

Tesis de Posgrado

Fisiología del sistema visual de la vinchuca *Triatoma infestans* : un enfoque comportamental

Reisenman, Carolina E.

2000

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. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Reisenman, Carolina E.. (2000). Fisiología del sistema visual de la vinchuca *Triatoma infestans* : un enfoque comportamental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3273_Reisenman.pdf

Cita tipo Chicago:

Reisenman, Carolina E.. "Fisiología del sistema visual de la vinchuca *Triatoma infestans* : un enfoque comportamental". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3273_Reisenman.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

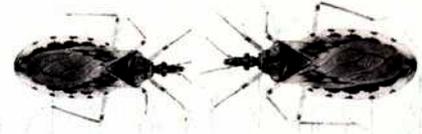


UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



Fisiología del sistema visual de la vinchuca *Triatoma infestans*: un enfoque comportamental



Autora: Lic. Carolina E. Reisenman

Director: Dr. Claudio R. Lazzari



Laboratorio de Fisiología de Insectos
Departamento de Ciencias Biológicas



Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas



Año 2000

3273

3273



Fisiología del Sistema Visual de la vinchuca *Triatoma infestans*: un enfoque comportamental

Tesis Doctoral de Carolina E. Reisenman

Dirigida por Claudio R. Lazzari

RESUMEN

Se estudiaron algunas propiedades del sistema visual de la vinchuca *Triatoma infestans*. La cuantificación de la respuesta fototáctica negativa de este insecto permitió: 1) establecer el umbral de sensibilidad de la respuesta a la luz blanca ($<0.009 \mu\text{W}/\text{cm}^2$); 2) demostrar que esta respuesta muestra una variación diaria, siendo mucho mayor durante la noche que durante el día; 3) demostrar que dicho ritmo es de naturaleza endógena, es decir, independiente de los ciclos luz-oscuridad; 4) demostrar la capacidad de los ocelos para mediar por sí mismos la respuesta fototáctica; 5) estudiar la sensibilidad espectral de los ojos compuestos de *T. infestans*, la que fue establecida entre 357 nm (ultravioleta) y 665 nm (rojo lejano); 6) estudiar la dependencia de esta respuesta con la edad y las mutaciones. Por otra parte, mediante técnicas de morfología funcional se estudió la estructura de las omatidias y sus variaciones según el estado de adaptación y el momento del día. Estas variaciones incluyen movimientos de pigmento pantalla y cambios en la distancia focal, que permiten al ojo adaptarse a las condiciones de luz del ambiente. Estos cambios están bajo control de un oscilador endógeno. Se estudió, además, la interacción entre claves olfativas (presentes en las heces de este insecto) y visuales en el comportamiento de agregación de *T. infestans*. Los resultados muestran que existe una competencia y/o jerarquía entre las señales de distinta modalidad, dependiente de la composición espectral del estímulo visual. Finalmente, se midieron las condiciones luminosas (intensidad y composición espectral de la luz) en un ambiente natural, las que fueron relacionadas con los resultados presentados en este trabajo de Tesis.

Palabras claves

Triatoma infestans, visión, fototaxis, agregación, ojo compuesto, ocelo, Enfermedad de Chagas

**Physiology of the Visual System of the haematophagous bug
Triatoma infestans: a behavioral approach**

Dissertation by Carolina E. Reisenman

Supervised by Claudio R. Lazzari

ABSTRACT

Some aspects of the visual system of the haematophagous bug *Triatoma infestans* were studied. The quantitative analysis of the photonegative response of this insect allowed: 1) to establish the threshold for phototactic sensitivity to white light ($<0.009 \mu\text{W}/\text{cm}^2$); 2) to demonstrate that this response changes on a daily basis, being more intense during the night than during day hours; 3) to demonstrate that this rhythm is under endogenous control; 4) to demonstrate that ocelli can mediate the phototactic response by themselves; 5) to study the spectral sensitivity of the compound eye, being *T. infestans* sensitive to a wavelength range between 357 (ultraviolet) and 665 nm (far red); 6) to study the effects of age and mutations in this response. Besides, the morphological analysis allowed to study the structure of the ommatidia of the compound eye and its variations according to the state of adaptation and the daytime. These variations include changes in the distribution of screening pigments and in the focal length, which allow the eye to adapt to the environmental light conditions. These changes showed to be under endogenous control. In addition, the interaction between visual and olfactory cues in the assembling behavior of *T. infestans* was studied. Results showed that there is a hierarchy between sensory modalities, which depends on the spectral composition of the visual stimuli. Finally, the light conditions (intensity and spectral composition) in a natural environment were measured, and related with the results presented here.

Key words

Triatoma infestans, vision, phototaxis, aggregation, compound eye, ocelli, Chagas Disease.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi Maestro, Claudio R. Lazzari, no solamente por haber sido mi Director y haberme introducido y guiado en este fascinante estudio del Comportamiento, sino por su estímulo constante, sus enseñanzas, sus consejos, amistad, y afecto permanente (y por haberme bancado!!).

Quiero agradecer especialmente a Martin Giurfa, cuya participación activa en el diseño y discusión de los experimentos presentados en los capítulos 3,4 y 9 fue fundamental para la realización de este trabajo de Tesis. Quiero agradecerle además por sus valiosas críticas y sugerencias, y por su estímulo a mejorar siempre.

A Teresita Insausti, por sus enseñanzas y participación en los experimentos de morfología funcional.

A Alicia Lorenzo Figueiras, por su participación en los experimentos de agregación.

A Gabriel Manrique, por haber leído y corregido esta Tesis.

Al Dr. R. Menzel, por su generoso préstamo ("donación") de material óptico que permitió la realización de varios de los experimentos presentados en esta Tesis.

A Robert Brandt, por su ayuda con algunos cálculos.

A Vero Ivanov, por sus enseñanzas de photoshop.

Al Dr. Josué Núñez, por transmitirme ideas y por las charlas compartidas allá y acá.

A Tim Pires, del Centro de Pesquisas René Rachou, Brasil, por facilitarme las vinchucas mutantes de ojos rojos.

A todos mis compañeros de Laboratorio, los que están aquí y en todas partes: Clau, Gabo, el Negro, Ali, Tere, Pablo, Sebas, Romina, Yuli, Juan, Vero, la Flores, quienes han hecho de estos años uno de los períodos más lindos de mi vida. También

quiero agradecer a los "Sociales" (Roxy, Walter, Pato, Ale, Katraska, Luciano), y a las "chicas" (Alicia Gil, Vero y María Inés).

A mi familia "sanguínea", Euge, Dani, Lili y Marquitos, por su afecto y apoyo constante, y porque los quiero mucho!

A mi familia "adquirida" Fito, Marta y Vivi, por toda la buena onda, el cariño y apoyo.

A mis amigos del alma, Pao, Magu, Vale, Diego, Guada, Dani, Marcelo, Eugenio, Julito, Tulia, por ser mis amigos intransferibles, con quienes comparto momentos espectaculares.

A todas las instituciones que mediante su apoyo financiero hicieron posible la realización de este trabajo: la Universidad de Buenos Aires, el CONICET, la Fundación OSDIC, UNDP/World Bank/TDR.

A la DAAD, por haberme proporcionado una beca que me permitió realizar una estadía de investigación en el Institut für Neurobiologie, Berlin, estadía que resultó sumamente formativa por su relación con la temática de este trabajo de Tesis.

A las gallinas y vacas que alimentaron las vinchucas.

A todos los que me olvidé de mencionar (Perdón!!)

Y especialmente, a Facu, por todo...

Quiero dedicar este trabajo a las siguientes personas:

A Facu, por su amor

A Euge y Dani, por estar siempre

A Pao, por ser mi amiga

"If life is not made of special stuff, then its uniqueness must lie in the pattern of its structural organization or molecular order. The secret is in the system and not in the materials"

Kenneth Roeder

"At night I experienced an attack (for it deserves no less a name) of the Benchuca, a species of Reduvius, the great black bug of the Pampas. It is most disgusting to feel soft wingless insects about an inch long, crawling over one's body. Before sucking they are quite thin, but afterwards they become round and bloated with blood, and in this state are easily crushed. One which I caught at Iquique, (for they are found in Chile and Peru,) was very empty. When placed on a table, and though surrounded by people, if a finger was presented, the bold insect would immediately protrude its sucker, make a charge, and if allowed, draw blood. No pain was caused by the wound. It was curious to watch its body during the act of sucking, as in less than ten minutes it changed from being as flat as a wafer to a globular form. This one feast, for which the benchuca was indebted to one of the officers, kept it fat during four whole months; but, after the first fortnight, it was quite ready to have another suck."

Charles Darwin – The voyage of the Beagle

INDICE

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN | 13 |
| Introducción General | 13 |
| Introducción al comportamiento de los triatominos..... | 14 |
| Ambientes ocupados por los insectos triatominos..... | 15 |
| Comportamiento de agregación y selección de refugios | 16 |
| Organización temporal del comportamiento. | 17 |
| Respuestas a estímulos visuales | 20 |
| ¿Por qué estudiar el sistema visual de <i>Triatoma infestans</i> ? | 21 |
| Objetivos del trabajo | 22 |
| | |
| CAPÍTULO 2: LOS ÓRGANOS FOTORRECEPTORES Y LA VISIÓN EN LOS INSECTOS Y OTROS | |
| ARTRÓPODOS | 23 |
| Introducción | 23 |
| Ojos compuestos..... | 24 |
| Distribución | 24 |
| Estructura de la omatidia..... | 24 |
| Ojos de aposición y de superposición | 27 |
| La comparación: ¿ojos simples ó compuestos? | 39 |
| Transducción de la señal luminosa | 40 |
| Adaptación del sistema visual | 41 |
| Sensibilidad espectral y visión de colores | 42 |
| Otras funciones del sistema visual | 46 |
| Los ojos simples de los insectos..... | 46 |
| Ocelos..... | 46 |
| Stemmata..... | 47 |
| Receptores extraoculares..... | 49 |
| Los órganos fotorreceptores de los triatominos | 49 |
| Ojos compuestos | 49 |
| Ocelos..... | 50 |

CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA RESPUESTA FOTONEGATIVA.

| | |
|---|-----------|
| | 54 |
| Introducción | 54 |
| Materiales y métodos..... | 55 |
| Animales | 55 |
| Diseño experimental | 55 |
| Procedimiento | 58 |
| Estímulos | 58 |
| Caracterización de la respuesta fototáctica..... | 60 |
| Sensibilidad fótica y variación diaria de la respuesta fototáctica..... | 62 |
| Análisis estadístico..... | 62 |
| Resultados..... | 64 |
| Caracterización de la respuesta fototáctica..... | 64 |
| Sensibilidad fótica y variación diaria de la respuesta fototáctica..... | 69 |
| Discusión..... | 75 |
| El comportamiento fotonegativo de <i>T. infestans</i> | 75 |
| Umbral de sensibilidad | 76 |

CAPÍTULO 4: BASES CRONOBIOLOGICAS DEL CONTROL TEMPORAL DE LA SENSIBILIDAD FOTOTÁCTICA DE *T. INFESTANS*

| | |
|---------------------------|-----------|
| | 78 |
| Introducción..... | 78 |
| Materiales y métodos..... | 78 |
| Resultados..... | 80 |
| Discusión..... | 85 |

CAPÍTULO 5: CONTROL TEMPORAL DE LA ESTRUCTURA DE LA OMATIDIA DE *T. INFESTANS*

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| | 87 |
| Introducción..... | 87 |
| Células del cono cristalino..... | 87 |
| Células pigmentarias..... | 88 |
| Células retinulares y rabdomas..... | 91 |
| Membranas basales y axones..... | 92 |
| Materiales y métodos..... | 92 |
| Procedimiento | 92 |
| Preparaciones histológicas | 93 |

| | |
|--|------------|
| Resultados..... | 96 |
| Descripción general de la omatidia de <i>T. infestans</i> | 96 |
| Cambios en la estructura omatidial bajo ciclos LD | 102 |
| Cambios en la estructura omatidial bajo condiciones constantes | 105 |
| Efecto de la intensidad de luz..... | 111 |
| Discusión..... | 114 |
| La omatidia de <i>T. infestans</i> y los fenómenos de adaptación visual..... | 114 |
| Cambios en la estructura omatidial bajo condiciones constantes | 117 |
| La alteración del ritmo en LL | 119 |
| El reloj..... | 119 |
| | |
| CAPÍTULO 6: EL PAPEL DE LOS OCELOS EN EL COMPORTAMIENTO FOTOTÁCTICO | |
| NEGATIVO DE <i>T. INFESTANS</i>..... | 122 |
| Introducción..... | 122 |
| Materiales y métodos..... | 123 |
| Resultados..... | 124 |
| Discusión..... | 126 |
| | |
| CAPÍTULO 7: SENSIBILIDAD ESPECTRAL DE LA RESPUESTA FOTOTÁCTICA DE <i>T.</i> | |
| <i>INFESTANS</i> | 128 |
| Introducción..... | 128 |
| Materiales y métodos..... | 129 |
| Metodología y procedimiento | 129 |
| Experimentos | 129 |
| Estímulos | 130 |
| Análisis estadístico..... | 131 |
| Resultados..... | 132 |
| Series control y luz blanca | 132 |
| Series espectrales..... | 134 |
| Discusión..... | 142 |
| | |
| CAPÍTULO 8: VARIABILIDAD DE LA RESPUESTA FOTOTÁCTICA: EFECTO DE LA EDAD Y LAS | |
| MUTACIONES | 145 |
| Introducción..... | 145 |
| Materiales y métodos..... | 146 |

| | |
|--|------------|
| Efecto de la edad | 146 |
| Efecto de las mutaciones | 147 |
| Análisis estadístico | 147 |
| Análisis morfológico | 147 |
| Resultados | 148 |
| Efecto de la edad | 148 |
| Efecto de las mutaciones | 153 |
| Análisis morfológico | 158 |
| Discusión | 160 |
| Efecto de la edad | 160 |
| Efecto de las mutaciones | 161 |
| | |
| CAPÍTULO 9: CLAVES VISUALES Y OLFATIVAS EN EL COMPORTAMIENTO DE AGREGACIÓN | |
| DE <i>T. INFESTANS</i> | 163 |
| Introducción | 163 |
| Materiales y métodos | 165 |
| Animales | 165 |
| Procedimiento | 165 |
| Estímulo olfativo | 168 |
| Estímulos visuales | 168 |
| Experimentos | 171 |
| Análisis estadístico | 172 |
| Resultados | 173 |
| Comportamiento de agregación frente a estímulos olfativos | 173 |
| Comportamiento de agregación a estímulos espectrales en ausencia o presencia de claves olfativas | 175 |
| Respuesta de agregación a la estimulación combinada de claves visuales y olfativas | 177 |
| Discusión | 184 |
| Respuesta de <i>T. infestans</i> a claves visuales | 185 |
| Respuesta de <i>T. infestans</i> a la estimulación combinada de claves visuales y olfativas | 186 |
| Significado ecológico | 188 |

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO 10: CONDICIONES LUMINOSAS EN UN AMBIENTE NATURAL | 189 |
| Introducción | 189 |
| Materiales y Métodos..... | 189 |
| Resultados y Discusión..... | 190 |
| | |
| CAPÍTULO 11: CONCLUSIONES GENERALES | 195 |
| Respuesta fototáctica negativa de <i>T. infestans</i> | 195 |
| La estructura de la omatidia de <i>T. infestans</i> y la organización temporal del sistema visual | 196 |
| Convergencia multimodal en <i>T. infestans</i> : interacción entre el sistema visual y el olfativo | 197 |
| | |
| CAPÍTULO 12: BIBLIOGRAFÍA | 199 |

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Introducción General

En un entorno sujeto a múltiples cambios físicos y químicos, la adquisición de información del medio ambiente es vital para la supervivencia de los organismos. La información es adquirida por medio de *órganos sensoriales* especializados, que la obtienen de manera selectiva del ambiente. Según la teoría de la información elaborada independientemente por Wiener (1948, *citado por Dusenbery*) y Shannon y Weaver (1949, *citado por Dusenbery*), la transmisión de información implica la “*pérdida de incertidumbre*”. Esta teoría, que ha sido tradicionalmente aplicada al campo de las comunicaciones, distingue los componentes funcionales que participan en la transmisión de información (Schmidt 1978). De acuerdo a esta teoría, la transmisión de información es la interacción entre una *fente* o *emisor* y un *receptor*. Entre ellos existe un *canal de transmisión* que involucra un movimiento de energía o material desde la fuente al receptor. En el campo de la Biología el receptor es un organismo, la fuente es parte del ambiente (circunstancialmente otro organismo de la misma u otra especie) y el *canal* incluye al *estímulo* de cualquier *modalidad* (e.g., visual, olfativo, mecánico), junto con los factores ambientales que lo afectan. Más precisamente, se denomina *estímulo* a un patrón específico de actividad dentro del canal de transmisión, que adquiere un significado por estar asociado con algún estado del ambiente que es relevante para el receptor (Dusenbery 1992). De este modo los sistemas sensoriales detectan solamente aquellos eventos que son relevantes para la supervivencia de los organismos (Schmidt 1978, Dusenbery 1992).

El presente Trabajo de Tesis se centra en el análisis de la adquisición, procesamiento y utilización de información visual en la vinchuca *Triatoma infestans*. En particular, hemos seleccionado, a modo de paradigma experimental, una respuesta bien conocida aunque nunca analizada en detalle de estos insectos, esto es, su preferencia por permanecer en sitios oscuros.

La metodología que se empleará en esta Tesis es la clásica de la Fisiología del Comportamiento, la cual consiste en analizar las relaciones funcionales entre los elementos componentes del sistema que media entre una entrada sensorial y una salida de comportamiento (von Holst 1953). Esta metodología considera al animal como un sistema constituido por “cajas negras”, cuya función y conexiones deben

deducirse del análisis de las relaciones *entrada-salida*. En un extremo de este sistema de cajas negras encontramos entonces las *entradas* o *estímulos*, que constituyen cambios en el estado físico y/o químico del ambiente (olores, vibraciones, temperatura) o en el estado del propio organismo (edad, madurez sexual). Estos cambios son detectados por receptores sensoriales especializados que traducen la información a un mensaje de impulsos nerviosos. Dicho mensaje es procesado en el sistema nervioso central, dando lugar como *salida* a una respuesta de comportamiento. La experimentación en Fisiología del Comportamiento se lleva a cabo bajo condiciones de laboratorio controladas, a fin de asegurar que los cambios en la salida de comportamiento sean *causa* estricta de las modificaciones introducidas por el experimentador (Roeder 1963). No obstante, las preguntas y los objetivos deben ser siempre planteados teniendo en cuenta el papel de un dado comportamiento en condiciones naturales, y el valor adaptativo que el mismo tiene para la supervivencia de los organismos. Naturalmente, este enfoque clásico se complementa, según corresponda, con otras técnicas fisiológicas y el análisis morfológico.

Introducción al comportamiento de los triatominos

La enfermedad de Chagas constituye uno de los problemas sanitarios más graves en Latinoamérica: las estimaciones actuales de la Organización Mundial de la Salud indican que entre 16 y 18 millones de personas están infectadas y 90 millones están en riesgo de adquirir la infección (WHO 1997). En nuestro país la Enfermedad de Chagas es la principal endemia y aproximadamente el 10% de la población está infectada. Esta enfermedad es una parasitosis producida por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, que es transmitido al hombre por insectos triatominos, la mayoría de hábitos nocturnos, y que son hematófagos obligados. El principal vector de la enfermedad en Sudamérica y en nuestro país es la vinchuca *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Dado que hasta el momento no existe una quimioterapia ideal ni vacuna contra *T. cruzi*, el control de la enfermedad depende principalmente de la eliminación temprana de los insectos de las viviendas (WHO 1997). En la actualidad las herramientas de detección de vinchucas en el campo se basan en la inspección manual, o en la utilización de dispositivos (sensores) que ofrecen refugio a los insectos (Schofield 1994; Gürtler et al. 1999). En este último caso, los insectos encuentran los sensores por azar, los que tienen alguna

característica (e.g., superficies de contacto) que hace que las vinchucas permanezcan en su interior. Así, estos dispositivos están diseñados para detectar signos de la presencia de vinchucas (e.g., insectos, huevos, excrementos, exuvias), pero no para capturarlos. Una vez que los insectos son detectados, se procede a la fumigación de las viviendas, por lo que es de particular importancia contar con dispositivos de detección, atracción y/o captura de alta sensibilidad.

La importancia del estudio de diversos aspectos de la fisiología sensorial de las vinchucas radica por un lado, en la información que estos estudios pueden aportar al desarrollo de nuevas herramientas de control de las vinchucas a través de la manipulación de su comportamiento (e.g., Guerenstein et al. 1995, Lorenzo et al. 1998). Por otro lado, diversas características del grupo, tales como el tipo de ojo, el alto grado de desarrollo de los ocelos, etc., hacen de los triatominos modelos experimentales atractivos para el estudio de diversos temas de interés básico. No olvidemos que gran parte del conocimiento que hoy tenemos acerca de la regulación de procesos vitales para los insectos, tales como la metamorfosis, muda, reproducción, regulación de la excreción, y control de las propiedades mecánicas de la cutícula, fue obtenido mediante las investigaciones realizadas utilizando como modelo experimental a la vinchuca *Rhodnius prolixus*.

El comportamiento de los triatominos ha sido objeto de varias revisiones (Schofield 1979, Núñez 1987). Recientemente se han revisado aspectos relativos a la integración nerviosa (Lazzari et al. 1999), la ecología sensorial (Lorenzo et al. 1999a), la orientación (Lorenzo et al. 1999b) y la comunicación (Lorenzo Figueiras et al. 1999) de estos insectos. A continuación presentaremos de manera sintética algunos aspectos del comportamiento de estos insectos que consideramos relevantes en el marco del presente trabajo y que ayudarán al lector a tener una mejor comprensión del resto de la Tesis.

Ambientes ocupados por los insectos triatominos

Se conocen más de 120 especies de insectos triatominos en el Nuevo Mundo, y se calcula que por lo menos la mitad de ellas son vectores potenciales de la enfermedad de Chagas. La mayoría de las especies ocupan ambientes silvestres y algunas de ellas pueden ocasionalmente invadir las viviendas humanas, contribuyendo a la transmisión de *T. cruzi* (Schofield 1994, Carcavallo et al. 1998a). Dado que todos los estadios de estos insectos son hematófagos obligados, se los

encuentra en asociación estrecha con sus hospedadores vertebrados (Schofield 1979, 1994). Así, las especies silvestres se encuentran frecuentemente en nidos y/o refugios de animales tales como marsupiales, roedores, murciélagos y aves (Carcavallo et al. 1998a). Sin embargo, las especies de mayor importancia epidemiológica son aquellas que colonizan fácilmente las viviendas humanas o sus ambientes relacionados. Debido a esta razón y a su amplia distribución geográfica (Carcavallo et al. 1999), *Triatoma infestans* es uno de los vectores más importantes en Sudamérica, y el principal en nuestro país. Otras especies domiciliadas de importancia sanitaria son *Rhodnius prolixus*, *T. dimidiata* y *Panstrongylus megistus* (Salvatella et al. 1998).

Comportamiento de agregación y selección de refugios

Los insectos triatominos despliegan su mayor actividad durante la noche. Durante el día permanecen inactivos (*akinesis*), agregados en lugares oscuros y protegidos que les permiten permanecer a resguardo de predadores potenciales (hombre, aves, arañas, hormigas). El comportamiento de agregación de las vinchucas se encuentra principalmente determinado por la preferencia de estos insectos a permanecer en estrecho contacto con el sustrato y con conespecíficos (*tigmotaxis*), y por *señales químicas*. Se ha demostrado que *T. infestans* es atraída por sustancias *volátiles* presentes en sus propias heces secas mediante un mecanismo de *anemotaxis* (i.e., seguimiento de señales químicas presentes en corrientes de aire) (Lorenzo Figueiras et al. 1994). Por otra parte, estos insectos eliminan sus heces en los accesos a los refugios mediante un comportamiento altamente estereotipado. Debido a esta distribución particular de excrementos, y al papel de los mismos como señal de agregación, se ha sugerido que las heces actuarían como una clave de orientación de las vinchucas hacia los refugios (Lorenzo y Lazzari 1996). Estos autores demostraron, además, que los refugios asociados a papeles impregnados con heces son capaces de reclutar activamente insectos hacia su interior. Por otra parte, la presencia de una señal de agregación en las heces ha sido demostrada en varias especies de triatominos, así como también la ocurrencia de respuestas inter-específicas (Schofield y Patterson 1977, Cruz López et al. 1993, Lorenzo Figueiras y Lazzari 1998a).

Por otra parte, se ha demostrado la existencia de un factor de agregación en *T. infestans*, presente en la cutícula. Esta señal es dejada por los insectos al

caminar sobre un sustrato, por lo que actuaría como una "huella química". Esta "huella" estimularía receptores de contacto, arrojando a los insectos que contactan las superficies marcadas (Lorenzo Figueiras y Lazzari 1998b). De este modo, la orientación a los refugios en *T. infestans* involucra por lo menos dos señales: una olfativa que actúa a distancia y que serviría para localizar la entrada a los refugios, y una señal química de contacto que arrojaría a los insectos dentro de los mismos. Además, la permanencia de las vinchucas dentro de los refugios obedece también a la conocida preferencia de estos insectos por sitios oscuros (*escototaxis*) (Wiesinger 1956).

Además del papel de las señales químicas en la orientación hacia refugios y en la inducción y mantenimiento de la agregación, se ha demostrado que otros factores, como la cercanía al hospedador, la temperatura y la humedad relativa condicionan la selección de refugios en *T. infestans* (Lorenzo y Lazzari 1999). Estas dos últimas claves son además utilizadas por las vinchucas para seleccionar sitios donde permanecer, oviponer y eclosionar (Lazzari 1991a, Roca y Lazzari 1994).

Organización temporal del comportamiento.

Si bien las vinchucas son insectos de hábitos nocturnos, muchas de sus actividades y procesos se presentan en ventanas temporales discretas. La dispersión (Lorenzo Figueiras et al. 1994), la iniciación del vuelo (McEwen y Lehane 1993), la salida de refugios y la búsqueda de alimento (Lorenzo y Lazzari 1996), la oviposición (Constantinou 1984b, Ampleford y Davey 1989), la preferencia por altas temperaturas (Lazzari 1991b) y la atracción a luz beta (Bertram 1971) tienen lugar al anochecer. En contraste, la agregación, la búsqueda de refugios, la eclosión del huevo, la ecdisis y la preferencia por bajas temperaturas ocurren poco antes del amanecer. La actividad locomotora, por su parte, sigue un patrón bimodal que presenta un pico en el crepúsculo y otro al amanecer (Lazzari 1992).

La ventaja adaptativa de este ajuste de actividades en ventanas temporales discretas es muy clara en algunas actividades. Por ejemplo, la búsqueda de alimento ocurre cuando algunos de sus huéspedes, que a su vez son potenciales predadores, están dormidos.

La naturaleza y control de varios de los procesos mencionados en los párrafos precedentes han sido estudiados con un enfoque cronobiológico. Previo a realizar una somera descripción de los mismos, se revisarán algunos conceptos y

términos cronobiológicos, dado que los mismos serán de utilidad para la comprensión de algunos aspectos de esta Tesis.

Relojes circadianos: bases y terminología

Se aplica el término de *ritmo biológico* a toda oscilación, regular en el tiempo, de una variable biológica (Saunders 1982). Los ritmos diarios son aquellos que se presentan con un período de 24 hs. El ciclo ambiental de luz-oscuridad (LD, por *light-darkness*) es uno de los *dadores de tiempo*, *sincronizadores*, o *Zeitgeber* más importante de los ritmos diarios (Pittendrigh 1981a, Aschoff 1989). Existen ritmos biológicos con períodos distintos de 24 hs., sincronizados por otras variables cíclicas ambientales tales como los ciclos de marea o estacionales. En todos los casos, la sincronización con el ambiente tiene un gran valor adaptativo ya que permite a los animales anticipar eventos futuros y organizar sus actividades en el tiempo (Pittendrigh 1981b, Page 1985, Aschoff 1989).

Los mecanismos que controlan los ritmos biológicos pueden ser *exógenos* (una respuesta directa a los cambios ambientales) o *endógenos* (controlados por un *oscilador* autosostenido). La mayoría de los ritmos diarios de actividad son controlados por un oscilador endógeno, pero son continuamente modulados por los efectos directos de los ciclos ambientales de luz y/o temperatura. Para demostrar la naturaleza endógena de un ritmo se debe verificar su persistencia en ausencia del *Zeitgeber*. Supongamos el caso de un ritmo controlado por el ciclo LD. Para demostrar la naturaleza endógena del ritmo se transfiere al organismo de esta *condición de sincronización* a *condiciones constantes* de luz (LL) u oscuridad (DD). Simultáneamente, se mantiene constante toda otra variable ambiental (i.e., temperatura, humedad, etc.). Bajo estas condiciones, también conocidas como *condiciones de libre curso* o "*free-running*", un ritmo diario que está controlado por un oscilador endógeno se mantendrá y expresará con un período ligera pero significativamente distinto de 24 hs (*período de libre curso* τ) (Saunders 1982, Page 1985). Es por eso que estos ritmos son llamados *circadianos* (del griego, *circa*=cerca, *diano*=día). Si en condiciones constantes la variable en cuestión se vuelve arrítmica, diremos que se trata de un *ritmo diario*, de naturaleza *exógena*. Es importante destacar esta distinción entre *ritmos diarios* y *ritmos circadianos*, dado que muchas veces estos términos se encuentran usados indistintamente en la literatura. Por ejemplo, un error frecuente es la denominación de *circadiano* a un

ritmo *diario* cuya naturaleza endógena se supone, pero no ha sido puesta a prueba experimentalmente. En resumen, los ritmos circadianos presentan tres características principales:

- persisten en ausencia de claves temporales externas (i.e., ciclos de luz-oscuridad, de temperatura, etc.)
- en dichas condiciones exhiben un período cercano a, pero usualmente distinto de 24 hs.
- son compensados para los cambios de temperatura (i.e., $Q_{10} \approx 1$).

Otras definiciones y términos que resultarán útiles son los siguientes (Marques et al. 1997):

- *Fotofase / escotofase*: fase de luz u oscuridad, respectivamente, de un ciclo LD.
- *Día / noche subjetivo*: en situación de constancia ambiental, dícese de la fase en la que el sistema biológico se comporta como si fuese la fase de luz (día) u oscuridad (noche), respectivamente, del ciclo día/noche ambiental.
- *Entrenamiento o sincronización*: acoplamiento de un ritmo endógeno con un ciclo ambiental de modo tal que el ritmo se expresa con el período del *Zeitgeber*. En el caso de los ritmos circadianos el ritmo es de exactamente 24 hs.

Relojes circadianos en triatominos

Se ha demostrado que los ritmos diarios de locomoción espontánea (Wiesinger 1956; Nuñez 1982; Constantinou 1984a; Settembrini 1984; Lazzari 1992), oviposición (Constantinou 1984b, Ampleford y Davey 1989), eclosión del huevo (Lazzari 1991a; Schilman 1998), ecdisis (Ampleford y Steel 1982; Ampleford 1985), y termopreferencia (Minoli 1999) están bajo control endógeno en diversas especies de insectos triatominos, y usan al ciclo LD como *Zeitgeber*.

El ritmo diario de actividad de *T. infestans* tiene dos componentes principales, que se presentan uno en la segunda hora de la escotofase y el otro al principio de la fotofase, los cuales han sido relacionados con la búsqueda de

hospedador y de refugio, respectivamente (Lazzari 1992, Lorenzo y Lazzari 1996). Estos dos picos persisten en DD con diferentes períodos de libre curso, lo que sugiere la existencia de dos osciladores independientes, cada uno de ellos controlando en forma individual cada uno de los dos picos de actividad. Este ritmo también es entrenable por ciclos de temperatura, siendo este *Zeitgeber* muy potente (Lazzari 1992). Sin embargo, puestos a competir, el ciclo de iluminación domina sobre el térmico, lo que llevó a este autor a postular que la actividad de *T. infestans* está controlada por un sistema circadiano compuesto de un arreglo jerárquico de dos osciladores acoplados.

Respuestas a estímulos visuales

En los insectos la visión tiene un papel fundamental en la localización de recursos, así como en el vuelo y en las respuestas de escape. A pesar de ello, el papel del sistema visual en los triatominos ha sido escasamente estudiado hasta el presente. A continuación revisaremos los antecedentes al respecto.

Es bien conocido que las vinchucas prefieren permanecer en sitios oscuros donde se ocultan de sus predadores (Wiesinger 1956). De hecho, una de las respuestas visuales más estereotipadas de estos insectos es la respuesta de escape a la luz o *fototaxis negativa*. Ward y Finlayson (1982) observaron que *T. infestans* muestra un comportamiento fototáctico negativo frente a luz verde, pero no frente a luz azul o roja. Por otra parte, el análisis electrofisiológico mostró que la retina de este insecto es sensible a longitudes de onda en la región del espectro electromagnético que abarca desde el verde hasta el naranja (Schofield 1975). Según estos autores, las vinchucas no serían sensibles a la luz ultravioleta (UV) ni a la luz azul. La falta de sensibilidad a estas longitudes de onda es un resultado que merece ser investigado nuevamente, dado que la mayoría de los insectos poseen pigmentos visuales en dichas regiones del espectro (Menzel y Backhaus 1991, Chapman 1998), incluso aquellos de hábitos crepusculares o nocturnos (Koehler et al. 1987, Cutler et al. 1995). Por otra parte, Sjorgren y Ryckman (1966) hallaron que las trampas de luz UV son capaces de capturar distintas especies de triatominos silvestres, lo que entra en evidente conflicto con los resultados mencionados.

El comportamiento de huida de *T. infestans* desencadenado por la vía visual presenta características que no han sido observadas en ningún otro insecto (Lazzari y Varjú 1990). Estos autores observaron que cuando un objeto se acerca a una

vinchuca por encima del horizonte, la misma escapa manteniendo dicho objeto en el campo visual lateral, a una posición fija respecto al eje longitudinal del cuerpo. Esta reacción de *fijación y seguimiento lateral* permitiría a los insectos mantener al predador potencial dentro del campo visual durante la huida. Esta respuesta está mediada por la zona dorsal del ojo compuesto, lo que muestra una especialización funcional del mismo en relación a este comportamiento (Lazzari y Varjú 1990).

En cuanto al papel de las claves visuales en el contexto de la búsqueda de alimento, Wigglesworth y Gillet (1934) observaron que cuando las entradas sensoriales de las antenas son anuladas por antenectomía bilateral, *R. prolixus* persigue e intenta picar objetos que se mueven en su proximidad, un comportamiento nunca observado en insectos intactos. Este punto es particularmente interesante por sus implicancias en relación a la integración de distintas entradas sensoriales en las respuestas de orientación de las vinchucas.

¿Por qué estudiar el sistema visual de *Triatoma infestans*?

Como surge de la lectura de los párrafos precedentes, queda claro que las respuestas visuales de las vinchucas sólo han sido estudiadas en aspectos parciales. En particular, algunas cuestiones tales como la sensibilidad espectral del sistema visual necesitan ser analizadas en detalle.

La escasa información disponible es probablemente producto de la poca importancia que erróneamente se ha atribuido a la visión en insectos de hábitos nocturnos o crepusculares (White et al. 1994) y con sentidos químico y térmico altamente desarrollados, como es el caso de las vinchucas. Sin embargo, en otros insectos hematófagos el estudio del sistema visual ha permitido comprender aspectos importantes de su ecología (Green y Cosens 1983, Allan et al. 1987, Lehane 1991). Esto ha proporcionado, por un lado, información relevante a problemas básicos de la fisiología sensorial de insectos, y por el otro, conocimientos potencialmente aplicables al desarrollo de herramientas de control (e.g., Green 1989, Mutinga et al. 1995, Constantini et al 1998). Esto pone de manifiesto la necesidad de estudiar de manera integral diversos aspectos del sistema visual de las vinchucas.

Objetivos del trabajo

El objetivo del presente trabajo de tesis es estudiar algunos aspectos de la fisiología de la visión de *Triatoma infestans*. En particular se analizará:

1. La sensibilidad fótica y espectral de los ojos compuestos de *T. infestans* mediante estudios de comportamiento (Capítulos 3 y 7).
2. El control temporal de la sensibilidad visual mediante estudios de comportamiento y de morfología funcional (Capítulos 4 y 5 respectivamente).
3. El papel de los ocelos y los ojos compuestos en la respuesta de escape a la luz (Capítulo 6).
4. El efecto de la edad y las mutaciones en la respuesta de escape a la luz de este insecto (Capítulo 8).
5. La interacción entre las modalidades sensoriales visual y olfativa en el contexto del comportamiento de agregación (Capítulo 9).
6. Las condiciones luminosas en un ambiente natural (Capítulo 10).

CAPÍTULO 2: LOS ÓRGANOS FOTORRECEPTORES Y LA VISIÓN EN LOS INSECTOS Y OTROS ARTRÓPODOS

La visión es uno de los sentidos que ha sido más estudiado en los animales. Dada la complejidad de su funcionamiento consideramos necesario revisar algunos aspectos relativos tanto a la estructura como a la función del sistema visual de los artrópodos, y en particular de los insectos.

Introducción

Según Dan-E. Nilsson (1990), la función primaria de los ojos es clasificar los fotones que provienen de distintos puntos de espacio de acuerdo con su ángulo de incidencia, longitud de onda y plano de polarización. A tal fin, los ojos poseen células sensoriales sensibles a la luz (*fotorreceptores*) que transducen este estímulo en una señal eléctrica y la transmiten al sistema nervioso central. Esto no implica, sin embargo, que los ojos sean capaces de percibir colores, formas o movimiento. Estas *percepciones* visuales, del mismo modo que como ocurre con las percepciones generadas por todos los sentidos, son construcciones internas resultado de un programa innato, la experiencia y el aprendizaje, y de un procesamiento específico por parte del sistema nervioso central (Schmidt 1978, Kandel et al. 1995).

Si bien existen una gran variedad de diseños de ojo, los mismos pueden agruparse en dos tipos básicos: **simples** y **compuestos**. Los primeros se caracterizan por poseer una única estructura de enfoque asociada a un conjunto relativamente numeroso de fotorreceptores que forman la retina. Los ojos compuestos, por su parte, están formados por múltiples estructuras de enfoque, cada una asociada a unas pocas células fotorreceptoras, constituyendo cada una de estas unidades estructurales una *omatidia*. Entre los ojos simples reconocemos los llamados de *tipo cámara con lente*, presentes en todos los vertebrados y en varios grupos de invertebrados (entre ellos, los insectos y las arañas), los de *cámara oscura sin lente* de *Nautilus sp.*, que poseen una pupila de diámetro regulable, y los de *cámara con espejo cóncavo* de *Pecten sp.* (Nilsson 1989b, 1990). En los insectos encontramos dos clases de ojos simples: (a) los *ocelos*, localizados en

posición dorsal y característicos de los insectos adultos, y (b) los *stemmata*, localizados en posición lateral, propios de las larvas de insectos holometábolos.

Ojos compuestos

Distribución

Los ojos compuestos son los órganos visuales más importantes tanto en los insectos como en los crustáceos. Los ojos compuestos también se encuentran en otros animales, pero constituyen casos aislados en grupos donde otros tipos de ojo son los dominantes, como ser el caso de *Limulus sp.* entre los quelicerados y *Scutigera sp.* entre los quilópodos. Fuera de los artrópodos estos ojos solamente se encuentran en algunos anélidos poliquetos tubícolas y en un pequeño grupo de almejas, pero en ambos casos se trata de estructuras pequeñas y de diseño sencillo (Nilsson 1989a).

Entre los insectos, los ojos compuestos están presentes en la mayoría de los individuos adultos y en las larvas de los hemimetábolos, y están ubicados uno a cada lado de la cabeza. Los ojos compuestos están reducidos en los grupos que parasitan (e.g., Siphonaptera) y en las formas cavernícolas, y están ausentes en la mayoría de los Apterigota.

El número de omatidias es sumamente variable; se encuentran 800 en *Drosophila sp.*, 5500 en la abeja recolectora, y 10000 en los ojos de algunos alcuaciles. En algunos casos las omatidias correspondientes a distintas partes de un mismo ojo difieren en el tamaño y/o en su estructura (Land 1989, Chapman 1998).

Estructura de la omatidia

Cada omatidia consiste básicamente de un *sistema de lentes* que colecta y enfoca los rayos luminosos y de una *porción sensorial* (el *rabdoma*) que transduce la energía luminosa en una señal eléctrica. La porción óptica de la omatidia consta de dos elementos, la *córnea* y el *cono cristalino* (CC) (Fig. 2.1). En una vista superficial, estas lentes o *facetras* se observan empaquetadas formando un típico arreglo hexagonal. La córnea es una lente cuticular bicóncava transparente e incolora,

producida por las *células cornéagenas*. Posteriormente, estas células se desplazan a los costados de la omatidia constituyendo las *células pigmentarias primarias* (CPPs). Debajo de la córnea se encuentran cuatro *células de Semper* (Fig. 2.1). En los ojos de tipo *eucono*, presentes en la mayoría de los insectos, estas células producen un verdadero CC intracelular. En los ojos de tipo *acono*, las células de Semper no producen un CC, pero el citoplasma claro de dichas células ocupa la posición de la lente (Chapman 1998). El CC, o el lugar ocupado por las células de Semper, está lateralmente rodeado por las CPPs (Fig. 2.1).

Debajo del CC de cada omatidia se encuentra la *retinula*, constituida usualmente por ocho *células retinulares*. Los axones de estas células alargadas atraviesan la *membrana basal* y se proyectan en dirección proximal hacia los *lóbulos ópticos* del protocerebro. Los lóbulos ópticos se presentan uno a cada lado de la cabeza y están constituidos por tres (cuatro en Diptera) neuropilos distintivos (*lamina*, *medula* y *lobula*) unidos por quiasmas (Chapman 1998).

El *rabdoma* es la porción fotosensible de cada omatidia. El rabdoma está formado por las microvellosidades densamente empaquetadas correspondientes a cada célula retinular (*rabdómeros*). Estas microvellosidades están dispuestas en la cara interna de cada célula retinular, en ángulo recto respecto al eje longitudinal de la célula. En la mayoría de los insectos los rabdómeros de células vecinas están dispuestos en estrecha aposición e interdigitados, formando un "*rabdoma fusionado*" (Fig. 2.2.A), mientras que en los dípteros, dermápteros, hemípteros y algunos coleópteros están separados, formando un "*rabdoma abierto*" (Fig. 2.2.B). En la mayoría de los ojos compuestos las células retinulares de cada omatidia están rodeadas por 12-18 *células pigmentarias secundarias* (CPSs) (Fig. 2.1). Estas células, al igual que las CPPs, contienen pigmentos *pantalla*. La función de estos pigmentos será discutida en detalle en el Capítulo 5.

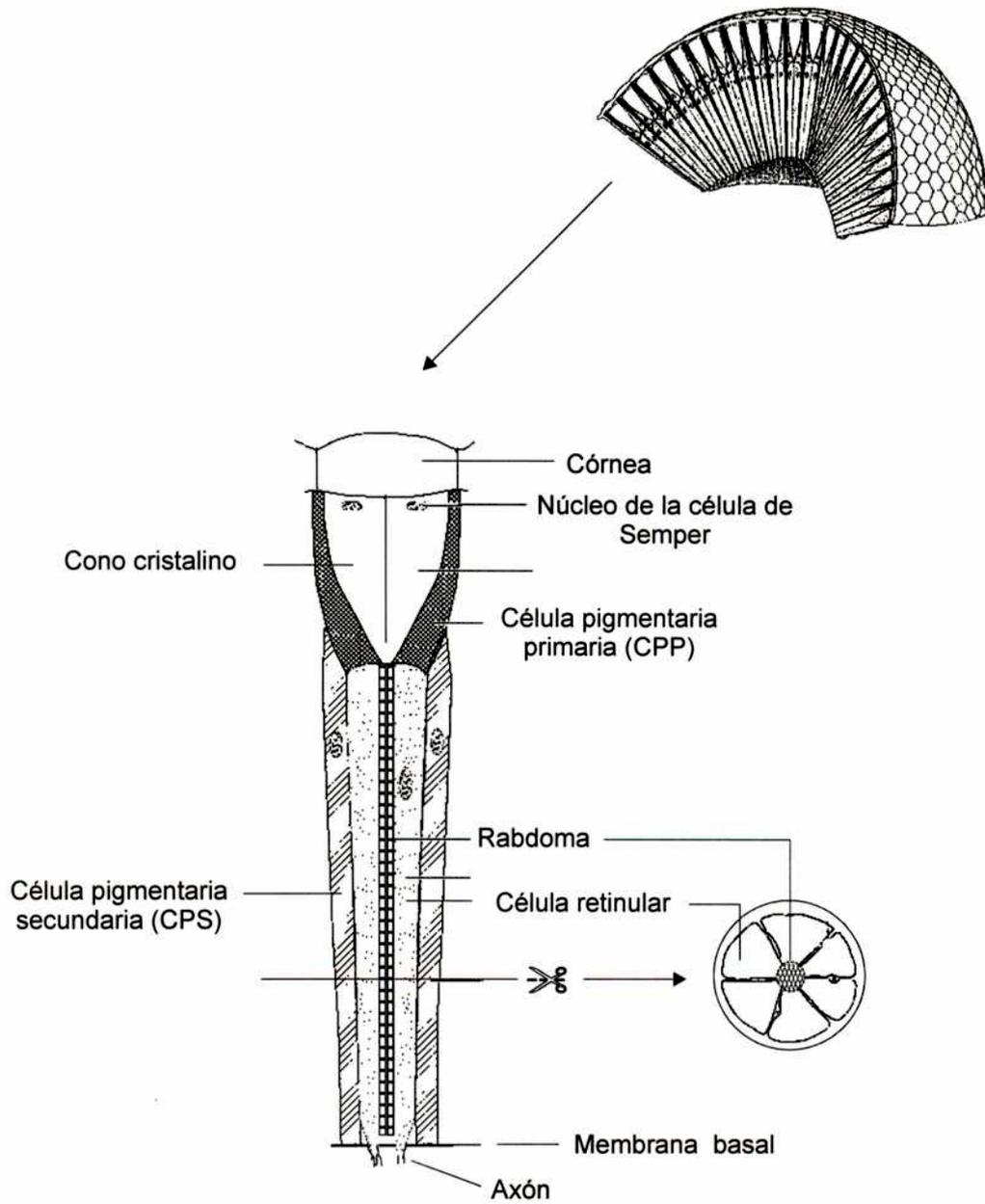


Figura 2.1: Representación esquemática de una ommatidia simple de aposición (modificado de Chapman 1998).

Ojos de aposición y de superposición

Los ojos compuestos pueden ser agrupados básicamente en dos grandes categorías: *ojos de aposición* y *ojos de superposición* (Fig. 2.3). En los ojos de aposición cada omatidia está ópticamente aislada de sus vecinas, es decir, cada rabdoma recibe solamente los rayos que entran a través de su propio sistema de enfoque, mientras que los rayos que entran a través de las facetas vecinas son absorbidos por los pigmentos de las CPSs (Fig. 2.3.A). En estos ojos, usualmente el rabdoma se extiende a todo lo largo de las células retinulares, entre el CC y la membrana basal. En los ojos de superposición no existe tal aislamiento óptico, y los rayos que entran a través de lentes correspondientes a diferentes omatidias son enfocados en un rabdoma único. Esto es posible porque en estos ojos existe una “*zona clara*”, libre de pigmento, entre el CC y el rabdoma, y porque el rabdoma se restringe a la porción proximal de las células retinulares (Fig. 2.3.B).

En los ojos compuestos, a diferencia de lo que ocurre en los ojos simples, las lentes forman una imagen derecha en la retina (Fig. 2.4). En el ojo de aposición cada lente forma una imagen en el extremo distal del rabdoma; los objetos están representados en la retina como un mosaico de puntos de luz (uno por omatidia) que difieren en su intensidad. En el ojo de superposición los rayos son refractados o reflejados en la lente y forman una imagen derecha en la retina (Fig. 2.4). Este hecho tiene profundas implicancias evolutivas, en cuanto no existirían intermedios funcionales entre ambos tipos (Nilsson 1989a).

Como regla general, podemos decir que los ojos de aposición son comunes en los artrópodos que son activos en ambientes muy luminosos. Los ojos de superposición, típicamente, se encuentran en los insectos y crustáceos de hábitos nocturnos, o en aquellos que viven en ambientes pobremente iluminados (Warrant y McIntyre 1993, Chapman 1998). Sin embargo, en ambos casos existen no pocas excepciones.

Ambos tipos de ojo presentan variaciones tanto en la estructura como en el tamaño de los componentes omatidiales, lo que ha dado lugar a una gran diversidad de diseños de ojo compuesto (e.g., de aposición simple, de rabdoma abierto, afocal, con superposición neural, de superposición de refracción, reflexión y parabólica). ¿Por qué existe tal variedad de ojos compuestos? Antes de analizar las propiedades y el desempeño de cada tipo de ojo, mencionaremos brevemente las limitaciones que la naturaleza de la *luz* impone a la cantidad y calidad de información que cualquier ojo pueda procesar.

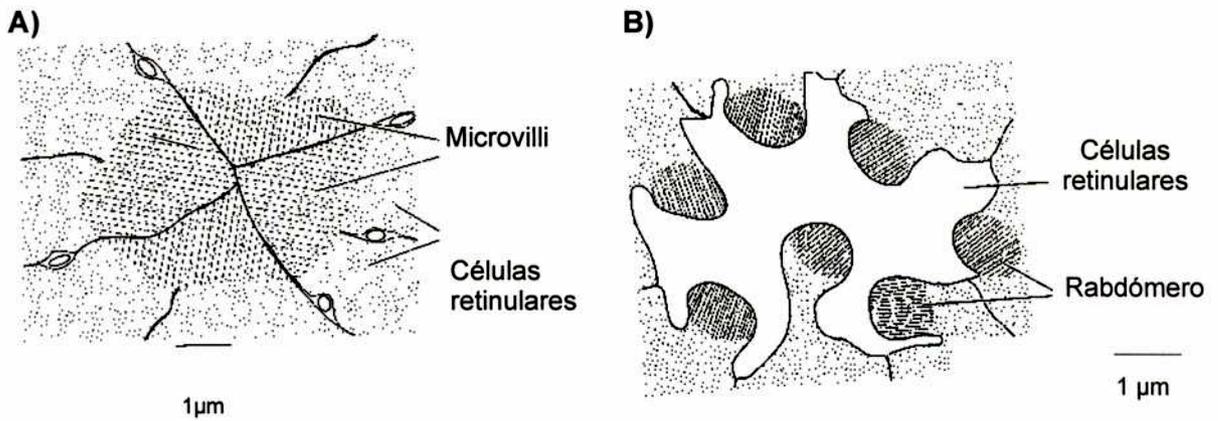


Figura 2.2: Sección transversal de una omatidia con rabdoma cerrado de *Apis* (A) y con rabdoma abierto de *Musca* (B). (Tomado de Chapman 1998)

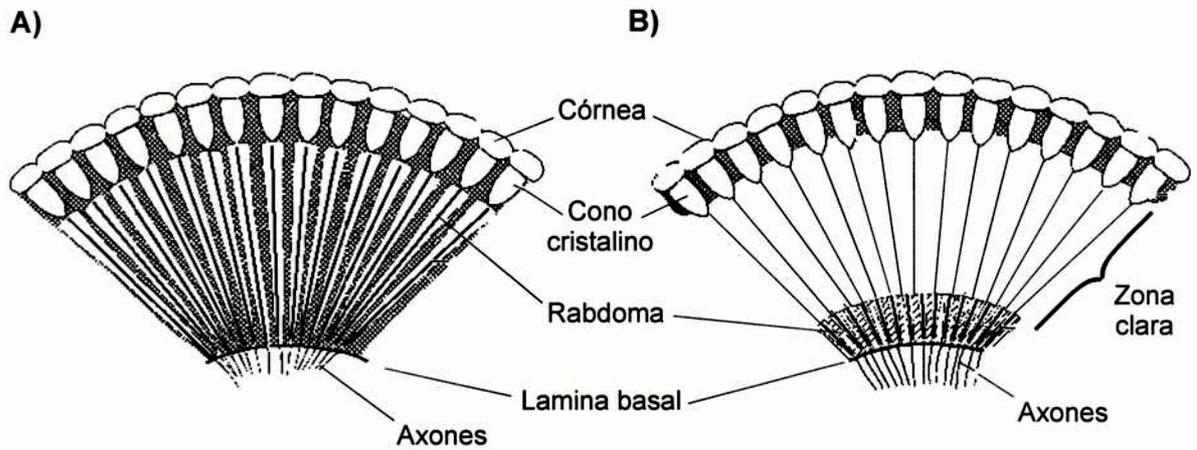


Figura 2.3: Sección longitudinal diagramática de: A) un ojo de aposición, mostrando la extensión de los rabdomas entre la membrana basal y el cono cristalino), B) de un ojo de superposición, donde se observa una zona clara, libre de pigmento entre el rabdoma y el cono. (Modificado de Chapman 1998).

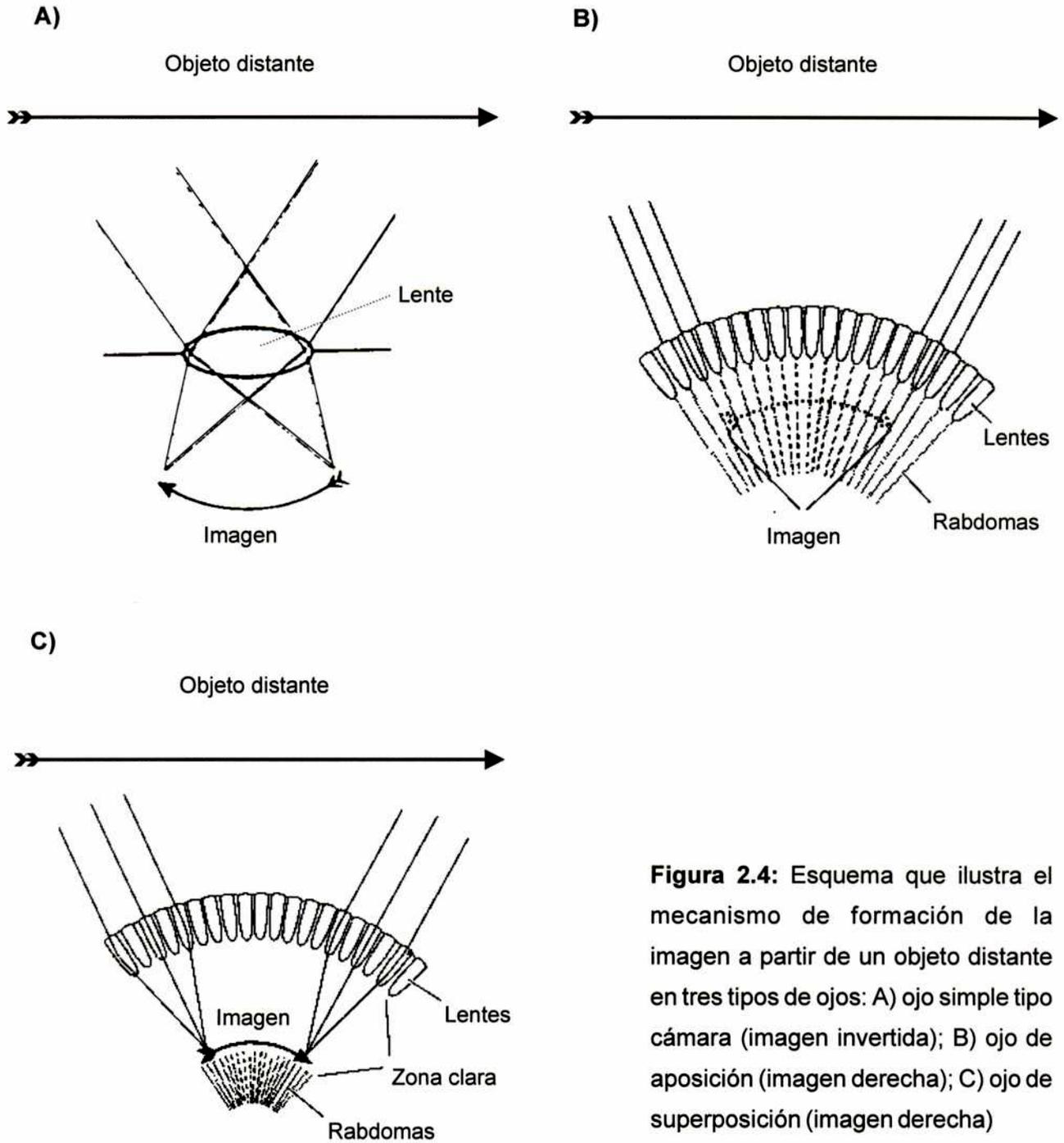


Figura 2.4: Esquema que ilustra el mecanismo de formación de la imagen a partir de un objeto distante en tres tipos de ojos: A) ojo simple tipo cámara (imagen invertida); B) ojo de aposición (imagen derecha); C) ojo de superposición (imagen derecha)

La luz

El término “luz”, en sentido estricto, está reservado para la región del espectro de radiación electromagnética que contiene longitudes de onda visibles para el ser humano (400-700 nm) (Fig. 2.5). Pero a fin de evitar confusiones, este término, tal como lo encontramos en la mayor parte de la bibliografía, será utilizado en esta Tesis para referirnos a las regiones del espectro a la que un sistema visual cualquiera es sensible. No obstante, es necesario entonces establecer un criterio de unidades de energía aplicables a todo el espectro de radiación.

La elección de una unidad de medida debe estar basada en si la radiación a medir será vista por un humano o por otro organismo. Existen básicamente dos modos de medir “luz” con propósitos analíticos. La *radiometría* trata a la luz en términos de energía absoluta, usualmente en watts (W). La *fotometría*, por su parte, considera la forma en la que el sistema visual humano percibe la radiación; su unidad básica es el lumen (lm). Los dispositivos de medición utilizados en uno y otro caso son distintos: un detector radiométrico ideal debe tener una respuesta plana, mientras que uno fotométrico tiene una respuesta que se aproxima a la curva de respuesta del ojo humano (curva CIE). Por otra parte, la conversión de energía a fotones resulta muy útil y es frecuente en la bibliografía, dado que un sistema biológico “ve” fotones y no energía. En todos los casos, existen unidades apropiadas para medir flujo, densidad, etc., las que se indican en la siguiente tabla.

| Cantidad | Unidades de medida | | |
|--|--|------------------------|---|
| | Radiometría | Quantos | Fotometría |
| Flujo | Flujo radiante (Watt, W) | (fotones/s) | Flujo luminoso (lumen, lm) |
| Densidad de flujo en una superficie | Irradiancia (W/m^2) | (fotones/s. m^2) | Iluminancia ($lm/m^2=lux$) |
| Flujo por unidad de ángulo sólido | Intensidad radiante ($W/esteroradian$, sr) | (fotones/s. sr) | Intensidad luminosa ($lm/sr=candela$, cd) |
| Flujo por unidad de ángulo sólido por área | Radiancia ($W/sr.m^2$) | (fotones/s. $sr.m^2$) | Intensidad luminosa ($lm/sr.m^2 = cd/m^2$) |

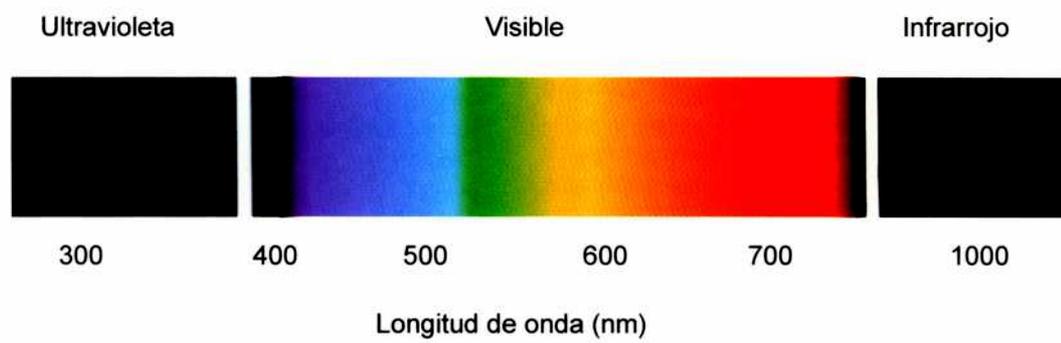


Figura 2.5: Espectro de radiación electromagnético entre 300 y 1000 nm

Casi todos los artrópodos experimentan fluctuaciones de diez o más órdenes de magnitud en la intensidad de luz ambiente. Por ejemplo, una superficie blanca a la luz del sol refleja 4×10^{20} fotones/m².sr.seg, en una noche de luna llena refleja 10^{14} fotones/m².sr.seg, y en una noche nublada sin luna 10^{10} fotones/m².sr.seg (Chapman 1998).

Muchos animales son sensibles a las distintas longitudes de onda *emitidas* por fuentes de luz o *reflejadas* por los objetos. La luz dispersada por la atmósfera tiene un contenido relativamente alto de longitudes de onda corta. La luz reflejada por el suelo y la vegetación contiene principalmente longitudes de onda en la región del amarillo y verde (Warrant y Nilsson 1998, Menzel 1979, Fig. 2.6.A). El espectro de radiación cambia con la elevación del sol, es decir, con el momento del día, la latitud y la estación del año. Por ejemplo, al atardecer los objetos reciben radiación con una mayor proporción de longitudes de onda en la región del amarillo, naranja y rojo (Hailman 1979). La luz reflejada por la luna, por su parte, es similar en composición espectral a la luz del sol, por lo que contiene un componente importante de longitudes de onda en la región del UV entre 330 y 400 nm (Stair y Johnston 1953) (Fig. 2.6.B.).

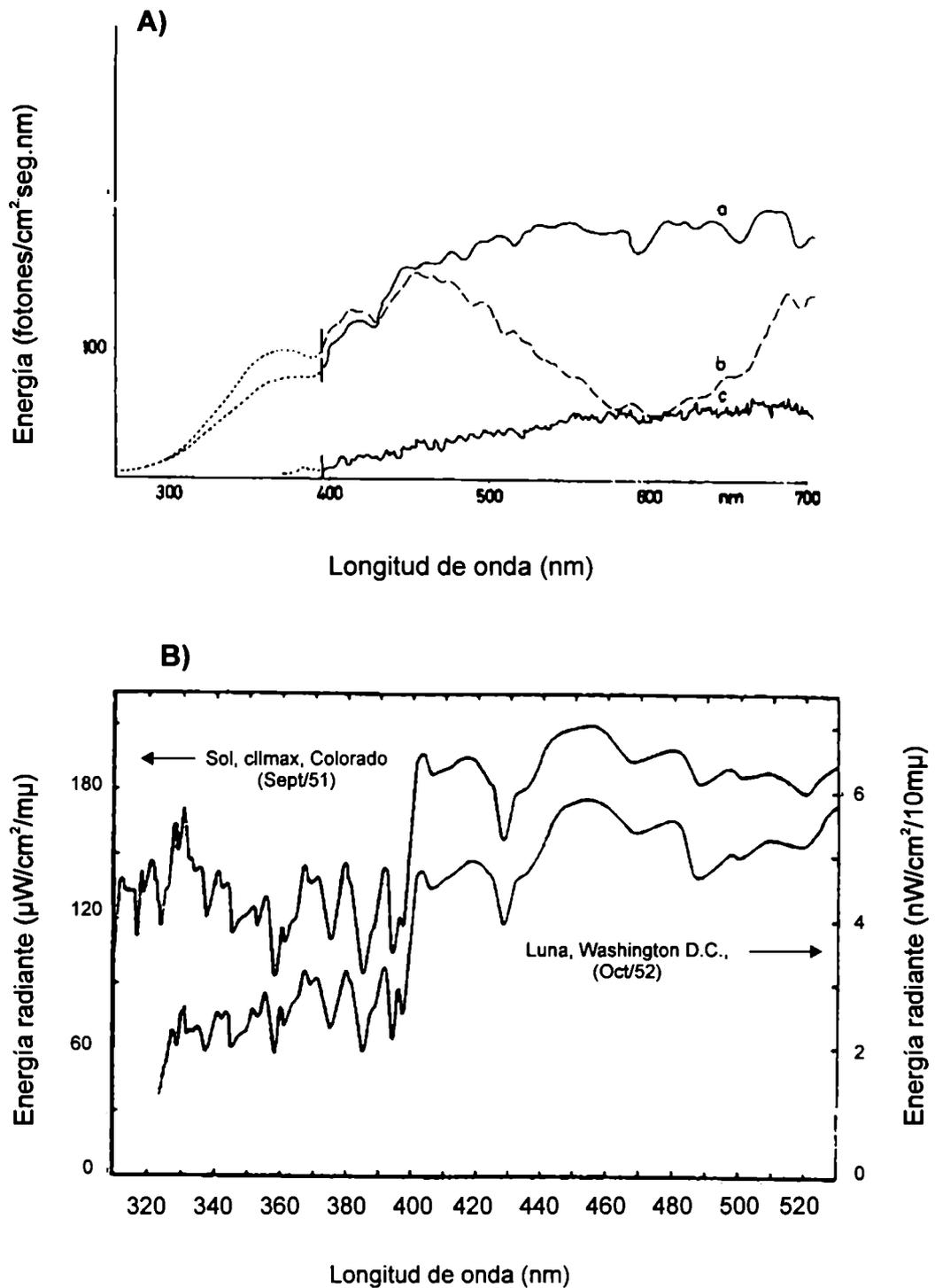


Figura 2.6: A) Composición espectral de la luz natural durante: (a) el mediodía, (b) el crepúsculo, (c) una noche de luna llena. La irradiación total entre 400 y 700 nm es $53000 \cdot 10^{12}$ (a), $30 \cdot 10^{12}$ (b), $30 \cdot 10^9$ (c) fotones/cm²/seg. (Tomado de Menzel 1979). B) Comparación entre la composición espectral de la energía reflejada por la luna y emitida por el sol (Tomado de Stair y Johnston 1953).

Las limitaciones físicas

La resolución espacial de un sistema visual está determinada en principio por el diseño óptico del ojo. En el ojo, al igual que en cualquier sistema óptico que forma una imagen, hay una serie de canales paralelos que conectan cada punto en la imagen con puntos en el objeto. De este modo, cuanto más canales estén disponibles (i.e., mayor cantidad de omatidias) más puntos del objeto estarán representados en la imagen en la retina, y por lo tanto la resolución será mayor. En los ojos de aposición la definición de una imagen será mejor cuanto más pequeño sea el *ángulo interomatidial* (el ángulo entre ejes ópticos de omatidias adyacentes). Sin embargo, el primer factor que limita el poder de resolución de un ojo es la cantidad de luz disponible en el ambiente (Warrant y McIntyre 1993). La intensidad de un estímulo luminoso puede ser medida como la tasa promedio de absorción de fotones por parte de los fotorreceptores. Si esta tasa es muy baja, decimos que hay una considerable cantidad de incertidumbre o *ruido*, lo que limita la detección precisa del estímulo (Nilsson 1989a, Warrant y McIntyre 1993). El *ruido fotónico* puede ser disminuido colectando mayor cantidad de fotones (por ejemplo, aumentando el diámetro de las lentes). Es decir, en ambientes donde la intensidad de luz es limitante, ningún ojo podrá resolver detalles al menos que, en primer lugar, haya capturado suficientes fotones.

A intensidades por encima del umbral de sensibilidad las restricciones físicas inherentes a 1) la óptica y 2) la retina, limitan el poder de resolución de un ojo. La óptica de los ojos sufre, al igual que todas las lentes, de imperfecciones que disminuyen considerablemente la resolución, dado que producen una imagen borrosa en la retina: *aberración esférica* y *cromática*, y *difracción*. Las aberraciones son producto de la curvatura y naturaleza dispersiva de las lentes, respectivamente. Los fenómenos de difracción, por su parte, imponen el límite último a la calidad de una imagen, y son producidos cuando la luz atraviesa una abertura estrecha, por lo que la energía se distribuye según un patrón Gaussiano. Además, en el diseño de todo ojo existe un compromiso entre estas imperfecciones: la difracción puede ser reducida aumentando el diámetro de la lente, pero a expensas de un aumento en las aberraciones y de una disminución en la resolución espacial. Por último, el poder de resolución del ojo está limitado por la capacidad para capturar luz del raddoma y por las propiedades ópticas del mismo. Se entiende por propiedades ópticas del raddoma al comportamiento del mismo como una *guía de luz* o como una *guía de onda*, lo que depende de la relación entre el diámetro del raddoma (D) y la longitud

de onda de la luz incidente (λ). En el primer caso ($D \gg \lambda$) la luz que llega en ángulos $<10^\circ$ del eje óptico es totalmente reflejada dentro del rabadoma, lo que aumenta la captura de luz. Cuando $D \approx \lambda$ el rabadoma se comporta como una guía de onda, lo que da lugar al fenómeno de interferencia. El resultado final es que parte de la luz viaja fuera del rabadoma, lo que disminuye la captura fotónica (Warrant y McIntyre 1993).

En resumen, la resolución espacial de un ojo está limitada por tres factores principales: disponibilidad de fotones, calidad de la óptica y propiedades del rabadoma. Una descripción detallada de estos temas puede encontrarse en las excelentes revisiones de Warrant y McIntyre (1993) y Land (1989, 1997).

Tipos de ojos de aposición y superposición

"Perhaps the most intriguing question in compound eye evolution is how superposition eyes can evolve from apposition eyes. The diversity within both insects and crustaceans is impressive, and to a large extent due to the need for improved sensitivity. The simple apposition design is a most uneconomical way to use the space available for an eye. It is only a small exaggeration to say that evolution seems to be fighting a desperate battle to improve a basically disastrous origin" (Dan-E. Nilsson)

Como ya hemos mencionado, existen dos tipos de ojos compuestos: aposición y superposición. Se reconocen dos tipos de ojos de aposición: *focal* (el más común) y *afocal*. En el ojo *focal* el plano focal de la lente (f) se ubica en el extremo distal del rabadoma. Por otra parte, el diámetro del rabadoma determina si el mismo se comporta como guía de luz (e.g., langostas, escarabajos) o como guía de onda (e.g., moscas, alguaciles, abejas), lo que afecta la captura de luz (Warrant y McIntyre 1993). Los ojos de aposición *afocal*, por su parte, son prácticamente universales en las mariposas diurnas. En este ojo, a diferencia de lo que ocurre en el ojo focal, existe un gradiente de índice de refracción en la región proximal del CC, por lo que los rayos son enfocados y recolimados antes de alcanzar el rabadoma. Por lo tanto, la resolución espacial y la sensibilidad son superiores a las de los ojos de aposición focal cuyos rabadomas se comportan como guías de onda. Es posible que este ojo se encuentre en varios otros órdenes de insectos diurnos, dado que es anatómicamente indistinguible del ojo focal (Nilsson 1989a). Debido al pequeño

diámetro de las lentes los ojos de aposición tienen buena resolución, pero a su vez sufren del fenómeno de difracción y capturan relativamente poca luz (Nilsson 1989a,b; Warrant y McIntyre 1993).

El tipo de ojo de aposición focal más común es el llamado de *aposición simple*, en el que todas las células retinulares forman un rabdoma fusionado (e.g., abejas, alcuaciles, langostas, etc.). En los ojos de aposición con rabdoma abierto, los rabdómeros de las células retinulares adoptan distintas configuraciones. En el caso de las moscas, existe un arreglo particular que aumenta la sensibilidad respecto de la del ojo de aposición simple, a la vez que mantiene la resolución. En este ojo de rabdoma abierto cada rabdómero constituye una guía de onda que analiza un punto distinto del espacio (Fig. 2.7.B). Los axones de las células retinulares de distintas omatidias que tienen ejes ópticos paralelos (i.e., que "miran" el mismo punto) convergen en la misma interneurona de la lámina, condición conocida como *superposición neural*. De este modo, la superposición es selectiva para señales originadas en fotorreceptores con idénticos campos visuales, lo que produce un incremento absoluto de la sensibilidad visual respecto del ojo de aposición simple. Cabe aclarar que este ojo, desde el punto de vista óptico, sigue siendo un ojo de aposición dado que las omatidias están ópticamente aisladas (Nilsson 1989b). Los ojos de aposición de rabdoma abierto presentes en los hemipteros, dermápteros, y algunos coleópteros no han sido asociados a este principio (Nilsson 1989a).

Los ojos de *superposición óptica*, en términos de sensibilidad, son superiores a cualquier ojo de aposición, ya que aumentan la captura fotónica, lo que ocurre a expensas de degradaciones en la resolución espacial. Estos ojos se encuentran típicamente en insectos y crustáceos de hábitos crepusculares y/o nocturnos o que viven en ambientes pobremente iluminados, si bien existen excepciones (Warrant y McIntyre 1993). Se reconocen tres tipos de ojo de superposición: *refractante*, *reflectante* y *parabólico* (Fig. 2.7.C-E). El más común de estos tipos es el ojo de *superposición refractante*, presente en muchos insectos nocturnos (e.g., neurópteros, algunos escarabajos, polillas, tricópteros) y en algunos crustáceos eufásidos y mísidos (Fig. 2.7.C). Las lentes de estos ojos presentan un gradiente de índice de refracción, por lo que los rayos que atraviesan la córnea son enfocados en el CC y recolimados en un haz de rayos paralelos antes de alcanzar el rabdoma. Este funcionamiento, similar al del ojo de aposición afocal, ha llevado a postular que este último sería un intermedio evolutivo entre el ojo de aposición y el de superposición (Nilsson 1989a). En el ojo de *superposición reflectante*, presente en

crustáceos decápodos, los rayos son reflejados en las paredes del CC (arreglo ortogonal de espejos) (Fig. 2.7.D). Finalmente, el ojo de *superposición parabólica* (que debe su nombre a la curvatura parabólica de las paredes reflectantes del CC), opera mediante una compleja combinación de mecanismos de refracción, reflexión y guías de luz (Fig. 2.7.E). Se encuentra en cangrejos brachiuros y ermitaños (Nilsson 1989a, b).

En las revisiones de Kunze (1979) y Nilsson (1989a,b; 1990) puede encontrarse una descripción detallada de la óptica y funcionamiento de los distintos tipos de ojo de aposición y superposición.

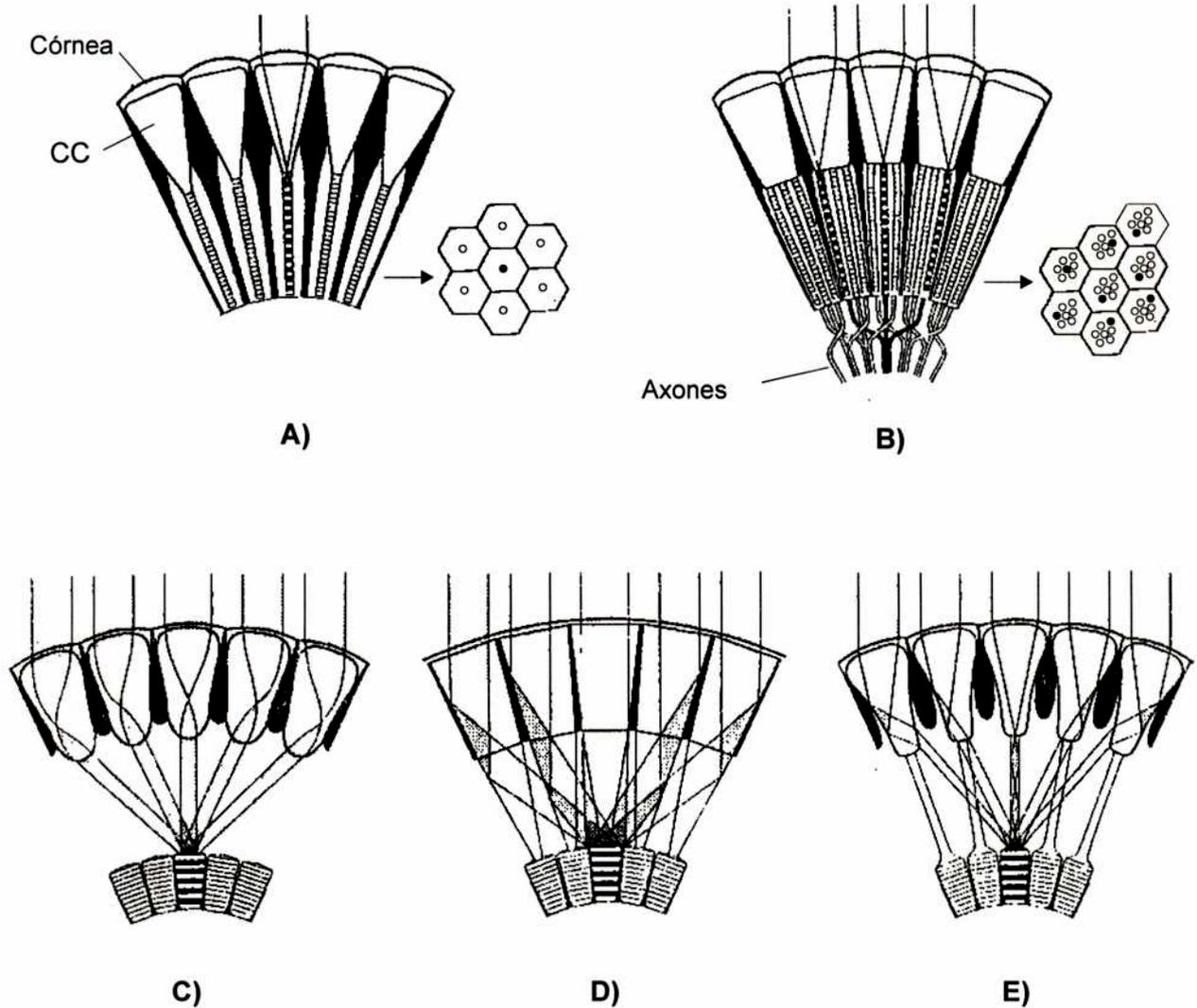


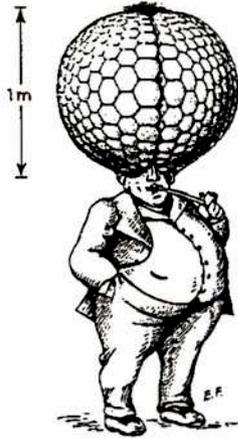
Figura 2.7 : Esquema que ilustra el mecanismo de enfoque de un punto lejano en los distintos tipos de ojos compuestos. (A-B) ojos de aposición: (A) ojo de aposición simple, el rabdoma actúa como guía de luz (sección transversal, círculo lleno); (B) ojo de superposición neural, los axones de células retinulares de distintas omatidias con ejes ópticos paralelos convergen en una única interneurona, la sección transversal muestra los rabdómeros que contribuyen a la formación de la imagen por superposición *neural* (círculos llenos). (C-E) ojos de superposición óptica: (C) superposición refractante, (D) superposición reflectante, (E) superposición parabólica. En los ojos de aposición los pigmentos pantalla (en negro) se extienden entre omatidias, mientras que en los ojos de superposición rodean el CC. Los rabdomas están representados como áreas rayadas (tomado de Nilsson 1989).

La comparación: ¿ojos simples ó compuestos?

De lo expuesto en la sección anterior podemos concluir que la clave está en los diseños de ojo de gran apertura, dado que esta característica reduce tanto la difracción como el ruido fotónico. En términos de difracción, el ojo simple tipo cámara es claramente superior al ojo compuesto. La cooperación óptica entre omatidias de los ojos de superposición suma a esto el fenómeno de aberración esférica. En cuanto al ruido fotónico, que es la principal limitación en ambientes poco iluminados, los ojos de aposición son inherentemente ineficientes (cada rabdoma recibe luz solamente a través de su propia faceta), mientras que los ojos de superposición óptica son en algunos casos tanto o más sensibles que los ojos tipo cámara (Warrant y McIntyre 1993). Sin embargo, los ojos simples de los arácnidos (revisados por Fleissner y Fleissner 1999) se encuentran entre los más espectaculares de los artrópodos en términos de eficiencia, dado que son muy sensibles y en algunos casos, a pesar de su tamaño pequeño, tienen un poder de resolución similar al del ojo humano. Pero no todo ojo cámara es bueno en cuanto a esta característica, ya que, por ejemplo, los ocelos de los insectos tienen una muy mala resolución espacial. Sin embargo, esta no es una característica del diseño sino que, como veremos más adelante, constituye una adaptación para una función particular. Finalmente, entre estos dos extremos encontramos los stemmata, que son ojos simples capaces de detectar formas. En resumen, podemos decir que los ojos tipo cámara son indudablemente la solución ideal a los requerimientos de la visión espacial, a la vez que la superposición neural y óptica de los ojos compuestos constituyen claras ventajas adaptativas (Nilsson 1990). ¿Por qué los ojos compuestos han persistido, cuando otros diseños mejores, como los ojos simples, están disponibles? Algunos autores han propuesto que dado que no existen intermedios funcionales entre un ojo simple y un ojo compuesto, una vez que la evolución ha tomado un camino, la única posibilidad fue mejorar el diseño existente, lo que ha dado lugar a la gran variedad de ojos compuestos que hoy observamos entre los artrópodos (Nilsson 1989a).

Finalmente, cabe mencionar que probablemente el pequeño tamaño del cuerpo de los artrópodos ha favorecido el desarrollo de una retina convexa (el ojo compuesto), lo que tiene como consecuencia campos visuales extensos. En el caso de las arañas, que poseen retinas cóncavas con pequeños campos visuales, la presencia de un arreglo particular de ojos simples constituiría una solución a los requerimientos de la visión espacial (Wehner 1994). Esta particularidad de los ojos

compuestos, también ha sido explotada por la evolución y en ella se basa buena parte de la visión de movimiento de los insectos.



Esta ilustración muestra el tamaño increíblemente grande que un ojo compuesto debería tener para mantener la agudeza visual del ojo de un humano.

Transducción de la señal luminosa

Una vez que la luz llega a las células retinulares la energía luminosa es convertida en una señal eléctrica. Este proceso de *fototransducción* comienza con la absorción de fotones por parte de los pigmentos visuales (*rodopsina*). La rodopsina es una cromoproteína que está ubicada en los rabadómeros, formada por una proteína y *retinal* (vitamina A₁). Tras la absorción de luz la rodopsina sufre una serie de transformaciones que conducen a la producción de *metarrodopsina*. La metarrodopsina activa una proteína G que desencadena una cascada de segundos mensajeros (que involucra fosfoinosítidos) que concluye en la despolarización de la membrana de las células retinulares (Suzuki 1999). Esto contrasta con lo que ocurre en los vertebrados, donde la absorción de luz en los conos y bastones conduce a la producción de GMP cíclico y a una *hiperpolarización* (Kandel et al. 1995). Las terminales de las células retinulares hacen sinapsis con interneuronas de la lámina. El neurotransmisor involucrado en estas sinapsis es la histamina, lo que resulta en una hiperpolarización de las células postsinápticas (Chapman 1998).

Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre en los vertebrados, la reconversión del fopigmento al estado activo (rodopsina) se produce por absorción de fotones y no por un mecanismo enzimático (Chapman 1998).

Adaptación del sistema visual

El término *adaptación*, en un sentido amplio, denota aquellos eventos que, a través de un cambio en la estructura, forma, función o comportamiento de los organismos, resultan en un mejor ajuste a las condiciones ambientales. Estos ajustes, además de darse en un sentido evolutivo, ocurren en organismos individuales. Los ritmos anuales de migración, diapausa, etc., son adaptaciones a las variaciones climáticas cíclicas, mientras que los ritmos diarios son ejemplos de fenómenos adaptativos que se dan en pocas horas. Pero las condiciones ambientales pueden cambiar en períodos aún más cortos, y en forma impredecible. Los órganos de los sentidos son capaces de *adaptarse* muy rápidamente a las condiciones cambiantes del ambiente (Autrum 1981).

Como hemos mencionado, casi todos los artrópodos viven en ambientes que experimentan grandes fluctuaciones en la intensidad de luz. Estas variaciones son producto de (1) las variaciones impredecibles del ambiente (nubes, sombras) y (2) la exposición al ciclo diario de luz-oscuridad. El sistema visual, sin embargo, se *adapta* a las condiciones luminosas ambientales. En los artrópodos, existen básicamente dos clases de mecanismos de adaptación (Autrum 1981, Chapman 1998):

1. *Regulación del flujo de luz que alcanza el rabdoma*: movimientos de pigmentos pantalla localizados en células pigmentarias y/o retinulares, cambios morfológicos en el aparato dióptrico, cambios en la estructura, posición y/o tamaño del rabdoma (estos fenómenos serán discutidos en detalle en el Capítulo 5)
2. *Cambios en la sensibilidad de las células fotorreceptoras*: transformaciones de los pigmentos visuales (adaptación fotoquímica) y cambios en la sensibilidad de las membranas (adaptación neural).

La sensibilidad visual también puede ser modulada mediante cambios en las sinapsis entre células retinulares e interneuronas en la lámina. Este mecanismo, si bien no está del todo comprendido, probablemente involucra una regulación de la cantidad de neurotransmisor liberado en las terminales sinápticas (Chapman 1998).

Sensibilidad espectral y visión de colores

"We receive electromagnetic waves of different frequencies but we perceive colors: red, green, orange, blue, yellow. We receive pressure waves but we heard words and music... Sensation is an abstraction, not a replication of the real world..." (Eric R. Kandel)

Los ojos de los insectos poseen células fotorreceptoras con diferente sensibilidad espectral. La luz natural estimularía, en principio, los fotorreceptores de los insectos en un intervalo de longitudes de onda entre 300 y 700 nm (Menzel y Backhaus 1991, Fig. 2.6.A). En términos de percepción humana, esto incluye longitudes de onda en la región del azul (400-500 nm), del verde (500-560 nm), del amarillo (560-590 nm), del naranja (590-630 nm), y del rojo (\approx 650 nm) (Fig. 2.5). Una gran diferencia entre los humanos y los insectos está dada por la sensibilidad a luz UV (300-400 nm) de estos últimos. Esta sensibilidad hace que los insectos experimenten un mundo visual sensiblemente distinto al de los humanos.

Las propiedades espectrales de los fotorreceptores han sido estudiadas en un número considerable de insectos (revisados por Menzel y Backhaus 1991), número que representa, sin embargo, una pequeña fracción de las especies conocidas. La mayoría de los insectos estudiados poseen tres pigmentos visuales localizados en sendos tipos de células retinulares, que presentan una absorción máxima en el ultravioleta (350 nm), el azul (440 nm) y el verde (530 nm) (Fig. 2.8). En algunos lepidópteros, odonatos y en ciertos himenópteros existe un pigmento adicional en la región del rojo (\approx 600 nm) (Arikawa 1999a), por lo que el intervalo de sensibilidad en estos insectos puede extenderse hasta 700 nm. La sensibilidad espectral de las células retinulares puede ser modificada por la presencia de córneas coloreadas, de filtros intrarrabdoméricos y laterales (Arikawa 1999a), o de pigmentos pantalla que presentan absorción diferencial (Chapman 1998).

Cada célula retinular contiene un único tipo de fotopigmento, si bien existen excepciones (e.g., *Papilio sp.*) (Arikawa 1999a). En *Musca sp.* existen pigmentos antena, que extienden la sensibilidad de los fotorreceptores hacia longitudes de onda a las cuales los fotopigmentos propiamente dichos no son sensibles (Kirschfeld y Franceschini 1977). En muchas especies existe polimorfismo omatidial: por ejemplo, las omatidias dorsales de los zánganos contienen una población de células retinulares sensibles al UV y otra al azul, mientras que en la zona ventral se encuentra una tercera población sensible al verde (Chapman 1998).

Las células fotorreceptoras no transmiten al sistema nervioso información acerca de la longitud de onda de la luz. La longitud de onda solo afecta la probabilidad de que un fotón sea capturado por un tipo particular de célula retinular, pero no afecta su respuesta eléctrica (Kandel et al. 1995). De acuerdo a la teoría tricromática del color de Young-Helmholtz propuesta para los seres humanos a principios del siglo XIX, para discriminar colores el sistema nervioso necesita, *en principio*, comparar las respuestas de tres tipos de fotorreceptores, cada uno máximamente sensible en una región diferente del espectro. Estas tres entradas aportan de este modo la información necesaria que hace posible la representación perceptual del tono, la saturación y el brillo de una luz. Estas tres cualidades son las que determinan, a través de un procesamiento neural, nuestra experiencia del color. Por ejemplo, nuestra sensación de “amarillo” resulta de la comparación que hace el sistema nervioso de las excitaciones simultáneas de los tres receptores (azul, rojo y verde). Sin embargo, es posible discriminar colores usando solo dos tipos de fotorreceptores, aunque por supuesto, esta visión dicromática sería más pobre y limitada, pero suficiente para distinguir, por ejemplo, estímulos de longitudes de onda corta de aquellos de longitudes de onda larga (Kandel et al. 1995).

Los experimentos de Karl von Frisch realizados a principios del siglo XX fueron los primeros en poner en evidencia que las abejas son capaces de *discriminar* colores. La visión de colores se define como la capacidad que permite a un animal detectar y reconocer objetos que difieren en su reflexión espectral o en sus propiedades de emisión de luz, independientemente de diferencias y/o variaciones en su intensidad lumínica (Menzel y Backhaus 1991). Posteriormente la visión de colores se ha demostrado en varias especies de insectos, algunas de las cuales presentan tres clases de fotorreceptores con distinta sensibilidad espectral, y constituyen buenos ejemplos de visión de colores tricromática, análoga a la que poseen los humanos y algunos primates.

Queda entonces claro que la mera existencia de fotorreceptores con distinta sensibilidad espectral no es un indicador de visión de colores; la demostración concluyente de que un animal “*percibe*” colores requiere un extenso y complejo análisis del comportamiento. Muchos insectos poseen varios tipos de fotorreceptores, pero no son capaces de discriminar colores. Sin embargo, estas distintas entradas espectrales pueden mediar comportamientos específicos, conocidos como *comportamientos dependientes de la longitud de onda*. Estos comportamientos son altamente dependientes de la intensidad, y por ello, se diferencian drásticamente de la visión de colores (Menzel 1979, Menzel y Backhaus

1991). Estos comportamientos han sido descritos incluso en insectos que, como las abejas, poseen la capacidad de discriminar colores. Por ejemplo, en las abejas los fotorreceptores verdes median, entre otras, la reacción optomotora, la estimación de distancias y alturas, y la detección de bordes (Lehrer 1994, Giurfa et al. 1996), mientras que los receptores ultravioletas median la sensibilidad a la luz polarizada de la bóveda celeste (Wehner y Rosset 1985). Estos ejemplos destacan la importancia de especificar, en cualquier estudio que realicemos acerca de la sensibilidad espectral un insecto, el contexto comportamental en el que tal sensibilidad es estudiada. Esto agrega una complicación adicional a la hora de poner a prueba si un insecto posee o no visión de colores, dado que debemos comenzar siempre estudiando aquellas respuestas en que tal información sea biológicamente relevante (e.g., colores de las flores en el caso de los polinizadores).

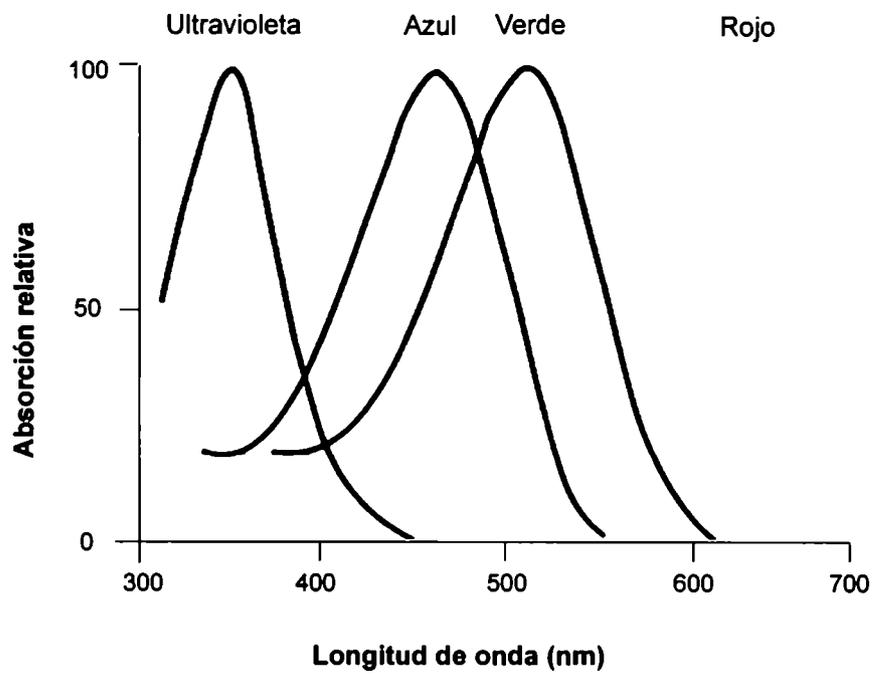


Figura 2.8: Espectro de absorción de los tres pigmentos visuales más comunes de los insectos. Cada uno de estos pigmentos presenta un pico de absorción en la región ultravioleta, azul y verde del espectro. (Tomado de Chapman 1998).

Otras funciones del sistema visual

El sistema visual de muchos insectos es sensible a la luz polarizada proveniente del cielo o reflejada por los cuerpos de agua. Por ejemplo, varios himenópteros de los géneros *Apis sp.* y *Cataglyphis sp.* infieren la posición del sol mediante la detección del plano de polarización de la luz, y utilizan esta información para *navegar*. Los ojos compuestos poseen regionalizaciones y modificaciones en la disposición de los rabdómeros que les permiten detectar tanto el patrón como el grado de polarización de la luz. Respecto a estos aspectos se pueden consultar las revisiones de Rossel (1989) y Eguchi (1999).

Los insectos son también capaces de detectar formas y movimiento, y de estimar distancias. En los ojos compuestos de muchos insectos se han descrito zonas de relativamente alta agudeza visual (fóveas) involucradas en la captura de presas y el seguimiento de la hembra (e.g., mántidos, alguaciles y simúlidos). Los insectos también son capaces de estimar distancias con muy buena precisión, mediante diversos mecanismos binoculares y monoculares. En cuanto a estos y otros aspectos relativos a la visión espacial de los insectos se pueden consultar las revisiones de Wehner (1981), Land (1989, 1997) y Schwind (1989).

Los ojos simples de los insectos

Ocelos

Además de los ojos compuestos, la mayoría de los insectos adultos poseen dos o tres ojos simples dorsales, los *ocelos*. Estos ojos están inervados por un neuropilo propio localizado en el protocerebro (Chapman 1998). Los ocelos están compuestos de una única lente cuticular (córnea) que proporciona a estas estructuras un gran campo visual. Debajo de la córnea se encuentra un número variable de células retinulares densamente empaquetadas (Fig. 2.9). El plano focal de los ocelos está ubicado por detrás de la retina, por lo que producen una imagen poco nítida. El axón de cada célula retinular se proyecta a través de la lámina basal hacia el plexo sináptico. A partir de este plexo se originan las interneuronas ocelares L (*large*) que se encuentran entre las más grandes del sistema nervioso de los insectos. Estas interneuronas generalmente terminan en el cerebro, aunque en las abejas, moscas y vinchucas algunas de estas fibras alcanzan los ganglios torácicos. Los ocelos de la mayoría de los insectos contienen otro grupo de

interneuronas de segundo orden más pequeñas S (*small*), que hacen sinapsis con otras regiones del cerebro tales como los lóbulos ópticos, los cuerpos pedunculados y el cuerpo central (Chapman 1998). Usualmente, un gran número de células retinulares converge en unas pocas interneuronas, lo que diluye la información espacial. Por otra parte, el gran diámetro de las interneuronas L proporciona una altísima velocidad de transmisión sináptica. Estas dos características, sumado al hecho de que producen una imagen desenfocada, apoyan la hipótesis de que los ocelos serían órganos visuales adaptados para concentrar luz y percibir cambios rápidos de intensidad (Chapman 1998). Es decir, si bien los ocelos tienen poca resolución espacial, serían superiores a los ojos compuestos con respecto a la sensibilidad y a la velocidad de transmisión sináptica.

La funcionalidad del sistema ocelar de los insectos será discutida en el Capítulo 6.

Stemmata

Los *Stemmata* son los únicos órganos visuales de las larvas de los insectos holometábolos. Estos ojos simples se encuentran en posición lateral a los lados de la cabeza en un número variable (en las larvas de Lepidoptera hay seis a cada lado), y están inervados por los lóbulos ópticos, por lo que son homólogos de los ojos compuestos. A diferencia de los ocelos, las lentes producen una imagen enfocada en la retina. Los *stemmata* pueden ser clasificados en dos grupos: (a) *tipo omatidia*, similar en su organización a la omatidia de un ojo compuesto (Fig. 2.10.A), y (b) *tipo lente*, de organización similar a los ocelos (Fig. 2.10.B). El primer tipo se encuentra en las larvas de Lepidoptera y Trichoptera, y consiste de unas pocas células retinulares ubicadas debajo de un cono y córnea pequeñas, por lo que tienen poca resolución espacial. Este tipo de *stemmata* estaría especializado en la percepción de colores. Las larvas de Himenoptera, Coleoptera y Neuroptera presentan *stemmata* tipo lente, constituidas por numerosas células retinulares situadas bajo el aparato dióptrico. Este tipo de *stemmata* estaría especializado en la detección de objetos móviles tales como presas y predadores (Ichikawa 1999).

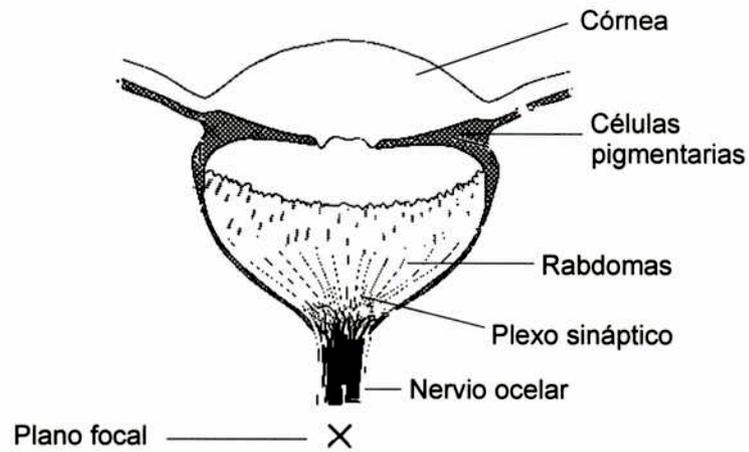


Figura 2.9: Sección diagramática longitudinal de un ocelo de saltamontes adaptado a la oscuridad (Tomado de Chapman 1998).

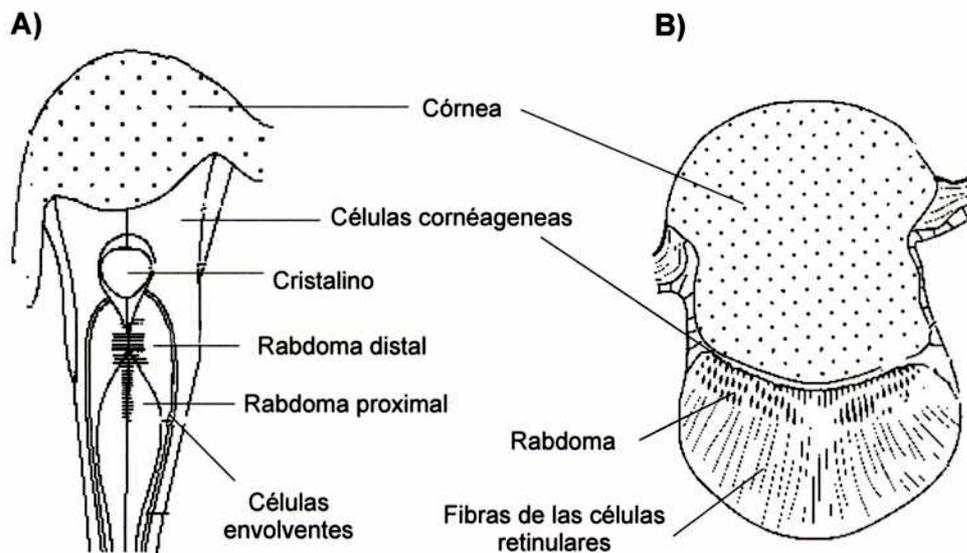


Figura 2.10: A) Sección longitudinal de un stemma con un solo rabdoma (larva de Lepidoptera); B) sección longitudinal de un stemma con múltiples rábdomas (larva de Coleoptera). (Tomado de Chapman 1998).

Receptores extraoculares

Se ha descrito la presencia de varios tipos de fotorreceptores extraoculares en los artrópodos, la mayoría relacionados con el sistema nervioso central: *fotorreceptores caudales* (crustáceos decápodos y en las mariposas del género *Papilio sp.*), *fotorreceptores neurales* relacionados con la sincronización de ritmos circadianos y respuestas fotoperiódicas, *fotorreceptores ventrales* (*Limulus sp.*). Finalmente, en *Papilio xuthus* y en otras mariposas se ha descrito la presencia de fotorreceptores extraoculares periféricos, localizados en la genitalia de ambos sexos (Arikawa 1999b).

Los órganos fotorreceptores de los triatominos

El sistema visual de *T. infestans* está compuesto por un par de ojos compuestos laterales, y dos ocelos ubicados por detrás de los ojos compuestos, mirado hacia el frente y dorsolateralmente (Fig. 2.11).

Ojos compuestos

Los ojos compuestos de *T. infestans* son esféricos y ocupan una extensa porción proximal de la cápsula cefálica tubular, especialmente en el adulto, en el que se extienden ventralmente dejando libre tan solo el espacio ocupado por el rostro (Fig. 2.11). Cada ojo compuesto presenta, en el primer estadio larval de esta especie, un número reducido de omatidias, cuyo tamaño y número se incrementa con el estadio, alcanzando el número máximo (300-400 omatidias) en el estado adulto. (Settembrini 1984). Este número es aún muy bajo, si lo comparamos con los varios miles de omatidias presentes en los ojos compuestos de *Apis sp.* o *Musca sp.* Como consecuencia del gran tamaño de los ojos y del número relativamente bajo de facetas, las lentes tienen una gran apertura, lo que incrementa la captura fotónica en ambientes pobremente iluminados.

Como ocurre en otros Hemiptera, los ojos compuestos de los triatominos son del tipo de aposición con rabdoma abierto, sin superposición neural (Nilsson 1989a). En *R. prolixus*, los rabdómeros correspondientes a las células retinulares R1-6 de cada omatidia forman un anillo que encierra a un rabdómero central doble

correspondiente a la séptima célula retinular (Fig. 2.12) (Müller 1970). En esta especie se encuentran pigmentos pantalla densamente empaquetados dentro de las células pigmentarias y dentro de las células retinulares. Los pigmentos localizados en el extremo distal de las células retinulares forman un anillo pigmentario ubicado por debajo del CC, dando lugar a un diafragma que, en el estado de adaptación a la luz, se cierra limitando el pasaje de luz a los fotorreceptores centrales. En el ojo adaptado a la oscuridad, los pigmentos se retraen y permiten que la luz alcance los rabadómeros del anillo periférico (Müller 1970), lo que aumentaría la sensibilidad.

Müller (1970) describió en *R. prolixus* la presencia de unas estructuras esféricas peculiares, no descritas en ningún otro insecto, a las que llamó "esferoides". Estas estructuras están localizadas en el interior de las células fotorreceptoras, en proximidad del núcleo, no poseen membranas que las rodeen, y están llenas de un material electrodenso. Los esferoides duplican su diámetro en el curso de la adaptación a la oscuridad, alcanzando su tamaño máximo (10 μm) luego de una hora, al cabo de la cual, aún en oscuridad, reducen su diámetro al valor inicial de 5 μm (Müller 1970). Los esferoides también han sido descrito en las células retinulares del ocelo de *T. infestans* (Insausti 1997). La función de estas estructuras no ha sido dilucidada hasta el momento.

Ocelos

Los insectos triatominos poseen dos ocelos bien desarrollados, localizados en una posición poco común. Están ubicados detrás de los ojos compuestos, sobre sendos promontorios cuticulares, mirando en dirección dorsolateral y frontal (Fig. 2.11.C-D). En comparación con el de otros insectos, el sistema ocelar de *T. infestans* posee un inusual grado de complejidad, tal como lo muestran varios estudios recientes realizados en nuestro laboratorio. En los ocelos de los adultos recién emergidos se puede reconocer una "pupila con forma de medialuna" que no cambia de tamaño con las condiciones de iluminación, pero sí con el desarrollo, hasta alcanzar el tamaño definitivo al cabo de 18 días (Insausti y Lazzari 2000). Los ocelos de *T. infestans*, como los de todos los insectos, están desenfocados. Los fotorreceptores forman una extensa malla de rabadoma: todas las caras laterales están modificadas en microvellosidades que se interdigitan con las de las células vecinas. Esto sugiere, en principio, que los ocelos de *T. infestans* serían muy sensibles a la luz. En esta especie el ocelo posee pigmentos pantalla dentro de las

células fotorreceptoras, de las células gliales y de células pigmentarias. Los primeros se hallan concentrados alrededor del rabadoma en el ojo adaptado a la luz y se retiran a la porción proximal en condiciones de oscuridad (Insausti 1997).

Las conexiones ocelares de *T. infestans* con otros centros nerviosos y motores están altamente desarrolladas. Las interneuronas de los nervios ocelares se proyectan hacia el interior del cerebro como un tracto bilateral simétrico, a través de la superficie dorsal del protocerebro. Los axones corren entre los cálices de los cuerpos pedunculados, en posición dorsal al cuerpo central. Finalmente alcanzan distintas regiones del cerebro y de los ganglios subesofágico y torácico. Las interneuronas descendentes de primer orden se proyectan en forma contralateral al lóbulo posterior del protocerebro, al deutocerebro y a centros subesofágicos, pro-, meso- y metatorácicos (Insausti y Lazzari 1996).

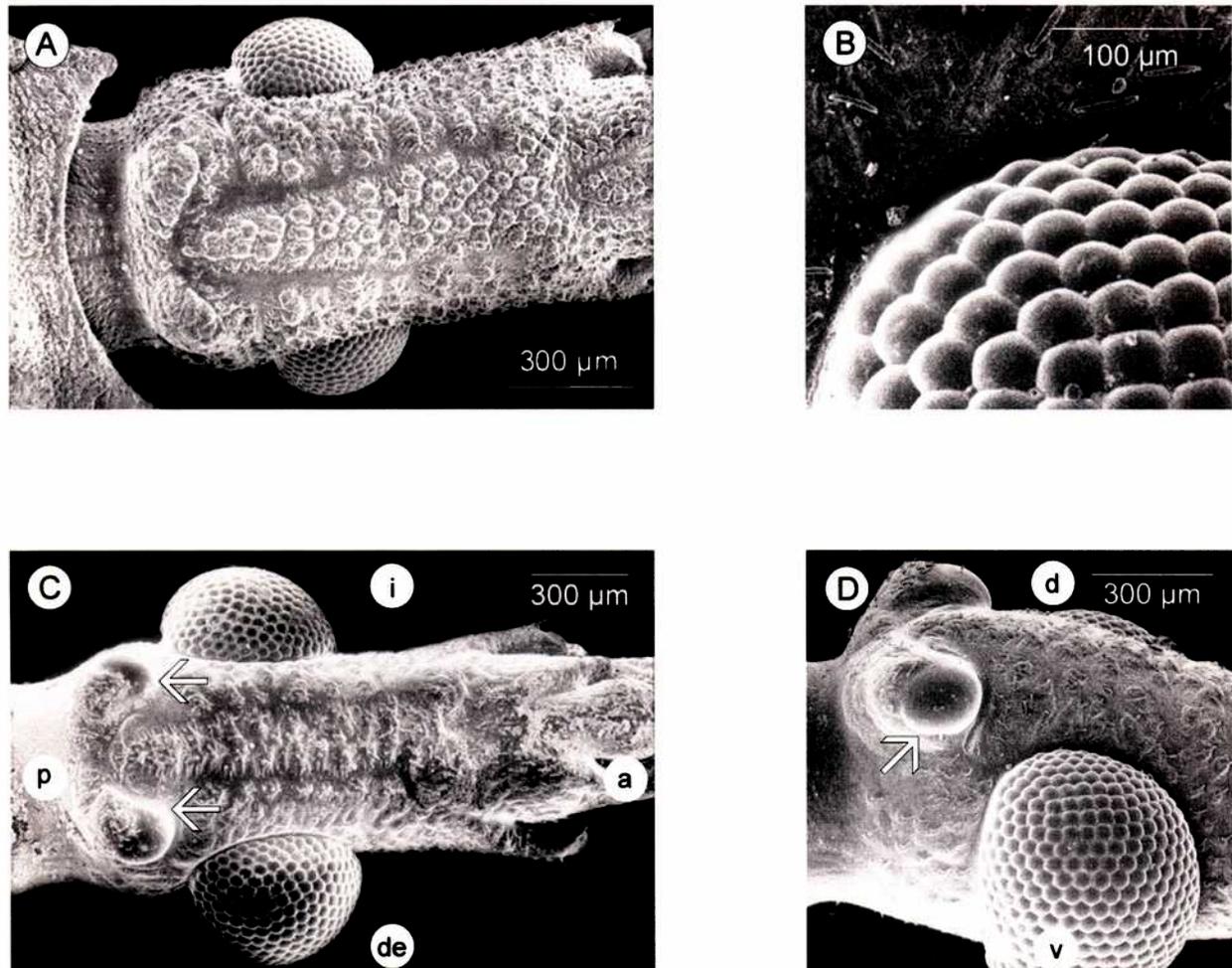


Figura 2.11: Fotografías (SEM) de la cabeza y los órganos visuales de *Triatoma infestans*. A) Vista superior de la cabeza de una larva de 5to. estadio, mostrando la disposición de los ojos compuestos; notar los promontorios cuticulares en la zona que ocuparán los ocelos en el estadio adulto. B) Detalle de las ommatidas. C) Vista superior de la cabeza de un individuo adulto mostrando la disposición de los ojos compuestos y de los ocelos (flecha). D) Vista lateral de la cabeza de un adulto mostrando el ocelo derecho (flecha). a: anterior; d: dorsal; de: derecha; i: izquierda; p: posterior; v: ventral. (Fotografías de *T. Insausti*)

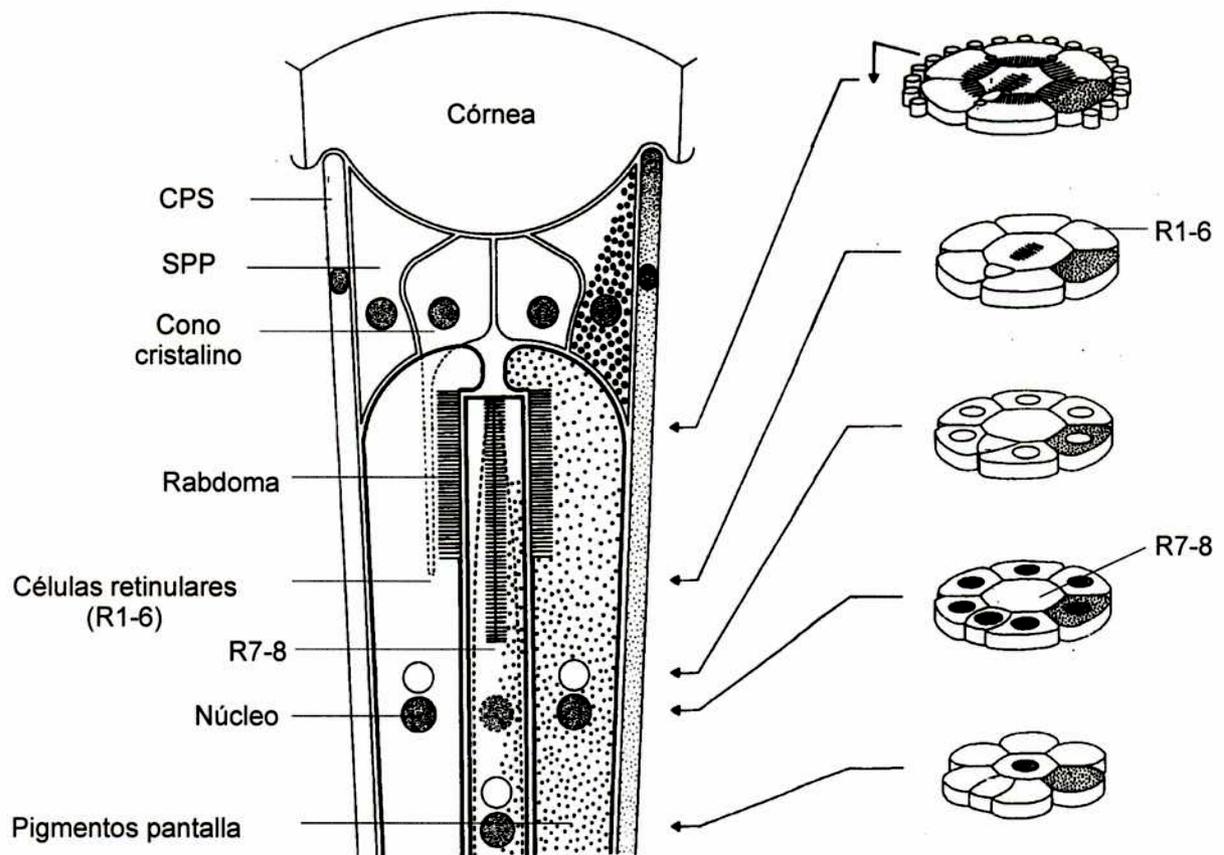


Figura 2.12: esquema de una ommatidia de *Rhodnius prolixus*. Se representan las mitades derecha e izquierda adaptadas a la oscuridad y a la luz, respectivamente (Tomado de Müller, 1970)

CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA RESPUESTA FOTONEGATIVA.

Introducción

La *fototaxis* es una reacción comportamental en la cual los animales se orientan hacia (*fototaxis positiva*) o contra (*fototaxis negativa*) una fuente de luz (Kühn 1929, Fraenkel y Gunn 1961). Es una reacción conspicua e importante, presente en muchos organismos y es, además, una buena medida de las capacidades visuales, particularmente en insectos, donde este comportamiento estereotipado es fácilmente evocable y relativamente estable (Menzel y Greggers 1985). La *fototaxis negativa* les permite a los animales evitar la exposición a predadores y encontrar refugios (Wiesinger 1956, Bikurow 1960, Fraenkel y Gunn 1961). La *fototaxis positiva*, por su parte, media la respuesta de vuelo en muchos insectos (Wehner 1981).

Como hemos mencionado en el Capítulo 1, el comportamiento de escape a la luz es una de las respuestas visuales más conspicuas y estereotipadas de los triatomíneos. Ward y Fynlayson (1982) estudiaron la respuesta a la luz de vinchucas suspendidas en experimentos de *lazo abierto* u *“open loop”* (esto es, el experimentador manipula el estímulo de modo tal que la respuesta del individuo no modifica ni la intensidad ni la dirección del estímulo, es decir, se mide la tendencia del animal a responder al estímulo). Estos autores utilizaron un procedimiento complejo, que podría interferir con la actividad normal de los insectos. Dado que se ha demostrado que el signo de la reacción fototáctica puede variar con el estado motivacional del insecto, se hace necesario entonces realizar estudios en los que se evite esta clase de interferencias (Menzel y Greggers 1985).

El primer objetivo de esta tesis fue entonces diseñar un bioensayo de comportamiento sencillo y fácilmente reproducible, que permita realizar un análisis cuantitativo de la respuesta fototáctica negativa de *T. infestans*, y que no interfiera con la actividad locomotora de los insectos. Una vez estandarizado, este bioensayo se utilizó como paradigma experimental para estudiar distintos atributos del sistema visual. Dado que una gran cantidad de respuestas comportamentales están organizadas en ventanas temporales en *Triatominae* (ver Capítulo 1), resulta relevante estudiar si esto también se repite para el comportamiento de escape a la

luz de *T. infestans*. Es probable que este comportamiento pueda ser evocado en cualquier momento del día, pero en particular podría ocurrir que la sensibilidad frente a distintas intensidades de luz, que de alguna manera es una medida de la sensibilidad visual, sea mayor durante la noche, que es el período en el que estos insectos presentan mayor actividad. En este Capítulo se estudiará entonces la sensibilidad fótica (esto es, la dependencia de la respuesta con la intensidad de estímulo), y la variación de la respuesta con el momento del día.

Materiales y métodos

Animales

Se usaron larvas de cuarto estadio de *T. infestans*, criadas en nuestro laboratorio a 28°C. Los insectos fueron alimentados semanalmente desde la eclosión del huevo con sangre bovina heparinizada usando un alimentador artificial (Núñez y Lazzari 1990). Las vinchucas a utilizar presentaban un ayuno de aproximadamente 20 días con posterioridad a la última ecdisis.

Diseño experimental

Los experimentos fueron realizados en una arena rectangular de vidrio (largo: 25 cm; ancho: 5,5 cm; alto: 2,2 cm) que contenía una lámina de papel de filtro a como sustrato. Para estudiar la respuesta fotonegativa se buscó generar una situación experimental en la cual los insectos estuvieran confrontados a un contraste de intensidad luminosa. Para ello, se cubrió la arena con una pieza rectangular de vidrio, una de cuyas mitades fue a su vez cubierta por su lado externo con una cartulina negra. De este modo, la arena presentaba una zona oscura, y otra zona iluminada, tal como se muestra en la Figura 3.1. La hipótesis de trabajo era que las vinchucas, dado su comportamiento fotonegativo, iban a preferir permanecer en la zona oscura, evitando la zona iluminada. La cubierta de vidrio, por su parte, evitaba eventuales interferencias con el experimentador o el ambiente (e.g., olores, corrientes de aire). La arena estaba iluminada con una fuente halógena de luz blanca (OSRAM 41860 WF, 12V/ 20W).

La lámpara se situaba dentro de un cilindro de aluminio (diámetro: 8 cm; alto: 17 cm) que se apoyaba sobre un vidrio difusor, a 60 cm de altura la arena (Fig. 3.1). El cilindro de aluminio dirigía la luz directamente sobre la arena, y evitaba su dispersión en otras direcciones. Este dispositivo permitía la colocación de diversos filtros entre la fuente de luz y la arena. El sistema de iluminación se colocaba sobre el extremo derecho o izquierdo de la arena para acentuar las diferencias entre las mitades oscura e iluminada de la arena experimental.

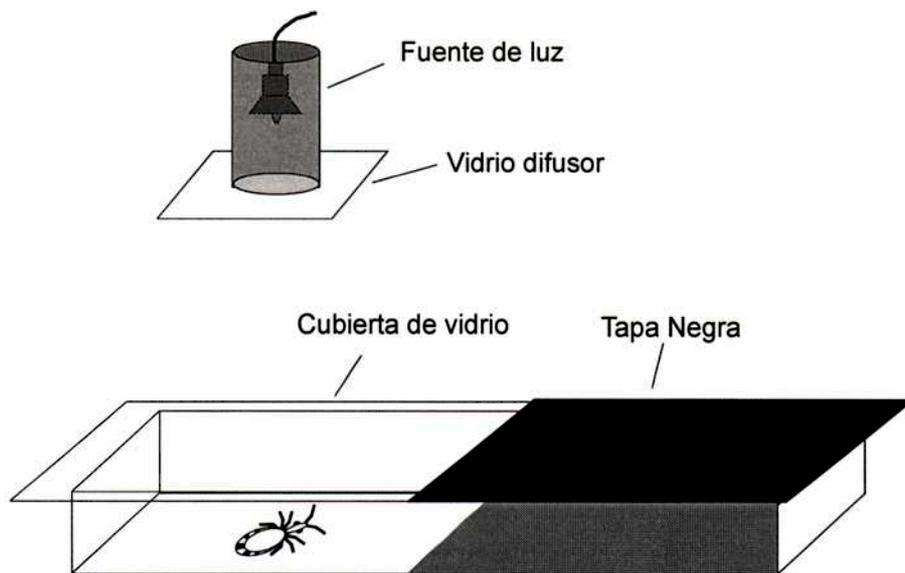


Figura 3.1: Arena experimental usada para ensayar la respuesta fototáctica negativa de *Triatoma infestans*

Procedimiento

En cada ensayo se liberó una vinchuca en un extremo de la arena (*i.e.*, izquierda o derecha). Para ello, cada insecto fue primero colocado en un pequeño recipiente cilíndrico negro que se invertía sobre la arena. Al cabo de 40 segundos se liberaba cuidadosamente al insecto, a la vez que se corría la tapa de vidrio, de modo de cubrir la arena totalmente. Cada ensayo duraba cinco minutos, y se registraba, con ayuda de un cronómetro, los tiempos a los que el insecto cruzaba la línea media de la arena. Con estos tiempos se pudo calcular, para cada vinchuca, tres parámetros comportamentales como medida de la respuesta fotonegativa:

1. *Tiempo de permanencia en la oscuridad*: tiempo total (medido en segundos) que el insecto permaneció en la mitad oscura de la arena durante el ensayo. Este parámetro se calcula simplemente sumando los intervalos de tiempo en los que el insecto estaba en la zona oscura. Para la representación gráfica, este parámetro se expresó como porcentaje del tiempo total pasado en la arena en ambas zonas - oscura e iluminada- (cinco minutos). En los ensayos control, donde las condiciones de iluminación fueron homogéneas (ver más abajo), el tiempo de permanencia se expresó de acuerdo al lado en el cual el insecto fue liberado (derecha o izquierda).
2. *Latencia en cambiar de lado* (segundos): es el tiempo que cada insecto tardó en alcanzar el lado de la arena opuesto al cual era liberado. Si las vinchucas fueron liberadas en el lado oscuro, se midió la "*latencia en pasar a la zona iluminada*". Si en cambio fueron liberadas en la zona iluminada, se midió la "*latencia en pasar a la zona oscura*". Si el insecto permaneció durante todo el ensayo en el lado de la arena en el que fue liberado, se le adjudicó un valor de latencia de 5 minutos.
3. *Número de pasajes entre áreas*: es el número de veces que cada insecto cruzó la línea media de la arena. Este parámetro constituye una medida de la actividad del insecto.

Estímulos

En la zona iluminada de la arena se presentó a los insectos distintas intensidades de luz blanca. Las mismas fueron generadas con filtros neutros, utilizados en forma individual o en distintas combinaciones (Melles Griot: 03 FNQ 089: 39.81 % de transmitancia; 03 FNQ 047: 25.12 %; 03 FNQ 049: 19.95 % y 03

FNQ 057: 10 %). De este modo, luego de atravesar los vidrios difusores y la tapa de vidrio de la arena, distintas intensidades de luz alcanzaban a los insectos en la zona iluminada: 0.05, 0.18, 0.75, 7.96 y 115 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. La intensidad fue medida con un fotómetro calibrado con una fuente estandarizada de luz (Graseby Optronics, System S351) y con un radiómetro (SEL 033 sensor module, IL 1400 radiometer, International Light, Newburyport, Mass, USA).

El cuarto donde se realizaban los experimentos permaneció siempre en total oscuridad, a excepción del área experimental según correspondiera.

La composición espectral de la fuente de luz se muestra en la Figura 3.2. La misma fue medida con un fotómetro (SR01, Gröbel UV-Elektronik, resolución 1 nm) y fue usada, junto con la curva fotópica CIE y con las lecturas del fotómetro, para calcular el número de fotones/ $\text{cm}^2\cdot\text{s}$. Este cálculo fue realizado a fin de poder comparar los datos de sensibilidad con otros citados en bibliografía, pero en los que se utilizan distintas unidades. En la Tabla 3.1 se muestra la intensidad, en unidades de radiación, luz y cantidad de fotones de los distintos estímulos usados en los experimentos con luz blanca. En la tabla se presenta el valor de intensidad en el extremo iluminado de la arena (es decir, el valor máximo).

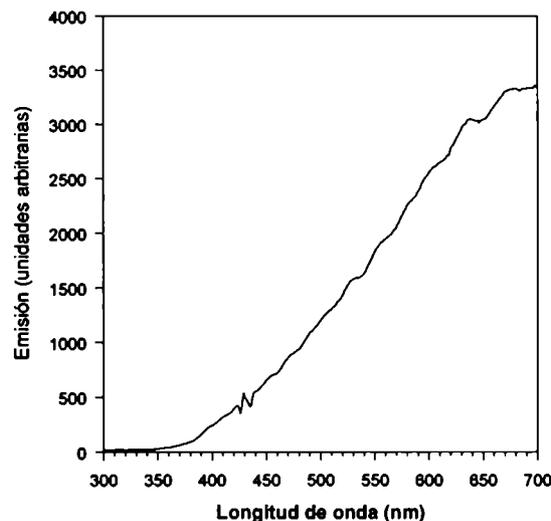


Figura 3.2: espectro de emisión de la fuente de luz blanca OSRAM 41860 WF, 12V/ 20W

| $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (medido) | lux (medido) | Fotones/ cm^2 .seg (calculado) |
|------------------------------------|--------------|---|
| 0.05 | 0.05 | $4.513 \times e^{10}$ |
| 0.182 | 0.275 | $3.103 \times e^{11}$ |
| 0.752 | 1.1 | $1.241 \times e^{12}$ |
| 7.96 | 11.8 | $1.264 \times e^{13}$ |
| 115 | 179.5 | $2.025 \times e^{14}$ |

Tabla 3.I: intensidad de luz (máxima) utilizada en los experimentos con luz blanca. Se incluye la medida en lux dado que esta unidad es usualmente utilizada para medir intensidades de luz blanca, es decir, aquella porción del espectro a la cual el sistema visual humano es sensible.

En los casos en que la intensidad de luz fue muy baja como para poder observar a los insectos, o cuando los experimentos fueron realizados en oscuridad completa, la respuesta de las vinchucas fue monitoreada con una cámara CCD sensible a radiación infrarroja (CCD Kamera-modul s/w; Conrad Electronic, Alemania) conectada a un monitor de TV, el cual estaba fuera del cuarto experimental. La cámara tiene su propia fuente de iluminación IR ($\lambda > 800$ nm).

Todos los experimentos fueron realizados a una temperatura ambiente de aproximadamente 25°C. Cada insecto fue usado en un solo ensayo. Las asimetrías espaciales fueron evitadas o controladas intercambiando las áreas (oscura e iluminada, o izquierda y derecha dependiendo del experimento) entre ensayos.

Caracterización de la respuesta fototáctica

Se realizó este experimento a fin de caracterizar parámetros relevantes que nos permitan medir la respuesta de las vinchucas frente a diferentes niveles de iluminación. Previo a los experimentos, los insectos fueron mantenidos con un régimen determinado por la actividad del insectario, y en condiciones más o menos constantes de oscuridad. Los experimentos fueron realizados durante las horas del día, entre las 10 y las 17 hs.

Series experimentales

Dado que en principio los insectos podían liberarse en cualquiera de los extremos de la arena (i.e., el iluminado u oscuro), se realizaron dos series experimentales a fin de determinar si existía alguna variación al respecto:

1. Los insectos fueron liberados en el extremo oscuro de la arena (N=30, k=3);
2. Los insectos fueron liberados en el extremo iluminado de la arena (N=30, k=3).

En cada serie se ensayaron tres intensidades distintas de luz: 0.75, 7.96 y 115 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Cabe mencionar que las intensidades de luz que se ofrecieron a las vinchucas debían ser suficientemente altas como para evocar un comportamiento de escape, pero no tanto como para saturar la respuesta de los fotorreceptores. La única referencia con la que contábamos para seleccionar las intensidades a ensayar eran los resultados de Ward y Finlayson (1982), pero dado que las condiciones experimentales usadas por estos autores eran muy diferentes, resultó muy difícil realizar comparaciones.

Series control

Se realizaron tres series control:

1. *Control en oscuridad completa*: cada insecto fue liberado en el lado derecho ó izquierdo de una arena completamente oscura (0.000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$; n=20), es decir, sin fuente de luz. En esta serie la cubierta de vidrio con la mitad oscura fue remplazada por una tapa de vidrio totalmente transparente.
2. *Control en iluminación completa*: cada insecto fue liberado en el lado derecho ó izquierdo de una arena homogéneamente iluminada con 115 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (n=15). En este caso la fuente de luz fue colocada sobre el centro en la arena. Esta condición generaba la situación buscada (pasajes entre una y otra mitad de la arena), dado que las vinchucas exploraban la arena buscando las esquinas y bordes.
3. *Control IR*: se controló específicamente si la emisión IR de la cámara usada para monitorear los insectos podía actuar como una clave de orientación (n=10). En esta serie, la mitad de la arena fue cubierta con la tapa negra, y la mitad restante quedó expuesta solamente a la emisión IR de la cámara CCD.

Sensibilidad fótica y variación diaria de la respuesta fototáctica.

Estos experimentos fueron realizados a fin de estudiar si la respuesta de las vinchucas a la luz cambia con el momento del día, es decir, para determinar si existe un ritmo diario de sensibilidad fototáctica. Para ello los insectos fueron mantenidos en un ciclo discreto de 12 hs luz:12 hs oscuridad (LD *–light-darkness–*, 200:0.00 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) a temperatura constante (25°C) durante cinco días. Durante la fase de entrenamiento se usó como fuente de luz una lámpara fluorescente (OSRAM Dulux EL E27, 7W/41-827). Este entrenamiento permitió sincronizar a los insectos con el ciclo ambiental impuesto, y por lo tanto nos permitió establecer con precisión el momento del día en el que los ensayos debían ser realizados. En el sexto día de entrenamiento se realizaron dos series experimentales:

1. los experimentos fueron realizados entre la cuarta y la octava hora de la *fotofase* (N=50, k=5).
2. los experimentos fueron hechos entre la primera y la tercera hora de la *escotofase* (N=50, k=5).

Estos dos momentos del día son aquellos en los que *T. infestans* exhibe actividad mínima (serie 1) y máxima (serie 2) respectivamente (Lazzari 1992).

En ambas series los insectos fueron liberados en el extremo oscuro de la arena y se calcularon los tres parámetros comportamentales ya mencionados (*tiempo de permanencia en la oscuridad, latencia en pasar a la zona iluminada y número de pasajes entre áreas*). Se utilizaron cinco intensidades de luz: 0.05, 0.18, 0.75, 7.96 y 115 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (n=10 para cada intensidad y momento del día). Para cada una de las dos series experimentales (*fotofase* y *escotofase*) se realizaron 10 ensayos control en una arena completamente oscura (0.00 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$).

Análisis estadístico

Se pusieron a prueba los supuestos correspondientes a cada tipo de análisis estadístico. La normalidad de los datos (eventualmente de sus residuos) fue estudiada mediante la modificación de Lilliefors de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La homogeneidad de varianzas entre grupos fue analizada mediante la prueba de Bartlett (Zar 1984). Cuando las varianzas entre grupos no fueron homogéneas, o cuando la distribución de los datos (o sus residuos) se apartaba de la normalidad, se hicieron transformaciones logarítmicas o recíprocas de los datos,

según correspondiera en cada caso particular. La normalidad y homocedacia de los datos transformados fueron puestas a prueba mediante los respectivos análisis ya mencionados.

En los experimentos control, a fin de controlar asimetrías espaciales, se puso a prueba la hipótesis de distribución al azar del *tiempo de permanencia* entre los lados derecho e izquierdo de la arena (i.e., 50% del tiempo en cada uno de los lados). Para ello se usó la hipótesis de la *media esperada* de dos colas (Prueba de *Student*, Zar 1984). A fin de evaluar si existieron diferencias entre las tres series control, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de un factor, para cada uno de los tres parámetros comportamentales medidos.

Para cada parámetro comportamental se analizó la variación de la respuesta con la intensidad de luz y el momento del día mediante un análisis de ANOVA de dos factores. Se realizaron las pruebas de Dunnett (a fin de comparar cada grupo experimental con su control correspondiente) y de Tukey (para estudiar la significación estadística de las diferencias entre las medias experimentales) (Zar 1984). Se realizaron pruebas de una sola cola porque se esperaban diferencias estadísticas en una sola dirección, dado que las vinchucas no exhiben un comportamiento fotopositivo ($\mu_{\text{control}} < \mu_{\text{experimental}}$) (Zar 1984).

En el caso que la interacción entre factores fue significativa en los ANOVA de dos factores se realizaron las pruebas de Efectos Simples, a fin de analizar los efectos de los factores principales (Steel et al. 1997). En estas pruebas se fija un nivel de uno de los factores y se realiza un ANOVA tomando todos los niveles del otro factor. Supongamos un ANOVA de dos factores (A y B) con niveles $a=3$ y $b=2$ para cada factor. Por ejemplo, para comparar el efecto del factor B para un nivel del factor A, se realiza un ANOVA tomando solamente los datos de, por ejemplo, a_1 , otro ANOVA con los datos de a_2 , etc. Del mismo modo se procede en el otro sentido (se compara el efecto del factor A para cada uno de los niveles del factor B). En las pruebas de efectos simples, así como en todas las comparaciones que se realicen, se utiliza como estimador del error el cuadrado medio del error del ANOVA de dos factores con sus respectivos grados de libertad.

Resultados

Caracterización de la respuesta fototáctica

En la Figura 3.3 se muestra la dependencia de los tres parámetros comportamentales medidos -tiempo de permanencia, latencia y número de pasajes entre áreas- con la intensidad de luz, para los animales liberados tanto en la zona oscura (serie 1), como en la zona iluminada (serie 2) de la arena. Los resultados de las series control en la arena completamente oscura ($0.00 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, cuadrados negros), en la arena homogéneamente iluminada ($115 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, cuadrados vacíos), y en la arena con una mitad iluminada solamente por la radiación IR proveniente de la cámara CCD (triángulos vacíos) se muestra también en dicha figura. No se encontraron asimetrías espaciales entre las áreas derecha e izquierda en ninguno de los parámetros medidos ($p > 0.05$ en todos los casos). Esto es, los valores de tiempo permanencia, latencia en pasar al lado opuesto al que el insecto es liberado, y el número de pasajes entre áreas, no dependieron del sitio de liberación del insecto. Por lo tanto, los datos experimentales de los insectos liberados en los extremos derecho e izquierdo de la arena pudieron ser agrupados.

El tiempo de permanencia en el lado derecho ó izquierdo de la arena no mostró diferencias estadísticas entre las tres series control (Fig. 3.3.A; ANOVA: $F=0.69$; $gl:2,44$; NS), y no fue diferente de la distribución esperada por azar (esto es, 50% del tiempo en cada lado de la arena; prueba de *Student* de dos colas: $p > 0.05$). Del mismo modo, la latencia para alcanzar el lado de la arena opuesto a aquel en el cual los insectos fueron liberados no difirió estadísticamente entre las series control (Fig. 3.3.B; ANOVA: $F=2.65$; $gl:2,44$; NS). Por lo tanto, estos resultados demuestran que en los experimentos control el comportamiento exploratorio inicial de los insectos fue independiente de las condiciones de iluminación en la arena (arena completamente oscura, completamente iluminada, o con una mitad iluminada con IR). Finalmente, tampoco se encontraron diferencias significativas en el número de pasajes entre áreas entre las tres series control (Fig. 3.3.C; ANOVA: $F=0.69$; $gl:2,44$; NS). En estas condiciones de iluminación homogéneas, los insectos cruzaron la arena de un lado al otro aproximadamente 10 veces. Por lo tanto, teniendo en cuenta los tres parámetros comportamentales medidos, los resultados de las series control indican que las condiciones de iluminación uniformes en la arena no afectaron significativamente el nivel general de actividad. Es decir, no se observó un comportamiento *fotokinético* (esto es, actividad modulada por la intensidad de luz).

Además, la emisión IR de la cámara no modificó la respuesta de los insectos respecto de la respuesta de los otros dos grupos control. Es altamente probable que estas longitudes de onda sean invisibles para los insectos.

Los resultados de las series experimentales (i.e., con la mitad de la arena oscura y con la otra mitad iluminada) muestran que la intensidad de luz afectó significativamente los tres parámetros comportamentales medidos (Fig. 3.3, curvas; Tabla 3.II). Ni las condiciones de iluminación en el sitio de liberación (luz u oscuridad), ni la interacción entre este factor y la intensidad de luz afectaron significativamente la respuesta de escape (excepto para los datos de latencia, Tabla 3.II). El aumento de la intensidad de luz en el lado iluminado de la arena produjo un incremento en el tiempo de permanencia en la oscuridad y en la latencia en cruzar al lado opuesto. Asimismo, se observó una disminución del número de pasajes entre áreas.

De los tres parámetros comportamentales medidos, el tiempo de permanencia en la oscuridad mostró la una mayor variación con la intensidad de luz (Fig. 3.3.A). La respuesta de ambos grupos experimentales (i.e., insectos liberados en el extremo iluminado u oscuro de la arena) a las tres intensidades de luz difirió significativamente de la respuesta de los grupos control (pruebas de Dunnett, $p < 0.05$). Es decir, todas las intensidades de luz ensayadas evocaron una respuesta fotonegativa en las vinchucas. La Figura 3.3.A muestra que cuando la intensidad de luz aumentó, los insectos permanecieron más tiempo en la oscuridad. La variación de la respuesta con los incrementos de intensidad de luz fue mayor cuando los insectos fueron liberados en la zona oscura de la arena que cuando fueron liberados en la zona iluminada (pruebas de Tukey, ver Fig. 3.3.A). En otras palabras, los insectos liberados en la zona oscura mostraron una tendencia a pasar más tiempo en la oscuridad que aquellos liberados en el extremo iluminado, si bien estos últimos también buscaron activamente la oscuridad.

La latencia en pasar al otro lado fue el único parámetro para el que se observó una interacción significativa entre los dos factores, esto es, la intensidad de luz y el sitio de liberación (oscuro o iluminado, Tabla 3.II). Esto puede verse claramente en la Figura 3.3.B: mientras que la latencia en pasar al lado oscuro (insectos liberados en el lado iluminado, círculos vacíos) no difirió significativamente de la latencia del grupo control (prueba de Dunnet, $p > 0.05$ en todos los casos), la latencia en pasar al lado iluminado (insectos liberados en la zona oscura de la arena, círculos negros) fue mayor que la del control para todas las intensidades de luz ($p < 0.05$ en todos los casos). Esto indica que, con la mitad de la arena iluminada, el

comportamiento inicial exploratorio de los insectos que fueron liberados en la oscuridad fue inhibido por altas intensidades de luz. En la serie experimental en la que se liberaron los insectos en la oscuridad, la respuesta de evitación de la luz alcanzó una meseta a $7.96 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (no se encontraron diferencias entre la respuesta a esta intensidad y a $115 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). Podemos concluir entonces que la dependencia de la latencia con la intensidad de luz (Tabla 3.II) es básicamente consecuencia de la respuesta del grupo liberado en la zona oscura de la arena.

El número de pasajes entre áreas disminuyó con el aumento de la intensidad de luz (Fig. 3.3.C). Durante los ensayos, se pudo observar que los insectos que estaban en la zona oscura se acercaban a la frontera oscuridad-luz, caminaban cerca de ella, pero no cruzaban hacia la zona iluminada. Este resultado, que concuerda con los observados en las Figuras 3.3.A, B, muestra que los insectos evitan explorar zonas iluminadas (en el caso del número de pasajes, por encima de $7.96 \mu\text{W}/\text{cm}^2$).

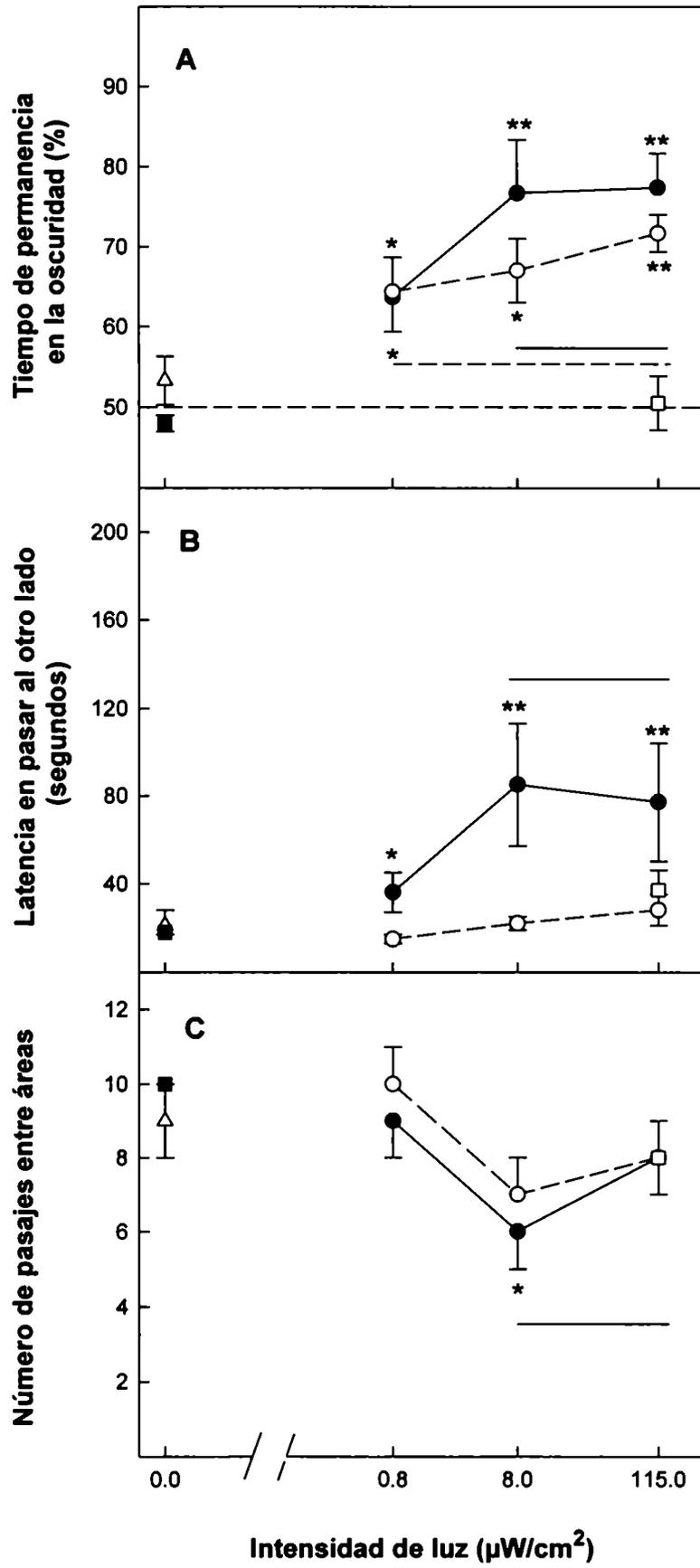
Resumiendo, este primer experimento permitió establecer las condiciones experimentales y estandarizar un bioensayo para estudiar la respuesta de escape a la luz de las vinchucas. Los resultados muestran que las vinchucas exhiben un comportamiento fotonegativo cuya intensidad aumenta con la intensidad de luz. Además este comportamiento es de algún modo modificado por las condiciones de iluminación al comienzo del experimento (esto es, por la iluminación de la zona de la arena en la cual el insecto era liberado; Tabla 3.II y Fig. 3.3.B). Aunque intuitivamente el tiempo de permanencia en la oscuridad parece ser el parámetro más sensible para establecer niveles de respuesta, la latencia en cruzar de un lado a otro de la arena, así como el número de pasajes entre áreas, aportan información que refuerza la conclusión mencionada más arriba. Estos dos criterios proveen, además, una medida de la actividad locomotora general del animal, y particularmente de su respuesta *fototáctica direccional*.

Cuando los insectos fueron liberados en la zona iluminada de la arena (Fig. 3.3, círculos vacíos), no se observaron variaciones de la respuesta con la intensidad de luz (Fig. 3.3.B), o bien las mismas fueron atenuadas (Fig. 3.3.A). Por lo tanto, en los experimentos que se presentan en las secciones y capítulos subsiguientes las vinchucas fueron liberadas en todos los casos en la zona oscura de la arena.

| Parámetro | Intensidad de luz <i>gl</i> = 3, 72 | Sitio de liberación <i>gl</i> = 1, 72 | Interacción <i>gl</i> = 3, 72 |
|-----------------------|---|---|---|
| Tiempo de permanencia | F=14.36; p<0.0001 | F=0.16; n.s. | F=0.54; n.s. |
| Latencia | F=13.08; p<0.0001 | F=1.08; n.s. | F=3.41; p<0.05 |
| Número de pasajes | F=4.41; p<0.01 | F=0.41; n.s. | F=0.20; n.s. |

Tabla 3.II: Resultados del análisis estadístico de los datos del primer experimento. Se realizó un ANOVA de dos factores para cada parámetro medido (filas). Factores: *intensidad de luz* (2da. columna, cuatro niveles: 0.00, 0.75, 7.96 y 115 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) y *sitio de liberación* (3era. columna, dos niveles: liberados en la zona oscura o en la zona iluminada de la arena). Cuarta columna: interacción entre factores. *gl*: grados de libertad; n.s.: diferencias no significativas entre grupos ($p>0.05$).

Figura 3.3: Respuesta fototáctica de *T. infestans* (ordenada, media \pm e.s.) y su dependencia con la intensidad de luz (abscisa, unidades logarítmicas, intensidades: 0.75, 7.96 y 115 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$). Los insectos fueron liberados en el extremo oscuro (*círculos negros*) o iluminado (*círculos vacíos*) ($n=10$ en cada punto). *Cuadrados negros*: control de oscuridad completa ($n=20$); *cuadrados vacíos*: control en iluminación completa ($n=15$); *triángulos*: control IR ($n=10$). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos experimentales y el control en oscuridad completa (Pruebas de Dunnett; *: $p<0,05$; **: $p<0,01$). Las líneas horizontales conectan puntos que no difieren estadísticamente a un nivel del 5% (pruebas de Tukey). **A)** Tiempo de permanencia en la zona oscura de la arena. La línea horizontal punteada a 50% representa el tiempo de permanencia esperado por azar. **B)** Latencia en pasar al lado de la arena opuesto a aquel en el cual el insecto fue liberado. **C)** Número de pasajes entre áreas.



Sensibilidad fótica y variación diaria de la respuesta fototáctica.

Este experimento fue realizado a fin de estudiar si la respuesta de las vinchucas a la luz cambia con el momento del día. Podría ocurrir que, tal como ocurre en muchos otros insectos y artrópodos nocturnos, la sensibilidad visual de *T. infestans* fuera mayor durante la noche. Pero al mismo tiempo, esa es la ventana temporal en la que las vinchucas son más activas, y por lo tanto la salida comportamental podría ser el resultado de un compromiso entre una mayor actividad exploratoria y un probable incremento de la sensibilidad visual. Este incremento en la sensibilidad inhibiría la salida de las vinchucas de los refugios hacia un ambiente relativamente más iluminado.

Adicionalmente, se trató de establecer el valor umbral de sensibilidad fototáctica. Clásicamente, el umbral se establece construyendo una curva *intensidad-respuesta*, que demanda un gran número de ensayos e insectos, y a partir de la cual se extrapola el valor de intensidad que provoca un 50% de la respuesta máxima (Menzel 1979). Esto ha sido realizado en insectos con respuesta fototáctica positiva, tales como abejas (Kaiser et al. 1977). Aquí hemos optado por un procedimiento más sencillo y ajustado a nuestro modelo experimental. En el experimento anterior habíamos observado que las vinchucas muestran una respuesta de escape a una intensidad de $0.75 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Por lo tanto, a fin de definir más precisamente el umbral de sensibilidad fótica se estudió la respuesta de las vinchucas frente a dos intensidades más bajas, 0.05 y $0.18 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, además de la respuesta frente a las intensidades de 0.75 , 7.96 y $115 \mu\text{W}/\text{cm}^2$.

La Figura 3.4 muestra la respuesta fotonegativa de vinchucas que fueron entrenadas a un ciclo LD y ensayadas entre: (1) la cuarta y la octava hora de la *fotofase*, que es el momento en el que los insectos están inactivos, y (2) la primera y la tercera hora de la *escotofase*, que es el momento de mayor actividad. La respuesta de los insectos de los grupos control en oscuridad completa ($0.00 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) también se muestra en la Figura (cuadrados negros: medido durante la escotofase; cuadrados vacíos: medido durante la fotofase). Estos controles se realizaron a fin de asegurar que las posibles variaciones diarias que se observaran en el nivel de respuesta no fueran una consecuencia de cambios en el nivel general de actividad. Efectivamente, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tres parámetros comportamentales, entre los insectos control ensayados durante distintos momentos del ciclo diario (Fig. 3.4: cuadrados negros vs. cuadrados blancos, ver 1era. fila en Tabla 3.V).

La Figura 3.4 muestra que la sensibilidad de las vinchucas a diferentes niveles de intensidad de luz depende del momento del día (Tabla 3.III). En términos generales, la respuesta fotonegativa es más intensa durante la escotofase que durante la fotofase. La respuesta también es afectada por la interacción entre los niveles de luz y el momento del día (interacción significativa, Tabla 3.III). Por lo tanto, a fin de analizar el efecto de cada uno de dos estos factores, se realizaron las pruebas de efectos simples para cada uno de los tres parámetros de comportamiento medidos (Tablas 3.IV y 3.V). La tabla 3.IV muestra que la respuesta fotonegativa de los insectos depende la intensidad de luz, tanto durante la fotofase (1era. fila) como durante la escotofase (2da. fila). La tabla 3.V, por su parte, muestra que el nivel de respuesta de los insectos ensayados con $7.96 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ y $115 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ depende del momento del día (5ta. y 6ta. fila). A intensidades más bajas no se encontraron diferencias entre la respuesta de los insectos ensayados durante la fotofase y escotofase respectivamente (filas 2-4). Es decir, la respuesta fotonegativa muestra una variación diaria que depende diferencialmente de la intensidad de luz.

El tiempo de permanencia en la oscuridad fue mayor que el de los controles realizados en oscuridad completa para todas las intensidades de luz, y para los dos momentos del día (pruebas de Dunnett, $p < 0.05$ en todos los casos, Fig. 3.4.A). Para la intensidad de $0.05 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, el tiempo de permanencia del grupo ensayado durante la fotofase fue también significativamente mayor que el del control (prueba de Dunnett, $p < 0.05$). Este resultado nos permite establecer que el umbral de sensibilidad fototáctico de las vinchucas está por debajo de este valor. El tiempo de permanencia en la oscuridad del grupo ensayado con una intensidad de $0.05 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ durante la escotofase no fue estadísticamente diferente del control; sin embargo en este caso también pudo observarse una tendencia de los insectos a permanecer más tiempo en la oscuridad ($59 \pm 5\%$ vs. $50 \pm 3\%$ de la serie control). Como puede observarse en la Figura 3.4.A, a medida que aumentó la intensidad de luz los insectos permanecieron más tiempo en la oscuridad (Tabla 3.IV). Este efecto fue mayor durante la noche que durante el día a intensidades mayores a $0.75 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (Tabla 3.V). En otras palabras, la respuesta no solo aumenta con la intensidad de luz, sino que es mayor durante la noche, particularmente a altas intensidades de luz.

Cabe recordar que en estos experimentos los insectos se liberaron siempre en el lado oscuro, por lo que se midió la latencia en pasar al lado iluminado; dicho de otro modo, se midió la "evitación" de la zona iluminada. Las Figuras 3.3.B, C muestran que tanto la latencia como el número de pasajes entre áreas mostraron

una variación significativa dependiente de la intensidad de luz y del momento del día en el que los insectos fueron ensayados (Tablas 3.IV y 3.V). Si bien la respuesta del grupo ensayado durante la fotofase fue dependiente de la intensidad de luz (Tabla 3.IV, 1era. fila), no se hallaron diferencias significativas entre la respuesta de los grupos experimentales y la del grupo control (Figs. 3.3.B, C; pruebas de Dunnett, $p > 0.05$). Por el contrario, a intensidades mayores a $0.75 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, la respuesta de las vinchucas ensayadas durante la noche difirió estadísticamente de la respuesta del grupo control (Figs. 3.4.B, C), y de la del grupo ensayado durante la fotofase (Tabla 3.IV, filas 5-6). A intensidades menores a $7.96 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, ninguno de los parámetros mostró variaciones diarias (Tabla 3.V, filas 2-4). De este modo, los resultados obtenidos de la medición de la *latencia en pasar al lado iluminado* y el *número de pasajes entre áreas* son coincidentes, y muestran que durante la noche las vinchucas son más renuentes a explorar zonas iluminadas que durante el día.

En resumen, la respuesta fototáctica negativa de *T. infestans* es más intensa durante la escotofase que durante la fotofase. En las vinchucas ensayadas durante el período de máxima sensibilidad, el nivel de respuesta alcanzó un valor máximo a una intensidad de luz de $7.96 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Los incrementos de intensidad no fueron capaces de evocar una respuesta más intensa en ninguno de los parámetros medidos (Fig. 3.4). Nuevamente, el tiempo de permanencia en la oscuridad resultó ser un parámetro comportamental que aportó información adicional: una intensidad de luz de $0.05 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, que equivale a un flujo cuántico de $4.51 \times 10^{10} \text{ q}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$., fue suficiente para evocar una respuesta fotonegativa significativa en *T. infestans* (Fig. 3.4.A). Este resultado muestra la extrema sensibilidad de esta especie a la luz.

| Parámetro | Intensidad de luz <i>gl</i> = 5, 128 | Momento del día <i>gl</i> = 1, 128 | Interacción <i>gl</i> = 5, 128 |
|-----------------------|--|--|--|
| Tiempo de permanencia | F=18.08; p<0.0001 | F=7.05; p<0.01 | F=5.72; p<0.0001 |
| Latencia | F=7.2; p<0.0001 | F=2.99; n.s. | F=2.93; p<0.05 |
| Número de pasajes | F= 3.2; p<0.01 | F=17.1; p<0.001 | F=5.7; p<0.0001 |

Tabla 3.III: Resultados del análisis estadístico de los datos del segundo experimento. Se realizó un ANOVA de dos factores para cada parámetro comportamental medido (filas). Los factores fueron: *intensidad de luz* (2da. columna, seis niveles: 0.00, 0.18, 0.75, 7.96 y 115 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) y *momento del día* (3era. columna, dos niveles: fotofase y escotofase). Cuarta columna: interacción entre factores. *gl*: grados de libertad; n.s.: diferencias no significativas entre grupos ($p>0.05$).

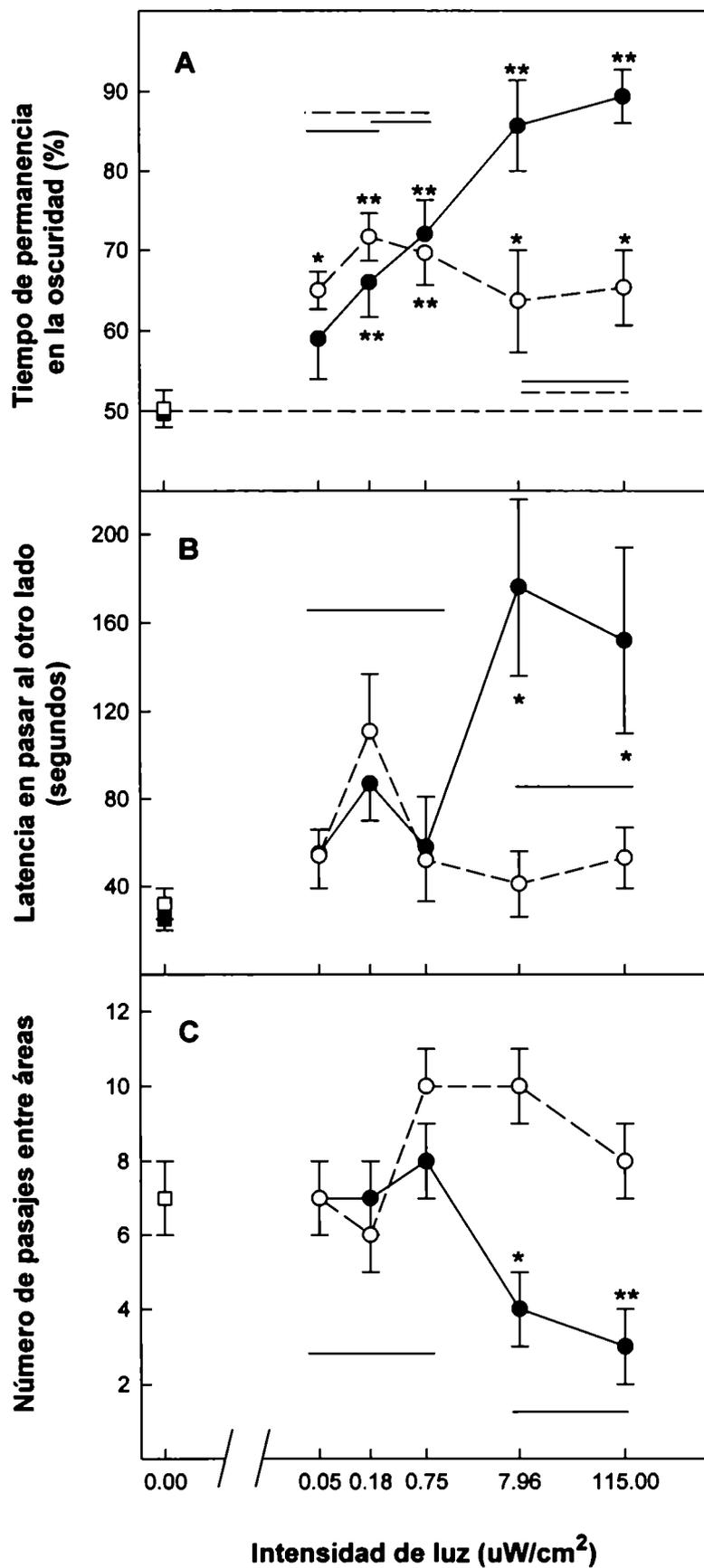
| Momento | Tiempo de permanencia | Latencia | Número de pasajes |
|----------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Fotofase | F=5.42; <i>gl</i> =5,128; p<0.0005 | F=2.89; <i>gl</i> =5,128; p<0.05 | F=2.74; <i>gl</i> =5,128; p<0.05 |
| Escotofase | F=18.38; <i>gl</i> =5,128; p<0.0001 | F=7.24; <i>gl</i> =5,128; p<0.0001 | F=6.16; <i>gl</i> =5,128; p<0.0001 |

Tabla 3.IV: Resultados del análisis de efectos simples realizado sobre el ANOVA de la Tabla 3.III para los tres parámetros comportamentales medidos (columnas). Se analizó el efecto del factor *intensidad de luz* (seis niveles) para cada uno de los niveles del factor *momento del día* (filas).

| Intensidad | Tiempo de permanencia | Latencia | Número de pasajes |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Control | F=0.01; gl=1,128; n.s. | F=0.46; gl=1,128; n.s. | F=0.01; gl=1,128; n.s. |
| 0.05 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ | F=1.07; gl=1,128; n.s. | F=0.01; gl=1,128; n.s. | F=0.10; gl=1,128; n.s. |
| 0.18 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ | F=0.98; gl=1,128; n.s. | F=0.12; gl=1,128; n.s. | F=0.15; gl=1,128; n.s. |
| 0.75 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ | F=0.14; gl=1,128; n.s. | F=0.05; gl=1,128; n.s. | F=2.04; gl=1,128; n.s. |
| 7.96 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ | F=14.60; gl=1,128; p<0.0005 | F=13.17; gl=1,128; p<0.0005 | F=22.76; gl=1,128; p<0.0001 |
| 115 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ | F=17.10; gl=1,128; p<0.0001 | F=5.14; gl=1,128; p<0.05 | F=17.10; gl=1,128; p<0.0001 |

Tabla 3.V: Resultados del análisis de efectos simples realizado sobre el ANOVA de la Tabla 3.III para los tres parámetros comportamentales medidos (columnas). Se analizó el efecto del factor *momento del día* (dos niveles) para cada uno de los niveles del factor *intensidad* (filas).

Figura 3.4: La respuesta fototáctica de *T. infestans* (ordenada, media \pm e.s.) y su dependencia con la intensidad de luz (abcisa, unidades logarítmicas, intensidades: 0.05, 0.18, 0.75, 7.96 y 115 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) durante la escotofase (*círculos llenos*; n=50) y durante la fotofase (*círculos vacíos*; n=50). *Cuadrados negros*: control realizado durante la escotofase (n=20); *cuadrados vacíos*: control realizado en la fotofase (n=20). Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales y su respectivo control (pruebas de Dunnett: *: p < 0,05; **: p < 0,01). Las líneas horizontales conectan puntos que no difieren estadísticamente a un nivel del 5% (prueba de Tukey). **A)** Tiempo de permanencia en la zona oscura de la arena. La línea horizontal punteada a 50% indica el tiempo de permanencia esperado por azar. **B)** Latencia. **C)** Número de pasajes entre áreas.



Discusión

El comportamiento fotonegativo de *T. infestans*

En esta primera parte del trabajo de Tesis se diseñó y estandarizó un bioensayo sencillo que permitió caracterizar y cuantificar la respuesta fototáctica de *T. infestans*. Usando este bioensayo de comportamiento se demostró que la intensidad de la respuesta fotonegativa de *T. infestans* es afectada por las condiciones de luz al comienzo del experimento, y depende tanto de la intensidad de luz como del momento del día (Figs. 3.3 y 3.4).

Antes de discutir estos resultados es necesario diferenciar entre los dos posibles mecanismos de orientación que podrían explicar la escotofilia característica de las vinchucas. El primero de estos mecanismos, la *fotokinesis*, depende solamente de la intensidad del estímulo, en cuyo caso los insectos caminarían más despacio en la oscuridad y más rápido en presencia de luz, independientemente de la dirección del estímulo. El segundo mecanismo que podría explicar nuestros resultados, la *fototaxis*, implica necesariamente una respuesta direccional a la fuente de estímulo (Kühn 1929; Fraenkel y Gunn 1961). Los resultados de las series control (arena totalmente oscura o totalmente iluminada, Fig. 3.3) muestran que tanto el nivel de actividad (medido como *número de pasajes entre áreas*) como el comportamiento exploratorio inicial de las vinchucas (medido como *latencia*) son similares bajo estas dos condiciones homogéneas (no se encontraron diferencias significativas en ambos parámetros entre las series control). Estos dos parámetros solamente cambiaron cuando se generó un contraste de intensidad luminosa en la arena (series experimentales, Figs. 3.3 y 3.4). En este caso, las vinchucas mostraron su comportamiento característico de escape a la luz. Estos resultados nos permiten excluir, por lo tanto, a la *fotokinesis* como el mecanismo responsable de la respuesta, y concluir que la *fototaxis* es el mecanismo responsable del comportamiento de escotofilia de las vinchucas. Las Figuras 3.3 y 3.4 muestran además que el nivel de respuesta de *T. infestans* aumenta con los incrementos de intensidad de luz.

Las condiciones de iluminación al comienzo del experimento (esto es, las condiciones de iluminación –luz u oscuridad- en la zona de la arena en la cual los insectos fueron liberados) afectaron el comportamiento de las vinchucas. La Figura 3.3 muestra que la variación de la respuesta (*tiempo de permanencia en la oscuridad*, *latencia en pasar al otro lado*, y *número de pasajes entre áreas*) con la

intensidad de luz fue menor cuando los insectos fueron liberados en la mitad iluminada de la arena. La liberación de los insectos en el lado oscuro de la arena mostró ser más adecuada para cuantificar la respuesta fotonegativa de *T. infestans*, ya que mostró una mejor modulación con la intensidad del estímulo y menor variabilidad.

El comportamiento fototáctico negativo de *T. infestans* mostró una variación dependiente del momento del día (Fig. 3.4). Los niveles más altos de respuesta fueron observados durante la escotofase, es decir cuando los insectos están normalmente activos (Lazzari 1992). Este efecto es aún más evidente a intensidades de luz mayores a $0.75 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (para dar una referencia al ojo humano, esta intensidad equivale a 1.2 lux) (Fig. 3.4). A intensidades de luz más bajas no se observaron diferencias entre la respuesta de los insectos durante la fotofase y la escotofase. Estas intensidades de luz podrían ser similares a aquellas presentes durante la noche, por lo que las vinchucas aún saldrían de sus refugios durante este período (ver Fig. 10.1).

La variación diaria en la respuesta fotonegativa de *T. infestans*, sugiere la posibilidad que la sensibilidad a la luz esté bajo el control de un reloj circadiano, i.e., endógeno, en esta especie, si bien estas diferencias también podrían obedecer al estado de adaptación del sistema visual (adaptado a la oscuridad o a la luz durante la noche o el día respectivamente). Este aspecto se analizará específicamente en el próximo Capítulo de esta Tesis.

Umbrales de sensibilidad

Los resultados presentados en este Capítulo muestran que el sistema visual de *T. infestans* es sensible en un amplio intervalo de intensidades de luz. Las vinchucas mostraron un comportamiento fototáctico negativo en un intervalo de cuatro órdenes de magnitud, entre $0.05 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ($4.51 \times 10^{10} \text{ q}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$) y $115 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ($2.02 \times 10^{14} \text{ q}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$). Estos valores son consistentes con los cambios naturales de intensidad de luz a los cuales las vinchucas están expuestas como consecuencia de su ritmo diario de actividad (Fig. 10.1). Bajo condiciones de luz-oscuridad, *T. infestans* exhibe un ritmo de actividad que presenta dos picos de actividad: uno al atardecer, que se extiende durante las primeras horas de la noche, y el otro al amanecer (Lazzari 1992). Por lo tanto, durante su período de actividad, *T. infestans* necesita poder operar en un intervalo de intensidades comprendido entre aquellas

reflejadas por un cielo estrellado, hasta la intensidad del sol al amanecer, i.e., de 7 unidades logarítmicas (Chapman 1998).

La Figura 3.4 muestra que el umbral de sensibilidad de la respuesta fotonegativa de *T. infestans* está por debajo de $0.05 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Este es el valor más bajo de sensibilidad visual hallado hasta el momento en esta especie. Schofield (1975) midió la amplitud del electroretinograma (ERG) frente a distintos estímulos luminosos y encontró que el ojo de este insecto es capaz de responder a una intensidad umbral de 5 lux (esto es, $3.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, este autor expresó el umbral en lux que es una unidad inapropiada dado que la misma se refiere al sistema humano de percepción visual). Ward y Finlayson (1982) estudiaron la respuesta fotonegativa de insectos inmovilizados en experimentos de lazo abierto u *open-loop*, y establecieron que las vinchucas responden a una intensidad de luz blanca de $0.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Estos valores son difíciles de comparar con los presentados aquí dado que se han utilizado distintos sistemas de medición y metodologías de experimentación (ERG, experimentos en condiciones restrictivas). Sin embargo, el valor umbral hallado en los experimentos que se presentan en este Capítulo es aún menor que aquellos hallados por dichos autores, y demuestra la extrema sensibilidad de *T. infestans* a la luz. Además, pone de manifiesto la importancia de usar una respuesta comportamental que no interfiera con la actividad de los insectos, como un instrumento más sensible para medir umbrales de respuesta.

En resumen, se puede concluir que la respuesta de escape a la luz de *T. infestans* debe ser entendida como compuesta por al menos dos componentes: un comportamiento inicial independiente de las condiciones de luz, que se evidencia cuando el insecto es confrontado con un nuevo ambiente, y una respuesta fototáctica negativa que se desencadena cuando los insectos son confrontados con un contraste de intensidad, particularmente durante la escotofase, cuando se presentan los picos de actividad.

Finalmente, el diseño experimental desarrollado provee un instrumento simple y reproducible para estudiar otros atributos del sistema visual de *T. infestans*. Específicamente, se utilizará para estudiar la organización temporal de la sensibilidad del sistema visual (Capítulo 4), el papel de los ocelos y ojos compuestos en esta respuesta (Capítulo 6), la sensibilidad espectral de los ojos compuestos (Capítulo 7), y los efectos de la edad y las mutaciones (Capítulo 8).

CAPÍTULO 4: BASES CRONOBIOLÓGICAS DEL CONTROL TEMPORAL DE LA SENSIBILIDAD FOTOTÁCTICA DE *T. INFESTANS*

Introducción

Como hemos visto en el Capítulo anterior, la diferencia en la respuesta de *T. infestans* frente a distintas intensidades de luz entre la fotofase y la escotofase sugiere la posibilidad de que la sensibilidad fotonegativa esté en esta especie bajo el control de un reloj circadiano. En las vinchucas muchos ritmos diarios, tales como la actividad locomotora, la oviposición, la muda, la eclosión de huevos, y la termopreferencia, están bajo control endógeno y utilizan a la luz como *Zeitgeber* (ver Capítulo 1). Dado entonces que una gran cantidad de respuestas comportamentales están bajo control endógeno en Triatominae, sería interesante estudiar si esto también ocurre con el ritmo diario de fototaxis de *T. infestans*.

En varias especies de insectos se han descrito ritmos circadianos (i.e., controlados por un oscilador endógeno) de sensibilidad a luz. Esto ha sido analizado mediante la cuantificación de las variaciones en la amplitud del electroretinograma (ERG) (e.g., escarabajos: Koehler y Fleissner 1978; langostas y mántidos: Horridge et al. 1981; *Manduca sexta*: Bennett 1983; cucarachas: Wills et al. 1985). Es decir, se cuantifica la respuesta eléctrica de la retina frente a pulsos de luz de distinta intensidad y/o duración en insectos mantenidos en oscuridad constante. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito en ningún insecto la existencia de un ritmo circadiano de sensibilidad fótica mediante otros procedimientos o aproximaciones, como por ejemplo, a través de la cuantificación de una respuesta de comportamiento (e.g., fototaxis). En el presente Capítulo se presentan los resultados de una serie de experimentos realizados específicamente para poner a prueba la existencia de un ritmo circadiano de fototaxis en *T. infestans*.

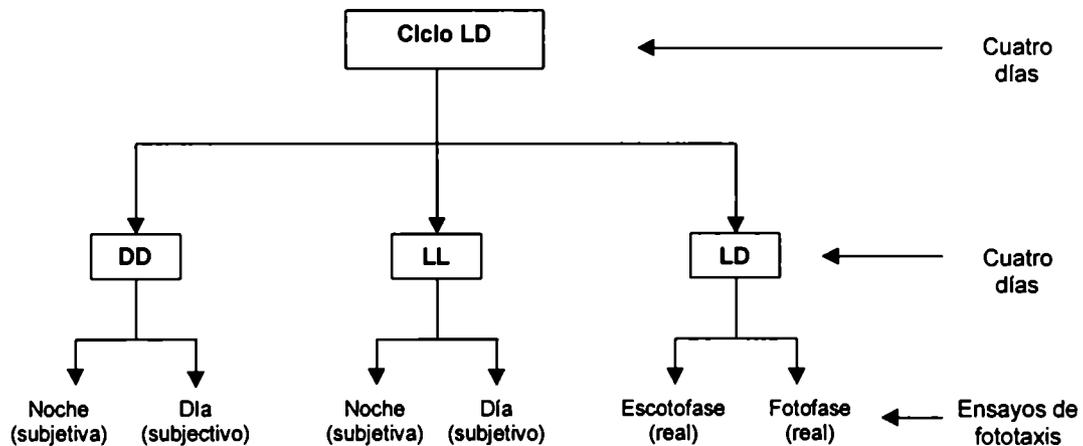
Materiales y métodos

A fin de estudiar si el ritmo diario de fototaxis de las vinchucas está bajo el control de un oscilador circadiano es necesario eliminar la posible influencia del estado de adaptación del sistema visual (i.e., adaptado a la luz durante el día,

adaptado a la oscuridad durante la noche). Para ello, vinchucas entrenadas a ciclos LD fueron transferidas a condiciones constantes de luz (grupo LL) u oscuridad (DD). Cabe mencionar que para establecer en forma rigurosa la naturaleza endógena de un ritmo es necesario mantener a los animales en condiciones de libre curso durante un período mayor a 24 hs (Enright 1981).

Se usaron larvas de cuarto estadio de *T. infestans* criadas en nuestro laboratorio, alimentadas tal como fue indicado en el Capítulo anterior. Los insectos utilizados tenían un ayuno de aproximadamente 20 días con posterioridad a la última ecdisis. Los ensayos se realizaron tal como fue descrito en el Capítulo anterior. Los insectos se liberaron en la zona oscura de la arena; las asimetrías espaciales fueron evitadas o controladas intercambiando áreas izquierda y derecha entre ensayos. Cada insecto fue utilizado una sola vez.

A fin de estudiar si el ritmo diario de sensibilidad fotonegativa está bajo control de un oscilador endógeno se siguió el procedimiento que se esquematiza a continuación:



Los insectos fueron entrenados a un ciclo 12 hs luz:12 hs oscuridad (LD: 200/0.00 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) a temperatura constante (25°C) durante cuatro días; hasta aquí el procedimiento fue idéntico al descrito en el Capítulo 3 para estudiar el ritmo *diario* de fototaxis. Luego de este entrenamiento un grupo de insectos fue transferido a condiciones de oscuridad constante (DD, 0.00 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$; n=20), mientras que otro grupo fue transferido a condiciones de iluminación constante (LL, 200 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$; n=20). Al cabo de cuatro días se ensayó la respuesta fototáctica de los insectos: la

mitad de los insectos de cada grupo (LL y DD) fueron ensayados entre la cuarta y la octava hora del día subjetivo, y la mitad restante en la primera hora de la noche subjetiva. La estimación del día y noche subjetivos fue realizada utilizando los períodos de libre curso de actividad locomotora establecidos por Lazzari (1992) ($\tau_{DD} \approx 23$ h 50 min y $\tau_{LL} \approx 26$ h 40 min). Se utilizaron los períodos de libre curso correspondientes al ritmo circadiano de actividad, dado que en la cucaracha *Leucophaea maderae* existen evidencias de que ambos ritmos, el de actividad y el de sensibilidad visual, estarían controlados por un mismo oscilador (Page 1990).

En cada ensayo se midió el *tiempo de permanencia en la oscuridad, latencia en pasar a la zona iluminada y número de pasajes entre áreas*, tal como fue descrito en el Capítulo anterior. En los ensayos la mitad de la arena fue iluminada con una sola intensidad de luz ($115 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). Esta intensidad fue la que provocó mayores diferencias en la respuesta de las vinchucas durante la fototaxe y la escotofase respectivamente (Fig. 3.4).

El análisis de los resultados (ANOVA de dos factores para cada uno de los parámetros cuantificados) se realizó tal como fue descrito en el Capítulo 3.

Resultados

El experimento presentado en este Capítulo fue realizado a fin de estudiar si el ritmo diario de sensibilidad fotonegativa está bajo control *exógeno* u *endógeno*. En la Figura 4.1 se muestran las predicciones de este experimento. La parte superior muestra la respuesta esperada en el caso de que el ritmo fuera consecuencia de la adaptación del sistema visual a las condiciones ambientales (i.e., se trataría de un ritmo *exógeno*). En este caso el nivel de respuesta sería más alto en el grupo DD que en el grupo LL, e independiente del momento del día. Por el contrario, si la respuesta estuviera controlada por un oscilador *endógeno*, la respuesta de los insectos mantenidos en condiciones constantes (DD ó LL) sería mayor durante la noche que durante el día subjetivo, es decir, independientemente de las condiciones de iluminación (oscuridad o luz). Estos dos grupos deberían manifestar variaciones en su respuesta similares a las mostradas por el grupo mantenido bajo condiciones de sincronización (ciclos LD).

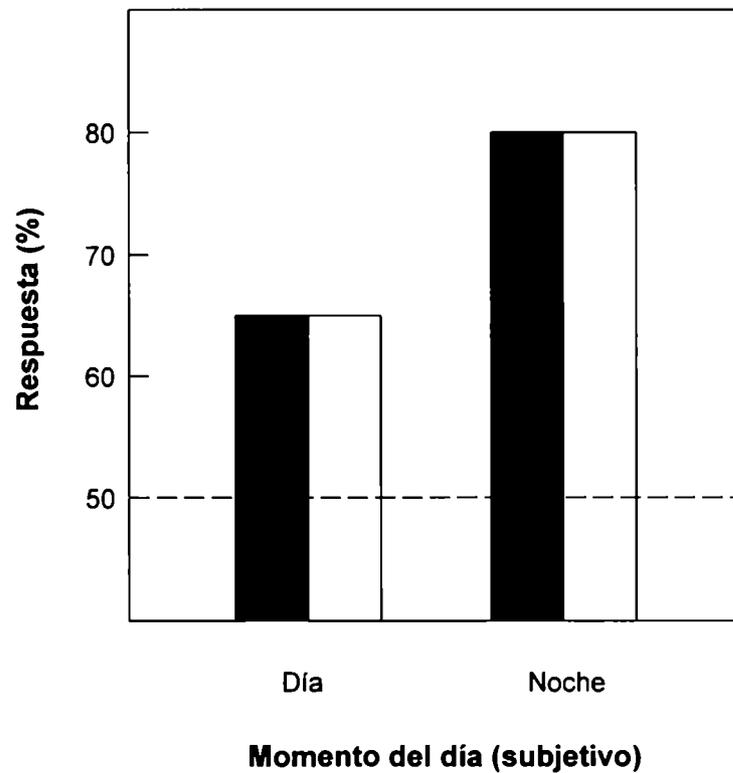
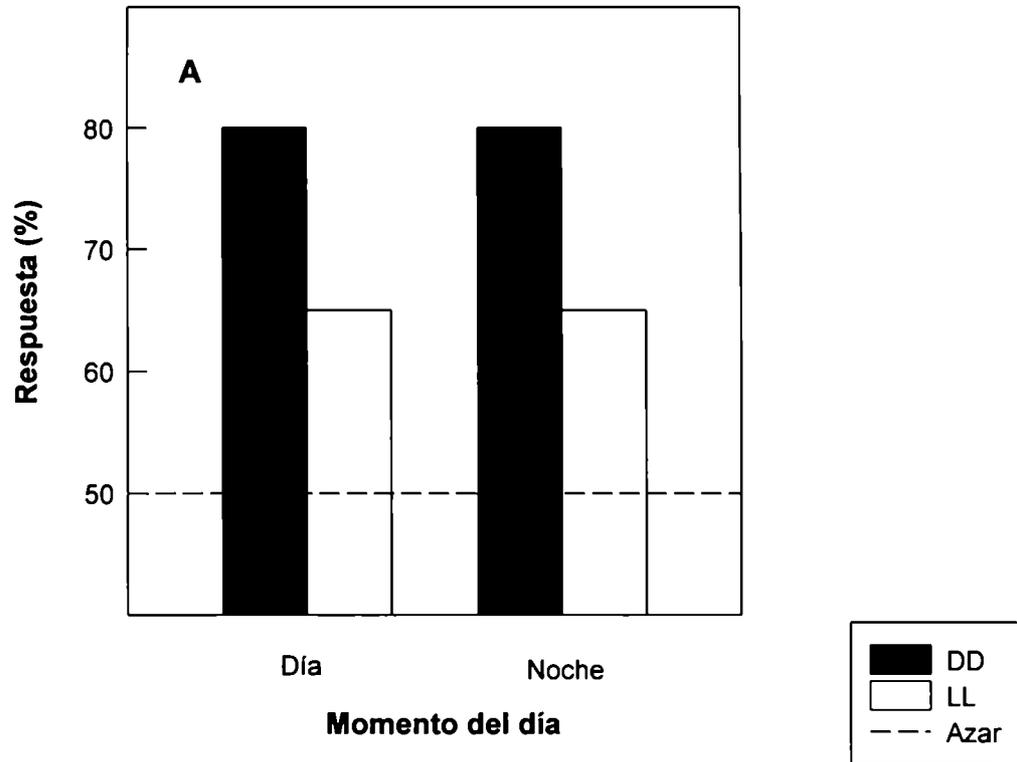


Figura 4.1: Predicción de la respuesta de los insectos (e.g., tiempo de permanencia en la oscuridad) de acuerdo a (A) un mecanismo de control exógeno del ritmo, (B) un mecanismo de control endógeno del ritmo.

En la Figura 4.2 se muestra la respuesta de los tres grupos de animales (DD, LL y LD) para los tres parámetros medidos. Los valores del último grupo son aquellos obtenidos en el segundo experimento del Capítulo 3 (ver Fig. 3.4, valores de los insectos ensayados durante la fotofase y escotofase con $115 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). En la Figura 4.2 se observa que los tres grupos muestran un patrón similar de respuesta: los insectos pasaron más tiempo en la oscuridad y mostraron una latencia mayor en cruzar a la zona iluminada de la arena durante la noche (*real* en el caso del grupo LD, *subjetiva* en el caso de los grupos DD y LL) que durante el día (real o subjetivo). Del mismo modo, el número de pasajes entre áreas fue mayor durante este último período.

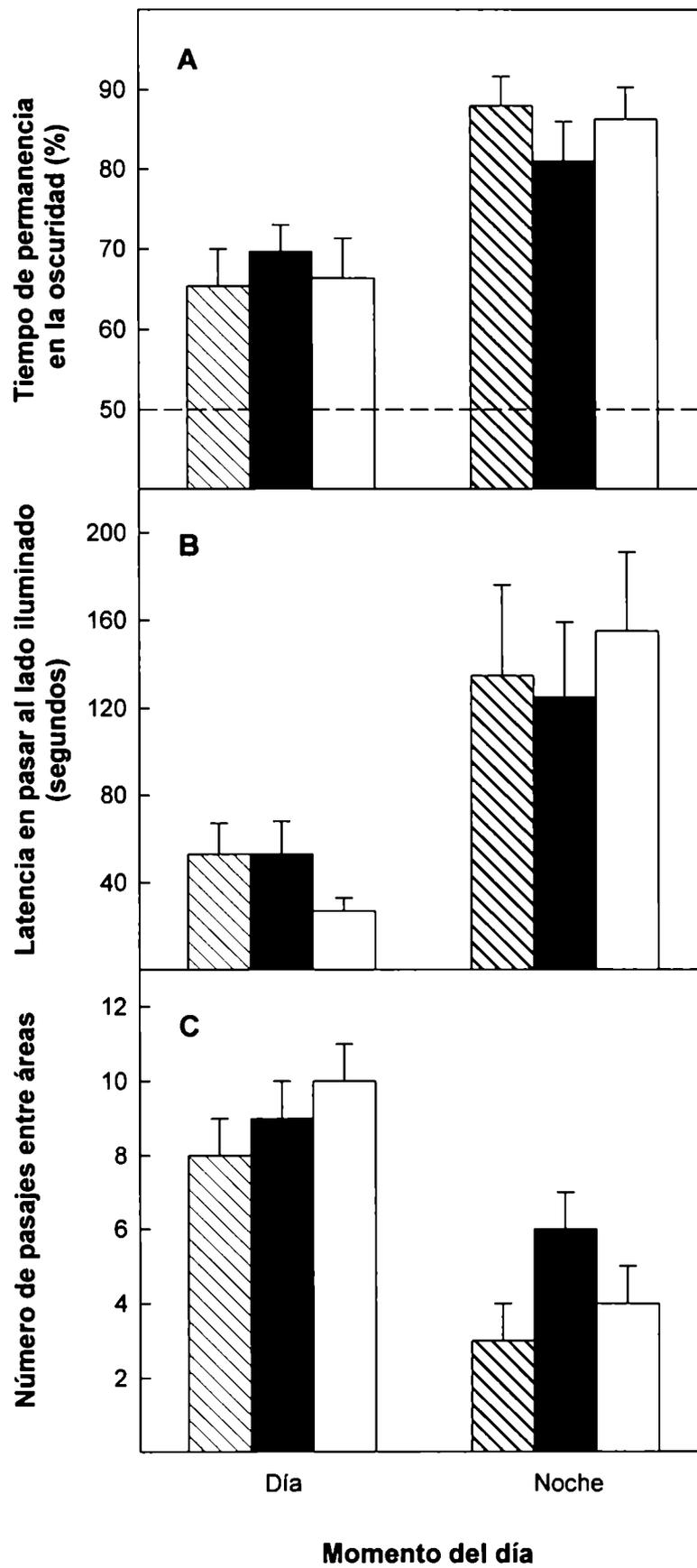
Para los tres parámetros medidos, la respuesta de las vinchucas mostró diferencias significativas solamente de acuerdo al momento del día (día vs. noche para el grupo LD; día subjetivo vs. noche subjetiva para los grupos LL y DD) (Tabla 4.1, 1era. columna). La respuesta de los insectos mantenidos en condiciones de constancia ambiental (DD y LL) ensayados durante su noche o día (subjetivo) no fue estadísticamente distinta de la respuesta del grupo LD durante la escotofase o fotofase (Tabla 4.1, 2da. columna). El patrón de respuesta tampoco mostró diferencias significativas entre grupos (Tabla 4.1, 3era. columna: interacción no significativa para los tres parámetros comportamentales medidos).

Es decir, los animales mantenidos bajo condiciones de libre curso (LL y DD) mostraron las mismas variaciones en la respuesta que el grupo LD. Estos resultados demuestran que la respuesta fototáctica de *T. infestans* está bajo control de un sistema circadiano endógeno, y concuerdan con la predicción del modelo de control circadiano ilustrado en la Figura 4.1.

| Parámetro | Momento del día <i>gl</i> = 1, 54 | Grupo experimental <i>Gl</i> = 2, 54 | Interacción <i>gl</i> = 2, 54 |
|-----------------------|--------------------------------------|---|----------------------------------|
| Tiempo de permanencia | F=30.38, $p<0.0001$ | F=0.09, n.s. | F=1.22, n.s. |
| Latencia | F=4.62, $p<0.05$ | F=2.74, n.s. | F=0.75, n.s. |
| Número de pasajes | F=30.76, $p<0.0001$ | F=3.03, n.s. | F=1.08, n.s. |

Tabla 4.1: Se realizó un ANOVA de dos factores para cada parámetro comportamental medido (filas). Factores: *momento del día* (2da. columna, dos niveles: fotofase -o día subjetivo en insectos bajo ciclo DD y LL-, y escotofase -o noche subjetiva- en insectos bajo ciclo DD y LL) y *grupo experimental* (3era. columna, tres niveles: LD, DD ó LL). Cuarta columna: interacción entre factores. *gl*: grados de libertad; n.s.: no se encontraron diferencias significativas entre grupos ($p>0.05$).

Figura 4.2: Control circadiano de la respuesta fototáctica de *T. infestans*. Los insectos fueron transferidos de ciclos LD a condiciones constantes (DD: *barras negras*, $n=20$; LL: *barras blancas*, $n=20$). Al cabo de cuatro días fueron ensayados durante el día o la noche subjetiva. La intensidad de luz fue de $115 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. También se muestra la respuesta de las vinchucas entrenadas a un ciclo LD (*barras rayadas*, $n=20$) con dicha intensidad (tomado de la Fig. 3.4). Las barras representan valores medios + e.s. **A)** Tiempo de permanencia en la zona oscura de la arena (% del tiempo total del ensayo). La línea horizontal a 50% indica el tiempo de permanencia esperado por azar. **B)** Latencia (segundos). **C)** Número de pasajes entre áreas.



Discusión

En el Capítulo 3 habíamos observado que el comportamiento fotonegativo de *T. infestans* muestra un ritmo diario: la intensidad de la respuesta es mayor durante la noche que durante el día. Los resultados presentados en este Capítulo demuestran que este ritmo está controlado por un oscilador endógeno, y descartan la posibilidad de que dichas variaciones sean consecuencia de una respuesta directa a las condiciones ambientales de iluminación. Los insectos mantenidos en condiciones de libre curso (DD ó LL), y ensayados en su respectiva noche ó día subjetivo, mostraron las mismas variaciones en su respuesta que los insectos mantenidos en ciclos LD y que fueron ensayados durante la fotofase o escotofase. Tanto los insectos mantenidos en LL como en DD mostraron una respuesta fotonegativa más intensa durante la noche subjetiva que durante el día subjetivo.

Los períodos de libre curso usados para estimar la noche y el día subjetivo de *T. infestans* fueron aquellos determinados por Lazzari (1992) para la actividad locomotora en esta especie. En la cucaracha *L. maderae* un mismo oscilador controla los ritmos de actividad locomotora y de amplitud del ERG. Este oscilador está localizado en posición ventral cerca de la lobula de cada uno de los lóbulos ópticos del protocerebro (Page 1990). Dado entonces que los ritmos de actividad locomotora y de sensibilidad a la luz también podrían estar acopladas en *T. infestans*, se puede proponer que en esta especie existiría una organización similar del sistema circadiano, o aún más, dicha organización podría ser común a varias especies de insectos.

En varias especies de insectos se han descrito ritmos diarios de fototaxis (Brady 1974) pero en ningún caso se ha demostrado la existencia de un control endógeno sobre la expresión de los mismos. Como hemos mencionado en la introducción de este Capítulo, en varias especies se han descrito ritmos circadianos de sensibilidad visual mediante técnicas electrofisiológicas (Koehler y Fleissner 1978; Horridge et al. 1981, Bennett 1983, Wills et al. 1985). El único estudio que demostró la existencia de un ritmo circadiano de fototaxis, en este caso positiva, fue realizado en un crustáceo, la pulga de agua *Daphnia magna* (Ringelberg y Servaas 1971). Por lo tanto, los resultados presentados en este Capítulo constituyen los primeros en demostrar en insectos la existencia de un ritmo endógeno de sensibilidad visual, a través de la medición de una respuesta de comportamiento.

Los mecanismos responsables de los cambios circadianos en la sensibilidad fototáctica de *T. infestans* podrían actuar a nivel central o periférico. Estos últimos

pueden ser activados directamente por cambios en las condiciones ambientales o estar bajo control endógeno, y serán discutidos en detalle en el Capítulo siguiente. A un primer nivel de integración, en *Drosophila melanogaster* se ha observado que el volumen de los neuropilos visuales depende de las condiciones de luz (Barth et al. 1997). En particular, en insectos mantenidos en condiciones constantes (DD ó LL) durante al menos cuatro días, se ha observado una disminución o aumento, respectivamente, del volumen de estos neuropilos. A un nivel más central, se han observado cambios similares en el volumen de los cuerpos pedunculados (Barth y Heisenberg 1997). Es decir, los cambios en la sensibilidad visual también podrían ser un resultado de ajustes a nivel central. En todo caso, la ventaja adaptativa del control endógeno de un ritmo de este tipo sería la de ajustar la sensibilidad visual en forma anticipada a los cambios en la intensidad de luz ambiente.

CAPÍTULO 5: CONTROL TEMPORAL DE LA ESTRUCTURA DE LA OMATIDIA DE *T. INFESTANS*

Introducción

En el Capítulo anterior hemos visto que la sensibilidad fototáctica de *T. infestans* está bajo el control de un oscilador circadiano. ¿Qué mecanismos podrían ser los responsables de las variaciones en la sensibilidad visual? Como hemos mencionado en el Capítulo 2, algunos de estos mecanismos son muy rápidos y afectan moléculas, canales, y membranas (Autrum 1981). En contraste, los mecanismos que regulan el flujo de luz que alcanza las estructuras fotosensibles pueden ser suficientemente amplios y lentos como para ser estudiados mediante análisis morfológico (Meyer-Rochow 1999). Estos últimos, a los que especialmente nos referiremos en este Capítulo, pueden ser estudiados analizando la forma en que las condiciones de luz afectan a: 1) el ojo compuesto como un todo (e.g., pseudopupilas), 2) a sus unidades constituyentes, las omatidias, y 3) a sus estructuras celulares y subcelulares (Meyer-Rochow 1999). Como veremos a continuación estos mecanismos son muy variados y pueden estar controlados endógena o exógenamente.

En este Capítulo de la Tesis analizaremos, por un lado, los fenómenos de adaptación visual en el ojo compuesto de *T. infestans*. Además, estudiaremos si existen cambios circadianos en la estructura y/o morfología de las omatidias, que pudieran explicar las variaciones observadas en la sensibilidad fotonegativa de esta especie.

A continuación se presentan los distintos cambios que se observan en las omatidias de los ojos compuestos de distintos artrópodos, a fin de poder discutir en forma comparativa los resultados que se presentarán en este Capítulo.

Células del cono cristalino

Básicamente se reconocen dos tipos de ojos en lo que respecta al cono cristalino (CC): 1) aconos (comunes en artrópodos diurnos con ojos de aposición) y 2) euconos (frecuentes en artrópodos nocturnos) (Meyer-Rochow 1999). En algunas especies de insectos con ojos aconos de aposición las células del CC se elongan y

forman un tracto proximal delgado en respuesta a la luz, mientras que durante la noche disminuye la distancia córnea-rabdoma (i.e., la distancia focal) (e.g., Hemiptera: Lüdtké 1953; Walcott 1971a; Coleoptera: Wada y Schneider 1967), por lo que aumenta la captura de luz y por lo tanto la sensibilidad visual (Nilsson 1989a, Meyer-Rochow 1999). Este fenómeno también fue observado en algunos insectos que poseen ojos euconos de aposición (Hymenoptera: Menzi 1987) o de superposición (Coleoptera: Walcott 1969).

Células pigmentarias

- *Los pigmentos pantalla*

Los pigmentos pantalla (o de “*screening*”) se encuentran en los ojos de muchos artrópodos. En los insectos estos pigmentos están localizados en las CPPs, en un número variable de CPSs, y en algunos casos también en las células retinulares. Las funciones más importantes de estos pigmentos son: aislar ópticamente las omatidias, controlar el flujo de luz incidente en los fotorreceptores, controlar la apertura omatidial y el ángulo de aceptación de los fotorreceptores, y proteger los pigmentos fotosensibles de una excesiva fotoconversión a su estado inactivo (metarrodopsina) (Stavenga 1989).

Los cambios en la distribución de los pigmentos pantalla y en la forma y/o tamaño de las células pigmentarias en respuesta a las condiciones de luz son uno de los eventos más corrientes en los ojos compuestos de los artrópodos. Los cambios en la posición de estos pigmentos dan lugar, en muchos casos, a los fenómenos de brillo ocular (“*eyeglow*”) y a varias clases de “*pseudopupilas*”. Estos fenómenos se pueden observar, entre otros, en el ojo intacto de polillas, mariposas, moscas y crustáceos, y han sido utilizados como herramientas indicadoras del estado de adaptación del ojo (Ro y Nilsson 1994, Meyer-Rochow 1999). En algunos casos estos cambios están bajo el control de un oscilador endógeno (Cronin 1992, Bennett 1983).

- *Células pigmentarias primarias (CPPs)*

Los movimientos de CPPs y/o de los pigmentos ubicados dentro de estas células son comunes en los ojos de aposición de especies crepusculares y/o nocturnas. Estos movimientos causan variaciones en el diámetro de un “*iris*” pigmentario que se encuentra en el extremo distal del rabdoma. Esto ha sido

observado en los ojos de rabdoma abierto que no poseen superposición neural (Hemiptera: Walcot 1971a, Ionides y Horridge 1975; Coleoptera: Wada y Schneider 1968), y en algunas especies con ojos con rabdoma cerrado (Hymenoptera: Menzi 1987; *Limulus sp.*: Barlow et al. 1980). En los insectos estas variaciones son consecuencia exclusiva de cambios en las CPPs y en las células del CC. En el ojo adaptado a la oscuridad las CPPs son desplazadas a la periferia y el CC se dilata, quedando todos los rabdómeros expuestos; durante la adaptación a la luz las CPPs se contraen, las CC forman un tracto delgado y el rabdómero se desplaza proximalmente (Fig. 5.1). Este mecanismo de adaptación permite un control directo del ángulo de aceptación de las omatidias (aumenta en condiciones de oscuridad) y por lo tanto de la cantidad de luz que llega a los rabdomas (Nilsson 1989a).

Como regla general, en los insectos con ojos de superposición no se observan movimientos de pigmento en las CPPs.

- *Células pigmentarias secundarias (CPSs)*

Los movimientos de pigmento en las CPSs son comunes en los ojos de superposición de artrópodos crepusculares y nocturnos (e.g., Coleoptera: Warrant y McIntyre 1990; Lepidoptera: Bernhard 1963, Bennett 1983, Weryrauther 1986; Crustacea: Bryceson 1986, Aréchiga y Rodríguez-Sosa 1997; Scorpionida: Fleissner y Fleissner 1978). Durante el día los pigmentos están distribuidos a lo largo de las células de modo tal que las omatidias se encuentran ópticamente aisladas y el ojo funciona como uno de aposición. Durante la noche los pigmentos se concentran alrededor del CC, dejando una zona clara transparente entre omatidias, por lo que el ojo funciona como uno de superposición. Estos movimientos incrementan la sensibilidad visual dado que cada omatidia recibe luz a través de un área que puede llegar a consistir de cientos e incluso miles de omatidias (Kunze 1979; Warrant y McIntyre 1990). En algunos casos estas migraciones de pigmento están bajo control endógeno (*Manduca sexta*: Bennett 1993; el escarabajo estercolero crepuscular *Onitis alexis*: Warrant y McIntyre 1990; la langosta de río *Procambarus clarkii*: Aréchiga y Rodríguez Sosa 1997).

En los insectos que poseen ojos de aposición no se observan movimientos de pigmento en las CPSs.

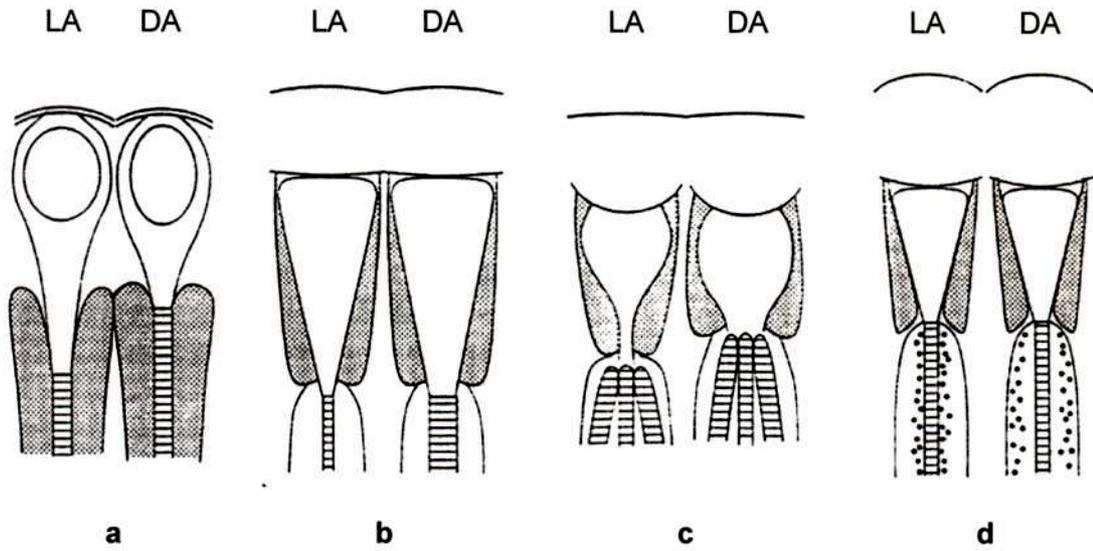


Figura 5.1: Estrategias de adaptación a la luz-oscuridad en los ojos de aposición. a: cambios en la distancia focal; b: variaciones en el diámetro del rhabdoma; c: cambios en la posición del rhabdoma; d: movimientos radiales de pigmento en las células retinulares LA: adaptado a la luz, DA: adaptado a la oscuridad (Tomado de Nilsson 1989).

Células retinulares y rbdomas

- *Cambios en la distribución de pigmentos*

En varias especies de insectos con ojos de aposición se han observado movimientos radiales de pigmento en las células retinulares (i.e., en dirección perpendicular al eje óptico de la célula) (*Periplaneta sp.*: Ferrel y Reitcheck 1993; *Locusta sp.* y *Mantis sp.*: Horridge et al. 1981; *Musca sp.*, *Calliphora sp.*, *Aeschna sp.*, *Formica sp.*, *Cataglyphis sp.*, *Apis sp.*, *Pieris rapae*: Autrum 1981). En el ojo adaptado a la luz los pigmentos se concentran alrededor del rbdoma disminuyendo la cantidad de luz que alcanza el mismo; mientras que en el ojo adaptado a la oscuridad los pigmentos se desplazan hacia la periferia de las células (Nilsson 1989a) (Fig. 5.1). En los insectos estos movimientos de pigmento están directamente controlados por las condiciones de iluminación (control exógeno). En contraste, en el quelicerado *Limulus sp.* coexisten dos mecanismos: 1) un control endógeno (mediado por neurotransmisores) que opera durante la noche real o subjetiva (en DD), y que provoca el movimiento de pigmento hacia la periferia de las células retinulares; 2) un efecto directo de la luz, que desencadena la migración de pigmento en sentido opuesto, independientemente del momento del día (Kier y Chamberlain 1990).

- *Organelas u estructuras subcelulares*

En varias especies de insectos con ojos de aposición los rbdomas están rodeados de cisternas intracelulares claras de retículo endoplasmático ("*palisado*") (*Aeschna sp.*, *Apis sp.*, *Cataglyphis sp.* y *Formica sp.*: Autrum 1981; langostas y mántidos: Horridge et al. 1981; *L. maderae*: Ferrel y Reitcheck 1993). Estas estructuras, que se observan en el ojo adaptado a la oscuridad, aumentan el contraste de índice de refracción entre el rbdoma y el citoplasma circundante, por lo que la reflexión dentro de aquél es máxima. En el ojo adaptado a la luz el palisado desaparece y los pigmentos pantalla se disponen alrededor de la cara interna de los microvilli (Chapman 1998). En el caso de la cucaracha *L. maderae* se han observado cambios circadianos en el área del palisado, si bien con una amplitud reducida en comparación con la amplitud del ritmo diario (Ferrel y Reitcheck 1993).

- *Rbdoma y microvilli*

En varios insectos y en otros artrópodos se han observado cambios en el diámetro y posición del rbdoma y en la estructura del microvilli (langostas y

mántidos: Horridge et al. 1981; cucarachas: Ferrell y Reitschek 1993; *Limulus sp.*: Barlow et al. 1980). En el ojo adaptado a la oscuridad aumenta el diámetro del rabdoma y con ello la captura fotónica y el ángulo de aceptación de las omatidias (Nilsson 1989a). La luz produce los fenómenos opuestos. En *Valanga sp.* estos cambios están relativamente influenciados por un oscilador circadiano (Horridge et al. 1981). En *Limulus sp.* la longitud y posición del rabdoma están bajo control de un reloj endógeno (Barlow et al. 1980); la luz dispara la ruptura de los microvilli tanto durante el día como durante la noche (Chamberlain y Barlow 1979).

Membranas basales y axones

En la mosca doméstica se ha descrito la presencia de pigmento pantalla en las terminales sinápticas de las células retinulares, más allá de la membrana basal, los cuales invaden las terminales de los fotorreceptores en forma circadiana (Pyza y Meinertzhagen 1997). Además, en la lámina de este insecto, se han descrito variaciones circadianas en el diámetro de las interneuronas monopolares tipo L2 (Pyza y Meinertzhagen 1995).

Dada la variedad de mecanismos que pueden regular la sensibilidad visual del ojo compuesto que hemos expuesto en los párrafos anteriores, en este Capítulo estudiaremos los fenómenos de adaptación visual en *T. infestans*. Hasta el momento, entre los triatomíneos, estos fenómenos han sido parcialmente descritos en *R. prolixus* (Müller 1970). Además, analizaremos si existen cambios circadianos en la estructura de las omatidias de *T. infestans*, que puedan explicar las variaciones observadas en la sensibilidad fotonegativa.

Materiales y métodos

Procedimiento

Se utilizaron larvas de cuarto estadio de *T. infestans*, criadas en nuestro laboratorio a 28°C, alimentadas semanalmente sobre gallinas hasta su eclosión. Las condiciones de entrenamiento fueron similares a las presentadas en el Capítulo anterior. Los insectos fueron entrenados a ciclos LD (140/0.00 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) durante

cinco días, al cabo de los cuales se seccionaron y fijaron las cabezas en: 1) la cuarta hora de la fotofase bajo luz de $\approx 140 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ($n=5$); 2) la segunda hora de la escotofase ($n=5$). En el segundo caso, a fin de evitar interferencias, las cabezas se seccionaron bajo luz roja de longitud de onda larga ($\lambda > 695 \text{ nm}$; generada con un filtro marca Schott RG 695, Alemania).

A fin de estudiar si existen cambios circadianos en la estructura omatidial es necesario, tal como hicimos para estudiar el ritmo de fototaxis, eliminar la posible influencia del estado de adaptación del sistema visual. A tal fin se entrenaron insectos a ciclos LD y luego se transfirieron a condiciones de oscuridad constante (DD, $0.00 \mu\text{W}/\text{cm}^2$; $n=8$) o luz constante (LL, $140 \mu\text{W}/\text{cm}^2$; $n=8$). Al cabo de tres días "subjettivos" se seccionaron y fijaron las cabezas de la mitad de los insectos de cada grupo (DD y LL) en 1) la cuarta hora del día subjettivo, o 2) en la segunda hora de la noche subjettiva. Las cabezas de los insectos mantenidos en LL fueron seccionadas y fijadas bajo luz de $\approx 140 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Las cabezas de los insectos mantenidos en DD fueron seccionadas y fijadas bajo luz roja ($\lambda > 695 \text{ nm}$). La estimación del día y noche subjettivos fue realizada tal como fue explicado en el Capítulo anterior.

A fin de estudiar el efecto de la intensidad de luz sobre la estructura de las omatidias se repitió el procedimiento descrito en el párrafo anterior, pero a una intensidad de luz de $8 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Los animales fueron entrenados a ciclos LD ($8/00 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) y luego transferidos a LL ($8 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) durante tres días "subjettivos". Las cabezas fueron fijadas en la fase de luz ($n=3$) u oscuridad ($n=3$) del ciclo LD, y en los correspondientes día ($n=3$) y noche ($n=3$) subjettivos. Las cabezas fueron cortadas bajo una intensidad de $8 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ o bajo luz de $\lambda > 695 \text{ nm}$, según correspondiese.

Durante la fase de entrenamiento se usó una fuente de luz blanca fluorescente (OSRAM Dulux EL E27, 7W/41-827). La intensidad de luz fue medida con un radiómetro (SEL 033 sensor module, IL 1400 radiometer, International Light, Newburyport, Mass, USA).

La edad de los insectos al momento de la fijación de las estructuras visuales varió entre 12 y 18 días postecdisis.

Preparaciones histológicas

Las piezas (mitad posterior de la cabeza con los ojos) fueron preparadas para ser analizadas en microscopio óptico siguiendo el procedimiento descrito por Ribi (1987), que consiste en:

a) **Fijación:** Se sumerge inmediatamente la pieza en fijador especial (ver *Recetas*) durante 3-4 horas.

b) **Lavado:** Se lavan las piezas con buffer especial (ver *Recetas*) durante veinte minutos con tres-cinco cambios de buffer.

c) **Deshidratación:** Se deshidratan las piezas en serie ascendente de alcoholes: Etanol 70 % (5'), Etanol 80% (5'), Etanol 90% (10'), Etanol 100% (3 x 10' cada vez), mezcla 1:1 de etanol 100%: óxido de propileno (15'). Nota: el óxido de propileno, que es el diluyente de la resina, puede ser reemplazado por acetona.

d) **Inclusión:**

Se lleva la pieza a óxido de propileno (15').

Se lleva la pieza a una mezcla 1:1 de óxido de propileno y resina dura (Durcupán duro, ver *Recetas*). Se deja una noche en frasco cerrado en agitación suave a temperatura ambiente.

Se lleva el frasco abierto a estufa a 40 °C por 1-2 hs a fin de evaporar el óxido de propileno.

Se lleva la pieza a resina fresca y dejar una hora a temperatura ambiente.

Se lleva la pieza a resina fresca en molde adecuado y orientar la pieza bajo lupa.

Se lleva a estufa a 60°C por 24-48 horas a fin de que polimerice la resina.

e) **Cortes:** Se retiran las piezas de la estufa y se dejan enfriar. Se talla el taco y se realizan cortes seriados de 5 µm con cuchilla de vidrio en micrótopo bajo lupa. Cada uno de los cortes se acomoda delicadamente con ayuda de una pinza fina en una gota de agua destilada sobre un portaobjetos, con ayuda de otra lupa. El corte se seca sobre una placa caliente a 60-70°C por unos segundos a fin de estirarlo y adherirlo al vidrio.

f) **Coloración:** Una vez secos, los cortes se cubren con una solución de azul de metileno (ver *Recetas*). Se coloca el portaobjetos sobre una placa caliente (60-70°C) hasta observar un anillo dorado. Se lava con agua destilada, se secan los cortes y se cubren montándolos con Depex.

Los cortes se analizan en microscopio óptico y se toman fotografías.

Recetas

- **Buffer especial:**

- *Solución A* del buffer: llevar 11.30 g de ortofosfato dihidrógeno monobásico de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) a 500 ml con agua destilada. Disolver.

- *Solución B* del buffer: llevar 2.52 g de hidróxido de sodio (NaOH) a 100 ml con agua destilada. Disolver.

Para preparar el buffer se mezclan 83 ml de *Solución A* con 17 ml de *Solución B*. Se lleva a pH=7.30 con ClH ó NaOH. Cada 100 ml de buffer se adicionan 2.2 g de d-glucosa y 0.9 ml de una solución de Cl₂Ca 1% para ajustar la presión osmótica.

- Fijador especial:

-Glutaraldehído 2.5% y Paraformaldehído 2.0% en buffer fosfato especial.

Para preparar el fijador se disuelven 2 g de Paraformaldehído en 17 ml de *Solución B* de buffer en un erlenmeyer, en un baño de agua caliente que no exceda los 60°C. Cuando está completamente disuelto se agregan 83 ml de *Solución A* del buffer. Para completar se agregan 10 ml de Glutaraldehído 2.5%. Finalmente se ajusta a pH=7.30. Cada 100 ml de fijador se adicionan 2.2 g de d-glucosa y 0.9 ml de una solución de Cl₂Ca 1% para ajustar la presión osmótica.

- Durcupan duro:

Componente A, 11.3 g

Componente B, 10 g

Componente C, 0.2 g

Componente D, 0.5 g

Mezclar en agitador magnético el componente A con el B. Agregar el componente D y agitar 30 minutos. Agregar el componente C y agitar una hora. Se guarda en porciones de 2-5 ml en freezer a -20°C.

- Solución de Azul de metileno:

Agua destilada, 50 ml

Borato de sodio (Bórax), 0.5 g

Azul de Metileno, 0.5 g

Mezclar y filtrar.

Resultados

Descripción general de la omatidia de T. infestans

En la Figura 5.2 se muestra una representación esquemática de la omatidia de *T. infestans* en la que se observan sus elementos constituyentes. Los ojos compuestos de esta especie son del tipo de aposición con rabdoma abierto. Los rabdómeros de seis células retinulares (R1-R6) forman un anillo que encierra a un rabdómero central formado por las contribuciones de microvellosidades de la séptima (R7) y/u octava (R8) célula retinular (Fig. 5.3). En este trabajo no se pudo distinguir claramente las contribuciones de las células R7-8 dado que para ello es necesario reconocer los límites celulares. Esto solamente puede ser realizado observando las células a mayor aumento, en microscopio electrónico. El aparato dióptrico de las omatidias está compuesto de dos elementos: una córnea hemiesférica y un CC formado por cuatro células de Semper. Las dos CPPs que rodean el CC, las 24 CPSs que rodean cada omatidia y todas las células retinulares están densamente cargadas con pigmento pantalla (Fig. 5.4).

Los rabdómeros y la mayor parte de los pigmentos pantalla están localizados en la mitad distal de las células retinulares. La mitad proximal de estas células está ocupada por los núcleos y por gránulos de pigmento (Figs. 5.4 y 5.5). Además, en la vecindad de cada núcleo se pueden observar estructuras claras rodeadas de pigmento, conocidas como "esferoides" (Fig. 5.5). Estas estructuras, de función desconocida, no poseen membranas, y fueron también descritas en las células retinulares de la omatidia de *R. prolixus* (Müller 1970) y en los fotorreceptores del ocelo de *T. infestans* (Insausti 1997). Cerca de la membrana basal los axones de las células retinulares están rodeados de pigmento pantalla (Fig. 5.5). Los axones de estas células atraviesan la membrana basal y se dirigen a los lóbulos ópticos. Dado que la cabeza de *T. infestans* tiene forma tubular, los lóbulos ópticos, al igual que el resto del cerebro, se encuentran desplazados hacia la región posterior de la cabeza. Estas estructuras pares voluminosas están constituidas por tres neuropilos distintivos (*lamina*, *medula* y *lobula*) unidos por quiasmas (Fig. 5.6).

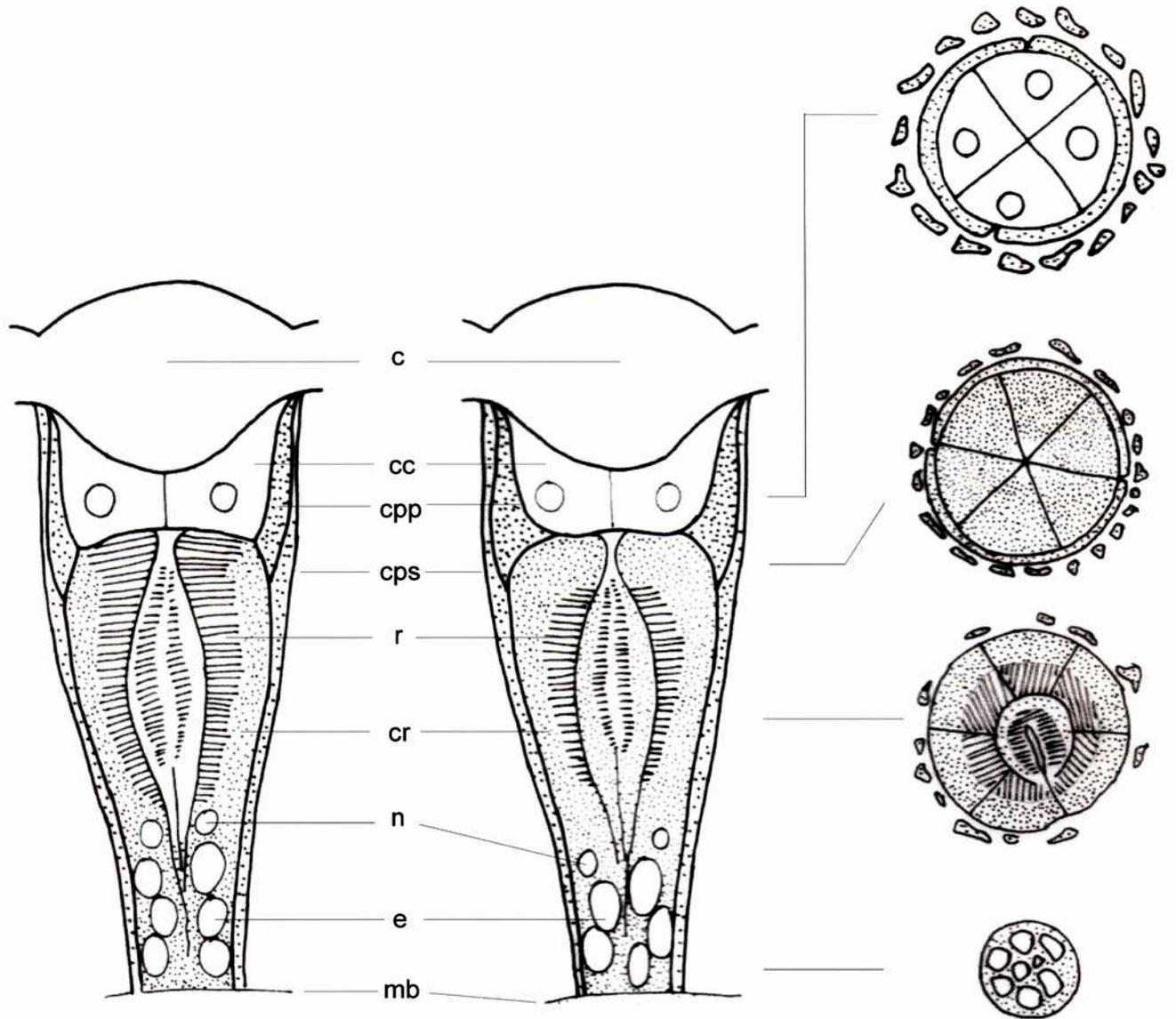


Figura 5.2: Representación esquemática de una omatidia de *T. infestans* adaptada a la oscuridad (izquierda) o a la luz (derecha). Se muestran secciones transversales a distintas alturas de la omatidia adaptada a la luz. c: córnea, cc: cono cristalino, cpp: célula pigmentaria primaria, cps: célula pigmentaria secundaria, cr: célula retinular, e: esferoide, mb: membrana basal, ncr: núcleo de la célula retinular, r: rabdómero.

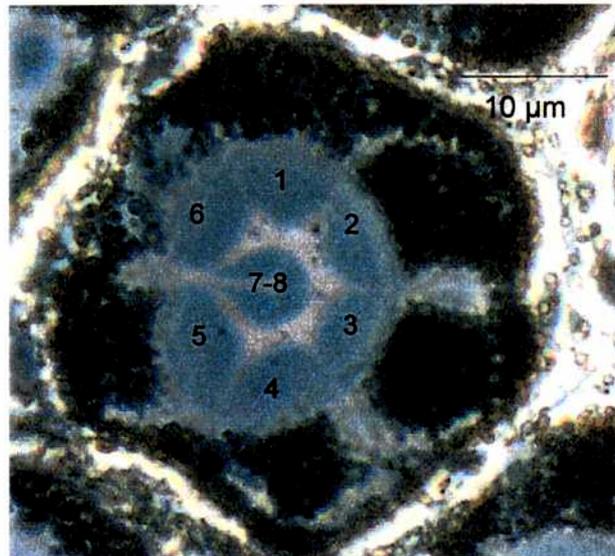


Figura 5.3: Sección transversal de una omatidia de *T. infestans* (adaptada a la oscuridad). Los rabdómeros de las células retinulares R1-6 (1-6) forman un anillo que encierra un rabdómero central dividido correspondiente a las células retinulares R7 y/u R8 (7-8).

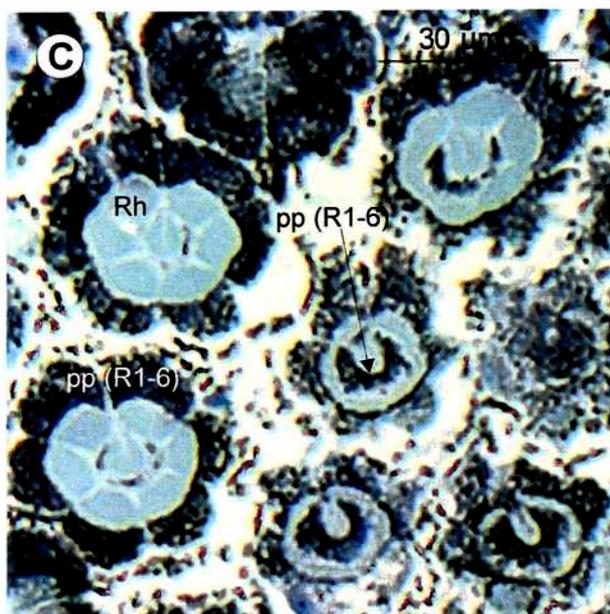
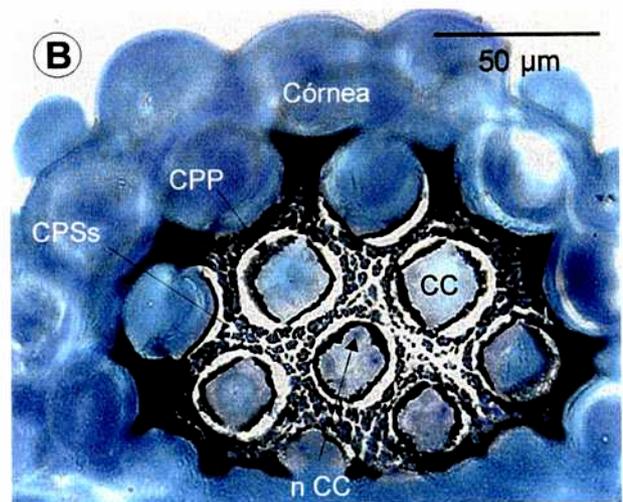
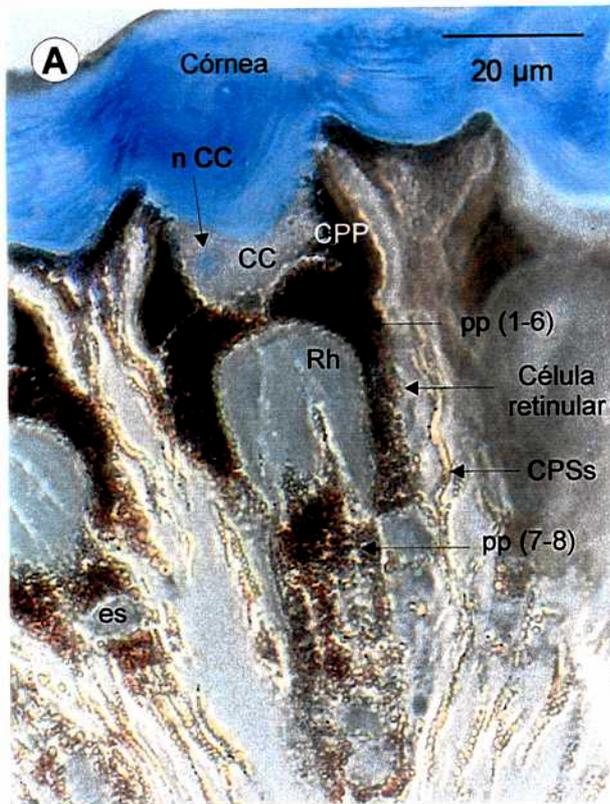


Figura 5.4: fotografías de omatidias mostrando sus elementos constituyentes (A: sección longitudinal, B: sección transversal distal, C: sección transversal proximal). CC: cono cristalino; es: esferoide; n CC: núcleo de las células del CC; pp (R1-6): pigmento pantalla de las células retinulares 1-6; pp (R7-8) pigmento pantalla de las células retinulares 7-8; Rh: rabdómero; CPP: célula pigmentaria primaria; CPSs: células pigmentaria secundarias.

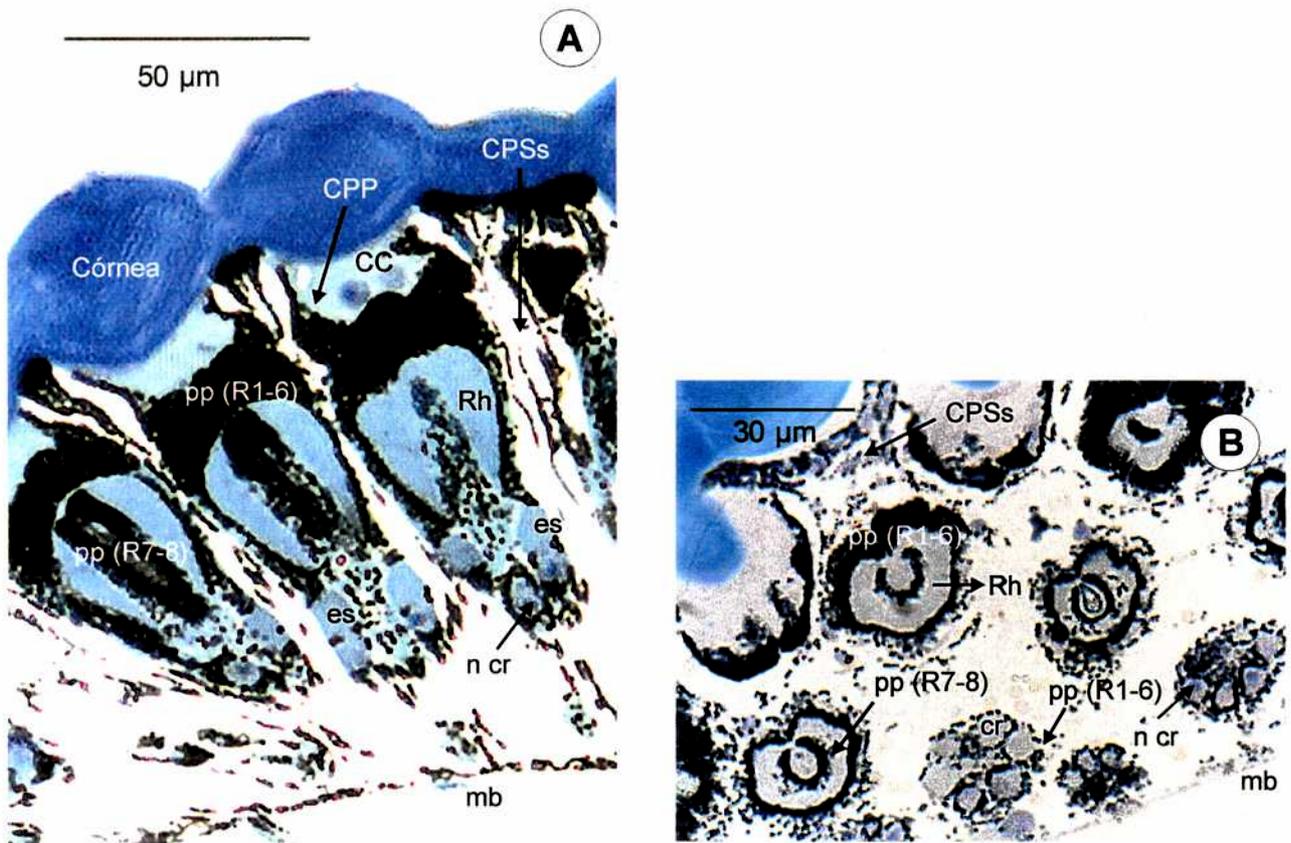


Figura 5.5: Secciones de omatidias (adaptadas a la luz) mostrando la distribución de pigmento y esferoides (A: sección longitudinal, B: sección transversal). La mayor parte del pigmento dentro de las células retinulares se encuentra en la porción distal de las células; los esferoides (es) y los núcleos de las células retinulares (n cr) se encuentran en la porción proximal. cr: célula retinular. Abreviaturas como en Fig. 5.4

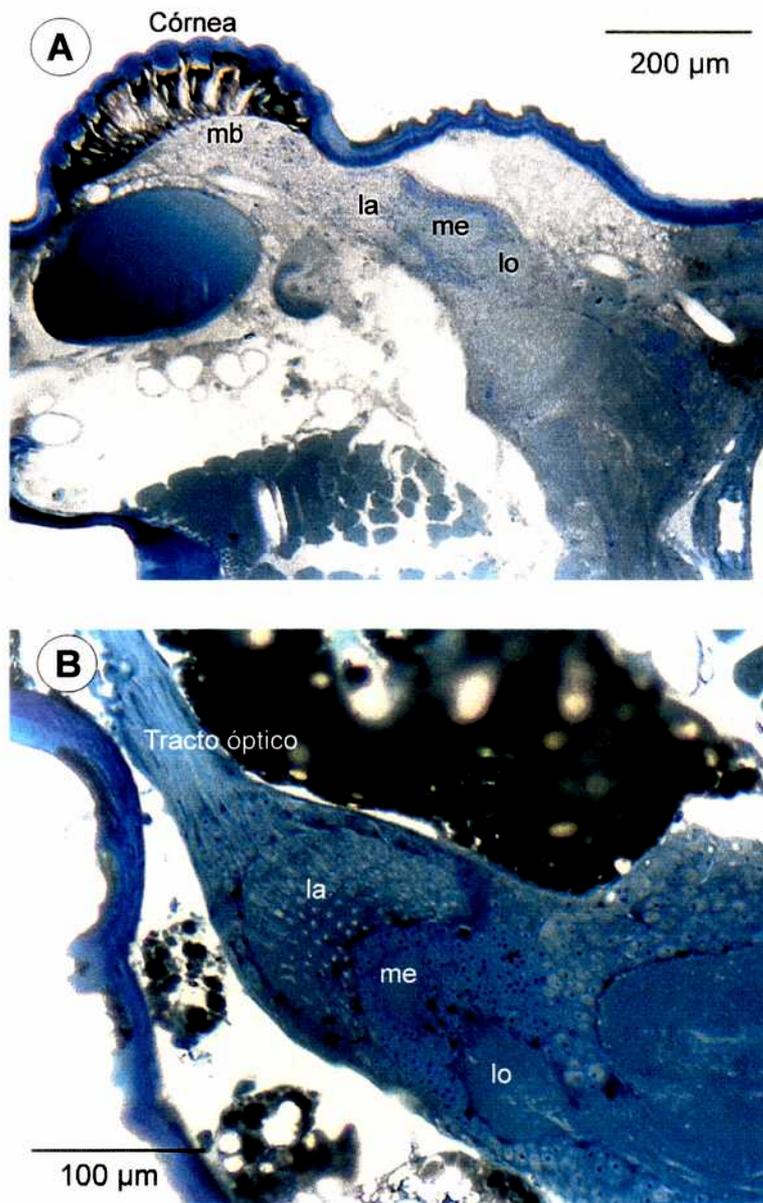


Figura 5.6: A: Sección longitudinal de la región posterior de la cabeza mostrando la disposición de los lóbulos ópticos (la: lamina, me: medula, lo: lobula) respecto de los ojos compuestos. B: detalle de los lóbulos ópticos. mb: membrana basal.

Cambios en la estructura omatidial bajo ciclos LD

Las omatidias de *T. infestans* experimentan cambios drásticos en respuesta a las condiciones de iluminación, especialmente en la posición de los pigmentos pantalla. Durante el día los pigmentos localizados en las células R1-R6 están dispersos en la región distal y forman, junto con los pigmentos de las CPPs, un "iris" de apertura reducida ($<5 \mu\text{m}$) frente al rabdómero central (Fig. 5.7). Los pigmentos localizados dentro de las células retinulares R7-8 están dispersos, rodeando el rabdómero central (Fig. 5.7). Por lo tanto, durante el día el anillo de rabdoma periférico está ópticamente aislado y los rayos de luz sólo pueden alcanzar el rabdómero central.

Durante la noche los pigmentos que forman el "iris" migran radialmente hacia la periferia de las células retinulares y de las CPPs. Durante este período la apertura omatidial ($24 \pm 1 \mu\text{m}$) es casi cinco veces mayor que durante el día (Fig. 5.8). Además, los pigmentos localizados en las células R7-8 migran longitudinalmente hacia la región proximal. Es decir, durante la noche la totalidad del rabdoma (el anillo periférico y rabdómero central) está expuesto. Además, el rabdoma se desplaza distalmente, ubicándose inmediatamente debajo del CC (Fig. 5.8.C). El rabdoma está aproximadamente $12 \pm 2 \mu\text{m}$ más cerca de la córnea durante la noche que durante el día, lo que disminuye la distancia focal efectiva f (Land et al. 1999). Tanto el aumento de la apertura como la disminución de la distancia focal durante la noche incrementarían la captura de luz, y con ello la sensibilidad visual.

En resumen, estas variaciones diarias permiten al ojo adaptarse a las condiciones de luz del ambiente, controlando el flujo de luz que alcanza los fotorreceptores.

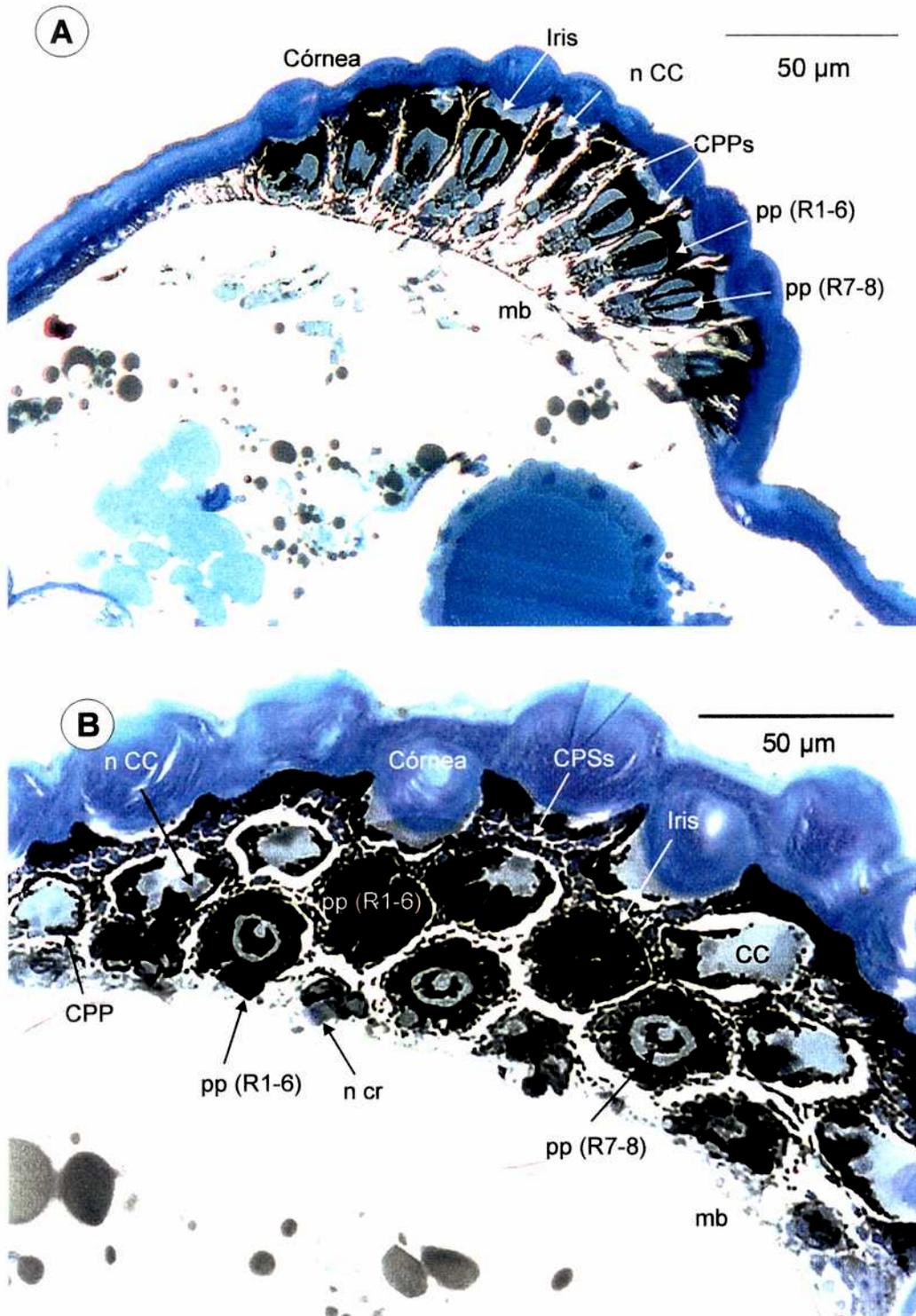


Figura 5.7: Secciones de omatidias de insectos mantenidos bajo ciclos LD fijadas durante el día (A: longitudinal, B: transversal). Los pigmentos de las células R1-R6 están dispersos en la región distal de las células formando, junto con los pigmentos de las CPPs, un "iris" de apertura reducida en el extremo distal del rabdoma; los pigmentos de las células R7-8 están dispersos, rodeando el rabdomero central. Abreviaturas como en las Figs. 5.4. y 5.5.

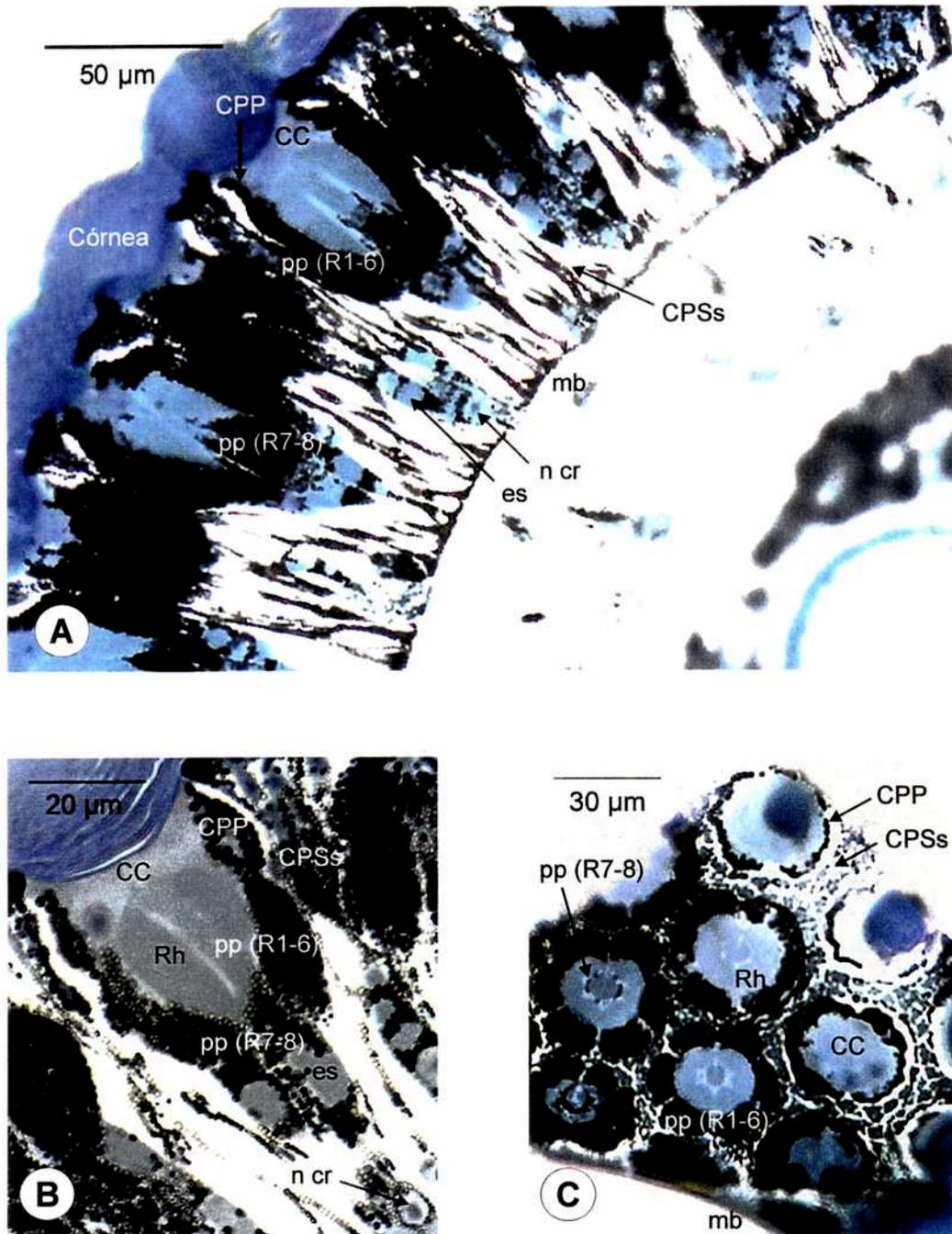


Figura 5.8: Secciones de omatidias de insectos mantenidos bajo ciclos LD fijadas durante la noche (A, B: longitudinal, C: transversal). Los pigmentos de las células R1-R6 y de las CPPs están concentrados en la periferia de las células; los pigmentos de las células R7-8 están concentrados en la porción proximal de las células. El rabdoma se ubica inmediatamente debajo del CC. Abreviaturas como en las Figs. 5.4. y 5.5.

Cambios en la estructura omatidial bajo condiciones constantes

Este experimento fue realizado a fin de estudiar si los cambios diarios en la estructura de las omatidias están bajo control endógeno. Para ello las vinchucas fueron transferidas de ciclos LD a condiciones constantes de luz (grupo LL) u oscuridad (DD). Si las variaciones diarias estuvieran bajo control endógeno, la estructura de las omatidias fijadas durante la noche o el día subjetivos debería ser similar a la de las omatidias fijadas durante la escotofase y fotofase respectivamente. Si en cambio el control fuera exógeno, la estructura omatidial de los insectos mantenidos en condiciones constantes debería ser en todo momento similar a la de los ojos adaptados a la oscuridad y luz respectivamente.

Las Figuras 5.9 y 5.10 muestran la estructura de las omatidias de insectos mantenidos bajo condiciones de oscuridad constante (DD). Durante el día subjetivo los pigmentos localizados en las células retinulares R1-6 y en las CPPs están dispersos, cerrando la apertura del "iris" (Fig. 5.9). Durante la noche subjetiva los pigmentos están concentrados en la periferia, aumentando la apertura omatidial (Fig. 5.10). Además, el rabdoma se desplaza distalmente, ubicándose inmediatamente debajo del CC. Es decir, la posición de los pigmentos y del rabdoma fue idéntica a la observada en los ojos de los insectos mantenidos en LD fijados durante la fotofase y escotofase respectivamente (comparar con las Figs. 5.7 y 5.8). Por lo tanto, podemos concluir que los cambios diarios en la posición del rabdoma y de los pigmentos que forman el "iris" están bajo control de un oscilador endógeno.

La Figura 5.10 muestra que durante la noche subjetiva los pigmentos de las células retinulares R7-8 están concentrados proximalmente, en la misma posición que la observada en los ojos de los insectos mantenidos en ciclos LD fijados durante la escotofase. Este resultado es predecible y explicable por ambas hipótesis (control endógeno u exógeno), dado que las omatidias fueron fijadas durante la noche subjetiva en condiciones de oscuridad. La Figura 5.9 muestra que durante el día subjetivo los pigmentos están localizados en una posición intermedia ($57 \pm 3\%$) entre los extremos proximal y distal de las células retinulares R7-8 (i.e., $14 \pm 2 \mu\text{m}$ más cerca). Estos resultados indican que la posición de los pigmentos pantalla en las células retinulares R7-8 está determinada tanto por factores endógenos (momento del día) como exógenos (condiciones de luz del ambiente). Si el control fuera exclusivamente endógeno los pigmentos deberían estar totalmente dispersos, alcanzando el extremo distal de las células. Del mismo modo, si los pigmentos

respondieran directamente a las condiciones ambientales (oscuridad), deberían estar concentrados proximalmente.

En las Figuras 5.11 y 5.12 se observa la estructura de las omatidias de insectos mantenidos bajo condiciones de luz constante (LL: 140 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$). Tanto durante la noche como durante el día subjetivo los pigmentos se encontraban dispersos, en la misma posición que la observada durante la fotofase (insectos mantenidos en LD, comparar con la Fig. 5.9). Los pigmentos de las células retinulares R1-6 y de las CPPs estaban dispersos, cerrando la apertura del "iris", mientras que aquellos localizados en las células R7-8 se encontraban esparcidos rodeando el rabdómero central. Es decir, la luz dispersa la migración de los pigmentos independientemente del momento del día.

En resumen, en condiciones de oscuridad constante la posición de los pigmentos que forman el iris distal evidencia estar bajo el control de un reloj circadiano. La posición de los pigmentos localizados dentro de las células retinulares R7-8 está determinada por influencias tanto endógenas como exógenas. En condiciones de luz constante este ritmo endógeno es enmascarado por la adaptación directa del ojo a la luz ambiente.

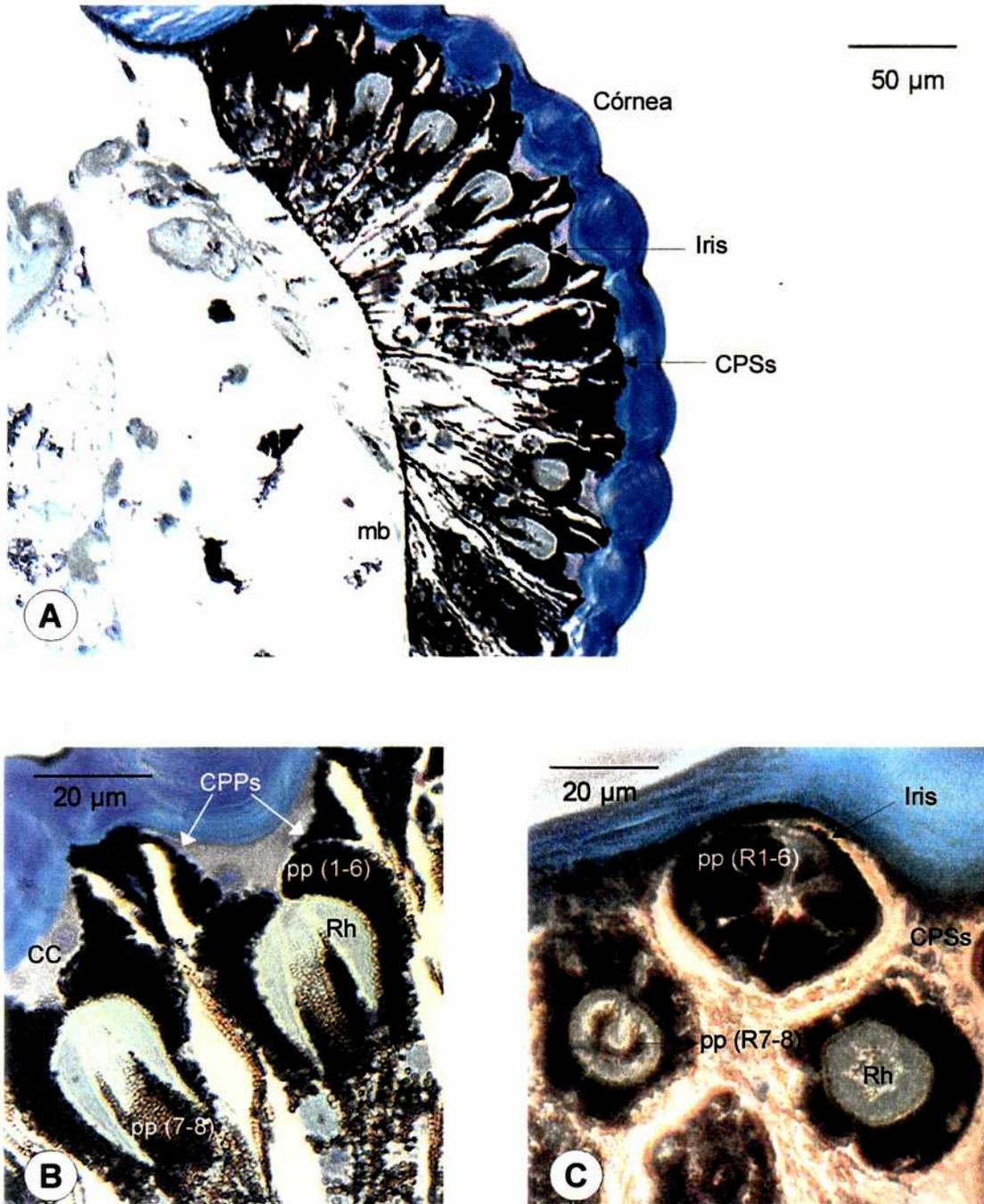


Figura 5.9: Secciones de ommatidias de insectos mantenidos bajo DD fijadas durante el día subjetivo (A: longitudinal, B: transversal). Los pigmentos de las CPPs y de las células R1-6 están dispersos formando un "iris" en el extremo distal del rabdoma; los pigmentos de las células R7-8 están dispersos alcanzando una posición intermedia. Abreviaturas como en las Figs. 5.4 y 5.5.

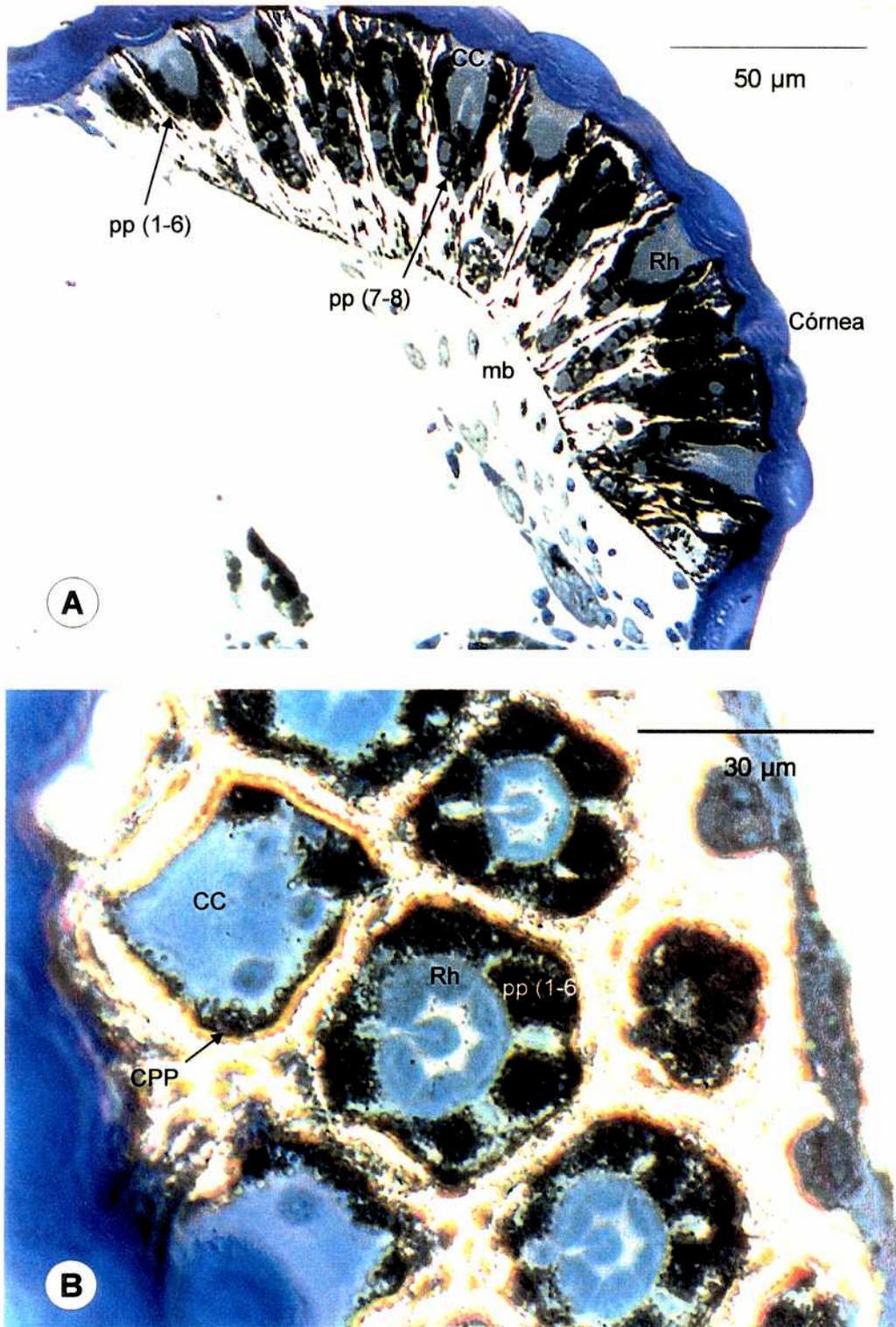


Figura 5.10: Secciones de ommatidias de insectos mantenidos en DD fijadas durante la noche subjetiva (A: longitudinal, B: transversal). Los pigmentos de las CPPs y de las células R1-6 están concentrados en la periferia de las células; los pigmentos de las células R7-8 están concentrados en la porción proximal de las células; el rabdoma se ubica inmediatamente debajo del CC. Abreviaturas como en las Figs. 5.4. y 5.5.

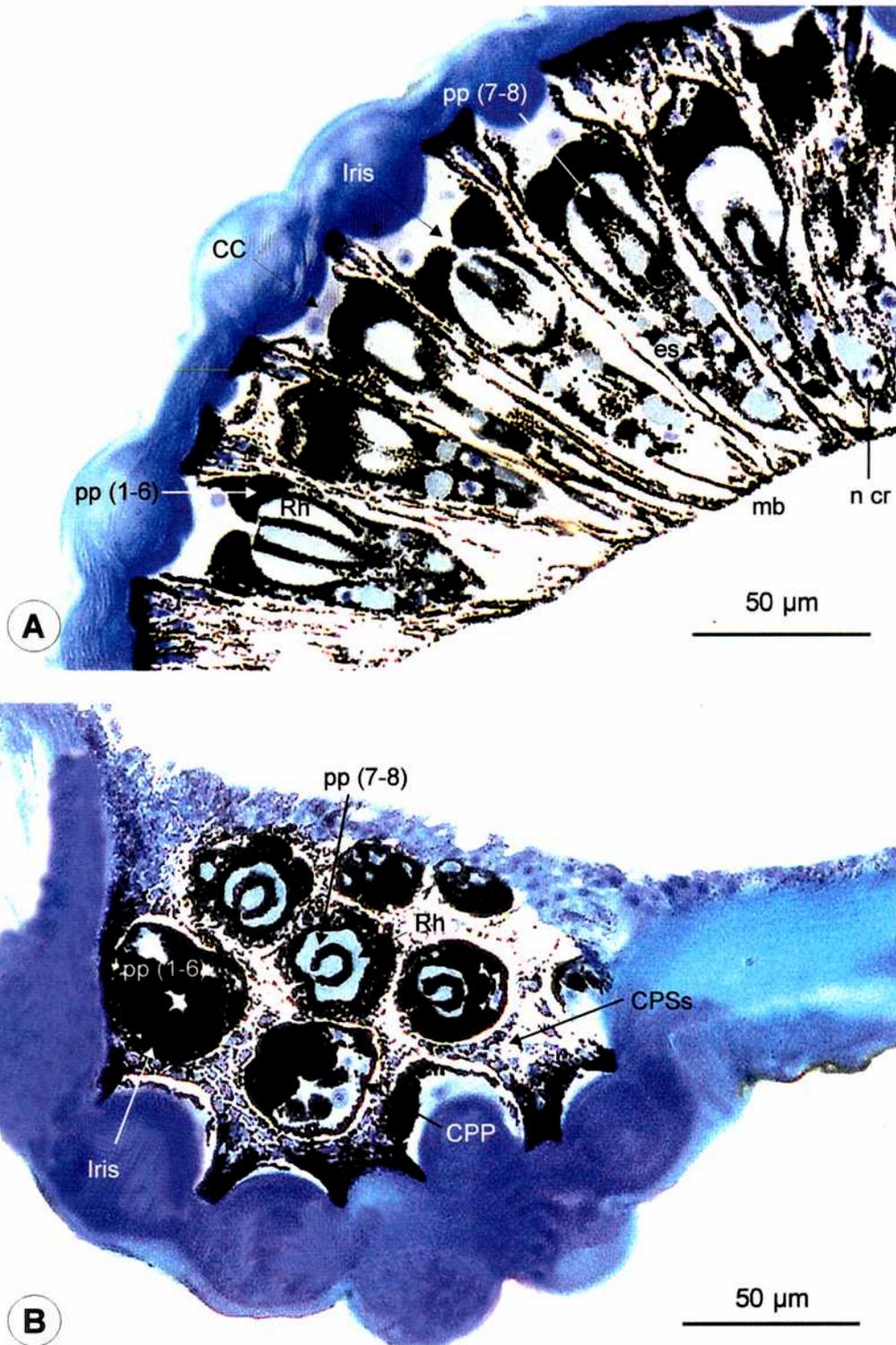


Figura 5.11: Secciones de ommatidias de insectos mantenidos en LL fijadas durante el día subjetivo (A: longitudinal, B: transversal). Los pigmentos pantalla de las CPPs y de las células R1-6 están dispersos formando un “iris” de apertura reducida en el extremo distal del rabdoma; los pigmentos de las células R7-8 están dispersos. Abreviaturas como en las Figs. 5.4. y 5.5.

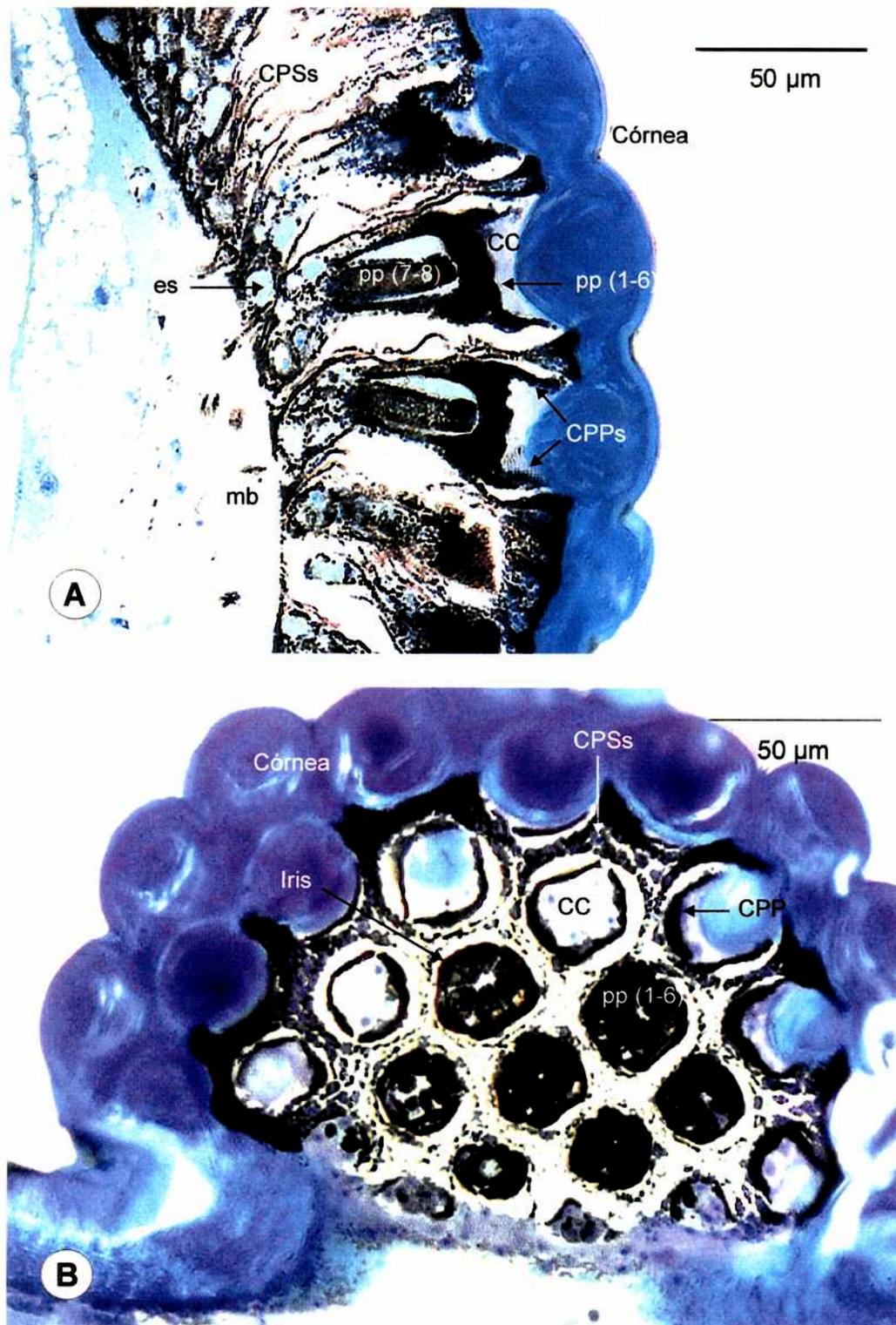


Figura 5.12: Secciones de omatidias de insectos mantenidos en LL fijadas durante la noche subjetiva (A: longitudinal, B: transversal). Los pigmentos pantalla de las CPPs y de las células R1-6 están dispersos formando un "iris" de apertura reducida en el extremo distal del rabdoma; los pigmentos de las células R7-8 están dispersos. Abreviaturas como en las Figs. 5.4. y 5.5.

Efecto de la intensidad de luz

Como hemos visto en la sección anterior, el ritmo diario de migración de pigmentos no se expresa en condiciones constantes de luz (LL: 140 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$). En estas condiciones la luz dispara la migración de pigmentos independientemente del momento del día. Este efecto de la luz sobre la expresión de los ritmos es muy común, e incluso en muchos insectos se manifiesta a muy bajas intensidades (Aschoff 1981). Dado que esto también podría estar ocurriendo en el caso de *T. infestans*, se repitieron los experimentos presentados en la sección anterior, pero a una intensidad de luz mucho menor (8 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$).

En la Figura 5.13 se observa la estructura de las omatidias de insectos entrenados a ciclos LD y fijadas durante la fotofase y la escotofase. Esta figura muestra que la intensidad de luz durante la fotofase (8 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) fue suficiente para entrenar el ritmo: durante el día los pigmentos se encontraban dispersos (Fig. 5.13. A, C), y concentrados en posición periférica durante la noche (Fig. 5.13. B, D). Estas variaciones fueron idénticas a las observadas en el caso de los insectos entrenados a ciclos LD con una intensidad de 140 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (comparar con la Fig. 5.7).

En la Figura 5.14 se observa la estructura de las omatidias de insectos mantenidos en LL (8 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$). Tanto durante la noche (A, C) como durante el día subjetivo (B, D) los pigmentos que forman el "iris" y aquellos localizados en las células R7-8 se encontraban dispersos, por lo que los rayos de luz solamente podían alcanzar el rabdómero central. Es decir, la posición de los pigmentos fue idéntica a la observada en las omatidias adaptadas a la luz tanto a 8 como a 140 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (comparar con Figs. 5.7, 5.11, 5.12, 5.13).

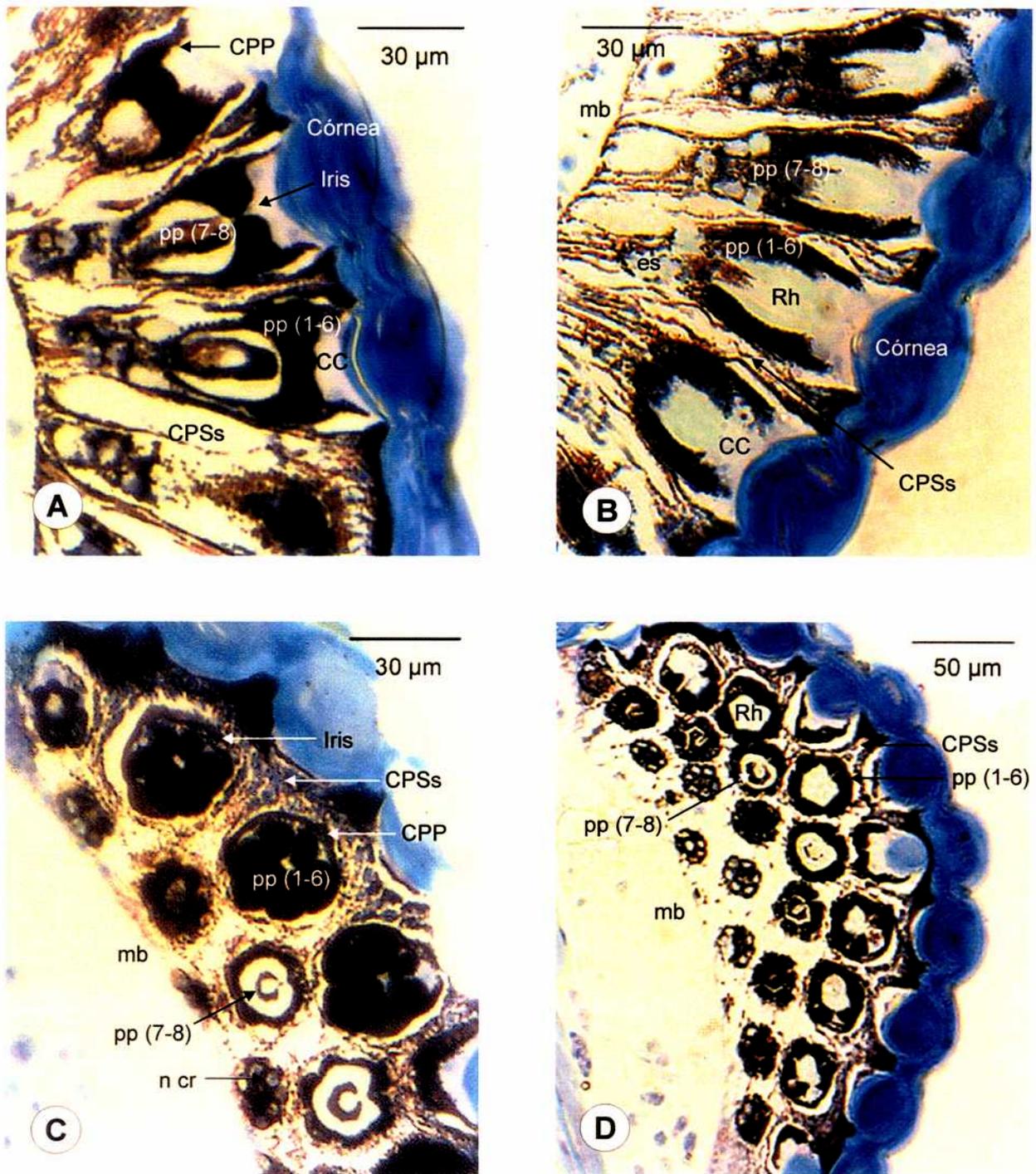


Figura 5.13: Secciones de ommatidias de insectos mantenidos bajo ciclos LD ($8 \mu\text{W}/\text{cm}^2$: $0.00 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) fijadas durante el día (A, C) y durante la noche (B, D). (A, B: secciones longitudinales; C, D: secciones transversales). La posición de los pigmentos pantalla y del rabdoma durante estos dos momentos es idéntica a la observada en las Figs. 5.7 y 5.8 respectivamente. Abreviaturas como en las Figs. 5.4 y 5.5.

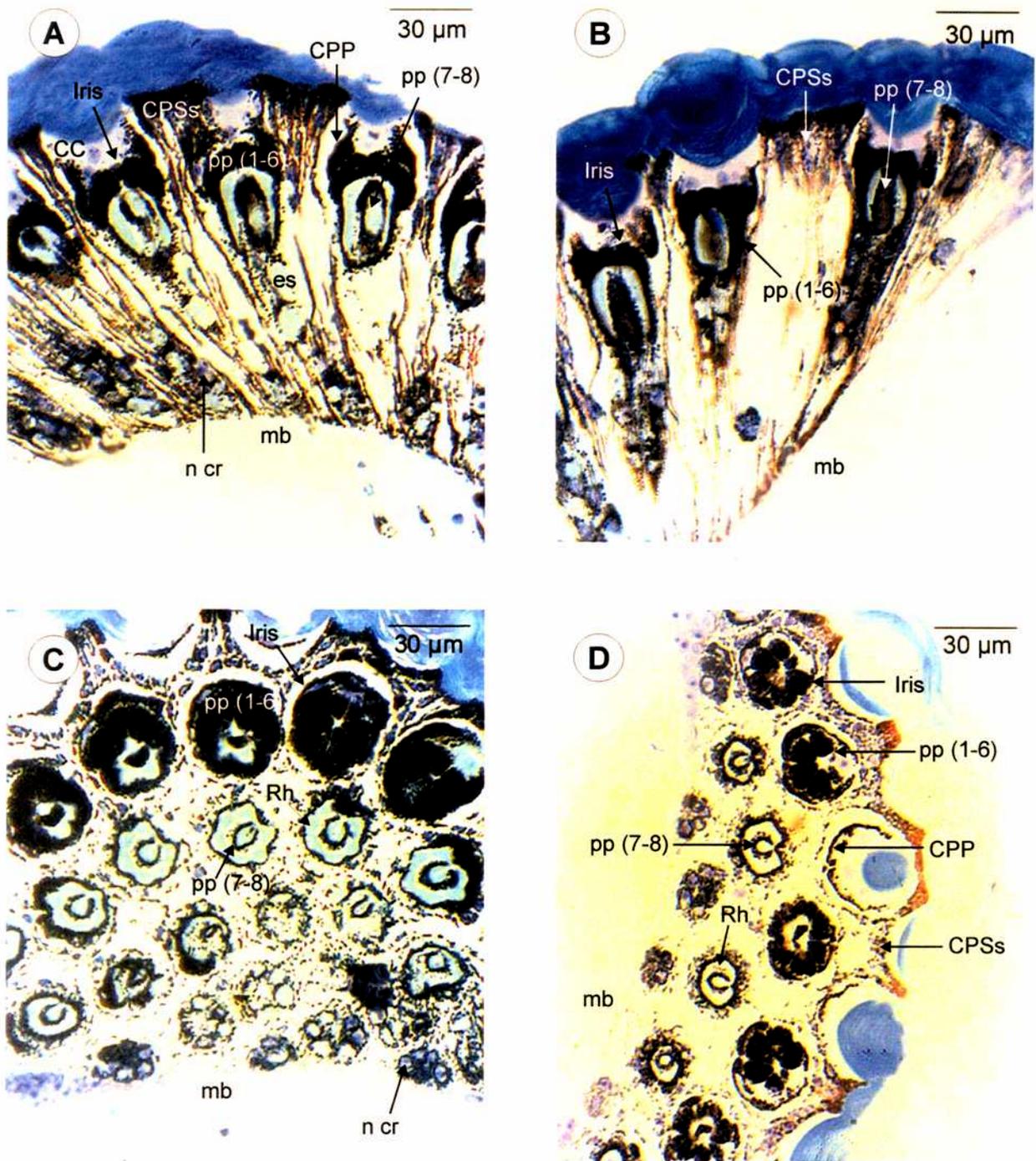


Figura 5.14: Secciones de ommatidias de insectos mantenidos en LL ($8 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) fijadas durante el día subjetivo (A, C) y durante la noche subjetiva (B, D). (A, B: secciones longitudinales; C, D: secciones transversales). En ambos casos la posición de los pigmentos pantalla fue idéntica a la observada en las Figs. 5.11 y 5.12, respectivamente. Abreviaturas como en las Figs. 5.4 y 5.5.

Discusión

La omatidia de T. infestans y los fenómenos de adaptación visual

Los ojos compuestos de *T. infestans* son del tipo de aposición con rabdoma abierto. Los rabdómeros de las células retinulares R1-6 se disponen en un anillo que rodea a un rabdómero central dividido, correspondiente a las células retinulares R7 y/o R8 (Fig. 5.3). Se encuentran gránulos de pigmento pantalla en las ocho células retinulares, en las CPPs y en las CPSs (Figs. 5.4 y 5.5). La posición de estos pigmentos cambia en respuesta a las condiciones de luz. Durante el día los pigmentos localizados en las células R1-R6 están dispersos en la región distal y forman, junto con los pigmentos de las CPPs, un "iris" de apertura reducida en el extremo distal del rabdómero central (Fig. 5.7). Además, los pigmentos localizados dentro de las células retinulares R7-8 están dispersos, rodeando el rabdómero central (Fig. 5.7). Por lo tanto, durante el día los rayos de luz sólo pueden alcanzar los fotorreceptores ubicados en el rabdómero central. Durante la noche los pigmentos del "iris" se concentran en la periferia de las células, y los localizados en las células R7-8 migran proximalmente. Además, el rabdoma se desplaza distalmente ubicándose inmediatamente debajo del CC (Fig. 5.8.C). Por lo tanto, durante la noche la totalidad del rabdoma está expuesto, y además disminuye la distancia córnea-rabdoma (i.e., la distancia focal). Estas variaciones diarias en la distribución de pigmento pantalla controlan el flujo de luz que alcanza los fotorreceptores, adaptando al ojo a las condiciones de luz del ambiente.

¿Cómo se relacionan estos cambios con los observados en otros insectos? En los ojos de aposición se reconocen varios tipos de cambios en respuesta a las condiciones de luz (8.1): 1) cambios en la distancia focal (*Lethocerus sp.*: Walcott 1971a; *Camponotus sp.*: Menzi 1987); 2) cambios en el diámetro de los rabdomas (langostas y mántidos: Horridge et al. 1981); 3) cambios en la apertura de un "iris" pigmentario situado frente al extremo distal del rabdómero central (ver más abajo); 4) cambios en el índice de refracción del medio que rodea el rabdoma, como consecuencia de los movimientos radiales de pigmento dentro de las células retinulares (Lepidoptera: Bernhard et al. 1963; Autrum 1981; *Camponotus sp.*: Menzi 1987). Los resultados presentados en este trabajo muestran que el ojo de *T. infestans* presenta varios de estos cambios en respuesta a las condiciones de luz: cambios en la distancia focal, en la apertura pigmentaria (formada por las células R1-6 y por las CPPs) y en la composición del medio que rodea el rabdómero central.

En particular, las variaciones en el diámetro del "iris" pigmentario son comunes en insectos que poseen ojos de aposición de rabdoma abierto sin superposición neural (Nilsson 1989a). Sin embargo, el ojo de *T. infestans* presenta algunas particularidades respecto de otros insectos que poseen ojos similares: en la vinchuca *R. prolixus* este "iris" está formado solamente por los pigmentos de las células R1-6 (Müller 1970), mientras que en el escarabajo diurno *Tenebrio molitor* (Coleoptera) y en la chinche de agua *Lethocerus sp.* (Hemiptera) está formado únicamente por los pigmentos de las CPPs (Wada y Schneider 1968, Walcott 1971a). Además, en varias especies con este tipo de ojo son usuales la formación de un tracto cristalino angosto y los movimientos de rabdoma en respuesta a la luz (*Notonecta glauca*: Lüdtke 1953; Wada y Schneider 1967; *Lethocerus sp.*: Walcott 1971a). En contraste, si bien en *T. infestans* hemos observado pequeños cambios en la distancia focal producto de los movimientos de rabdoma, no se han observado variaciones en la forma y/o tamaño del CC. Finalmente, entre las especies con este tipo de ojo, solamente en *T. infestans* y en *R. prolixus* se encuentra pigmento pantalla en las células R7-8. La disposición de pigmento alrededor del rabdómero central durante el día (Figs. 5.7, 5.8, 5.13) impide la dispersión de luz al anillo de rabdoma periférico. Pero además, esta disposición de pigmento mejoraría la eficiencia del rabdómero central como guía de onda, mejorando la resolución espacial durante el día (Warrant y McIntyre 1993). Esta solución al problema de los rabdomas que funcionan como guías de onda ha sido observada en algunas especies que poseen ojos de aposición de rabdoma fusionado, tales como algunas mariposas y moscas (Nilsson 1989a).

¿Cómo se relacionan este tipo de cambios con las variaciones en la sensibilidad visual? La amplitud de la variación en la sensibilidad visual entre los extremos de adaptación a la luz y a la oscuridad es mucho mayor en los ojos de superposición que en los de aposición (cuatro vs. dos unidades logarítmicas) (Warrant y McIntyre 1990). Generalmente, en los ojos de superposición estas variaciones son producto de 1) los cambios en la ganancia de transducción de los fotorreceptores y de 2) las migraciones de pigmento en las CPSs (Bernhard et al. 1963, Bennett 1983; Warrant y McIntyre 1990). En los ojos de aposición no existe un único patrón: en algunas especies diurnas las variaciones de sensibilidad están relacionadas únicamente con cambios en la ganancia de los fotorreceptores (Bernhard et al. 1963, Warrant y McIntyre 1990, Ferrell y Reitcheck 1993), mientras que en la chinche de agua *Lethocerus sp.* dichas variaciones (que alcanzan hasta tres órdenes de magnitud) son producto de los cambios en la distancia focal (Walcott

1971b). En el caso de *T. infestans*, en el Capítulo anterior vimos que la sensibilidad fotonegativa de esta especie muestra un ritmo diario. Podría ocurrir entonces que la modulación de la sensibilidad visual esté relacionada con los cambios que hemos observado en la apertura omatidial y en la distancia focal. Sin embargo es necesario realizar estudios electrofisiológicos a fin de determinar el aporte de estas variaciones. Es muy probable que, tal como ocurre en muchos artrópodos (Autrum 1981), exista una diversidad de mecanismos actuando en forma simultánea a fin de incrementar la sensibilidad visual.

¿Existe una relación entre la estructura óptica de los ojos y las condiciones de luz que un animal experimenta en su ambiente natural? Esta cuestión ha sido estudiada en varias especies de mosquitos de hábitos distintos. Se demostró que las especies nocturnas, a diferencia de las especies diurnas, poseen lentes hemiesféricas, una distancia focal corta, rabdomas fusionados de gran sección (lo que garantiza que toda la luz que alcanza al rabdoma sea efectivamente absorbida), y experimentan cambios adaptacionales notorios en respuesta a las condiciones de iluminación (Land et al. 1999). ¿Cómo se relaciona la estructura del ojo de *T. infestans* con sus hábitos? Por un lado, el gran diámetro de las facetas y los cambios drásticos en respuesta a las condiciones de iluminación ubican al ojo de *T. infestans* como uno típicamente nocturno. Sin embargo las vinchucas poseen un ojo de rabdoma abierto, una característica asociada con la visión diurna (Land et al. 1999). Si bien *T. infestans* es una especie nocturna, su patrón de actividad se halla repartido en dos ventanas temporales discretas, el anochecer y el amanecer (Lazzari 1992). Es decir, su sistema visual debería ser capaz de operar en un intervalo amplio de intensidades de luz, razón por la cual sería esperable que el ojo de estos insectos presente características tanto diurnas como nocturnas. Los resultados presentados en este Capítulo apoyan esta hipótesis. Durante el día solamente el rabdómero central está expuesto y la resolución sería bastante buena (dada la pequeña apertura omatidial). Tal como ocurre en algunos dípteros con ojo de rabdoma abierto (sin superposición neural), los movimientos de pigmento evitarían la saturación de los fotorreceptores, optimizando la relación señal-ruido a altas intensidades de luz (Järemo Jonson et al. 1998). Durante la noche todos los rabdómeros están expuestos, por lo que aumentaría la sensibilidad visual pero a expensas de una disminución en la resolución espacial (Nilsson 1989a, Warrant y McIntyre 1990). Es probable que la disminución de la resolución durante este período no sea un problema para las vinchucas, dado que en principio sería más importante la detección de movimientos y cambios bruscos en el panorama,

teniendo en cuenta el papel dual de sus hospedadores, como fuente de alimento y como predador potencial (Lazzari y Varjú 1990, Lehane 1991).

Como hemos mencionado, la disposición de rabdoma abierto que hemos observado en *T. infestans* ha sido descrita en varias especies de hemípteros, dermápteros, y en los dípteros superiores. Solamente en este último grupo dicha disposición ha sido asociada al principio de superposición neural (ver Capítulo 2). ¿Cuál es entonces el significado funcional de un arreglo rabdomérico de este tipo en *T. infestans*, si no está asociado al principio de superposición neural? Como hemos visto en los párrafos precedentes, el papel de esta clase de rabdoma podría estar relacionado con los cambios frente a las distintas condiciones de iluminación, una situación similar a la observada en *Lethocerus sp.* (Ioannides y Horridge 1975). El rabdómero central de *T. infestans* constituiría un sistema *fotópico* de baja sensibilidad y alta resolución, mientras que el anillo de rabdómero periférico sería funcional sólo como un sistema *escotópico* de alta sensibilidad pero de poca resolución (Nilsson 1989a).

Finalmente, cabe mencionar que a fin de tener un completo panorama acerca de las capacidades del ojo de *T. infestans* y del papel funcional de esta clase de ojo es necesario analizar las proyecciones neuroanatómicas de las células retinulares, y estudiar la sensibilidad del sistema visual mediante métodos electrofisiológicos. No hay razones para suponer que exista un único patrón asociado a una misma función (optimizar la sensibilidad de acuerdo a las condiciones del ambiente) en un sistema tan variado como ha mostrado ser el sistema visual de los artrópodos.

Cambios en la estructura omatidial bajo condiciones constantes

En las Figuras 5.9 y 5.10 se muestra que los cambios diarios en la posición del rabdoma y de los pigmentos que forman el "iris" están bajo control de un oscilador endógeno. Estas variaciones persistieron en condiciones de oscuridad constante (DD): durante el día subjetivo los pigmentos se encontraban dispersos, y concentrados en la periferia durante la noche subjetiva, a la vez que el rabdoma se ubicaba inmediatamente debajo del CC. La posición de los pigmentos localizados en las células R7-8 mostró estar bajo influencias tanto endógenas como exógenas. Durante la noche subjetiva los pigmentos de las células R7-8 estaban concentrados proximalmente (Fig. 5.10), mientras que durante el día subjetivo estaban localizados en una posición intermedia (Fig. 5.9).

En varios insectos que poseen ojos de superposición se han descrito ritmos circadianos de migración de pigmento pantalla en las CPSs (e.g., *Onitis alexis* (Coleoptera): Warrant y McIntyre 1990; *Manduca sexta* (Lepidoptera): Bennett 1993). Entre los insectos con ojos de aposición, los movimientos circadianos de pigmento han sido descritos solamente en las CPPs del escarabajo de la harina *Tenebrio molitor* (Coleoptera) (Wada y Schneider 1968). En contraste, en *T. infestans* la posición tanto de los pigmentos localizados dentro de las células retinulares (R1-6) como dentro de las CPPs está bajo control endógeno, una situación similar a la observada en un quelicerado, el cangrejo balloneta *Limulus sp.* (Barlow et al. 1980; Kier y Chamberlain 1990). Aún más, en *T. infestans* la posición de los pigmentos en las células retinulares R1-6 está bajo control endógeno, mientras que en las células retinulares R7-8 la distribución de los pigmentos está determinada por el efecto conjunto de un oscilador circadiano y de las condiciones ambientales. Es decir, aún en un mismo tipo celular encontramos dos mecanismos de control de la sensibilidad visual actuando en forma superpuesta: 1) un mecanismo que opera en forma endógena, y que tendría un gran valor adaptativo dado que ajusta la sensibilidad visual en forma anticipada a los cambios ambientales; 2) un mecanismo exógeno que ajustaría rápidamente la sensibilidad del ojo frente a cambios súbitos en la intensidad de luz del ambiente. En otras especies también se ha descrito la coexistencia de mecanismos endógenos y exógenos, pero en distintos tipos celulares de la omatidia. En *T. molitor* los movimientos de pigmento están bajo control endógeno (Wada y Schneider 1968), mientras que los cambios en la longitud del CC se producen en respuesta directa a la luz (Wada y Schneider 1967). En *Procambarus clarkii* (Decapoda: Crustacea) los movimientos de pigmento en las CPSs están bajo control de un oscilador circadiano, mientras que los pigmentos de las células retinulares se mueven en respuesta a las condiciones ambientales (Aréchiga et al. 1993, Aréchiga y Rodríguez-Sosa 1997).

Estos mecanismos de control endógeno no solo ajustan la sensibilidad en forma anticipada a los cambios ambientales. En *T. infestans*, la existencia de un ritmo de este tipo es además ventajosa si, por ejemplo, el animal sale del refugio durante el día. Si esto ocurriera tanto la sensibilidad como la resolución del ojo estarían optimizadas para operar en las condiciones de luz diurnas.

La alteración del ritmo en LL

Los cambios diarios en la posición de los pigmentos pantalla y del rabdoma no fueron observados en condiciones de luz constante (LL: 8 ú 140 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$). En todo momento los pigmentos estaban dispersos, cerrando la apertura del "iris" y rodeando el rabdómero central (Figs. 5.11, 5.12 y 5.14). Es decir, la condición ambiental tiene un efecto "enmascarador" sobre la expresión del ritmo (Aschoff 1960). En el caso de *T. infestans* esta respuesta directa de los pigmentos a la luz protegería a las membranas rabdoméricas de daños permanentes, y a la rodopsina de una excesiva fotoconversión a su estado inactivo (metarodopsina) (Schwemer 1989, Stavenga 1989, Järemo Jonson et al. 1998). Este efecto de luz sobre los mecanismos de adaptación visual ha sido descrito en varios casos. Por ejemplo, independientemente del momento del día, la luz provoca la formación del tracto cristalino en las células del cono en varias especies de insectos (Meyer-Rochow 1999), y la ruptura del microvilli y los movimientos de pigmento en *Limulus sp.* (Chamberlain y Barlow 1979, Barlow 1980, Kier y Chamberlain 1990).

Teniendo en cuenta el papel dual de la luz como agente sincronizador y como estímulo disparador de la migración de pigmentos, sería interesante analizar si este ritmo puede ser sincronizado por algún *Zeitgeber* distinto del ciclo LD. En particular, se ha demostrado que en ausencia de variaciones de luz los ciclos de temperatura pueden sincronizar los ritmos de migración de pigmentos en el ojo de polillas, mariposas, moscas y de varias especies de crustáceos (Nordström et al. 2000). Es probable que esto también ocurra en *T. infestans*, dada la capacidad de los ciclos de temperatura de sincronizar el ritmo circadiano de actividad locomotora en esta especie (Lazzari 1992).

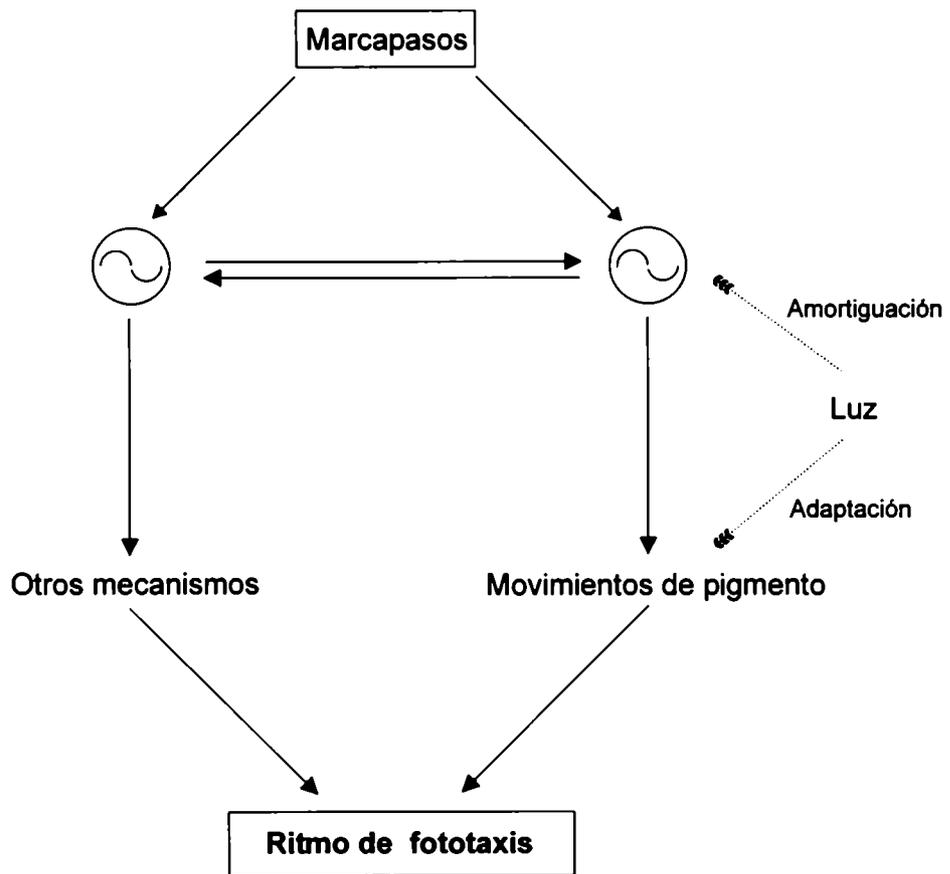
El reloj

En los insectos las hormonas no parecen estar involucradas en el control de los ritmos circadianos de sensibilidad visual (Weyrauther 1986, Barlow et al. 1989). Si bien no se conoce con exactitud la localización del reloj, en varias especies los ritmos de fotosensibilidad estarían controlados por osciladores localizados en los lóbulos ópticos (Giebultowicz 1999). Por ejemplo, en la cucaracha *L. maderae* un marcapasos central formado por dos osciladores bilaterales localizado cerca de cada lobula controla los ritmos circadianos de ERG y de actividad locomotora (Wills et al. 1985, Page 1990). En *Musca domestica* y en *Drosophila sp.* otros ritmos

relacionados con los fenómenos de adaptación visual están controlados por un oscilador localizado en las células gliales de la lamina (Giebultowicz 1999).

La desaparición del ritmo de migración de pigmentos en LL es un efecto característico de la mayoría de ritmos "fisiológicos" y de "desarrollo" (e.g., eclosión del huevo, liberación de hormonas, eclosión de la pupa) (Saunders 1982). En contraste, el ritmo circadiano de sensibilidad fotonegativa de *T. infestans* persiste tanto en DD en LL, tal como ocurre con los ritmos de actividad locomotora y la mayoría de los ritmos de comportamiento (Saunders 1982). Por lo tanto, dada la expresión diferencial de estos dos ritmos de naturaleza diferente (i.e., fisiológica y comportamental), el ritmo circadiano de migración de pigmentos no puede explicar por sí mismo el ritmo circadiano de fototaxis (dado que el primero no persiste en LL).

El esquema que se muestra a continuación ilustra una hipótesis que explica los fenómenos de adaptación visual en *T. infestans*. Un marcapasos u oscilador maestro central controlaría otros osciladores esclavos, los cuales actuarían en forma más o menos acoplada. Estos osciladores controlarían los movimientos los movimientos de pigmento pantalla, los posibles cambios bioquímicos y en la ganancia de los fotorreceptores, etc. La luz actuaría directamente sobre el ojo controlando la migración de pigmentos (adaptación), o bien actuaría amortiguando la expresión del oscilador. En cualquier caso, el resultado final sería el mismo: la salida del sistema es un ritmo circadiano de sensibilidad fototáctica, que persiste tanto en DD como en LL.



CAPÍTULO 6: EL PAPEL DE LOS OCELOS EN EL COMPORTAMIENTO FOTOTÁCTICO NEGATIVO DE *T. INFESTANS*

Introducción

Como hemos mencionado en el Capítulo 2, los ocelos son órganos fotorreceptores simples que tienen poca resolución espacial, pero son superiores a los ojos compuestos con respecto a la sensibilidad y a la velocidad de transmisión sináptica. Hasta el presente, no se ha podido establecer una función general para los ocelos, si bien estas estructuras visuales han sido el objeto de numerosos estudios anatómicos, fisiológicos y comportamentales. La función de los ocelos ha sido particularmente estudiada en insectos considerados “buenos voladores”, tales como abejas, avispas, moscas, alcuaciles y libélulas. Entre las funciones de los ocelos en relación al vuelo se han descrito la estabilización de horizontes, la modulación del tono muscular, el control del equilibrio, y la respuesta dorsal a la luz. Los ocelos también han sido involucrados en la orientación de moscas y hormigas caminadoras (Goodman 1970, 1981; Wehrhahn 1984; Mizunami 1994, 1995). En polillas y moscas, existen evidencias que sugieren que los ocelos detectarían cambios rápidos en la intensidad de luz durante el amanecer y atardecer (Mizunami 1999). Es decir, los ocelos participarían en comportamientos visuales que requieren gran sensibilidad y/o velocidad, tales como el control del curso durante el vuelo (Mizunami 1999).

Como vimos en el párrafo precedente, el papel de los ocelos ha sido particularmente estudiado en los insectos considerados buenos voladores (Mizunami 1999). Las vinchucas son insectos principalmente caminadores, si bien son capaces de sostener vuelos prolongados (Lehane y Schofield 1976, Ward y Baker 1982) o de dispersión bajo condiciones particulares tales como el ayuno prolongado (Lehane y Schofield 1982). Es decir, en principio los ocelos en *T. infestans* no estarían directamente involucrados en la actividad de vuelo. Este hecho, sin embargo, se contrapone con el altísimo grado de desarrollo del sistema ocelar de esta especie expuesto en el Capítulo 2 (rabdoma muy desarrollado, un sistema pigmentario complejo, conexiones directas de primer orden que alcanzan centros torácicos), y plantea la necesidad de estudiar los aspectos funcionales de estas estructuras.

Dicho de otro modo: ¿Para qué poseen las vinchucas un sistema ocelar tan complejo y desarrollado?

En distintas especies de insectos se ha descrito que el comportamiento fototáctico está mediado por los ojos compuestos exclusivamente, mientras que los ocelos actúan como órganos que modulan la sensibilidad a la luz de aquéllos (Mizunami 1994). Dada entonces la gran sensibilidad fototáctica de *T. infestans* (Capítulo 3) y el alto grado de complejidad del sistema ocelar, en esta parte del trabajo de Tesis se estudiará el papel de los ocelos en esta respuesta comportamental. Específicamente, se pondrá a prueba la hipótesis, aceptada hasta el presente, de que los ocelos no pueden mediar por sí mismos el comportamiento fototáctico.

Materiales y métodos

Se usaron insectos adultos machos criados en laboratorio a 28° C, alimentados semanalmente mediante un alimentador artificial (Núñez y Lazzari 1990), de aproximadamente 20 días de edad postecdisis. Este período asegura el desarrollo completo del sistema ocelar (Insausti y Lazzari 2000b).

Los experimentos fueron realizados tal como fue descrito en el Capítulo 3, pero los insectos se liberaron únicamente en la zona oscura de la arena. La mitad de la arena se iluminó con luz blanca de 7.96 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Las asimetrías espaciales fueron evitadas o controladas intercambiando áreas izquierda y derecha entre ensayos. Cada insecto fue utilizado una sola vez.

En los Capítulos 3 y 4 hemos visto que si bien los tres parámetros comportamentales son buenos indicadores de la fotonegatividad de las vinchucas, el *tiempo de permanencia en la oscuridad* fue el que mostró una mejor modulación con la intensidad de luz. Por lo tanto en este Capítulo y los subsiguientes consideraremos solamente este parámetro.

Se ensayaron en forma individual insectos de los siguientes grupos experimentales (N=10 en cada grupo):

1. Insectos intactos
2. Insectos con ocelos cubiertos
3. Insectos con ojos compuestos cubiertos
4. Insectos con ojos compuestos y ocelos cubiertos

Los ojos compuestos y/u ocelos se cubrieron, según correspondiese, con una capa de pintura acrílica negra inocua. Esta tarea se realizó bajo microscopio estereoscópico, tomando cuidado de cubrir la totalidad de la estructura visual correspondiente.

Los datos se analizaron mediante un ANOVA de un factor fijo con cuatro niveles (cada uno de los grupos experimentales), y se realizaron comparaciones a posteriori (pruebas de Tukey).

Resultados

Como se esperaba, las vinchucas intactas permanecieron la mayor parte del tiempo del ensayo en la zona oscura de la arena, mientras que los insectos con ambas entradas ocluidas permanecieron aproximadamente el 50% del tiempo en cada una de las mitades de la arena (Fig. 6.1). La oclusión de los ocelos u ojos compuestos solamente (grupos 2 y 3 respectivamente) tuvo poco efecto en el comportamiento fotonegativo de los insectos.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre grupos (ANOVA: $F= 8.89$, $gl= 3,36$, $p<0.0005$). En el caso de los insectos con una sola entrada visual cubierta (grupos 2 y 3), se observó una muy leve disminución de la respuesta fotonegativa respecto de la respuesta del grupo de insectos intactos (Figura 6.1). Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (contrastes de Tukey, $p>0.05$ en ambos casos). Sólo aquellos insectos cuyos ocelos y ojos compuestos fueron ocluidos (grupo 4) mostraron una reducción significativa en su respuesta fototáctica. La respuesta de este grupo difirió estadísticamente de la respuesta de los otros tres grupos experimentales (comparaciones de Tukey, $p<0.01$ en todos los casos), pero no fue significativamente distinta de la respuesta esperada por azar (i.e, 50% del tiempo en cada una de las zonas de la arena).

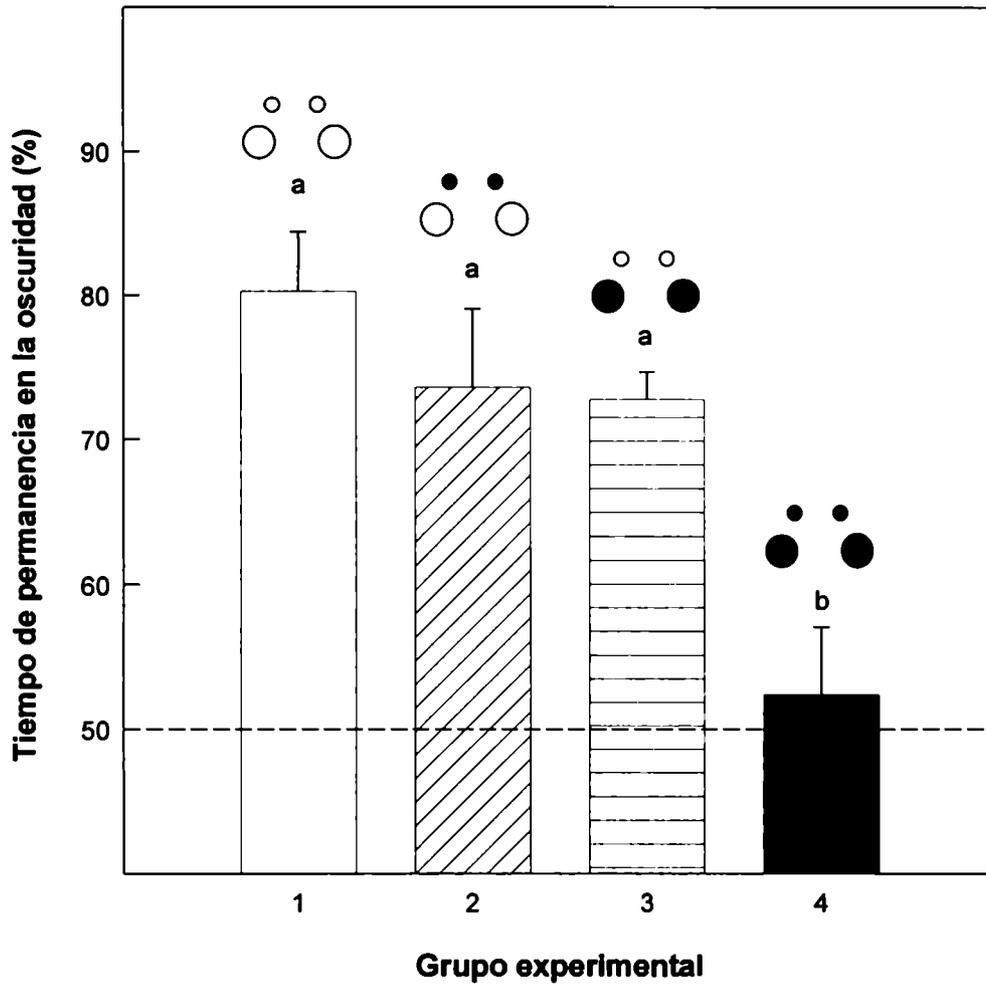


Figura 6.1: Respuesta fotonegativa (media \pm e.s.) de adultos de *T. infestans*. 1: insectos intactos, 2: ocelos cubiertos, 3: ojos compuestos cubiertos, 4: ocelos + ojos compuestos cubiertos. Con la misma letra se indican los grupos que no difieren estadísticamente ($p > 0.05$, comparaciones de Tukey). La línea horizontal punteada a 50% representa el tiempo de permanencia esperado por azar.

Discusión

Los resultados presentados en este Capítulo demuestran que los ocelos de *T. infestans* son capaces de mediar por sí mismos la respuesta fototáctica. Los trabajos existentes en otras especies de insectos muestran que los ocelos son capaces de modular la sensibilidad de los ojos compuestos a la luz. Sin embargo, la capacidad de estas estructuras para mediar la respuesta fototáctica por sí mismas ha sido raramente mencionada (Mizunami 1994), e incluso algunos autores la han descrito como "imposible" (Goodman 1970). Sin embargo, debemos destacar que estos estudios se refieren a insectos con fototaxis **positiva**. Hasta donde sabemos, en esta Tesis se analiza por primera vez la función ocelar en relación con la fototaxis **negativa** en insectos, y constituye, además, la primera demostración de esta capacidad para los ocelos de un insecto.

Esta función novedosa de los ocelos de *T. infestans* se puede relacionar con las propiedades ópticas y estructurales de estas estructuras visuales. Como en otros insectos, el plano focal de los ocelos en esta especie se ubica detrás de la retina, siendo por lo tanto incapaces de formar una imagen. Además, otras características del sistema ocelar de *T. infestans*, tales como la estructura compleja del rabdoma y la convergencia de una gran cantidad de fotorreceptores en unas pocas interneuronas de primer orden, sugieren que los ocelos poseen un alto grado de integración espacial. Por otro lado, las conexiones directas de células retinulares con centros torácicos mediante interneuronas de primer orden de gran diámetro son características típicas de un sistema de transmisión rápido (Insausti y Lazzari 1996, Insausti 1997).

Las características mencionadas precedentemente son relevantes en relación con la capacidad de las vinchucas para detectar sombras y ambientes iluminados. La detección de un refugio podría depender, entre otros factores, del contraste de intensidad entre un ambiente iluminado y la oscuridad de un refugio potencial, una tarea que no requiere de un sistema visual con buena resolución espacial. En este sentido, la alta capacidad de integración espacial de los ocelos podría ser una característica ventajosa en el contexto comportamental de búsqueda de refugio.

Como se observa en la Figura 6.1, tanto los ocelos como los ojos compuestos son capaces de mediar por sí mismos la respuesta de escape a la luz de *T. infestans*. La oclusión de la entrada ocelar tiene poco efecto en la respuesta fototáctica mediada por los ojos compuestos. Del mismo modo, la oclusión de estos

últimos tampoco tiene un efecto significativo en el nivel de la respuesta fototáctica mediada por los ocelos. Esto sugiere la existencia de vías visuales paralelas para cada una de estas estructuras, las cuales convergerían en un único centro superior. Por otro lado, estudios neuroanatómicos realizados en nuestro laboratorio mostraron la existencia de conexiones directas, mediadas por interneuronas de primer orden, entre los neuropilos ocelares y la lámina (el neuropilo distal de los lóbulos ópticos) (Insausti y Lazzari 1996). Estas conexiones aportan, por lo tanto, una evidencia neuroanatómica que podría explicar la capacidad tanto de los ocelos como de los ojos compuestos de mediar la respuesta fotonegativa en esta especie.

Por otra parte, estos resultados ponen de manifiesto el significado biológico de la respuesta fototáctica en triatominos, dado que la misma no está controlada por una única entrada visual. Finalmente, la posible existencia de vías sensoriales paralelas provenientes de distintos órganos fotorreceptores, pero destinadas a la misma función, agrega un nuevo elemento a la complejidad del sistema ocelar de estos insectos.

CAPÍTULO 7: SENSIBILIDAD ESPECTRAL DE LA RESPUESTA FOTOTÁCTICA DE *T. INFESTANS*

Introducción

La respuesta fototáctica ha sido utilizada para estudiar la sensibilidad espectral del sistema visual en varias especies de insectos (e.g., Kaiser et al. 1977, Jacob et al. 1977, Fisbach 1979). Los tres tipos más comunes de fotorreceptores (UV, azul y verde) pueden participar, con distinto peso y dependiendo de la especie, en el control de la respuesta fototáctica. Sin embargo, las longitudes de onda en la región del UV y del verde han resultado ser las más efectivas para evocar una respuesta de fototaxis en la mayoría de los insectos en los que este comportamiento ha sido analizado (Jacob et al. 1977, Kaiser et al. 1977, Menzel 1979; Menzel y Greggers 1985, Allan et al. 1987; Green y Cosens 1983). Por otra parte, en muchos casos el signo de la reacción cambia con la longitud de onda y/o la intensidad (Jacob et al. 1977, Green 1985, Stortz y Paul 1998). En la familia Glossinidae (Diptera) se ha descrito un pico de sensibilidad fototáctica en la región entre 600 y 625 nm (naranja-rojo), además de los picos de sensibilidad en la región del UV y del verde (Green 1985). Es decir, la respuesta fototáctica, a diferencia de los comportamientos selectivamente dependientes de la longitud de onda (ver Capítulo 2), estaría controlada por varios tipos espectrales de fotorreceptores.

Entre los insectos hematófagos, este comportamiento ha sido estudiado en miembros de las familias Culicidae y Muscidae (Allan et al. 1987) y en Glossinidae (Green y Cosens 1983, Green 1985). Estos estudios mostraron que el color es un factor relevante que modifica la efectividad de las trampas o de los dispositivos atractantes (Green 1986, 1993, Allan et al. 1987).

Según Schofield (1975) y Ward y Finlayson (1982) las vinchucas no serían sensibles a longitudes de onda en la región del ultravioleta y el azul. Este resultado contrasta con el hecho de que la mayoría de los insectos, incluso aquellos de hábitos crepusculares y nocturnos, son sensibles a dichas longitudes de onda (Menzel y Backhaus 1991, Koehler et al. 1987, Allan et al. 1987, White et al. 1994, Cutler et al. 1995). Estos antecedentes plantean por lo tanto la necesidad de estudiar nuevamente la sensibilidad espectral de las vinchucas. Como hemos visto en los capítulos anteriores, la respuesta fototáctica provee un instrumento simple y

reproducibile para estudiar diversos atributos del sistema visual de estos insectos. Por lo tanto, en el presente Capítulo utilizaremos dicha respuesta como instrumento para estudiar la sensibilidad espectral de *T. infestans*.

Materiales y métodos

Metodología y procedimiento

Se usaron larvas de cuarto estadio de *T. infestans* de aproximadamente 15 días de edad postecdisis, alimentadas como fue indicado en el Capítulo 3. Los ensayos se realizaron tal como fue descrito en dicho Capítulo. En este caso se usó una arena más pequeña, dividida en dos secciones longitudinales (largo: 14 cm, ancho: 4 + 4 cm, alto: 2.5 cm), a fin de poder ensayar dos animales por vez. La arena fue cubierta con una pieza rectangular de vidrio o acrílico transparente al UV, una de cuyas mitades fue cubierta por su lado externo con una cartulina negra. Los insectos se liberaron en la zona oscura de la arena, y las asimetrías espaciales fueron evitadas o controladas intercambiando áreas izquierda y derecha entre ensayos. Se midió únicamente el *tiempo de permanencia en la oscuridad*. A fin monitorear el comportamiento de los insectos se usó una cámara de video CCD sensible al IR, conectada a un monitor de TV que se colocaba fuera del cuarto de experimentación. Cada insecto fue utilizado una sola vez.

Los experimentos se realizaron durante la 2da-3era hora de la escotofase, dado que hemos visto que la sensibilidad fototáctica de las vinchucas es máxima en dicho período (Capítulo 3). Para ello, previo a los experimentos, los animales fueron entrenados durante aproximadamente una semana a ciclos luz-oscuridad (LD: 12/12).

Experimentos

Se ensayaron en forma individual insectos de los siguientes grupos:

1. Series control: Se realizaron ensayos en oscuridad completa, en los que la mitad de la arena permaneció oscura y la mitad restante quedó expuesta solamente a la radiación IR proveniente de la cámara CCD. Los insectos fueron liberados en

el extremo izquierdo o derecho, siempre del lado cubierto por la cartulina negra. Se determinó el tiempo de permanencia "control" en la zona sin iluminación IR. Aunque se totalizaron un total de 114 ensayos, para los análisis estadísticos sólo se consideraron aquellos ensayos que se realizaron paralelamente a cada condición experimental (λ e intensidad).

2. Series luz blanca: la zona iluminada de la arena se iluminó con tres intensidades de luz blanca: 0.06, 0.6 y 6 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (N=59).
3. Series espectrales: La zona clara de la arena fue iluminada con luces de distinta longitud de onda (λ) e intensidad (N=247), según se explica a continuación.

Estímulos

Para ofrecer estímulos de distinta λ en la zona iluminada de la arena, se interpusieron filtros de interferencia y/o espectrales a una fuente de luz blanca (OSRAM 41860 WF 12V/ 20W, OSRAM 41870 WF 12V/ 50W, OSRAM HLX 64634 EFR 15V/150W). Se usaron filtros de interferencia con λ_{max} (λ de máxima transmitancia τ) en 357, 397, 458, 499, 555 y 621 nm (ancho de la curva de transmitancia τ a $\tau_{\text{max}}/2 \approx 10$ nm) (Schott, Mainz, Germany). Para producir estímulos de mayores longitudes de onda se usaron los filtros de paso alto RG665 y RG695 (Schott, Alemania). El funcionamiento y especificaciones de estos filtros se presentan en la Figura 7.1 y en la Tabla 7.1.

La intensidad de los estímulos se ajustó a distintos valores entre 0.006 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ y 659 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (ver Resultados) mediante filtros neutros (Melles Griot, USA), o cambiando la distancia entre la fuente de luz y la arena. La intensidad fue medida con un radiómetro (IL 1400 radiometer, International Light) con sensor de respuesta plana.

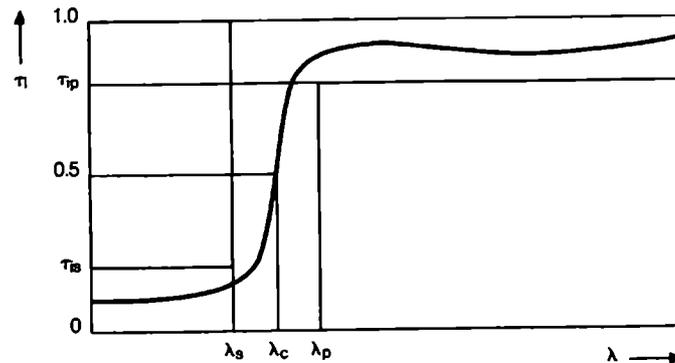


Figura 7.1: Características de un filtro de paso alto

Donde:

λ_c : longitud de onda a la cual la transmitancia interna (τ_i) del filtro es la mitad del valor máximo.

λ_s : longitud de onda debajo de la cual la τ_i no supera la transmitancia mínima (τ_{is}).

λ_p : longitud de onda por encima de la cual la τ_i no cae por debajo de la transmitancia máxima (τ_{ip}).

| Filtro | λ_c ($\tau_i=0.50$) [nm] | λ_s ($\tau_{is}=1.10^{-5}$) [nm] | λ_p ($\tau_{ip}=0.99$) |
|--------|------------------------------------|--|----------------------------------|
| RG 665 | 665 ± 6 | 620 | 730 |
| RG 695 | 695 ± 6 | 640 | 760 |

Tabla 7.1: Características de los filtros RG 665 y RG 695. Por ejemplo, usando el filtro RG665, una medición de intensidad (realizada con un detector radiométrico) de $100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ indica que a valores de $\lambda < 620 \text{ nm}$ la intensidad de luz transmitida es $< 0.001 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (que resulta ser un valor extremadamente pequeño), y a 665 nm es de $50 \mu\text{W}/\text{cm}^2$.

Análisis estadístico

Los análisis se realizaron de manera similar a la expuesta en el Capítulo 3. Se realizaron pruebas de ANOVA de un factor para analizar el efecto de la λ (a una intensidad fija), y para analizar el efecto de la intensidad (para una λ fija). Se

realizaron pruebas de Dunnett (a fin de comparar cada uno de los grupos experimentales con su control) y/o de Tukey (para las comparaciones entre grupos experimentales) según correspondiera.

Resultados

Series control y luz blanca

Si bien ya habíamos estudiado la dependencia de la respuesta fotonegativa de *T. infestans* con la intensidad de luz blanca (Capítulo 3) fue necesario repetir estas series dado que se cambiaron las dimensiones de la arena experimental.

No se encontraron asimetrías espaciales: el análisis estadístico de las series control mostró que el tiempo de permanencia no dependió del lado en el que el insecto era liberado (izquierda o derecha) (prueba *t de Student*; $t=-1.105$, $gl=112$, $p>0.05$).

En la Figura 7.2 se observa que la respuesta de las vinchucas aumenta con la intensidad de luz presente en la zona iluminada de la arena (ANOVA: $F=14.01$, $gl=3.78$, $p<0.0001$). En particular, una intensidad de $0.06\mu W/cm^2$ es suficiente para evocar una respuesta de escape. Estos resultados concuerdan con los presentados en el Capítulo 3, y muestran nuevamente la extrema sensibilidad a la luz de las vinchucas. Este análisis nos permite además establecer que la arena usada en estos experimentos es adecuada para cuantificar la respuesta fototáctica de *T. infestans*.

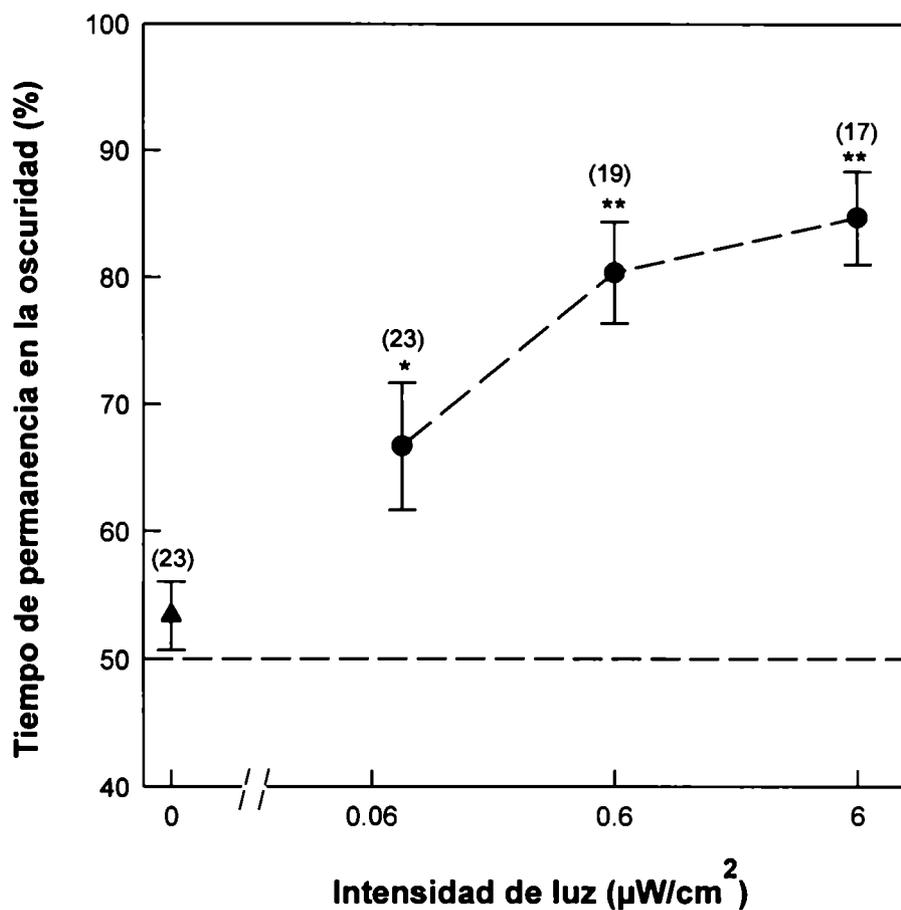


Figura 7.2: La respuesta respuesta fototáctica de *T. infestans* (ordenada, media \pm e.s.) y su dependencia con la intensidad de luz blanca (abcisa, unidades log). *Círculos:* grupos experimentales; *triángulo:* serie control. Se indica entre paréntesis el número de insectos usado en cada punto. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales y el control (prueba de Dunnett: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Series espectrales*Respuesta en la región entre 357 y 621 nm a intensidad constante*

Se analizó la respuesta fotonegativa de *T. infestans* frente a diferentes luces monocromáticas, a intervalos de 50 nm, en la región del espectro entre 357 y 621 nm. A fin de estudiar si esta especie es diferencialmente sensible a distintas longitudes de onda se mantuvo la intensidad de los estímulos a un valor constante de $0.06 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Esta intensidad, de acuerdo a los resultados de los experimentos realizados con luz blanca, estaría en la llamada zona “de regulación” de la curva de respuesta (Figs. 3.5 y 7.2).

La Figura 7.3 muestra que la respuesta depende de la longitud de onda (ANOVA: $F=5.52$, $gl=6,135$, $p<0.0001$). La respuesta fotonegativa de los insectos fue estadísticamente distinta de la respuesta de los insectos control en el intervalo de longitudes de onda entre 397 y 555 nm. En este intervalo la respuesta no dependió de la longitud de onda (contrastes de Tukey, $p>0.05$ en todos los casos), si bien la respuesta parece ser más intensa frente a luz de 555 nm.

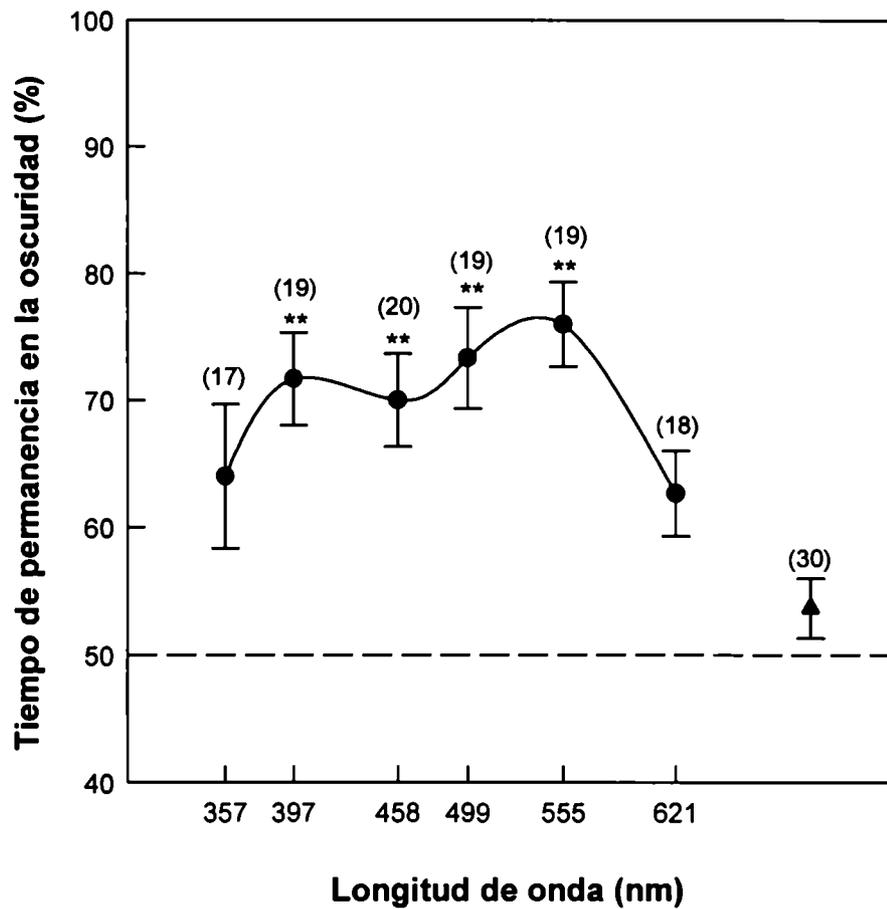


Figura 7.3: La respuesta respuesta fototáctica de *T. infestans* (ordenada, media \pm e.s.) y su dependencia con la longitud de onda (abcisa) a intensidad constante ($0.06 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). *Círculos*: grupos experimentales; *triángulo*: control. Se indica entre paréntesis el número de insectos usado en cada punto. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales y el control (test de Dunnett: **: $p < 0,01$).

Respuesta frente a luces monocromáticas de 458 y 555 nm en función de la intensidad de luz

La falta de variación en el nivel de respuesta de las vinchucas en el intervalo entre 397 y 555 nm (Fig. 7.3) podría deberse a que la intensidad del estímulo ($0.06 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) fue superior a la intensidad umbral. A fin de estudiar esta cuestión se estudió la respuesta de *T. infestans* a luces monocromáticas de 458 y de 555 nm, pero a una intensidad un orden de magnitud menor ($0.006 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). La Figura 7.4 muestra que la respuesta a estas longitudes de onda dependió de la intensidad del estímulo (ANOVA de dos factores: $F=14.97$; $gl=2,121$; $p<0.0001$). La respuesta de los insectos no dependió de la longitud de onda (ANOVA de dos factores: $F=1.36$; $gl=1,121$; NS), ni de la interacción entre la longitud de onda y la intensidad (ANOVA de dos factores: $F=0.68$; $gl=2,121$; NS).

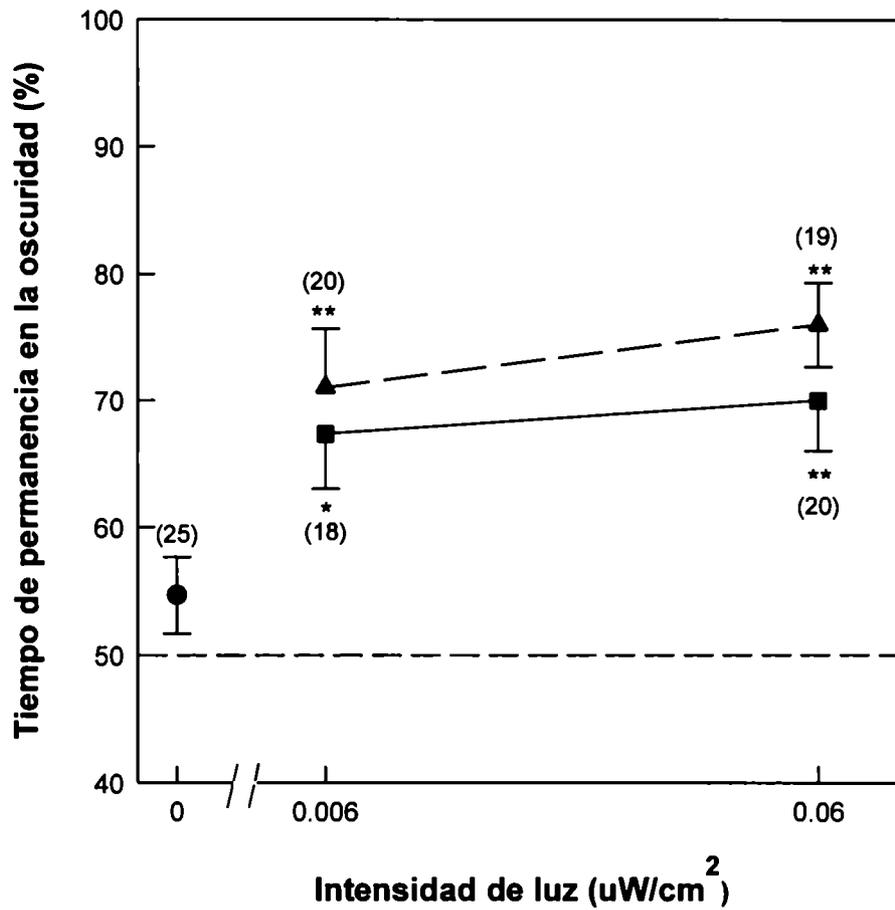


Figura 7.4: La respuesta respuesta fototáctica de *T. infestans* (ordenada, media \pm e.s.) y su dependencia con la intensidad de luz monocromática de 458 (cuadrados) y 555 nm (triángulos). Círculo: control. Se indica entre paréntesis el número de insectos usado en cada punto. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales y el control (test de Dunnett: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Respuesta frente a luces monocromáticas de 621, 665 y 695 nm en función de la intensidad de luz

Estas series se realizaron a fin de estudiar si las vinchucas son sensibles a longitudes de onda en la región del rojo del espectro electromagnético. Dado que frente a luz monocromática de 621 nm de $0.06 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ no se había observado una respuesta significativamente distinta del control (Fig. 7.3), se estudió la respuesta frente a luz monocromática de 621 nm de una intensidad un orden de magnitud mayor ($0.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). Se analizó, además, la respuesta de los insectos a longitudes de onda más largas a intensidades mayores (RG665: 6-60 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$; RG695 110-659 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$). En esta situación el componente de $\lambda < 620$ nm generado con el filtro RG665 fue inferior a $0.005 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, mientras que en el caso del filtro RG695 el componente de $\lambda < 640$ nm fue inferior a $0.006 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (Fig. 7.1 y Tabla 7.I). Estos valores extremadamente pequeños nos permiten controlar que la modificación del comportamiento que se observe será consecuencia de la respuesta de los insectos a longitudes de onda iguales o mayores a 665 y 695 nm respectivamente.

La Figura 7.5 muestra la respuesta fotonegativa de las vinchucas frente a luces monocromáticas en la región del rojo. El nivel de respuesta de los insectos disminuyó a medida que aumentó la longitud de onda. La respuesta frente a luces de 621 y 665 nm mostró un aumento significativo con la intensidad (ANOVA 621 nm: $F=17.28$; $gl=2,59$; $p<0.0001$; ANOVA 665 nm: $F=20.28$; $gl=2,62$; $p<0.0001$). La respuesta de los insectos frente a luz de 695 nm no difirió estadísticamente de la respuesta del grupo control (ANOVA: $F=2.68$; $gl=2,62$; $p>0.05$).

De estas series puede concluirse entonces que *T. infestans* es sensible a longitudes de onda en la región del rojo. La sensibilidad fototáctica es (tomando en cuenta la respuesta frente a 621 nm) al menos dos órdenes de magnitud menor que la sensibilidad frente a luz azul (458 nm) o verde (555 nm).

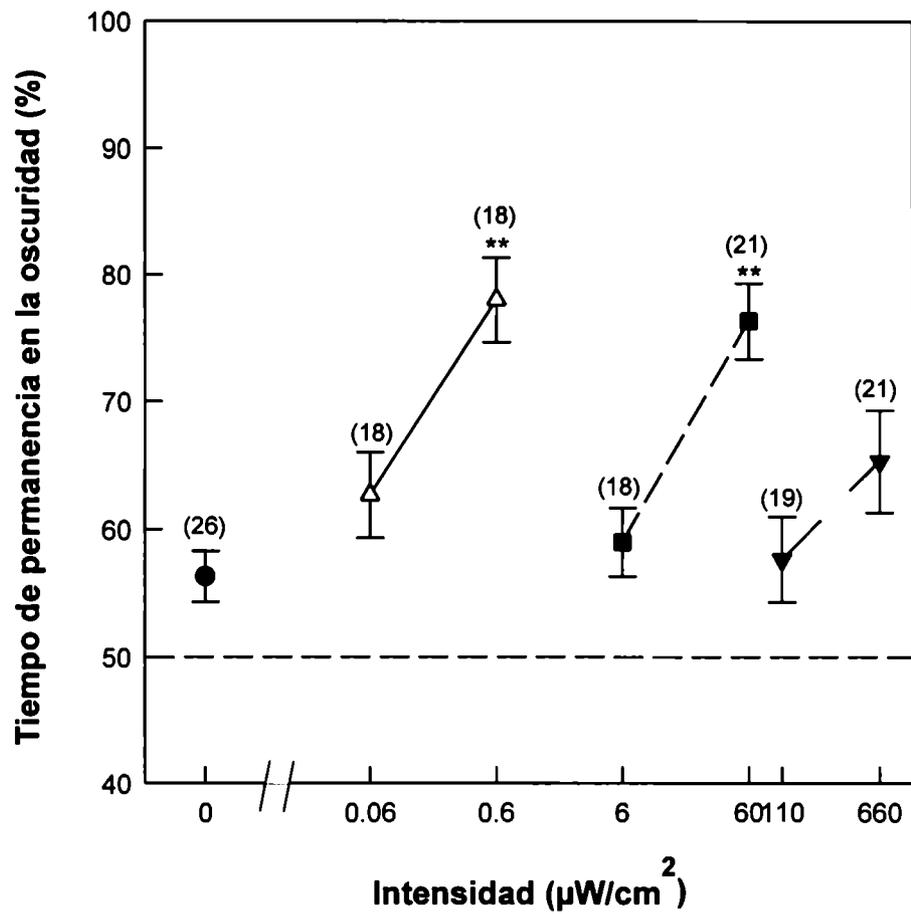


Figura 7.5: La respuesta respuesta fototáctica de *T. infestans* (ordenada, media \pm e.s.) y su dependencia con la intensidad de luz en la región del rojo. Triángulos blancos: 621 nm, cuadrados: 665 nm, triángulos negros: 695 nm, círculo: control. Se indica entre paréntesis el número de insectos usado en cada punto. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales y el control (test de Dunnett: **: $p < 0.01$).

Respuesta frente a luz monocromática de 357 nm (ultravioleta)

Esta serie fue realizada a fin de estudiar si las vinchucas son sensibles a longitudes de onda en la región del ultravioleta del espectro electromagnético. Dado que frente a luz monocromática de 357 nm de $0.06 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ no se había observado una respuesta significativamente distinta del control (Fig. 7.6), se estudió la respuesta frente a luz de esta longitud de onda, pero de una intensidad un orden de magnitud mayor ($0.9 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). La Figura 7.6 muestra que los insectos muestran una respuesta fotonegativa frente a luz ultravioleta (prueba *t de Student*: $t=4.43$; $gl=19$; $p<0.0005$).

De esta serie se puede concluir entonces que las vinchucas son sensibles a luz ultravioleta, si bien en este contexto comportamental la sensibilidad es menor que frente a longitudes de onda en la región entre 397 y 555 nm (Fig. 7.3).

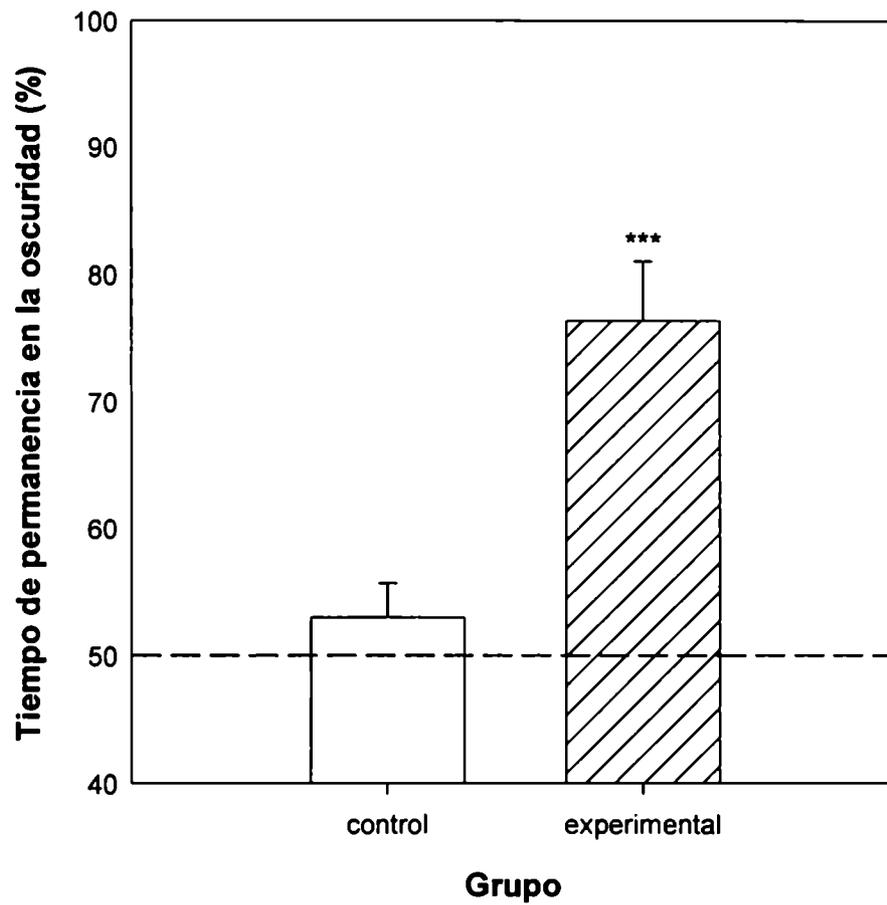


Figura 7.6: Respuesta fototáctica de *T. infestans* (media \pm e.s.) frente a luz monocromática de 357 nm de $0.9 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (barra rayada, $n=11$). Se muestra la respuesta del grupo control (barra blanca, $n=9$). (Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.001$, prueba de Student)).

Discusión

Los resultados presentados en este Capítulo muestran que los ojos compuestos de *T. infestans* son sensibles a longitudes de onda en un intervalo entre 357 (ultravioleta) y 665 nm (rojo) (Figs. 7.3-7.6). La región de mayor sensibilidad fototáctica incluye a longitudes de onda en la región del azul (458 nm) y del verde (555 nm). En estos casos, la respuesta puede ser evocada con una intensidad de tan solo $0.006 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (Fig. 7.4). La alta sensibilidad de la respuesta fototáctica de *T. infestans* en esta zona del espectro concuerda con aquella encontrada en otros insectos y artrópodos (Menzel 1979, Allan et al. 1987).

Lamentablemente existen pocos trabajos en los que se halla estudiado la sensibilidad del sistema visual mediante una salida comportamental, de manera comparable a la presentada en esta Tesis. Con fines comparativos, en la siguiente Tabla se presentan los valores umbral de sensibilidad fototáctica frente a luces monocromáticas en varias especies de insectos. A estos fines, estos valores deben tomarse como una referencia aproximada, dado que si bien las medidas fueron realizadas sobre la base de una respuesta fototáctica, el signo de la misma y los procedimientos experimentales fueron distintos a los utilizados en esta Tesis.

| Especie | Umbral | Respuesta | Referencia |
|---------------------------|---|--------------------|--------------------|
| <i>Drosophila sp.</i> | $\approx 0.1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (luces monocromáticas) | Fototaxis positiva | Jacob et al. 1977 |
| <i>Apis mellifera</i> | $\approx 0.003\text{-}0.02 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (luces monocromáticas entre 339 y 539 nm) | Fototaxis positiva | Kaiser et al. 1977 |
| <i>Drosophila sp.</i> | $0.0006 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (375 nm) $0.006 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (575 nm) | Fototaxis positiva | Fischbach 1979 |
| <i>Musca domestica</i> | $6.3 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (550 nm) | Fototaxis negativa | Green 1985 |
| <i>Triatoma infestans</i> | $<0.006 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (555 y 458 nm) | Fototaxis negativa | Esta Tesis |

En la Tabla se puede observar que, si bien no es posible realizar una comparación precisa por los motivos expuestos anteriormente, las vinchucas

parecen exhibir una sensibilidad fototáctica negativa de las más altas descritas hasta el momento en insectos.

Por otra parte, nuestros resultados amplían el intervalo de sensibilidad espectral que había sido descrito para los triatominos, abarcando nuevas regiones del espectro electromagnético (ultravioleta, azul y rojo). Los trabajos de Schofield (1979) y Ward y Finlayson (1982) mostraban que *T. infestans* era sensible solamente en la región entre el verde y el amarillo. Además, los resultados presentados en este Capítulo muestran que la sensibilidad de esta especie a la luz en la región del verde (555 nm) es dos órdenes de magnitud mayor que la descrita por aquellos autores.

Cabe mencionar que estos resultados deben ser interpretados en el marco del contexto de comportamiento en el que la sensibilidad espectral ha sido estudiada. Es decir, la falta de respuesta a una longitud de onda determinada no indica necesariamente que los fotorreceptores no sean sensibles, dado que la respuesta fototáctica es la salida de un proceso que comienza con una entrada sensorial (que obviamente es la limitante), pero que además incluye un procesamiento central y una eventual integración con otras entradas.

La respuesta fotonegativa de *T. infestans* muestra una menor sensibilidad a luces de longitudes de onda en la región del espectro que incluye al rojo (Fig. 7.6). Si bien no conocemos los tipos espectrales de fotorreceptores de *T. infestans*, una hipótesis simple que explicaría estos resultados es asumir que la respuesta fotonegativa de este insecto a dichas longitudes de onda está mediada por un fotorreceptor que presenta máxima absorción en la región del verde. Esta hipótesis concuerda con el hecho de que dicho fotorreceptor se encuentra en la mayoría de los insectos y presenta absorción, si bien en mucha menor medida, hasta aproximadamente 620 nm (Chapman 1998, Fig. 2.8). Por otra parte, las vinchucas podrían tener un fotorreceptor con máxima absorción en la región del rojo, si bien estas longitudes de onda no evocan una respuesta de escape. Esta hipótesis encuentra sustento en el hecho de que algunos dípteros presentan un pico inusual de sensibilidad fototáctica alrededor de 625 nm, mediado por un fotorreceptor con máxima absorción en la región del rojo (Green 1985). Esta cuestión solo puede ser resuelta analizando mediante estudios de electrofisiología aquellas longitudes de onda a las que los fotorreceptores son sensibles. No obstante, los resultados presentados en este Capítulo muestran que los estudios de comportamiento, en particular la respuesta fototáctica, constituyen una herramienta adecuada para estudiar en forma sencilla la sensibilidad espectral de las vinchucas.

En resumen, el intervalo de sensibilidad fotonegativa de *T. infestans* se encuentra entre 357 (ultravioleta) y 665 nm (rojo), con una región de máxima sensibilidad en el azul y el verde. La sensibilidad a luz en la región del verde, que es uno de los principales componentes de la luz diurna reflejada por los objetos (Fig. 2.6), refuerza el valor adaptativo de la respuesta fototáctica negativa, dado que es durante este momento del día cuando las vinchucas permanecen ocultas, evitando la exposición a sus predadores potenciales.

CAPÍTULO 8: VARIABILIDAD DE LA RESPUESTA FOTOTÁCTICA: EFECTO DE LA EDAD Y LAS MUTACIONES

Introducción

Como hemos visto en los Capítulos 3 y 7, la respuesta fototáctica de las vinchucas depende de la intensidad y longitud de onda de la luz. Sin embargo, en los insectos esta dependencia no es constante para una determinada especie, sino que además está influenciada por factores tales como la fase del ciclo sexual, la etapa del ciclo recolector (e.g., abejas), y por diversas variables ambientales y fisiológicas (Menzel 1979, Allan et al. 1987, Blackmer y Byrne 1993). En algunos casos incluso los parásitos son capaces de alterar el comportamiento fototáctico de sus insectos hospedadores. Por ejemplo, en la cucaracha *Periplaneta americana*, la infección con parásitos acantocéfalos produce una disminución de la respuesta fotonegativa. Esta alteración en el comportamiento aumentaría la exposición de los insectos a sus predadores, incrementado en consecuencia la probabilidad de transmisión del parásito (Moore y Gotelli 1990).

En este Capítulo se analizará, en primer lugar, el efecto de la edad en la respuesta de escape de *T. infestans*. Para ello se estudiará la respuesta de larvas y de adultos en función de la intensidad de luz. Dado que tanto el número como el diámetro de las omatidias de los ojos compuestos de *T. infestans* aumentan con la edad (Settembrini 1984), podría esperarse que los insectos adultos tengan una sensibilidad visual mayor, y por lo tanto una respuesta fotonegativa más intensa, que los insectos más jóvenes. Esta hipótesis será puesta a prueba comparando las curvas de sensibilidad fototáctica de insectos de distintos estadios.

En segundo lugar se analizará la respuesta fotonegativa en una variedad mutante de ojos rojos de *T. infestans*, y la morfología de los fotorreceptores de estos mutantes. Esta mutación recesiva ha sido descrita en varias especies de triatominos (*T. infestans*, *R. prolixus*, *T. eratyrusiformis*, *P. megistus*). En *T. infestans* se ha descrito también una mutación que se manifiesta con manchas blancas y amarillas en los ojos compuestos, y que ha sido atribuida a una deficiencia de pigmento (Carcavallo et al. 1998b). Hasta el momento, no se han realizado estudios relativos al impacto de las mutaciones sobre el funcionamiento del sistema visual en los triatominos. En otros insectos esta clase de estudios ha revelado

aspectos importantes relacionados con la neurobiología de la visión (Jacob et al. 1977, Fischbach 1979). En este capítulo analizaremos entonces el efecto de la edad y las mutaciones (ojos rojos) en el comportamiento fototáctico de *T. infestans*.

Materiales y métodos

Efecto de la edad

Se utilizaron larvas de tercer estadio y adultos de ambos sexos de *T. infestans*, de aproximadamente 15 y 20 días de edad postecdisis, respectivamente. Previo a los experimentos, los animales fueron entrenados durante aproximadamente una semana a ciclos LD: 12/12, y los ensayos se realizaron durante la 2da-3era hora de la escotofase, tal como fue descrito en los Capítulos anteriores. En los experimentos con larvas se utilizó una arena dividida en dos secciones longitudinales (largo: 14 cm, ancho: 4 + 4 cm, alto: 2.5 cm), mientras que en los experimentos con adultos se utilizó una arena de mayor tamaño (largo: 25 cm, ancho: 5.5 cm, alto: 2.2 cm).

- Experimentos con insectos adultos:

Se ensayaron en forma individual insectos de los siguientes grupos:

1. Control en oscuridad completa (la mitad de la arena expuesta a IR) (n=7).
2. La mitad de la arena fue iluminada con luz blanca de $0.009 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (n=10).
3. La mitad de la arena fue iluminada con luz blanca de $0.130 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (n=10).
4. La mitad de la arena fue iluminada con luz blanca de $0.995 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (n=10).

- Experimentos con larvas de tercer estadio:

Se ensayaron en forma individual insectos de los siguientes grupos:

1. Control en oscuridad completa (la mitad de la arena expuesta a IR) (n=21)
2. La mitad de la arena fue iluminada con luz blanca de $0.06 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (n=11).
3. La mitad de la arena fue iluminada con luz blanca de $0.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (n=13).
4. La mitad de la arena fue iluminada con luz blanca de $6.0 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (n=12).

Efecto de las mutaciones

Se utilizaron larvas de *T. infestans* de una variedad mutante de ojos rojos criadas en nuestro laboratorio sobre gallinas vivas, de aproximadamente 15 días de edad postecdisis. Los experimentos fueron realizados tal como se indicó en los párrafos precedentes.

Se ensayaron larvas de tercer y cuarto estadio de los siguientes grupos:

1. Control en oscuridad completa (la mitad de la arena expuesta a IR) (N3: n=22; N4: n=20).
2. La mitad de la arena fue iluminada con luz blanca de $0.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (N3: n=20; N4: n=14)
3. La mitad de la arena fue iluminada con luz blanca de $6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (N3: n=16; N4: n=16).

Análisis estadístico

Los análisis se realizaron de manera similar a la expuesta en el Capítulo 3. La variación de la respuesta de los insectos adultos con la intensidad de luz se analizó mediante un ANOVA de un factor. Se realizaron análisis de ANOVA de dos factores a fin de estudiar efecto de la edad y de las mutaciones con la intensidad de luz. En los casos en los que se obtuvieron interacciones significativas, se realizaron las Pruebas de efectos Simples (ver Capítulo 3). Se realizaron pruebas de Dunnett y/o de Tukey según correspondiese.

Análisis morfológico

Se analizó la morfología de los fotorreceptores de los insectos de ojos rojos. El procedimiento para fijación, inclusión, y análisis morfológico fue descrito en el Capítulo 5. Se utilizaron insectos de la variedad mutante de cuarto estadio, mantenidos en ciclos LD: 12/12. Las cabezas fueron seccionadas durante la fase de luz.

Resultados

Efecto de la edad

Respuesta de adultos intactos

La Figura 8.1 muestra la respuesta fotonegativa de adultos de *T. infestans* en función de la intensidad de luz. El análisis estadístico mostró que la respuesta depende de la intensidad de luz (ANOVA: $F=10.93$, $gl=3,33$, $p<0.0001$). Este análisis se realizó agrupando los datos de machos y hembras para cada nivel de iluminación (Fig. 8.1, curva), dado que se utilizaron pocos individuos de cada sexo. No obstante, en la figura puede observarse que los niveles de respuesta de machos y hembras fueron similares (Fig. 8.1, barras). La respuesta de los grupos experimentales fue estadísticamente distinta de la respuesta del grupo control a todas las intensidades de luz ensayadas (pruebas de Dunnett, $p<0.01$ en todas las comparaciones). No se hallaron diferencias en la respuesta de los insectos frente a distintas intensidades de luz (pruebas de Tukey, $p>0.05$ en todas las comparaciones).

Estos resultados nos permiten situar el umbral de sensibilidad de la respuesta fotonegativa de los adultos en un valor de intensidad inferior a $0.009 \mu\text{W}/\text{cm}^2$.

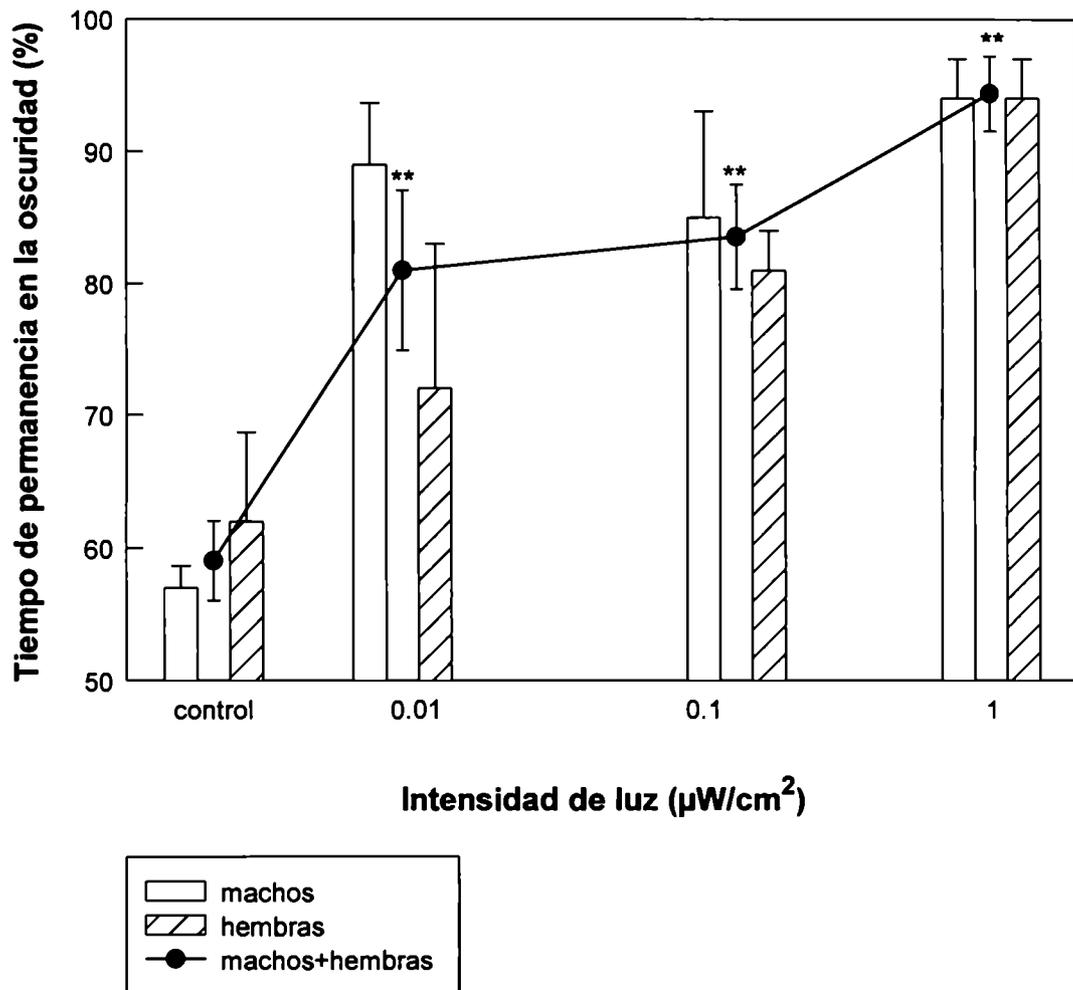


Figura 8.1: Respuesta fotonegativa de adultos de *T. infestans* (media \pm e.s.) en función de la intensidad de luz (unidades log). *Barras blancas:* machos; *barras rayadas:* hembras; *círculos negros:* machos+hembras. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del grupo control (Pruebas de Dunnett, $p < 0.01$).

Respuesta de larvas

La Figura 8.2 muestra la dependencia de la respuesta fotonegativa de *T. infestans* con la edad y la intensidad de luz blanca. Se muestra la respuesta de las larvas de tercer estadio, y con fines comparativos, también se muestran los valores de tiempo de permanencia de las larvas de cuarto estadio (tomados de los experimentos presentados en el Capítulo 7, serie con luz blanca) y de insectos adultos (tomados de la Fig. 8.1).

El análisis de ANOVA mostró que la respuesta de las larvas depende de la intensidad de luz y del estadio larval (Tabla 8.1). En condiciones de oscuridad (grupos control), el nivel de actividad de las larvas de distinto estadio fue similar: los insectos permanecieron aproximadamente el 50% del tiempo del ensayo en cada uno de los lados de la arena (Prueba de Tukey, $p > 0.05$, Fig. 8.2). Cuando se generó un contraste de intensidad luminoso en la arena (series experimentales), las vinchucas, como se esperaba, pasaron la mayor parte del tiempo en la zona oscura de la arena. Sin embargo las larvas de cuarto estadio mostraron una respuesta más intensa que las larvas de tercer estadio (Fig. 8.2). La respuesta de estas últimas, a diferencia de la respuesta de las larvas de cuarto, no fue estadísticamente distinta de la respuesta de su respectivo control a una intensidad de $0.06 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (Prueba de Dunnett, $p > 0.05$). A la intensidad más alta ($6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$), las larvas de tercer estadio permanecieron en promedio el $67 \pm 7 \%$ del tiempo en la zona oscura de la arena, valor que, en el caso de las larvas de cuarto, fue observado a una intensidad de luz dos órdenes de magnitud menor. La respuesta de los insectos adultos fue aún más intensa (línea punteada), alcanzando valores de tiempo de permanencia similares a tan solo $0.009 \mu\text{W}/\text{cm}^2$.

Es resumen, los resultados muestran que el nivel de fototaxis negativa de *T. infestans* aumenta con la edad, es decir, depende del desarrollo. La máxima intensidad de respuesta fue observada en los adultos.

| Intensidad de luz | Estadio | Interacción |
|--------------------------------|----------------------------|------------------------|
| F=14.78, gl=3,131, p<0.0001 | F=11.25, gl=1,131, p<0.005 | F=1.38, gl=3,131, n.s. |

Tabla 8.1: Resultados del ANOVA de dos factores realizado sobre los datos de tiempo de permanencia en la oscuridad de larvas de tercer y cuarto estadio. Factores: *intensidad de luz* (1era columna, cuatro niveles: oscuridad, 0.06 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 0.6 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 6 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$); *estadio* (dos niveles: larvas de tercer y cuarto estadio). Tercera columna: interacción entre factores. Los datos correspondientes a los insectos de cuarto estadio son los mismos que fueron presentados en el Capítulo 7 (serie luz blanca). *gl*: grados de libertad; n.s.: diferencias no significativas entre grupos ($p>0.05$).

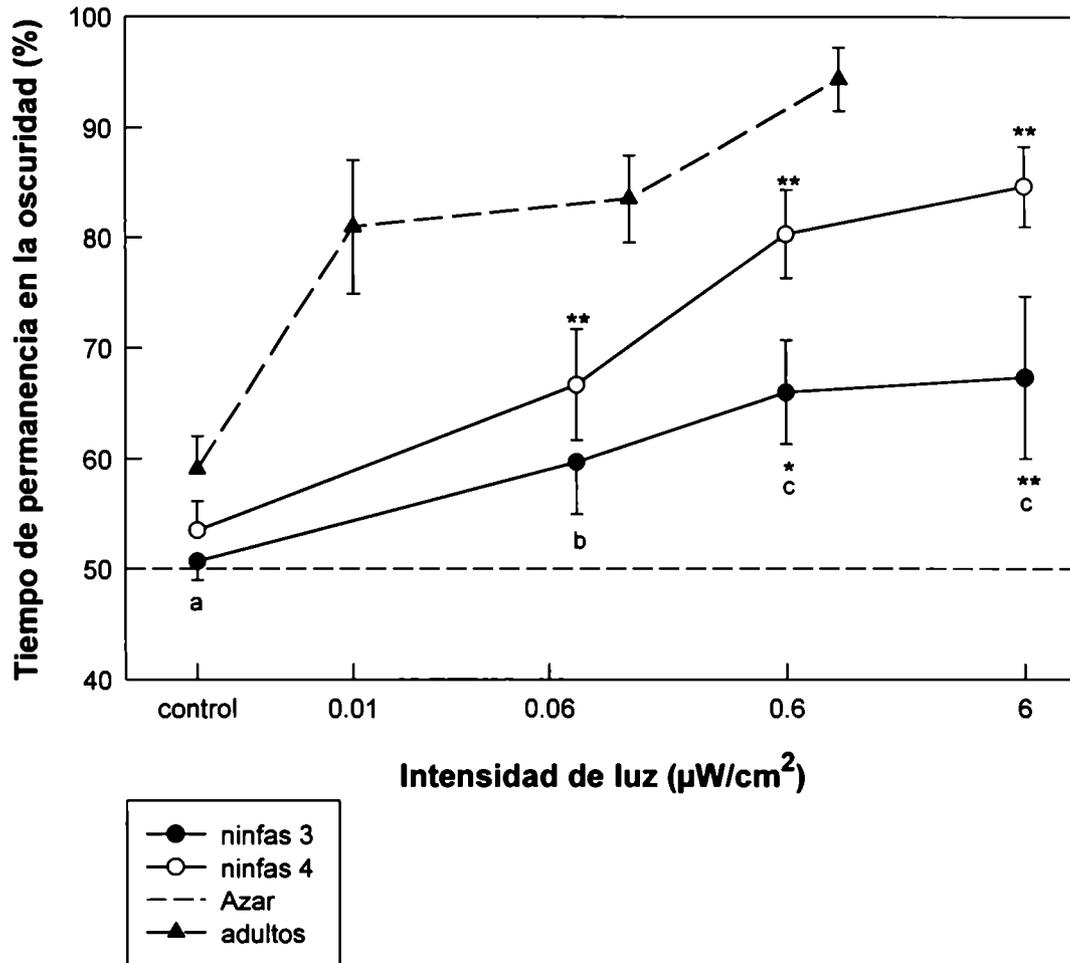


Figura 8.2: Respuesta fototáctica de *T. infestans* (media \pm e.s.) y su dependencia con la intensidad de luz (unidades log) y con la edad (*círculos llenos*: larvas de tercer estadio; *círculos vacíos*: cuarto estadio, *triángulos llenos*: adultos). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos experimentales y su control (Prueba de Dunnett; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$). Con la misma letra se indican los grupos que no difieren estadísticamente ($p > 0.05$, comparaciones de Tukey). La línea horizontal punteada a 50% representa el tiempo de permanencia esperado por azar.

Efecto de las mutaciones

La Figura 8.3 muestra la respuesta fotonegativa de larvas mutantes de ojos rojos de cuarto y tercer estadio en función de la intensidad de luz. Con fines comparativos se muestran los valores de tiempo de permanencia en la oscuridad de las larvas de la variedad salvaje (tomados de los experimentos presentados en el Capítulo 7, serie luz blanca, y de la Fig. 8.2). El análisis de ANOVA mostró que la respuesta depende de la interacción entre los niveles de luz y la variedad (mutante o salvaje) (Tabla 8.II), por lo que se realizaron las pruebas de efectos simples. Tanto en el caso de las larvas salvajes como en el de las mutantes, la intensidad de la respuesta dependió del nivel de iluminación (Tabla 8.III, 1era. y 2da. fila). Sin embargo, la respuesta de las larvas mutantes de tercer estadio ensayadas con una intensidad de $0.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ no fue estadísticamente distinta de la de su control (pruebas de Dunnett, Figura 8.3). Por otro lado, en condiciones de oscuridad (series control), en todos los casos las larvas permanecieron aproximadamente el 50% del tiempo del ensayo en cada una de las mitades de la arena (Fig. 8.3), y no se observaron diferencias entre variedades (salvaje vs. mutante) (Tabla 8.III, 3era. fila).

Las mutaciones tuvieron un efecto significativo sobre la respuesta de los insectos a la luz: a $0.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ la respuesta de las larvas mutantes fue significativamente menor que la de las larvas salvajes (Tabla 8.III, 4ta. fila), mientras que a $6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ no se encontraron diferencias significativas entre variedades (Tabla 8.III, 5ta. fila).

| Estado larval | Intensidad de luz | Variedad | Interacción |
|---------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Cuarto | F=66.65, gl=2,103, p<0.0001 | F=2.6, gl=1,103, n.s. | F=5.7, gl=2,103, p<0.005 |
| Tercero | F=5.51, gl=2,98, p<0.01 | F=2.53, gl=1,98, n.s. | F=3.97, gl=2,98, p<0.05 |

Tabla 8.II: Resultados del ANOVA de dos factores realizado sobre los datos de tiempo de permanencia en la oscuridad para larvas de cuarto y tercer estadio de las variedades mutante y salvaje. Factores: *intensidad de luz* (1era columna, tres niveles: oscuridad, 0.6 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 6 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$); *variedad* (dos niveles: salvaje y mutante). Tercera columna: interacción entre factores. Los datos correspondientes a los insectos de la variedad salvaje de cuarto y tercer estadio fueron tomados del Capítulo 7 (serie luz blanca) y de la Figura 8.2 respectivamente. *gl*: grados de libertad; *n.s.*: diferencias no significativas entre grupos ($p>0.05$).

| EFECTO SIMPLE | | Larvas de cuarto estadio | Larvas de tercer estadio |
|---------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 1 | Variedad ojos rojos | F=36.75, gl=2,103, p<0.0001 | F=3.29, gl=2,98, p<0.05 |
| 2 | Variedad salvaje | F=36.49, gl=2,103, p<0.0001 | F=6.19, gl=2,98, p<0.005 |
| 3 | Control | F=0.02, gl=1,103, n.s. | F=0.81, gl=1,98, n.s. |
| 4 | 0.6 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ | F=12.54, gl=1,103, p<0.001 | F=8.59, gl=1,98, p<0.005 |
| 5 | 6.0 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ | F=1.03, gl=1,103, n.s. | F=0.25, gl=1,98, n.s. |

Tabla 8.III: Análisis de efectos simples realizado sobre los análisis de ANOVA de la Tabla 8.II. 1-2: para cada una de las variedades se analizó el efecto de la intensidad (tres niveles). 3-5: para cada una de las intensidades se analizó el efecto de la variedad (dos niveles).

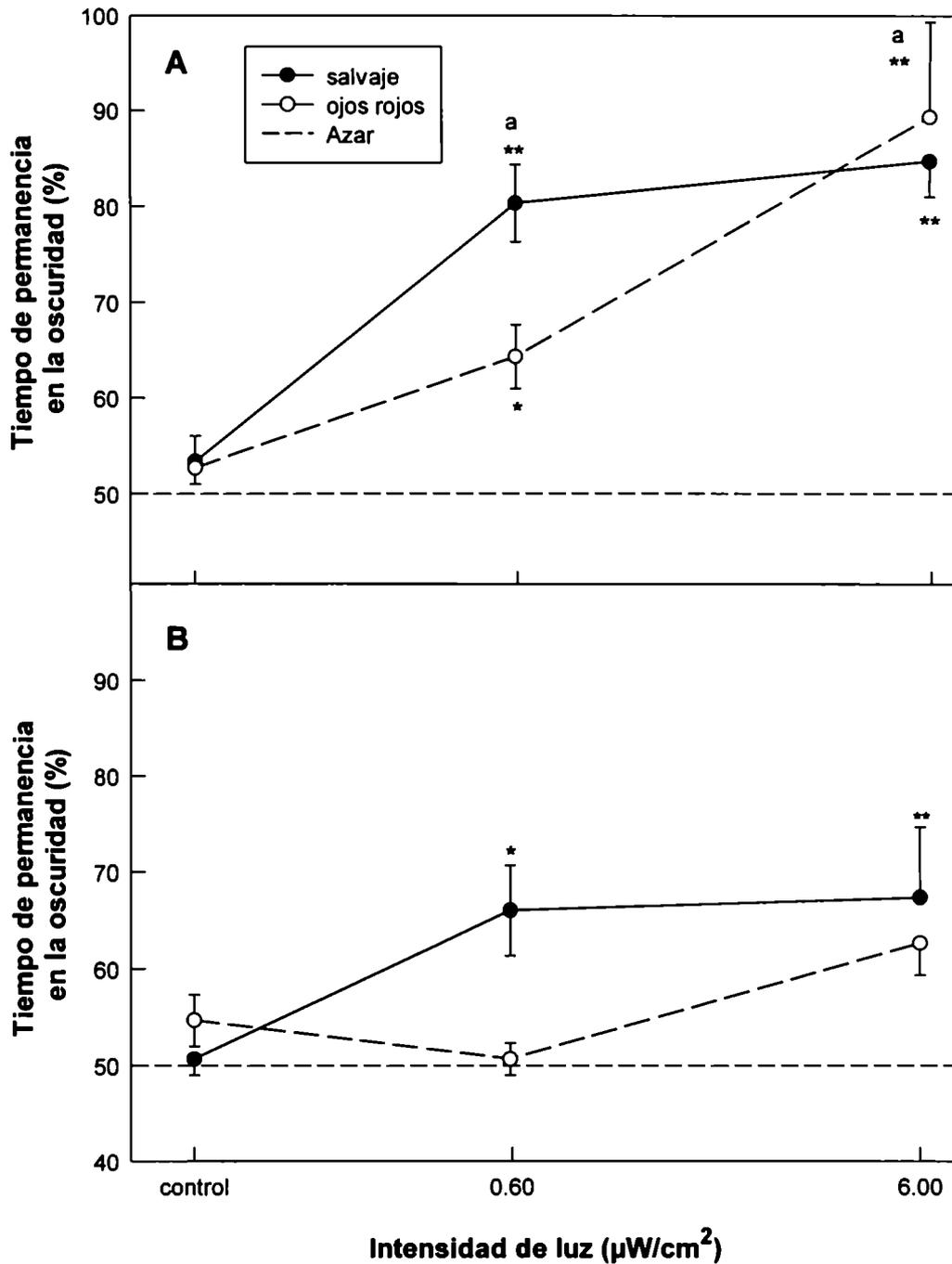


Figura 8.3: Respuesta fototáctica de larvas de cuarto estadio (A) y tercer estadio (B) de *T. infestans* (media \pm e.s.). *círculos llenos*: larvas de la variedad salvaje; *círculos vacíos*: larvas mutantes. Los datos correspondientes a los insectos de la variedad salvaje de cuarto y tercer estadio fueron tomados del capítulo 7 (serie luz blanca) y de la Figura 8.2 respectivamente. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos experimentales y su control (Prueba de Dunnett; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$). Con la misma letra se indican los grupos que no difieren estadísticamente ($p > 0.05$, comparaciones de Tukey). La línea horizontal punteada a 50% representa el tiempo de permanencia esperado por azar.

Con fines ilustrativos, en la Figura 8.4 se ilustra el efecto del estadio en el comportamiento de escape a la luz de las larvas mutantes. El análisis de ANOVA muestra que la respuesta de los insectos mutantes también resultó afectada por la edad (Tablas 8.IV y 8.V). No se observaron diferencias significativas en el nivel de actividad de los grupos control (Fig. 8.4, Tabla 8.V, 3era. fila). La respuesta de las larvas de cuarto estadio fue estadísticamente distinta de la respuesta de las larvas de tercer estadio, a las dos intensidades de luz ensayadas (Tabla 8.V, 4ta. y 5ta. fila). Es decir, estos resultados concuerdan con los observados para las larvas salvajes, y muestran que en el caso de las larvas mutantes la respuesta fotonegativa también depende de la edad.

| Intensidad de luz | Estadio | Interacción |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| F=37, gl=2,12, p<0.0001 | F=32, gl=1,102, p<0.0001 | F=14, gl=2,102, p<0.0001 |

Tabla 8.IV: Análisis de ANOVA de dos factores realizado sobre los datos de tiempo de permanencia en la oscuridad para las larvas de la variedad mutante. Factores: *intensidad de luz* (1era columna, cuatro niveles: oscuridad, 0.06 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 0.6 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 6 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$); *estadio* (dos niveles: larvas de tercer y cuarto estadio). Tercera columna: interacción entre factores. *gl*: grados de libertad.

| EFECTO SIMPLE | | |
|---------------|-------------------------------|------------------------------|
| 1 | Larvas de tercer estadio | F=5, gl=2,102, p<0.01 |
| 2 | Larvas de cuarto estadio | F=45, gl=2,102, p<0.00001 |
| 3 | Control | F=0.28, gl=1,102, n.s. |
| 4 | 0.6 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ | F=11.41, gl=1,102, p<0.005 |
| 5 | 6.0 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ | F=42.42, gl=1,102, p<0.00001 |

Tabla 8.V: Análisis de efectos simples realizado sobre el ANOVA de la Tabla 8.IV. 1-2: efecto de la intensidad (tres niveles) para cada uno de los estadio. 3-5: efecto del estadio (dos niveles) para cada una de las intensidades.

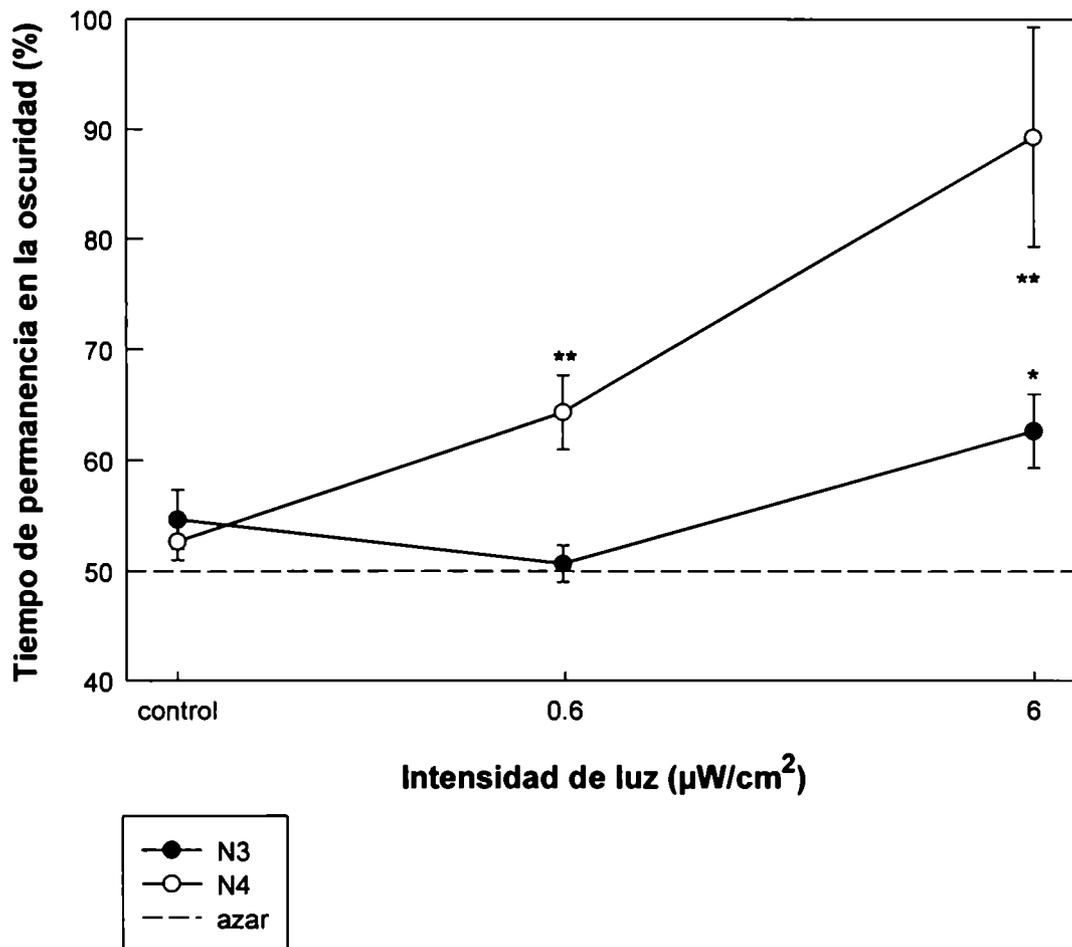


Figura 8.4: Respuesta fototáctica de una variedad mutante de ojos rojos de *T. infestans* (media \pm e.s.) y su dependencia con la intensidad de luz (unidades log) y con la edad (*círculos llenos*: larvas de tercer estadio; *círculos vacíos*: cuarto estadio). La respuesta de los insectos fue tomada de las Figs. 8.3 (cuarto estadio) y 8.4 (tercer estadio). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos experimentales y su control (Prueba de Dunnett; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$). La línea horizontal punteada a 50% representa el tiempo de permanencia esperado por azar.

En resumen, estos resultados muestran que la respuesta de los insectos de ojos rojos, al igual que la respuesta de los insectos de la variedad salvaje, depende de la intensidad de luz y de la edad (Figs. 8.3 y 8.4). Sin embargo, la respuesta está disminuida respecto de la respuesta de los insectos salvajes, especialmente en las larvas de tercer estadio. A intensidades intermedias la respuesta de los insectos salvajes es más intensa que la de los mutantes (Fig. 8.3). Este resultado sugiere que el umbral de respuesta estaría desplazado a valores de intensidad más altos en las vinchucas de ojos rojos. Por lo tanto podemos concluir que las mutaciones constituyen otro factor que afectan la respuesta fotonegativa de *T. infestans*.

Análisis morfológico

La Figura 8.5 muestra la estructura de los fotorreceptores de larvas mutantes de ojos rojos. Las omatidias presentan un sistema óptico (córnea + CC), una porción fotosensible (ocho células retinulares), y células pigmentarias (CPPs + CPSs). A diferencia de lo que ocurre en la variedad salvaje, se encuentran pigmentos pantalla solamente en las CPPs y en las CPSs. No se encuentran pigmentos dentro de las células retinulares.

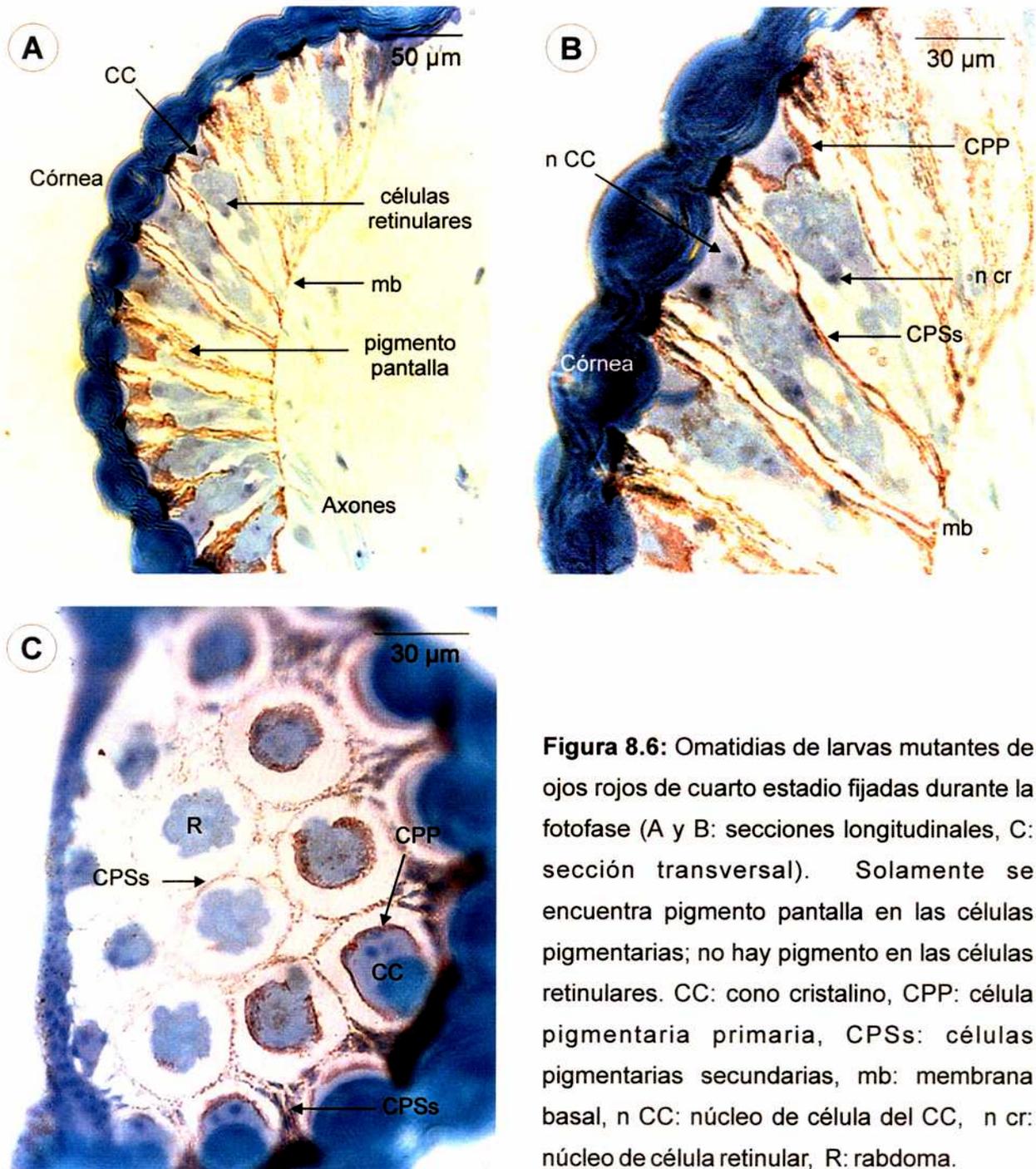


Figura 8.6: Omatidias de larvas mutantes de ojos rojos de cuarto estadio fijadas durante la fotofase (A y B: secciones longitudinales, C: sección transversal). Solamente se encuentra pigmento pantalla en las células pigmentarias; no hay pigmento en las células retinulares. CC: cono cristalino, CPP: célula pigmentaria primaria, CPSs: células pigmentarias secundarias, mb: membrana basal, n CC: núcleo de célula del CC, n cr: núcleo de célula retinular, R: rabdoma.

Discusión

Los resultados presentados en este Capítulo muestran que la respuesta fotonegativa de *T. infestans* es afectada por el desarrollo y por las mutaciones. Además, el análisis morfológico muestra que en las larvas mutantes está alterada la distribución de los pigmentos pantalla en las omatidias.

Efecto de la edad

Los resultados presentados en la Figura 8.2 muestran que la intensidad de la respuesta fotonegativa de las vinchucas se incrementa con la edad. La respuesta de larvas de cuarto estadio fue más intensa que la de las larvas de tercero. Los insectos adultos fueron los que mostraron una respuesta más intensa. En este caso el umbral de sensibilidad fotonegativo, es decir, de la respuesta mediada por los ojos compuestos y ocelos, se encuentra en algún valor inferior a $0.009 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ (Fig. 8.1). En el caso de las (Fig. 8.2).

¿Por qué observamos un incremento de la respuesta fototáctica con la edad? La explicación más simple es que esta variación podría ser consecuencia de un incremento de la sensibilidad visual a lo largo del desarrollo. En *T. infestans*, tanto el tamaño como el número de omatidias se incrementan en cada uno de los estadios larvales, alcanzando el número máximo (aproximadamente 300) en el estado adulto (Settembrini 1984). Este número es bajo, comparando con los varios miles de omatidias presentes en los ojos compuestos de *Apis sp.* o *Musca sp.* Pero como consecuencia del gran tamaño de los ojos (Fig. 2.11) y del número relativamente bajo de omatidias, las lentes de *T. infestans* tienen una gran apertura, lo que aumenta la captura de luz (Land 1997). La captura fotónica en cada omatidia depende, además, del diámetro del rabdoma según la siguiente expresión (Land 1997):

$$N=0.621.D^2.d^2/f^2$$

Donde: N =número de fotones disponibles, D =diámetro de la omatidia, d =diámetro del rabdoma, f =distancia focal.

Lamentablemente no es posible cuantificar de manera precisa N , dado que si bien tanto d como f aumentan con la edad, no disponemos de datos cuantitativos.

Sin embargo, la Tabla 8.VI (tomada de Settembrini 1984) nos permite estimar a modo grosero el efecto probable de la edad en la captura fotónica.

| Estado | Diámetro de la omatidia | Número de omatidias |
|---------|-------------------------|---------------------|
| Larva 3 | 43.6 ± 1.9 | 83 ± 6 |
| Larva 4 | 48.3 ± 1.7 | 129 ± 12 |
| Adulto | 96.9 ± 4.8 | 308 ± 21 |

Tabla 8.VI: Diámetro y número (media ± SD) de las omatidias de larvas de 3ero. y 4to. estadio, y de adultos de *T. infestans* (tomado de Settembrini 1984).

Si tomamos en cuenta solamente los efectos del aumento de D y del número de omatidias con la edad, un cálculo aproximado nos permite predecir que el ojo de un adulto capturaría aproximadamente 6.5 veces más luz que el ojo de una larva de tercero o cuarto estadio. A su vez, estas últimas capturarían 0.7 veces más luz que una larva de tercer estadio.

Por lo tanto, podemos postular que el incremento de la respuesta fotonegativa con la edad podría ser una consecuencia de un aumento en la captura fotónica, debido al incremento tanto del número como del diámetro de las omatidias. Sin embargo, las contribuciones debidas al aumento del diámetro y de la distancia focal con la edad no han podido ser contempladas en estos cálculos. En particular, el aumento de f tendría una contribución negativa dado que se halla relacionado con N en forma inversa.

Efecto de las mutaciones

La Figura 8.3 muestra que la respuesta fotonegativa de *T. infestans* es afectada por las mutaciones. Dado que la respuesta de los grupos control no mostró diferencias significativas con la variedad (Fig. 8.3 y Tabla 8.III), podemos afirmar que las diferencias observadas en el comportamiento de los insectos son consecuencia de las mutaciones. A altas intensidades de luz los dos grupos de insectos (salvajes y mutantes) mostraron una respuesta fotonegativa (Fig. 8.3, Tabla 8.III). La respuesta fue más intensa en larvas de cuarto que de tercer estadio (Fig. 8.4, Tabla 8.V). A intensidades más bajas ($0.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) la respuesta de las larvas salvajes fue

mayor que la de las mutantes (Tabla 8.III). Estos resultados muestran que si bien los insectos mutantes también muestran un comportamiento fotonegativo, existe un desplazamiento del umbral de sensibilidad hacia valores de intensidad más altos.

¿Por qué las larvas mutantes presentan una menor sensibilidad fototáctica? Desgraciadamente, no sabemos si esta mutación afecta también a los pigmentos fotosensibles. Los resultados del análisis morfológico muestran que en estos mutantes está afectada la distribución de los pigmentos pantalla en las omatidias (Fig. 8.5). A diferencia de lo que ocurre en la variedad salvaje (ver Capítulo 5), se encuentran pigmentos pantalla solamente en las células pigmentarias. No se observaron pigmentos en las células retinulares (Figs. 8.5). En el Capítulo 5 hemos visto que en el ojo adaptado a la luz los pigmentos pantalla localizados en las células retinulares forman, junto con aquellos localizados en las CPPs, un "iris" pigmentario. Este "iris" limita el flujo de luz que alcanza los fotorreceptores, adaptando la sensibilidad visual a las condiciones de luz ambiente. En el caso de la variedad mutante, la deficiencia de pigmento en las células retinulares afecta la capacidad del ojo de regular el flujo de luz que llega al rabdoma, y por lo tanto, la sensibilidad del ojo compuesto. Además, debido a esta falta de pigmento, es probable que la exposición a la luz cause una excesiva fotoconversión de los pigmentos a su estado inactivo (lo que disminuiría la sensibilidad visual), y provoque daños permanentes en las membranas rabdoméricas (Stavenga 1989, Järemo Jonson 1998).

Por otra parte, en un ambiente natural estas mutaciones tendrían un efecto deletéreo, dado que la disminución de la sensibilidad fototáctica podría aumentar la exposición de los insectos a predadores. Estas mutaciones, si bien son frecuentes en los insectarios, han sido raramente observadas en la naturaleza (Carcavallo et al. 1998b), lo que refuerza la hipótesis antes mencionada.

En resumen, podemos concluir que la respuesta de escape a la luz de las vinchucas es afectada por al menos dos factores, además de los descritos en los capítulos anteriores: la edad y las mutaciones. Respecto del primero de estos aspectos, es probable que dicha variabilidad sea consecuencia del desarrollo (esto es, del aumento del número y diámetro de las omatidias con la edad). En cuanto al segundo, las alteraciones en la distribución de pigmento pantalla afectarían la sensibilidad visual. Es posible que otros factores, tales como el nivel del ayuno y la especie, también afecten el nivel de respuesta de las vinchucas. De este modo, la respuesta fotonegativa de los insectos presentaría una variabilidad resultante de un compromiso entre diversos factores internos (edad, mutaciones, estado fisiológico) y externos (intensidad de luz).

CAPÍTULO 9: CLAVES VISUALES Y OLFATIVAS EN EL COMPORTAMIENTO DE AGREGACIÓN DE *T. INFESTANS*

Introducción

Los insectos utilizan claves sensoriales de distinta modalidad para orientarse en el ambiente e identificar apropiadamente un objeto o condición (Dusenbery 1992). Las claves visuales, olfativas y mecánicas son comúnmente utilizadas para localizar alimento, sitios de oviposición y pareja, entre otras actividades (Bradbury y Bennett 1974).

La concurrencia de señales de distinta modalidad y su interacción en distintos niveles de la vía sensorial resulta en el fenómeno conocido como *convergencia multimodal*. La interacción de señales de distinta modalidad puede ocurrir a nivel de receptor, en neuronas ascendentes o descendentes, e incluso en motoneuronas (Horn 1985). Generalmente, la convergencia multimodal produce en el animal un comportamiento específico, distinto del comportamiento evocado por cada modalidad en forma separada. En otros casos algunas claves son predominantes. La interacción entre claves de distinta modalidad tiene además otro efecto: las respuestas frente a un estímulo determinado pueden ser inhibidas por la percepción de estímulos de una modalidad diferente (Wigglesworth 1972).

En el caso de los insectos hematófagos las respuestas multimodales tienen un alto valor adaptativo ya que aumentan las probabilidades de encontrar un hospedador (Lehane 1991). En estos insectos la localización del hospedador es una respuesta integrada por claves sensoriales de distinta modalidad, particularmente visuales, olfativas y térmicas (Bradbury y Bennett 1974, Allan et al. 1987, Lehane 1991, Warnes y Finlayson 1985). En muchos casos las claves visuales u olfativas por separado no pueden orientar eficazmente a los insectos en esta tarea (Allan et al. 1987). Esta particularidad del comportamiento de búsqueda de alimento de los insectos hematófagos ha sido utilizada para aumentar la eficacia de trampas o sensores para detectar estos insectos (Lehane 1991). En el caso de la mosca tse-tse, los *targets* coloreados cebados con olores de hospedador tienen una eficiencia de captura varias veces superior a la de los *targets* que no presentan atrayentes químicos (Green 1986, 1993).

Como hemos mencionado las vinchucas buscan a sus hospedadores durante la noche, para lo cual utilizan principalmente claves olfativas y térmicas (Núñez 1987, Flores y Lazzari 1996). Durante el día las vinchucas están agrupadas en sitios que les permiten permanecer protegidos de predadores potenciales. El comportamiento de agregación de los triatominos está mediado principalmente por tigmotaxis y por señales olfativas presentes en las heces secas de estos insectos (Lorenzo Figueiras et al. 1994). Se ha sugerido que las señales olfativas presentes en las heces constituyen marcas químicas de los refugios (Lorenzo y Lazzari 1996). En términos generales los olores activan y orientan a estos insectos hacia los hospedadores y refugios (Núñez 1987, Lorenzo y Lazzari 1996), mientras que la luz, como hemos visto en los capítulos anteriores de esta Tesis, produce una respuesta de escape muy intensa.

En los capítulos anteriores hemos estudiado diversos aspectos de la fisiología visual de las vinchucas. Sin embargo, como ya hemos mencionado, en los insectos los mecanismos de orientación están muchas veces mediados por claves de más de una modalidad (convergencia multimodal). La visión es uno de los sentidos que más frecuentemente se halla integrado con otras modalidades (Horn 1985). Por lo tanto, resulta relevante estudiar si esto también ocurre en *T. infestans*. Hasta el momento la interacción entre claves visuales y olfativas y su papel en un comportamiento natural no ha sido estudiada en los insectos triatominos. En esta parte del trabajo de Tesis se analizará entonces como el comportamiento de agregación de la vinchuca hematófaga *T. infestans* está modulado por la convergencia de factores químicos presentes en las heces de este insecto, y la calidad espectral de la luz asociada a refugios potenciales. Específicamente, se estudiará si la combinación de estímulos visuales y olfativos produce respuestas distintas a las producidas por aquellas evocadas por los estímulos individuales. Esta información es relevante por dos motivos: 1) a fin de entender como los mecanismos de convergencia multimodal operan en un insecto de hábitos nocturnos, y en particular en el contexto del comportamiento de agregación, y 2) a fin de aportar información que pueda ser útil para el diseño de dispositivos de captura o detección cebados con atrayentes químicos.

Materiales y métodos

Animales

Se usaron larvas de segundo estadio de *T. infestans*, criadas en nuestro laboratorio a 28°C, con cinco-siete días de ayuno postecdisis. Los insectos fueron alimentados semanalmente desde su eclosión del huevo con sangre bovina heparinizada usando un alimentador artificial (Núñez y Lazzari 1990), o sobre gallinas vivas.

Procedimiento

El dispositivo experimental y procedimiento utilizado para estudiar el comportamiento de agregación de *T. infestans* fueron similares a los descritos previamente (Lorenzo Figueiras et al. 1994). Se utilizó una arena circular (diámetro: 14 cm; altura: 3 cm) cuya base se cubrió con un papel de filtro a modo de sustrato. La arena fue dividida en dos o tres sectores imaginarios de igual tamaño (Fig. 9.1.A). En cada sector, a modo de refugio, se colocó un papel de filtro (3 x 1.5 cm) doblado al medio (Fig. 9.1.B). La contribución de las claves visuales y olfativas en el comportamiento de agregación de *T. infestans* fue estudiada presentando estas claves en forma combinada o separada. Los estímulos visuales fueron producidos con distintos filtros espectrales (ver más abajo). La estimulación olfativa fue generada mediante la presentación de pequeñas piezas de papel de filtro impregnadas con heces (ver más abajo).

La arena experimental se apoyaba sobre un vidrio esmerilado de 30 cm de lado, y estaba encerrada por un cubo de acrílico sin base (arista: 20 cm). Una de las paredes del cubo se abría a modo de puerta, a fin de facilitar el acceso a la arena. Sobre el cubo de acrílico se colocó un cubo de cartón negro sin base de 25 cm de arista. En su cara superior se practicó un orificio de 1 cm de diámetro, a través del cual pudo observarse todo el campo de la arena. Los insectos (9-15 por ensayo) se colocaron dentro de un pequeño frasco de plástico invertido (diámetro: 3 cm, altura: 5 cm). El frasco estaba unido a un hilo de nylon delgado que permitía elevar el frasco desde el exterior del sistema, liberando a las vinchucas cuidadosamente en el centro de la arena sin producir perturbaciones. Todo el sistema se apoyaba sobre un soporte de madera con cuatro patas, en cuya base se colocó una fuente de luz

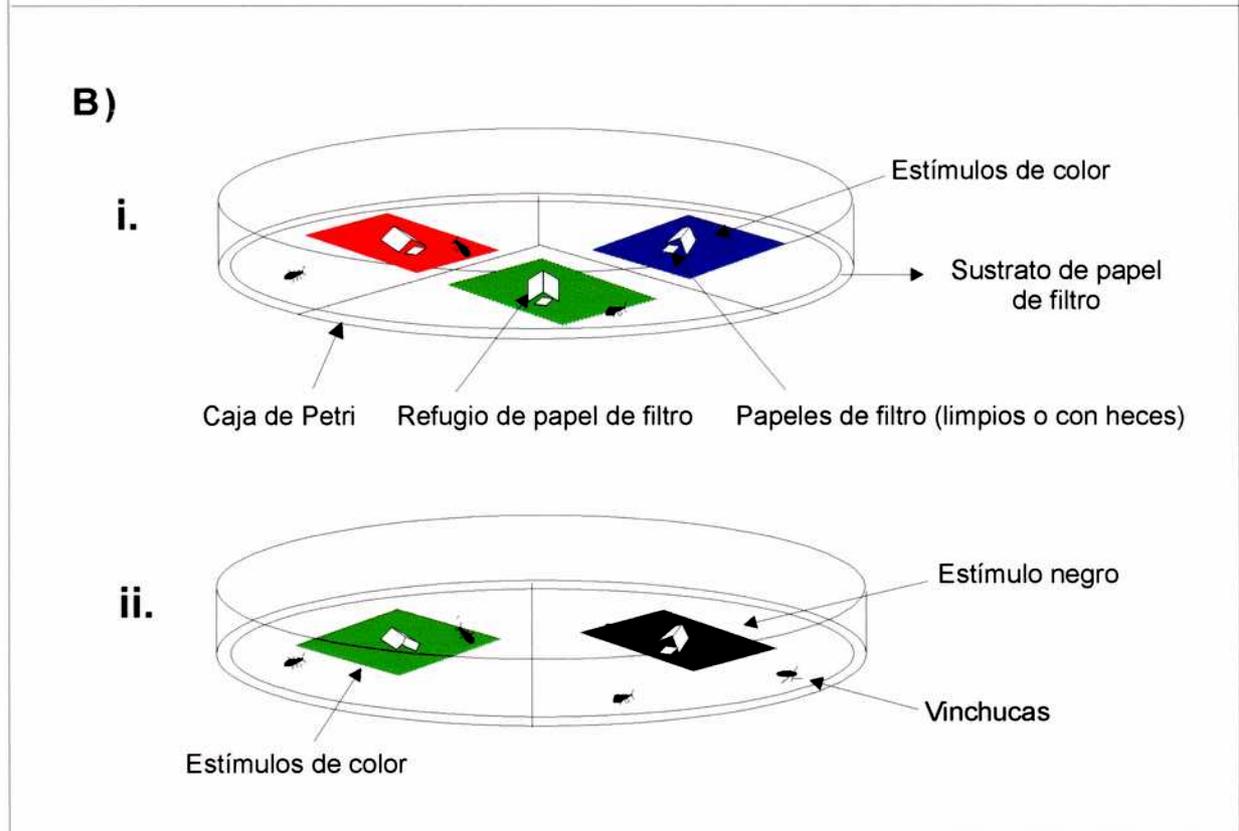
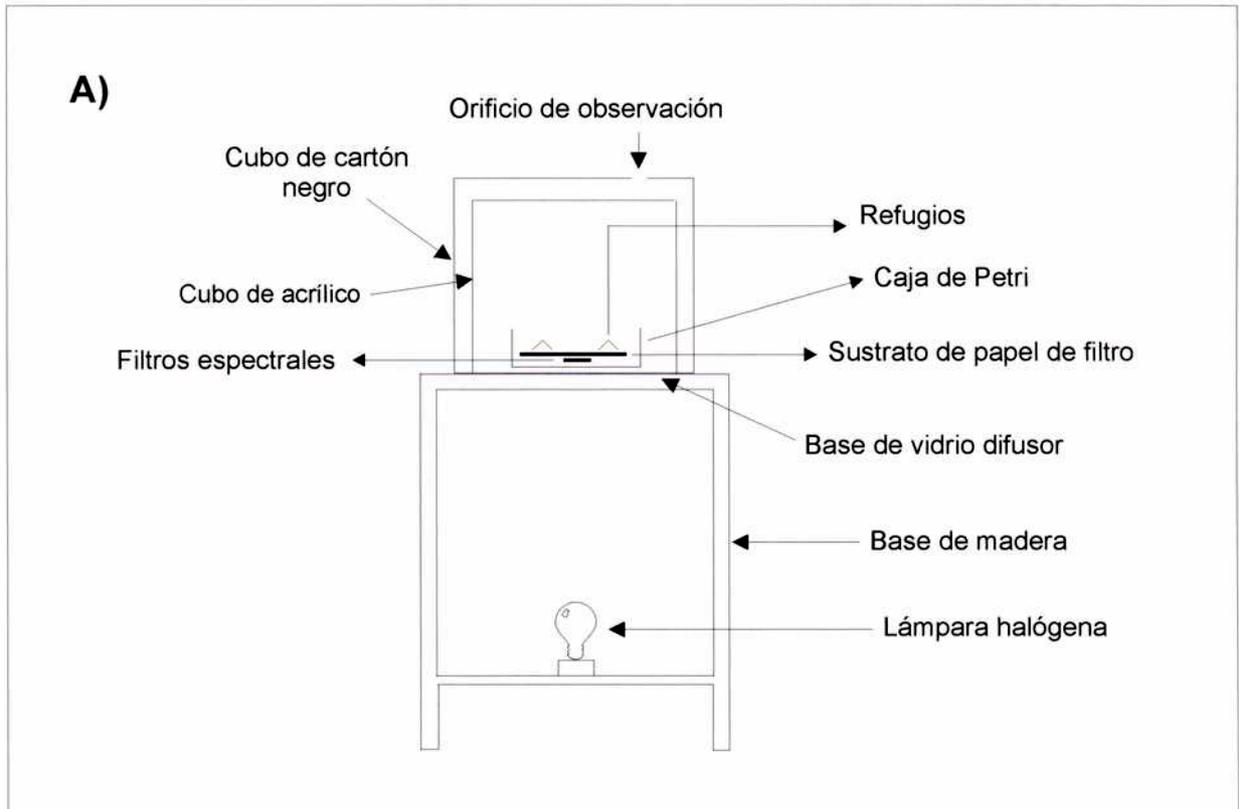
blanca en posición central (Fig. 9.1.A). Este tipo de soporte permitió la circulación de aire entre la lámpara y el sistema, evitando la variación de la temperatura a lo largo del ensayo. La presencia de los dos cubos evitó eventuales interferencias provocadas por el observador.

El procedimiento que se siguió en cada ensayo fue:

1. distribución de estímulos visuales (filtros espectrales o cartón negro, ver más abajo);
2. colocación del disco de papel de filtro sobre los mismos;
3. encendido de la lámpara;
4. medición de la intensidad de luz (ver más abajo)
5. ubicación de un lote de insectos ($n=9-15$) en el centro de la arena con la ayuda del frasco de plástico invertido como se muestra en la figura 9.1.A;
6. distribución de las piezas de papel y los refugios en las posiciones correspondientes (Fig. 9.1.B);
7. cierre del cubo de acrílico y colocación del cubo de cartón;
8. liberación de los insectos luego de 5 minutos;
9. al cabo de una hora se contó el número de vinchucas asociadas a cada uno de los refugios.

Todos los ensayos se realizaron a $25\pm 2^\circ\text{C}$. Cada lote de animales fue utilizado en un único ensayo. Todos los materiales se limpiaron con hexano o etanol al finalizar cada ensayo, y todos los papeles de filtro (base de la arena, refugios, fuente de estimulación olfativa) se descartaron y reemplazaron entre ensayos. La posición de los estímulos fue rotada entre repeticiones a fin de compensar eventuales asimetrías espaciales.

Figura 9.1: a) vista lateral del dispositivo experimental utilizado para estudiar el comportamiento de agregación de *T. infestans*. b) detalle de la arena circular mostrando la distribución de los estímulos visuales y olfativos. A modo de arena experimental se utilizó una caja de Petri con papel de filtro como sustrato, dividida en dos (i) ó tres (ii) sectores iguales. Cada área presentaba un refugio, asociado a un estímulo visual (una luz espectral o un cartón negro) y olfativo (un papel de filtro limpio o impregnado con heces). En cada ensayo se liberaba un grupo de larvas de segundo estadio en el centro de la arena. Luego de una hora se contaba el número de animales agregados en cada sector.



Estímulo olfativo

Como fuente de estímulo olfativo se utilizaron papeles de filtro (1x1,5 cm cada uno) impregnados con heces secas de larvas de 3^{er}-5^{to} estadio de *T. infestans*. Las heces se obtuvieron ejerciendo una pequeña presión en el extremo posterior del abdomen de los insectos con ayuda de pinzas finas, haciendo fluir gotas del contenido rectal (Segura 1997). Se ha demostrado que las heces obtenidas de este modo son efectivas para provocar el comportamiento de agregación (Lorenzo Figueiras 1997). Las heces de distintos animales fueron diluidas con agua destilada a fin de homogeneizarlas y facilitar su distribución en los papeles de filtro. Cada papel de filtro fue impregnado con 50 µl de esta solución 8% (v/v). Los papeles fueron colocados en una cámara a 30°C y utilizados 24 horas más tarde, momento en el cual las heces ya estaban secas y por lo tanto eran efectivas en provocar la respuesta de agregación de los insectos (Lorenzo Figueiras et al. 1994).

Estímulos visuales

La arena experimental fue iluminada desde abajo con una fuente halógena de luz blanca (OSRAM 64405S G4, 5W/12V), como se muestra en la Fig. 9.1.A. A fin de producir estímulos de distinta calidad espectral se utilizaron filtros espectrales cuadrados. Estos filtros fueron colocados sobre la base de la arena y por debajo del papel de filtro utilizado a modo de sustrato (Fig. 9.1.B). Se utilizaron cuadrados negros de la misma dimensión que los filtros a fin de generar "zonas oscuras". La disposición de los estímulos visuales fue tal que, antes de alcanzar a los insectos, la luz proveniente de la fuente pasaba a través del vidrio difusor, el piso de la arena, los filtros espectrales (o el cuadrado negro), y finalmente a través del sustrato de papel de filtro (Fig. 9.1.A). Tanto el papel de filtro como los filtros neutros de papel usados para reducir la intensidad de luz no alteraron la composición espectral de la fuente de luz blanca. La transmitancia de estos materiales fue medida con un espectrofotómetro de arreglo de diodos (Hewlett Packard HP8452A).

Se usaron los filtros espectrales marca Schott (Mainz, Alemania) BG12, VG9 y OG590, de 5cm de lado y 1mm de espesor. Estos filtros son de apariencia azul, verde y roja, respectivamente, para la visión humana. La elección de estos filtros permitió cubrir el intervalo de longitudes de onda entre 400 y 700 nm (Fig. 9.2).

Una vez que los filtros espectrales y el disco de papel de filtro fueron colocados sobre la base de la arena se procedió a medir la intensidad de luz que alcanzaba a los insectos utilizando un radiómetro con sensor de respuesta plana (SEL 033 sensor module, IL 1400 radiometer, International Light, Newburyport, Mass, USA). A tal fin, la superficie del sensor fue colocada en forma invertida sobre el papel de filtro. Se midió la intensidad de luz transmitida por: 1) los filtros espectrales (o por los cuadrados negros) a través del papel de filtro que servía de sustrato, 2) la intensidad transmitida por el papel de filtro solamente (*background*). Se fijó la intensidad de los distintos estímulos coloreados en $1.68\text{-}2.00\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$, para lo que se usaron filtros neutros de papel. La intensidad en la zona asociada al cuadrado negro fue de $0.00\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$. La intensidad de luz en la zona blanca de la arena fue de $21.7\text{-}25.4\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Es decir, la intensidad de los estímulos espectrales fue diez veces menor que la del fondo contra el que se presentaban los mismos. Por lo tanto, estos estímulos actuaban como zonas contrastantes de baja intensidad de luz y de una calidad espectral definida. Dado que las vinchucas prefieren agregarse en zonas oscuras o de poca intensidad de luz, nuestro diseño aseguró que los insectos buscaran activamente los refugios y permitió estudiar el efecto de luces de distinta composición espectral en el comportamiento de agregación. Dado que se mantuvo la intensidad de los estímulos espectrales a un valor constante, pudimos estudiar el efecto específico de la composición espectral de la luz y excluir posibles fenómenos de sensibilidad relativa.

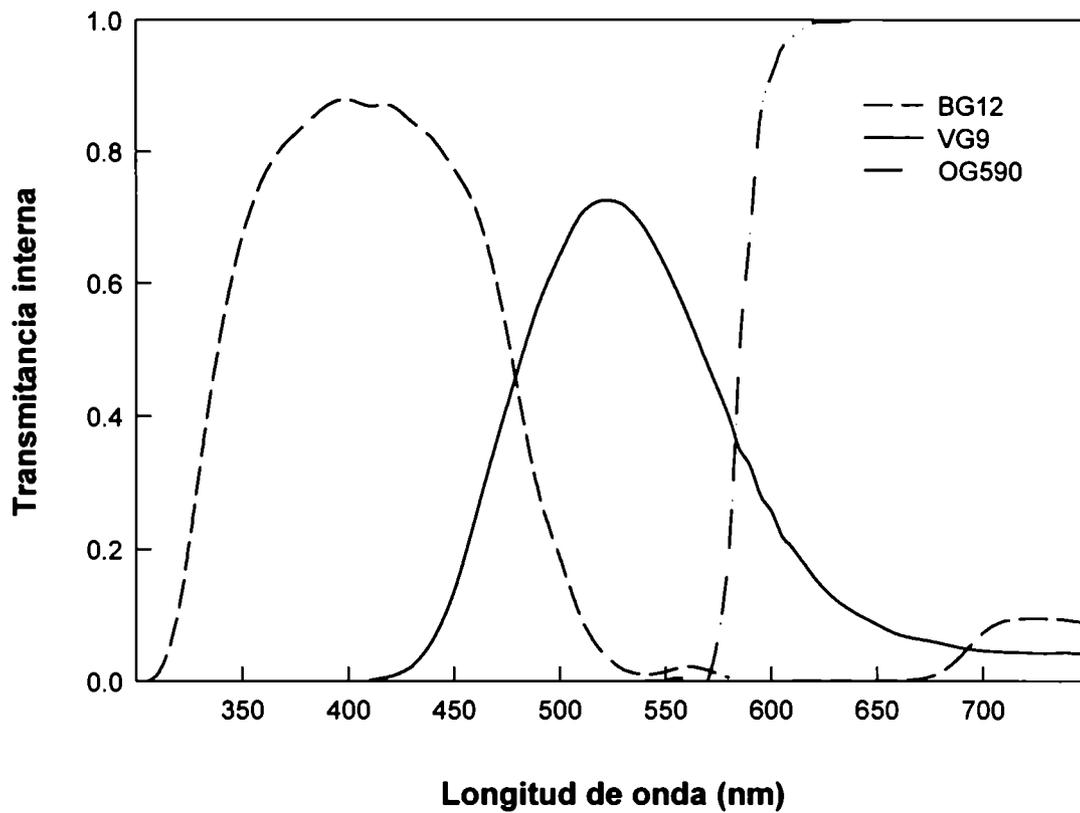


Figura 9.2: Transmittancia en función de la longitud de onda de los filtros utilizados como estímulos espectrales. Los filtros utilizados tienen apariencia azul (BG12), verde (VG9) y roja (OG590) para el sistema visual humano.

Experimentos

Comportamiento de agregación frente a estímulos olfativos

Este experimento fue realizado a fin de estudiar si las condiciones experimentales (la cantidad de materia fecal, la intensidad de luz, el estadio larval, etc.) fueron adecuadas para reproducir de modo consistente el comportamiento de agregación de *T. infestans*, tal como ha sido caracterizado en estudios previos (Lorenzo Figueiras et al. 1994). Se realizaron tres series experimentales en la arena dividida en tres sectores:

1. Cada sector presentó un papel limpio asociado a un refugio (número total de insectos $N=60$; el número de réplicas $k=5$).
2. Cada sector presentó un papel impregnado con heces y un refugio ($N=48$; $k=4$).
3. Un sector de la arena presentó un papel impregnado con heces y un refugio, mientras que cada uno de los otros dos sectores presentaba un papel limpio y un refugio ($N=117$; $k=10$).

La primera y segunda serie permitieron establecer la distribución de los insectos en los refugios cuando estos fueron idénticos en términos de información olfativa. La tercer serie permitió estudiar el nivel de agregación evocado por la señal olfativa.

Comportamiento de agregación frente a estímulos espectrales en ausencia o presencia de claves olfativas

Este experimento se realizó en la arena dividida en tres sectores. Cada sector presentó una luz espectral distinta (azul, verde y roja) asociada a un refugio (Fig. 9.1.B). Se realizaron dos series experimentales:

1. Cada sector presentó un papel limpio ($N=177$; $k=12$).
2. Cada sector presentó un papel impregnado con heces ($N=178$; $k=12$).

En ambas series los tres sectores de la arena fueron equivalentes en términos de información olfativa. Por lo tanto, si las vinchucas no tuvieran preferencias por alguna de las luces espectrales, los tres sectores deberían ser elegidos en la misma proporción. Más aún, la comparación entre los resultados de ambas series permitió determinar si la presentación simultánea de color y olor cambia el patrón de agregación obtenido para cada clave (visual y olfativa) por separado.

Respuesta de agregación a la estimulación combinada de claves visuales y olfativas

Este experimento se realizó en la arena dividida en dos sectores. En un sector de la arena se presentó un cuadrado negro (N) mientras que en el otro sector se presentó un filtro espectral (C), azul (A), verde (V) o rojo (R) (Fig. 9.1.B). Cada sector presentaba un refugio y la señal olfativa podía estar presente o ausente en uno o ambos sectores. De este modo, se realizaron cuatro series experimentales para cada color (ver Tablas 9.I-III para N y k):

1. Series NC: cada sector (el negro y el coloreado) presentaba un papel limpio.
2. Series N*C*: cada sector (el negro y el coloreado) presentaba un papel impregnado con heces (*).
3. Series NC*: el sector negro presentaba un papel limpio, mientras que el sector coloreado presentaba un papel impregnado con heces.
4. Series N*C: el sector negro presentaba un papel impregnado con heces mientras el sector coloreado presentaba un papel limpio.

La primera serie (NC) fue realizada a fin de estudiar si alguno de los estímulos coloreados es equivalente a oscuridad funcional para las vinchucas. La comparación de los resultados de la primera serie (NC) con los de la segunda serie (N*C*) permitió establecer si la adición de olores altera el patrón de agregación previamente observado. La tercera y cuarta series (N*C y NC*) fueron realizadas a fin de estudiar la interacción entre la señal olfativa y los estímulos visuales de distinta composición.

Se realizó una quinta serie de experimentos en la arena dividida en dos sectores. En estas series ambos sectores presentaban el mismo estímulo visual [ya sea azul (A), verde (V), rojo (R) o negro (N)] y un refugio, pero un solo sector fue asociado a un papel impregnado con heces (CC*) (ver Tabla 9.IV para N y k). El objetivo de estas series fue determinar el papel de las claves olfativas en presencia de refugios asociados a estímulos visualmente idénticos. Específicamente, nos preguntamos si la señal olfativa pierde su efecto atractante cuando está asociada a una luz espectral determinada.

Análisis estadístico

La distribución de los insectos en la arena fue analizada con una prueba de G de bondad de ajuste a una distribución al azar (es decir, 1/3 ó 1/2 de los animales en cada sector según se haya usado una arena dividida en tres ó dos sectores

respectivamente) (Sokal y Rohlf 1981). En el caso de que estas pruebas arrojaran un resultado significativo ($p < 0.05$), los resultados de los experimentos realizados en la arena de tres sectores fueron analizados mediante un análisis de G subdividido (*log-likelihood ratio*). Este análisis permitió determinar que sectores presentaban diferencias en el número de insectos agregados (Zar 1984).

En las tablas de resultados se presentan los valores de G_p (G_{pool}) y G_h (G de heterogeneidad). Estos valores son más útiles que el valor de G_t (G total), dado que este último es la suma de aquellos. Los valores de G_p y G_h , si bien no serán discutidos, pueden ser interpretados como sigue (Sokal y Rohlf 1981):

- $G_p < 0.05$, $G_h > 0.05$: la distribución es distinta de la esperada por azar; las réplicas son homogéneas.

- $G_p < 0.05$, $G_h < 0.05$: la distribución es distinta de la esperada por azar; hay diferencias en la magnitud de la respuesta entre réplicas.

- $G_p > 0.05$, $G_h < 0.05$: la distribución no es estadísticamente distinta de la esperada por azar; las réplicas no son homogéneas.

Resultados

Comportamiento de agregación frente a estímulos olfativos

Este experimento fue realizado en una arena dividida en tres sectores. En la primera y segunda serie los refugios fueron idénticos en términos de información olfativa. Cada refugio estaba asociado a un papel limpio (primera serie) o impregnado con heces (segunda serie). En la tercera serie solamente un refugio estaba asociado a un papel impregnado con heces.

La Figura 9.3 muestra los resultados de este experimento. En la primera y en la segunda serie la agregación de las vinchucas en los tres sectores no fue estadísticamente distinta de la distribución esperada por azar (1era serie: $G=2.0$, $gl=2$, NS; 2da serie: $G=0.2$, $df=2$, NS). En la tercera serie, la proporción de insectos agregada en el sector que presentaba heces fue estadísticamente distinta de la esperada por azar ($G=13.1$, $gl=2$, $p < 0.001$). Por lo tanto, la señal olfativa presente en las heces fue efectiva para provocar la respuesta de agregación de *T. infestans*.

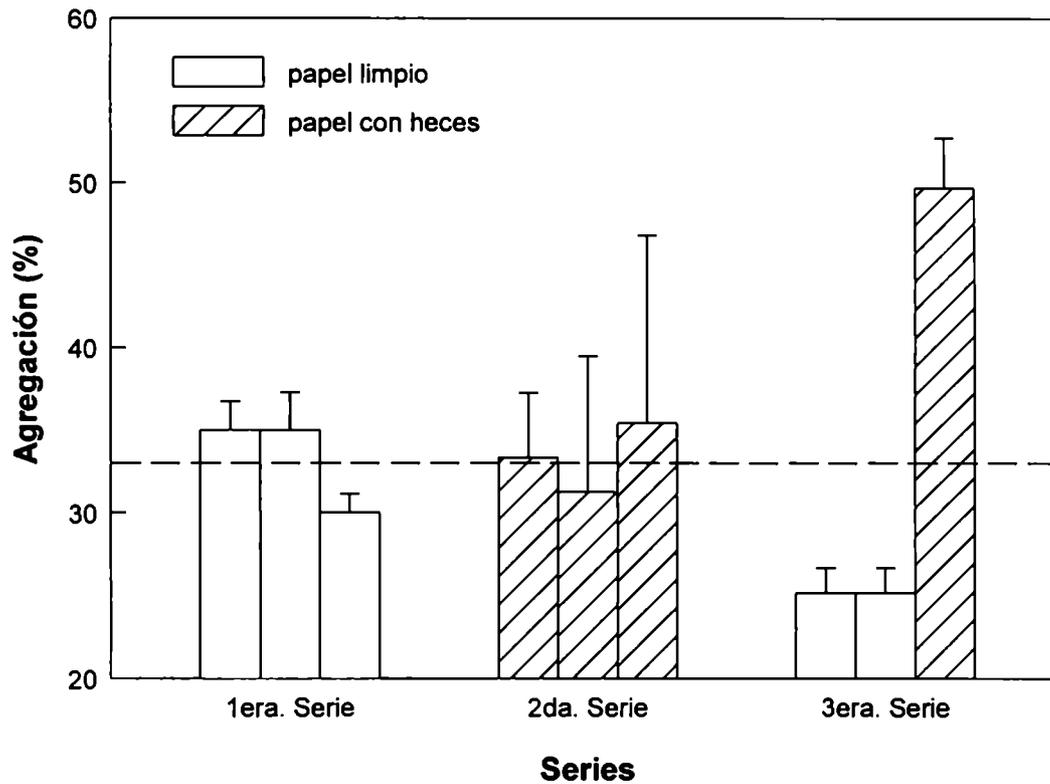


Figura 9.3: claves olfativas en la respuesta de agregación (media \pm e.s.) de *T. infestans*. La línea punteada en 33.33% indica el nivel de agregación esperado por azar en cada uno de los sectores. En la primera serie (N=60, k=5) cada refugio presentaba un papel limpio (barras blancas); en la segunda serie (N=48, k=4) cada refugio presentaba un papel impregnado con heces (barras rayadas). En la tercera serie (N=117, k=10) un refugio presentaba un papel impregnado con heces (barra rayada), mientras que los otros dos refugios presentaban papeles limpios (barras blancas).

Comportamiento de agregación a estímulos espectrales en ausencia o presencia de claves olfativas

En este experimento cada sector de la arena presentaba una luz espectral distinta (azul, verde o roja) asociada a un refugio. Cada refugio podía presentar un papel limpio (primera serie) o impregnado con heces (segunda serie).

La Figura 9.4 muestra que el tipo de luz espectral afectó significativamente el comportamiento de agregación de *T. infestans*. En ambas series la distribución de las vinchucas en los refugios fue estadísticamente distinta de la distribución esperada por azar (1era. serie: $G=15.6$, $gl=2$, $p<0.001$; 2da. serie: $G=49.5$, $gl=2$, $p<0.001$). La presencia de heces modificó el patrón de agregación evocado por los estímulos espectrales (1era. vs. 2da serie: $G=13.6$, $gl=2$, $p<0.005$). El efecto específico de la señal olfativa para cada color (barras blancas vs. barras negras en la Fig. 9.4) no pudo ser analizado en este experimento, dado que la respuesta a una de las luces espectrales resulta necesariamente afectada por la respuesta a las otras dos luces. Este efecto será específicamente analizado en la siguiente sección (Experimento 3), en la que se presentan experimentos realizados en una situación de doble elección que permiten excluir la mencionada interferencia.

La Fig. 9.4 muestra que en ambas series las vinchucas evitaron el sector que presentó luz verde (análisis de G subdividido, 1era. serie: $G=15.7$, $gl=1$, $p<0.001$; 2da. serie: $G=6.5$, $gl=1$, $p<0.025$). En ausencia de la señal olfativa (1era. serie) las vinchucas se distribuyeron al azar entre los sectores azul y rojo (análisis de G subdividido, $g=0.3$, $gl=1$, NS). Sin embargo, en presencia de la señal olfativa los insectos prefirieron agregarse en el sector rojo (análisis de G subdividido, $G=43.0$, $gl=1$, $p<0.001$), seguido del azul y finalmente del verde ($G=6.46$, $p<0.05$). Estos resultados muestran que la presencia de la señal olfativa modificó el patrón de elección de luces espectrales de las vinchucas.

En resumen, las vinchucas siempre evitaron agregarse en refugios asociados a luz verde, y prefirieron refugios donde ambas, luz roja y heces, estuvieran presentes. Además, existe una interacción entre señales visuales y olfativas en el comportamiento de agregación de *T. infestans*, dado que cuando fueron presentadas en forma simultánea, estas señales provocaron respuestas que fueron distintas de aquellas evocadas por la presentación individual de estímulos visuales u olfativos.

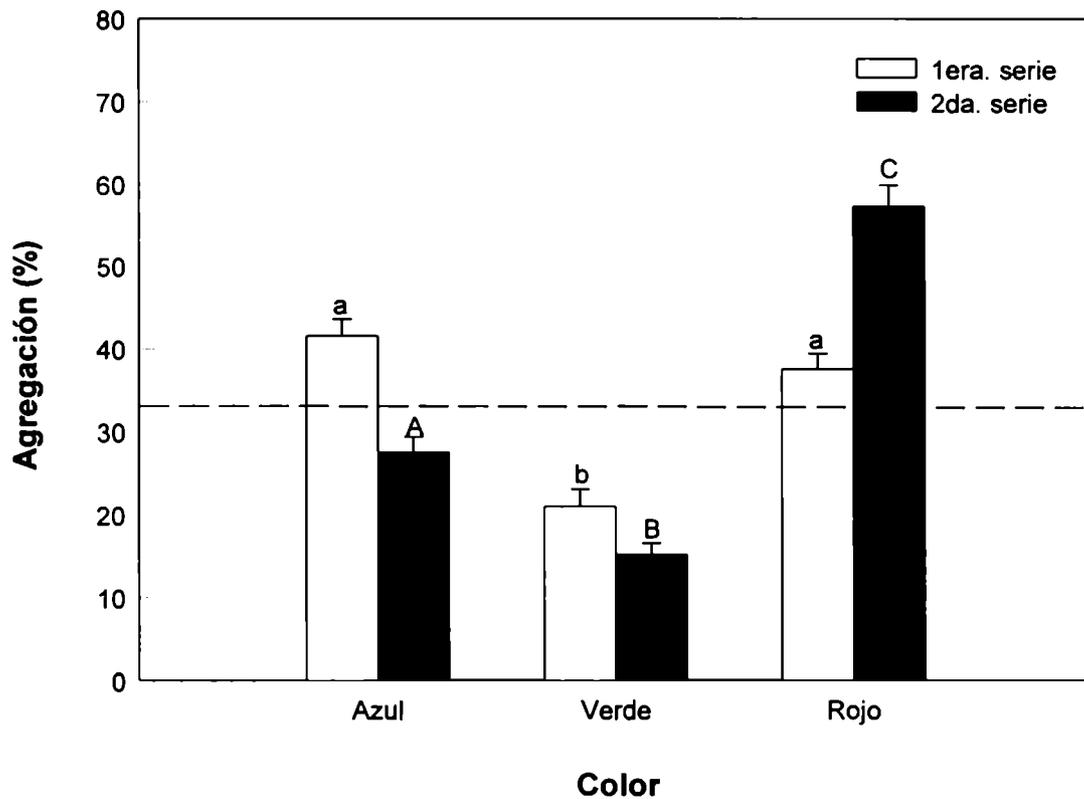


Figura 9.4: Claves visuales en la respuesta de agregación (media \pm e.s.) de *T. infestans*, en presencia o ausencia de estimulación olfativa. Se utilizó una arena dividida en tres sectores; en cada sector se presentó una luz espectral distinta (azul, verde y roja) asociada a un refugio. La línea punteada en 33.33% indica el nivel de agregación esperado por azar en cada uno de los sectores. En la primera serie experimental cada refugio presentaba un papel limpio (barras blancas; N=177, k=12); en la segunda serie cada refugio presentaba un papel impregnado con heces (barras negras; N=178, k=12). Con distintas letras (1era. serie: minúsculas; 2da serie: mayúsculas) se indican las medias que difieren estadísticamente al nivel de 5 %.

Respuesta de agregación a la estimulación combinada de claves visuales y olfativas

En este experimento se utilizó una arena dividida en dos sectores (Fig. 9.1.A). Un sector de la arena siempre presentó un cartón negro, mientras que el otro sector presentaba una luz espectral (azul, verde o roja). Las heces podían estar ausentes o presentes en ambos sectores (primera y segunda serie), o presentes en un solo sector, ya sea el que presentaba la luz coloreada (tercer serie) o el que presentaba el cartón negro (cuarta serie).

La Figura 9.5 muestra la respuesta de las vinchucas para cada una de las tres luces espectrales y series experimentales. La primer serie (barras blancas) excluye las señales olfativas, y fue realizada a fin de estudiar si alguna de las luces espectrales actúa como "oscuridad funcional" para las vinchucas, al menos en el contexto del comportamiento de agregación. Si esto fuera así las vinchucas deberían distribuirse al azar entre el sector con la luz espectral y el sector con el cartón negro. Sin embargo, esto no fue observado en ningún caso: los insectos prefirieron agregarse en el sector oscuro, rechazando los refugios asociados a luz azul, verde o roja (barras blancas en la Fig. 9.5 y primera fila de las Tablas 9.I, 9.II y 9.III). Estos resultados demuestran que ninguna de las luces espectrales es equivalente a oscuridad para *T. infestans*, y que en ausencia de señales olfativas el comportamiento de agregación de esta especie está mediado por fototaxis negativa.

En la cuarta serie la señal olfativa fue únicamente asociada al sector oscuro. En estas series las vinchucas también prefirieron agregarse en la zona oscura, rechazando los refugios asociados a luz azul, verde o roja (barras negras en la Fig. 9.5 y cuarta fila en las Tablas 9.I-III). Este resultado es predecible dado que los dos estímulos de distintas modalidades capaces de provocar la agregación de los insectos (heces + oscuridad) fueron presentados en un mismo sector.

En la tercer serie (barras grises en la Fig. 9.5 y tercera fila de las Tablas 9.I-III) el efecto de las heces fue contrastado con el efecto de la oscuridad. A tal fin, las heces fueron asociadas con el estímulo visual menos atractivo, i.e., la luz espectral. Los resultados de estas series dependieron de la composición espectral del estímulo visual. En el caso de la luz azul, la presencia de heces modificó la preferencia original de las vinchucas por el sector oscuro (Fig. 9.5.A y tercera fila de la Tabla 9.I). La distribución de los insectos en ambos sectores no fue estadísticamente distinta de la esperada por azar, si bien se observó una preferencia de las vinchucas por el sector oscuro (Fig. 9.5.A). En el caso de las series realizadas con luz verde,

la presencia de heces en el refugio asociado a esta luz espectral no modificó la preferencia original de las vinchucas por el sector oscuro (Fig. 9.5.B y tercera fila de la Tabla 9.II). En el caso de la luz roja, la preferencia inicial de las vinchucas por el sector oscuro fue revertida cuando las heces fueron asociadas a dicha luz espectral (Fig. 9.5.C y tercera fila de la Tabla 9.III). En este caso se observó un mayor número de vinchucas agregadas en el sector que presentaba simultáneamente heces + luz roja, que en el sector que presentaba un cartón negro solamente.

Finalmente en la segunda serie (barras rayadas en la Fig. 9.5 y segunda fila de las Tablas 9.I-III) se presentó la señal olfativa tanto en el sector oscuro como en el sector que presentaba la luz espectral. Si la señal olfativa predominara sobre las claves visuales, los insectos deberían distribuirse al azar entre ambos sectores. Si por el contrario, las claves visuales predominaran sobre las olfativas, las vinchucas deberían agregarse en mayor medida en el sector oscuro. Tanto en el caso de las series realizadas con luz azul como en las realizadas con luz verde, las vinchucas se agregaron en el sector oscuro (Figs. 9.5.A, B y segunda fila de las Tablas 9.I y 9.II). Sin embargo, en el caso de las series realizadas con luz roja las vinchucas se distribuyeron al azar entre los dos sectores (Fig. 9.5.C y segunda fila de la Tabla 9.III). Estos resultados muestran que la preferencia por un sitio oscuro predomina sobre las claves olfativas en el caso de luz azul y verde. En el caso de la luz roja, esta predominancia desaparece y el comportamiento de agregación está principalmente determinado por las claves olfativas presentes en las heces.

En resumen, ninguna de las luces espectrales utilizadas fue equivalente a oscuridad funcional para las vinchucas: la preferencia por un sitio oscuro (respuesta fotonegativa) fue verificada en todos los tratamientos en los que las claves olfativas no fueron presentadas en la arena. En las series en las que la preferencia por un sitio oscuro fue puesta en competencia con la presencia de la señal olfativa de agregación, las luces espectrales tuvieron distinta eficiencia en disparar el comportamiento fotonegativo. La luz verde fue el estímulo más eficiente, seguido de la luz azul y finalmente de la luz roja.

| | Series | G_{pool} | P | G_h | P | N | k |
|---|---------------|-------------------------|----------|----------------------|----------|----------|----------|
| 1 | N A | 34 | <0.001 | 11.3 | <0.05 | 71 | 6 |
| 2 | N*A* | 19.87 | <0.001 | 4.93 | NS | 65 | 6 |
| 3 | N A* | 2.94 | NS | 23.98 | <0.05 | 77 | 8 |
| 4 | N*A | 14.4 | <0.001 | 1.36 | NS | 69 | 6 |

Tabla 9.I: Pruebas de G (G_p : G_{pool} ; G_h : G de heterogeneidad) realizadas sobre los datos del tercer experimento. Un sector de la arena presentaba un cartón negro (N) mientras que el otro sector presentaba una luz azul (A). Los asteriscos indican la presencia de heces en el sector correspondiente. N: número de insectos; k: número de réplicas.

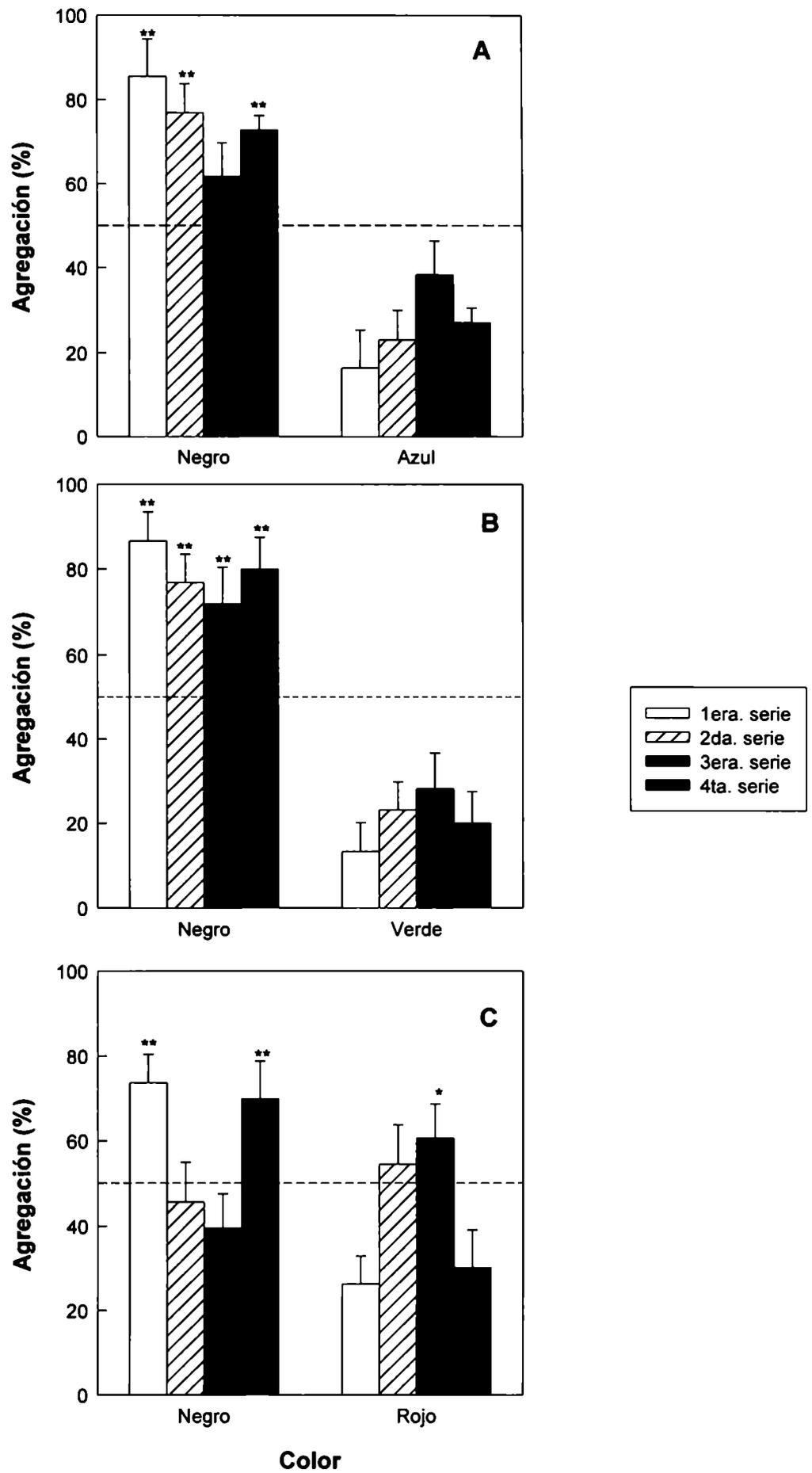
| | Series | G_{pool} | P | G_h | P | N | k |
|---|---------------|-------------------------|----------|----------------------|----------|----------|----------|
| 1 | N V | 44.4 | <0.001 | 7.7 | NS | 71 | 7 |
| 2 | N*V* | 23.75 | <0.001 | 13 | NS | 78 | 8 |
| 3 | N V* | 15.3 | <0.001 | 21 | <0.005 | 78 | 8 |
| 4 | N*V | 25 | <0.001 | 6.21 | NS | 62 | 6 |

Tabla 9.II: Pruebas de G (G_p : G_{pool} ; G_h : G de heterogeneidad) realizadas sobre los datos del tercer experimento. Un sector de la arena presentaba un cartón negro (N) mientras que el otro sector presentaba una luz verde (V). Los asteriscos indican la presencia de heces en el sector correspondiente. N: número de insectos; k: número de réplicas.

| | Series | G_{pool} | P | G_h | P | N | k |
|---|---------------|-------------------------|----------|----------------------|----------|----------|----------|
| 1 | N R | 18.8 | <0.001 | 13.2 | NS | 80 | 8 |
| 2 | N*R* | 1.3 | NS | 11.9 | NS | 80 | 8 |
| 3 | N R* | 4.7 | <0.05 | 25.5 | <0.005 | 97 | 10 |
| 4 | N*R | 18.8 | <0.001 | 13.2 | NS | 80 | 8 |

Tabla 9.III: Pruebas de G (G_p : G_{pool} ; G_h : G de heterogeneidad) realizadas sobre los datos del tercer experimento. Un sector de la arena presentaba un cartón negro (N) mientras que el otro sector presentaba una luz roja (R). Los asteriscos indican la presencia de heces en el sector correspondiente. N: número de insectos; k: número de réplicas.

Figura 9.5: Claves visuales y olfativas en la respuesta de agregación (media \pm e.s.) de *T. infestans*. Se utilizó una arena de dos sectores; un sector de la arena presentó una luz espectral (A: azul, B: verde, C: rojo) mientras que el otro sector presentaba un cartón negro. Las heces podían estar ausentes en ambos sectores (1era. serie: barras blancas), presentes en ambos sectores (2da. serie: barras rayadas), presentes solamente en el sector con la luz espectral (3era. serie: barras grises) o presentes solamente en el sector con el cartón negro (4ta. serie: barras negras). La línea punteada en 50% indica el nivel de agregación esperado por azar en cada uno de los sectores. L: papel limpio, H: papel impregnado con heces. Los asteriscos indican diferencias significativas con las esperadas por una distribución al azar (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).



En la quinta serie experimental ambos sectores de la arena presentaron el mismo estímulo visual pero solamente uno de los sectores presentaba la señal olfativa. Estas series fueron realizadas a fin de estudiar si la señal olfativa pierde su efecto atractante cuando está presentada con alguna de las luces espectrales. La Figura 9.6 y la Tabla 9.IV muestran que en el caso de las luces espectrales (azul, verde y rojo), las vinchucas prefirieron agregarse en el sector que presentaba la señal olfativa. Sin embargo, las vinchucas se distribuyeron al azar cuando ambos sectores presentaban un cartón negro. Es decir, en presencia de refugios oscuros la entrada visual predominó sobre la olfativa.

| | Series | G_{pool} | P | G_h | P | N | k |
|---|---------------|-------------------------|----------|----------------------|----------|----------|----------|
| 1 | A A* | 9.52 | <0.01 | 96.7 | <0.01 | 96 | 9 |
| 2 | V V* | 4.08 | <0.05 | 14.9 | NS | 89 | 9 |
| 3 | R R* | 4.06 | <0.05 | 14.24 | NS | 120 | 11 |
| 4 | N N* | 0.10 | NS | 9.56 | NS | 89 | 10 |

Tabla 9.IV: Pruebas de G (G_p : G_{pool} ; G_h : G de heterogeneidad) realizadas sobre los datos del experimento 3. Ambos sectores presentaban el mismo estímulo (A: azul, V: verde, R: rojo, N: negro) pero solamente uno de ellos estaba asociado a un papel con heces (*). N: número de insectos, k: número de réplicas.

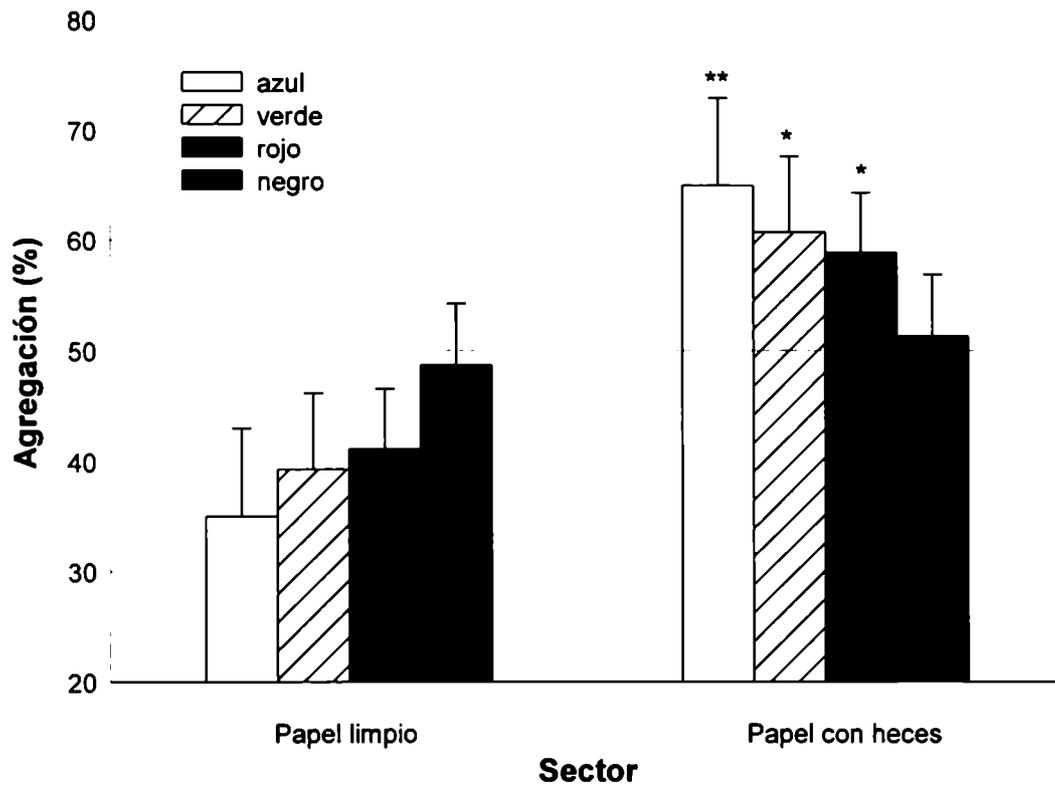


Figura 9.6: Claves visuales y olfativas en la respuesta de agregación (media \pm e.s.) de *T. infestans*. Los dos sectores de la arena presentaban el mismo estímulo visual (barras blancas: luz azul, barras rayadas: luz verde, barras grises: luz roja, barras negras: cartón negro), pero uno solo de los sectores presentaba el estímulo olfativo (papel impregnado con heces); el otro sector presentaba un papel limpio. La línea punteada en 50% indica el nivel de agregación esperado por azar en cada uno de los sectores. Los asteriscos indican diferencias significativas con las esperadas por una distribución al azar (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

Discusión

Los experimentos realizados en este Capítulo analizan la interacción entre claves sensoriales de distinta modalidad en el comportamiento de agregación de *T. infestans*. En particular, nos hemos concentrado en dos de las claves principales que median la agregación en forma separada: señales olfativas de agregación presentes en las heces (Lorenzo Figueiras et al. 1994), y señales visuales (luz vs. oscuridad) que desencadenan el comportamiento de fototaxis negativa. Como se esperaba de acuerdo a trabajos previos (Lorenzo Figueiras et al. 1994), las heces por sí mismas fueron capaces de provocar el comportamiento de agregación de las vinchucas (Fig. 9.3, barras rayadas). En ausencia de heces, los sitios oscuros fueron siempre preferidos a los iluminados con luces espectrales, ya sea en el caso del azul, verde o rojo (Fig. 9.5, barras blancas). Este resultado también era esperado dado el comportamiento fotonegativo de las vinchucas (Capítulos 3, 4 y 7). En particular, las tres luces espectrales indujeron distintos niveles de agregación aún cuando tuvieron la misma intensidad (Fig. 9.4). Por lo tanto, los estímulos de distinta calidad espectral (azul, verde y rojo) fueron diferencialmente evaluados por los insectos. En particular todos los experimentos fueron consistentes en demostrar que la luz verde fue siempre rechazada por las vinchucas para agregarse (Figs. 9.4 y 9.5). Las luces azul y roja, por su parte, fueron menos evitadas que la luz verde. Ninguna de las luces utilizadas en este trabajo, que cubrían el intervalo de longitudes de onda entre 400 y al menos 700 nm, fue equivalente a oscuridad (Fig. 9.5).

La presencia de la señal olfativa (heces) modificó el patrón de elección de luces espectrales: las vinchucas prefirieron agregarse en los refugios asociados a luz roja, seguido de los refugios asociados a luz azul y finalmente a luz verde (Fig. 9.4, barras negras). Cuando se presentaron dos estímulos espectrales visualmente idénticos y además un papel con heces en uno solo de los refugios, las vinchucas siguieron la clave olfativa para agregarse (Fig. 9.6). Cuando una luz espectral fue asociada a heces y puesta en competencia con un sitio oscuro (sin heces), la capacidad de la señal olfativa para provocar la agregación de los insectos dependió de la calidad espectral del estímulo visual. Los refugios asociados a luz verde siempre fueron rechazados a pesar de la presencia de heces (Fig. 9.5.B). En el caso de la luz azul las heces contrarrestaron la preferencia de las vinchucas por un sitio oscuro: las vinchucas se distribuyeron al azar entre ambos sectores: (Fig. 9.5.A). Finalmente, los refugios asociados a luz roja y heces fueron preferidos a los

asociados únicamente al cartón negro (Fig. 9.5.C). Por lo tanto, estos experimentos demuestran que existe una interacción concreta entre estímulos visuales y olfativos en el comportamiento de agregación de *T. infestans*. Dicha interacción depende de la composición espectral del estímulo visual.

En las siguientes secciones discutiremos la respuesta de *T. infestans* a claves visuales y la respuesta a la estimulación combinada de claves visuales y olfativas. La respuesta de agregación mediada por señales olfativas solamente ha sido descrita en trabajos previos (Lorenzo Figueiras et al. 1994, Lorenzo Figueiras y Lazzari 1998b, Lorenzo Figueiras y Lazzari 2000), por lo que no será discutida en esta Tesis.

Respuesta de T. infestans a claves visuales

Las vinchucas respondieron diferencialmente al azul, al rojo y al verde, lo que implica que la discriminación entre estos estímulos es posible. Dado que la intensidad de los estímulos de color fue mantenida a un valor constante, la respuesta de *T. infestans* puede ser interpretada básicamente de acuerdo a dos hipótesis: 1) las vinchucas discriminan entre estos estímulos en base a mecanismos cromáticos. El comportamiento de los insectos sería consistente con la definición de visión de colores, que es la capacidad de distinguir entre luces espectrales independientemente de las diferencias en intensidad (Menzel 1979, ver Capítulo 2). 2) las vinchucas discriminan dichas luces espectrales en base a mecanismos acromáticos (mecanismos *ciegos al color*). Los mecanismos de visión acromática pueden estar basados en la entrada de un único tipo de fotorreceptor (mecanismos selectivamente dependientes de la longitud de onda, ver Capítulo 2), o en las señales sumadas procedentes de distintos tipos de fotorreceptores. Las respuestas mediadas por un único tipo de receptor son muy comunes en los insectos, entre ellas la reacción optomotora, la detección de bordes y distancias, la detección de luz polarizada, etc. (Menzel 1979, Menzel y Backhaus 1991). Las respuestas acromáticas basadas en las señales sumadas de distintos tipos de fotorreceptores han sido descritas, por ejemplo, en la respuesta fototáctica de las abejas en su vuelo de regreso a la colmena ("*open space reaction*", Menzel y Greggers 1995).

Como requisito para definir una verdadera visión de colores es necesario demostrar interacciones sustractivas entre al menos dos tipos distintos de fotorreceptores (Menzel y Backhaus 1991, Kandel et al. 1995). Desafortunadamente

no existe información acerca de los tipos de fotorreceptores de *T. infestans*, lo que hace difícil cualquier especulación acerca de la posibilidad de que en esta especie exista una verdadera visión de color. La segunda posibilidad, una respuesta ciega al color, sería más consistente con los hábitos nocturnos de *T. infestans* (Allan et al. 1987, Lehane 1991). La hipótesis más simple que explica la sensibilidad espectral de esta especie encontrada en los experimentos presentados en este Capítulo sería entonces asumir que la respuesta fotonegativa de este insecto está mediada por un único tipo de fotorreceptor máximamente sensible en la región del verde del espectro. Esta hipótesis explicaría porqué las vinchucas siempre evitan refugios asociados a la luz verde y aún más, la razón por la cual la naturaleza atractiva de las heces tampoco pudo contrarrestar esta reacción primaria de evitación. Aunque no se ha demostrado que en *T. infestans* exista un receptor de este tipo, en todos los insectos en los que se ha estudiado esta cuestión existe un fopigmento con máxima absorción en la región del verde, entre 490 y 550 nm (Chapman 1998). Esta hipótesis también explicaría porqué las luces rojas y azules produjeron un nivel de agregación similar (Fig. 9.4, barras blancas). La estimulación producida por estos dos estímulos en el fotorreceptor verde sería en principio similar. En varias especies de insectos se ha demostrado que varias respuestas ciegas al color están mediadas por un único tipo de receptor máximamente sensible en la región verde (aprox. 550 nm), típicamente aquellas respuestas relacionadas con la detección de movimiento (Lehrer 1994). Sin embargo, no podemos descartar que la discriminación de luces espectrales que hemos encontrado en los experimentos presentados en este Capítulo de la Tesis no esté basada en otra clase de mecanismos acromáticos.

Respuesta de T. infestans a la estimulación combinada de claves visuales y olfativas

Los resultados presentados en este Capítulo muestran que existe una interacción entre estímulos visuales y olfativos en el comportamiento de agregación de *T. infestans*. A fin de estudiar esta interacción es necesario considerar que la respuesta de agregación resulta de dos comportamientos específicos: una respuesta de agregación mediada por heces, y una respuesta fotonegativa. Como discutiremos a continuación, la interacción entre los estímulos olfativo y visual que media estas dos reacciones de comportamiento depende de la calidad espectral del estímulo visual (Fig. 9.5).

Cuando se presentó un estímulo de luz verde en uno de los sectores de la arena, los insectos siempre se agregaron en el sector que presentaba un cartón negro, sin importar la presencia de la señal olfativa. Es decir, el comportamiento de agregación mostró estar básicamente controlado por una respuesta de fototaxis negativa a luz verde. Este resultado implica que en este caso la señal visual tiene un efecto inhibitorio sobre la respuesta a la señal olfativa. En el caso de la luz roja, los insectos se agregaron en el sector que presentó la señal olfativa, aún cuando este fuera el sector que presentaba la luz espectral. Es decir, en este caso el comportamiento de agregación mostró estar controlado por la señal olfativa. Esta conclusión es además apoyada por los resultados observados en la Fig. 9.5.C (barras rayadas): las vinchucas se distribuyeron al azar entre sectores cuando las heces fueron presentadas en ambos refugios. Finalmente, cuando se presentó un estímulo de luz azul en uno de los sectores de la arena se observó una respuesta intermedia. Los insectos se agregaron en el sector que presentaba simultáneamente la señal olfativa de agregación y el estímulo visual más atractivo (oscuridad) (Fig. 9.5.A, barras rayadas y negras). Sin embargo los insectos se distribuyeron al azar cuando las heces fueron asociadas solamente al estímulo visual menos atractivo, i.e., la luz espectral (Fig. 9.5.A, barras grises). Es decir, en este caso la respuesta de agregación se manifestó como un compromiso entre el efecto atractivo de las heces, y el comportamiento fotonegativo de las vinchucas. Dicho de otra manera, en este caso el comportamiento de agregación está controlado por una jerarquía de estímulos de distinta modalidad en la que la respuesta fotonegativa tiene un mayor peso, seguido por la respuesta a la señal olfativa.

Cuando ambos sectores de la arena presentaron la misma luz espectral pero solamente un sector presentaba heces (Fig. 9.6), los insectos se agregaron en el sector que presentaba la señal olfativa. Sin embargo las vinchucas se distribuyeron al azar cuando ambos sectores presentaban un cartón negro. Estos resultados pueden ser explicados postulando que las luces espectrales desencadenan una reacción de escape, lo que a su vez provoca la búsqueda de la señal química presente en las heces, dado que esta sería la única clave disponible para identificar apropiadamente un refugio potencial. Cuando se presentaron refugios asociados a zonas oscuras, este estímulo sería suficiente para arrestar a las vinchucas dentro de los refugios, independientemente de la presencia de la señal olfativa.

Significado ecológico

El correlato ecológico de la respuesta de agregación frente a la estimulación combinada de claves visuales y olfativas es bastante obvio: en un ambiente iluminado, las vinchucas deben encontrar un refugio a fin de evitar la exposición a predadores. A tal fin, una respuesta primaria sería evitar los sitios iluminados y buscar sitios oscuros para agregarse (reacción fotonegativa). La alta sensibilidad de las vinchucas a luces espectrales en la región del verde es consistente con esta interpretación. La luz reflejada por los ambientes terrestres, particularmente durante el día, está caracterizada por un contenido relativamente alto de longitudes de onda en la región del verde (Menzel 1979, Dusenbery 1992, Fig. 10.2). Por lo tanto, los refugios asociados a luz verde serían asimilables a los lugares expuestos donde el riesgo de predación sería muy alto. Por otra parte, las heces actúan como marcas químicas de los refugios, particularmente al amanecer, cuando la intensidad de luz ambiente comienza a aumentar (Lorenzo y Lazzari 1996, 1998). En ausencia de sitios oscuros, los insectos buscarían las claves químicas indicadoras de la presencia de un refugio. Al igual que ocurre durante la búsqueda de alimento, las vinchucas utilizan claves de distinta modalidad (en particular olfativas y visuales) para localizar un refugio. Estos resultados revelan la importancia biológica de las respuestas multimodales, en particular de aquellas integradas con la visión, en los insectos triatomíneos.

Como vemos, una de las características comportamentales más evidentes y conocidas de las vinchucas, como es la agregación en sitios oscuros, se basa en la convergencia multimodal de claves (mecánicas, químicas y fóticas), que se asocian de una manera compleja. En este Capítulo hemos visto que este comportamiento, en apariencia estereotipado, exhibe una notable plasticidad dependiente del patrón particular que las distintas señales adoptan en un dado momento.

CAPÍTULO 10: CONDICIONES LUMINOSAS EN UN AMBIENTE NATURAL

Introducción

Como hemos visto en los capítulos precedentes la sensibilidad fótica de las vinchucas depende de una diversidad de factores, tales como el momento del día y la edad. La sensibilidad espectral de las vinchucas, por su parte, parece ser máxima en la región del verde del espectro electromagnético. ¿Cómo están relacionados estos resultados con las condiciones luminosas de un ambiente natural (i.e., en ausencia de fuentes de luz artificiales). Esta información es relevante a fin de interpretar, desde un punto de vista ecológico, los resultados presentados en esta Tesis. Tanto la intensidad luminosa como la composición espectral de la luz natural de distintos ambientes ha sido analizada previamente (Dusenbery 1992, Warrant y McIntyre 1993, Stair y Johnston 1953, Menzel 1979). Sin embargo, estos trabajos presentan unidades y geometrías de medición variadas y diferentes a las utilizadas en este trabajo de Tesis, lo que hace dificultosa la utilización de estos antecedentes con fines comparativos.

Materiales y Métodos

Se midieron las variaciones de intensidad luminosa durante la caída del sol en varios sitios: a cielo abierto, en medio del follaje, en una grieta "simulada" en una pared de ladrillos de una habitación, y dentro de una habitación iluminada con luz natural a través de una abertura. La intensidad de luz fue medida también al mediodía y a la noche, y en diversas condiciones atmosféricas (cielo nublado, estrellado, distintas fases de la luna).

Se midió la composición espectral de la luz ambiente. Estas mediciones se realizaron a cielo abierto, en medio del follaje y en una grieta en una pared de ladrillos de una habitación. A fin de realizar estas mediciones se midió la intensidad de radiación transmitida a través de distintos filtros de interferencia (357, 397, 439, 458, 499, 537, 555 y 621 nm). Estas mediciones constituyen medidas relativas de intensidad, dado que gran parte de la energía es absorbida por los filtros.

Todas las medidas fueron tomadas en una finca localizada en el Partido de Ezeiza, Provincia de Buenos Aires. El equipamiento utilizado y las unidades de medición fueron las mismas que las utilizadas en los experimentos presentados en esta Tesis. Se utilizó un radiómetro (IL 1400 radiometer, International Light) con sensor de respuesta plana.

Resultados y Discusión

La Figura 10.1 muestra la variación en intensidad luminosa durante la caída del sol. En los tres ambientes (a cielo abierto, dentro de una habitación y en una grieta simulada) se observa una variación amplia en la intensidad de luz, de más de cuatro órdenes de magnitud, en un corto lapso de tiempo (aproximadamente una hora). Por lo tanto, para ser funcional, el sistema visual de las vinchucas debería ser capaz de adaptarse rápidamente a las condiciones ambientales. En este sentido, el ritmo diario de sensibilidad visual de las vinchucas (Capítulo 4) ajustaría la sensibilidad del sistema en forma anticipada a los cambios ambientales. Durante el día y previo a la caída del sol la intensidad de luz tanto dentro como fuera de las grietas es mucho mayor que el valor umbral de sensibilidad fotonegativa de las vinchucas. Esto está de acuerdo con el hecho que durante el día las vinchucas no salen de sus refugios. En algún momento durante la caída del sol la intensidad tanto dentro de las grietas como dentro de la habitación cae por debajo de los valores umbrales de sensibilidad fotonegativa (tanto para larvas como para adultos). Estas variaciones en la intensidad de luz se correlacionan con el hecho de que la actividad de los insectos esté ajustada en una ventana temporal precisa: las vinchucas salen de los refugios al comienzo de la noche (Lorenzo y Lazzari 1996), cuando la intensidad cae a valores inferiores al valor umbral de sensibilidad fotonegativo. Cabe mencionar que el umbral de sensibilidad de los fotorreceptores probablemente sea mucho más bajo que el umbral de sensibilidad fototáctico, por lo que el sistema visual de vinchucas sería funcional aún durante horas de la noche. Finalmente, la intensidad de luz durante la noche a cielo abierto es mayor al valor umbral de sensibilidad fotonegativo de los adultos, pero levemente menor que el valor de umbral de las larvas (Tabla 10.I).

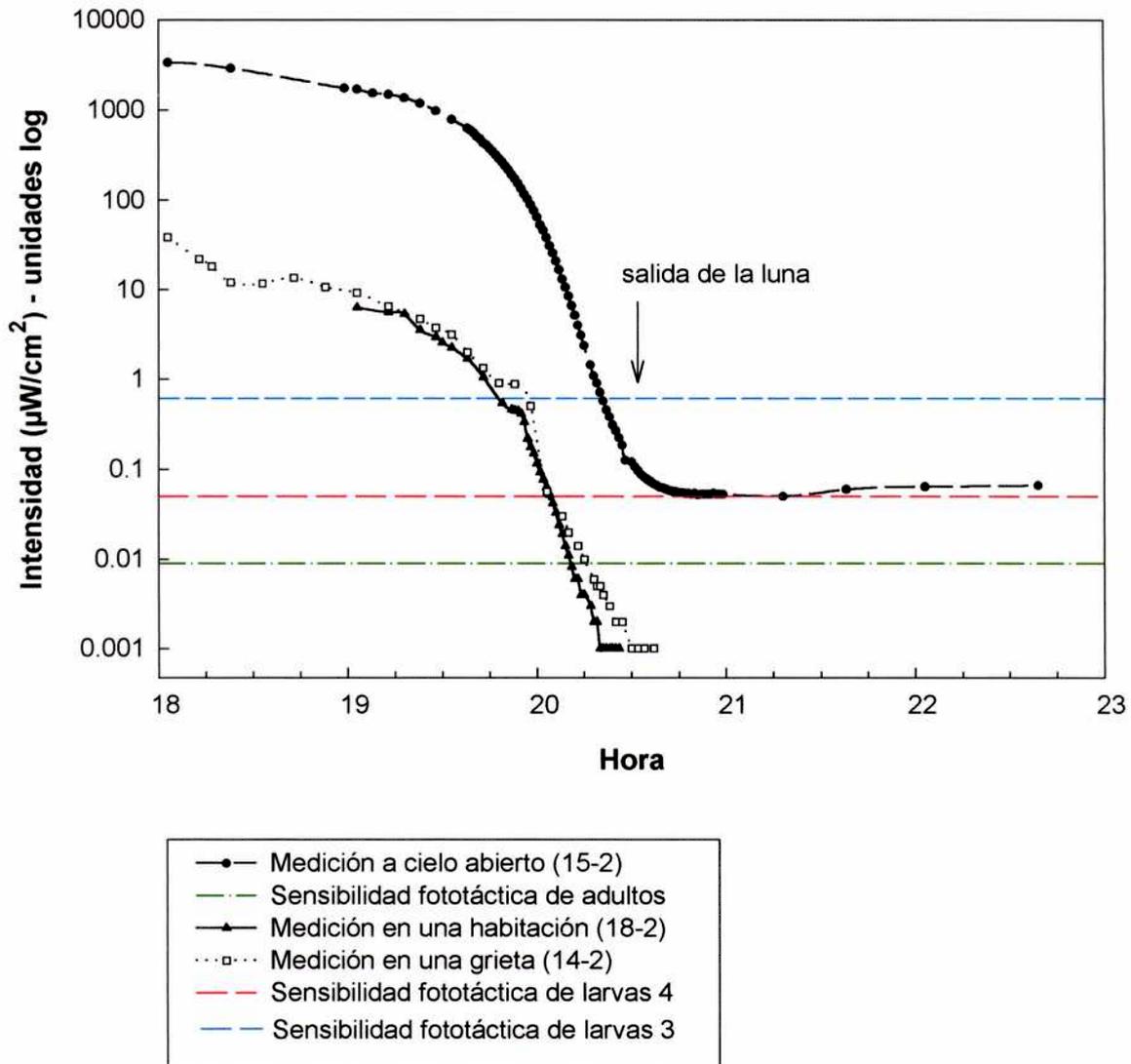


Figura 10.1: Variaciones en la intensidad luminosa durante la caída del sol en tres ambientes: a cielo abierto, dentro de una habitación y dentro de una grieta. Las líneas horizontales muestran la sensibilidad fotonegativa de adultos y larvas de tercer y cuarto estadio.

| Fecha y hora | Cielo abierto | Follaje | Grieta | Habitación | Cielo |
|--------------------|---------------------|----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------------|
| 8/2/00, 23:20 hs | 0.039 | 6×10^{-3} | 5×10^{-3} | 5×10^{-3} | Parcialmente nublado |
| 9/2/00, 13:20 hs. | $> 10^5$ | 3×10^3 | 1.7×10^3 | 1.9×10^3 | Soleado, parcialmente nublado |
| 9/2/00, 23:05 hs. | 7×10^{-3} | 3×10^{-3} | 2×10^{-3} | 2×10^{-3} | Despejado |
| 12/2/00, 13:05 hs | 13×10^{-3} | 1.4×10^3 | 1.5×10^3 | 1×10^3 | Totalmente nublado |
| 13/2/00, 23:05 hs. | 0.022 | 3×10^{-3} | 2×10^{-3} | 3×10^{-3} | Despejado; luna: cuarto creciente |
| 14/2/00, 23:00 hs. | 0.05 | 9.6×10^{-3} | 4×10^{-3} | 4×10^{-3} | Despejado; luna: cuarto creciente |
| 21/2/00, 22:05 hs. | 0.015 | 4×10^{-3} | 0.000 | 4×10^{-3} | Estrellado; luna nueva |

Tabla 10.i: Intensidad de luz (en $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) en condiciones naturales de iluminación (i.e., en ausencia de fuentes de luz artificiales). Las medidas fueron realizadas en las fechas y horas indicadas en la primera columna, en diversos sitios: a cielo abierto (2da. columna), en medio del follaje (3era. columna), en una grieta de una pared de ladrillos (4ta. columna), y en una habitación de 2x2 metros iluminada a través de una abertura sin vidrios (5ta. columna). La sexta columna indica a modo grosero las condiciones atmosféricas. Las filas sombreadas en gris indican las mediciones realizadas durante la noche.

La Figura 10.2 muestra los resultados de una serie de mediciones preliminares de la composición espectral de distintos ambientes (a cielo abierto, debajo del follaje, dentro de una grieta) en un día soleado. Como muestra la figura, la composición espectral de estos ambientes es prácticamente idéntica, con un componente mayoritario de longitudes de onda en la región de transición entre el azul y el verde (470-500 nm). Por supuesto existen grandes diferencias en la intensidad para cada longitud de onda, siendo la intensidad de la radiación a cielo

abierto más de dos órdenes de magnitud mayor que dentro de una grieta simulada. Desafortunadamente los filtros de interferencia disminuyen considerablemente la energía de la radiación transmitida, por lo que no fue posible repetir estas mediciones durante la noche. De acuerdo a la bibliografía disponible (Stair y Johnston 1953, Fig. 2.6.B) es esperable que durante la noche la luz tenga un fuerte componente en la región del UV-azul del espectro electromagnético. Es así es que los resultados presentados en este Capítulo deben considerarse simplemente como indicativos de la composición espectral de los ambientes que ocupan las vinchucas.

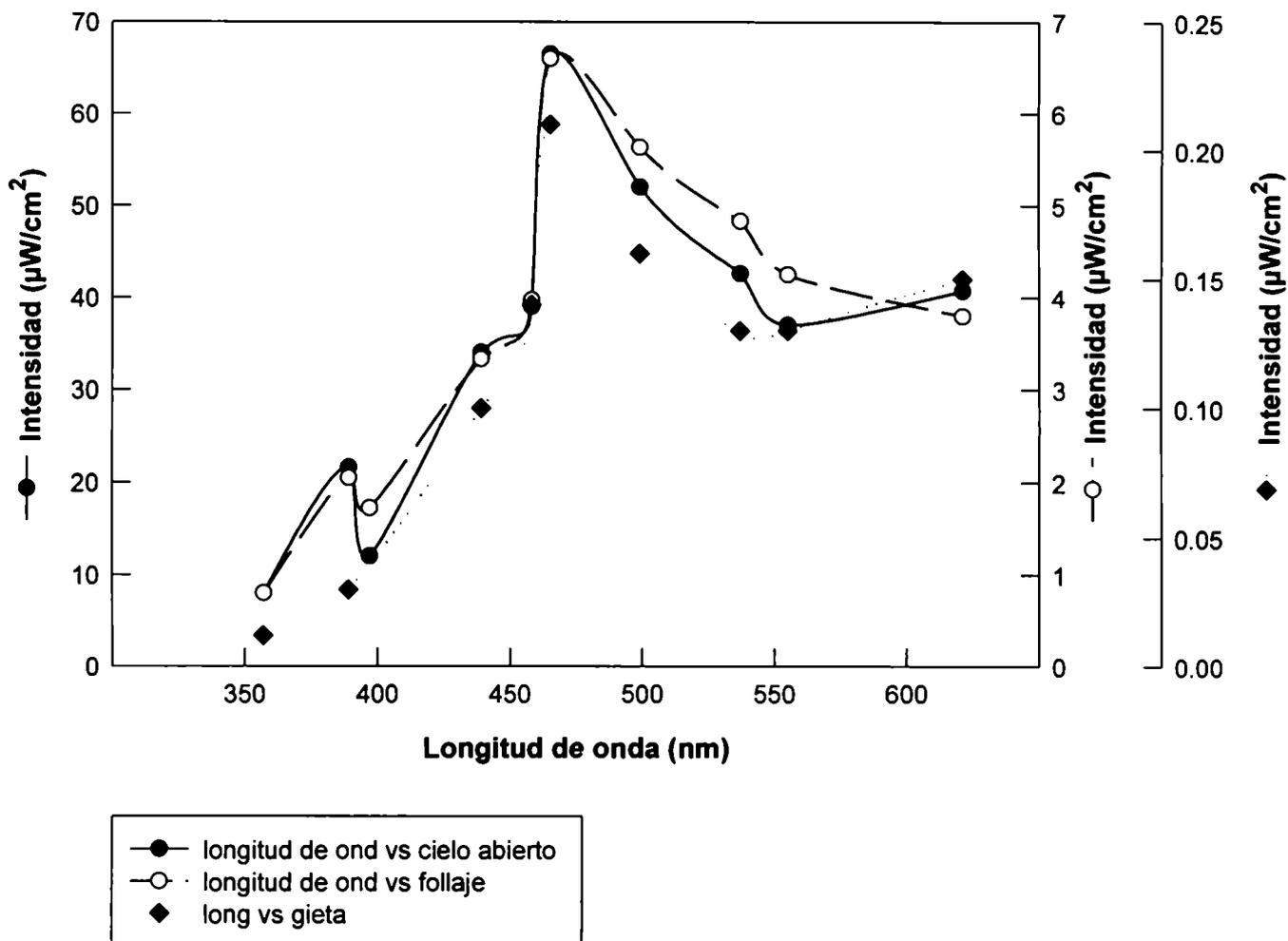


Figura 10.2: Composición espectral de la luz en un ambiente natural, medida en tres sitios (a cielo abierto, bajo el follaje y en una grieta) durante el mediodía en un día soleado.

CAPÍTULO 11: CONCLUSIONES GENERALES

Respuesta fototáctica negativa de *T. infestans*

- El sistema visual de *T. infestans* es sensible en un intervalo de intensidades de luz de al menos cuatro órdenes de magnitud. El umbral de sensibilidad de la respuesta fotonegativa es menor a $0.05 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ en el caso de las larvas, e inferior a $0.009 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ en los adultos. Estos valores son consistentes con los cambios naturales de intensidad de luz a los cuales las vinchucas están expuestas como consecuencia de su ritmo diario de actividad.
- La sensibilidad a la luz de las vinchucas muestra una variación diaria, siendo mucho mayor durante la noche que durante el día. Este ritmo es de naturaleza endógena, es decir, independiente de los ciclos ambientales de luz-oscuridad. La ventaja adaptativa de esta endogenicidad radicaría en la posibilidad de ajustar la sensibilidad visual en forma anticipada a los cambios en la intensidad de luz ambiente. Estos resultados constituyen los primeros en demostrar la existencia de un ritmo circadiano de sensibilidad visual en un insecto, a través de una respuesta comportamental.
- Se demostró por primera vez en un insecto la capacidad de los ocelos para mediar la respuesta fototáctica por sí mismos. Este resultado revela una nueva función de estas estructuras visuales, ya que hasta el momento se aceptaba que los ocelos solamente podían modular la respuesta fototáctica mediada por los ojos compuestos.
- Los ojos compuestos de *T. infestans* son sensibles en un intervalo de longitudes de onda entre 357 (ultravioleta) y 665 nm (rojo lejano). La sensibilidad es máxima en la región del azul (458 nm) y del verde (555 nm), un resultado que concuerda con el descrito en otros insectos y artrópodos. La sensibilidad a estas longitudes de onda, que son los principales componentes de la luz diurna, refuerza el valor adaptativo de la respuesta fototáctica negativa, dado que es durante este momento cuando las vinchucas permanecen ocultas, evitando la exposición a sus predadores. Estos resultados amplían el intervalo de sensibilidad que estaba descrito en la bibliografía para los insectos triatomínicos y obliga a rechazar dos ideas previas. La primera, que las vinchucas son ciegas a longitudes de onda cortas. La segunda,

crítica a la hora de realizar experimentos, de que la luz roja (iluminación utilizada en muchos estudios comportamentales) representa oscuridad funcional para las vinchucas.

- El análisis de la respuesta de larvas y adultos frente a distintas intensidades de luz blanca mostró que la intensidad de la respuesta depende de la edad; en particular, los insectos adultos son los más sensibles. Este incremento de la sensibilidad fototáctica estaría relacionado con el aumento del diámetro y del número de omatidias con la edad.
- El análisis de la respuesta en una variedad mutante de ojos rojos muestra que estas mutaciones afectan el umbral de sensibilidad fotonegativo y, por lo tanto, el desempeño del sistema visual de los insectos mutantes. El análisis morfológico muestra que en estos mutantes está alterada la distribución de los pigmentos pantalla en las omatidias: no se encuentran pigmentos en las células retinulares. Esta deficiencia afecta la capacidad del ojo de regular el flujo de luz que llega al rabdoma, y por lo tanto, la sensibilidad del ojo compuesto.

Estos resultados ponen de manifiesto el significado biológico y el valor adaptativo de la respuesta fototáctica en un insecto que permanece oculto de sus predadores durante el día, y obliga a replantear el papel que se le atribuía a la visión en insectos con hábitos nocturnos y sentidos químico y térmico altamente desarrollados.

La estructura de la omatidia de *T. infestans* y la organización temporal del sistema visual

Los ojos de *T. infestans* son del tipo de aposición de rabdoma abierto; seis rabdómeros forman un anillo que encierra a un rabdómero central doble correspondiente a la séptima y/u octava célula retinular. Las omatidias de *T. infestans* experimentan variaciones diarias que permiten al ojo adaptarse a las condiciones de iluminación del ambiente, controlando el flujo de luz que alcanza los fotorreceptores. Dichas variaciones incluyen cambios en la apertura pigmentaria o "iris" localizada en el extremo distal del rabdoma (estos cambios son especialmente notorios), en la posición del rabdoma (i.e., en la distancia focal efectiva), y en la distribución de pigmentos pantalla alrededor del rabdómero central. Durante el día los rayos de luz sólo pueden alcanzar los fotorreceptores ubicados en el rabdómero

central. Durante la noche aumenta la captura de luz y con ello la sensibilidad visual, dado que todos los rabdómeros están expuestos y además disminuye la distancia focal. Este incremento en la sensibilidad durante la noche ocurre a expensas de una disminución en la resolución espacial. Es muy probable que existan, además, otros mecanismos que sumados a estos cambios se combinen a fin de incrementar la sensibilidad.

El análisis de las variaciones en la estructura de las omatidias en condiciones de constancia ambiental permite concluir que existe un control dual de los mecanismos de adaptación a la luz-oscuridad en los ojos compuestos de *T. infestans*. La posición de los pigmentos que forman el "iris" está bajo control de un oscilador circadiano, mientras que la de los pigmentos que se encuentran en las células retinulares R7-8 está controlada por factores tanto endógenos como exógenos. La luz, por su parte, actúa como un estímulo disparador de la migración de pigmentos, independientemente del momento del día. Esta respuesta directa a la luz protegería a los fotopigmentos de una excesiva fotoconversión a su estado inactivo, y a las membranas rbdoméricas de daños permanentes. El ritmo circadiano de apertura-cierre del "iris" podría explicar (al menos parcialmente, dado que este ritmo no persiste en LL) el ritmo circadiano de sensibilidad fotonegativa. Estos resultados aportan nuevos elementos a la complejidad de los mecanismos de adaptación visual en los insectos. Los resultados presentados aquí son los primeros en describir un ritmo circadiano de migración de pigmento en células retinulares. En particular, la existencia de un control dual proporcionaría al sistema una plasticidad única: la de ajustar la sensibilidad general del ojo en forma endógena, y la de poseer mecanismos de ajuste directos a las condiciones ambientales.

Convergencia multimodal en *T. infestans*: interacción entre el sistema visual y el olfativo

En esta Tesis se estudió por primera vez la interacción entre claves sensoriales de distinta modalidad (visual y olfativa) en el comportamiento de agregación de *T. infestans*. Los resultados muestran que la combinación de estímulos de distinta modalidad evoca respuestas que difieren de aquellas evocadas por cada modalidad en forma separada. En ausencia de señales olfativas, el comportamiento de agregación de las vinchucas está controlado por fototaxis negativa. En presencia de señales olfativas y visuales, ambas entradas pueden

interactuar y controlar la agregación de las vinchucas. Dicha interacción depende de la composición espectral de la luz asociada a los refugios potenciales: 1) en presencia de luz verde la señal visual inhibe la respuesta a la señal olfativa; 2) en presencia de luz roja la respuesta está principalmente mediada por la señal química de agregación; 3) en presencia de luz azul la respuesta de las vinchucas se manifiesta como un compromiso entre la atracción a la señal fecal y la fotonegatividad de estos insectos. Estos resultados demuestran que existe una competencia y/o jerarquía entre las señales de distinta modalidad, dependiente de la composición espectral del estímulo visual, en el comportamiento de agregación de las vinchucas. Este comportamiento, en apariencia estereotipado, exhibe una notable plasticidad dependiente del patrón particular que las señales olfativa y visual adoptan en un dado momento.

Además, las vinchucas respondieron diferencialmente a estímulos visuales de distinta composición espectral (azul, rojo, verde) pero idéntica intensidad. Este resultado sugiere que el sistema visual de *T. infestans* es capaz de discriminar entre estos estímulos de distinta calidad espectral, posiblemente a través de un mecanismo acromático.

Estos resultados permiten postular que las propiedades espectrales de un objeto, como un refugio artificial cebado con atractantes químicos, podrían afectar la probabilidad de aproximación, y por lo tanto de captura, de los insectos. Esto resulta relevante a fin de optimizar el diseño de sensores o dispositivos de detección de vinchucas en el campo.

CAPÍTULO 12: BIBLIOGRAFÍA

- Allan S.A., Day J.F., Edman J.D. (1987). Visual ecology of biting flies. *Ann. Rev. Entomol.* 32: 297-316.
- Ampleford E. (1985). Ecdysteroids influence the circadian system timing ecdysis in the insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Comp. Physiol.* 157: 699-704.
- Ampleford E., Steel C. (1982). Circadian control of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Comp. Physiol.* 147: 281-286.
- Ampleford E., Davey K. (1989). Egg laying in the insect *Rhodnius prolixus* is timed in a circadian fashion. *J. Insect. Physiol.* 35: 183-187.
- Aréchiga H., Fernández-Quiróz F., Fernández de Miguel F., Rodríguez-Sosa L. (1993). The circadian system of crustaceans. *Chronobiology International* 10 (1): 1-19.
- Aréchiga H., Rodríguez-Sosa L. (1997). Coupling of environmental and endogenous factors in the control of rhythmic behaviour in decapod crustaceans. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 77: 17-29.
- Arikawa K. (1999a). Vision of compound eyes: Color vision. En: (Eguchi E., Tominaga Y., eds.) *Atlas of Arthropod Sensory Receptors*. Capítulo I-3, Springer-Verlag, Tokio. p: 23-32.
- Arikawa K. (1999b). Photoreceptor organs other than compound eye: extraocular photoreceptors. En: (Eguchi E., Tominaga Y., eds.) *Atlas of Arthropod Sensory Receptors*. Capítulo II-4, Springer-Verlag, Tokio. p:79-86.
- Aschoff J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25: 11-28.
- Aschoff J. (1981). Free-running and entrained circadian rhythms. En: (Aschoff J., ed.) *Biological Rhythms (Handbook of Behavioral Neurobiology vol. IV)*. Plenum Press, New York. p: 81-93.
- Aschoff J. (1989). Temporal orientation: circadian clocks in animals and humans. *Anim. Behav.* 37: 881-896.
- Autrum H. (1981). Light and dark adaptation in invertebrates. En: (Autrum H., ed.): *Comparative physiology and evolution of vision in invertebrates C: Invertebrate Visual Centers and Behavior II*, Capítulo 1. Springer-Verlag, Berlin. p: 1-91.
- Barlow R.B., Chamberlain S.C., Lehman H.K. (1989). Circadian rhythms in invertebrate retina. En: (Stavenga D.G., Hardie R.C., eds.) *Facets of vision*. Capítulo 13. Springer-Verlag, Berlin. p: 257-280.

- Barlow R.B., Chamberlain S.C., Levinson J.Z. (1980). *Limulus* brain modulates the structure and function of the lateral eyes. *Science* 210 (28): 1037-1039.
- Barth M., Heisenberg M. (1997). Vision affects mushroom bodies and central complex in *Drosophila melanogaster*. *Learning Memory* 4: 219-229.
- Barth M., Hirsch H.V.B., Meinertzhagen I.A., Heisenberg M. (1997). Experience-dependent developmental plasticity in the optic lobe of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 17: 1493-1504.
- Bennett R.R. (1983). Circadian rhythm of visual sensitivity in *Manduca sexta* and its development from an ultradian rhythm. *J. Comp. Physiol.* 150: 165-174.
- Bernhard C.G., Höglund G., Ottoson D. (1963). On the relation between pigment position and light sensitivity of the compound eye in different nocturnal insects. *J. Insect Physiol.* 9: 573-586.
- Bertram D.S. (1971). Attraction of triatomine bug vectors of Chaga's disease to betalights. *Nature* 231: 268.
- Bikurov von G. (1964). Aktivitäts - und Orientierungsrhythmik beim Kornkäfer (*Calandra granaria* L.). *Z Tierpsychol* 21 (3): 279-301.
- Blackmer J.L., Byrne D.N. (1993). Environmental and physiological factors influencing phototactic flight of *Bemisia tabaci*. *Physiological Entomology* 18: 336-342.
- Bradbury W.C., Bennett G.F. (1974). Behavior of adult Simuliidae (Diptera). II. Vision and olfaction in near-orientation and landing. *Can. J. Zool.* 52: 1355-1364.
- Brady J. (1974). The physiology of insect circadian rhythms. *Advances Insect Physiology* 10: 1-115.
- Bryceson K.P. (1986). Diurnal changes in photoreceptor sensitivity in a reflecting superposition eye. *J. Comp. Physiol. A* 158: 573-582.
- Carcavallo R.U., Franca Rodríguez M.E., Salvatella R., Curto de Casas S.I., Sherlock I.S., Galvão C., Da Silva Rocha D., Galíndez Girón I., Otero Arocha M.A., Martínez A., Aristeu Da Rosa J., Canale D.M., Farr T.H., Barata J.M. (1998a). Habitats and related fauna. En: (Carcavallo R.U., Galíndez Girón I., Jurberg J., Lent H., eds.) *Atlas of Chagas Disease vectors in the Americas*, Vol. II, Capítulo. 14, parte A. Editora Fiocruz-Rio de Janeiro. p: 561-600.
- Carcavallo R.U., Galíndez Girón I., Jurberg J., Galvao C., Naoireau F., Canale D.M. (1998b). Mutations, hybrids and teratologies. En: (Carcavallo R.U., Galíndez Girón I., Jurberg J., Lent H., eds.) *Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas*, Capítulo 12. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. p: 515-536.

- Carcavallo R.U., Curto de Casas S.I., Sherlock I.A., Galíndez Girón I., Jurberg J., Galvão C., Mena Segura C.A., Noireau F. (1999). Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion. En: (Carcavallo R.U., Galíndez Girón I., Jurberg J., Lent H., eds.) *Atlas of Chagas Disease vectors in the Americas*, Vol. III, Capítulo 17, Editora Fiocruz-Rio de Janeiro. p: 747-792.
- Chapman R.F. (1998). *The insects: structure and function*. 4ta. Edición. Cambridge University Press, UK. 770 pp.
- Chamberlain S.C., Barlow R.B. Jr. (1979). Light and efferent activity control rhabdom turnover in *Limulus* photoreceptors. *Science* 206: 361-363.
- Constantini C., Sagnon N.F., Sanogo E., Merzagora L., Coluzzi M. (1998). Relationship to human biting collections and influence of light and bednet in CDC light-trap catches of West African malaria vectors. *Bull. ent. Res.* 88: 503-511.
- Constantinou C. (1984a). Photoreceptors involved in the entrainment of the circadian activity rhythm of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 15 (3): 195-201.
- Constantinou C. (1984b). Circadian rhythm of oviposition in the blood sucking bugs, *Triatoma phyllosoma*, *T. infestans* and *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Interdiscipl Cycle Res.* 15 (3): 203-212.
- Cronin T.W. (1992). Visual rhythms in stomatopod crustaceans observed in the pseudopupil. *Biol. Bull.* 182: 278-287.
- Cutler D.E., Bennett R.R., Stevenson R.D., White R.H. (1995). Feeding behavior in the nocturnal moth *Manduca sexta* is mediated mainly by blue receptors, but where are they located in the retina? *J. Exp. Biol.* 198: 1909-1917.
- Dusenbery D.B. (1992). *Sensory Ecology: how organisms acquire and respond to information*. Freeman W.H. (ed), New York. 558 pp.
- Eguchi E. (1999). Vision of compound eyes: Polarized light vision and rhabdom. En: (Eguchi E., Tominaga Y., eds.) *Atlas of Arthropod Sensory Receptors*, Capítulo I-4, Springer-Verlag, Tokio. p: 33-46.
- Enright J.T. (1981). Methodology. En: (Aschoff J., ed.) *Handbook of Behavioral Neurobiology, Vol. 4: Biological rhythms*. Plenum Press, New York. p: 11-18.
- Ferrell B.R., Reitcheck B.G. (1993). Circadian changes in cockroach ommatidial structure. *J. Comp. Physiol. A* 173: 549-555.
- Fisbach K.F. (1979). Simultaneous and successive colour contrast expressed in "slow " phototactic behaviour of walking *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol.* 130: 161-171.

- Fleissner G., Fleissner G. (1978). The optic nerve mediates the circadian pigment migration in the median eyes of the scorpion. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 61A: 69-71.
- Fleissner G., Fleissner G. (1999). Photoreceptor organs other than compound eye: Simple eyes of arachnids. En: (Eguchi E., Tominaga Y., eds.) *Atlas of Arthropod Sensory Receptors*, Capítulo II-2. Springer-Verlag, Tokio, p: 55-70.
- Flores G.B., Lazzari C.R. (1996). The role of the antennae in *Triatoma infestans*: orientation towards thermal sources. *J. Insect Physiol.* 42 (5):433-440.
- Fraenkel G.S., Gunn D.L. (1961). *The orientation of animals - Kineses, taxes and compass reactions*. Dover Publications, New York. 376 pp.
- Giebultowicz J.M. (1999). Insect circadian clocks: is it all in their heads? *J. Insect Physiol.* 45: 791-800.
- Giurfa M., Vorobyev M., Kevan P. & Menzel R. (1996). Detection of coloured stimuli by honeybees: minimum visual angles and receptor specific contrasts. *J. Comp. Physiol. A.* 178: 699-709.
- Goodman L.J. (1970). The structure and function of the insect dorsal ocellus. *Advances in Insect Physiology* 7: 97-195.
- Goodman L.J. (1981). Organisation and physiology of the insect dorsal ocellar system. En: (Autrum H., ed.) *"Handbook of Sensory Physiology"*, Vol VII/6C. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. p: 201-286.
- Green C.H. (1985). A comparison of phototactic responses to red and green light in *Glossina morsitans morsitans* and *Musca domestica*. *Physiol. Entomol.* 10: 165-172.
- Green C.H. (1986). Effects of colours and synthetic odours on the attraction of *Glossina pallidipes* and *G. morsitans* to traps and screens. *Physiol. Entomol.* 11: 411-421.
- Green C.H. (1989). The use of two-coloured screens for catching *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Glossinidae). *Bull. ent. Res.* 79:81-93.
- Green C.H. (1993). The effects of odours and target colour on landing responses of *Glossina morsitans morsitans* and *G. pallidipes* (Diptera: Glossinidae). *Bull. ent. Res.* 83: 553-562.
- Green C.H., Cosens D. (1983). Spectral responses of the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *J Insect Physiol* 29 (10): 795-800.
- Guerenstein P.G., Lorenzo M.G., Núñez J.A., Lazzari C.R. (1995). Baker's yeast, an attractant for baiting traps for Chagas' disease vectors. *Experientia* 51: 834-837.

- Gürtler R.E., Cécere M.C., Canale D.M., Castañera M.B., Chuit R., Cohen J.E. (1999). Monitoring house reinfestation by vectors of Chagas disease: a comparative trial of detection methods during a four-year follow-up. *Acta Tropica* 72: 213-234.
- Hailman J.P. (1979). Environmental light and conspicuous colors. En: (Burt E.H. ed.): *The behavioural significance of colour*, Capítulo 7. Garland STPM Press, New York, London. p: 269-354.
- Holtz von E. (1953). Der Physiologie und Versuchtier. Lebendiges Wissen, Bd 99 der "Sammlung Dieterich" Weisbaden: 201-208.
- Horn E. (1985). Multimodal convergences. En: (Kerkut, Gilbert, eds.) *Nervous system: Sensory (Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology Vol VI)*. p. 653-659.
- Horridge G.A., Duniec J., Marcelja L. (1981). A 24-hour cycle in single locust and mantis photoreceptors. *J. Exp. Biol.* 91: 307-322.
- Ichikawa T. (1999). Photoreceptor organs other than compound eye: Stemmata. En: (Eguchi E., Tominaga Y., eds.) *Atlas of Arthropod Sensory Receptors*, Capítulo II-1, Springer-Verlag, Tokio. p: 47-54.
- Insausti T. (1997). *Estudio del sistema ocelar de la vinchuca T. infestans (Klug, 1834) (Heteroptera: Reduviidae)*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, 257 pp.
- Insausti T.C., Lazzari C.R. (1996). Central projections of first-order interneurons in bug *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Journal of Morphology* 229: 161-169.
- Insausti T.C., Lazzari C.R. (2000). The postembryonic development of the ocellar system of *Triatoma infestans* Klug (Heteroptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. (En prensa).
- Ioannides A.C., Horridge F.R.S. (1975). The organization of visual fields in the hemipteran acone eye. *Proc. R. Soc. Lond. B* 190: 373-391.
- Jacob K.G., Willmund R., Folkers E., Fischbach K.F., Spatz H. Ch. (1977). T-maze phototaxis of *Drosophila melanogaster* and several mutants in the visual systems. *J. Comp. Physiol. A.* 116: 209-225.
- Järemo Jonson A.C., Land M.F., Osorio D.C., Nilsson D.-E. (1998). Relationships between pupil working range and habitat luminance in flies and butterflies. *J. Comp. Physiol. A* 182: 1-9.

- Kaiser W., Reinhard S., Vollmar J. (1977). The participation of all three colour receptors in the phototactic behaviour of fixed walking honeybees. *J. Comp. Physiol. A.* 122: 27-44.
- Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell R.M. (1995). *Essentials of neural science and behavior*. Appleton & Lange, Connecticut. 743 pp.
- Kier C.K., Chamberlain S.C. (1990). Dual controls for screening pigment movement in photoreceptors of the *Limulus* lateral eye: circadian efferent input and light. *Visual Neuroscience* 4: 237-255.
- Kirschfeld K., Franceschini N. (1977). Photostable pigments within the membrane of photoreceptors and their possible role. *Biophys. Struct. Mechanism* 3: 191-194.
- Koehler P.G., Agee H.R., Leppla N.C., Patterson R.S. (1987). Spectral sensitivity and behavioral response to light quality in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Ann. ent. Soc. Am.* 80: 820-822.
- Koehler W., Fleissner G. (1978). Internal desynchronisation of bilaterally organised circadian oscillators in the visual system of insects. *Nature* 274: 708-710.
- Kühn A. (1929). Phototropismus und Phototaxis der Tiere. *Bethes Handb norm path Physiol* 12: 17-35
- Kunze P. (1979). Apposition and Superposition eyes. En: (Autrum H., ed.) *Handbook of Sensory Physiology, Vol. VII/6A, Capítulo 8, Comparative Physiology and Evolution of Vision in Invertebrates*. Springer-Verlag, Berlin. p: 441-502.
- Land F. (1989). Variations in the structure and design of compound eyes. En (Stavenga D.G., Hardie R.C., eds.): *Facets of vision, Capítulo 5*. Springer-Verlag, Berlin. p: 90-111.
- Land M.F. (1997). Visual acuity in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 142-177.
- Land M.F., Gibson G., Horwood J., Zeil J. (1999). Fundamental differences in the optical structure of the eyes of nocturnal and diurnal mosquitoes. *J. Comp. Physiol. A* 185: 91-103.
- Lazzari C.R., Varjú D. (1990). Visual lateral fixation and tracking in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J. Comp. Physiol. A* 167: 527-531.
- Lazzari C.R. (1991a). Circadian rhythm of egg hatching in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 28 (5): 740-741.
- Lazzari C.R. (1991b). Temperature preference in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. ent. Res.* 81: 273-276.
- Lazzari C.R. (1992). Circadian organisation of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol* 38: 895-903.

- Lazzari C.R., Schilman P.E., Guerenstein P.G., Ianowski J.P. (1999). Nervous integration. En: (Carcavallo R.U., Galíndez Girón I., Jurberg J., Lent H., eds.) *Atlas of Chagas Disease vectors in the Americas*, Vol. III, Capítulo 23, parte B. Editora Fiocruz-Rio de Janeiro.p: 1053-1070.
- Lehane M.J. (1991). *Biology of blood-sucking insects*. Harper Collins Academic, London U. 288 pp.
- Lehane M.J, Schofield C.J. (1982). Flight initiation in *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. Ent. Res.* 72: 497-510.
- Lehane M.J., Schofield C.J. (1976). Preliminary report on flight by some triatomine bugs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 70: 526.
- Lehrer, M. (1994). Spatial vision in the honeybee: the use of different cues in different tasks. *Vision Res.* 34(18):2363-2385.
- Lorenzo Figueiras A.N. (1997). *Comportamiento de agregación y comunicación intra-e interespecífica en Triatominae*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 167 pp.
- Lorenzo Figueiras A.N., Kenigsten A., Lazzari C.R. (1994). Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: chemical signals and temporal pattern. *J. Insect Physiol.* 40 (4): 311-316.
- Lorenzo Figueiras A.N., Lazzari C.R. (1998a). Aggregation behaviour and interspecific responses in three species of Triatominae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93 (1): 133-137.
- Lorenzo Figueiras A.N., Lazzari C.R. (1998b). Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: a novel assembling factor. *Physiological Entomology* 23: 33-37.
- Lorenzo Figueiras A.N., Manrique G., Lorenzo M.G., Lazzari C.R., Schilman P.E. (1999). Sensory Ecology: Communication. En: (Carcavallo R.U., Galíndez Girón I., Jurberg J., Lent H., eds.) *Atlas of Chagas Disease vectors in the Americas*, Vol. III, Capítulo 24, parte B. Editora Fiocruz-Rio de Janeiro. p: 1089-1103.
- Lorenzo Figueiras A.N., Lazzari C.R. (2000). Temporal change of the aggregation response in *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (en prensa).
- Lorenzo M.G., Lazzari C.R. (1996). The spatial pattern of defaecation in *Triatoma infestans* and the role of faeces as a chemical mark of the refuge. *J. Insect Physiol.* 42 (9): 903-907.

- Lorenzo M.G., Lazzari C.R. (1998). Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Tropica* 70: 163-170.
- Lorenzo M.G., Lazzari C.R. (1999). Temperature and relative humidity affect the selection of shelters by *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. *Acta Tropica* 72: 241-249.
- Lorenzo M.G., Reisenman C.E., Lazzari C.R. (1998). *Triatoma infestans* can be captured under natural climatic conditions using yeast-baited traps. *Acta Tropica* 70: 277-284.
- Lorenzo M.G., Flores G.B., Lazzari C.R., Reisenman C.E. (1999). Sensory Ecology: Communication. En: (Carcavallo R.U., Galíndez Girón I., Jurberg J., Lent H., eds.) *Atlas of Chagas Disease vectors in the Americas*, Vol. III, Capítulo 24, parte A. Editora Fiocruz-Rio de Janeiro. p: 1071-1087.
- Lüdtke H. (1953). Retinomotorik und adaptionsvorgänge im auge des rüschschwimmers (*Notonecta glauca* L.). *Zeitschrift für vergleichende physiologie* 35: 129-152.
- Marques N., Menna-Barreto L., Golombek D.A. (1997). *Cronobiología: principios y aplicaciones*. Editorial Universitaria de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 383 pp.
- McEwen P.K., Lehane M.J. (1993). Factors influencing flight initiation in the triatomine bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Sci. Applic.* 14: 461-464.
- Menzel R. (1979). Spectral sensitivity and color vision in invertebrates. En: (Autrum, ed.): *Handbook of Sensory Physiology Volumen VII/6A, Vision in invertebrates, A: invertebrate photoreceptors, Capítulo 9*. Springer-Verlag, Berlin. p: 503-580.
- Menzel R., Greggers U. (1985). Natural phototaxis and its relationship to colour vision in honeybees. *J. Comp. Physiol. A* 157: 311-321.
- Menzel R., Backhaus W. (1991). Colour vision in insects. En: (Gouras P., ed) *Vision and visual dysfunction. The perception of colour*. Macmillan Press, London: 262-293.
- Menzi U. (1987). Visual adaptation in nocturnal and diurnal ants. *J. Comp. Physiol. A* 160: 11-21.
- Meyer-Rochow V.B. (1999). Photoreceptors and photo-environments: Compound eye: circadian rhythmicity, illumination, and obscurity. En: (Eguchi E., Tominaga Y., eds.) *Atlas of Arthropod Sensory Receptors*, Capítulo III-2. Springer-Verlag, Tokio, 97-124.

- Minoli S.A. (1999). *Bases cronobiológicas de la termopreferencia en Triatoma infestans*. Tesis de Licenciatura, Universidad de Buenos Aires. 50 pp.
- Mizunami M. (1994). Information processing in the insect ocellar system: Comparative approaches to the evolution of visual processing and neural circuits. *Advances in Insect Physiology* 25: 151-265.
- Mizunami M. (1995). Functional diversity of neural organization in insect ocellar systems. *Vision research* 4: 443-452.
- Mizunami M. (1999). Photoreceptor organs other than compound eye: Ocelli. En: (Eguchi E., Tominaga Y., eds.) *Atlas of Arthropod Sensory Receptors*, Capítulo II-3, Springer-Verlag, Tokio. p: 71-78.
- Moore J., Gotelli N.J. (1990). A phylogenetic perspective on the evolution of altered host behaviours: a critical look at the manipulation hypothesis. En: (Barnard C.J., Behnke C.J., eds.) *Parasitism and host behavior*. Taylor & Francis, London. 332 pp.
- Müller v J. (1970). Feinbau und dunkelanpassung der komplexaugen von *Rhodnius prolixus* (Stal). *Zool. Jb. Physiol. Bd.* 75: 111-133.
- Mutinga M.J., Odhiambo T.R., Kamau C.C., Odulaja A., Amimo F.A., Wachira D.W. (1995). Choice of resting sites by *Anopheles gambiae* (Diptera: Culici) in Mwea rice irrigation scheme, Kirinyaga district, Kenya. *East African Medical Journal* 72 (3): 170-175.
- Nilsson D.-E (1989a). Optics and evolution of Compound Eyes. En: (Stavenga D.G., Hardie R.C., eds.), *Facets of vision*. Springer-Verlag, Berlin. p: 30-73.
- Nilsson D.-E. (1989b). Vision optics and evolution. *BioScience* 39 (5): 298-307.
- Nilsson D.-E. (1990). From cornea to retinal image in invertebrate eyes. *TINS* 13 (2): 35-64.
- Nördstrom P., Warrant E.J. (2000). Temperature-induced pupil movements in insect superposition eyes. *J. Exp. Biol.* 203: 685-692.
- Núñez J.A. (1982). Food source orientation and activity in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Bull. ent. Res.* 72: 252-262.
- Núñez J.A. (1987). Behaviour of triatomine bugs. En: (Brenner R.R., Stoka A., eds.) *Chagas' disease vectors, Vol II: Anatomic and physiological aspects*, Capítulo 1. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida. p: 1-41.
- Núñez J.A., Lazzari C.R. (1990). Rearing of *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera: Reduviidae) in the absence of a live host. I Some factors affecting the artificial feeding. *J. Appl. Ent.* 109: 87-92.

- Page T.L. (1985). Clocks and circadian rhythms. En: (Kerkut, Gilbert, eds.) *Nervous system: Sensory (Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, vol. VI)*. Pergamon Press, Oxford, New York. p: 577-652.
- Page T.L. (1990). Circadian organization in the cockroach. En: (Huber I., Masler E.P., Rao B.R., eds.) *Cockroaches as models for neurobiology: applications in biomedical research, Vol II*. CRC Press, Inc, Boca Raton Florida. p: 226-245.
- Pittendrigh C.S. (1981a). Circadian systems: Entrainment. En: (Aschoff J., ed.) *Biological Rhythms (Handbook of Behavioral Neurobiology vol. IV)*. Plenum Press, New York. p: 95-124.
- Pittendrigh C.S. (1981b). Circadian systems: General perspective. En: (Aschoff J., ed.) *Biological Rhythms (Handbook of Behavioral Neurobiology vol. IV)*. Plenum Press, New York. p: 57-80.
- Pyza E., Meinertzhagen I.A. (1995). Monopolar cell axons in the first optic neuropil of the housefly, *Musca domestica* L., undergo daily fluctuations in diameter that have a circadian basis. *The Journal of Neuroscience* 15 (1): 407-418.
- Pyza E., Meinertzhagen I.A. (1997). Circadian rhythms in screening pigment and invaginating organelles in photoreceptor terminals of the housefly's first optic neuropile. *The Journal of Neurobiology* 32 (5): 517-529.
- Ringelberg J., Servaas H. (1971). A circadian rhythm in *Daphnia magna*. *Oecologia* 6: 289-292.
- Ribi W.A. (1987). *A handbook in biological electron microscopy*. Ribi W.A. (ed.), Switzerland. 106 pp.
- Ro A.-I., Nilsson D.-E. (1994). Circadian and light-dependent control of the pupil mechanism in tipulid flies. *J. Insect Physiol.* 40: 883-891.
- Roca M., Lazzari C. R. (1994). Effects of relative humidity on the haematophagous bug *Triatoma infestans*: hygropreference and eclosion success. *J. Insect Physiol.* 40 (10): 901-907.
- Roeder K.D. (1963). *Nerve cells and Insect Behavior*. 5ta. Edición. Harvard University Press, Cambridge. 238 pp.
- Rossel S. (1989). Polarization sensitivity in compound eyes. En (Stavenga D.G., Hardie R.C., eds.): *Facets of vision*, Capítulo 15. Springer-Verlag, Berlin. p: 298-316.
- Salvatella R., Franca Rodríguez M.E., Curto de Casas S.I., Barata J.M., Carcavallo R.U. (1998). Human environment: dwellings and peridomiciliary sites. En (Carcavallo R.U., Galíndez Girón I., Jurberg J., Lent H., eds): *Atlas of Chagas*

- Disease vectors in the Americas*, Vol. II, Capítulo 14 parte B. Editora Fiocruz-Rio de Janeiro. p: 601-619.
- Saunders D.S. (1982). *Insect Clocks*. 2da. Ed. Pergamon Press, Oxford, UK. 408 pp.
- Schilman P.E. (1998). *Factores que afectan la reproducción de las vinchucas: aspectos fisiológicos y comportamentales*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 126 pp.
- Schmidt R. F. (1978). *Fundamentals of sensory physiology*. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin. 285 pp.
- Schofield C. J., Patterson J. W. (1977). Assembly pheromone of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* nymphs (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 13: 727-734.
- Schofield C.J. (1975). The visual system. En: *The behavioural biology of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) with special reference to intra-specific communication mechanisms*. PhD Thesis, London. p: 56-75.
- Schofield C.J. (1979). The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): A review. *Bull. Entomol. Res.* 69: 363-379.
- Schofield C.J. (1994). *Triatominae: Biología y Control*. Eurocommunica Publications, UK. 76 pp.
- Schwemer J. (1989). Visual pigments of compound eyes –structure, photochemistry, and regeneration. En: (Stavenga D.G., Hardie R.C.,eds), *Facets of vision*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. p: 112-133.
- Schwind R. (1989). Size and distance perception in compound eyes. En: (Stavenga D.G., Hardie R.C.,eds), *Facets of vision*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. p: 425-444.
- Segura E.L. (1987). Xenodiagnosis. En: (Brenner RR, Stoka A, eds) *Chagas' disease vectors, Vol II: Anatomic and physiological aspects*. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida. p: 41-45.
- Settembrini B. P. (1984). The compound eyes of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 21: 477-479.
- Shannon CE, Weaver W (1949). *The mathematical theory of communication*. Univ. Of Illinois Press, Urbana. Citado por Dusenbery (1992).
- Sjorgren R.D., Ryckman R. E.(1966). Epizootiology of *Trypanosoma cruzi* in southwestern North America. Part VIII: nocturnal flights of *Triatoma protracta* (Uhler) as indicated by collections at black light traps. *J. Med. Entomol.* 3: 81-93.
- Sokal R., Rohlf F.J. (1981). *Biometry*. Freeman & Co, San Francisco, CA. 859 pp.

- Stair R., Johnston R. (1953). Ultraviolet spectral radiant energy reflected from the moon. *Journal of Research of the National Bureau of Standards* 51 (2): 81-84.
- Stavenga D.G. (1989). Pigments in compound eyes. En: (Stavenga D.G., Hardie R.C., eds), *Facets of vision*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. p:152-172.
- Steel R.G., Torrie J.H., Dicky D.A. (1997). *Principles and procedures of statistics – A biomedical approach*. 3era. Edición. McGraw Hill, Boston, Massachusetts. 666 pp.
- Storz U.C., Paul R.J. (1998). Phototaxis in water fleas (*Daphnia magna*) is differently influenced by visible and UV light. *J. Comp. Physiol. A* 183: 709-717.
- Suzuki E. (1999). Vision of compound eyes: Photoreceptive membrane and phototransduction cascade. En: (Eguchi E., Tominaga Y., eds.): *Atlas of Arthropod Sensory Receptors*, Capítulo I-2. Springer-Verlag, Tokio. p: 13-22.
- Wada S., Schneider G. (1967). Eine pupillenreaktion im ommatidium von *Tenebrio molitor*. *Naturwissenschaften* 54:542.
- Wada S., Schneider G. (1968). Circadianer rhythmus der Pupillenweite im ommatidium von *Tenebrio molitor*. *Z. Vergl. Physiologie* 58: 395-397.
- Walcott B. (1969). Movement of retinula cells in insect eyes on light adaptation. *Nature* 223: 971-972.
- Walcott B. (1971a). Unit studies on receptor movement in the retina of *Lethocerus* (Belostomatidae, Hemiptera). *Z. Vergl. Physiologie* 74: 17-25.
- Walcott B. (1971b). Cell movement on light adaptation in the retina of *Lethocerus* (Belostomatidae, Hemiptera). *Z. Vergl. Physiologie* 74: 1-16.
- Ward J.P., Baker P.S. (1982). The tethered flight performance of a laboratory population of *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae) to visual stimuli. *Bull. ent. Res.* 72: 357-366.
- Ward J.P., Finlayson L.H. (1982). Behavioural responses of the haematophagous bug *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae) to visual stimuli. *Bull. ent. Res.* 72: 357-366.
- Warnes M.L., Finlayson L.H. (1985). Responses of the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae) to carbon dioxide and host odours. II. Orientation. *Bull. ent. Res.* 75: 717-727.
- Warrant E., McIntyre (1990). Screening pigment, aperture and sensitivity in the dung beetle superposition eye. *J. Comp. Physiol. A* 167: 805-815.
- Warrant E.J., McIntyre P.D. (1993). Arthropod eye design and the physical limits to spatial resolving power. *Progress in Neurobiology* 40: 413-461.

- Warrant E.J., Nilsson D-E. (1998). Absorption of white light in photoreceptors. *Vision Res.* 38 (2): 195-207.
- Wehner R. (1981). Spatial vision in arthropods. En (Autrum H., ed.): *Comparative physiology and evolution of vision in invertebrates C: Invertebrate Visual Centers and Behavior II*, Capítulo 4. Springer-Verlag, Berlin. p: 287-616.
- Wehner R. (1994). Insect vision: exploring the third dimension. *Ethology Ecology & Evolution* 6: 395-401.
- Wehrhahn C. (1984). Ocellar vision and orientation in flies. *Proceedings of the Royal Society of London B* 222: 409-411.
- Wehner R., Rossel S. (1985). The bee's celestial compass - A case study in behavioural neurobiology. En: (Hölldobler B., Lindauer M., eds.) *Experimental behavioral ecology*, Stuttgart-New York:Gustav Fischer Verlag, 11-53.
- White R.H., Stevenson R.D., Bennett R.R., Cutler D.E. (1994). Wavelength discrimination and the role of ultraviolet vision in the feeding behavior of hawkmoths. *Biotropica* 26 (4): 427-435.
- WHO (1997). UNDP/ World Bank/ WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. World Health Organisation, Geneva. 141 pp.
- Wiener N. (1948). *Cybernetics*. Wiley, New York. Citado por Dusenbery (1992).
- Wiesinger D. (1956). Die Bedeutung der Umweltfaktoren für den Saugakt von *Triatoma infestans*. *Acta Tropica* 13: 97-141
- Wigglesworth V.B. (1972). *The principles of insect physiology*. 7a. Edición. Chapman and Hall, London. 827 pp.
- Wigglesworth V.B., 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: 120-138.
- Wills S.A., Page T.L., Colwell C.S. (1985). Circadian rhythms in the electroretinogram of the cockroach. *J. Biol. Rhythms* 1 (1): 25-37.
- Zar J.H. (1984). *Biostatistical analysis*. 2da Edición. Prentice-Hall International Inc, USA. 718 pp.