones iguales a las utilizadas en poblaciones experimentales (0,1mg/cm<sup>2</sup>). Estos papeles se mantuvieron en las mismas condiciones que los de las poblaciones experimentales (25°C y 50% HR) pero sin insectos.

A distintos tiempos de envejecimiento (120, 250 y 380 días) tres grupos de 10 ninfas de 5º estadio, estandarizadas de acuerdo a lo establecido en material biológico, se expusieron durante 24 horas a los papeles impregnados y envejecidos. La actividad residual de los maleamatos en los papeles de filtro se midió como porcentaje de los insectos expuestos que no se alimentaron después de una oferta de alimento durante 20 minutos.

## **2.2. Evaluación del Efecto Sobre Poblaciones Experimentales.**

Se preparan poblaciones experimentales de *Triatoma infestans* formadas por 15 ninfas de cada uno de los estadios, alimentadas en el estadio anterior y ayunadas desde el primer día de muda, hasta los 10 días de edad. Las ninfas I se separaron el primer día de eclosión y se las utilizó con tres días de ayuno, ya que se deshidratan más fácilmente. Para la selección de los adultos se separó un grupo de ninfas V que fueron alimentadas a repleción para estimular la muda. En el primer día de aparición de los adultos se separaron machos y hembras (10 de cada sexo) para asegurar hembras vírgenes al momento de comenzar los ensayos (Picollo, et al. 1993). Las poblaciones experimentales se colocaron en cajas de acrílico de 18 x 18 x 18 cm de lado que contenían papeles de filtro en sus bases para retener la suciedad de los insectos y una red de soportes de acrílico formada por seis rectángulos de 4 x 14 cm de lado. Se impregnaron cinco papeles de filtro Whatman Nº 1 de 72 cm<sup>2</sup> de superficie (4 x 18 cm) con 1 ml de la correspondiente solución acetónica de los maleamatos y se dejó evaporar el solvente durante 1 hora.

Las concentraciones usadas fueron 0,4 y 0,7 mg/cm<sup>2</sup> para *cis-trans* maleamatos y 0,1 mg/cm<sup>2</sup> para los *cis* maleamatos purificados.

Los papeles impregnados se colocaron entre los soportes de acrílico del interior de las cajas de cría experimentales y sirvieron de soporte permanente para los insectos en ensayo. De la misma forma se preparó una caja control impregnando los papeles con acetona. Los papeles así impregnados se mantuvieron sin cambios durante todo el tiempo que duró la experiencia (380 días). La oferta de alimento se realizó una vez por semana y se mantuvieron las condiciones ambientales de cría. Semanalmente se registró para cada

huevos depositados. Los resultados obtenidos se graficaron como número total de individuos a cada tiempo de lectura y el número total de huevos acumulados.

### **2. 2.I. Tratamiento Estadístico de los Resultados.**

La inhibición alimentaria de los insectos expuestos a los maleamatos por las tres metodologías descritas, se midió como la dosis o concentración de compuesto que inhibe la alimentación del 50% de insectos (DE<sub>50</sub> o CE<sub>50</sub>). Estos parámetros se calcularon mediante un programa de computadora realizado por el Dr. José Luís Sívori en el CIPEIN, basado en el análisis estadístico "probit" (Litchfield and Wilcoxon, 1949). En cada caso se determinó la DE<sub>50</sub> o CE<sub>50</sub> y sus respectivos intervalos de confianza.

En las experiencias con poblaciones se contó a distintos tiempos luego de iniciada la experiencia el número de insectos y de huevos presentes en la cajas controles y tratadas. Los resultados obtenidos para cada tiempo fueron comparados utilizando Test de Student ("Student t-Test, Paired test") para valores pareados que permite comparar "sets" de datos {x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, ..., x<sub>n</sub>} con {y<sub>1</sub>, y<sub>2</sub>, ..., y<sub>n</sub>} obteniéndose un valor estadístico

$$t = \bar{D} / S_{\bar{D}}$$

donde:

$$\bar{D} = \bar{x} - \bar{y}$$

$$S_{\bar{D}} = [(\sum D_i^2 - (\sum D_i)^2 / n) / (n(n - 1))]^{1/2}$$

$$D_i = x_i - y_i$$

A partir de estos valores se calcula p (probabilidad de que sea incorrecto considerar que las medias de ambas poblaciones sean diferentes).

Dicho análisis estadístico se llevó a cabo utilizando Sigma Plot Version 1.00 Jandel Scientific (1993). Se consideraron los datos obtenidos desde la primera lectura (siete días de comenzada la experiencia) hasta la superposición de las curvas de la población control y la tratada o hasta los 400 días de iniciada la experiencia.

## 2. 3. Medición de la Respuesta a Estímulo Térmico y Químico.

Teniendo en cuenta que en insectos hematófagos como *Triatoma infestans* la orientación hacia la fuente de alimento está determinada por señales térmicas y químicas (Lazzari, 1990) se midió la respuesta a dichos estímulos en ninfas V controles y tratadas con BMM (el material biológico fue seleccionado según el punto 1.1.1. de esta sección). Para ello se utilizó un analizador computarizado de imágenes de video Videomex-V, Columbus Instrument International Corporation, U. S. A.

### 2.3.I. *Diseño de los Ensayos.*

La arena de ensayo utilizada fue un recipiente plástico de 120 mm de diámetro cuyo fondo fue cubierto por papeles de filtro Whatman N° 1 para facilitar el movimiento de las vinchucas. La temperatura ambiente se mantuvo entre 24°C - 26°C.

Las ninfas V tratadas fueron topicadas en la parte dorsal de la cabeza con 1 µl de la solución acetónica ( de BMM) en tres dosis distintas (5, 15, 30 µg/insecto). Las ninfas V controles fueron tratadas de la misma manera pero con 1 µl de acetona. Los insectos fueron mantenidos en condiciones de cría durante 24 hs. antes de introducirlos en la arena experimental donde se les permitió aclimatarse durante 20 minutos (tiempo necesario para que los insectos alterados por el traspaso a la arena vuelvan a su estado normal de akinesis), ubicándose principalmente en el borde de la arena.

### 2.3.II. *Medición de Actividad General de los Insectos.*

La actividad total de las chinches en la arena sin estímulo externo fue monitoreado con una cámara monocromática CCTV (Sanyo), observado en un monitor monocromático y registrado por el Videomex-V. La resolución es de 256 x 192 "pixels" y tiene una velocidad de toma y procesamiento de imagen de 30 cuadros por segundo. Se conectó con una computadora personal (50Mz 80486 DX). El "software" utilizado fue el "Multiple Motion Monitor" (MMM) de Videomex-V.

Este "software" cuantifica en toda la arena experimental A) el número de "pixels" que han cambiado de estado "on" ↔ "off" durante un tiempo prefijado para cada sesión de medición (en este caso 30 segundos) durante un número prefijado de sesiones (en este caso 60). La magnitud de este valor está directamente relacionada con el movimiento de los insectos dentro de la arena. La duración total de la experiencia es de 30 minutos.

La actividad locomotora espontánea de grupos de 10 insectos topicados con dosis de BMM capaces de producir diferente % de inhibición alimentaria fue comparada con grupos controles en iguales condiciones (Fig. 10 de resultados y discusión). Como parámetro de movimiento total se utilizó la sumatoria de A) en toda la arena experimental durante las 60 sesiones (duración total de la experiencia: 30 minutos). El valor para cada ensayo se expresó como un cociente con el control respectivo. Los promedios de los valores para cada dosis (n=3) fueron comparados con un valor hipotético = 1 utilizando Test de t para una muestra (Instat)

### 2.3.III. Medición de Actividad hacia Fuentes de Estímulos Térmico y Químico.

En este caso la arena de iguales dimensiones que el ensayo anterior, fue dividida en dos zonas concéntricas en cuyo centro se ubicó la fuente de estímulo como se muestra en el esquema.



Para estímulo térmico se utilizó como fuente una resistencia de 3 cm de alto x 1 cm de diámetro ( $400\Omega$ ) conectada a una fuente de corriente continua variable empíricamente ajustada para obtener una temperatura constante de  $40^{\circ}\text{C}$  determinada como la óptima en la atracción de *Triatoma infestans* (Lazzari, comunicación personal).

Para estímulo químico se utilizan dos fuentes liberadoras de  $\text{CO}_2$ :

- *Fuente de liberación lenta y continua*: Cultivo de levadura fresca preparado con 6 gr de levadura (CALSA-Argentina) + 4 gr de sacarosa + 15 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  a temperatura ambiente (Guerenstein et al., 1995) 200  $\mu\text{l}$  de este cultivo fueron colocados en un disco de papel de filtro Whatman N° 3 de 1 cm de diámetro.
- *Fuente de liberación rápida*: Se preparó colocando 30 mg de  $\text{NaHCO}_3$  en un disco de papel de filtro Whatman N° 3 de 1cm de diámetro y agregando 50  $\mu\text{l}$  de una solución 50% de  $\text{SO}_4\text{H}_2$ . La mezcla se realiza inmediatamente antes del comienzo del ensayo para producir una reacción rápida y completa que produjo una liberación masiva de  $\text{CO}_2$ .

Se colocó una termocupla en el medio de reacción para controlar si se produce un aumento significativo de temperatura, lo que no ocurrió.

El "software" utilizado en este caso fue el "Multiple Zone Motion Monitor" (MZMM) que permitió dividir la imagen registrada por el Videomex-V en dos zonas: una central que contiene la fuente de estímulo (de 5 cm de diámetro) y una periférica (de 7 cm de diámetro) que prefieren los insectos por su comportamiento tigmotáctico.

La estadía de los insectos en cada zona se cuantifica a través de número de "pixels on" en cada sesión (definida en 30 segundos) durante el número total de sesiones de cada ensayo (definida en 60). Duración total de la experiencia 30 minutos.

Como medida de la respuesta del insecto a las fuentes de estímulo se usó el cociente Z entre sumatoria del área ocupada por los insectos durante las 60 sesiones en la zona central en presencia de estímulo / en ausencia de estímulo (Fig. 11 de resultados).

$$Z = \sum_{i=1}^{60} a_{\text{con estímulo } i} / \sum_{i=1}^{60} a_{\text{sin estímulo } i}$$

donde:

a = área ocupada por insectos en la zona central.

Cada grupo de resultados fue comparado con el valor teórico = 1 de los controles con Test de t para una sola muestra (Instat).

Como medida de la respuesta del insecto al estímulo luego del tratamiento con BMM se usó el cociente Q entre la sumatoria del área ocupada por los insectos tratados durante las 60 sesiones respecto de los controles (Fig. 12 a 15 de resultados).

$$Q = \sum_{i=1}^{60} a_{ti} / \sum_{i=1}^{60} a_{ci}$$

donde:

$a_{ti}$  = área ocupada por insectos tratados en la zona central y

$a_{ci}$  = área ocupada por insectos controles en la zona central.

Cada grupo de resultados fue comparado con el valor teórico = 1 con Test de t para una sola muestra (Instat).

### ***2.3.IV. Tratamiento Postensayo de los Insectos.***

Una vez realizada la medición de actividad de los insectos se realizó en todos los casos una evaluación de su capacidad alimentaria. La metodología utilizada fue la descrita en el punto 2. 1. 1. I de esta sección y se calculó el porcentaje de insectos no alimentados.

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSION**

---





## 1. Efecto Antialimentario en *Triatoma infestans*.

### 1. I. Aplicación por Tópico.

El efecto antialimentario fue medido como la dosis de compuesto que inhibe la alimentación en el 50% de los insectos tratados (DE<sub>50</sub>). Las correspondientes DE<sub>50</sub> obtenidas para las mezclas *cis-trans* y para los isómeros *cis* puros de los distintos maleamatos se muestran en la Tabla 1 con la metodología ya descrita en el punto 2.1.1.

**Tabla 1**

**Evaluación del efecto antialimentario de maleamatos por aplicación tópica.**

Compuesto	<i>cis-trans</i> maleamatos	<i>cis</i> maleamatos
	DE <sub>50</sub> (µg/insecto) 95%IC	DE <sub>50</sub> (µg/insecto) 95%IC
EMM	30,8 (18.8 - 50.4)	16,3 (4,9 - 54,1)
PMM		8,6 (3,2 - 22,7)
BMM	65,3 (40.6 - 105.3)	6,6 (3,9 - 11,2)
HMM	20,8 (13.9 - 31.1)	5,0 (2,7 - 8,8)
HpMM		3,0 (1,4 - 6,3)
OMM	18,8 (11.7 - 30.2)	1,9 (1,5 - 2,5)
DeMM		> 30
DMM	> 200	-

**Efecto antialimentario de los maleamatos expresados como Dosis efectiva 50 (µg/insecto) con sus respectivos intervalos de confianza. Se topicó un µl de solución acetónica de los compuestos en cabeza de ninfas V.**

Estos resultados indicaron que los maleamatos mostraron inhibición alimentaria cuando los sustituyentes fueron desde etilo hasta octilo. No se encontró inhibición alimentaria para *cis-trans* DMM (DE<sub>50</sub> > 200 µg/insecto) ni para el *cis* DeMM (DE<sub>50</sub> > 30 µg/insecto). Por otro lado se determinaron con el mismo procedimiento las DE<sub>50</sub> para *trans*-HMM y *trans* OMM (95 % de isómero *trans*). Estos isómeros *trans* no produjeron inhibición alimentaria con DE<sub>50</sub> >50µg/insecto para ambos compuestos.

En todos los casos los isómeros *cis* puros resultaron mas efectivos que sus correspondientes mezclas de isómeros, lo que es explicable teniendo en cuenta la ineffectividad observada en los isómeros *trans*.

La mayor diferencia fue observada para el BMM donde el isómero *cis* puro fue casi 10 veces más efectivo que su respectiva mezcla de isómeros.

En el caso de los *cis-trans* maleamatos de metilo N-sustituídos no se observó correlación entre la efectividad y la longitud de la cadena alquílica, el compuesto más efectivo fue el *cis-trans* N-octil maleamato de metilo ( $DE_{50}$  18,8  $\mu\text{g/insecto}$ ) y el de menor efectividad el N-butil maleamato de metilo ( $DE_{50}$  65,3  $\mu\text{g/insecto}$ ), la falta de correlación es probable que se deba a la distinta relación *cis-trans* obtenidas en la síntesis no dirigida de los distintos maleamatos. La proporción p/p *cis-trans* medida para EMM fue 4:96, para BMM 30:70 y para HMM 59:41.

En el caso de los *cis* maleamatos sustituidos, donde el % de isómeros *cis* fue en todos los casos > 90 %, se observó una correlación entre efectividad y la longitud de la cadena alquílica desde etil a octil sustituyente. A mayor longitud de cadena alimentaria mayor efectividad en la inhibición alimentaria ( $DE_{50}$  13,6  $\mu\text{g/insecto}$  para EMM hasta  $DE_{50}$  1,9  $\mu\text{g/insecto}$  para OMM). Esta correlación fue corroborada por análisis de regresión múltiple (González Audino, 1996) y fue interpretada teniendo en cuenta que aquellos compuestos de sustituyente más largo son más liposolubles, lo que permite mayor movilidad a lo largo de la epicutícula y mayor posibilidad de alcanzar receptores sensoriales ubicados en distintas partes de la cabeza, principalmente antena y rostro (Fontán y Zerba, 1992). La importancia de los receptores antenales en la orientación de *Triatoma infestans* hacia la fuente de alimento fue estudiada por Lazzari y Nuñez (1989) y por Flores y Lazzari (1996). Ellos encontraron que los receptores antenales tienen un rol importante en la orientación del insecto hacia su fuente de alimento cuando están a larga distancia y juegan un rol menor cuando entran en contacto con ella.

En este último caso los receptores del rostro parecerían estar involucrados en la termo y quimiorrecepción.

Teniendo en cuenta lo estudiado por Lazzari y Nuñez podemos interpretar que los compuestos topicados en la cutícula dorsal de la cabeza deben migrar hacia las antenas para bloquear sus receptores.

Este movimiento a través de cutícula estaría favorecido para los compuestos de cadena más larga.

### 1. II. Exposición a Papeles Impregnados.

El efecto antialimentario fue medido como la dosis de compuesto que inhibe la alimentación en la mitad de los insectos expuestos durante 24 hs a papeles impregnados con los maleamatos ( $CE_{50}$ ). En este caso se utilizó la técnica descrita en el punto 2.1.II. de la metodología.

Los datos obtenidos para las mezclas *cis-trans* y para los isómeros *cis* puros de los distintos compuestos se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2**

***Evaluación del efecto antialimentario de maleamatos por exposición a papeles impregnados.***

Compuesto	<i>cis-trans</i> maleamatos	<i>cis</i> maleamatos
	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 95%IC	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 95%IC
EMM	-	2,47 (0,3 - 6,10)
PMM		5,1 (2,5 - 11,7)
BMM	219,6 (139,9 - 344,7)	5,41 (2,01 - 11,00)
HMM	564,3 (532,4 - 599,1)	
HpMM		22,18 (15,35 - 30,36)
OMM	475,4 (460,1 - 492,1)	65,10 (43,56 - 91,64)

***Evaluación del efecto antialimentario de los maleamatos expresados como  $CE_{50}$  en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  con sus respectivos intervalos de confianza. Ninfas V se expusieron durante 24 hs a papeles de filtro impregnados con los compuestos.***

No se encontró correlación entre el efecto antialimentario y la longitud de la cadena alquílica para la mezcla *cis-trans* de isómeros debido probablemente a la distinta proporción de isómeros *cis-trans* descritas en el punto 1. 1. de resultados y discusión. El mayor efecto antialimentario fue para *cis-trans* BMM ( $CE_{50}$  219,6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Todos los isómeros *cis* puros fueron más efectivos que las correspondientes mezclas *cis-trans*, resultado esperable por la falta de efecto antialimentario de los isómeros *trans*.

Se encontró además correlación entre la longitud de la cadena alquílica y la inhibición alimentaria inversa a la observada por aplicación tópica. El mayor efecto antialimentario fue observado para la cadena más corta de los *cis* *N*-alquil maleamatos de metilo ( $CE_{50}$  para EMM 2,47  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). El efecto antialimentario disminuye con el aumento de la longitud de la cadena alquílica hasta ocho carbonos ( $CE_{50}$  para OMM 65,1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Esta correlación es similar a la observada por Berger y Estes (1987) quienes trabajaron con machos de *Trichoplusia ni* (Hübner) expuestos a *N*-alquil maleámicos. Ellos encontraron que las maleamidas más activas para bloquear la recepción de feromonas eran aquellas que tenían cadena alquílica más cortas.

Tanto en el caso de *Trichoplusia ni* como en *Triatoma infestans* la mayor actividad podría ser explicada teniendo en cuenta que la mayor volatilidad de los compuestos con cadena alquílica más corta facilita la llegada de los mismos a los receptores antenales, proceso poco significativo en los tratamientos por tópico. Como ya fue descrito estos receptores son importantes en la orientación para el comportamiento alimentario de *Triatoma infestans*.

### 1. III. *Interposición de Telas Impregnadas.*

El efecto antialimentario fue medido como la concentración de compuesto en tela interpuesta entre el insecto y la fuente de alimento que inhibe en un 50 % de insectos el comportamiento alimentario ( $CE_{50}$ ).

Las correspondientes  $CE_{50}$  obtenidas para *cis-trans* HMM y para los isómeros *cis* puros se resumen en la Tabla 3. La técnica utilizada fue descrita en el punto 2.1.III. de la metodología.

**Tabla 3**

***Evaluación del efecto antialimentario de maleamatos por interposición de telas impregnadas.***

Compuesto	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), 95%IC
<i>cis-trans</i> HMM	125,2 (30,0 - 585,1)
<i>cis</i> EMM	136,5 (50,8 - 360,2)
<i>cis</i> PMM	42,8 (17,5 - 104,7)
<i>cis</i> BMM	22,2 (1,1 - 30,1)
<i>cis</i> HMM	16,3 (10,6 - 25,2)
<i>cis</i> HpMM	14,3 (3,2 - 36,4)
<i>cis</i> OMM	3,2 (1,3 - 9,4)

***Efecto antialimentario de los maleamatos expresado como  $CE_{50}$  en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  con sus respectivos intervalos de confianza. La tela impregnada se interpuso entre la fuente de alimento (paloma) y las ninfas V sin tratamiento.***

Como fue observado con la metodología de aplicación tópica y relacionado con el alto % de isómeros *trans* en la exposición a papel la única mezcla *cis-trans* evaluada (HMM) resultó menos efectiva que su correspondiente isómero *cis*.

Se encontró una correlación directa entre la longitud de la cadena alquílica y el efecto antialimentario. Al igual que en la metodología de aplicación tópica el mayor efecto correspondió al compuesto de mayor largo de cadena sustituyente ( $CE_{50}$  para OMM 3,2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) y el menor efecto correspondió al compuesto de cadena sustituyente más corta ( $CE_{50}$  para EMM 136,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

De acuerdo a lo discutido para las metodologías anteriores (aplicación tópica y exposición a papel) las vías de llegada de los compuestos a los receptores antenales son principalmente dos, contacto y tensión de vapor. La correlación obtenida con la metodología de exposición a tela nos estaría indicando que en este caso predomina la vía de contacto y por lo tanto los compuestos de mayor longitud de cadena son los de mayor migración y los de mejor llegada a los receptores antenales. Esto se ve corroborado por el comportamiento de las vinchucas expuestas a las telas impregnadas. En todos los casos que hubo inhibición alimentaria las etapas bloqueadas fueron aquellas a partir de la entrada en contacto con la tela. En efecto, las dos primeras etapas correspondientes a la orientación por movimiento de antenas y acercamiento hacia la paloma por movimientos locomotores se cumplieron de la misma manera que en los insectos controles. Cuando los insectos se posan sobre la tela, extienden el rostro el que entra en contacto con el compuesto. En ese momento se interrumpe el comportamiento alimentario y comienza el comportamiento de limpieza de antenas y rostro. Este cambio de comportamiento podría interpretarse como que es necesario el contacto con el compuesto para que se produzca el efecto antialimentario.

Los compuestos más efectivos serían entonces los que presentan mas facilidad para migrar por la cutícula (mayor liposolubilidad).

Esta metodología de interposición de telas demostró un efecto rápido visible desde el momento que los insectos no pre-tratados entran en contacto con los compuestos. Los insectos pretratados 24 hs antes por tópico y por exposición a papel mostraron bloqueado su comportamiento alimentario permaneciendo inactivos durante todo el ensayo desde las primeras etapas ya que no se orientaron ni buscaron su fuente de alimento.

## 2. Efecto sobre Poblaciones Experimentales.

### 2.1. Efecto de cis - trans Maleamatos sobre Poblaciones Experimentales.

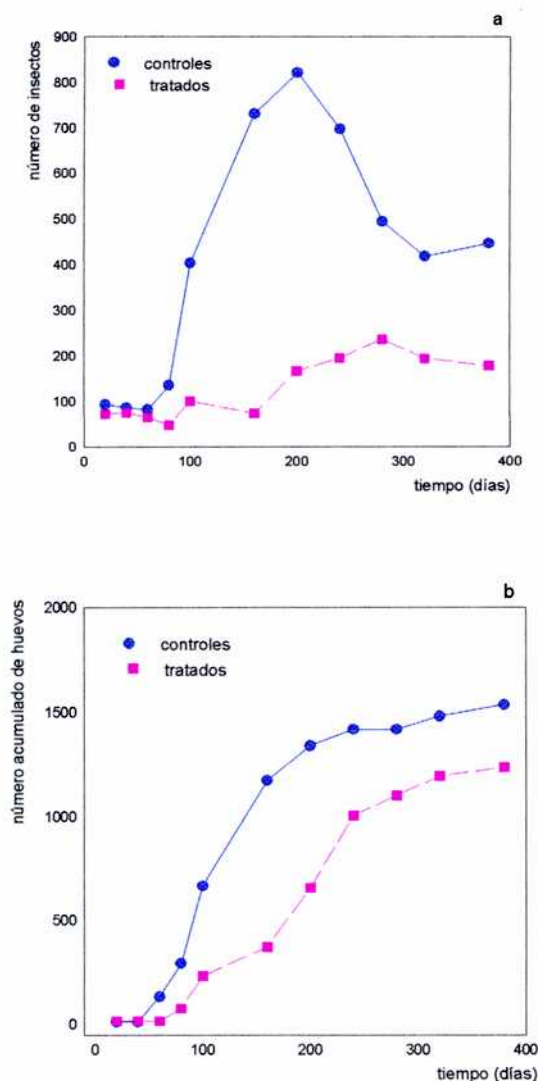
La exposición continua de poblaciones experimentales de *Triatoma infestans* a papeles impregnados con los distintos N-alquil maleamatos de metilo mostró una disminución significativa en el número de insectos y de huevos respecto a la población control no tratada.

El incremento de las poblaciones controles siguió la curva general de crecimiento de una población normal, comenzando con un crecimiento rápido hasta alcanzar un máximo a los 200 días de experiencia debido a una buena posibilidad de alimentación. A partir de ese momento la población experimental deja de crecer y oscila alrededor de un valor de equilibrio. El límite de crecimiento de las poblaciones controles está dado posiblemente por la densidad de individuos. La mayor densidad poblacional lleva a mecanismos de competencia por espacio y alimento. Estos factores denso dependientes en poblaciones de *Triatoma infestans* fueron estudiados por Schofield (1985) y Gorla y Schofield (1985). El análisis de poblaciones de campo de *Triatoma infestans* después de tres años de estudio demostró que la velocidad de crecimiento poblacional está afectada por mortalidades denso dependientes y denso independientes. El mecanismo dependiente de densidad fue importante en la determinación del nivel de equilibrio y el mecanismo independiente de la densidad (variaciones estacionales de temperatura) produjo fluctuaciones en la densidad poblacional a lo largo del año (Gorla, 1985). En nuestras poblaciones experimentales el principal mecanismo operante fue seguramente el denso dependiente ya que las variables ambientales (factor denso independiente) se mantuvieron constantes durante toda la experiencia.

Todas las poblaciones experimentales expuestas a papeles impregnados con los N-alquil maleamatos de metilo mostraron disminución significativa en el número de individuos a  $p < 0,01$  (Test de Student) en todos los casos. Las poblaciones tratadas se mantuvieron por debajo de las poblaciones controles hasta los 400 días de experiencia. Estas poblaciones no presentaron la fase de la curva de crecimiento rápido a pesar de la disponibilidad de espacio y alimento.

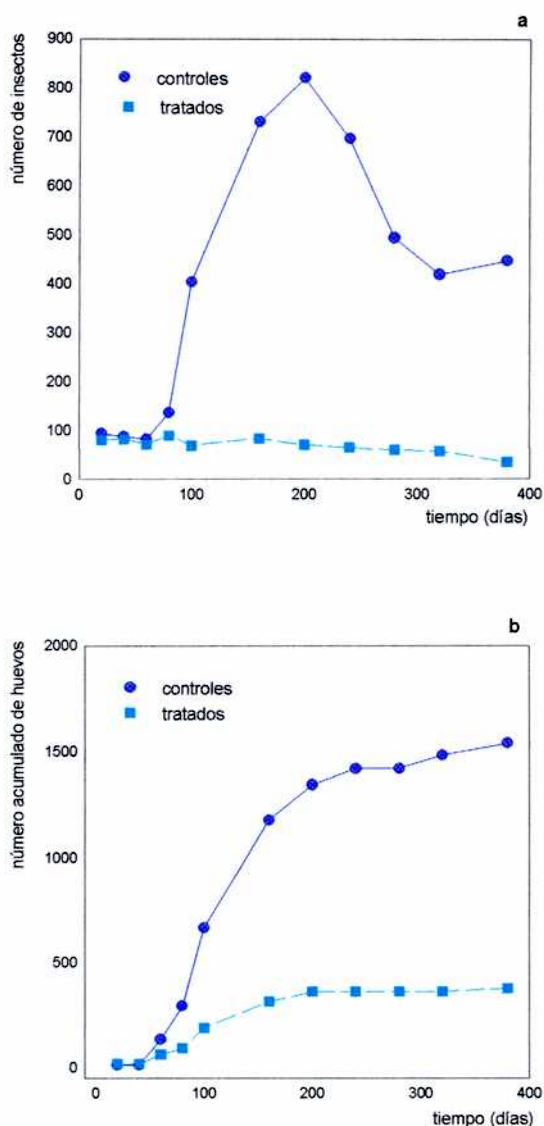


La diferencia entre el número de insectos y de huevos entre población control y expuesta a BMM 0,7 mg/cm<sup>2</sup> se muestran en la Figura 1 donde la población experimental expuesta a BMM (Fig. 1. a) mostró leve incremento poblacional a partir de los 200 días. Coincidentemente con este incremento en el número de individuos se observó un incremento en el número de huevos depositados (Fig. 1. b). El número total de huevos depositados por la población control fue 1500 a los 400 días y el mismo número para la población tratada fue 1250 ( $p < 0,01$ ).



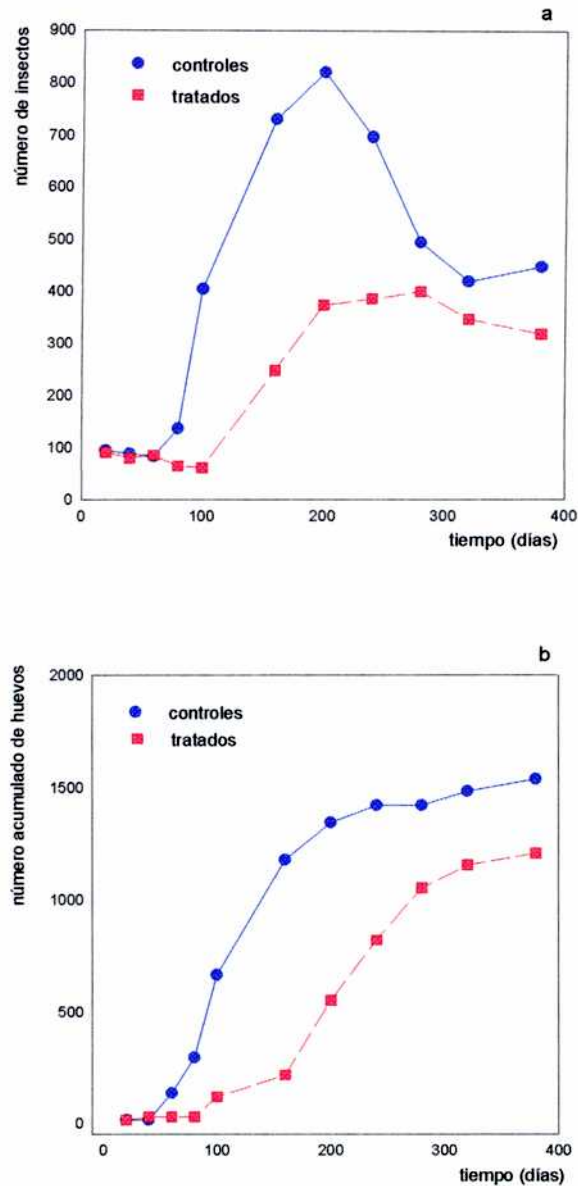
**Fig. 1 Efecto del cis-trans N-butil maleamato de metilo (BMM) sobre el número de insectos (a) y de huevos (b) de poblaciones experimentales de *Triatoma infestans*.** La concentración inicial del compuesto fue 0,7 mg/cm<sup>2</sup>. Los insectos permanecieron expuestos en forma permanente a los mismos papeles. El número de insectos en ambas poblaciones fue significativamente diferente ( $p = 0,003$ ,  $gl = 10$ ,  $T = 3,7$ ). El número acumulado de huevos depositado por ambas poblaciones resultó significativamente diferente ( $p = 0,001$ ,  $gl = 10$ ,  $T = 4,2$ ).

La diferencia entre el número de insectos y de huevos entre población control y expuesta a OMM 0,7 mg/cm<sup>2</sup> se muestran en la Figura 2 donde la población experimental expuesta a OMM no mostró ningún incremento poblacional hasta los 400 días de la experiencia. El número total de huevos depositados por la población tratada fue llamativamente menor que el de la población control (300 para tratados y 1500 para control) con  $p < 0,01$ .



**Fig. 2 Efecto del cis-trans N-octil maleamato de metilo (OMM) sobre el número de insectos (a) y de huevos (b) de poblaciones experimentales de *Triatoma infestans*.** La concentración inicial del compuesto fue 0,7 mg/cm<sup>2</sup>. Los insectos permanecieron expuestos en forma permanente a los mismos papeles. El número de insectos en ambas poblaciones fue significativamente diferente ( $p = 0,002$ ,  $gl = 10$ ,  $T = 3,9$ ). El número acumulado de huevos depositado por ambas poblaciones resultó significativamente diferente ( $p = 0,001$ ,  $gl = 10$ ,  $T = 4,3$ ).

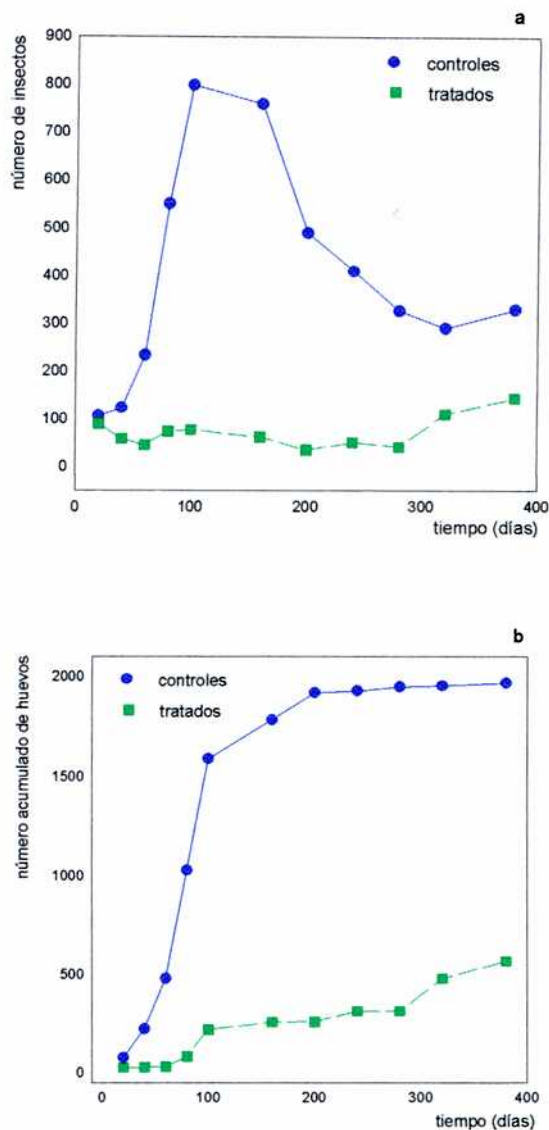
La diferencia entre el número de insectos y de huevos entre población control y expuesta a HMM 0,4 mg/cm<sup>2</sup> se muestran en la Figura 3.



**Fig. 3 Efecto del cis-trans N-hexil maleamato de metilo (HMM) sobre el número de insectos (a) y de huevos (b) de poblaciones experimentales de *Triatoma infestans*.** La concentración inicial del compuesto fue 0,4 mg/cm<sup>2</sup>. Los insectos permanecieron expuestos en forma permanente a los mismos papeles. El número de insectos en ambas poblaciones fue significativamente diferente ( $p=0,008$ ,  $gl=10$ ,  $T=3,2$ ). El número acumulado de huevos depositado por ambas poblaciones resultó significativamente diferente ( $p=0,001$ ,  $gl=10$ ,  $T=4,1$ ).

La diferencia entre el número de insectos y de huevos entre población control y expuesta a HMM 0,7 mg/cm<sup>2</sup> se muestran en la Figura 4.





**Fig. 4 Efecto del cis-trans N-hexil maleamato de metilo (HMM) sobre el número de insectos (a) y de huevos (b) de poblaciones experimentales de *Triatoma infestans*. La concentración inicial del compuesto fue  $0.7 \text{ mg/cm}^2$ . Los insectos permanecieron expuestos en forma permanente a los mismos papeles. El número de insectos en ambas poblaciones fue significativamente diferente ( $p=0,001$ ,  $gl=10$ ,  $T=4,2$ ). El número acumulado de huevos depositado por ambas poblaciones resultó significativamente diferente ( $p=0,001$ ,  $gl=10$ ,  $T=6,1$ ).**

Las poblaciones experimentales expuestas a distintas concentraciones de HMM mostraron una correlación entre la concentración del compuesto y la efectividad para demorar el crecimiento de la población. En efecto, cuando la concentración fue  $0,7 \text{ mg/cm}^2$  un leve crecimiento poblacional se observó recién a los 300 días mientras que cuando la concentración fue de  $0,4 \text{ mg/cm}^2$  el comienzo de crecimiento poblacional fue a los 100 días. Esta mayor diferencia entre la curva de la población tratada con HMM  $0,7 \text{ mg/cm}^2$  y su

control resultó en un menor valor de  $p$  ( $p= 0,001$  para HMM  $0,7 \text{ mg/cm}^2$  vs  $p= 0.008$  para HMM  $0,4 \text{ mg/cm}^2$ ). Coincidentemente con la reducción significativa del número de individuos en la población experimental tratada se observó reducción en el número acumulado de huevos. Con la misma correlación entre concentración y efectividad. A mayor concentración ( $0,7 \text{ mg/cm}^2$ ) el incremento comienza a los 300 días mientras que a menor concentración ( $0,4 \text{ mg/cm}^2$ ) a los 100 días.

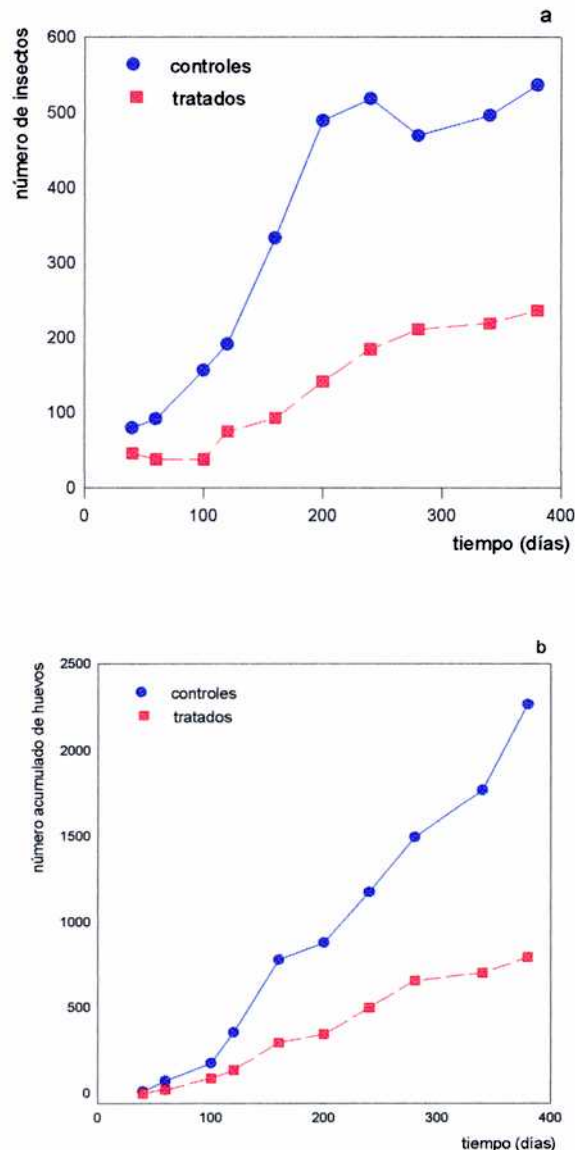
### ***2.2.Efecto de cis Maleamatos sobre Poblaciones Experimentales.***

Establecida la mayor eficacia antialimentaria de los isómeros *cis* respecto de los isómeros *cis-trans* maleamatos (Tablas 1, 2 y 3), se realizaron nuevos ensayos de poblaciones experimentales con concentraciones menores a las informadas anteriormente. En estos casos se expusieron poblaciones experimentales de *Triatoma infestans* a papeles impregnados con una concentración inicial en papeles de filtro de  $0,1 \text{ mg/cm}^2$ . Al igual que en las poblaciones experimentales expuestas a *cis-trans* maleamatos las que fueron continuamente expuestas a *cis* maleamatos mostraron una disminución significativa en el número de insectos y de huevos respecto a poblaciones no tratadas.

Las poblaciones controles tuvieron un crecimiento similar al observado para las poblaciones controles de las poblaciones expuestas a *cis-trans* maleamatos con un nivel de máxima correspondiente a 200 días de experiencia. Los mecanismos dependientes de densidad que estarían operando ya fueron descritos en el punto 2.1. de esta sección. Las poblaciones experimentales expuestas a los papeles tratados con los distintos maleamatos de metilo mostraron en todos los casos una disminución en el número de insectos y de huevos hasta al menos 250 días. La reducción fue significativa ( $p= 0,0016$ ) en el número de individuos y el número de huevos ( $p= 0,014$ ). Las poblaciones tratadas se mantuvieron por debajo de las poblaciones controles hasta por lo menos 250 días de experiencia. Al igual que las poblaciones experimentales expuestas a *cis-trans* maleamatos no se

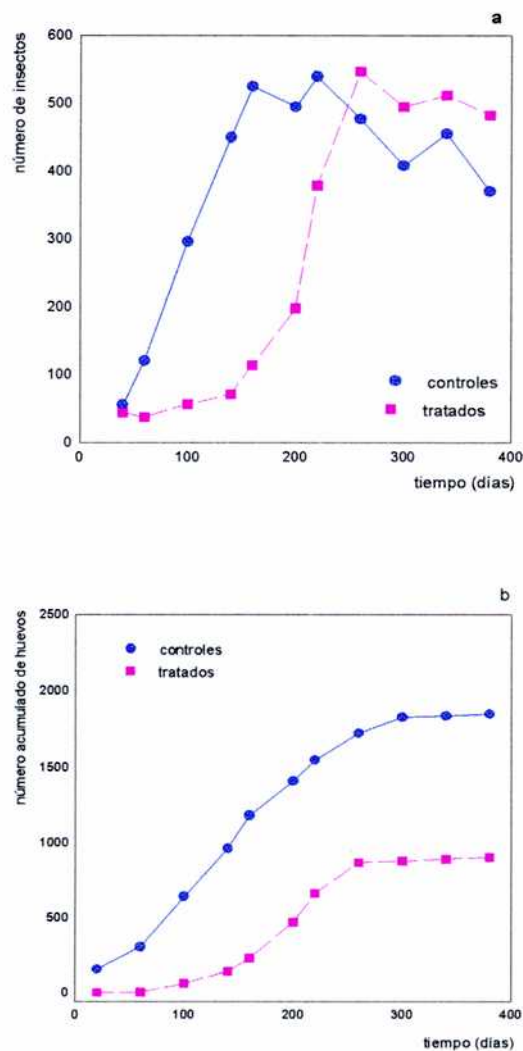
observó la fase de la curva de crecimiento rápido a pesar de la disponibilidad de espacio y alimento. Ver punto 2.1.

En la Fig. 5 se muestra la evolución en el número de insectos y huevos hasta los 400 días de exposición a *cis* EMM 0,1 mg/cm<sup>2</sup> donde se observó el comienzo del crecimiento poblacional a partir de los 100 días (Fig. 5. a) coincidentemente con el comienzo de incremento en el número de huevos depositados (Fig. 5. b).



**Fig. 5 Efecto del *cis* N-etil maleamato de metilo (EMM) sobre el número de insectos (a) y de huevos (b) de poblaciones experimentales de *Triatoma infestans*.** La concentración inicial del compuesto fue 0,1 mg/cm<sup>2</sup>. Los insectos permanecieron expuestos en forma permanente a los mismos papeles. El número de insectos en ambas poblaciones fue significativamente diferente ( $p= 0,0003$ ,  $gl= 9$ ,  $T= 5,6$ ). El número acumulado de huevos depositado por ambas poblaciones resultó significativamente diferente ( $p= 0,0059$ ,  $gl= 9$ ,  $T= 3,5$ ).

El número total de individuos a los 400 días fue aproximadamente 550 para la población control y de aproximadamente 200 para la población tratada. La diferencia es altamente significativa ( $p= 0.0003$ ). El número total de huevos depositados por la población control fue 2300 a los 400 días mientras que la población tratada llegó a 750 huevos. La diferencia es significativa con  $p= 0.0059$ . La diferencia entre el número de insectos y de huevos entre la población control y tratada con *cis* BMM 0,1 mg/cm<sup>2</sup> se muestran en la Fig. 6.



**Fig. 6 Efecto del *cis* N-butil maleamato de metilo (BMM) sobre el número de insectos (a) y de huevos (b) de poblaciones experimentales de *Triatoma infestans*** La concentración inicial del compuesto fue 0,1 mg/cm<sup>2</sup>. Los insectos permanecieron expuestos en forma permanente a los mismos papeles. El número de insectos en ambas poblaciones fue significativamente diferente ( $p= 0,016$ ,  $gl= 7$ ,  $T= 3,1$ ). El número acumulado de huevos depositado por ambas poblaciones resultó significativamente diferente ( $p= 0,00001$ ,  $gl=10$ ,  $T= 8,8$ ).

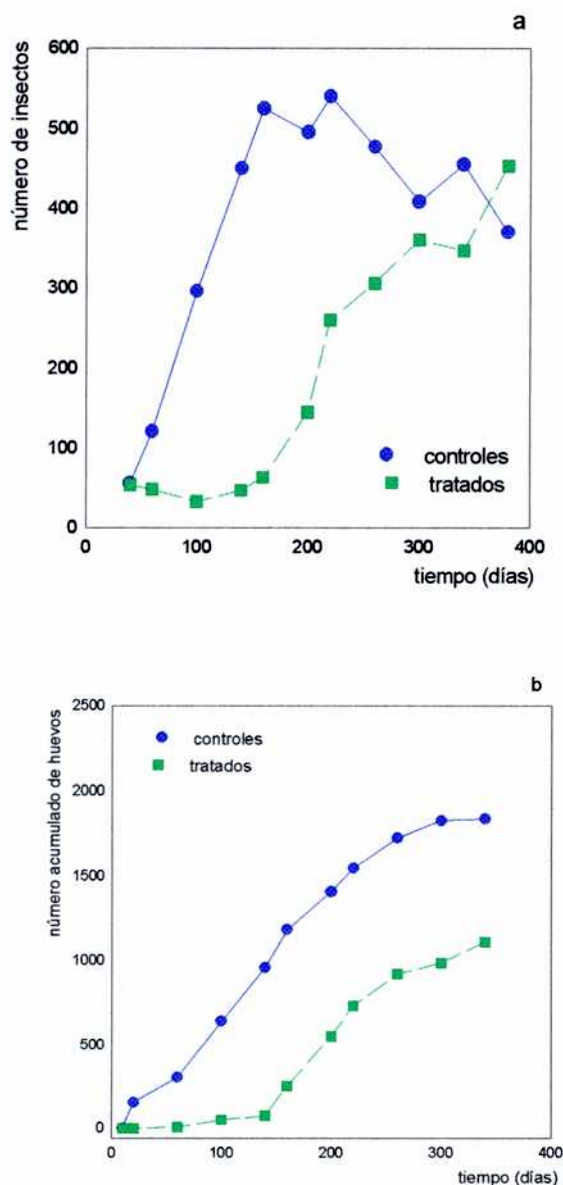
La población tratada mostró el comienzo del crecimiento poblacional a los 150 días en que se produjo un cambio de pendiente y alcanzó en número de individuos de la población control a los 220 días. A partir de este momento las poblaciones controles y tratadas no mostraron diferencias en su posición de equilibrio.

Este incremento demorado de la población experimental expuesta pudo deberse a una disminución de la actividad residual del *cis* BMM en los papeles de filtro. Esta hipótesis fue corroborada midiendo el efecto antialimentario residual en papeles impregnados y envejecidos según el punto 2.1.IV de la metodología. Ninfas expuestas durante 24 horas a dichos papeles envejecidos mostraron los siguientes porcentajes de inhibición alimentaria 100 % a los 120 días, 29 % a los 250 días y 0 % a los 380 días. Estos valores se corresponden con los cambios observados en la curva de crecimiento de la población expuesta a *cis* BMM. En efecto, el mayor efecto antialimentario (100 %) correspondió a la zona en la que no hay crecimiento poblacional mientras que un bajo efecto antialimentario (29 %) correspondió a la zona de mayor crecimiento poblacional. La falta de efecto antialimentario de los papeles envejecidos (0%) correspondió a la zona de superposición de curvas controles y tratadas. Resultados similares a estos fueron observados previamente en nuestro laboratorio (Picollo, et al. 1993) cuando expusimos poblaciones experimentales de *Triatoma infestans* a *N* - etilmaleimida (NEM). En este caso se observó un incremento demorado de la población tratada hasta los 220 días donde comenzó a crecer rápidamente hasta alcanzar y superar el nivel del control. Este incremento demorado debido a la posible degradación del NEM fue evitado cuando los papeles impregnados fueron reemplazados semanalmente. En este último caso se demostró que la presencia permanente de NEM mantiene la población sin crecimiento hasta prácticamente su extinción.

El número total de huevos acumulados en la población tratada fue significativamente menor a la población control (1800 vs. 900 con  $p= 0,00001$ ).

La diferencia entre el número de insectos y de huevos entre la población control y tratada con *cis* HpMM 0,1 mg/cm<sup>2</sup> se muestran en la Fig. 7





**Fig. 7 Efecto del *cis* N-heptil maleamato de metilo (HpMM) sobre el número de insectos (a) y de huevos (b) de poblaciones experimentales de *Triatoma infestans*. La concentración inicial del compuesto fue  $0,1 \text{ mg/cm}^2$ . Los insectos permanecieron expuestos en forma permanente a los mismos papeles. El número de insectos en ambas poblaciones fue significativamente diferente ( $p= 0,0031$ ,  $gl= 8$ ,  $T= 4,2$ ). El número acumulado de huevos depositado por ambas poblaciones resultó significativamente diferente ( $p= 0,00007$ ,  $gl= 10$ ,  $T= 6,3$ ).**

En forma similar a lo observado para *cis* BMM se encontró una demora en el crecimiento de la población experimental expuesta a HpMM.

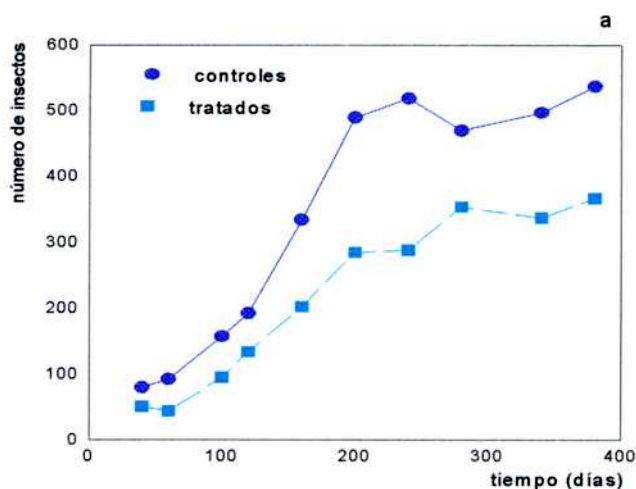
En este último caso el crecimiento comienza después de los 150 días y alcanzó el número de individuos de la población control a los 380 días.

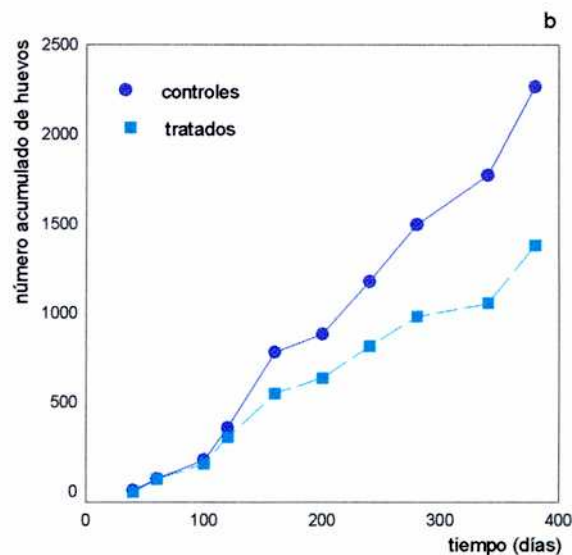
Como en el caso anterior (*cis* BMM) las curvas control y tratada llegan a similar nivel de equilibrio. La disminución de efecto antialimentario fue evaluada exponiendo ninfas V durante 24 horas a papeles impregnados con *cis* HpMM con distintos tiempos de envejecimiento según metodología 2.1.IV.

Los porcentajes de inhibición alimentaria determinados fueron 100 % a los 120 días, 70 % a los 250 días y 0 % a los 380 días. Estos valores indican que existe una correlación entre el incremento de la población expuesta y la disminución del efecto antialimentario del maleamato envejecido sobre el papel: mientras la inhibición alimentaria es total (100 %) no hay crecimiento poblacional; cuando la inhibición alimentaria es parcial (70 %) la población crece más lentamente que la población control, y por último cuando no hay inhibición alimentaria (0 %) las poblaciones controles y tratadas no muestran diferencia.

El número total de huevos depositados por la población tratada con *cis* HpMM es significativamente menor ( $p=0,00002$ ) que la población control.

La diferencia entre el número de insectos y de huevos entre la población control y tratada con *cis* OMM 0,1 mg/cm<sup>2</sup> se muestran en la Fig. 8.





**Fig. 8 Efecto del *cis* N-octil maleamato de metilo (OMM) sobre el número de insectos (a) y de huevos (b) de poblaciones experimentales de *Triatoma infestans*.** La concentración inicial del compuesto fue  $0,1 \text{ mg/cm}^2$ . Los insectos permanecieron expuestos en forma permanente a los mismos papeles. El número de insectos en ambas poblaciones fue significativamente diferente ( $p= 0,0003$ ,  $gl= 9$ ,  $T= 5,4$ ). El número acumulado de huevos depositado por ambas poblaciones resultó significativamente diferente ( $p= 0,0137$ ,  $gl= 9$ ,  $T= 3,0$ ).

En este caso y a diferencia de lo observado en los dos casos anteriores el número de individuos de la población tratada fue menor que el control hasta los 400 días ( $p= 0,0003$ ) sin alcanzar al número de insectos controles. El número de huevos acumulado fue significativamente menor ( $p= 0,014$ ) en la población tratada (1300 vs 2300 huevos).

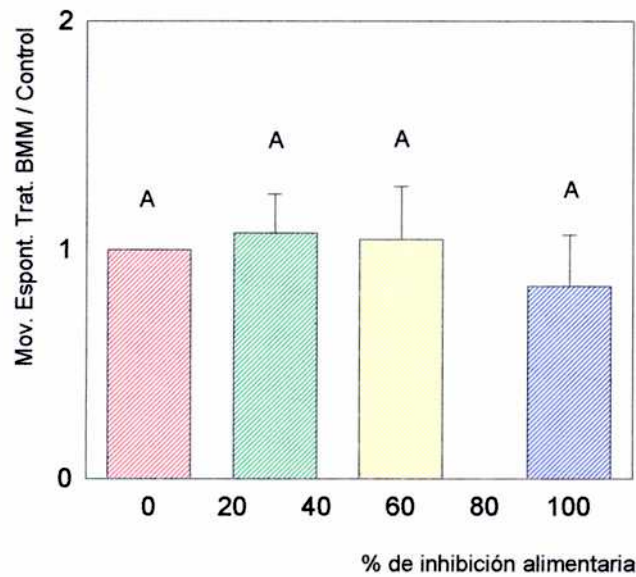
En resumen todas las poblaciones experimentales de *Triatoma infestans* expuestas a los *cis* maleamatos sustituidos en concentración inicial  $0,1 \text{ mg/cm}^2$  mostraron una reducción significativa en el número de individuos y de huevos respecto al grupo control. No hubo una clara correlación entre la actividad antialimentaria medida por exposición a papeles impregnados ( y usados a tiempo cero) y el nivel de reducción poblacional durante 400 días excepto que la mayor inhibición alimentaria y la mayor reducción de la población experimental fue observada para el *cis* maleamato de cadena más corta (*cis* EMM). Evidentemente en el caso de las poblaciones experimentales expuestas intervienen otros factores como la estabilidad del compuesto en el papel de filtro.



### 3. Efecto Sobre la Actividad de Insectos.

#### 3. 1. Efecto de BMM en la Actividad Espontánea.

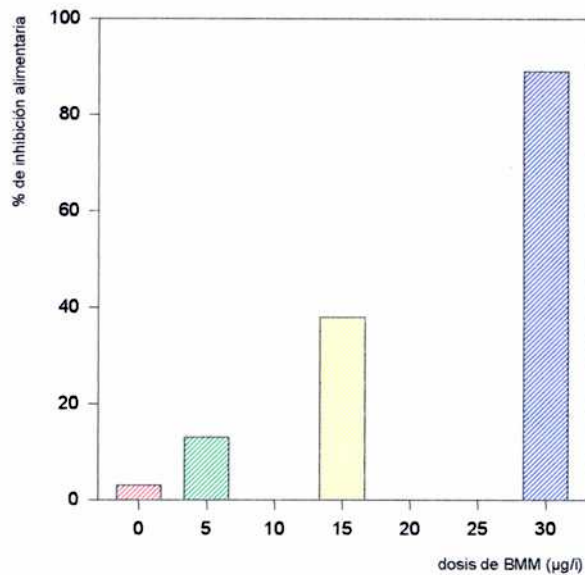
En la Fig. 9 se muestra la actividad espontánea respecto del control de ninfas V de *Triatoma infestans* tratadas con dosis de BMM que producen distinto porcentaje de inhibición antialimentaria. Se graficó el cociente del movimiento total de los insectos tratados respecto al movimiento total de los insectos controles en el tiempo experimental (30 minutos) vs el porcentaje de inhibición alimentaria medido en los insectos una vez finalizado el ensayo.



**Fig. 9. Actividad Locomotora Espontánea (sin fuente de estímulo) de Ninfas V Tratadas con BMM en Dosis que Producen Distintos % de Inhibición Alimentaria.**

El movimiento espontáneo de los insectos se expresa como movimiento total de insectos tratados respecto al movimiento total de insectos controles durante 30 minutos. El % de inhibición alimentaria se determinó sobre los mismos insectos una vez terminado en ensayo de medición de actividad. La misma letra sobre la barra indica que no hay diferencia significativa respecto del control. Test de *t* para una sola muestra, media hipotética = 1.

Dosis de BMM que produjeron porcentajes de inhibición alimentaria que variaron entre 0 y 100 % no produjeron diferencia significativa en el movimiento espontáneo con respecto a controles. No se encontró correlación entre la inhibición alimentaria producida por BMM y la cantidad de movimiento total de los insectos, a pesar que las dosis utilizadas demostraron correlación con la inhibición alimentaria (Fig. 10).



**Fig. 10. Correlación Entre Dosis Aplicada e Inhibición Alimentaria Observada en Ninfas V de *Triatoma infestans* Tratadas con BMM.** Las ninfas V fueron tratadas por aplicación por tópicó de 1 µl de solución acetónica de BMM. Se midió inhibición de la alimentación a 24 hs postratamiento.

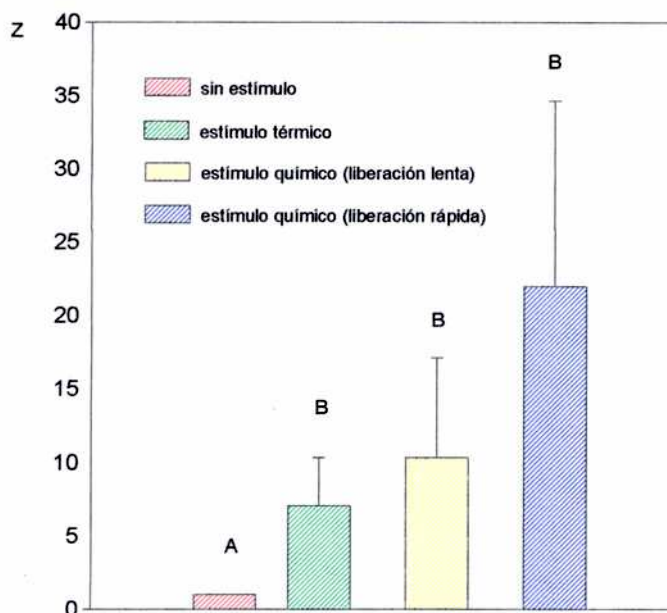
### 3. 2. Efecto de BMM en la Actividad de Respuesta a Estímulos Térmicos y Químicos.

La Fig. 11 muestra la presencia de las ninfas V controles en la zona central de la arena experimental en ausencia de estímulo o en presencia de distintos estímulos. Se graficó el cociente entre área central ocupada por insectos en presencia de un estímulo respecto a esa misma área en ausencia de estímulo. Tanto la fuente de estímulo térmico como las fuentes de estímulo químico produjeron un acercamiento de las ninfas hacia la zona central. No se encontró diferencia significativa en la capacidad de respuesta producida por los distintos estímulos.

Sin embargo la gran dispersión en la respuesta a estímulo químico (especialmente evidente para fuentes de liberación masiva) sugiere una mayor efectividad del gradiente de temperatura. Estos resultados demuestran que a distancias cortas como la utilizada en este diseño experimental las vinchucas se orientan vía termo o quimiorreceptores hacia su fuente de alimento.



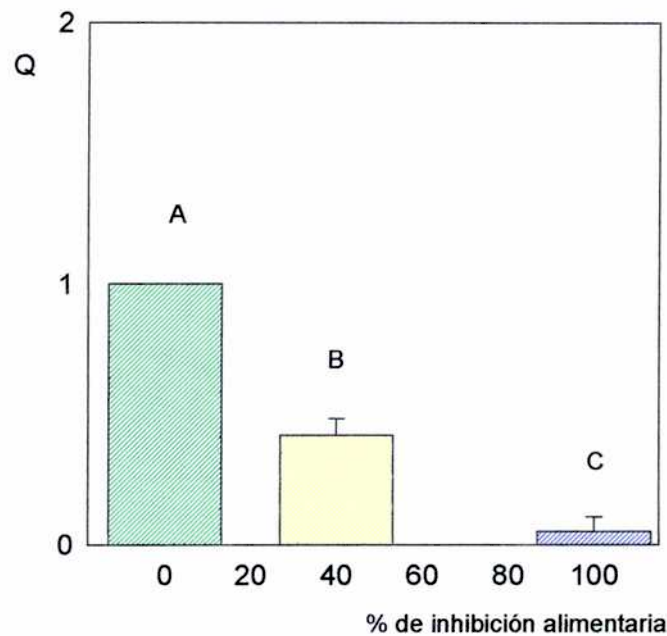
Estas claves sensoriales fueron descritas por Lazzari y Nuñez (1989).



**Fig. 11. Acercamiento de Ninfas V de *Triatoma infestans* a Fuentes de Estímulo Térmico o Químico.** La respuesta se midió como presencia de los insectos en la cercanía de la fuente respecto a la presencia de los insectos en la misma área cuando no está la fuente de estímulo. El parámetro Z fue definido en el punto 2. 4. III. de la metodología. Los grupos indicados con B son estadísticamente significativos respecto del control con  $p < 0,05$ . Test de t para una sola muestra, media hipotética = 1.

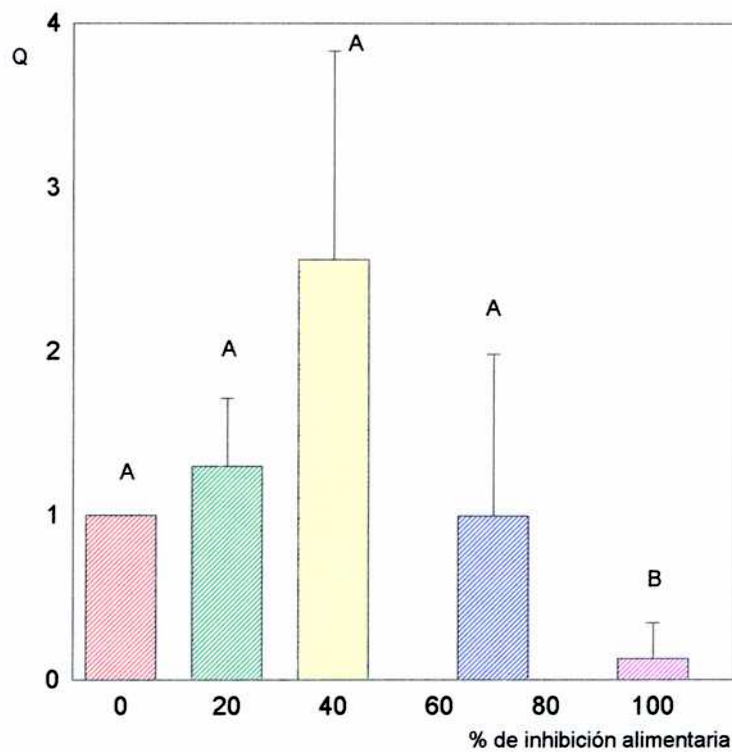
Basándonos en estos resultados de respuesta de insectos controles a los distintos estímulos se utilizó la misma metodología para determinar el bloqueo de la respuesta a estímulos térmico y químico en ninfas pretratadas con BMM con dosis que produjeron diferentes porcentajes de inhibición alimentaria.

En la Fig. 12 se muestra la relación entre el área central ocupada por los insectos tratados respecto a insectos controles vs el porcentaje de inhibición alimentaria de los insectos tratados. Se encontró una correlación positiva entre la inhibición alimentaria y la falta de acercamiento a la fuente de estímulo térmico ya que a mayor efecto antialimentario menor acercamiento al estímulo.



**Fig. 12. Acercamiento a Fuente de Estímulo Térmico de Ninfas V Controles y Tratadas con Dosis de BMM que producen distinto % de Inhibición Alimentaria.** La respuesta se midió como presencia de los insectos tratados en la cercanía de la fuente respecto a la presencia de los insectos controles en la misma zona durante todo el tiempo experimental. El parámetro Q fue definido en el punto 2. 3. III. de la metodología. Las letras distintas indican que existen diferencias significativas respecto del control con  $p < 0,05$ . Test de  $t$  para una sola muestra, media hipotética = 1.

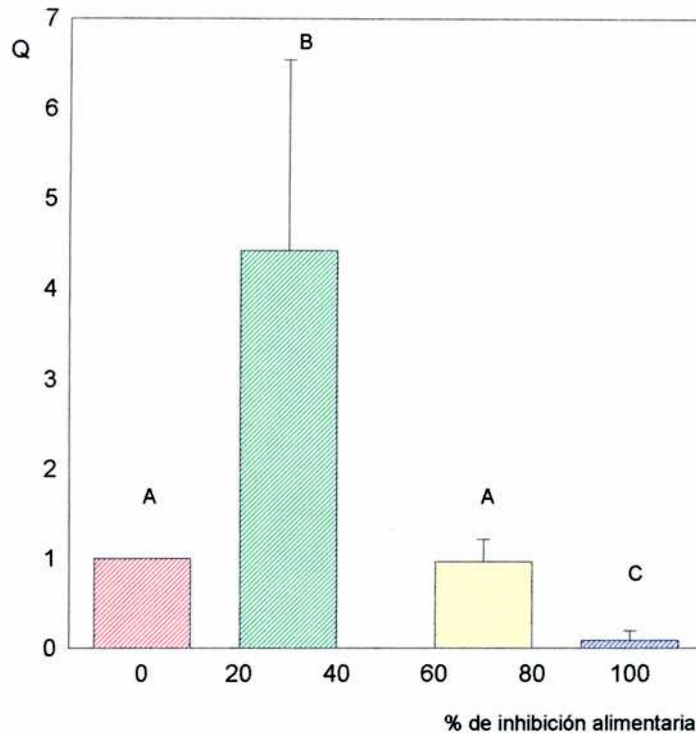
En la Fig. 13 se muestra la alteración de la respuesta a una fuente de liberación lenta de  $\text{CO}_2$  en ninfas V pretratadas con BMM con dosis que produjeron distinto porcentaje de inhibición alimentaria. Se graficó el área central total ocupada por los insectos tratados con respecto al área central total ocupada por los insectos controles vs el porcentaje de inhibición alimentaria. No se encontró correlación entre el efecto antialimentario y la falta de respuesta a estímulo químico excepto que para el máximo efecto antialimentario (100%) se encontró falta total de acercamiento a la fuente de estímulo.



**Fig. 13. Acercamiento a Fuente de Estímulo Químico (de liberación lenta) de Ninfas V Controles y Tratadas con Dosis de BMM que Producen Diferente % de Inhibición Alimentaria.** La respuesta se midió como presencia de los insectos tratados en la cercanía de la fuente respecto a la presencia de los insectos controles en la misma zona durante el tiempo experimental. El parámetro Q fue definido en el punto 2. 3. III. de la metodología. B estadísticamente significativo respecto del control con  $p < 0.05$ . Test de t para una sola muestra, media hipotética = 1.

En la Fig. 14 se muestra la alteración de la respuesta a una fuente de liberación masiva de  $CO_2$  en ninfas V pretratadas con BMM en dosis que producen diferente porcentaje de efecto antialimentario. Se graficó el área central ocupada por los insectos tratados durante toda la experiencia con respecto al área central ocupada por los insectos controles durante la experiencia vs el porcentaje de inhibición alimentaria.





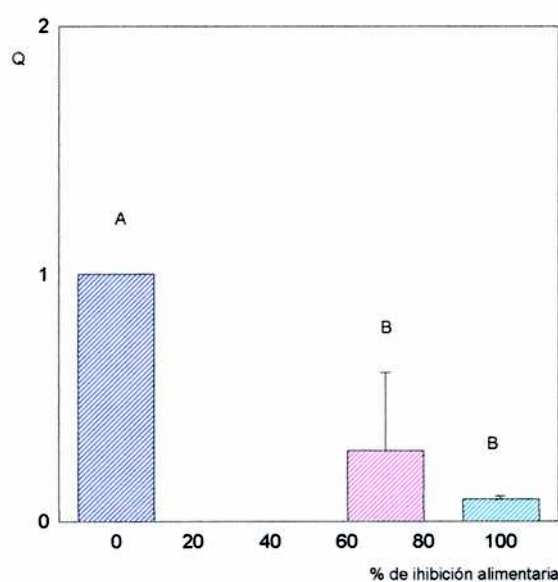
**Fig. 14. Acercamiento a Fuente de Estímulo Químico (de liberación rápida) de Ninfas V Controles y Tratadas con Dosis de BMM que Producen Diferentes % de Inhibición Alimentaria.** La respuesta se midió como presencia de los insectos tratados en la cercanía de la fuente respecto a la presencia de los insectos controles en la misma zona durante el tiempo experimental. El parámetro Q fue deduido en el punto 2. 3. III. de la metodología. B y C indican diferencias estadísticas significativas respecto del control con  $p < 0,05$ .

Similar a lo encontrado para la fuente de liberación lenta no se encontró correlación entre mayor efecto antialimentario y bloqueo de respuesta al estímulo químico, excepto que al mayor porcentaje de inhibición alimentaria (100%) correspondió la falta total de respuesta. Por el contrario el pretratamiento de los insectos con BMM en dosis capaces de producir efecto antialimentario intermedio, produce una tendencia al aumento en el cociente Q.

Los resultados obtenidos en la experiencia de respuesta a estímulos térmico y químico de insectos pretratados con BMM y con nuestro diseño experimental demuestran que termo y quimiorreceptores interactúan de diferente manera con dosis intermedias de BMM.

Mientras que en termorreceptores se observó bloqueo parcial y gradual con la dosis, en quimiorreceptores se observó bloqueo solamente en dosis capaces de producir una inhibición alimentaria total.

Cuando actúan los dos estímulos combinados la respuesta total de los insectos es similar a los resultados encontrados para estímulo térmico. En la Fig. 15 se graficó el cociente del área central ocupada por insectos tratados respecto del área central ocupada por insectos controles vs el porcentaje de inhibición alimentaria. Se encontró correlación entre el acercamiento a la fuente de estímulo y el efecto antialimentario.

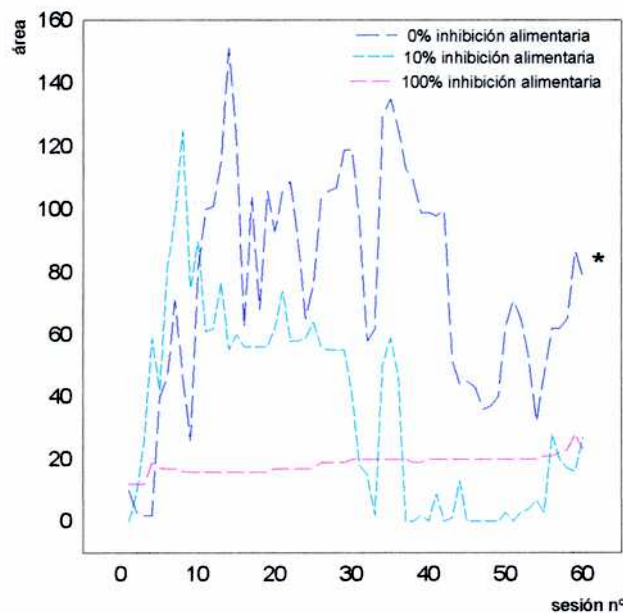


**Fig. 15. Acercamiento a Fuentes de estímulo Térmico + Químico de Ninfas V Controles y Tratados con Dosis de BMM que Producen Distinto % de Inhibición Alimentaria.** La respuesta se midió como presencia de los insectos tratados en la cercanía de las fuentes respecto a la presencia de los insectos en la misma zona durante el tiempo experimental. El parámetro Q fue dedinado en el punto 2. 3. III. de la metodología. B indica diferencias significativas respecto del control con  $p < 0,01$ .

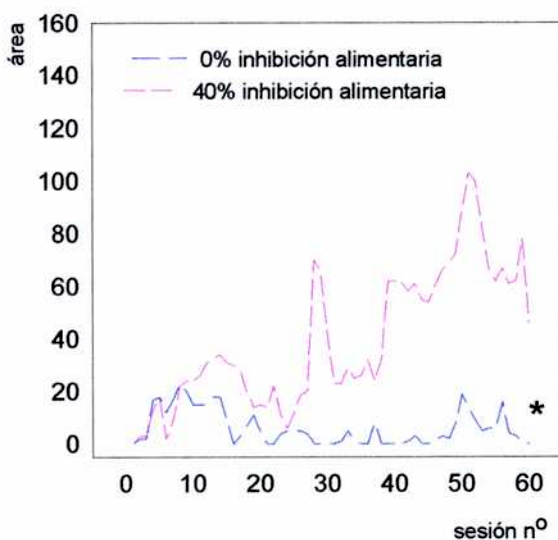
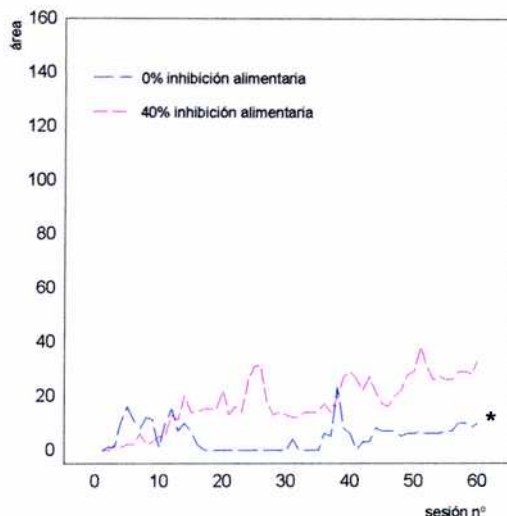
En un intento por interpretar estos resultados se analizaron los gráficos que representan el área ocupada por insectos en la zona central en cada una de las 60 sesiones registradas durante cada experiencia vs el número de sesión correspondiente (como medida del tiempo transcurrido a lo largo de la experiencia). Los insectos fueron tratados con dosis de BMM que producen 10 y 100 % de efecto antialimentario en el caso del experimento con estímulo térmico y 40 % de efecto antialimentario para el caso del estímulo químico.



Un ejemplo de cada uno de estos ensayos se muestra en las Fig. 16, 17 y 18. La curva \* de las Fig. 16, 17 y 18 refleja la permanencia de los insectos controles en la zona periférica a la fuente a lo largo de la experiencia (30 minutos). Como se ve los insectos comienzan a aproximarse a la fuente de estímulo luego de algunos minutos retornando después en general a la zona periférica. En el caso de la respuesta a estimulación térmica (Fig. 16) el tratamiento con dosis de BMM que producen porcentaje de inhibición alimentaria intermedia produce un descenso en el número de insectos que se acercan a la fuente. Sin embargo, los que logran acercarse a ella muestran un patrón de comportamiento semejante a los controles. Por el contrario, cuando se considera la respuesta a estímulo químico (Fig. 17) para tratamiento con dosis de BMM que producen porcentaje de efectos antialimentario intermedios, los insectos que se aproximan a la fuente no parecen retornar luego a la periferia, aumentando incluso tardíamente el área de insectos próximos a la fuente. Esto explicará el aumento del cociente Q (Fig. 13 y 14) observado para dosis bajas de BMM.



**Fig. 16. Patrón de Acercamiento y Alejamiento a la Fuente de Estímulo Térmico en Ninfas V Controles y Tratadas con Distintas Dosis de BMM que Producen Diferente % de Inhibición Alimentaria.** Se midió el área ocupada en la cercanía de la fuente en cada sesión del tiempo experimental. Valores bajos de área ocupada representa baja presencia de insectos en la zona cercana a la fuente de estímulo.

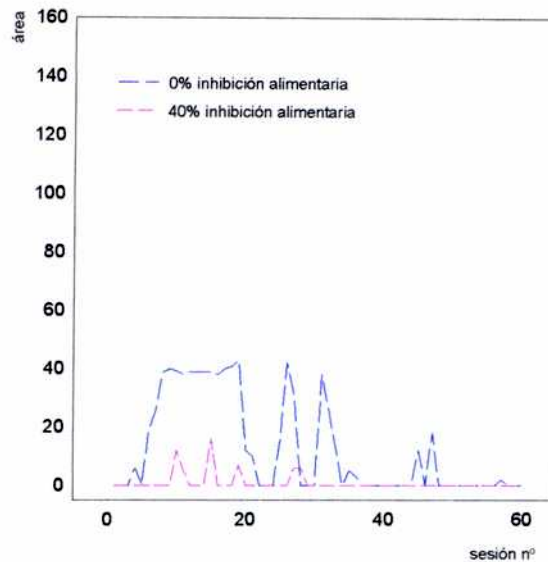


**Fig. 17. Patrón de Acercamiento y Alejamiento a Fuentes de Estímulo Químico en Ninfas V Controles y Tratadas con una Dosis de BMM que Producen 40 % de Inhibición Alimentaria.**

a. Se midió el área ocupada en la cercanía de una fuente de liberación lenta de dióxido de carbono en cada sesión del tiempo experimental.

b. Se midió el área ocupada en la cercanía de una fuente de liberación masiva de dióxido de carbono en cada sesión del tiempo experimental.

Quando se agregó estímulo térmico a la fuente de liberación lenta de CO<sub>2</sub> (levadura) se encontró que para tratamientos con dosis intermedias de BMM la respuesta de los insectos es similar a lo encontrado con estímulo térmico solo Fig. 18.



**Fig. 18. Patrón de Acercamiento y Alejamiento a Fuentes de Estímulo Térmico + Químico en Ninfas V Controlas y Tratadas con Dosis de BMM que Producen 40 % de Inhibición Alimentaria.** Se midió el área ocupada en la cercanía de la fuente en cada sesión del tiempo experimental.

Resumiendo los resultados obtenidos para bloqueo de quimio y termorreceptores en insectos controles y tratados con BMM se observó:

- La respuesta de los insectos controles a una fuente térmica es más homogénea que la respuesta a una fuente química.
- Dosis de BMM que producen 100 % de inhibición alimentaria bloquean termo y quimiorreceptores.
- La respuesta de insectos tratados con dosis intermedias de BMM muestran un bloqueo parcial de la termorrecepción.
- Los insectos tratados con dosis intermedias de BMM mostraron alteraciones en su comportamiento tigmotáctico cuando están en presencia de un estímulo químico.

Estos resultados pueden interpretarse teniendo en cuenta que muchos receptores sensoriales presentes en las antenas de *Triatoma infestans* (Bernard, 1974) poseen respuesta bimodal gracias a la presencia de pares antagónicos de receptores en la misma sensilia. Estos pares antagónicos podrían tener sensibilidad diferencial al BMM bloqueándose preferencialmente la respuesta de alejamiento a la fuente de estímulo químico con dosis intermedias de compuesto.

## V. CONCLUSIONES

---



- Una serie de N-alkil maleamatos de metilo produjeron inhibición alimentaria en ninfas V de *Triatoma infestans*.
- En todos los casos los isómeros *cis* puros resultaron más efectivos que sus correspondientes mezclas de isómeros *cis-trans*.
- Los isómeros *trans* no fueron activos.
- En el caso de los isómeros *cis* puros se observó correlación entre el largo de la cadena alquílica del sustituyente y el poder antialimentario.
- El pretratamiento de los insectos mediante la aplicación tópica de los distintos maleamatos demostró mayor efectividad para el compuesto con cadena sustituyente más larga. Los insectos con inhibición alimentaria mostraron un bloqueo total de todos los pasos del comportamiento alimentario desde la orientación hasta la ingesta.
- El pretratamiento de insectos mediante la exposición durante 24 horas a residuos de los maleamatos demostró mayor efectividad para los compuestos con cadena sustituyente más corta. Los insectos con inhibición alimentaria mostraron también bloqueo total de la percepción de la fuente de alimento.
- La interposición de telas tratadas entre el insecto y la fuente de alimento demostró mayor efectividad de los maleamatos con cadena más larga. En estos casos se observó inhibición de las etapas finales del comportamiento alimentario (a partir del contacto con el compuesto).

*De acuerdo a estos resultados, los maleamatos demostraron producir inhibición alimentaria pre-ingestiva (observado por las tres metodologías) y de efecto rápido (demostrado en la metodología de interposición de telas). La distinta correlación observada para la efectividad de los distintos sustituyentes sugiere la posible participación de dos mecanismos importantes en la determinación del efecto antialimentario:*

- a. **contacto** donde se ven favorecidos los compuestos de cadena más larga y más liposolubles con mayor facilidad para migrar por la cutícula y llegar al sitio de acción.*
- b. **volatilidad** de los compuestos de cadena sustituyente más corta con mayor posibilidad de llegar vía vapor a los receptores sensoriales.*



- La exposición continua de poblaciones experimentales de *Triatoma infestans* a papeles impregnados con distintos N-alquil maleamatos de metilo produjo disminución significativa en el número de insectos y de huevos respecto a poblaciones controles.
- Las poblaciones experimentales expuestas a distintas concentraciones de *cis-trans* HMM mostraron una correlación entre la concentración del compuesto y la efectividad para demorar el crecimiento de la población.
- Para todos los compuestos los isómeros *cis* puros de los distintos maleamatos fueron efectivos a dosis 7 veces menores que los *cis-trans*.
- Se encontró una correlación entre el efecto antialimentario residual de los papeles impregnados y la reducción de las poblaciones experimentales.

*Estos resultados sugieren que la inhibición alimentaria es una de las causas determinantes en la alteración de la curva de crecimiento de la población.*

- Mediante técnicas de medición de actividad de insectos (Actómetro) se encontró:
  - I. la actividad espontánea de los insectos no varía con la inhibición alimentaria.
  - II. existe correlación entre dosis de BMM que produce efecto antialimentario y falta de la respuesta a estímulo térmico.
  - III. no existe correlación entre dosis de BMM que produce inhibición alimentaria y bloqueo de la respuesta a estímulo químico (fuentes rápida y lenta de liberación de CO<sub>2</sub>).
  - IV. vinchucas tratadas con dosis de BMM que producen inhibición parcial de la alimentación responden al estímulo térmico manteniendo su comportamiento tigmotáctico.
  - V. vinchucas tratadas con dosis intermedias de BMM que producen inhibición parcial de la alimentación responden al estímulo químico y no mantienen su comportamiento tigmotáctico permaneciendo cerca de la fuente.
  - VI. cuando los dos estímulos están combinados su respuesta es similar a la encontrada para estímulo térmico.

*Estos resultados demostraron que los maleamatos bloquean la respuesta de las vinchucas a fuentes de estímulo químico y térmico. La respuesta a estímulo térmico fue mayor que la respuesta a estímulo químico de acuerdo a lo ya informado para insectos hematófagos. Debido posiblemente a esta mayor importancia relativa del estímulo térmico frente al estímulo químico se observó en nuestras condiciones experimentales correlación de efecto antialimentario de maleamatos con bloqueo de termorreceptores.*

## **VI. BIBLIOGRAFIA**



- Agosin, M., Morello, A. and Scaramelli, N.** (1964) Partial Characterización of the *in vivo* metabolites of  $^{14}\text{C}$ -DDT in *Triatoma infestans*. *Journal of Economic Entomology* 57, 974-977.
- Almeida, A. F. and Pritchard, J. B.** (1980). A comparative study of the action of DDT on sodium potassium ATPase. *Fed. Proc.* 39, 979.
- Altner, H. and Loftus, R.** (1985). Ultrastructure and function of insect thermo- and hygroreceptors. *Ann. Rev. Entomol.* 30: 273-295.
- Alzogaray, R.** (1996). Caracterización de la toxicidad de insecticidas piretroides en *Triatoma infestans*. Tesis Doctoral. UBA.
- Ascher, K. R. S.** (1992). Antifeedants an overview. *The Philip. Ent.* 8(5): 1117-1123.
- Ascher, K. R. S. and Moscovitz, J.** (1968). Fentins (truphenyltins) have an anti-feedant effect for housefly larvae. *International Pest Control*.
- Avé, D. A.** (1995). Stimulation of feeding: Insect Control Agents. Cap. 12. In: *Regulatory Mechanisms in Insect Feeding*. edited by Chapman, R. F. and de Boer, G.
- Barberá, C.** (1989) Insecticidas fosfóricos. *Pesticidas agrícolas*. Editorial Omega. p. 124-171.
- Bar-Zeev, M., Maibach, H. I. and Khan, A. A.** (1977). Studies on the attraction of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to man. *J. Med. Entomol.* 14, 113-120.
- Berger, R. S. and Estes, P. M.** (1987). Blockage of pheromone perception in *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) males with N-alkylmaleimides. *Environ. Entomol.* 16, 1130-1134.
- Bernard, J.** (1974). Etude électrophysiologique de récepteurs impliqués dans l'orientation vers l'hôte et dans l'acte hémophage chez un Hemiptère: *Triatoma infestans*. Thèse. Univ. Rennes, France. 285 pp.
- Brewer, M., Garay, M., Gorla, D., Murua, F., Favot, R.** (1981). Caracterización de los estadios ninfales del genero *Triatoma* Laporte 1833. I. *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera, Reduviidae). *Revista Soc. Entom. Arg.* 40 (1-4):91-102.
- Bruce, A., Bray, D., Lewis, J. Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D.** (1994) Membrane transport of small molecules and the ionic basis of membrane excitability. Cap. 11. In: *Molecular Biology of the Cell*.
- Callec, J. J.** (1985). Synaptic Transmission in the Central Nervous System. In: *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Cap. 5 Vol. 5 Nervous System: Structure and motor function ed. by G.A. Kerkut and L.J. Gilbert, Pergamon Press.

**Campbell, R. D., Leadem, T. P. and Johnson, D. W.** (1974). The *in vitro* effect of p, p'- DDT on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> activated ATPase activity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 11, 425 - 428.

**Carcavallo, R.** (1987). The Subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): Systematics and Some Ecological Factors. *Chagas' Disease Vectors*. Vol 1 Chapter 1.

**Cerisola, J. A., Rohwedder, R., Segura, E. L., Del Prado, C. E., Alvarez, M., Wynne de Martini, G. J.** (1974). El xenodiagnóstico.

**Chuit, R.** (1994). Control Vectorial de la enfermedad de Chagas en la República Argentina. *Acta Toxicol. Argent.* 2 (1 y 2): 29-58.

**de Boer, G.** (1995). Regulatory Mechanisms in Insect Feeding. edited by Chapman, R. F. and de Boer, G.

**Despommier, D., Gwadz, R. W., Hotez, P. J.** (1995). *Parasitic Diseases*. Cap. IV. Protozoa. *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909). pag. 190. Third Edition.

**Ehrlich, P. R. and Raven, P. H.** (1964). Butterflies and plants: a study in co-evolution. *Evolution* 18, 586-608.

**Flores, G. and Lazzari, C. R.** (1996). The role of the antennae in *Triatoma infestans*: orientation towards thermal sources. *J. Insect. Physiol.* Vol. 42, No. 5, pp. 433-440.

**Fontan, A. and Zerba, E.** (1992). Influence of the nutritional state of *Triatoma infestans* over the insecticidal activity of DDT. *Comp. Biochem. and Physiol.* 101 c (3): 589-591.

**Fraenkel, G.** (1969). Evaluation of our thoughts on secondary plant substances. Proc. 2Int. Symp. *Insect and Hostplant*. Pages 473-486. ed. by J. de Wilde and L. M. Schoonhoven. North-Holland, Amsterdam-London.

**Frazier, J. L. and Chyb, S.** (1995). Use of Feeding Inhibitors in Insect Control. Cap. 13. In: *Regulatory Mechanisms in Insect Feeding*. edited by Chapman, R. F. and de Boer, G.

**Frazier, J. L.** (1992). How animals perceive secondary plant compounds. In: *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, Vol. 2. (eds.) Rosenthal, G. A. and Berenbaum, M. R. Academic Press, New York, pp. 89-134.

**Frazier, J. L.** (1985). Nervous system. In: *Fundamentals of insect physiology*, ed. by M. S. Blum, pp. 287-356, Wiley and Sons, New York.

**Frazier, J. L. and Heitz, J. R.** (1975). Inhibition of olfaction in the moth *Heliothis virescens* by the sulfhydryl reagent fluorescein mercuric acetate. *Chem. Senses Flavor*, 1, 271-281.

**Friend, W. G. y Smith, J. J.** (1985). La fisiología de los triatominos con especial referencia a la alimentación por sangre. *Factores Biologicos y ecologicos en la enfermedad de Chagas*. Tomo 1. Cap. VII. pag.55.

**Friend, W. G. and Smith, J. J. B.** (1977). Factors affecting feeding by bloodsucking insects. *Ann. Rev. Entomol.* 22: 309-31.

**Futuyma, D. J. and Keese, M. C.** (1992). Evolution and coevolution of plants and phytophagous arthropods. In: *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, Vol. 2. (eds.) Rosenthal, G. A. and Berenbaum, M. R. Academic Press, New York, pp. 440-447.

**Ghassemi, M., Painter, P., Quinlivan, S. and Dellarco, M.** (1983). *Bacillus thuringiensis*, nucleopoluhedrosis virus, and pheromanes: environmental considerations and uncertainties in large scale insect control. *Environ. Int.* 9, 39-49.

**Gonzalez Audino, P., Masuh, H., Licastro, S., Vassena, C., Picollo, M.I. and Zerba, E.** (1996) Suppression of food intake on *Triatoma infestans* by N-substituted methyl maleamates. Aceptado para su publicación en *Pesticide science*.

**Gorla, D. E. and Schofield, C. J.** (1985). Analysis of egg mortality in experimental populations of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in Argentina. *Bulletin of the Society of Vector Ecologists.* 10, 107-117.

**Griffiths, D. C.** (1990). Opportunities for control of insects in arable crops using semiochemicals and other unconventional methods. In: *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference*. Farnham, England, pp.487-496.

**Griffiths D. C., Hassanali, A., Merritt, L. A., Mudd, A., Pickett, J. A., Shah, S. J., Smart, L. E., Wadhams, L. J. and Woodcock, C. M.** (1988). Highly effective antifeedants against coleopteran pests. In: *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference*, Farnham, England, pp. 487-496.

**Gurenstein, P. G., Lorenzo, M. G., Nuñez, J. A. and Lazzari, C. R.** (1995) Baker's Yeast, an attractant for baiting traps for Chagas Disease vectors *Experientia* 51, 834-837.

**Harborne, J. B.** (1993). *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, London.

**Holloway, G. J. and McCaffery, A. R.** (1988). Reactive and preventative strategies for the management of insecticide resistance. In: *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference*, Farnham, England, pp. 465-469.

**InStat Graph** (1990-1993) GraphPad Software, version 2.00, Uchitel, O. D.

**Jandel** (1990). Sigma Plot, version 1.00, Berkeley, CA.

**Kaissling, K. E.** (1977). Control of insect behaviour via chemoreceptor organs. In: *Chemical control of insect behaviour, theory and application*, ed. by H. M. Shorey and J. J. McKelvey, pp. 45-65, John Wiley & Sons, New York.

**Kennedy, J. S.** (1977). Olfactory responses to distant plants and odor odour sources. In: *Chemical control of insect behavior*. Shorey and McKelvey (eds.) pp. 67-91. Wiley.

**Koch, R. B.** (1969). Chlorinated hydrocarbon insecticides: inhibition of rabbit brain ATPase activities. *J. Neurochem.* 16, 269 - 271.

**Kubo, Y. and Nakanishi, K.** (1977). Some terpenoid insect antifeedants from tropical plants. In: *Synthesis of pesticides, chemical, structure and biological activity, natural products with biological activity*. (Edited by Geissbühler, H.) pp. 284-294. Pergamon Press, Oxford.

**Lazzari, C. R.** (1991) Temperature preference in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Bulletin of Entomological Research* 81, 273-276.

**Lazzari, C. R.** (1990). Fisiología del comportamiento de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Heteroptera: Reduviidae), orientación térmica. Tesis Doctoral. UBA.

**Lazzari, C. and Nuñez, J.** (1989, a). The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distant sources in *Triatoma infestans*. *J. Insect Physiol.* Vol 35, No. 6, pp. 525-529.

**Lazzari, C. R. and Nuñez, J. A.** (1989, b) *J. Insect. Physiol.* 35, 525.

**Lazzari, C. R.** (1987). Blood temperature and feeding behavior in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Entomol. Gener.* 14(3/4): 183-188. Stuttgart 1989-07. ISSN:0171-8177. Nro 597.

**Lazzari, C. R.** (1981). Estudio de los receptores sensoriales de las antenas de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Heteroptera: Reduviidae). Seminario de Licenciatura. UBA.

**Litchfield, J. T., and F. Wilcoxon** (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Exptl. Therap.* 96: 99-110.

**Lund, A. E.** (1985). Insecticides: Effects on the Nervous Systems. In: *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Vol 12. Insect Control. ed. by G.A. Kerkut and L.J. Gilbert, Pergamon Press.



**Ma, W. C.** (1981). Receptor membrane function in olfaction and gustation: implications from modification by reagents and drugs. In: *Perception of behavioural chemicals*, ed. by D. M. Morris, pp. 267-287. Elsevier North-Holland, Amsterdam.

**Ma, W. C.** (1977). Alterations of chemoreceptor function in army worm larvae (*Spodoptera exempta*) by plant-derived sesquiterpene and by sulfhydryl reagents. *Physiol. Ent.* 2, 199-207.

**Matsumura, F.** (1976). *Toxicology of Insecticides*. Cap. 4.

**Matsumura, F. and Narahashi, T.** (1971). ATPase inhibition and electro physiological change caused by DDT and related neuroactive agents in lobster nerve. *Biochem. Pharmacol.* 20, 825 - 837.

**Matsumura, F. and Patil, K.** (1969). Adenosine triphosphate sensitive to DDT in synapses of rat brain. *Science* 166, 121 - 122.

**Mayer, M. S.** (1968). Response of single olfactory cell of *Triatoma infestans* to human breath. *Nature* 220: 924-925.

**Moncayo, A.** (1994). Iniciativa de los países del cono sur. *Acta Toxicol. Argent.* 2 (1 y 2) : 29-58.

**Moncayo, A.** (1993). Chagas Disease. Progress in Research 1991-1992 (Tenth Programme Report) WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) *Tropical Diseases*. WHO Geneva. Cap.7 pag 67 - 75.

**Morita, H. and Shiraishi, A.** (1985). Chemoreception physiology. In: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Vol. 6: Nervous system sensory, Cap 3. ed. by G. A. Kerkut and L. J. Gilbert, pp. 133-170, Pergamon Press.

**Mullin, C. A., Chyb, S., Eichenseer, H., Hollister, B. and Frazier, J. L.** (1994). Neuroreceptor mechanisms in insect gustation: a pharmacological approach. *J. Insect Physiol.* 40, 913-931.

**Narahashi, T.** (1983). Resistance to Insecticides Due to Reduced Sensitivity of the Nervous System. *Pest Resistance to Pesticides*. pag. 333 - 352.

**Narahashi, T., Frey, J. M., Ginsburg, K. S., Nagata, K., Roy, M. L. and Tatebayashi, H.** (1994). Sodium Channels and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Activated Channels as Target Sites of Insecticides. In: *Molecular Action of Insecticides on Ion Channels*. (edited by J. Marshall Clark). Cap. 2.

**Neufels, G. J. and Pritchard, J. B.** (1979). Osmoregulation and giel  $\text{Na}^+ \text{--} \text{K}^+$  ATPase in the rock crab, *cancer inoratus*: response to DDT. *Comp. Biochem. Physiol.* 62C, 165 - 172.

**Norris, D. M.** (1986). Anti-feeding compounds. In: Bowers, W. S., Ebing, W., Fukuto, T. R., Martin, R. W. and Yamamoto, Y. (eds.), *Chemistry of Plant Protection: Sterol Biosynthesis, Inhibitors and Anti-feeding Compounds*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 97-146.

**Nuñez, J. A.** (1987). Behavior of Triatominae bugs. *Chagas' Disease Vectors*. Vol 3 Anatomic and physiological aspects, CRC Press, USA. pag 71 - 30.

**Nuñez, J. A.** (1982). Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. ent.Res.* 72: 253-262.

**O'Brien and Yamamoto** (1970) *Biochemical toxicology of insecticides*.

**Osborne, M. P.** (1985). DDT, -HCH and the Cyclodienes. In: *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Cap. 6 Vol. 12 ed. by G. A. Kerkut and L. J. Gilbert, Pergamon Press.

**Pelosi, P and Maida, R.** (1995). Odorant-binding proteins in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 111B, 503-514.

**Pelosi, P and Maida, R.** (1990). Odorant binding proteins in vertebrates and insects: similarities and possible common function. *Chem Senses.* 15, 205-215.

**Picollo, M. I., Seccacini, E., Vassena, C. and Zerba, E.** (1993). Feeding and mating deterrence by sulfhydryl reagents in *Triatoma infestans*. *Acta tropica*, 52, 297-307.

**Picollo, M. I., Seccacini, E., Fontan, A., Zerba, E. N.** (1987). Activity of the insect growth regulator fenoxycarb (RO-13-5223) on *Triatoma infestans*. *Comp. Biochem. Physiol.* 87, 367-373.

**Picollo, M. I., Wood, E. J., Zerba, E. N., Licastro, S., Rúveda, M. A.** (1976). Métodos de Laboratorio para medir la toxicidad de insecticidas en *Triatoma infestans*, Klug. *Acta Bioq. Clin. Latinoam.* 10, 67-70.

**Prestwich, G. D. and Blomquist, G. J.** (eds.) (1987). *Pheromone Biochemistry*. Academic Press, Orlando, Fl.

**Riddiford, L. M.,** (1970). Antennal proteins of saturniid moths. Their possible rôle in olfaction. *J. Insect. Physiol.*, Vol. 16, pp. 653 to 660. Pergamon Press.

**Rojakovich, A. S. y March, R. B.** (1976). Insecticide cyclic nucleotide interactions. Part I. Quinoxalinedithiol derivatives. A new group of potent phosphodiesterase inhibitors. *Pestic. Biochem. Physiol.* 6, 10 - 19.

**Rosenthal, G. A. and Berenbaum, M. R.** (eds.) (1992) *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*, second edition, Vol. 2. Academic Press, New York.

**Rosenthal, G. A. and Janzen, D. H.** (eds.) (1979). *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. first edition. Academic Press, New York.

**Ruigt, G. S. F.** (1985). Pyrethroids. In: *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, Cap. 7. Vol. 12 ed. by G. A. Kerkut and L. J. Gilbert, Pergamon Press.

**Salomón, O. D.** (1988). Vitelogénesis en Triatomínos vectores de la enfermedad de Chagas. Tesis Doctoral. UBA.

**Schefczik, J. and Simonis, W.** (1980). Side effects of chlorinated hydrocarbon insecticides on membranes of plant cells. *Pestic. Biochem. Physiol.* 13, 13 - 19.

**Schnieder, R. P.** (1975). Mechanism of inhibition of rat brain ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) - adenosine triphosphatase by 2, 2 - bis (p - chlorophenyl) - 1, 1, 1 - trichloro - ethane (DDT). *Biochem. Pharmacol.* 24, 939 - 946.

**Schneider, D. and Steinbrecht, R. A.** (1968). Checklist of insect olfactory sensilla. *Symp. Zool. Soc. London.* 23, 279-297.

**Schneider, D.** (1964). Insect Antennae. *Ann. Rev. Ent.* 9, 103-122.

**Schneider, D., Lacher, V. and Kaissling, K. E.** (1964). Die Reaktions-weise und das Reaktions-spektrum von Riechzellen bei *Antheraea pernyi* (Lepidoptera, Saturniidae). *Z. Vergl. Physiol.* 48, 632-662.

**Schofield, C. J.** (1994). *Triatominae. Biología y Control.* Eurocommunica Publications.

**Schofield, C. J.** (1985). Population Dynamics and Control of *Triatoma infestans*. *Ann. Soc. Belge Med. trop.* 65, Suppl. 1, 149-164.

**Schoonhoven, L. M. and Yan Fu-Shun** (1989). Interference with normal chemoreceptor activity by some sesquiterpenoid antifeedants in an herbivorous insect *Pieris brassicae*. *J. Insect Physiol.* Vol. 35. No.9. pp. 725-728.

**Shanes, A. M.** (1949). Electrical phenomena in nerve. II. Crab nerve. *J. Gen. Physiol.* 33, 75 - 102.

**Singer, G., Rozental, J. and Norris, D.** (1975). Sulfhydryl groups and the quinone receptor in insect olfaction and gustation. *Nature* 256, 222-223.

**Snodgrass, R. E.** (1935). Principles of insect morphology. McGraw-Hill, New York.

**Snodgrass, R. E.** (1926). The morphology of insect sense organs and the sensory nervous system. *Smithson. Misc. Colect.* 77, 1-80.

**Steinbrecht, R. A.** (1987). Functional Morphology of Pheromone. Sensitive Sensilla. Cap. XI. Part II. Reception and Catabolism of Pheromones. In: *Pheromone Biochemistry* ed. by Prestwich, G. D. and Blomquist, G. J. Academic Press. inc.

**Steinbrecht, R. A.** (1984). Arthropoda: Chemo-, thermo- and hygrosensors. In: *Biology of the Integument*. (J. Bereiter-Hahn, A. G. Matolsky and K. S. Richards, eds.) Vol. 1, pp. 523-276

**Stengl, M., Hatt, H. and Breer, H.** (1992). Peripheral processes in insect olfaction. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 665-681.

**Uchida, M., Kurihara, N., Fujita, T. and Nakajima, M.** (1974). Inhibitory effects of BHC isomers on  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase, yeast growth and nerve conduction. *Pestic. Biochem. Physiol.* 4, 260 - 265.

**Vogt, R. G., Rybczynski, R. and Lerner, M. R.** (1990) The biochemistry of odorant reception and transduction. *Chemosensory Information Processing*, NATO ASI Series H, Vol. 39 (Edited by Schild D.), pp. 33-76, Springer. Berlin.

**Webb, G. D., Sharp, R. W. and Feldman, J. D.** (1979). Effect of insecticides on the short - circuit current and resistance of isolated frog skin. *Pestic. Biochem. Physiol.* 10, 23 - 30.

**WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR).** (1989-1990) Chagas Disease. Progress in Research (Tenth Programme Report) In: *Tropical Diseases*. WHO Geneva. Cap. 7. pag 69-77.

**Wigglesworth, V. B.** (1934). *Insect Physiology* (ed) Chapman and Hall. London.

**Wigglesworth, V. B. and Gillet, J. D.** (1934). The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and the mechanism of orientation to the host. *J. Exp. Biol.* 11: 120-134.

**Wigglesworth, V. B. and Gillet, J. D.** (1934). The function of the antennae in *Rhodnius prolixus*: confirmatory experiments. *J. Exp. Biol.* 11: 480.

**Zacharuk, R. Y.** (1985). Antennae and Sensilla. In: *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Cap. 1. Vol. 6. Nervous System: Structure and motor function ed. by G. A. Kerkut and L. J. Gilbert, Pergamon Press.

**Zacharuk, R. Y.** (1980). Ultrastructure and function of insect chemosensilla. *Annu. Rev. Entomol.* 25, 27-47.

**Zerba, E.** (1994). Evaluación Biológica en el Laboratorio de la Actividad Triatómica. *Acta Toxicol. Argent.* 2 (1 y 2): 29-58.

**Zerba, E.** (1989) Chemical control of Chagas' Disease vectors. *Biomed. Environ. Sci.*2: 24-29.

**Zerba, E.** (1988) Development of new insecticides and synergistic formulations for the Chagas' Disease vector control. *Revista. Argent. Microbiología* 20 (Supl): 25-31.

**Zerba, E.** (1988). Conventional insecticides: Mechanism of action, resistance and bioassay in Chaga's Disease Vectors. *Revista Argent. de Micribiología* 20 (Supl) 32-38,

**Zerba, E. N. and Picollo, M. I.** (1987). Embryogenesis and ovicide action. *Chagas' Disease Vectors*. Vol 3 Biochemical aspects and control. CRC Press, USA. pag 125-138.

**Zerba, E.** (1987). Insecticides: Mechanism of action. In: *Chagas' disease vectors*, Vol. III: Biochemical aspects and control, ed. by R. Brenner and Stoka, pp. 103-106, CRC Press, Boca Ratón.

**Zerba E.** (1979). Evaluación del efecto insecticida y ovicida de la decametrina en *Triatoma infestans*. CIPEIN 1978. Informe inédito (parcialmente publicado en: *K-othrine, Roussell-Uclaf Pyrethroid Insecticides*. Roussell-Uclaf, Paris, Francia.

## VII. APENDICE



Los resultados presentados en este trabajo de Tesis dieron origen a las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos:

- Reduction of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Experimental Populations Exposed to Feeding Inhibitors" (1996) C. Vassena, M. I. Picollo and E. Zerba. J. Medical Entomology Vol. 33, no. 5.
- Suppression of food intake on *Triatoma infestans* by N-substituted methyl maleamates" (1995) P. Gonzalez Audino, H. Masuh, C. Vassena, S. Licastro, M. I. Picollo and E. Zerba. En prensa en Pesticide science.
- Síntesis de maleamatos N-sustituídos: Correlación entre estructura y actividad antialimentaria. P. Gonzalez Audino, S. Licastro, H. Masuh, M. I. Picollo, C. V. Vassena y E. Zerba. Simposio Nacional de Química Orgánica. Córdoba, 17 al 19 de Noviembre de 1993.
- Reducción Poblacional de Vinchucas, La Importancia de la Purificación de Isómeros en Compuestos Antialimentarios. C. V. Vassena, M. I. Picollo y E. Zerba. Efectos sobre la Actividad de *Triatoma infestans* de N-alquilmaleamatos de metilo con Efecto Antialimentario. A. Fontán, M. I. Picollo, C. V. Vassena, E. Zerba. Congreso Argentino de Entomología. Mendoza, 2 al 7 de Abril de 1995.
- Bloqueo Sensorial en *Triatoma infestans*: Una Nueva Alternativa de Control Poblacional. M. I. Picollo, A. Fontán, C. V. Vassena y E. Zerba. VI Congreso Latinoamericano de Entomología. Cd. de Mérida, Yucatán, Mexico, 26 al 30 de Mayo de 1996.
- Reducción de Poblaciones experimentales de *Triatoma infestans* por Bloqueo de Receptores Sensoriales. C. V. Vassena, M. I. Picollo, A. Fontán y E. Zerba. Congreso Argentino de Toxicología. XVI Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología. "Toxicología y Medio Ambiente". Bs. As., 18 al 20 de Septiembre de 1996.