



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**FUNCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN
EL COMPORTAMIENTO DE
RHODNIUS PROLIXUS EN
RESPUESTA A ESTÍMULOS
QUÍMICOS**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: Ciencias Biológicas

Valeria Sfara

Director: Dr. Raúl A. Alzogaray

Consejero de estudios: Dr. Walter Farina

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN-CITEFA/CONICET)

NOVIEMBRE DE 2008

A Fede
A Clara
A los viejos

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
AGRADECIMIENTOS	8
1. INTRODUCCIÓN	9
<i>1.1 ¿Cómo perciben los insectos el mundo que los rodea?</i>	9
<i>1.2. Repelencia</i>	16
<i>1.3. Localización del hospedador</i>	20
<i>1.4. El óxido nítrico, una molécula muy simple</i>	24
<i>1.5. Rhodnius prolixus, el modelo experimental</i>	38
<i>1.6. Objetivos</i>	39
2. MATERIALES Y MÉTODOS	41
<i>2.1. Material biológico</i>	41
<i>2.2. Compuestos químicos</i>	41
<i>2.3. Bioensayos: Repelencia</i>	42
<i>2.4. Bioensayos: Actividad locomotora</i>	46
<i>2.5. Bioensayos: Efecto antialimentario</i>	47
<i>2.6. Bioensayos: Orientación sobre una paloma viva</i>	49
<i>2.7. Bioensayos: Orientación hacia claves térmicas y químicas</i>	50

<i>2.8. Medición de la actividad óxido nítrico sintasa (NOS)</i>	51
<i>2.9. Análisis estadístico</i>	52
3. RESULTADOS	54
<i>3.1. Estabilidad de la SNAC</i>	54
<i>3.2. Repelencia</i>	55
<i>3.3. Actividad locomotora</i>	58
<i>3.4. Efecto antialimentario</i>	59
<i>3.5. Orientación sobre una paloma viva</i>	63
<i>3.6. Orientación a claves térmicas y químicas</i>	63
<i>3.7. Actividad NOS</i>	65
4. DISCUSIÓN	68
<i>4.1. Estabilidad de la SNAC</i>	68
<i>4.2. Repelencia</i>	69
<i>4.3. Actividad locomotora</i>	72
<i>4.4. Efecto antialimentario</i>	73
<i>4.5. Orientación sobre una paloma viva</i>	75
<i>4.6. Orientación a claves térmicas y químicas</i>	76

4.7. Actividad NOS	78
5. CONCLUSIONES	80
5.1. Conclusiones generales	80
5.2. Conclusiones particulares	80
5.3. Objetivos futuros	82
7. REFERENCIAS	83

RESUMEN

Función del óxido nítrico en el comportamiento de *Rhodnius prolixus* en respuesta a estímulos químicos

El óxido nítrico (NO) ejerce múltiples funciones en los seres vivos. Su blanco molecular es la guanilato ciclasa soluble que sintetiza el nucleótido guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Esta molécula, a su vez, activa otros blancos intracelulares. En los insectos, el sistema NO/GMPc es responsable de la transducción de señales visuales, gustativas y olfativas. En particular, el aumento del GMPc por acción del NO induce adaptación sensorial. En el presente trabajo evaluamos el efecto de la S-nitroso-acetilcisteína (SNAC), un dador de NO, y del dibutiril-GMPc (db-GMPc), un análogo del GMPc, sobre el comportamiento de *Rhodnius prolixus* en respuesta a estímulos olfativos (una paloma viva, CO₂ y el repelente dietiltoluamida – DEET–) y a un estímulo térmico. (37 °C). La aplicación tópica de SNAC en ambas antenas de los insectos inhibió parcialmente el proceso de alimentación (DE50 = 5,26 µg/insecto). También disminuyó en una forma dependiente de la dosis la atracción producida por el CO₂ y el efecto repelente de la DEET. La aplicación de db-GMPc produjo un efecto similar sobre la repelencia de la DEET, pero no modificó la respuesta alimentaria. Ni la SNAC ni el GMPc modificaron la respuesta al estímulo térmico. Estos resultados sugieren que el sistema NO/GMPc podría participar en la adaptación olfativa de *R. prolixus*.

Palabras clave: Óxido nítrico, olfato, repelencia, DEET, *Rhodnius prolixus*, quimiorrecepción, comportamiento alimentario.

ABSTRACT

Role of nitric oxide in the behaviour of *Rhodnius prolixus* in response to chemical stimuli

Nitric oxide (NO) has multiple functions in the living organisms. NO activates the soluble guanylyl cyclase, which elicits the synthesis of the nucleotide cyclic guanosine monophosphate (cGMP) that starts a signalling pathway activating other intracellular targets. In insects, the NO/cGMP system participates in the transduction of visual, gustatory and olfactory signals. Particularly, it has been identified as the mediator of the sensory adaptation processes. In the present work, we tested the effect of S-nitroso-acetylcysteine (SNAC), a NO donor, and dibutyryl cyclic GMP (db-cGMP), a cGMP analogue, in the response of *Rhodnius prolixus* nymphs towards chemical stimuli (a living pigeon, a CO₂ source, and the diethyltoluamide (DEET) repellent). We also evaluated the effect of these compounds in the response of the nymphs towards a thermal stimulus (a 37° C copper resistance). Topical application of SNAC on both nymphs' antennae produced feeding deterrence in a dose-dependent manner (ED₅₀ = 5.26 µg/insecto). Treatment with SNAC also decreased the attraction to the CO₂ source and the repellence caused by DEET. When nymphs were topically treated with db-cGMP on both antennae, a decrease in repellence but no feeding deterrence, was observed. There were no changes in the response to the thermal stimulus of nymphs treated with SNAC. These results suggest a possible role of the NO/cGMP system in the sensory adaptation process in *R. prolixus*.

Key words: Nitric oxide, olfaction, repellence, DEET, *Rhodnius prolixus*, chemoreception, feeding behaviour.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Dr. Eduardo Zerba por abrirme las puertas de CIPEIN, en donde me formé desde mis comienzos en la investigación.

Gracias al Dr. Raúl Alzogaray por ayudarme con su dirección, a concretar todos mis trabajos de Tesis!

Gracias a todos los *cipeinianos*, con quienes comparto hace ocho años almuerzos, café con medialunas y discusiones científicas (y no tanto).

Gracias a Gastón y Ariel, mis “compañeros de banco”, y a Pablo SO, quienes están siempre: para darme una mano con el Word, para opinar sobre el color de los gráficos, para ayudarme a decidir sobre la significación estadística de mis resultados, para hablar de Capusotto....gracias chicos!

Gracias a CITEFA por brindarle sus instalaciones a nuestro centro.

Gracias al CONICET por financiar mi trabajo con cinco años de beca y dos años de subsidios.

Gracias a todos aquellos quienes, fuera del CIPEIN, con su incondicional apoyo me alientan a seguir trabajando!!

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ¿Cómo perciben los insectos el mundo que los rodea?

Hace algunos años, cuando era alumna de grado en la facultad de Ciencias Exactas y Naturales, me decidí a estudiar a los insectos. Una de las cosas que influyó fuertemente mi decisión fue el interés que me despertó su llamativa fisiología. Los insectos son sin duda uno de los grupos más sorprendentes del reino animal. Además de ser muy diversos, están adaptados a prácticamente todos los ambientes de la Tierra (podemos encontrar especies de insectos adaptadas a las condiciones ambientales más extremas, desde latitudes tropicales, hasta los polos).

La diversidad de los insectos se manifiesta no solamente en términos de su morfología, sino también a nivel fisiológico. Entre las especies de insectos conocidas se pueden encontrar adaptaciones en sus sistemas de órganos que no están presentes en ningún otro grupo animal. Uno de los sistemas más sofisticados es el sensorial.

Los insectos perciben el ambiente que los rodea a través de sus sentidos. Su comportamiento está determinado, o al menos influenciado, por los estímulos captados por sus órganos sensoriales (Wigglesworth, 1972).

Los quimiorreceptores. La superficie del cuerpo de los insectos está cubierta por pelos o setas con función sensorial. Estos pelos fueron denominados *sensilias* por el zoólogo alemán Ernest Haeckel (1834-1919), y son la unidad básica para la percepción sensorial en los insectos (Klowden, 2007). Las sensilias están compuestas por una estructura cuticular, neuronas y otras células asociadas, y las sustancias o estructuras que estas células producen. Las células accesorias son la *célula tormógena*, que origina la cavidad de la sensilia, la *célula tricógena*, que da origen al asta del pelo sensorial y finalmente la *célula tecógena*, que produce los componentes de la vaina interna de la sensilia. Esta vaina mantiene aislados a los axones entre sí y les provee los iones y nutrientes que necesitan para funcionar.

Las sensilias pueden asumir distintas formas y funciones (Figura 1.1). Según su morfología externa, las sensilias olfativas se clasifican en *tricoideas*, compuestas por un largo pelo sensorial con una gruesa cutícula, y entre una y tres dendritas no ramificadas; *basiconicas*, que presentan un pelo más corto, cutícula más gruesa y entre una y tres dendritas ramificadas; *placoides*, en forma de placa y con un alto número de dendritas ramificadas (hasta 50); *celocónicas*, que tienen una estructura en forma de estaca, se encuentran dentro de una cavidad cuticular y contienen entre tres y cinco dendritas no ramificadas (Klowden, 2007). El número y la disposición de sus poros o el grosor de la cutícula que reviste el pelo sensorial son otras características morfológicas de las sensilias usadas para su clasificación (Keil, 1999).

Los *mecanorreceptores* son estructuralmente similares a los *quimiorreceptores* y son los responsables de la detección de corrientes de aire, vibraciones del sustrato, movimientos de los apéndices y orientación, velocidad del vuelo y gravedad (Nation, 2002).

Los *quimiorreceptores* son receptores sensoriales que perciben los estímulos químicos presentes en el ambiente y transducen estas señales químicas en un potencial de acción eléctrico.

Existen dos tipos de quimiorreceptores capaces de responder a la energía química del ambiente: los quimiorreceptores de contacto o sensilias gustativas y las sensilias olfativas.

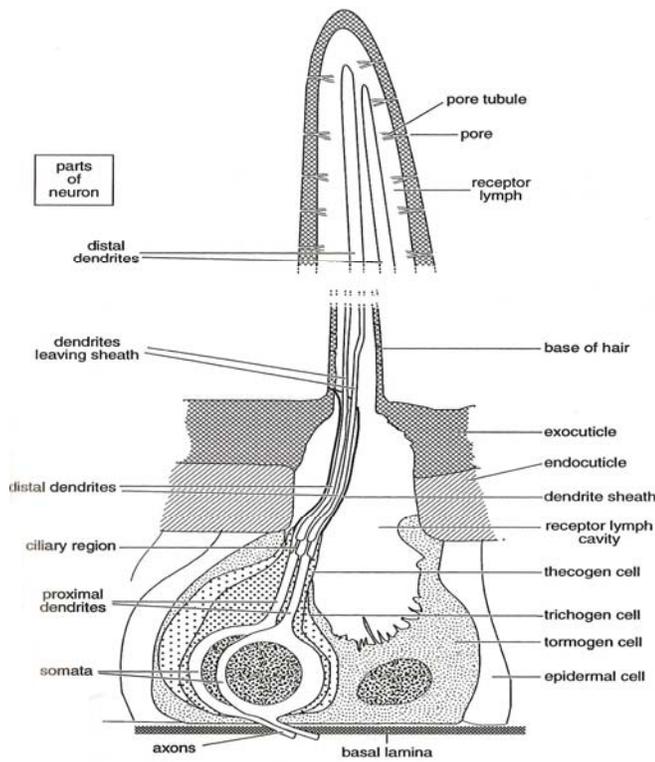
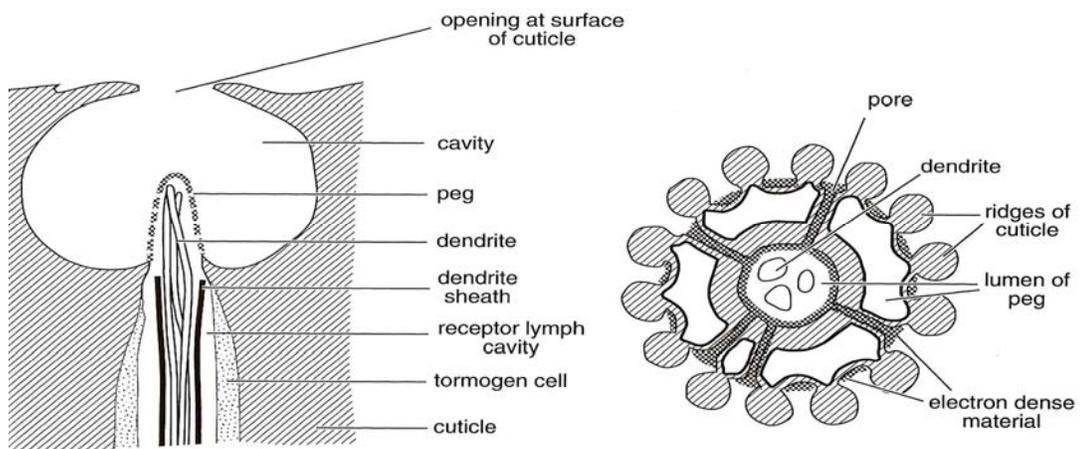


Figura 1.1: Esquemas de dos tipos de sensilias: a la izquierda, una sección de sensilia olfativa. La parte superior del pelo sensorial se encuentra agrandado para observar el detalle de los poros.

Abajo izquierda, sección longitudinal de una sensilia celocónica mostrando el pelo en el interior de la cavidad; abajo derecha, sección transversal de la sensilia celocónica de doble pared (Fuente: Chapman, 1998).



Las sensilias olfativas están compuestas por todos los elementos descritos más arriba. Se encuentran en las antenas y en los palpos maxilares de los insectos y suelen tener forma de pelo, con la superficie “cubierta” por poros en número variable. Adentro, en el lumen, pueden contener hasta cinco neuronas sensoriales.

Las neuronas sensoriales olfativas de los insectos son células bipolares con un soma elipsoidal en la base de la sensilia y dendritas con proyecciones distales hacia el lumen (Chapman, 1998). En el otro extremo, los axones se extienden hasta los lóbulos antenales y finalizan en ramificaciones, formando los glomérulos.

Las células accesorias regulan la composición de la linfa dentro del pelo sensorial. En la producción de la respuesta neuronal a un determinado olor están involucrados dos procesos fundamentales: la captura y transporte de la molécula de olor hacia la membrana de la dendrita, y la transducción de la señal. Este último proceso consiste en la conversión de una señal química en una señal eléctrica.

Las sensilias olfativas pueden detectar sustancias presentes en el ambiente en muy bajas concentraciones. Los ejemplos más impresionantes corresponden a la detección de feromonas (señales químicas que los insectos liberan al ambiente y funcionan como mensajes entre individuos de la misma especie). Unas pocas decenas de moléculas de feromonas son suficientes para producir una respuesta comportamental en los machos del gusano de la seda.

Las sustancias volátiles detectadas por las sensilias olfativas suelen ser lipofílicas. Para ingresar al pelo sensorial, pasan a través de los poros presentes en la pared de la sensilia. Una vez adentro, las moléculas de olor se unen a determinadas proteínas solubles (*odorant binding proteins*, OBP) que las transportan a través de la hemolinfa. Luego, al alcanzar la membrana de la dendrita, las moléculas se desprenden de las proteínas transportadoras y se unen a los receptores proteicos anclados en la membrana (Stengl *et al.*, 1999). Existen al menos dos tipos de OBP: las *general odorant binding proteins*, a las que se unen las moléculas de olor en general, y suelen estar presentes en ambos sexos de casi todas las especies de insectos; y las *pheromone binding proteins*, a las que se unen solamente las feromonas, fundamentalmente las de atracción sexual. Estas últimas proteínas suelen estar presentes mayormente en los machos y son altamente específicas para las feromonas emitidas por las hembras de la misma especie.

Los termorreceptores. La experiencia en la observación del comportamiento de los insectos indica que estos sentidos responden a los cambios de temperatura y humedad del ambiente. Sin embargo, existe poca información acerca de los receptores involucrados y de la manera en que esta información es procesada. Las sensilias que funcionan como *termorreceptores*, en general son también *higrorreceptores* (es decir receptores de humedad), y están presentes principalmente en las antenas (Nation, 2002). En varias especies de insectos se encontraron termo-higrorreceptores con arreglos de tres neuronas. Cada una de ellas responde específicamente a un estímulo diferente, aumentando o disminuyendo la frecuencia de sus potenciales de acción según los cambios percibidos en el ambiente. De esta manera, la neurona termorreceptora aumenta la frecuencia de disparo de sus potenciales de acción al detectar un aumento en la temperatura ambiente. Las neuronas higrorreceptoras, en cambio, aumentan la frecuencia de disparo de sus potenciales de acción cuando hay un cambio en la humedad relativa del aire; una de ellas aumenta la frecuencia de disparo de sus potenciales de acción en relación directa con el aumento de la humedad relativa del aire, y la otra en relación inversa. Morfológicamente, estas sensilias pueden ser del tipo tricoidea, basicónica o celocónica. Estas estructuras fueron identificadas en las antenas de *Periplaneta americana*, *Locusta migratoria*, *Carausius morosus*, *Apis mellifera*, *Triatoma infestans*, *Mamestra brassicae* y *Aedes aegypti* (Nation, 2002). En las antenas de *R. prolixus* también fueron identificadas sensilias con función termo-higrorreceptora: se trata de pelos sensoriales cortos ubicados dentro de una cavidad, a las que los autores llamaron *nonporous sensilla* (McIver y Siemicki, 1985).

En los insectos hematófagos, la percepción del calor por medio de las antenas es un factor importante en el proceso de detección del hospedador (Wigglesworth, 1972). En los triatominos, los receptores térmicos están dispersos por toda la superficie del cuerpo, pero se concentran en las antenas (Flores y Lazzari, 1996). En *Triatoma infestans* fueron identificadas sensilias celocónicas inervadas por tres neuronas, una de ellas sensible a la temperatura y las otras dos sensibles a la humedad (Lazzari, 1990). Este arreglo concuerda con el modelo general de sensilia termorreceptora presente en otros insectos (ya descrito en los párrafos precedentes). *T. infestans* presenta también un órgano termorreceptor más complejo, llamado *cueva de cerdas* (Lazzari, 1990). Consiste en una cavidad localizada en el segundo artejo antenal y contiene un gran

número de cerdas. Estudios electrofisiológicos confirmaron que su función es termorreceptora.

Un trabajo clásico que Wigglesworth y Guillet (1934) realizaron en *Rhodnius prolixus*, la especie en estudio en esta tesis, muestra cómo estos insectos utilizan el calor para orientarse hacia el hospedador. Estos científicos observaron que individuos de *R. prolixus* ubicados a 3 ó 4 cm de unos tubos con agua caliente desarrollaban una respuesta de atracción hacia el estímulo térmico; la respuesta se mantuvo al exponer insectos con los ojos y ocelos cubiertos con pintura o a los que se les había cortado la proboscis. Sin embargo, no se observó ninguna respuesta cuando a los insectos expuestos a la fuente térmica se les habían removido las antenas. Este resultado fue la primera evidencia del rol de las antenas en la percepción de una estímulo térmico en *R. prolixus*. Dos trabajos más recientes confirmaron esta observación: Friend y Smith (1971) determinaron que el calor es suficiente para que individuos de la especie *R. prolixus* se orienten hacia la fuente emisora del estímulo y extiendan la proboscis; Fujita y Kloetzel (1976) determinaron que la respuesta de extensión de proboscis de estos insectos es máxima cuando la temperatura de la fuente alcanza los 37° C.

Transducción sensorial. El proceso de transducción sensorial es la manera en que la energía del medio ambiente es transformada en energía eléctrica en el sistema nervioso del insecto (Klowden, 2007). Las moléculas de olor ingresan a la sensilia a través de los poros presentes en la pared de ésta y viajan por el lumen de la sensilia hasta la neurona unidas a las OBP. Una vez allí, se unen a receptores proteicos presentes en la membrana de las dendritas, con mayor o menor afinidad. Algunos receptores responden solo a la unión de un tipo de molécula (*receptores especialistas*), mientras que otros desencadenan una respuesta ante la unión de más de un tipo de molécula (*receptores generalistas*). En este último caso, la respuesta es modulada por la afinidad con que ocurre la unión. La información proveniente de los receptores especialistas y generalistas es integrada a nivel central y el insecto “reconoce” la sustancia de la misma forma en que nosotros reconocemos un olor. Finalmente, se obtiene la respuesta comportamental asociada al compuesto en cuestión.

Existen evidencias que indican que la unión de moléculas de olor produce un aumento rápido y transitorio de segundos mensajeros en el interior de la célula. Este

proceso ocurre tanto en el tejido olfativo de los vertebrados como en el de los insectos (Zufall *et al.*, 1994) (Figura 1.2).

Se ha demostrado que al exponer preparados de antenas de machos de *Antheraea polyphemus* (Lepidoptera: Saturniidae) a una feromona específica, se produce un aumento de la concentración intracelular de inositol trifosfato (IP₃) (Kaissling y Boekhoff, 1993). Este fenómeno fue observado también en homogenatos de antenas de la cucaracha *P. americana* en presencia de concentraciones picomolares de la feromona sexual de este insecto (Breer *et al.*, 1990).

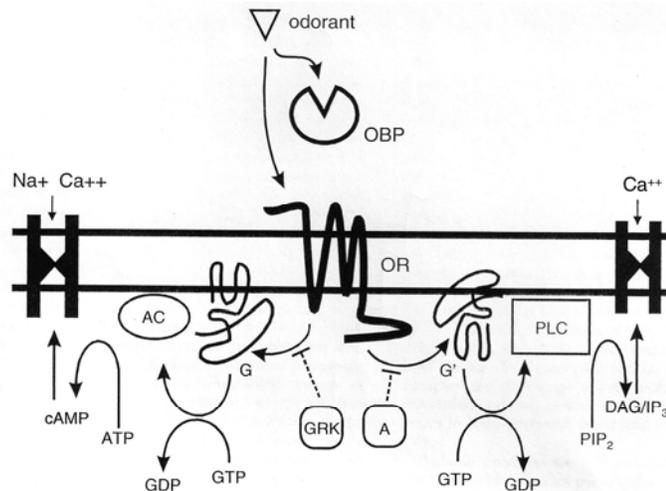


Figura 1.2: Representación de los componentes intracelulares del proceso de transducción de señales olfativas. Un receptor (OR) en la membrana de la neurona receptora interactúa con la molécula de olor o con la *odorant-binding protein* (OBP). En ambos casos, la interacción con complejos de proteína G (G/G'), activa diferentes efectores: adenilato ciclasa (AC), fosfolipasa C (PLC), que producen la síntesis de segundos mensajeros: AMPc, diacilglicerol (DAG), inositol trifosfato (IP₃). Estas moléculas regulan canales catiónicos (Na⁺; Ca²⁺) que transportan la corriente de transducción (Fuente: Klowden y Zwiebel, 2005).

El aumento en la concentración intracelular de estos nucleótidos produce un incremento en la conductancia de ciertos iones a través de la membrana de las neuronas

sensoriales (Dionne, 1994). Se han identificado canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos tanto en vertebrados como en insectos.

La degradación de las moléculas de olor produce la liberación de los receptores y permite que las neuronas olfativas puedan responder a estímulos repetitivos. Esta reacción es catalizada por esterasas y otras enzimas específicas (por ejemplo, oxidasas específicas de feromonas) presentes en el interior de las sensilias olfativas (Stengl *et al.*, 1999).

1.2. Repelencia

Un repelente de insectos ha sido definido como *un compuesto químico que produce en el insecto movimientos orientados que lo alejan de la fuente emisora* (Dethier *et al.*, 1960). Otro autor lo definió como *un compuesto químico o una mezcla de compuestos que, en su fase vapor, desencadenan en el insecto un comportamiento que lo hace moverse en sentido contrario a la fuente emisora* (Barton Brown, 1977).

El uso de repelentes de insectos no está restringido a la especie humana: se ha observado que otros primates suelen ungirse el pelaje frotándose hojas de distintas plantas o algunas especies de milpiés. Se ha descubierto que los milpiés de la especie *Orthoporus dorsovittatus* contienen benzoquinonas, sustancias que producen un significativo efecto repelente sobre varias especies de mosquitos (Moore y Debboun, 2007). Históricamente, las poblaciones humanas han utilizado el humo proveniente de la quema de plantas para protegerse de los insectos hematófagos. Hay reportes históricos que documentan la existencia de esta práctica en civilizaciones antiguas como Egipto, Grecia y Roma, y las tribus indígenas del continente americano (Moore y Debboun, 2007).

Existe una amplia variedad de compuestos químicos, naturales o sintéticos, que poseen la capacidad repelente. Entre los compuestos de origen natural se cuentan muchos aceites esenciales de plantas y sus componentes. El aceite de citronela, con su ingrediente activo citronelal, es uno de los más usados (Isman, 2006). Este aceite es el principio activo de algunos repelentes comerciales de uso pediátrico; también se usa en

exteriores formulado como espirales, cuyos humos repelen mosquitos. Algunos repelentes como el d-limoneno tienen aplicaciones veterinarias, para evitar la presencia de pulgas y garrapatas en las mascotas (Isman, 2006). El mentol y el timol suelen usarse en las colmenas de abejas para protegerlas del ataque de los ácaros parásitos del género *Varroa*. Los aceites esenciales de plantas demostraron su efectividad como repelentes en otros insectos hematófagos además de los mosquitos. La citronella, el citronelal, el geraniol, el piperonal y el piretro repelen al piojo del cuerpo *Pediculus humanus humanus* (Mumcuoglu *et al.*, 1996; Burgess, 1993). Toloza *et al.* (2006) demostraron que el aceite esencial de *Mentha pulegium* es muy efectivo como repelente de cepas resistentes a permetrina del piojo de la cabeza *P. humanus capitis*.

Además de los aceites esenciales, otras fracciones de determinadas plantas o frutos pueden ser usadas como repelentes. Las proteínas, fibra y almidón de la arveja *Pisum sativum* son repelentes para las plagas de grano almacenado *Cryptolestes ferrugineus*, *Sitophilus oryzae*, *S. zeamais*, *Tribolium confusum* y *T. castaneum* (Fields *et al.*, 2001).

Durante las primeras décadas del siglo XX, las fuerzas armadas invirtieron un gran esfuerzo en la búsqueda de compuestos sintéticos con propiedades repelentes (Moore y Debboun, 2007). Durante las guerras mundiales, muchas de las bajas que se produjeron en los ejércitos fueron debidas al tifus y la malaria, dos enfermedades transmitidas por las picaduras de insectos hematófagos. Por esta razón, era imperiosa la necesidad de encontrar un compuesto químico capaz de controlar y mantener alejados de las tropas a estos insectos. Los primeros compuestos desarrollados para este fin fueron el dimetilftalato y la Indalona, patentados en 1929 y 1937, respectivamente (Strickman, 2007). El uso de estos productos entre los soldados produjo una disminución significativa de los casos de tifus. Sin embargo, el descubrimiento de la N,N-dietil-3-metilbenzamida o DEET en 1946 y su posterior comercialización en 1956 revolucionó el mercado de los repelentes por su efectividad, persistencia y relativamente baja toxicidad en los humanos (Frances, 2007). Si bien algunos resultados muestran cierta neurotoxicidad de este producto, principalmente en niños, muchos de ellos están relacionados con la exposición a dosis muy altas y a su mal uso.

En los últimos años se descubrieron otros compuestos sintéticos con propiedades repelentes. Las piperidinas son aminas cíclicas cuya estructura básica está presente en la

piparina, el principal activo de la pimienta (*Piper* sp.). Estos compuestos demostraron ser tan eficientes como la DEET en proteger al individuo del ataque de los hematófagos, y además son toxicológicamente seguros. La Picaridina es el formulado comercial más conocido que contiene compuestos de esta familia.

La efectividad de la DEET ha sido comprobada en un gran número de insectos hematófagos. En estudios de laboratorio se ha demostrado que la DEET tiene un importante efecto repelente en las vinchucas *T. infestans* (Alzogaray *et al.*, 2000; Sfara *et al.*, 2006) y *R. prolixus* (Sfara *et al.*, 2008).

A pesar de estar disponible en el mercado hace más de 50 años, se sabe muy poco acerca del modo de acción de la DEET. Klun *et al.*, (2006) observaron que una superficie tratada con DEET y ubicada fuera del alcance de los insectos, producía un efecto repelente en los dípteros hematófagos *Ae. aegypti*, *Anopheles stephensi* y *Phlebotomus papatasi*. Estos resultados indicarían que la repelencia es producida por la fracción volátil de la DEET, percibida por los insectos a través del olfato. Este resultado coincidió con un estudio reciente que confirma que la DEET y otros repelentes son percibidos por los insectos por la vía olfativa (Syed y Leal, 2008). La tensión de vapor es una propiedad importante que debe tener un repelente de insectos; a menor tensión de vapor, el efecto repelente dura más tiempo, pero un compuesto con mayor tensión de vapor puede ser más eficiente como repelente a menor concentración.

Alzogaray *et al.* (2000) observaron que el pretratamiento de las ninfas de *T. infestans* con el reactivo de sulfhidrido N-etilmaleimida (NEM), producía una disminución de la respuesta a la DEET. Esta disminución, atribuida al bloqueo de los quimiorreceptores producido por la NEM, constituye una evidencia a favor de la hipótesis que postula la vía olfativa como el camino de percepción de los repelentes en los insectos. Un trabajo previo de nuestro laboratorio, demostró que el pretratamiento con NEM interfería con la alimentación y la cópula en *T. infestans*, posiblemente por el bloqueo de la quimiorrecepción, y en particular del olfato (Picollo *et al.*, 1993).

Muchos compuestos presentan un efecto dual que depende de la concentración: pueden ser repelentes a concentraciones altas, pero presentan el efecto contrario al disminuir su concentración. Un ejemplo es el ácido isobutírico, uno de los compuestos liberados por la glándula de Brindley (glándula exócrina presente en los triatominos que libera feromonas). El ácido isobutírico también es emitido por los vertebrados y usado

por los hematófagos, y en particular por los triatominos, para orientarse hacia su hospedador (Rojas *et al.*, 2002). Individuos adultos de *R. prolixus* mostraron ser atraídos hacia dosis bajas de este compuesto, pero las dosis altas fueron repelentes (Schofield, 1979).

En otros casos, la repelencia puede aparecer como un efecto tóxico durante la cadena de eventos que finalizan con la muerte del insecto expuesto a un insecticida. Dosis subletales del piretroide deltametrina producen un efecto repelente en las vinchucas de la especie *T. infestans* (Diotaiuti *et al.*, 2000). Sin embargo, no se observó repelencia cuando individuos de la misma especie fueron expuestos a dosis más altas de este insecticida (Alzogaray y Zerba, 2001).

Gran parte de los estudios sobre el modo de acción de la DEET fueron realizados en distintas especies de mosquitos. Algunos autores presentaron modelos hipotéticos sobre el modo de acción de este repelente, pero ninguno fue confirmado con una sólida evidencia experimental.

La hipótesis más ampliamente aceptada acerca del modo de acción de la DEET sostiene que su efecto repelente se debe a que interfiere en la percepción de las claves químicas que emanan del hospedador, produciendo la desorientación de los insectos. Dogan *et al.* (1999) demostraron que la DEET inhibe la respuesta de determinados quimiorreceptores específicos de ácido láctico presentes en las antenas de los mosquitos *Ae. aegypti*; además, mostraron que en ausencia de un estímulo químico relacionado con el hospedador, la DEET tiene propiedades atractantes. Estudios electrofisiológicos realizados en antenas de varias especies de mosquitos durante la década del '70, confirmaron que la respuesta eléctrica de las neuronas sensibles a ácido láctico disminuía en presencia de DEET, y que el grado de inhibición de las neuronas inhibidas por ácido láctico era aumentado por la DEET.

McIver (1981) propuso una explicación a nivel celular del fenómeno de repelencia por DEET. Dado que es un compuesto lipofílico, la DEET muestra afinidad por la porción lipídica de las membranas celulares. Al unirse a los lípidos produciría una desorganización estructural en la membrana celular de las neuronas sensoriales. Esta desorganización alteraría las respuestas normales de la neurona de tal manera que la presencia de sustancias atractantes relacionadas con el hospedador generarían en el sistema nervioso central un patrón de respuesta diferente al que se produciría en ausencia

del repelente. El resultado de este proceso sería un conjunto de respuestas musculares que alejarían al insecto del hospedador.

Los modelos sobre el modo de acción de la DEET referidos hasta aquí no consideran que esta sustancia pueda tener propiedades repelentes en sí misma, sino que atribuyen el fenómeno de repelencia a una interferencia con las claves de orientación hacia el hospedador. Sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio, no apoyan este modelo (Alzogaray *et al.*, 2000; Sfara *et al.*, 2006; Sfara *et al.*, 2008). En estos trabajos se demostró que la aplicación de DEET en ausencia de cualquier otro estímulo produce un efecto repelente dependiente de la dosis en *T. infestans* y *R. prolixus*.

Para concluir, la efectividad de la DEET como repelente de insectos no hematófagos, por ejemplo el díptero *Drosophila melanogaster*, es una evidencia más a favor de la idea de que este compuesto es intrínsecamente repelente y no actuaría por interferencia con los olores del hospedador (Reeder *et al.*, 2001).

1.3. Localización del hospedador

Los hemípteros de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, son chinches que se alimentan exclusivamente de la sangre de los vertebrados, preferentemente de mamíferos y ocasionalmente de aves. Estos insectos son *hematófagos* en todos los estadios de su desarrollo. Comúnmente llamadas *vinchucas* en Argentina, su presencia en los ambientes habitados por el hombre representa un grave problema sanitario ya que son vectores de la Enfermedad de Chagas. En las zonas endémicas, las chinches pueden estar infectadas con el protozoo *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de esta dolencia. Durante el proceso de alimentación transmiten el parásito al hombre y a los animales domésticos que conviven con él.

Los insectos hematófagos no representan un grupo monofilético (Black y Kondratieff, 2005). El hábito de la hematofagia parece haber evolucionado en forma independiente en los linajes de insectos unas 21 veces. Esto implica que las adaptaciones relacionadas con este hábito, como los mecanismos de orientación hacia el

hospedador y de localización de la sangre dentro del sistema vascular de los vertebrados, han aparecido más de una vez.

La dificultad de los insectos hematófagos para detectar la presencia de sus hospedadores varía según el grado de asociación que presentan con ellos (Lehane, 1991). Los hematófagos han desarrollado diferentes estrategias de localización del hospedador. En algunos casos presentan un sistema sensorial muy sensible, que les permite detectar la presencia de una potencial fuente de alimento a grandes distancias. En otros casos, son capaces de localizar fuentes de alimento a distancias intermedias e incrementan la eficiencia de su aparato sensorial compartiendo el hábitat con sus hospedadores. Finalmente, existen especies que prescinden del sistema de localización a distancia viviendo directamente sobre el hospedador (ectoparásitos).

Para explicar el proceso de localización del hospedador, que concluye con la ingestión de sangre, se lo ha subdividido en tres fases teóricas (Lehane, 1991):

- *Búsqueda*: luego de un determinado período de ayuno, los insectos hambrientos realizan una serie de movimientos no orientados, que aumentan las probabilidades de encontrar estímulos provenientes de un potencial hospedador;
- *Activación y orientación*: al percibir los estímulos provenientes del hospedador, se desencadenan los comportamientos estereotipados asociados a cada uno de ellos. Esto resulta en movimientos orientados hacia la fuente emisora del estímulo.
- *Atracción*: el insecto decodifica los estímulos provenientes del hospedador, realizar el último acercamiento y establece el contacto.

El mecanismo que implica la localización y la orientación hacia el hospedador está determinado por una serie de estímulos químicos y térmicos que son comunes entre los insectos hematófagos. Como ya fue mencionado en el comienzo de esta introducción, las antenas de estos insectos son los órganos que presentan la mayor concentración de receptores químicos y térmicos.

En experimentos realizados en un túnel de viento, la mosca tsé-tsé *Glossina morsitans morsitans* respondió eficientemente a corrientes de aire húmedo junto con pulsos de CO₂ (Evans y Gooding, 2002). Muchos estudios muestran que distintas especies de mosquitos se orientan hacia las fuentes emisoras de CO₂ y de compuestos volátiles de la piel de los mamíferos (Dekker *et al.*, 2005). Los triatomíneos siguen en general el esquema de localización del hospedador común a los demás hematófagos.

Wigglesworth y Guillet (1934) publicaron la primera descripción detallada del comportamiento de *R. prolixus* ante un estímulo térmico (un tubo de vidrio que contenía agua caliente). En ausencia de estímulos estos insectos permanecían en reposo (akinesis), estado que abandonaban al percibir el calor emitido por el tubo. En primer lugar, realizaban movimientos característicos de las antenas, las que movían en forma independiente. Luego, sin abandonar los movimientos antenales, se aproximaban a la fuente del estímulo. Finalmente, cuando las antenas entraban en contacto con el tubo, los insectos extendían la proboscis e intentaban picarlo, un comportamiento llamado *probing*. Para que la orientación hacia la fuente térmica ocurra correctamente, es necesaria la presencia de ambas antenas.

La orientación de los hematófagos por medio del calor ha sido ampliamente estudiada; sin embargo, los resultados obtenidos por los diferentes autores que abordaron el tema han mostrado contradicciones (Lazzari y Núñez, 1989). Durante varios años no estuvo claro si estos insectos detectan calor radiante, corrientes de aire convectivas o gradientes de aire caliente. La capacidad para orientarse hacia fuentes de radiación infrarroja y la presencia de receptores específicos para este tipo de radiación fue descrita en el coleóptero *Melanophila acuminata*, que es capaz de detectar las radiaciones provenientes de incendios forestales (Evans, 1964).

Lazzari y Núñez (1989) demostraron que la vinchuca *T. infestans* puede orientarse hacia una fuente térmica a 32° C obstaculizada por una pantalla de polietileno, demostrando la capacidad de percepción del calor radiante.

Las vinchucas utilizan las corrientes convectivas y los gradientes de aire caliente generados por una fuente térmica como clave de orientación a corta distancia (< 1 m). Utilizando un sistema de triangulación mediante las dos antenas, pueden estimar la distancia y la posición de la fuente térmica. Esta información permite que ocurra el fenómeno de extensión de la proboscis (Flores y Lazzari, 1996).

La importancia de las claves químicas en el proceso de localización del hospedador también ha sido muy estudiada en los triatominos. Estas claves permiten que los insectos identifiquen fuentes ubicadas a mediana y larga distancia (> 1 m), dependiendo de las condiciones ambientales, ya que los compuestos volátiles emitidos por un vertebrado pueden alcanzar distancias mayores si son transportados por corrientes de aire (Núñez, 1987). En presencia de una corriente de aire, las vinchucas se desplazan en el sentido de la corriente (*anemotaxis negativa*). Pero, si la corriente arrastra un estímulo químico, por ejemplo una sustancia volátil emitida por un potencial hospedador, los triatominos se desplazan en sentido contrario al de la corriente (*anemotaxis positiva*). Este comportamiento ha sido observado en individuos de las especies *R. prolixus* y *T. infestans* expuestos a corrientes de aire que transportaban olores de ratón, orina de conejo o CO₂ (Taneja y Guerin, 1995). Las respuestas de estas dos especies ante estos estímulos fueron diferentes: los individuos pertenecientes a *T. infestans* respondieron con más eficacia al olor de ratón, mientras que los pertenecientes a *R. prolixus* fueron más sensible al CO₂ y presentaron una respuesta más prolongada a este estímulo que *T. infestans*. En todos los casos, la marcha hacia la fuente emisora de los estímulos estuvo precedida por movimientos conspicuos de las antenas.

Taneja y Guerin (1997) establecieron que diferentes concentraciones de amoníaco, la orina de conejo y las propias heces de las vinchucas, disparan el comportamiento de anemotaxis positiva en *T. infestans*. Estos autores determinaron con mediciones electrofisiológicas la presencia de receptores de amoníaco en las antenas de estos insectos, y establecieron una relación de dependencia entre la frecuencia de disparo de los potenciales de acción de las neuronas y la concentración de amoníaco.

El CO₂ ha sido identificado como el principal estímulo químico en la orientación de los hematófagos hacia su fuente de alimento (Núñez, 1987). Este gas es el primero en ser detectado por las vinchucas entre todos los posibles olores emanados por el hospedador, y produce la activación y orientación de los insectos hacia la fuente. Los triatominos no responden a una concentración constante de CO₂, sino que diferencian variaciones tan pequeñas como un 0,03 % por encima de la concentración atmosférica (Núñez, 1987). El estado nutricional de los insectos determina el umbral de detección de estas variaciones: cuanto mayor es el período de ayuno, más pequeñas son las variaciones que pueden detectar. Este hecho fue observado en ninfas de *R. prolixus*,

pero no en ninfas de *T. infestans*, las cuales no tuvieron una mayor sensibilidad al CO₂ luego de ayunos prolongados (Núñez, 1987; Barrozo y Lazzari, 2004 a).

La presencia del CO₂ puede reforzar la respuesta a otros estímulos químicos del hospedador (Núñez, 1987). El agregado de este gas aumentó la atracción de ninfas del quinto estadio de *R. prolixus* expuestas a ácido láctico y a sangre de conejo en un olfatómetro.

La exposición a diferentes concentraciones de ácido láctico no tuvo ningún efecto sobre el comportamiento de ninfas de *T. infestans*. Sin embargo la exposición conjunta a ácido láctico y a una concentración subumbral de CO₂ indujo una respuesta orientada de los insectos, indicando la presencia de un fenómeno de sinergismo entre los estímulos (Barrozo y Lazzari, 2004 a). Otras sustancias volátiles emitidas por la piel o el sudor de los seres humanos, por ejemplo ácidos grasos de cadena corta, pueden provocar respuestas orientadas en ninfas de *T. infestans* expuestas a determinadas mezclas de estos compuestos (Barrozo y Lazzari, 2004 b).

1.4. El óxido nítrico, una molécula muy simple

Características químicas. El monóxido de nitrógeno, óxido de nitrógeno u óxido nítrico (NO) es un gas incoloro y poco soluble en agua. Es muy reactivo y se oxida rápidamente en presencia de oxígeno, convirtiéndose en dióxido de nitrógeno (Liptrot, 1980). La atmósfera terrestre contiene pequeñas cantidades de NO que se forma durante las tormentas eléctricas. Se genera también como consecuencia de la quema de combustible fósil y es un producto de desecho de las plantas de energía. Por ello se lo considera un contaminante ambiental y un agente tóxico.

El NO es una molécula “impar” porque posee un electrón no apareado (Partington, 1937). Por esta razón, muchos autores señalan que es un radical libre (Colasanti *et al.*, 1997; Wink y Mitchell, 1998; Homberg y Müller, 1999; Torreilles, 2001). Sin embargo, presenta una estabilidad mayor que la que puede esperarse de moléculas de este tipo (Cotton y Wilkinson, 1981). Esta estabilidad se debe en parte a su singular comportamiento magnético. Además, se lo suele representar como un híbrido de resonancia, cuyo electrón desapareado se estabiliza entre los átomos de O y de N.

El NO se produce durante la conversión del aminoácido L-arginina en citrulina, en una reacción enzimática catalizada por la *óxido nítrico sintasa* (“*nitric oxide synthase*” o NOS) (Bicker, 1998). Se trata de una familia de hemo-proteínas, compuesta por varias isoformas, que han sido identificadas tanto en vertebrados como invertebrados (Knowles *et al.*, 1989). La enzima se activa en presencia de cinco cofactores: Ca^{++} /calmodulina, (6*R*)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH_4), FAD, FMN y NADPH (Alderton *et al.*, 2001). Es un dímero, cuyas subunidades pesan entre 130 y 160 kDa, según la isoforma y la especie. En general, las NOSs constan de un dominio oxigenasa y un dominio reductasa. El dominio reductasa contiene los sitios de unión de los cofactores FAD, FMN, NADPH y Ca^{++} /calmodulina, mientras que el sitio de unión de la BH_4 , el sitio de unión al sustrato y el grupo hemo con el núcleo de hierro, se encuentran en el dominio oxigenasa. La función del dominio reductasa es transferir electrones a los aceptores presentes en el dominio oxigenasa, agilizando la conversión del sustrato.

En los mamíferos existen tres isoformas de NOS, dos de ellas denominadas *constitutivas* y dependientes de calcio (*NOS neuronal* o nNOS y *NOS endotelial* o eNOS, que toman sus nombres de los tejidos en que fueron identificadas por primera vez), las cuales sintetizan NO en condiciones normales, y una *inducible* e independiente del calcio (iNOS), que no se expresa en condiciones fisiológicas o lo hace muy débilmente (Davies, 2000). En los insectos han sido identificadas las tres isoformas y conservan un alto grado de similitud con las NOSs de los mamíferos.

Cada isoforma de las NOSs está codificada por un gen diferente; estos genes sin embargo son muy similares en su estructura, lo que hace pensar en la posible existencia de un único gen ancestral (Alderton *et al.*, 2001).

Si bien en los mamíferos las NOSs fueron identificadas en un gran número de tejidos y tipos celulares, en los insectos la mayor parte de los estudios acerca de la localización de estas enzimas se realizaron en el sistema nervioso. Utilizando métodos de inmunohistoquímica, como la actividad de NADPH diaforasa como un indicador de la actividad NOS, y también mediante la clonación de los genes de NOS, se han localizado e identificado las tres isoformas en los géneros *Drosophila*, *Apis*, *Anopheles*,

Manduca, *Schistocerca* (Müller, 1996; Müller, 1997; Luckhart y Rosenberg, 1999; Davies, 2000; Gibson y Nighorn, 2000; Collmann *et al.*, 2004).

En los triatomíneos, la actividad de NADPH diaforasa fue detectada en varias partes del sistema nervioso central de *T. infestans*: (Villar *et al.*, 1994; Settembrini *et al.*, 2007). En *R. prolixus* ha sido posible clonar y expresar el gen de la NOS de las glándulas salivales (Yuda *et al.*, 1996).

Funciones biológicas en los vertebrados. El NO está presente en los cinco reinos en los que se dividen los seres vivos, bacterias, protozoos, hongos, plantas y animales (Torreilles, 2001). En la década de 1980, un importante descubrimiento llamó la atención de los investigadores sobre el NO: se lo identificó como el *factor relajante derivado del endotelio* (*endotelial derived relaxing factor* o *EDRF*) (Bicker, 2001a). Producido por las células de los vasos sanguíneos, el NO se une a receptores específicos e induce la relajación de la capa muscular del endotelio. Esto produce una vasodilatación que disminuye la presión arterial.

En el interior celular, el NO tiene tres blancos principales (Bicker, 1998):

- la *guanilato ciclasa soluble* (GCs): esta enzima cataliza la síntesis de GMPc, que a su vez regula la fosforilación de proteínas, la conductividad de canales iónicos y la actividad de fosfodiesterasas. El NO la activa uniéndose a su grupo hemo. Este sistema constituye una vía de transducción de señales en el sistema nervioso central y periférico de los vertebrados y los insectos, y en los sistemas cardiovascular, renal y pulmonar de los vertebrados.
- la *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa* (GAPDH): es una enzima de la glucólisis que cataliza la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato; está presente en el cerebro, en los eritrocitos y las plaquetas de los vertebrados. Su unión con el NO causa su inhibición permanente.
- los *radicales superóxido*: su reacción con el NO durante el metabolismo oxidativo de la célula forma *peroxinitritos*, que pueden causar daños en el

ADN, modificar proteínas y peroxidar lípidos, procesos que, a su vez, pueden llevar a la muerte celular.

El NO ejerce su acción a través de la enzima guanilato ciclasa en diferentes procesos fisiológicos. En el sistema nervioso es un *neurotransmisor* que, a diferencia de los neurotransmisores convencionales, no se encuentra empaquetado en vesículas transportadoras. Por ser un compuesto gaseoso, difunde a través del espacio sináptico y a través de las membranas celulares (Bicker, 2001b). Estas características le permiten ejercer su acción tanto en la célula que lo produce como en las vecinas.

En los seres humanos, el NO participa como mensajero celular en distintos procesos. Herrero *et al.* (2000) demostraron que la concentración de NO aumenta en los espermatozoides inmaduros durante el proceso de capacitación que les permite adquirir la habilidad de unirse a la zona pelúcida de los oocitos para finalmente fecundarlos. Estos autores observaron además que como consecuencia del aumento de la concentración de NO se produce un aumento de AMPc. En las células de Leydig de los testículos, la presencia de NO inhibe la síntesis de testosterona (Del Punta *et al.*, 1996). El NO está presente en el sistema nervioso central y en células de la glía, participa en los fenómenos de contracción y relajación de los músculos liso y esquelético, en la función eréctil y también en la homeostasis de la piel y en la producción de diferentes patologías dérmicas (Bruch-Gerharz *et al.*, 1998; Inada *et al.*, 1998; Vincent *et al.*, 1998; Bredt, 1999; Vila-Petroff *et al.*, 1999).

En la rata, el NO es un neurotransmisor en los sistemas olfativo y visual (Breer *et al.*, 1992; Garthwaite *et al.*, 1999) y regula a través del GMPc el flujo de calcio en las células de la cóclea del cobayo (Matsunobu y Scacht, 2000). El NO es liberado en las neuronas olfativas al ser estimuladas con concentraciones relativamente altas de un determinado olor. La transducción de la señal ocurre por el consecuente aumento en la concentración intracelular de GMPc, que dispara una cascada de fosforilaciones y produce la apertura de canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos. En los vertebrados, la mayoría de las vías de transducción en las neuronas olfativas están mediadas por AMPc asociado a proteína G o por inositol trifosfato (IP3) (Lischka y Schild, 1993; Schild y Restrepo, 1998; Takeuchi y Kurahashi, 2003). El aumento de la concentración de estos nucleótidos genera la apertura de canales iónicos dependientes

de AMPc ó IP3. Sin embargo, en los anfibios, los reptiles y los mamíferos han sido identificadas vías de transducción independientes de AMPc (Breer y Shepherd, 1993). Un estudio realizado en preparados de neuronas olfatorias de tortuga reveló que al aumentar la concentración de GMPc debido al tratamiento con nitroprusiato sódico (un dador de NO), se activaban canales dependientes de AMPc (Inamura *et al.*, 1998). Un resultado similar fue observado en preparados de neuronas olfativas de *Xenopus laevis*, demostrando también en este sistema la presencia de una vía alternativa de transducción (Lischka y Schild, 1993).

Funciones biológicas en los invertebrados. Durante la década de 1990 se hizo evidente que en los invertebrados el sistema NO/GMPc estaba involucrado en una variedad de procesos fisiológicos que superaba en cantidad y complejidad a las funciones conocidas hasta ese momento en los vertebrados. Colasanti *et al.* (1997) observaron que en *Hydra vulgaris*, el sistema NO/GMPc coordina la contracción de los tentáculos, un comportamiento que estos animales realizan para capturar a sus presas antes de la alimentación. Las presas, al ser rozadas por los nematocistos de los tentáculos de la *Hydra*, liberan determinadas cantidades de glutation reducido (GSH). Este tripéptido induciría la contracción del tentáculo que tocó a la presa y la señal de contracción sería enviada a los demás tentáculos por la difusión del NO.

Las neuronas del sistema nervioso central de los moluscos producen oscilaciones de los potenciales durante el procesamiento de la información olfativa. En el molusco terrestre *Limax maximus* el NO aumenta la frecuencia de estas oscilaciones, mientras que un bloqueo en la producción de este gas disminuye o suprime las oscilaciones de los potenciales en las interneuronas del procerbro, una zona asociada con el aprendizaje olfativo (Gelperin *et al.*, 2000).

Funciones biológicas en los insectos. En este grupo de invertebrados el NO participa en procesos muy diversos, desde la respuesta inmunológica, hasta los procesos de alimentación.

A pesar de que los insectos carecen de un sistema inmunológico tal como el que presentan los vertebrados, poseen un mecanismo muy eficiente para combatir patógenos. Este tipo de sistema inmune está compuesto por elementos humorales y

celulares. Los componentes celulares, llamados *hemocitos*, son capaces de expulsar cuerpos extraños por fagocitosis, por medio de la formación de nódulos o por encapsulamiento. La respuesta humoral incluye la activación de cascadas proteicas e induce la síntesis de NO (Beckage, 2003). La agregación de los hemocitos que lleva a la formación de los nódulos que encapsulan a los patógenos está mediada por NO. Además, este gas tiene actividad antimicrobiana, ya que mata al patógeno por nitrosilación, nitración u oxidación de ADN, lípidos y otros componentes vitales de la célula. Este proceso ocurre también en la respuesta inmune de los mamíferos. En la hemolinfa de las larvas de *Chrysomya megacephala*, se observó un aumento en la producción de NO y en la proliferación de los tipos celulares que participan en el encapsulamiento de los patógenos 24 horas después de inocularles una suspensión de levaduras. Los hemocitos fueron identificados como la fuente productora del NO.

Un mecanismo similar está presente en el cangrejo cacerola *Limulus polyphemus*, en el cual la agregación de los hemocitos en respuesta a la entrada de agentes patógenos también está regulada por la producción de NO (Torreilles, 2001). Esto sugiere que el sistema de señalización NO/GMPc ha sido muy conservado durante la evolución, ya que *L. polyphemus* es una especie muy antigua, directamente emparentada con los trilobites.

En la mosca de la fruta, el NO participa en las modificaciones del comportamiento y del desarrollo que se producen en respuesta a la hipoxia (Wingrove y O'Farrell, 1999).

En las chinches hematófagas *R. prolixus* y *Cimex lectularius* hay producción de NO en las glándulas salivales con un fin muy particular. El NO forma complejos con ciertas proteínas llamadas *nitroforinas*. En el momento de la picadura, estos complejos son liberados en los capilares del hospedador, donde ejercen un efecto vasodilatador e inhiben la agregación de las plaquetas. Estos efectos aseguran el flujo local de sangre, facilitando la alimentación (Gérczei *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2003).

Estos ejemplos dan una idea de la diversidad de procesos fisiológicos en los que participa el NO en los insectos. En los últimos años se ha empezado a vislumbrar la importancia de este gas en el desarrollo del sistema nervioso y en los mecanismos de percepción sensorial.

NO en el sistema nervioso. La presencia del sistema de señalización NO/GMPc ha sido identificada en varias partes del sistema nervioso de los insectos (Müller, 1997). Utilizando la técnica de medición de la actividad de NADPH-diaforasa como un indicador de la actividad NOS, se ha detectado la presencia de esta enzima en los lóbulos antenales y ópticos, en los cuerpos pedunculados (Schuermann, 2000), en el complejo central (un área del cerebro vinculada con la regulación del comportamiento), y en las neuronas motoras que controlan el movimiento de las patas de las larvas de los lepidópteros (Qazi y Trimmer, 1999). En las larvas de *D. melanogaster* se demostró que los dadores de NO y los análogos del GMPc producen la liberación de vesículas de neurotransmisores desde la neurona presináptica en la unión neuromuscular (Wildemann y Bicker, 1999).

Además de participar en la transmisión del impulso nervioso, el NO también se comporta como *mensajero retrógrado* en varios procesos neuronales complejos (Bicker, 1998). Al llegar la señal nerviosa a la célula postsináptica, se produce en esta neurona una salida de calcio que resulta en la liberación de NO. El gas difunde hacia la neurona presináptica y le indica que la señal nerviosa que había partido de ella una fracción de segundo antes, llegó correctamente a su destino. De esta manera se genera una comunicación bidireccional entre las neuronas. Este mecanismo ha sido identificado en el sistema visual de los ortópteros, entre las células fotorreceptoras del ojo compuesto y las interneuronas postsinápticas, llamadas células monopolares.

En *Drosophila* se ha detectado la producción de NO en los *discos imaginales* que regulan la proliferación celular durante el desarrollo y en los lóbulos ópticos en formación (Davies, 2000). En estos últimos, el sistema de señalización por NO es esencial para el correcto desarrollo de las proyecciones neuronales de la retina. El NO actúa como un mensajero intercelular que estabiliza o detiene el crecimiento de los axones de la retina durante los estadios más tempranos del desarrollo, antes del establecimiento de las conexiones permanentes, que ocurren en estadios más avanzados de la metamorfosis. El bloqueo farmacológico *in vitro* de la producción de NO resultó en la desorganización y el crecimiento anormal de la retina.

Seidel y Bicker (2000) determinaron que el NO es esencial para la formación de las terminales axonales de las antenas en los embriones del ortóptero *S. gregaria*. En este insecto, la axonogénesis comienza con la diferenciación de los cuerpos celulares desde

el tejido epitelial. Estas células pioneras reciben una señal de las células epiteliales por medio del NO, que incrementa la síntesis de GMPc; a su vez, el aumento de GMPc desencadena el crecimiento del axón. Este resultado fue confirmado por medio de la inhibición farmacológica de la GCs y de la NOS, que resultó en la formación de patrones neuronales anormales en las antenas de los insectos tratados.

Utilizando técnicas de inmunocitoquímica fue posible identificar la NOS y la GCs en las neuronas olfatorias del sistema nervioso en desarrollo del lepidóptero *Manduca sexta* (Gibson y Nighorn, 2000).

El sistema NO/GMPc y la quimiorrecepción en los insectos. Los primeros estudios sobre los mecanismos implicados en la transducción de señales sensoriales en los insectos apuntaron a revelar el rol de los nucleótidos cíclicos en el procesamiento de las señales olfativas. Ya se conocía que en los vertebrados, los nucleótidos cíclicos regulan la conductividad de las membranas celulares de las neuronas receptoras en los sistemas visual, gustativo y olfativo. Los primeros caminos de transducción de señales olfativas en los insectos fueron revelados mediante el estudio de las sensillas receptoras de feromonas.

Ziegelberger *et al.*, (1990) midieron variaciones en las concentraciones de nucleótidos cíclicos en antenas aisladas de los lepidópteros *Bombix mori* y *Antheraea polyphemus*. Al estimular los preparados con concentraciones altas de las respectivas feromonas se registró un aumento significativo de GMPc, pero los niveles de AMPc no variaron. Un resultado similar fue obtenido en *Heliothis virescens* (Boekhoff *et al.*, 1993). Al estimular preparados de antenas de estos insectos con su feromona sexual se detectó un aumento rápido y transitorio de inositol trifosfato (IP3). La aplicación de concentraciones relativamente altas de la feromona produjo un aumento retardado y sostenido de GMPc, y una disminución de los niveles de IP3. Estos resultados sugieren que el GMPc participa en los fenómenos de adaptación sensorial de las neuronas receptoras en las antenas de los insectos. Este tema será discutido con más detalle más adelante (ver la sección sobre adaptación sensorial).

El mecanismo de transducción mediado por IP3 y diacilglicerol (DAG) no es exclusivo de los receptores de feromonas, sino que también señala la recepción de cualquier tipo de olor (Pophof y van der Goes van Naters, 2002). En los vertebrados se

da el caso contrario ya que la cascada de transducción por IP3/DAG ocurre exclusivamente en el órgano vomeronasal, una parte del epitelio olfativo especializado en la recepción de feromonas, mientras que la recepción de olores en general está mediada por nucleótidos cíclicos, en particular AMPc.

Además de actuar como mensajero intracelular en los procesos de adaptación sensorial, el NO está presente en las vías convencionales de transducción de señales olfativas. Las sensilias con función olfativa están presentes mayormente en las antenas de los insectos, pero pueden encontrarse también en los palpos maxilares; según su ubicación, están especializadas en olores provenientes de distintas fuentes (Wasserman e Itagaki, 2003). Utilizando la técnica de actividad de NADPH-diaforasa como indicadora de la presencia de NOS, esta enzima se ha detectado en las antenas y en los palpos maxilares de la mosca de la carne *Neobellieria bullata*. Por medio de técnicas electrofisiológicas, se registró una disminución de entre el 30 y el 50% en la actividad eléctrica observada en los electroantenogramas y electropalpogramas en preparados de antenas y palpos maxilares profundidos con nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), un inhibidor de la NOS. Este resultado indicaría la participación del NO como mensajero de señales excitatorias en las neuronas receptoras olfativas de la mosca de la carne.

Las piezas bucales de los insectos presentan, además de las olfativas, otro tipo de sensilias quimiorreceptoras que poseen un solo poro en el extremo del pelo sensorial. Estos órganos tienen función gustativa y se conocen como quimiorreceptores de contacto (Chapman, 1998). En las células sensoriales de estas sensilias, el NO también actúa como mensajero intracelular.

Una de las células receptoras gustativas más estudiadas en los insectos es el receptor de azúcar de los dípteros. La respuesta a la estimulación con sacarosa del receptor de azúcar de la mosca *Phormia regina* ha sido medida con técnicas electrofisiológicas, tratando a la célula con dadores y captadores de NO (Murata *et al.*, 2004). La respuesta eléctrica de la célula receptora fue mayor en presencia de NO exógeno, indicando que la transducción de las señales gustativas ocurre mediante una cascada iniciada por este gas, que a su vez aumenta la producción de GMPc en la misma célula (Nakamura *et al.*, 2005).

El NO en las células gustativas no siempre media señales excitatorias sino que, en determinadas circunstancias, puede producir la disminución de los potenciales de estas

células. En los receptores de sales de la langosta, el NO disminuye la frecuencia de los potenciales de acción producidos por la estimulación con NaCl (Schuppe *et al.*, 2007). El NO se genera en las células glandulares y su síntesis está determinada por la concentración de NaCl en la hemolinfa. La respuesta al NaCl está modulada por el NO, de modo que se regula la ingesta de sales según los requerimientos del animal.

La importancia del NO en la quimiorrepción de los insectos, y en particular en el procesamiento de las señales olfativas, ha sido confirmada por numerosos trabajos que determinaron la presencia de esta molécula en los neuropilos olfativos. Las técnicas de fluorescencia revelaron la presencia de NO en las neuronas receptoras olfativas, en las neuronas de proyección que conectan a los glomérulos con los cuerpos pedunculados, y en las interneuronas locales de los lóbulos antenales de *M. sexta* (Nighorn *et al.*, 1998; Collmann *et al.*, 2000; Collmann y Nighorn, 2003; Stengl *et al.*, 2001; Collmann *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2007), que constituyen las zonas del cerebro de los insectos en donde ocurre el procesamiento de la información olfativa. La actividad eléctrica de las neuronas estimuladas con moléculas de olor aumenta en presencia de NO, mientras que no hay respuesta a la estimulación en ausencia del gas. Por medio de técnicas de inmunofluorescencia fue posible medir la actividad de la GCs, el principal blanco del NO, en todos los tipos neuronales presentes en los lóbulos antenales de *M. sexta*, demostrando que el gas es producido en las neuronas receptoras y su blanco se encuentra en el neuropilo olfativo (Collmann *et al.*, 2004). Estos resultados son una prueba contundente de que el NO es protagonista de la función olfativa de los insectos, asociado tanto a la GCs como a su producto, el GMPc.

El sistema NO/GMPc en los fenómenos de adaptación sensorial. El sistema nervioso tiene la capacidad de adaptar su organización estructural a situaciones nuevas, que pueden emerger de cambios ambientales o deberse al desarrollo del individuo; esta propiedad se llama *plasticidad neuronal* (Randall *et al.*, 1997). Un ejemplo de plasticidad neuronal es la *adaptación sensorial*, un fenómeno por el cual el sistema sensorial ajusta su sensibilidad a la intensidad de los estímulos (Zufall y Leinders-Zufall, 2000).

La adaptación es una propiedad de todas las células sensoriales (Dolzer *et al.*, 2003). En las neuronas receptoras olfativas de los vertebrados se han identificado al menos tres

tipos de adaptación olfativa, que se diferencian por la duración del efecto, el tiempo de recuperación y sus propiedades farmacológicas. La duración e intensidad del estímulo determina cómo se verá modificada la respuesta de la neurona sometida a la estimulación. De esta manera, cuando un estímulo olfativo es presentado dos veces en un breve lapso, la amplitud de la respuesta eléctrica evocada por la segunda estimulación es notablemente menor que la primera. Este fenómeno se llama adaptación de corta duración (*short-term adaptation*: STA). Esta respuesta aumenta su amplitud a medida que aumenta el tiempo transcurrido entre la presentación de los estímulos sucesivos. La presentación continua de un estímulo de una determinada intensidad produce una disminución gradual de la respuesta eléctrica de la neurona; este es un fenómeno denominado desensibilización. En algunos casos, la presentación breve de un único estímulo intenso puede causar en la neurona un tipo de adaptación persistente, que se conoce como adaptación de larga duración (*long-lasting adaptation*: LLA). Este efecto está mediado por GMPc, cuya producción es disparada por CO en los vertebrados (Zufall y Leinders-Zufall, 1997; 1998). Estos tipos de adaptaciones ocurren también en otros sistemas sensoriales, entre ellos el visual (Sánchez-Vives *et al.*, 2000).

Los tres tipos de adaptación sensorial también fueron identificados en el sistema olfativo de los insectos. Dolzer *et al.* (2003) identificaron la formación de STA y desensibilización en las neuronas receptoras de *M. sexta*, en respuesta al bombical, uno de los componentes mayoritarios de la feromona sexual específica. A nivel electrofisiológico, el fenómeno de adaptación olfativa puede manifestarse como una disminución en la amplitud del potencial receptor en el soma neuronal y/o una disminución en la frecuencia de los potenciales de acción generados en el cono axónico (Randall *et al.*, 1997).

Si bien hasta el momento no están totalmente dilucidados los caminos de transducción que subyacen a los fenómenos de adaptación sensorial, muchos estudios identifican al GMPc como una molécula fundamental en estos procesos. La concentración de GMPc aumenta en las neuronas olfativas de los vertebrados ante la presentación repetitiva de un estímulo de mediana intensidad (Zufall y Leinders-Zufall, 2000). Este aumento ha sido relacionado con la formación de LLA, porque es lento y sostenido en el tiempo. En los lepidópteros, la presentación repetitiva de la feromona sexual específica produjo el aumento de GMPc en las neuronas receptoras olfativas

(Ziegelberger *et al.*, 1990; Boekhoff *et al.*, 1993). Del mismo modo, la administración de dibutilil GMPc (db-GMPc), un análogo del GMPc, a las neuronas de *B. mori* produjo una disminución en el potencial receptor generado por la estimulación con feromonas (Redkozubov, 2000).

El fenómeno de adaptación olfativa no sólo ocurre como consecuencia de la exposición a estímulos repetitivos o a estímulos prolongados de gran intensidad; también puede ser producto de procesos de regulación endógena que modulan la sensibilidad de la neurona receptora a un determinado olor, por ejemplo feromonas en un contexto circadiano (Flecke *et al.*, 2006). Se ha observado que la respuesta de los machos de *M. sexta* a la feromona sexual emitida por las hembras de la misma especie varía a lo largo del día. La sensibilidad a estos compuestos es mayor al final de la noche y es menor en horas del mediodía, durante la fase de reposo de estos insectos. Estos autores determinaron que en la fase de reposo se produce un aumento en la concentración de GMPc, que probablemente regula la dependencia temporal de la sensibilidad a la feromona que presentan estas neuronas.

Comportamiento, aprendizaje y memoria. Función del NO. Una de las funciones más interesantes del NO en el sistema nervioso de los vertebrados y de los insectos es su participación en los procesos de aprendizaje y formación de la memoria (Bicker, 1998). La abeja *A. mellifera* es uno de los modelos más usados para el estudio de estos fenómenos.

La formación de la memoria tiene una progresión común tanto en los vertebrados como en los invertebrados: inicialmente se obtiene una memoria lábil y transitoria que luego procede a formas más estables y duraderas (Müller, 1996).

La estimulación de las antenas utilizando una clave olfativa genera en las abejas el reflejo de extensión de la proboscis. Este reflejo se utiliza en el estudio de aprendizajes asociativos, ya que se puede obtener condicionamiento clásico apareando el estímulo olfativo con la aplicación de una gota de solución azucarada como refuerzo (Müller, 1997). Se ha observado que el número de veces que se presentan los estímulos condicionados induce la formación de diferentes tipos de memoria. De esta manera, una única presentación de los estímulos genera una memoria de mediano plazo, que dura algunas horas, mientras que presentaciones múltiples de los estímulos generan la

formación de memoria de largo plazo. Diferentes mecanismos moleculares y bioquímicos subyacen a la formación de cada tipo de memoria. En el caso de la memoria de largo plazo, su formación en el cerebro del animal entrenado requiere cambios permanentes, como la síntesis de proteínas. A nivel sináptico ocurre un refuerzo de la transmisión eléctrica entre neuronas, un fenómeno denominado potenciación de larga duración (*long-term potentiation*: LTP).

Además del procesamiento de la información olfativa en general, el NO participa en los procesos de aprendizaje asociativo olfativo (Müller, 1997). Esta hipótesis está sostenida por la observación de la expresión de la NOS en zonas del cerebro de la abeja vinculadas con este tipo de aprendizaje, como los lóbulos antenales y los cuerpos pedunculados. Además, al aplicar inhibidores de la NOS se observó una reducción en la formación de la memoria de largo plazo durante experimentos de condicionamiento clásico en abejas. La inhibición enzimática no afectó la expresión del reflejo condicionado ni la memoria de corto plazo (Müller, 1996).

El NO está presente en la regulación de las formas de aprendizaje no asociativo. Una de estas formas, la habituación, consiste en la disminución progresiva de la respuesta a un determinado estímulo ante su presentación repetitiva. El animal responde inicialmente a un estímulo, pero si éste aparece en forma reiterativa y no es nocivo ni recompensado, la respuesta disminuye. En las abejas, la presentación de un estímulo olfativo a una de las antenas produce habituación, que se expresa como la disminución progresiva del reflejo de extensión de la proboscis. La inhibición de la NOS en los lóbulos antenales de la abeja interfirió en la habituación pero no afectó la respuesta al estímulo individual (Müller, 1997). Al inhibir la GCs de los lóbulos antenales se obtuvieron resultados idénticos, que sugieren que el NO participa en los procesos de integración neuronal que llevan a la habituación, activando la GCs. Ante la aplicación de estímulos repetitivos, se observó un aumento lento de la actividad de la proteína quinasa A en los lóbulos antenales, que estaría inducido por el sistema NO/GMPc (Müller y Hildebrandt, 2002).

El NO compone también la maquinaria neuronal que está en la base de otros comportamientos de los insectos. Las moscas del género *Drosophila* exploran eficientemente el ambiente con el fin de evaluar sus propiedades y colonizar un lugar adecuado para oviponer y alimentarse (Tinette *et al.*, 2007). Este es un comportamiento

complejo que requiere la integración de múltiples señales provenientes del ambiente (visuales, olfativas, auditivas). Mutantes de *Drosophila* que carecen de la GCs mostraron una ineficiencia en la exploración y colonización de nuevos ambientes, probablemente debida a la incapacidad de integración neuronal causada por la ausencia de la enzima.

En los invertebrados, varios comportamientos basados en movimientos rítmicos o cíclicos como la oviposición (movimientos rítmicos de las valvas del ovipositor), el vuelo o la alimentación (movimientos rítmicos de las piezas bucales) son generados por patrones neuronales flexibles del sistema nervioso central, llamados generadores de patrones centrales (*central pattern generators*: CPGs). La generación de estos patrones está modulada en la mayoría de los casos por el NO.

Las hembras de la langosta *Schistocerca gregaria* entierran sus huevos en el sustrato introduciendo la parte final del abdomen en el terreno por medio de movimientos rítmicos de las valvas del ovipositor. Estos movimientos rítmicos están controlados a nivel central por un CPG en el ganglio abdominal. Las características físico-químicas del sustrato modulan el ritmo de oviposición; la presencia de NaCl por ejemplo, disminuye la frecuencia y puede llegar a interrumpir el ritmo de excavación. Las langostas detectan las sustancias del suelo por medio de quimiorreceptores de contacto ubicados en el ovipositor. Trabajos recientes muestran que la perfusión de dadores de NO en un preparado de ganglio abdominal de langosta aumenta la frecuencia del ritmo de excavación del ovipositor (Newland y Yates, 2007). Esta frecuencia está modulada por el NO al estimular el ovipositor con diferentes sustancias químicas que pueden estar presentes en el sustrato y que afectan el ritmo de excavación en condiciones naturales (Newland y Yates, 2008).

El canto de los acrididos es otro comportamiento que está regulado por un CPG en el sistema nervioso central. Cada especie de este grupo produce un patrón particular de canto, cuyos sonidos son generados con movimientos rítmicos del tercer par de patas. Estos movimientos están regulados a nivel central por un CPG originado en el complejo central, un neuropilo situado en el protocerebro. Allí ocurre la integración de varios tipos de información provenientes del ambiente, que determinan la conveniencia de producir o no el canto. Wenzel *et al.* (2005) observaron que la aplicación de nitroprusiato sódico (un dador de NO) a las neuronas del complejo central impide la

estrídulación. Estos autores comprobaron que el NO ejerce su acción activando la GCs, un mecanismo que estaría desencadenado por señales sensoriales que indicarían una situación desfavorable para la producción del canto.

Estos ejemplos evidencian la diversidad de zonas y funciones que el sistema NO/GMPc presenta en el sistema nervioso de los insectos.

1.5. *Rhodnius prolixus*, el modelo experimental

La especie *R. prolixus* pertenece al orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Son insectos hemimetábolos, cuyo ciclo de vida está compuesto por cinco estadios ninfales, morfológicamente muy similares a los adultos, con los que comparten el nicho ecológico y los hábitos alimentarios (Lehane, 1991) (Figura 1.3). Como todas las especies de la subfamilia Triatominae, *R. prolixus* es hematófaga obligada y se alimenta exclusivamente de la sangre de los vertebrados, preferentemente mamíferos, en todos los estadios de su desarrollo. Luego de la alimentación, por medio de sus heces, estos insectos pueden transmitir a su hospedador el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la enfermedad de Chagas (Chagas, 1909).

R. prolixus no se encuentra en la Argentina, pero está ampliamente distribuida en América Central y en el norte de Sudamérica (Schofield, 1994). En el ambiente natural se la encuentra principalmente en las palmeras, en donde vive asociada a los nidos de las aves de las cuales se alimenta. Tiene también una relación estrecha con los ambientes antrópicos, ya que coloniza viviendas precarias en las cercanías de su hábitat natural, y se alimenta de la sangre del hombre y de sus animales domésticos. Por esta razón, *R. prolixus* representa un grave problema sanitario en Colombia, Venezuela y los países centroamericanos donde es el principal vector de la enfermedad de Chagas.

Además de su importancia sanitaria, *R. prolixus* ha sido un modelo en el estudio de la fisiología de insectos desde principios del siglo XX. El eminente entomólogo y fisiólogo inglés Vincent B. Wigglesworth (1899-1994) realizó importantes descubrimientos estudiando a *R. prolixus*. Sus investigaciones abarcaron muchos campos de la morfología y la fisiología de los insectos, incluyendo aspectos sobre la regulación hormonal, la función de las células del sistema inmunológico, la eclosión de

los huevos y el funcionamiento del sistema sensorial. Su libro *The principles of insect physiology* (1939) es un referente para el estudio de la fisiología de los insectos.



Figura 1.3: *Rhodnius prolixus*, el modelo experimental, en todos los estadios de su desarrollo. Arriba, de izquierda a derecha: ninfas del primero al quinto estadio; abajo, de izquierda a derecha, hembra adulta y macho adulto.

1.6. Objetivos

Objetivo general.

- Obtener evidencias que apoyen o contradigan la hipótesis de que el sistema NO/GMPc participa en el comportamiento de *R. prolixus* en respuestas a estímulos olfativos.

Objetivos específicos.

- Cuantificar la repelencia de la DEET en ninfas del quinto estadio de *R. prolixus*, usando un analizador de imágenes;

- Determinar si la aplicación de SNAC, sustancia dadora de NO, en las antenas de las ninfas modifica la respuesta a la DEET;
- Determinar si la aplicación de db-GMPc, un análogo de GMPc, en las antenas de las ninfas modifica la respuesta a la DEET;
- Determinar si la exposición de las ninfas a una alta concentración de DEET produce un fenómeno de adaptación sensorial que disminuye la respuesta al repelente;
- Determinar si la exposición a vapores de DEET modifica la actividad locomotora de las ninfas y, en caso de que la modifique, establecer si esta respuesta se altera después de la aplicación de SNAC;
- Determinar si la aplicación de SNAC en las antenas o en la proboscis de las ninfas afecta la localización de una fuente viva de alimento (paloma) y/o la ingesta;
- Determinar si la aplicación de db-GMPc en las antenas o en la proboscis de las ninfas afecta la orientación hacia una fuente viva de alimento (paloma) y/o la ingesta;
- Determinar si la aplicación de SNAC o GMPc en las antenas de las ninfas afecta la orientación hacia fuentes artificiales de estímulos habitualmente emitidos por el hospedador (CO₂; 37° C);
- Determinar la presencia de actividad NOS en las antenas de *R. prolixus*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material biológico

En los experimentos se usaron ninfas del quinto estadio de *R. prolixus* provenientes de una cepa criada en nuestro laboratorio desde 1975, mantenidos en cámaras con temperatura y fotoperíodo controlados (28°C, 12:12 L:O). Los insectos estuvieron ayunados desde la muda por períodos variables según los requerimientos de cada ensayo. En general, para los ensayos de repelencia se usaron ninfas de 15-20 días (edad establecida en ensayos preliminares) y en los experimentos de alimentación y atracción a claves asociadas con el hospedador se usaron ninfas de 30-45 días. Durante los períodos de ayuno las ninfas fueron mantenidas en las mismas condiciones que las de cría.

2.2. Compuestos químicos

Se utilizó N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) 97% (Aldrich, Milwaukee, WI, USA), acetona (Merck, Darmstadt, Alemania) y dibutiril-GMPc (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA).

Para administrar el óxido nítrico (NO) se utilizó la S-nitroso-N-aceticisteína (SNAC), un dador de NO. La SNAC fue sintetizada por nitrosilación de N-acetil-L-cisteína catalizada en medio ácido, según el protocolo de Mathews y Kerr (1993). Se colocaron 32,6 mg de N-acetil-L-cisteína en un vial de 4 ml y 250 μ l de agua destilada (Solución A). En otro vial de 4 ml se colocaron 46 mg de NaNO₃ y se agregaron 500 μ l de una solución 0,1% de EDTA (Solución B). Luego se tomaron 150 μ l de la Solución B y se agregaron gota a gota a la Solución A. Estos compuestos reaccionan inmediatamente y por lo tanto se observa en seguida la formación de una solución de color rojo. A esta solución se le agregó HCl 1N hasta obtener un pH = 2 y se la dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Entonces se la neutralizó con NaOH 0,5 N, y luego se la llevó a un volumen final de 5 ml con acetona fría, obteniéndose una concentración final de 40 mM.

Las soluciones de SNAC se prepararon diariamente y fueron mantenidas a -15° C y al abrigo de la luz hasta el momento de su uso. Con este método de síntesis se obtiene S-nitroso-N-acetilcisteína con un 99% de pureza. La concentración exacta y la estabilidad de la SNAC se determinaron por medio de mediciones espectrofotométricas a 330 nm (Shimadzu UV-160), basadas en el coeficiente de extinción molar de 727 (Mathews y Kerr, 1993).

Se preparó una solución stock de SNAC según el protocolo descripto más arriba. Se fraccionó la solución madre en mitades. A una mitad se le agregó agua destilada hasta un volumen final de 5 ml. A la otra mitad se le agregó acetona hasta alcanzar el mismo volumen. Estas soluciones fueron fraccionadas en tres alícuotas, cada una de las cuales fue conservada a una temperatura distinta (-15°, 4° y 40° C). Para determinar la estabilidad del compuesto, se midió diariamente la concentración de cada alícuota en el espectrofotómetro y se calculó qué porcentaje de la concentración inicial se conservaba cada día.

2.3. Bioensayos: Repelencia

Los siguientes experimentos se realizaron para establecer una posible participación del sistema NO/GMPc en la percepción del repelente DEET. La arena experimental

estaba compuesta por papeles de filtro circulares de 11 cm de diámetro (Whatman Nro 1). Los papeles de filtro fueron cortados en mitades (Zona I y Zona II). La Zona I fue impregnada con 0,35 ml de acetona sola y la Zona II fue tratada con el mismo volumen de solución de DEET en acetona (Figura 2.1). Luego de dejar evaporar el solvente durante 30 min, las mitades fueron unidas por la parte posterior con cinta adhesiva. Sobre el papel de filtro se colocó un aro de vidrio (diámetro: 10 cm; altura: 5 cm), con el objeto de limitar el movimiento de los insectos y evitar que abandonaran el área experimental.



Figura 2.1: impregnación de los papeles de filtro con DEET y exposición de las ninfas.

El papel de filtro con el aro de vidrio quedó ubicado 15 cm por debajo de una cámara de video de circuito cerrado (VC 1910, Sanyo Electrical Co., Tokio, Japón) conectada a un analizador de imágenes Videomex-V (Columbus, OH). La iluminación fue provista por un tubo fluorescente de 15 W (Silvana, Sao Paulo, Brasil), ubicado 20 cm por encima de la cámara de video (Figura 2.2).

El Videomex V cuenta con un monitor en el que puede visualizarse la imagen captada por la cámara de video. La imagen del monitor fue dividida en mitades y el papel de filtro fue colocado en el piso de la arena haciendo coincidir las dos zonas con las mitades en que estaba dividida la imagen.

El Videomex V convierte las imágenes analógicas en digitales con una resolución de 256 x 192 pixels y una velocidad de adquisición y procesamiento de los datos de 30 marcos/seg.

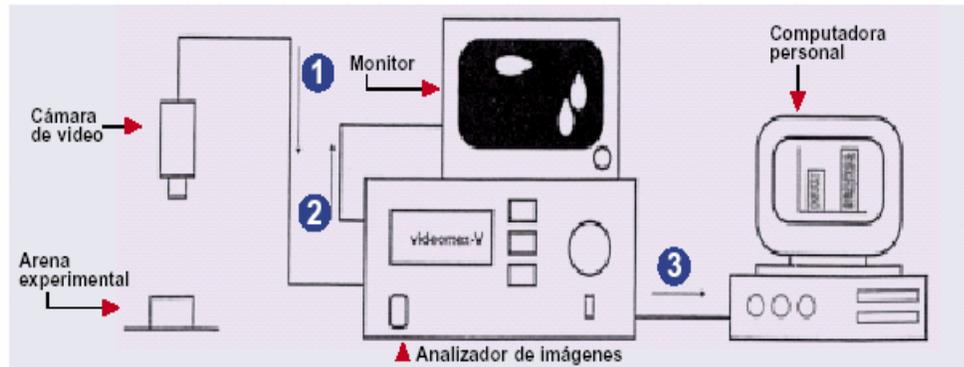


Figura 2.2: dispositivo usado para la medición de la repelencia, la actividad locomotora y la orientación de los insectos.

Trabaja con imágenes en blanco y negro e invierte los tonos (los objetos oscuros aparecen en el monitor representados por píxeles blancos; los objetos claros aparecen como píxeles negros). De esta manera el área ocupada por los insectos es representada en el monitor por píxeles blancos, y el fondo de la arena (papel de filtro) por píxeles negros.

Se utilizaron cuatro ninfas V de *R. prolixus* por tratamiento, ayunadas desde la muda por un período de entre dos y tres semanas y se cuantificó su distribución durante 30 minutos en las Zonas I y II mediante el programa *Multiple Zones Motion Monitor for Videomex V*, que registra el movimiento de múltiples objetos en múltiples zonas. La preferencia por permanecer en la Zona I, tratada con acetona sola, indicaría la manifestación de un efecto repelente de la DEET. Este efecto se cuantificó por medio de Coeficientes de Repelencia $(CR) = A(I) - A(II) / A(I) + A(II)$, donde $A(I)$ es el área ocupada por los insectos en la Zona I, y $A(II)$ el área ocupada en la Zona II. Cuando el CR asume valores cercanos a 0, indica que los insectos se distribuyen homogéneamente

en ambas zonas durante el tiempo de exposición al tratamiento, y por consiguiente, la ausencia de efecto de la sustancia testada. Los CR pueden variar entre -1 (atracción total) y 1 (repelencia total).

Se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

Experimento 1: se evaluó la repelencia producida por diferentes concentraciones de DEET: 70, 700, 1750 ó 3500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Se realizaron tres réplicas independientes (N = 36). Los resultados de este experimento permitieron establecer la concentración de DEET que se usaría en los siguientes experimentos.

Experimento 2: antes de exponerlas a la DEET, las ninfas fueron tratadas con SNAC. La SNAC disuelta en acetona fue aplicada en forma tópica en las antenas, utilizando una microjeringa equipada con pulsador (Hamilton Company, NV) (Figura 2.3). Se aplicó 1 μl de solución sobre cada antena y se usaron dos concentraciones de SNAC: 1,5 ó 15 $\mu\text{g}/\text{insecto}$. Un grupo de insectos fue tratado con el mismo volumen de acetona sola como control. Inmediatamente después de estos tratamientos, las ninfas fueron expuestas a la DEET. Se realizaron tres réplicas independientes (N = 36).

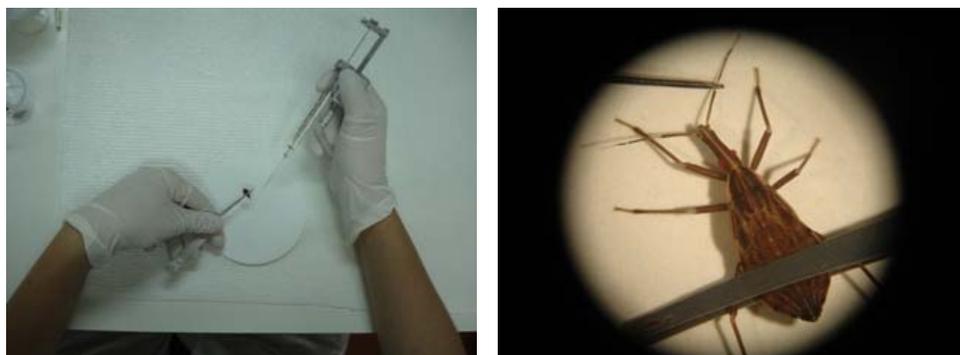


Figura 2.3: Aplicación tópica de las soluciones de SNAC en las antenas de las ninfas.

Experimento 3: las ninfas fueron tratadas con db-GMPc, un análogo del nucleótido GMPc. Soluciones de este compuesto en acetona fueron aplicadas en las antenas de las ninfas de la misma forma que en el experimento 2. Se utilizaron dos concentraciones de db-GMPc: 1 ó 2 $\mu\text{g}/\text{insecto}$. Se realizaron tres réplicas independientes (N = 36).

Experimento 4: las ninfas fueron expuestas a tres concentraciones de DEET en acetona (70, 700 ó 1750 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) durante 20 minutos sin recibir ningún tratamiento previo. Se calcularon dos CR, uno para el período 0-10 minutos y otro para el período 10-20 minutos. Se realizaron cinco réplicas independientes (N = 80).

2.4. Bioensayos: Actividad locomotora

En esta serie experimental se trató de establecer si la DEET modifica la actividad locomotora de los insectos y si el NO participa de alguna manera en el proceso.

Se utilizaron papeles de filtro de 10 cm de diámetro, tratados con acetona sola o con una solución de DEET en acetona. Se dejó evaporar el solvente durante 30 minutos, luego cada papel de filtro fue colocado en el fondo de una placa de Petri de plástico del mismo diámetro. La placa fue cubierta con un trozo de gasa, cuyos bordes fueron sujetados a la cara inferior de la placa con cinta adhesiva doble faz. La placa fue colocada dentro de un aro de vidrio del mismo diámetro, con la finalidad de evitar que los insectos abandonaran la gasa. Este dispositivo fue colocado en la misma arena experimental donde se realizaron los experimentos anteriores.

Se colocaron cuatro ninfas sobre la gasa, de modo que quedaran expuestas a los vapores de DEET sin posibilidad de entrar en contacto con el repelente. Finalmente se cuantificó el movimiento de los insectos durante 60 minutos. Para esto se utilizó el programa *Multiple Zone Motion Monitor for Videomex V*, con el que se registró la cantidad de pixeles que pasaban del estado “encendido” (blanco) al “apagado” (negro) y viceversa durante el período experimental. De esta manera, el área ocupada por cada insecto estaba representada en la imagen digital por una cierta cantidad de pixeles “encendidos”. Cuando el insecto se movía, esos pixeles pasaban de inmediato al estado “apagado”, mientras que otros pixeles pasaban al estado “encendido” en la nueva posición ocupada por el insecto. La cantidad de pixeles que sufrieron un cambio de estado durante el experimento es una medida indirecta del movimiento de los insectos.

La cantidad de movimiento (M) expresada en unidades de pixeles, estaba representada por la cantidad de pixeles que cambiaron de estado durante el tiempo que duró el ensayo. El área ocupada por los insectos estaba representada por los pixeles

encendidos. Con estos datos se calculó la actividad locomotora como $(AL) = M/A$, definida por Alzogaray *et al.* (2001). De esta manera se relativizó la cantidad de movimiento al área ocupada por los insectos, ya que el área varía según el tamaño de los individuos y según la posición que estos adopten respecto de la superficie sobre la cual se desplazan (por ejemplo, están paralelos a la superficie al estar en reposo, pero forman un ángulo agudo con el piso cuando se desplazan).

Experimento 1: Se evaluó la actividad locomotora de ninfas expuestas a distintas concentraciones de DEET: 70, 350 ó 700 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Se realizaron cuatro réplicas independientes (N = 64).

Experimento 2: Se midió la actividad locomotora de ninfas tratadas con SNAC en las antenas (1,5 ó 15 $\mu\text{g}/\text{insecto}$) y luego expuestas a 350 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de DEET (en el experimento anterior se determinó que esta concentración producía un aumento de la actividad locomotora de las ninfas). Se hicieron tres réplicas independientes (N = 36).

2.5. Bioensayos: Efecto antialimentario

Se separaron ninfas del quinto estadio de *R. prolixus* ayunadas desde la muda por un período mínimo de 30 días. Las ninfas fueron pesadas y agrupadas por rangos de peso (20-30 mg, 30-40 mg y 40-50 mg). Se formaron grupos de cinco insectos dentro de cada rango de peso. Luego cada insecto fue marcado con números de uno al cinco en la parte dorsal del tórax, utilizando pintura acrílica amarilla, con el fin de poder identificarlos individualmente. Las ninfas fueron colocadas en un contenedor de plástico (diámetro: 4 cm; altura: 4 cm) que a su vez fue puesto sobre el muslo de una paloma inmovilizada (Figura 2.4). Los insectos se alimentaron libremente durante 15 minutos. Al finalizar el experimento, se registró nuevamente el peso de cada ninfa y se determinó el número de insectos alimentados y no alimentados por la diferencia de peso antes y después de la ingesta.



Figura 2.4: Exposición de las ninfas a una paloma inmovilizada como oferta de alimento.

Experimento 1: Las ninfas fueron tratadas con diferentes concentraciones de SNAC (0,9; 1,9; 3,8; 7,5 ó 15 $\mu\text{g}/\text{insecto}$) aplicadas en forma tópica en las antenas; cada insecto recibió 1 μl /antena de cada solución o de acetona sola en el caso de los controles. El efecto antialimentario fue dosis-dependiente. Se construyó una curva dosis-respuesta y se calculó la Dosis Efectiva 50% para el efecto antialimentario de SNAC. Este parámetro indica la dosis que produce el efecto buscado (en este caso el antialimentario) en el 50% de la población tratada. El cálculo de este parámetro se realizó utilizando el Polo Plus 2.0 (LeOra Software, 2002-2008), basado en el método probit. Se realizaron seis réplicas independientes (N = 180).

Experimento 2: Los insectos recibieron diferentes concentraciones de db-GMPc en forma tópica en las antenas. Se aplicó 1 μl de solución en cada antena y se usaron dos concentraciones: 1 ó 2 $\mu\text{g}/\text{insecto}$ de db-GMPc o acetona sola en el caso de los controles. Se realizaron tres réplicas independientes (N = 45).

Experimento 3: Para determinar la duración del efecto de la SNAC, se midió el efecto antialimentario con grupos de ninfas topicadas con 15 $\mu\text{g}/\text{insecto}$ de SNAC inmediatamente y 30 minutos antes de ser colocadas sobre la paloma. Se realizaron cuatro réplicas independientes (N = 60).

Experimento 4: Dos concentraciones de SNAC (1,5 $\mu\text{g}/\text{insecto}$ ó 15 $\mu\text{g}/\text{insecto}$) fueron aplicadas sobre la proboscis para estudiar un posible efecto del NO en los quimiorreceptores presentes en esta zona. Se realizaron tres réplicas independientes (N=60).

2.6. Bioensayos: Orientación sobre una paloma viva

Esta serie experimental tuvo como objeto determinar un posible aumento de la actividad locomotora de los insectos tratados con SNAC al estar expuestos a una paloma viva. Para ello se dispuso de una arena experimental compuesta por una caja de acrílico de 20 cm de alto con una base cuadrada de 30 cm de lado. La cara superior de la caja tiene adosada un contenedor circular de acrílico de 23 cm de diámetro por 7 cm de alto, con un orificio central de 3 cm de diámetro. El piso del contenedor estaba cubierto con papel de filtro (Figura 2.5).

Dentro de la caja se colocó un críquet de laboratorio sobre el cual se ubicó una paloma inmovilizada. Al subir el críquet el muslo de la paloma previamente privado de las plumas, quedaba expuesto por el orificio central del contenedor, por debajo de un trozo de gasa que lo cubría. Los insectos podían picar a la paloma a través de la gasa.



Figura 2.5: dispositivo usado para determinar la orientación y la actividad locomotora de las ninfas sobre una paloma viva.

Grupos de 10 ninfas V de *R. prolixus* ayunadas desde la muda por un período mínimo de 30 días, fueron tratadas con 1,5 ó 15 μg /insecto de SNAC en forma tópica en las antenas. Las ninfas fueron luego colocadas en la arena, en donde se aclimataron durante 5 minutos. Al cabo de ese tiempo se midió la actividad locomotora y el número de visitas al área central durante 15 minutos, utilizando el dispositivo de video y

analizador de imágenes descrito en el apartado 3 de esta sección. Se realizaron cuatro réplicas independientes (N=120).

2.7. Bioensayos: Orientación hacia claves térmicas y químicas

Para estudiar el efecto del NO sobre la capacidad de orientación de los insectos hacia una fuente emisora de calor o una fuente emisora de CO₂, se usaron ninfas del quinto estadio de *R. prolixus* ayunadas desde la muda por un período mínimo de 30 días.

La arena experimental consistía en un contenedor plástico circular de 20 cm de diámetro y 4 cm de alto colocado 15 cm por debajo de una cámara de video. El piso del contenedor estaba cubierto con un papel de filtro. A ambos se les realizó un agujero en el centro de 2 cm de diámetro, donde se colocaron posteriormente las fuentes emisoras de los estímulos y se determinó un área central (Figura 2.6).



Figura 2.6: Arena experimental con la fuente emisora de calor en el centro.

Los insectos se colocaron en la arena experimental y se los dejó aclimatar durante 5 minutos. Al cabo de ese tiempo, se colocó la fuente emisora del estímulo correspondiente en el centro de la arena y se contabilizó el número de visitas al área

central durante 15 minutos en forma visual, observando en el monitor la imagen de los insectos captada por la cámara.

Experimento 1: Grupos de 10 ninfas fueron tratados con 1,5 y 15 μg /insecto de SNAC. Cada insecto recibió 1 μl de solución de SNAC en cada antena o acetona sola en el caso de los controles. Se contabilizó el número de visitas de los insectos hacia una fuente térmica durante 15 minutos. La fuente térmica estaba constituida por una resistencia eléctrica cilíndrica de cobre de 10 cm de largo y 2 cm de diámetro. La resistencia estaba conectada a un regulador de corriente y a un termostato, calibrados para que la temperatura de la resistencia se mantuviera en $37 \pm 1^\circ \text{C}$. Se realizaron cuatro réplicas independientes ($N = 120$).

Experimento 2: Grupos de 10 ninfas fueron tratadas con SNAC (1,5 ó 15 μg /insecto) de igual manera que en el experimento anterior. Se contabilizó el número de visitas al área central hacia una fuente emisora de CO_2 durante 15 minutos. La emisión de CO_2 se logró a partir de 30 mg de Na_2HCO_3 contenidos en la tapa de un vial de 2 cm de diámetro colocada en el centro de la arena. El agregado de 50 μl de H_2SO_4 50% v/v sobre el Na_2HCO_3 produjo la liberación del CO_2 . Se realizaron ocho réplicas independientes ($N = 240$).

2.8. Medición de la actividad óxido nítrico sintasa (NOS)

La detección de la actividad NOS en *R. prolixus* se realizó utilizando un kit comercial para la medición de esta enzima (Nitric oxide synthase detection system, Sigma, Missouri, USA). Este sistema utiliza el compuesto diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA), que al ser hidrolizado por esterasas en el interior celular produce diaminofluoresceína (DAF-2); este compuesto finalmente se une al NO generado por la NOS, formando un producto fluorescente (Kojima et al., 1998). La fluorescencia se midió en un fluorómetro de microplacas (Packard FluoroCount, Packard Instrument Company, Meriden, USA).

La actividad NOS fue medida en las antenas o en la cabeza de ninfas del quinto estadio de *R. prolixus*. Las cabezas de los insectos vivos fueron disecadas utilizando tijeras de entomología; se colocó una sola cabeza por pocillo junto con los reactivos.

Las antenas de las ninfas vivas fueron cortadas desde la base con tijeras de entomología. Grupos de antenas enteras (2, 10 ó 20) fueron colocados en cada pocillo junto con los reactivos. La fluorescencia del producto formado se midió luego de 2 hs de incubación a temperatura ambiente, según las instrucciones del kit.

Además de determinar la actividad NOS en tejidos intactos, se prepararon homogenatos de cabezas o antenas de ninfas del quinto estadio. Se tomaron una ó 10 cabezas, que fueron discadas de los insectos vivos con tijeras entomológicas. Las cabezas fueron colocadas en 100 μ l de buffer fosfato de sodio (pH = 7,2) en donde se machacó el tejido usando un microhomogeneizador de vidrio esmerilado. Se realizó un shot de centrifugación en una ultracentrífuga refrigerada (Eppendorf Centrifuge 5417-R) para decantar la cutícula y otras estructuras grandes que pudieran interferir con la medición. Luego se separó el sobrenadante y se lo conservó en hielo. El homogenato de antenas se realizó de la misma manera, partiendo de 10, 20 ó 100 antenas disecadas de los insectos vivos.

Alicuotas de cada homogenato (20 μ l) fueron sembradas en los pocillos de las microplacas junto con los reactivos. Al cabo de 2 hs de incubación a temperatura ambiente se midió la fluorescencia del producto formado como indicador de la actividad enzimática.

2.9. Análisis estadístico

Para cada CR se calcularon Intervalos de Confianza del 95%. Se consideró que un valor de CR fue significativamente diferente de 0 cuando este valor no estaba contenido en el Intervalo de Confianza correspondiente. Los CR fueron comparados estadísticamente utilizando ANOVA de un factor y la prueba de Tukey de contrastes *a posteriori*.

En los experimentos de exposición a concentraciones crecientes de DEET, en el de DEET + SNAC y en el de exposición a una paloma viva, se calculó un valor de actividad locomotora para cada tratamiento y estos valores fueron analizados estadísticamente usando ANOVA de un factor y la prueba de Tukey de contrastes *a posteriori*.

Para analizar los datos obtenidos al aplicar la SNAC en la proboscis, los datos de la duración del efecto antialimentario de la SNAC y los datos del efecto de la aplicación del db-GMPc en las antenas, fueron transformados utilizando la función arcoseno \sqrt{x} para ajustar los datos a una distribución normal. Posteriormente fueron analizados con ANOVA de un factor.

En los experimentos de orientación, la variable analizada fue el número medio de visitas al área central como un indicador de la atracción hacia la fuente térmica, de CO₂ o hacia la paloma. En cada caso, se calculó el número medio de visitas al área central para cada tratamiento en los 15 minutos de medición y estos datos se compararon con ANOVA de un factor y la prueba de Tukey de contrastes *a posteriori*, cuando correspondía.

3. RESULTADOS

3.1. Estabilidad de la SNAC

La síntesis de la SNAC se realizó por nitrosilación de la acetilcisteína utilizando un método sencillo y conocido, que da un producto de alta pureza fácilmente caracterizable por espectrofotometría a 330 nm (Mathews y Kerr, 1993). Este método permitió realizar la síntesis de la SNAC con suficiente frecuencia como para evitar la incertidumbre de pureza que pudiera causar su descomposición.

La estabilidad de la SNAC fue estudiada a diferentes temperaturas y en distintos solventes para determinar la forma óptima de conservar esta sustancia luego de su síntesis en nuestro laboratorio. El seguimiento de la concentración de la SNAC en diferentes solventes y temperaturas fue posible por la aplicación del coeficiente de extinción molar previamente publicado (Mathews y Kerr, 1993). La Figura 3.1 muestra la variación en la concentración de la SNAC a través del tiempo, a diferentes temperaturas y disuelta en agua destilada (3.1a) o en acetona (3.1b). Se observa que las soluciones de SNAC en acetona son más estables, dado que el decaimiento es más lento que en las soluciones acuosas; además, en las soluciones acetónicas, la concentración de SNAC se redujo a una velocidad similar a las tres temperaturas estudiadas, mientras que, entre las soluciones acuosas, la más estable fue la que estuvo conservada a 4° C.

3.2. Repelencia

En el primer experimento de la serie de repelencia, se evaluó el efecto de distintas concentraciones de DEET en las ninfas de *R. prolixus*. La Figura 3.2 muestra los Coeficientes de Repelencia (CR) de las cuatro concentraciones de DEET estudiadas. Todas las concentraciones produjeron un efecto repelente significativo en los insectos expuestos, ya que los CR son significativamente diferentes de 1 (este valor no está incluido en los intervalos de confianza: IC 95% = -0,147-0,203; 0,433-0,966; 0,341-0,839; 0,589-0,871; 0,421-0,939 para las concentraciones de 0, 70, 700, 1750 y 3500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de DEET respectivamente). El efecto repelente no difirió significativamente entre las concentraciones ($P < 0,05$). En experimentos anteriores se observó que concentraciones menores de 70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ no eran repelentes para las ninfas del quinto estadio de esta especie (resultados no mostrados).

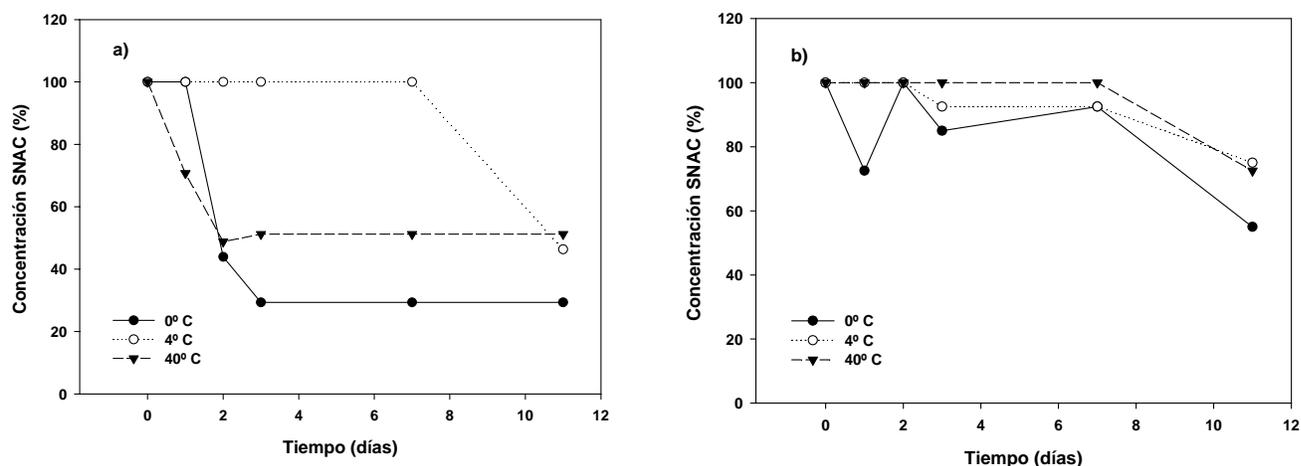


Figura 3.1: variación en la concentración de SNAC a través del tiempo. Las soluciones en agua destilada (a) o en acetona (b) fueron mantenidas a tres temperaturas diferentes. La absorbancia de estas soluciones medida al tiempo 0 (inmediatamente después de la síntesis) representó el 100% de la concentración.

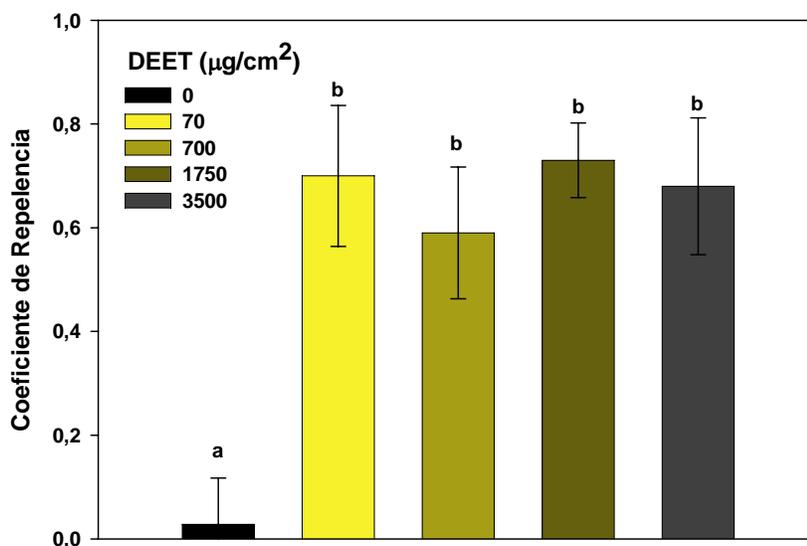


Figura 3.2: Coeficientes de Repelencia (CR) de ninfas de *R. prolixus* no tratadas y expuestas a diferentes concentraciones de DEET. El control con acetona consistió en la exposición de los insectos a una arena experimental con ambas superficies tratadas con acetona sola. Cada CR es un promedio de cinco réplicas independientes. Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas ($P < 0,01$, ANOVA de un factor y prueba de Tukey para diferente n de contrastes *a posteriori*).

Para los experimentos de SNAC y repelencia se utilizó la concentración de 70 µg/cm² de DEET. La Figura 3.3 presenta los CR de las ninfas tratadas con SNAC y luego expuestas a 70 µg/cm² de DEET. El CR correspondiente a la aplicación de 15 µg/insecto de SNAC fue significativamente menor que el valor obtenido para el control; la dosis de 1,5 µg/insecto de SNAC no produjo diferencias significativas en la respuesta al repelente respecto del control ni respecto de la mayor dosis de SNAC ($P > 0,05$ en ambos casos).

Al aplicar db-GMPc en las antenas de *R. prolixus* y luego exponer los insectos a la DEET se obtuvo un resultado similar (Figura 3.4). El CR obtenido para las ninfas tratadas con 2 µg/insecto de db-GMPc fue significativamente menor que el valor obtenido para el control ($P < 0,05$).

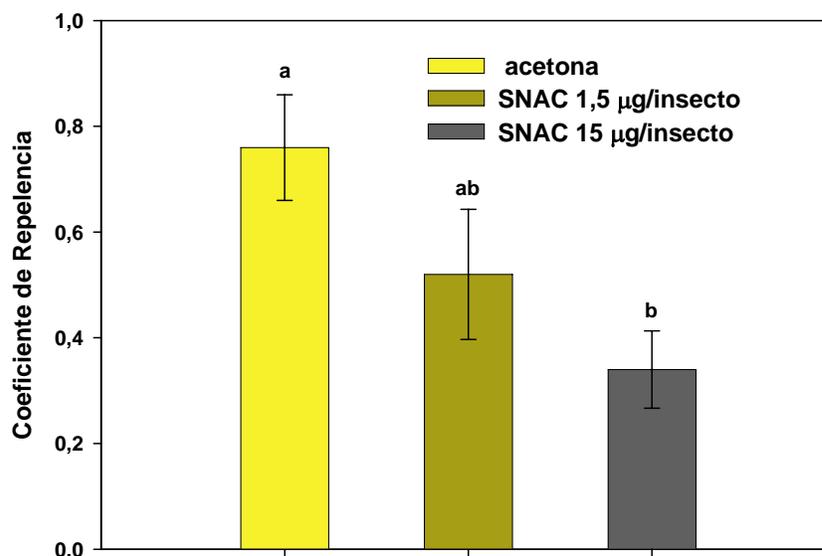


Figura 3.3: Coeficientes de Repelencia obtenidos al exponer a las ninfas de *R. prolixus* tratadas con SNAC a 70 µg/cm² de DEET. Los valores de cada barra son el promedio de tres réplicas independientes. Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los valores ($P < 0,05$, ANOVA de un factor y prueba de Tukey de contrastes *a posteriori*).

La dosis de 1 µg/insecto no produjo diferencias respecto del control ni respecto de la dosis de 2 µg/insecto de db-GMPc ($P > 0,05$ en ambos casos).

Para determinar la posible existencia de un fenómeno de adaptación sensorial, las ninfas de *R. prolixus* fueron expuestas a distintas concentraciones de DEET y se determinaron los CR para cada concentración en dos períodos consecutivos de 10 minutos cada uno (Figura 3.5). El efecto esperado se manifestó en las concentraciones más altas de DEET, en las que hubo una disminución significativa del CR en el segundo período respecto del valor obtenido en el primero ($P < 0,05$). Es interesante observar que este efecto no se manifestó en la concentración de 70 µg/cm², a pesar de que esta concentración produce un efecto repelente (Figura 3.2).

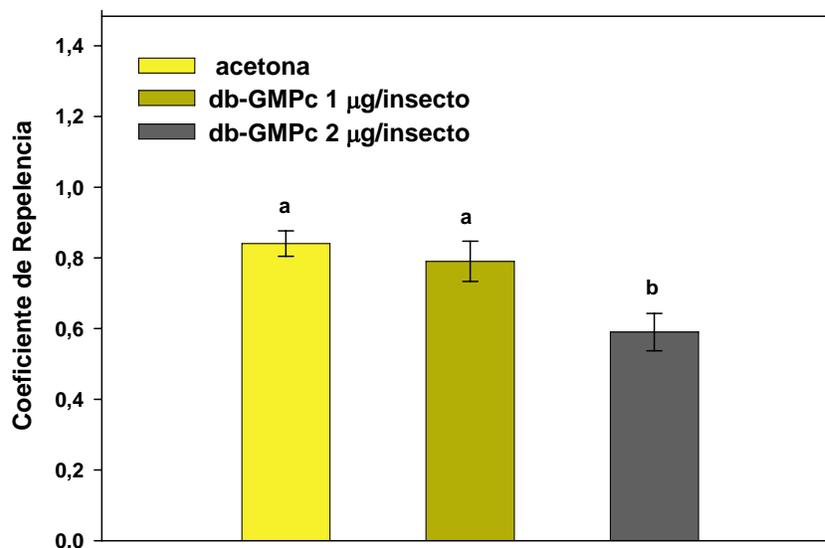


Figura 3.4: Coeficientes de Repelencia obtenidos al exponer a las ninfas de *R. prolixus* tratadas con db-GMPc a 70 µg/cm² de DEET. Los valores de cada barra son el promedio de tres réplicas independientes. Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los valores ($P < 0,05$, ANOVA de un factor y prueba de Tukey de contrastes *a posteriori*).

3.3. Actividad locomotora

Los resultados obtenidos en la serie experimental de la modificación de la actividad locomotora por exposición a DEET están resumidos en las Figuras 3.6 y 3.7. La exposición constante a concentraciones altas de DEET (350 ó 700 µg/cm²) produjo un aumento significativo en la actividad locomotora de las ninfas expuestas ($P < 0,05$) (Figura 3.6).

En un experimento similar, se determinó si el pretratamiento con SNAC en las antenas de *R. prolixus* produce alguna modificación sobre la hiperactividad producida por 350 µg/cm² de DEET. La Figura 3.7 muestra que el tratamiento con SNAC no afectó en forma significativa la hiperactividad producida por la DEET ($P > 0,05$).

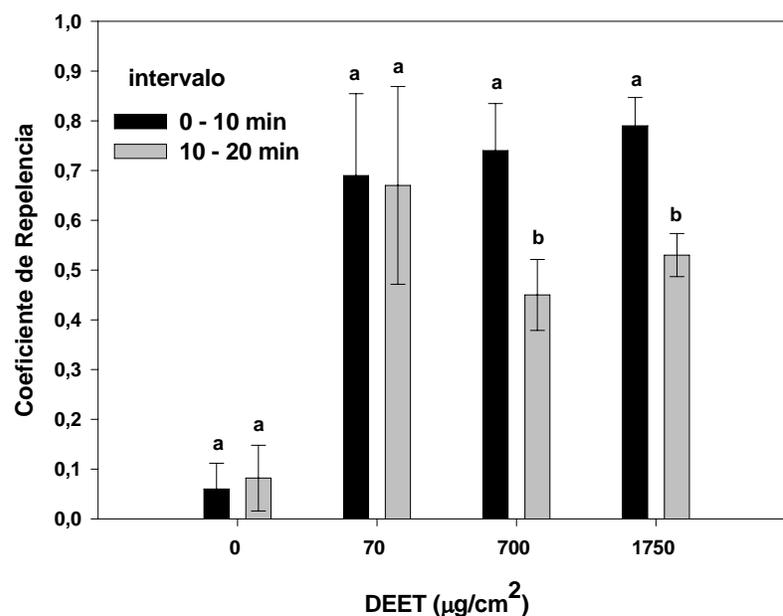


Figura 3.5: Coeficientes de Repelencia de ninfas expuestas a tres concentraciones de DEET obtenidos en dos intervalos consecutivos. Los valores de las barras son el promedio de cinco réplicas independientes. En cada par de barras las letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de CR ($P < 0,05$, prueba t de Student para muestras pareadas).

3.4. Efecto antialimentario

La Figura 3.8 resume los resultados obtenidos en el experimento de alimentación sobre una paloma viva. El tratamiento de los insectos con dosis crecientes de SNAC produjo una disminución de la ingesta de sangre y esta disminución fue dependiente de la dosis. La DE₅₀ fue 5,2 $\mu\text{g}/\text{insecto}$. La Figura 3.9 muestra que la aplicación de 15 $\mu\text{g}/\text{insecto}$ de SNAC en las antenas de *R. prolixus* produjo un efecto antialimentario significativo cuando los insectos fueron expuestos a la paloma inmediatamente luego del tratamiento ($P < 0,05$); sin embargo, 30 minutos luego de la aplicación de SNAC ya no se observó efecto.

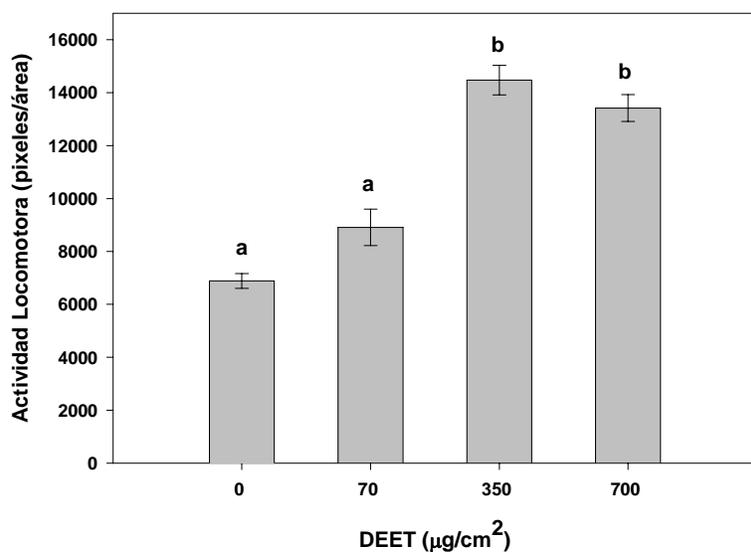


Figura 3.6: Actividad locomotora de ninfas de *R. prolixus* expuestas a vapores de DEET. Los valores de las barras son el promedio de cuatro réplicas independientes. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los valores de actividad locomotora ($P < 0,05$, ANOVA de un factor y prueba de Tukey de contrastes *a posteriori*).

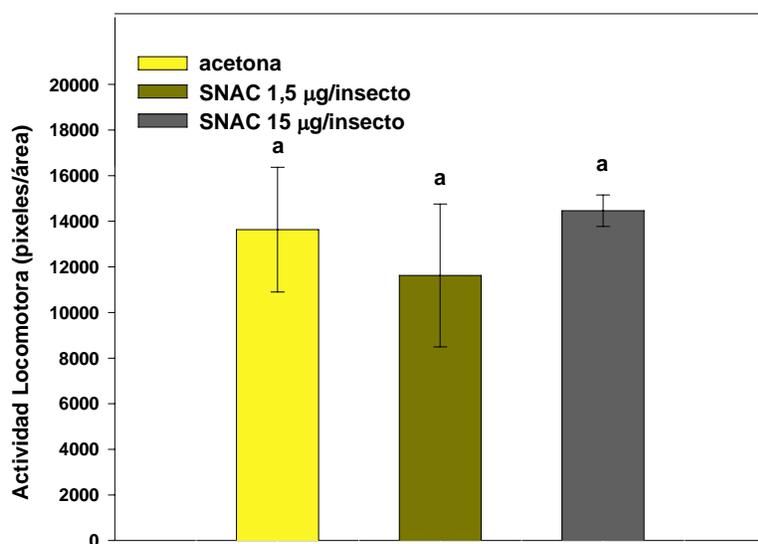


Figura 3.7: Actividad locomotora de ninfas de *R. prolixus* tratadas con dos dosis de SNAC y luego expuestas a los vapores de 350 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de DEET. Los valores de las barras son el promedio de tres réplicas independientes. Las letras sobre las barras indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$, ANOVA de un factor).

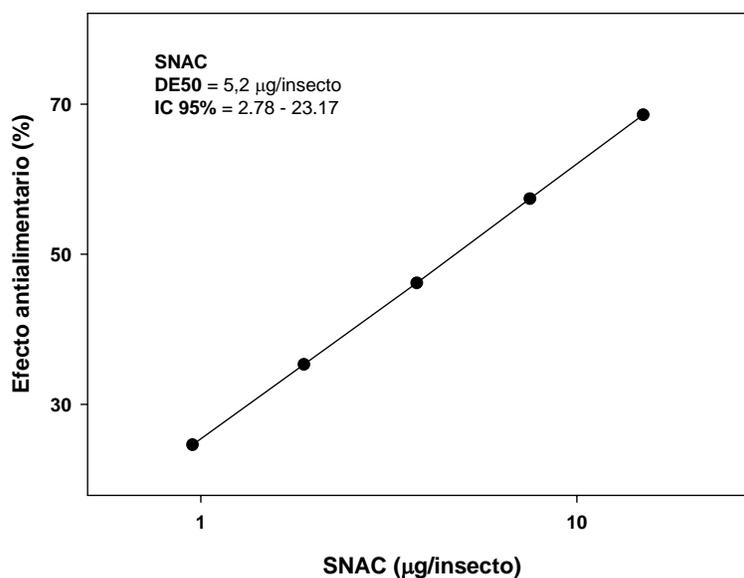


Figura 3.8: Curva dosis-respuesta del efecto antialimentario producido por la aplicación de dosis crecientes de SNAC en las antenas de las ninfas de *R. prolixus*. La curva muestra la dosis-dependencia de este efecto. En el gráfico se muestra también el valor del parámetro DE50 con su intervalo de confianza.

La Figura 3.10 muestra el efecto sobre el comportamiento alimentario de la aplicación tópica de SNAC en la proboscis de las ninfas de *R. prolixus*. La SNAC no modificó en forma significativa el comportamiento de alimentación de los insectos ante una paloma viva ($P > 0,05$).

Para determinar la posible asociación del GMPc con el efecto antialimentario producido por la aplicación de la SNAC, se realizó un experimento de exposición a una paloma viva tratando a las ninfas de *R. prolixus* con db-GMPc en las antenas. El tratamiento con este nucleótido no produjo ningún efecto significativo sobre el comportamiento alimentario de los insectos ($P > 0,05$).

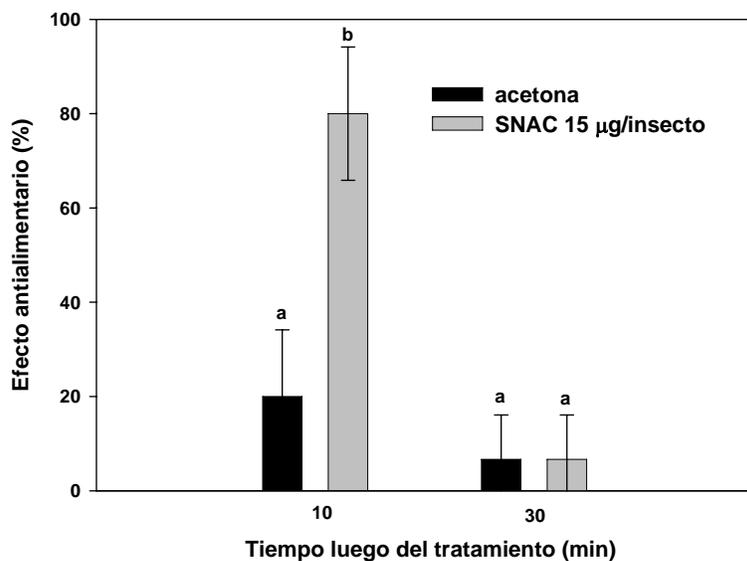


Figura 3.9: Duración del efecto antialimentario de la SNAC. Los valores de las barras son el promedio de tres réplicas independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,05$, ANOVA de un factor).

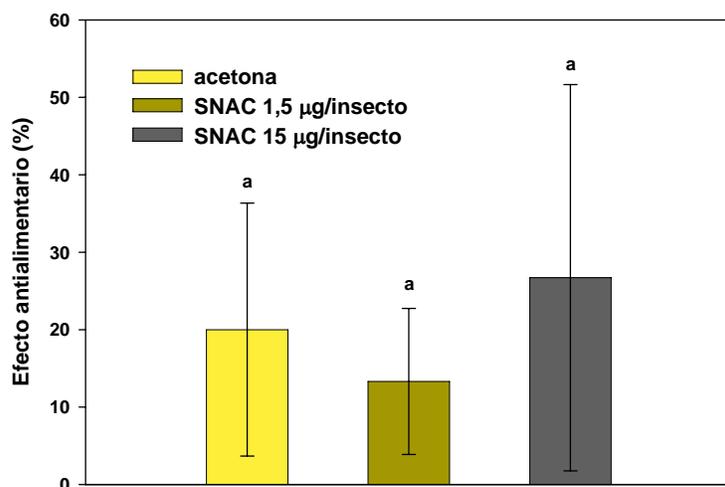


Figura 3.10: Porcentaje de insectos no alimentados, tratados con dos dosis de SNAC en la proboscis. Los valores de las barras son el promedio de tres réplicas independientes. Las letras sobre las barras indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0,05$, ANOVA de un factor).

3.5. Orientación sobre una paloma viva

En el experimento de orientación sobre una paloma viva, la actividad locomotora no se vio afectada en forma significativa por el tratamiento con SNAC ($P > 0,05$) (Figura 3.11). En el caso del número de visitas al área central, los resultados fueron coincidentes con los obtenidos en el experimento de orientación a una fuente de CO₂: el número de visitas de los insectos que recibieron 15 µg/insecto fue significativamente menor que en el grupo control ($P < 0,05$), pero el grupo tratado con 1,5 µg/insecto de SNAC no se diferenció en forma significativa de los otros dos (Figura 3.12).

3.6. Orientación a claves térmicas y químicas

En la Figura 3.13 se observa la respuesta de las ninfas tratadas con SNAC y expuestas a una fuente térmica ubicada en el centro de una arena experimental. En todos los grupos se observó que los insectos eran atraídos al área central alrededor de la fuente térmica inmediatamente después de que la resistencia alcanzaba una temperatura de 32° C.

En el presente experimento no hubo diferencias significativas en el número de visitas al área central de los grupos tratados respecto del grupo control ($P > 0,05$). El tratamiento con SNAC no afectó la percepción del estímulo térmico ni el proceso de orientación hacia él.

La Figura 3.14 muestra la respuesta de las ninfas tratadas con SNAC y expuestas a una fuente de CO₂ ubicada en el centro de la arena experimental. El número de visitas al área central alrededor de la fuente del estímulo del grupo tratado con 15 µg/insecto de SNAC fue significativamente menor que en el control ($P < 0,05$), mientras que la respuesta del grupo tratado con 1,5 µg/insecto no se diferenció en forma significativa de la respuesta de los otros dos grupos ($P > 0,05$).

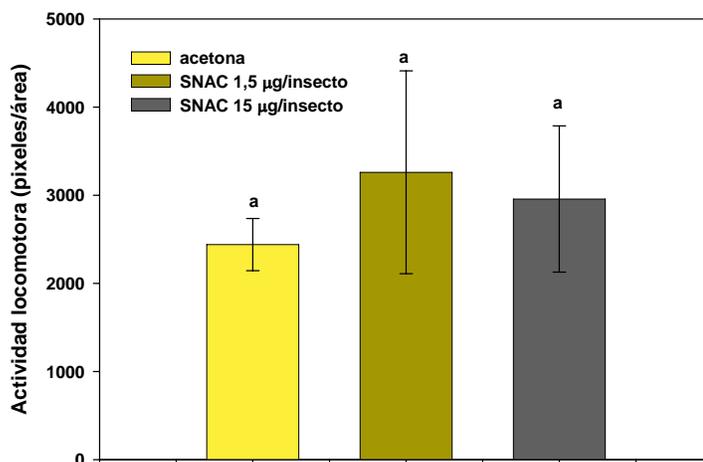


Figura 3.11: Actividad locomotora de ninfas de *R. prolixus* tratadas con SNAC y expuestas a una paloma viva. Las barras son el promedio de cuatro réplicas independientes. Las letras sobre las barras indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0,05$, ANOVA de un factor).

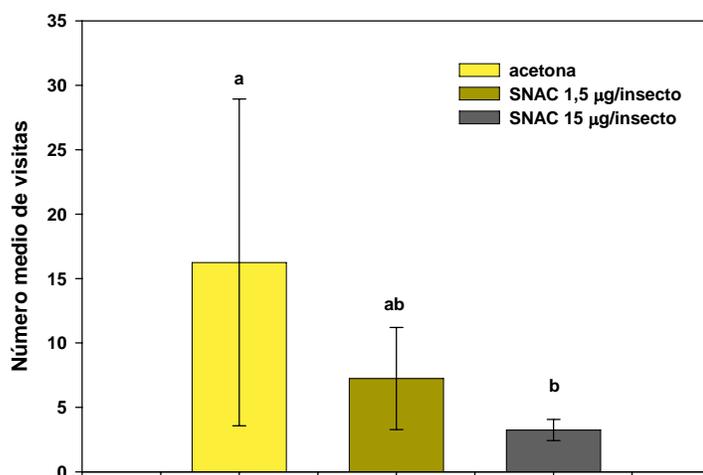


Figura 3.12: Número medio de visitas de ninfas de *R. prolixus* tratadas con SNAC al área central de una arena experimental con una paloma viva como estímulo. Las barras son el promedio de cuatro réplicas independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,05$, ANOVA de un factor y prueba de Tukey de contrastes *a posteriori*).

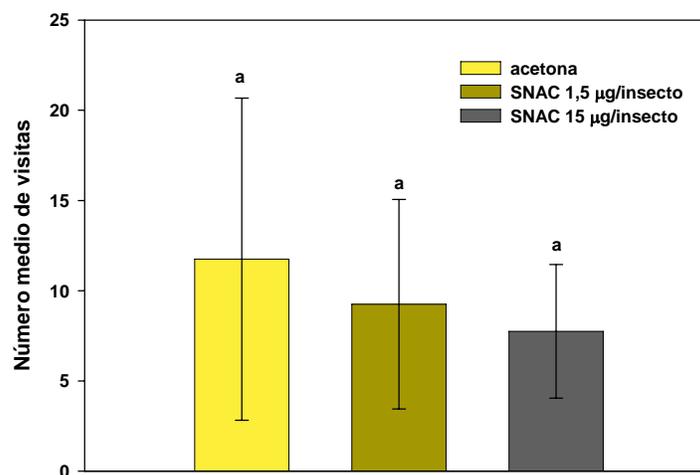


Figura 3.13: Número medio de visitas de ninfas de *R. prolixus* tratadas con SNAC al área central de una arena experimental con una fuente térmica como estímulo. Los valores de las barras son el promedio de cuatro réplicas independientes. Las letras sobre las barras indican que no hay diferencias significativas entre los grupos ($P > 0,05$, ANOVA de un factor).

3.7. Actividad NOS

La Figura 3.15 resume los resultados obtenidos en los experimentos de medición de la actividad NOS en la cabeza de *R. prolixus*. Fue posible medir actividad NOS en una cabeza intacta. El kit usado para la medición sugiere el agregado de β -NADPH para aumentar la actividad NOS. La concentración óptima de este cofactor debe ajustarse a cada sistema biológico, dentro de un rango sugerido en las instrucciones del kit. En nuestro caso, el agregado de 0,5, 1 ó 2 μ M de β -NADPH a los reactivos no produjo diferencias significativas en la actividad NOS de las cabezas de *R. prolixus*. Sin embargo, no se observó actividad al agregar 4 μ M de β -NADPH, la mayor concentración del rango sugerido en el kit.

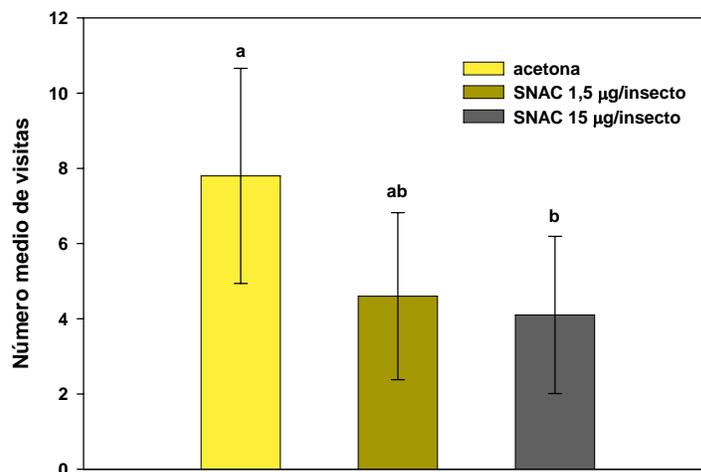


Figura 3.14: Número medio de visitas de ninfas de *R. prolixus* tratadas con SNAC al área central de una arena experimental con una fuente emisora de CO₂ como estímulo. Los valores de las barras son el promedio de ocho réplicas independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ($P < 0,05$, ANOVA de un factor y prueba de Tukey de contrastes *a posteriori*).

Se puso a prueba la efectividad de la técnica para medir actividad NOS en homogenatos de cabezas. La Figura 3.16 muestra estos resultados: se realizaron homogenatos de una y 10 cabezas de ninfas del quinto estadio de *R. prolixus*. La actividad sólo se detectó en el homogenato de 10 cabezas, mientras que una sola cabeza homogeneizada, a diferencia de las cabezas intactas, no fue suficiente para medir la actividad de esta enzima.

Esta técnica fue aplicada para medir la actividad NOS en las antenas de *R. prolixus*, pero no fue posible detectar la actividad de esta enzima en grupos de antenas intactas (dos, 10 ó 20 antenas) ni en homogenatos realizados con dos, 10, 20 ó 100 antenas (datos no mostrados).

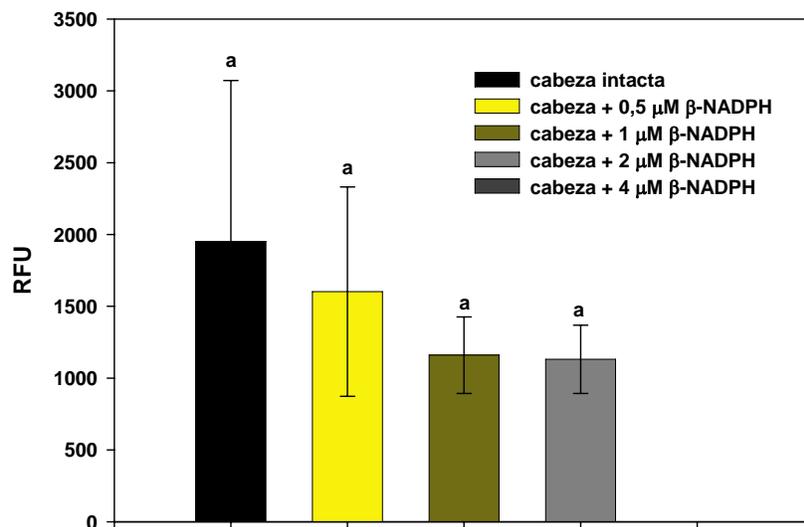


Figura 3.15: Actividad NOS en la cabeza de *R. prolixus*. La medición se realizó en cabezas individuales. Las barras indican la fluorescencia del producto como medida de la actividad enzimática. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los valores de RFU ($P > 0,05$, prueba de Kruskal-Wallis).

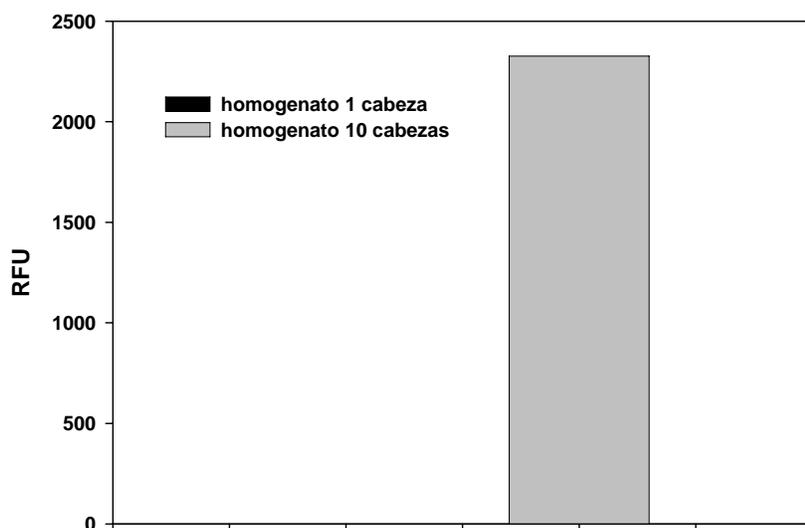


Figura 3.16: Actividad NOS en cabezas de *R. prolixus*. La medición se realizó en homogenatos de una y 10 cabezas. La sensibilidad de la técnica permitió medir la actividad sólo en el homogenato de 10 cabezas.

4. DISCUSIÓN

4.1. Estabilidad de la SNAC

Los dadores de NO son sustancias farmacológicamente activas, que liberan NO y otras especies reactivas de nitrógeno en sistemas biológicos *in vivo* o *in vitro* (Yamamoto y Bing, 2000). Entre ellos, los S-nitrosotioles son un conjunto de compuestos que se obtienen por S-nitrosilación de tioles primarios, secundarios y terciarios (Feelisch, 1998). En el caso de la acetilcisteína, el residuo cisteína es el que sufre la nitrosilación. Estas sustancias también liberan NO entre otras especies reactivas de nitrógeno. Son compuestos de relativamente baja estabilidad, por lo que es necesario mantenerlos al reparo de la luz y a baja temperatura; generalmente, el agregado de quelantes los protege de la acción de los metales y aumenta su estabilidad.

En la presente tesis usamos SNAC como dador de NO. La SNAC es un S-nitrosotiol, que se obtiene por nitrosilación del residuo cisteína de la acetilcisteína (el grupo nitro proviene de la descomposición del NaNO_3 en medio ácido) (Mathews y Kerr, 1993). Esta sustancia fue sintetizada en nuestro laboratorio siguiendo el protocolo publicado por estos autores, que permite obtener un producto de alta pureza. La SNAC fue seleccionada como agente dador de NO por su menor polaridad frente a otros S-nitrosotioles. La acetilcisteína es una molécula menos polar que las de otros compuestos sulfhidrúlicos, como la cisteína y el glutatión, los que luego de la nitrosilación son

corrientemente utilizados como S-nitrosotioles dadores de NO. La menor polaridad de la SNAC comparada con otros S-nitrosotioles dadores de NO es una propiedad deseable para una mejor penetración a través de barreras biológicas, como la cutícula de los insectos.

El protocolo de síntesis utilizado en este trabajo permite obtener SNAC en solución acuosa. Sin embargo, para poder ser aplicado en forma tópica en los insectos, es necesario que el compuesto esté disuelto en un solvente orgánico de polaridad intermedia, que actúe como un vehículo eficaz a través de la cutícula. La acetona cumple con este requisito, pero como no encontramos ninguna referencia sobre la estabilidad de la SNAC en este solvente, debimos estudiarla antes de realizar los experimentos. Realizamos una medición espectrofotométrica del compuesto en acetona y lo comparamos con el coeficiente de extinción molar publicado para la SNAC en solución acuosa. De esta manera comprobamos que el compuesto disuelto en acetona presentaba el mismo pico de absorción que en solución acuosa. Estas mediciones se realizaron diariamente en distintas condiciones de temperatura. Así determinamos que la SNAC se mantiene estable durante al menos 48 hs cuando está disuelta en acetona y conservada a 0° C. Estos datos nos permitieron establecer la frecuencia de síntesis requerida para realizar los experimentos con un producto de adecuada pureza.

4.2. Repelencia

El efecto repelente de la DEET ha sido descrito en un gran número de especies de insectos. La mayor parte de los estudios se focalizan en la respuesta de los mosquitos y otros insectos hematófagos. El efecto de la DEET en los triatominos ha sido estudiado en nuestro laboratorio en la especie *T. infestans* (Alzogaray *et al.*, 2000; Sfara *et al.*, 2006). En estos trabajos se informó que concentraciones entre 7 y 700 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ resultaron efectivas para repeler a las ninfas de esta especie. En esta tesis mostramos que el mismo rango de concentraciones resultó repelente para las ninfas de *R. prolixus*.

Desde la década del '70 se han realizado muchos avances en el estudio del modo de acción de los repelentes de insectos, y en particular de la DEET. Sin embargo, toda la información disponible hasta el momento no ha permitido construir un modelo

convinciente acerca del modo de acción de esta sustancia. McIver (1981) sugirió un modelo en el cual las moléculas de DEET en la fase vapor llegan a la membrana de las neuronas sensoriales, en donde interactúan con los lípidos de membrana, afectando la respuesta normal de estas neuronas. Barton Browne (1977) consideró que el estudio de ciertos mecanismos implicados en los fenómenos de atracción es un punto importante para comprender de los mecanismos de repelencia. En efecto, algunos autores sugieren que en el mosquito *Ae. aegypti*, la DEET no funciona como un repelente en sí mismo, sino como un inhibidor de la respuesta de atracción al ácido láctico proveniente del hospedador (Dogan *et al.*, 1999). Trabajos recientes muestran resultados contradictorios respecto de esta hipótesis: Ditzen *et al.* (2008) aseguran que la respuesta eléctrica de las neuronas evocada por olores relacionados con la comida en *D. melanogaster* disminuye en presencia de DEET. Estos autores obtuvieron un resultado similar al medir la respuesta eléctrica de las neuronas olfativas del mosquito *Anopheles gambiae*: los potenciales de estas neuronas evocados por olores relacionados con el hospedador disminuían en presencia de DEET. Sin embargo, Syed y Leal (2008) observaron que la liberación de sustancias volátiles, como el ácido láctico o el octenol desde el dispositivo de liberación del estímulo, es menor en presencia de DEET. Lo mismo ocurriría en la piel del hospedador tratada con DEET. Este resultado explicaría la observación de que la respuesta de los mosquitos al ácido láctico en presencia de DEET es menor, no por una disminución de la respuesta en sí, sino porque llega menos estímulo al receptor. Estos autores confirmaron con mediciones electrofisiológicas que hay determinadas neuronas olfativas en el mosquito *Culex quinquefasciatus*, que responden directamente a la DEET. Estos receptores son sensibles también a compuestos de origen natural, como los terpenoides linalol, eucaliptol y tujona, cuyas propiedades repelentes serían beneficiosas para los mosquitos en un contexto ecológico (Pickett *et al.*, 2008).

Estudios comportamentales realizados en nuestro laboratorio coinciden con las evidencias sobre la capacidad repelente intrínseca de la DEET. Los vapores de DEET demostraron ser eficientes para repeler a los triatominos en ausencia de otros estímulos (Alzogaray *et al.*, 2000). El bloqueo de la quimiorrecepción de las ninfas de *T. infestans* por la aplicación del reactivo de sulfhidrilo N-etilmaleimida (NEM), produjo una disminución en la repelencia de los insectos expuestos a la DEET, indicando que el repelente sería percibido por el sentido del olfato.

Del mismo modo, la disminución de la repelencia que observamos en este trabajo al topicar la SNAC en las antenas de las ninfas del quinto estadio de *R. prolixus* coincide con el resultado hallado por Alzogaray *et al.* (2000) y sería una evidencia más a favor de la hipótesis de la percepción olfativa de la DEET.

En los últimos 10 años ha sido descubierto un gran número de funciones del NO en los seres vivos. Como ya se ha comentado en la Introducción, la función del sistema NO/GMPc en el proceso de transducción de las señales olfativas ha sido demostrada en muchas especies de vertebrados. Uno de los primeros trabajos fue realizado en el epitelio olfativo de la rata (Breer *et al.*, 1992). Estos autores midieron el aumento transitorio en la concentración de AMPc y GMPc al estimular el epitelio con olores. En el sistema nervioso central de los insectos, el NO está involucrado en el procesamiento de las señales químicas en los lóbulos antenales y en la transducción de las señales olfativas primarias (Müller, 1997).

El NO activa la síntesis de diferentes nucleótidos cíclicos asociados a cada tipo de respuesta. Se ha encontrado que el IP₃ es el segundo mensajero asociado a la transducción de señales olfativas primarias en neuronas olfativas de insectos, mientras que el GMPc estaría involucrado en los fenómenos de adaptación sensorial. La exposición a concentraciones altas de un estímulo químico causa un aumento retardado y sostenido de los niveles de GMPc, lo que sugiere la participación de esta sustancia en los mecanismos de adaptación sensorial olfativos o químicos en general (Murata *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2005).

Por ejemplo, la aplicación de db-GMPc a las membranas de las neuronas receptoras olfativas del lepidóptero *B. mori* redujo la respuesta eléctrica de estas células a las feromonas sexuales (Redkozubov, 2000). El autor atribuyó esta disminución a la reducción de la corriente elemental receptora que produce el impulso nervioso y subyace la formación de la corriente general del receptor.

Cuando tratamos a las ninfas de *R. prolixus* con 2 µg/insecto db-GMPc, también se produjo una disminución de la repelencia causada por la DEET. Si consideramos a la DEET como un estímulo olfativo, los resultados presentados en este trabajo sugieren que la cascada de señales NO/GMPc produce una disminución en la percepción del repelente y la consiguiente disminución de la respuesta comportamental.

Para explorar la existencia de un fenómeno de adaptación sensorial, expusimos a los insectos a diferentes concentraciones de DEET y medimos la repelencia en dos intervalos consecutivos. La exposición a $70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ produjo una respuesta repelente normal en ambos períodos; sin embargo, al exponer a las ninfas a 700 y $1750 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de DEET, la repelencia en el segundo período fue menor que la observada en el primero. Suponemos que al estar expuestos a concentraciones altas del repelente, los receptores olfativos de las ninfas comienzan a saturarse, manifestando un fenómeno de adaptación sensorial observado por la disminución de la respuesta a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos con las ninfas tratadas con SNAC y db-GMPc coinciden con esta observación, por lo cual nos aventuramos a proponer que el fenómeno de adaptación olfativa en las ninfas de *R. prolixus* expuestas al repelente está mediado por el sistema NO/GMPc. La observación de resultados similares en presencia de otros estímulos olfativos que discutiremos más adelante nos alentó a sostener esta hipótesis.

4.3. Actividad locomotora

La exposición de los insectos a concentraciones crecientes de DEET produjo un aumento significativo en la actividad locomotora. Este efecto fue observado al exponer a los insectos en forma continua a 350 y $700 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de DEET durante 60 minutos. Este aumento de la actividad locomotora podría deberse a la búsqueda de un refugio sin repelente por parte de las ninfas; sin embargo, la hiperactividad no se observó cuando los insectos fueron expuestos a $70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, a pesar de que esta concentración produce un notable efecto repelente. Pickett *et al.* (2008) proponen que la repelencia es un efecto comportamental causado en el sistema nervioso sensorial periférico, que hace que el insecto se aleje de la fuente del repelente. La hiperactividad podría ser una manifestación más de este efecto periférico, que tendría un umbral de concentración de DEET mayor que la repelencia, ya que hay concentraciones que repelen pero no hiperactivan. En el caso de otras sustancias que producen hiperactividad como los piretroides, también se postula que este fenómeno es causado por el efecto de estos compuestos sobre blancos presentes en el sistema nervioso periférico (Ruigt, 1985).

El aumento en la actividad locomotora no fue revertido por el tratamiento previo con SNAC. Este resultado sugiere que el sistema NO/GMPc no estaría involucrado en el mecanismo que genera la hiperactividad.

4.4. Efecto antialimentario

La orientación al hospedador y el comportamiento de alimentación de *R. prolixus* ha sido definido por Wigglesworth y Guillet en su trabajo clásico de 1934 como una “cadena de reflejos” condicionada por su estado fisiológico. El insecto surge de su estado de akinesis por medio de movimientos de las antenas que se producen en respuesta a corrientes de aire y calor que son percibidas por receptores de temperatura y olor presentes en estos órganos. De esta forma es atraído al hospedador (Friend y Smith, 1977). Una vez que lo alcanza, el insecto comienza a realizarle pequeñas perforaciones en la piel (*probing* y *piercing*) para tomar una o más muestras del fluido. Luego comienza la ingesta de sangre, facilitada por la presencia de fagoestimulantes. La alimentación finaliza cuando el abdomen alcanza un volumen crítico, registrado por receptores de estiramiento. La modificación o alteración de alguna de estas etapas puede causar la interrupción parcial o total de la alimentación.

Se ha demostrado que el sistema NO/GMPc participa en diferentes procesos relacionados con la alimentación, no solamente en los insectos sino también en otros invertebrados. Durante el proceso de alimentación, las neuronas motoras que inervan el esófago del molusco *Lymnaea stagnalis* liberan NO, y esto resulta en una disminución de la tasa de alimentación y su consiguiente inhibición (Kobayashi *et al.*, 2000).

El proceso de habituación del reflejo de extensión de la proboscis ante la estimulación de la antena de la abeja *Apis mellifera* está mediado por el sistema NO/GMPc (Müller y Hildebrandt, 2002). La disminución en la probabilidad de la respuesta durante el proceso de habituación se correlaciona con un aumento de la proteína kinasa A en los lóbulos antenales. Esta enzima es activada por la cascada de señales iniciada por el NO.

En esta tesis encontramos que el tratamiento con SNAC produjo un efecto antialimentario dependiente de la dosis. Debido a su gran reactividad, el NO actúa

rápidamente. Al ser aplicados en forma externa, los dadores de NO ejercen su efecto localmente, ya que reaccionan con otras moléculas de su entorno. Cuando estudiamos la duración del efecto antialimentario de la SNAC, confirmamos su transitoriedad, ya que observamos que 30 minutos después de su aplicación, este compuesto ya no tuvo efecto. El NO liberado por el dador aplicado en las antenas debe entonces haber ejercido su efecto en los receptores presentes en las antenas, en donde se realizó la aplicación.

Durante los ensayos preliminares, varias concentraciones de SNAC fueron aplicadas en la cabeza de las ninfas de *R. prolixus* y se estudió su efecto sobre la alimentación. En este caso no se observó efecto antialimentario al aplicar SNAC hasta una dosis máxima de 11,3 µg/insecto (datos no mostrados). Los S-nitrosotioles de bajo peso molecular son inestables en presencia de agua (Singh *et al.*, 1996) y sufren S-transnitrosilación en presencia de oxígeno (Liu *et al.*, 1998). Al ser topicada, por ejemplo en la cabeza, la SNAC probablemente reacciona con moléculas presentes en la cutícula del insecto, particularmente lípidos y proteínas. Estas reacciones pueden evitar la liberación del NO a partir de la SNAC, o impedir que el NO llegue como tal hasta los receptores de las antenas por difusión desde la cabeza, lo que se traduce en la falta de efecto de este compuesto.

Cuando la SNAC fue aplicada en la proboscis de las ninfas no se observó efecto antialimentario. Los insectos presentan quimiorreceptores gustativos en las piezas bucales, que les aportan información acerca de la calidad del alimento que van a ingerir. Los individuos de la especie *R. prolixus* presentan quimiorreceptores gustativos en la proboscis (Friend y Smith, 1977). En las últimas etapas del proceso de alimentación, estos quimiorreceptores son los responsables de la ocurrencia exitosa de la ingesta de sangre, ya que detectan la presencia de fagoestimulantes como el ATP, que desencadenan en el insecto la respuesta de succión (Friend y Smith, 1971). La cascada de señales en estos quimiorreceptores es diferente de la que se observa en los quimiorreceptores olfativos de las antenas. Este resultado es esperable, no solamente por los resultados que observamos en esta tesis, sino por resultados recientes obtenidos en otras especies como *P. regina* (Murata *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2005). Contrariamente a lo que ocurre con las señales olfativas, en las que el IP3 es el segundo mensajero de la vía principal de transducción, en las señales gustativas la cascada

principal estaría constituida por el sistema NO/GMPc, y el IP3 sería, en cambio, el mediador químico en el fenómeno de adaptación sensorial (Ozaki y Amakawa, 1992).

Al aplicar db-GMPc en las antenas de las ninfas no observamos el efecto antialimentario producido por la SNAC. Como ya se explicó más arriba, hay evidencias que sugieren que el NO puede ejercer su efecto por caminos alternativos que no involucran la activación de la GCs ni el consiguiente aumento de GMPc.

En resumen, hasta el momento hemos visto que la disminución de la repelencia por DEET y el efecto antialimentario tienen en común que ambos procesos se inician por la acción del NO, pero difieren en el resto de la cascada de señales; la disminución de la repelencia incluye la activación de la GCs y el aumento de GMPc, mientras que el efecto antialimentario implica la participación de otro segundo mensajero que no hemos identificado. Newland y Yates (2008) obtuvieron un resultado similar estudiando los receptores de sacarosa y NaCl de *S. gregaria*, que modulan el ritmo de oviposición de las hembras de esta especie. Los autores observaron que el NO disminuía el efecto inhibitorio de estas sustancias (*S. gregaria* interrumpe el ritmo de excavación al detectar alguno de estos compuestos en el sustrato en el que va a oviponer); sin embargo el GMPc solo participaba en la cascada de señales del receptor de sacarosa, mientras que en el otro caso, la transducción parecería ocurrir por medio de otro segundo mensajero.

4.5. Orientación sobre una paloma viva

Para estudiar el efecto de la SNAC sobre el comportamiento alimentario de las ninfas de *R. prolixus* habíamos colocado grupos de ninfas tratadas, directamente sobre el muslo de una paloma viva. Con este experimento pudimos hallar una relación del comportamiento antialimentario con la dosis de SNAC aplicada, pero no nos permitió dilucidar si el sentido de orientación hacia el hospedador también estaba afectado por el tratamiento. Para ello diseñamos el experimento de orientación a una paloma viva. Las ninfas se encontraban en la arena experimental a una distancia máxima de 10 cm de la fuente de alimento. Los resultados observados coinciden con los que obtuvimos en el experimento de orientación al CO₂. En ambos casos observamos un número

significativamente menor de insectos que se acercaron a la fuente del estímulo, cuando las ninfas fueron tratadas con la mayor dosis de SNAC. Esto indicaría que la percepción del estímulo químico usado por los insectos para orientarse a larga distancia es afectada por el tratamiento con SNAC.

En las etapas preliminares de esta tesis probamos varios compuestos dadores de NO con el fin de poner a punto la técnica de aplicación y determinar la existencia de posibles efectos tóxicos de estas sustancias. De todos ellos se probó el efecto antialimentario sobre paloma. En algunos casos, observamos que el tratamiento con los dadores producía hiperactividad en las ninfas al exponerlas a la paloma. Para determinar si esto ocurría con la SNAC, se cuantificó con un actómetro la actividad locomotora de las ninfas tratadas y expuestas a la paloma. No se observaron variaciones en la actividad locomotora de los grupos tratados con SNAC.

4.6. Orientación a claves térmicas y químicas

Para determinar si el efecto antialimentario observado sobre la paloma se debía a un efecto del tratamiento sobre la percepción de los estímulos químicos o térmicos, se estudió la respuesta de las ninfas a dos claves individuales relacionadas con la detección del hospedador.

La percepción del CO₂ junto con otros volátiles emitidos por los vertebrados, como ácidos grasos de cadena corta, son utilizados por los triatominos para localizar a su hospedador a mediana y larga distancia (Núñez, 1987; Barrozo y Lazzari, 2004 b). Estos estímulos son detectados por receptores olfativos presentes en las antenas y orientan al insecto en la dirección de la fuente emisora del estímulo. Luego, los receptores térmicos les permiten acercarse definitivamente a la fuente. Estos receptores también están presentes en las antenas y responden a temperaturas entre 32 y 45° C (Lazzari y Núñez, 1989). El estímulo térmico es indispensable para que el insecto extienda la proboscis (Flores y Lazzari, 1996).

Si ocurre una interferencia en la percepción de alguno de estos estímulos, es probable que el acercamiento a la fuente y la extensión de la proboscis no ocurra, de manera que no se concrete el proceso de alimentación. Dado que observamos un efecto

antialimentario al tratar a las ninfas con SNAC y exponerlas posteriormente a una paloma viva, la percepción de alguna de estas claves debería estar afectada por el tratamiento.

En nuestro trabajo, las ninfas expuestas al estímulo térmico comenzaron a responder en el momento en que la resistencia alcanzó una temperatura de 32° C. Esta observación coincide con resultados previos de Lazzari y Núñez (1989), quienes mostraron que las ninfas de *T. infestans*, también responden al estímulo térmico a partir de esta temperatura. Las ninfas de *R. prolixus* tratadas con SNAC no modificaron su respuesta al estímulo térmico. No hay antecedentes acerca de la posible función del NO en las células de los termorreceptores de insectos hematófagos. Recientemente se demostró que individuos de la especie *R. prolixus* pueden desarrollar habituación al estímulo térmico (Lallement, 2007). Este antecedente demuestra por primera vez la capacidad de estos insectos a desarrollar un tipo de aprendizaje no asociativo. Sin embargo el mecanismo bioquímico que subyace este proceso aún no está claro. Los receptores térmicos tienen la capacidad de adaptarse a la presentación de estímulos repetitivos, y los insectos pueden integrar esta información de modo que ocurra aprendizaje. Según los resultados presentados en esta tesis, el sistema NO/GMPc no estaría relacionado con la plasticidad presentada por los receptores térmicos.

En los experimentos de alimentación sobre la paloma viva observamos que algunos de los individuos que no se alimentaron extendían la proboscis. Este reflejo podría estar causado por la percepción del calor proveniente de la paloma, ya que el tratamiento con SNAC no modificó la respuesta a este estímulo.

La orientación de las ninfas hacia la fuente emisora de CO₂, en cambio, se vio afectada por el tratamiento con SNAC. La respuesta al CO₂ disminuyó significativamente entre los insectos que recibieron la mayor dosis de SNAC. Este resultado, junto con la disminución de la respuesta a la DEET y el efecto antialimentario, es una evidencia más a favor del modelo de señalización mediado por NO/GMPc, o al menos por el NO, en las neuronas sensoriales olfativas durante el fenómeno de adaptación sensorial.

4.7. Actividad NOS

La presencia de la enzima NOS fue identificada en varias zonas del cerebro de los insectos utilizando métodos inmunohistoquímicos, como la actividad de NADPH-diaforasa (Davies, 2000). Una de las primeras evidencias de la presencia del NO en los sistemas sensoriales de los insectos fue la purificación de la NOS del sistema nervioso de la langosta *S. gregaria* y el descubrimiento de la activación de la GCs por parte del NO en el cerebro de este insecto.

La gran mayoría de los trabajos realizados sobre NOS en insectos se basan en la localización de la enzima en diferentes tejidos, pero hay muy pocos que miden la actividad. Settembrini *et al.* (2007) determinaron la actividad NOS en homogenatos de cerebro y ganglios de *T. infestans*, midiendo la absorbancia producida por nitritos y nitratos como productos de descomposición del NO.

En este trabajo acondicionamos una técnica de medición de actividad NOS que se utiliza para la determinación de esta enzima en líneas celulares en cultivo de mamíferos. Utilizamos los reactivos provistos por el kit comercial y probamos varios tipos de muestras provenientes de ninfas del quinto estadio de *R. prolixus* para determinar la sensibilidad del método. En primer lugar usamos órganos intactos como una cabeza y un número variable de antenas. La ventaja de tratar de determinar la actividad NOS en estos sistemas es que la muestra conserva la estructura celular y tisular, y esto garantiza que la enzima está presente en su entorno fisiológico con todos sus cofactores. La limitación es que para lograr una medición positiva es necesario que los reactivos entren al órgano, reaccionen y el producto formado salga al medio de reacción para ser medido por el aparato. Esta serie de pasos implica varias cinéticas físico-químicas que pueden interferir en la medición del producto final.

Utilizando esta técnica pudimos medir la actividad NOS en una cabeza intacta de *R. prolixus*. La cabeza presenta varios tejidos en los que ha sido identificada la presencia de la NOS en *R. prolixus* y otras especies de insectos: en *T. infestans* se observó inmunorreactividad en la corteza de los somas del protocerebro, en los lóbulos ópticos, en los neuropilos sensoriales del deutocerebro y en los ganglios torácico y subesofágico (Villar *et al.*, 1994). En *R. prolixus* se localizó la NOS en las glándulas salivales (Yuda *et al.*, 1996). En *M. sexta* ha sido localizada la NOS en las neuronas receptoras olfativas

(Collman *et al.*, 2000; Hudson *et al.*, 2003; Collman *et al.*, 2004). En este trabajo no pudimos determinar la actividad NOS en las antenas de *R. prolixus* al utilizar pares de antenas intactas. La cantidad de neuronas que potencialmente expresan la enzima en las antenas de estos insectos es baja, por lo que la actividad en este órgano parece estar por debajo del límite de detección de la técnica. Se requirió entonces aumentar el número de antenas para llegar a detectar la actividad, pero al colocar más antenas en los pocillos éstas quedaban en la superficie del medio de reacción sin llegar a entrar en contacto totalmente con los reactivos y además interferían con la fluorescencia emitida por el producto formado. Al encontrarnos con esta dificultad, decidimos realizar homogenatos de antenas, para poder aumentar la cantidad de material sin aumentar a su vez la interferencia en la medición. Previamente preparamos homogenatos de cabezas para validar el método. No pudimos medir actividad NOS en los homogenatos de una sola cabeza, pero sí al homogeneizar 10 cabezas. Sin embargo, no hallamos actividad NOS en los homogenatos de 10, 20 ó 100 antenas. El resultado obtenido en cabeza muestra que si la cantidad de tejido es suficiente, esta metodología permite medir la actividad de la enzima. En el caso de las antenas, no logramos preparar una muestra que contenga la cantidad suficiente de enzima para poder ser medida con esta técnica.

El agregado de varias concentraciones de β -NADPH sugerido en las instrucciones del kit para aumentar la actividad enzimática no tuvo ningún efecto en nuestro sistema. La proporción de los cofactores de la NOS varía en cada tipo de tejido (Alderton *et al.*, 2001), por eso se requiere la puesta a punto de estas cantidades en cada sistema sometido a la medición de NOS.

Los resultados comportamentales obtenidos en esta tesis, y otras evidencias presentadas en otras especies sobre la participación del NO en la función olfativa de los insectos, junto con evidencias sobre la presencia de NOS en las antenas de *M. sexta*, nos anima a poner a punto otras técnicas para determinar la actividad de esta enzima en las antenas de *R. prolixus*.

Finalmente, si bien no pudimos aún lograr nuestro objetivo de caracterizar la actividad NOS en las antenas de *R. prolixus*, el resultado positivo obtenido tanto en la cabeza intacta como en el homogenato de cabezas constituye uno de los pocos resultados de la medición de la actividad NOS en insectos, y el primero en *R. prolixus*.

5. CONCLUSIONES

5.1. Conclusiones generales

- ❖ *El sistema NO/GMPc mediaría un fenómeno de adaptación sensorial olfativa al repelente DEET, que sería el mecanismo responsable de la disminución en la repelencia observada experimentalmente. La repelencia disminuiría por una respuesta menor de los receptores debido al tratamiento con SNAC/db-GMPc.*
- ❖ *El NO produciría una disminución de la alimentación dependiente de la dosis, modulando la percepción olfativa del CO₂. Esta modulación ocurriría a través de un sistema que no involucra la participación del GMPc.*

5.2. Conclusiones particulares

- El tratamiento con SNAC disminuyó la repelencia producida por 70 µg/cm² de DEET en ninfas del quinto estadio de *R. prolixus* en una forma dependiente de la dosis.

-
- Se obtuvo el mismo resultado al tratar a las ninfas con db-GMPc, un análogo de GMPc.
 - Se observó un posible fenómeno de adaptación sensorial al exponer a los insectos a concentraciones altas de DEET (700 y 1750 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).
 - La exposición de las ninfas a 350 ó 700 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de DEET produjo un aumento en su actividad locomotora; sin embargo, la concentración de 70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de DEET no produjo hiperactividad, aunque resultó repelente para los insectos.
 - El tratamiento con SNAC no modificó la hiperactividad producida por la DEET.
 - El tratamiento con SNAC produjo un efecto antialimentario dependiente de la dosis.
 - El tratamiento con db-GMPc, en cambio, no modificó el comportamiento alimentario de los insectos.
 - El tratamiento con SNAC disminuyó la atracción de las ninfas a una fuente emisora de CO_2 , pero no modificó su respuesta al estímulo térmico.
 - El tratamiento con SNAC disminuyó la atracción de los insectos hacia una paloma viva.
 - La actividad locomotora de las ninfas expuestas a una paloma viva no se modificó con el tratamiento con SNAC.
 - El método de fluorescencia por la formación de un cromóforo, debida a la unión del NO con DAF-2, permitió medir la actividad NOS en la cabeza de las ninfas de *R. prolixus*, pero en las antenas no pudo detectarse la actividad con el mismo método.

5.3 Objetivos futuros

- Confirmar la existencia del fenómeno de adaptación sensorial olfativa en *R. prolixus* utilizando estímulos químicos relacionados con su contexto ecológico, como el CO₂ u otros olores emanados por sus hospedadores.
- Confirmar el modelo de transducción de señales planteado en esta tesis para el fenómeno de adaptación sensorial olfativa, utilizando inhibidores específicos de las enzimas postuladas para esta vía (NOS, GCs) y captadores de NO.
- Identificar al segundo mensajero que participa en la vía que subyace al efecto antialimentario de la SNAC, vinculado con el NO.
- Determinar si el tratamiento de machos adultos de *R. prolixus* con SNAC tiene algún efecto sobre la cópula (por ejemplo, disminuyendo la percepción de señales químicas asociadas con la localización del sexo opuesto).
- Estudiar la posible función del NO en procesos de aprendizaje de *R. prolixus* (por ejemplo, habituación a un estímulo químico, tomando como antecedente el trabajo del Dr. Lazzari sobre el desarrollo de este tipo de aprendizaje en esta especie con la presentación del estímulo térmico).
- Desarrollar una técnica que permita identificar la presencia y/o cuantificar la actividad de la NOS en las antenas de *R. prolixus*.

7. REFERENCIAS

Alderton, WK, Cooper, CE y Knowles, RG, 2001. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357: 593-615.

Alzogaray, RA, Fontán, A y Zerba, EN, 2000. Repellency of DEET to nymphs of *Triatoma infestans*. *Med. Vet. Entomol.* 14: 6-10.

Alzogaray, RA y Zerba, EN, 2001. Behavioral response of fifth instar nymphs of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to pyrethroids. *Acta Tropica* 78: 51-57.

Barrozo RB y Lazzari, CR, 2004 a. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. *Chem. Senses.* 29 (4): 319-329.

Barrozo RB y Lazzari, CR, 2004 b. Orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to short-chain fatty acids: synergistic effect of L-lactic acid and carbon dioxide. *Chem. Senses.* 29 (9): 833-841.

Barton Browne L, 1977. Host-related responses and their suppression: some behavioral considerations. En: Shorey HH y J McKelvey Jr, (eds.). *Chemical control of insect behavior*, pps 117-127. John Wiley & Sons, New York.

Beckage, NE, 2003. Immunology. En: Resh, VH y RT Cardé (eds.). *Encyclopedia of insects*. Academic Press, Elsevier, Amsterdam, 1266 pps.

Bicker, G, 1998. NO news from insect brains. *Trends Neurosc.* 21 (8): 349-355.

Bicker, G, 2001a. Sources and targets of nitric oxide signaling in insect nervous systems. *Cell Tissue Res.* 303: 137-146.

Bicker, G, 2001b. Nitric oxide: an unconventional messenger in the nervous system of an orthopteroïd insect. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 48: 100-110.

Black, WC y Kondratieff, BC, 2005. Evolution of arthropod disease vectors. En: Marquardt, WC (ed.). *Biology of disease vectors*, pps 9-24. Academic Press, Elsevier, Amsterdam.

Boekhoff, I, Seifert, E, Göggerle, S, Lindemann, M, Krüger, B-W y Breer, H, 1993. Pheromone-induced second-messenger signalling in insect antennae. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 23 (7): 757-762.

Bredt, DS, 1999. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Rad. Res.* 31: 577-596.

Breer, H, Boekhoff, I y Tareilus, E, 1990. Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction. *Nature*, 345: 65-68.

Breer, H, Klemm, T y Boekhoff, I, 1992. Nitric oxide mediated formation of cyclic GMP in the olfactory system. *Neuro Report* 3: 1030-1032.

Breer, H y Shepherd, GM, 1993. Implications of the NO/cGMP system for olfaction. *Trends Neurosci.* 16 (1): 5-9.

Bruch-Gerharz, D, Ruzicka, T y Kolb-Bachofen, V, 1998. Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease- a review. *Arch. Dermatol. Res.* 290: 643-651.

Burgess, I, 1993. The function of a repellent in head louse control. *The Pharmacol. J.* 15: 674-675.

Chagas, C, 1909. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. Gen.,n. Sp.; agente etiológico de nova entidade morbida do homen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1: 159-218.

Chapman, RF, 1998. The insects, structure and function. Cambridge University Press, Cambridge. 770 pps.

Colasanti, M, Venturini, G, Merante, A, Musci, G y Lauro, GM, 1997. Nitric oxide involvement in *Hydra vulgaris* very primitive olfactory-like system. The J Neurosc, 17(1): 493-499.

Collmann, C, Christensen, TA y Nighorn, A, 2000. Nitric oxide signalling and odor-information processing in the moth. Society for Neuroscience Abstracts, Vol. 26 n° 1-2 pp. Abstract n° 451.11. 30th Annual Meeting of the Society of Neuroscience. New Orleans, LA, USA, November 4-9 2000.

Collmann, C y Nighorn, A, 2003. Examining nitric oxide signalling using diaminorhodamine-4m AM and cGMP immunocytochemistry in the antennal lobe of *Manduca sexta*. Society of Neuroscience Abstract Viewer and Itinerary Planner, Vol. 2003, Abstract n° 821.20. 33rd Annual Meeting of the Society of Neuroscience, New Orleans, LA, USA, November 8-12 2003.

Collmann, C, Carlsson, MA, Hansson, BS y Nighorn, A, 2004. Odorant-evoked nitric oxide signals in the antennal lobe of *Manduca sexta*. J. Neurosci. 24 (27): 6070-6077.

Cotton, FA y Wilkinson, G, 1981. Química inorgánica avanzada. Editorial Limusa, México, 1173 pps.

Davies, S, 2000. Nitric oxide signalling in insects. Insect Biochem. Molec. Biol. 30: 1123-1138.

Dekker, T, Geier, M y Cardé, RT, 2005. Carbon dioxide instantly sensitizes female yellow fever mosquitoes to human skin odours. *J. Exp. Biol.* 208: 2963-2972.

Del Punta, K, Charreau, EH y Pignataro, OP, 1996. Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 137: 5337-5343.

Dethier VG, Browne LB y Smith CN, 1960. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. *J. Econ. Entomol.* 53: 134-136.

Dionne, VE, 1994. Emerging complexity of odor transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 6253-6254.

Diotaiuti, L, Marques Penido, C, Saraiva de Araujo, H, Schofield, CJ y Teixeira Pinto, C, 2000. Excito-repellency effect of deltamethrin on triatomines under laboratory conditions. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33 (3): 247-252.

Ditzen, M, Pellegrino, M y Vosshall, LB, 2008. Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science*, 319: 1838-1842.

Dogan, EB, Ayres, JW y Rossignol, PA, 1999. Behavioural mode of action of DEET: inhibition of lactic acid attraction. *Med. Vet. Entomol.* 13: 97-100.

Dolzer, J, Fischer, K y Stengl, M, 2003. Adaptation in pheromone-sensitive trichoid sensilla of the hawkmoth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 206: 1575-1588.

Evans, WG, 1964. Infra-red receptors in *Melanophila acuminata* De Geer. *Nature*, 202: 211.

Evans, WG y Gooding, RH, 2002. Turbulent plume of heat, moist heat, and carbon dioxide elicit upwind anemotaxis in tsetse flies *Glossina morsitans morsitans* Westwood (Diptera: Glossinidae). *Can. J. Zool.* 80 (7): 1149-1155.

Feelisch, M, 1998. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. Arch. Pharmacol. 358: 113-122.

Fields, PG, Xie, YS, y Hou, X, 2001. Repellent effect of pea (*Pisum sativum*) fractions against stored-products insects. J. Stor. Prod. Res. 37: 359-370.

Flecke, C, Dolzer, J, Krannich, S y Stengl, M, 2006. Perfusion with cGMP analogue adapts the action potential response of pheromone-sensitive sensilla trichoidea of the hawkmoth *Manduca sexta* in a daytime-dependent manner. J. Exp. Biol. 209: 3898-3912.

Flores, GB y Lazzari, CR, 1996. The role of the antennae in *Triatoma infestans*: orientation towards thermal sources. J. Insect Physiol. 42 (5): 433-440.

Frances, SP, 2007. Efficacy and safety of repellents containing DEET. En: Insect repellents. Principles, methods, and uses, pps. 311-326. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Friend, WG y Smith, JJB, 1971. Feeding in *Rhodnius prolixus*: potencies of nucleoside phosphates in initiating gorging. J. Insect Physiol. 17: 1315-1320.

Friend, WG y Smith, JJB, 1977. Factors affecting feeding by blood-sucking insects. Annu. Rev. Entomol. 22: 309-331.

Fujita, T y Kloetzel, K, 1976. A resposta de *Rhodnius prolixus* a estímulos térmicos. Revta. Soc. Bras. Med. Trop. 10: 119-125.

Garthwaite, G, Goodwin, DA y Garthwaite, J, 1999. Nitric oxide stimulates cGMP formation in rat optic nerve axons, providing a specific marker of axon viability. European J. Neurosci. 11: 4367-4372.

Gelperin, A, Flores, J, Raccuia-Behling, F y Cooke, IRC, 2000. Nitric oxide and carbon monoxide modulates oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusk. *J. Neurophysiol.* 83: 116-127.

Gérczei, T, Fazekas, Á y Keserű, GM, 2000. Theoretical study on the nitric oxide binding to nitrophorin 1, an NO-carrier protein from a blood-sucking insect. *J. Mol. Struc.* 503: 51-58.

Gibson, NJ y Nighorn, A, 2000. Expression of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the developing olfactory system of *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.* 422: 191-205.

Herrero, MB, Chatterjee, S, Lefièvre, L, De Lamirande, E y Gagnon, C, 2000. Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Rad. Biol. Med.* 29 (6): 522-536.

Homberg, U y Muller, U, 1999. Neuroactive substances in the antennal lobe, pps. 186-206. En: BS Hansson (ed), *Insect olfaction*, Springer, Berlin.

Hudson, J, Kaneko, M y Nighorn, A, 2003. Knock down of nitric oxide synthase in the olfactory system of *Manduca sexta*. 33rd Annual Meeting of the Society of Neuroscience, New Orleans, LA, USA. November 8-12 2003. Abstract n° 794.11.

Inada, H, Shindo, H, Tawata, M y Onaya, T, 1998. cAMP regulates nitric oxide production and ouabain sensitive Na⁺, K⁺-ATPase activity in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Diabetologia* 41: 1451-1458.

Inamura, K, Kashiwayanagi, M y Kurihara, K, 1998. Effects of cGMP and sodium nitroprusside on odor responses in turtle olfactory sensory neurons. *Am. J. Physiol.* 275 (5): C1201-C1206.

Isman, MB, 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66.

Kaissling, KE y Boekhoff, I, 1993. Transduction and intracellular messengers in pheromone receptor cells of the moth *Antheraea polyphemus*, pps 489-502. En: Sensory systems of arthropods. Wiese, K, Gribakin, FG, Popov, AV y G Renninger (eds.). Birkhäuser Verlag, Basel.

Keil, TA, 1999. Morphology and development of the peripheral olfactory organs, pps. 5-47. En: Insect olfaction, BS Hansson (ed.). Springer, Berlin.

Klowden, MJ, 2007. Physiological systems in insects. Academic Press, Elsevier, Amsterdam. 688 pps.

Klowden MJ y Zwiebel, LJ, 2005. Vector olfaction and behavior. En: Marquardt, WC *et al.* (eds.) Biology of disease vectors. Academic Press, Elsevier, Amsterdam, 277-287.

Klun, JA, Khrimian, A y Debboun, M, 2006. Repellent and deterrent effects of SS220, Picaridin and Deet Suppress human blood feeding by *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Phlebotomus papatasi*. *J. Med. Entomol.* 43 (1): 34-39.

Knowles, RG, Palacios, M, Palmer, RMJ y Moncada, S, 1989. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 5159-5162.

Kobayashi, S, Ogawa, H Fujito, Y y Ito, E, 2000. Nitric oxide suppresses fictive feeding response in *Lymnaea stagnalis*. *Neurosci. Letters*, 285 (3): 209-212.

Kojima, H, Sakurai, K, Kikuchi, K, Kawahara, S, Kirino, Y, Nagoshi, H, Hirata, Y y Nagano, T, 1998. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem. Pharm. Bull.* 46 (2): 373-375.

Lallement, H, 2007. Habituation et conditionnement classique aversif de la réponse d'extension du proboscis chez un insecte hématophage, *Rhodnius prolixus*. M.Sc. Dissertation, University of Tours, 66 pp.

Lazzari, CR y Núñez, JA, 1989. The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distance sources in *Triatoma infestans*. J. Insect Physiol. 35 (6): 525-529.

Lazzari, CR, 1990. Fisiología del comportamiento de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Heteroptera: Reuviidae). Orientación térmica. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, 161 pps.

Lehane, MJ, 1991. Biology of blood-sucking insects. Chapman and Hall, London, 288 pps.

Liptrot, GF, 1980. Química inorgánica moderna. Compañía Editorial Continental, México, 568 pps.

Lischka, FW y Schild, D, 1993. Effects of nitric oxide upon olfactory receptor neurones in *Xenopus laevis*. Neuro Report 4: 582-584.

Liu Z, Rudd MA, Freedman JE y Loscalzo J, 1998. S-transnitrosation reactions are involved in the metabolic fate and biological actions of nitric oxide. J. Pharmacol. Exp. Ther. 284: 526-534.

Luckhart, S y Rosenberg, R, 1999. Gene structure and polymorphism of an invertebrate nitric oxide synthase gene. Gene 232: 25-34.

Mathews WR, Kerr SW. 1993. Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. J Pharmacol Exp Ther 267: 1529-1537.

Matsunobu, T y Scacht, J, 2000. Nitric oxide/ cyclic GMP pathway attenuates ATP-evoked intracellular calcium increase in supporting cells of the Guinea pig cochlea. *J. Comp. Neurobiol.* 423: 452-461.

McIver, SB, 1981. A model for the mechanism of action of the repellent DEET on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 18 (5): 357-361.

McIver, SB y Siemicki, R, 1985. Fine structure of antennal putative thermo/hygrosensilla of adult *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). *J. Morphol.* 183: 15-23.

Moreira, MF, Coelho, HSL, Zingali, RB, Oliveira, PL y Masuda, H, 2003. Changes in salivary nitrophorin profile during the life cycle of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 33: 23-28.

Moore, SJ y Debboun, M, 2007. History of insect repellents, pps. 3-29. En: *Insect repellents. Principles, methods and uses*, Debboun, M, Frances, SP y D. Strickman (eds.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Müller, U, 1996. Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. *Neuron* 16: 541-549.

Müller, U, 1997. The nitric oxide system in insects. *Progress Neurobiol.* 51: 363-381.

Müller, U y Hildebrandt, H, 2002. Nitric oxide/cGMP-mediated protein kinase A activation in the antennal lobes plays an important role in appetitive reflex habituation in the honeybee. *J. Neurosci.* 22(19): 8739-8747.

Mumcuoglu, KY, Galun, R, Bach, U, Miller, J y Magdassi, S, 1996. Repellency of essential oils and their components to the human body louse, *Pediculus humanus humanus*. *Entomol. Experim. Appl.* 78: 309-314.

Murata, Y, Mashiko, M, Ozaki, M Amakawa, T, Nakamura, T, 2004. Intrinsic nitric oxide regulates the taste response of the sugar receptor cell in the blowfly *Phormia regina*. Chem. Senses 29: 79-81.

Nakamura, T, Murata, Y, Mashiko, M, Okano, K, Satoh, H, Ozaki, M, Amakawa, T, 2005. The nitric oxide-cyclic GMP cascade in sugar receptor cells of the blowfly *Phormia regina*. Chem. Senses 30 (1): 1281-1282.

Nation, JL, 2002. Insect physiology and biochemistry. CRC Press, Boca Raton. 485 pps.

Newland, PL y Yates, P, 2007. Nitroergic modulation of an oviposition digging rhythm in locusts. J. Exp. Biol. 210: 4448-4456.

Newland, PL y Yates, P, 2008. Nitric oxide modulates salt and sugar responses via different signalling pathways. Chem. Senses 33: 347-356.

Nighorn, A, Gibson, NJ, Rivers, DM, Hildebrandt, JG y Morton, DB, 1998. The nitric oxide-cGMP pathway may mediate communication between sensory afferents and projection neurons in the antennal lobe of *Manduca sexta*. J. Neurosci. 18 (18): 7244-7255.

Núñez, JA, 1987. Behavior of Triatominae bugs, pps. 1-30. En: Chagas' disease vectors, Vol. II. Brenner, RR y AM Stoka (eds.), CRC Press, Boca Raton.

Ozaki, M y Amakawa, T, 1992. Adaptation-promoting effect of IP₃, Ca²⁺, and phorbol ester on the sugar taste receptor cell of the blowfly *Phormia regina*. J. Gen. Physiol. 100: 867-879.

Partington, JR, 1937. Text-book of inorganic chemistry. Macmillan Publishers, London. 586 pps.

Pickett, JA, Birkett, MA y Logan, JG, 2008. DEET repels ORNery mosquitoes. PNAS, 105 (36): 13195-13196.

Picollo, MI, Seccacini, EA, Vassena, CV y Zerba, EN, 1993. Feeding and mating deterrence by sulfhydryl reagents in *Triatoma infestans*. Acta Tropica, 52: 297-307.

Pophof, B y van der Goes van Naters, W, 2002. Activation and inhibition of the transduction process in silkworm olfactory receptor neurons. Chem. Senses 27: 435-443.

Qazi, S y Trimmer, BA, 1999. The role of nitric oxide in motoneuron spike activity and muscarinic-evoked changes in cGMP in the CNS of larval *Manduca sexta*. J. Comp. Physiol. A 185: 539-550.

Randall, D, Burggren, W y French, K, 1997. Eckert: Fisiología animal. Mecanismos y adaptaciones. Cuarta Edición, Editorial McGraw-Hill, 726 pps.

Redkozubov, A, 2000. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate reduces the response of the moth's olfactory receptor neuron to pheromone. Chem. Senses 25: 381-385.

Reeder, NL, Ganz, PJ, Carlson, HR y Saunders, CW, 2001. Isolation of a deet-insensitive mutant of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). J. Econom. Entomol. 94: 1584-1588.

Rojas, JC, Rios-Candelaria, E, Cruz-López, L, Santiesteban, A, Bond-Compean, JG, Brindis, Y y Malo, EA, 2002. A reinvestigation of Brindley's gland exocrine compounds of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). J. Med. Entomol. 39 (2): 256-265.

Ruigt GSF, 1985. Pyrethroids. En: GA Kerkut & LI Gilbert eds. Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, vol.12. Pergamon, Oxford, pp. 183-262.

Sánchez-Vives, MV, Nowak, LG y McCormick, DA, 2000. Cellular mechanisms of long-lasting adaptation in visual cortical neurons *in vitro*. J. Neurosci. 20(11): 4286-4299.

Schild, D y Restrepo, D, 1998. Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. Physiol. Rev. 78 (2): 429-466.

Schofield, CJ, 1994. Triatominae. Biología y control. Eurocomunica Publications. West Sussex, UK.

Schofield, CJ, 1979. The behaviour of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a review. Bull. Entomol. Res. 69: 363-379.

Schuermann, FW, 2000. Acetylcholine, GABA, glutamate and NO as putative transmitters indicated by immunocytochemistry in the olfactory mushroom body system of the insect brain. Acta Biol. Hungarica 51(2-4): 355-362.

Schuppe, H, Cuttle, M y Newland, PL, 2007. Nitric oxide modulates sodium taste via a cGMP-independent pathway. Develop. Neurobiol. 67: 219-232.

Seidel, C y Bicker, G, 2000. Nitric oxide and cGMP influence axonogenesis pioneer neurons. Development 127: 4541-4549.

Settembrini, BP, Coronel, MF, Nowicki, S, Nighorn, AJ y Villar, MJ, 2007. Distribution and characterization of nitric oxide synthase in the nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta: Heteroptera). Cell Tissue Res. 328 (2): 421-430.

Sfara, V, Zerba, EN y Alzogaray, RA, 2006. Toxicity of pyrethroids and repellency of diethyltoluamide in two deltamethrin resistant colonies of *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae). Mem. Inst. Osw. Cruz, 101 (1): 89-94.

Sfara, V, Zerba, EN y Alzogaray, RA, 2008. Decrease in DEET repellency caused by nitric oxide in *Rhodnius prolixus*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 67 (1): 1-8.

Singh SP, Wishnok JS, Keshive M, Deen, WM y Tannenbaum SR, 1996. The chemistry of S-nitrosoglutathione/glutathione system. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 14428-14433.

Stengl, M, Ziegelberger, G, Boekhoff, I y Krieger, J, 1999. Perireceptor events and transduction mechanisms in insect olfaction, pp 50-66. En: Insect olfaction, BS Hansson (ed.). Springer, Berlin.

Stengl, M, Zintl, R, De Vente, J y Nighorn, A, 2001. Localization of cGMP immunoreactivity and soluble guanylyl cyclase in antennal sensilla of the hawkmoth *Manduca sexta*. Cell Tissue Res. 304 (3): 409-421.

Strickman, D, 2007. Older synthetic active ingredients and current additives, pps. 361-383. En: Insect repellents. Principles, methods and uses, Debboun, M, Frances, SP y D. Strickman (eds.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Syed, Z y Leal, WS, 2008. Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. PNAS, 105: 13598-13603.

Taneja, J y Guerin, PM, 1995. Oriented responses of the triatomine bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* to vertebrate odours on a servosphere. J. Comp. Physiol. A. 176: 455-464.

Taneja, J y Guerin, PM, 1997. Ammonia attracts the haematophagus bug *Triatoma infestans*: behavioural and neurophysiological data on nymphs. J. Comp. Physiol. A. 181: 21-34.

Takeuchi, H y Kurahashi, T, 2003. Identification of second messenger mediating signal transduction in the olfactory receptor cell. J. Gen. Physiol. 122 (5): 557-567.

Tinette, S, Zhang, L, Garnier, A, Engler, G, Tares, S y Robichon, A, 2007. Exploratory behaviour in NO-dependent cyclase mutants of *Drosophila* shows defects in coincident neuronal signalling. *Neuroscience* 8: 65-82.

Tolozza, AC, Zygadlo J, Mougabure Cueto, G, Biurrun, F, Zerba, E y Picollo MI, 2006. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *J. Med. Entomol.* 43 (5): 889-895.

Torreilles, J, 2001. Nitric oxide: one of the more conserved and widespread signalling molecules. *Front. Biosc.* 6, d1161-1172.

Vila-Petroff, MG, Younes, A, Egan, J, Lakatta, EG y Sollott, SJ, 1999. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circulation Res.* 84: 1020-1031.

Villar, MJ, Settembrini, BP, Hökfelt, T y Tramezzani, JH, 1994. NOS is present in the brain of *Triatoma infestans* and is colocalized with CCK. *Neuro Report* 6: 81-84.

Vincent, VAM, Tilders, FJH y Van Dam, AM, 1998. Production, regulation and role of nitric oxide in glial cells. *Mediators of Inflammation*, 7: 239-255.

Wasserman, SL e Itagaki, H, 2003. The olfactory responses of the antenna and maxillary palp of the fleshfly, *Neobellieria bullata* (Diptera: Sarcophagidae), and their sensitivity to blockage of nitric oxide synthase. *J. Insect Physiol.* 49: 271-280.

Wenzel, B, Kunst, M, Günther, C, Ganter, GK, Lakes-Harlan, R, Elsner, N y Heinrich, R, 2005. Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signalling in the central complex of the grasshopper brain inhibits singing behaviour. *J. Comp. Neurol.* 488: 129-139.

- Wigglesworth, VB y Guillet, JD, 1934.** The function of the antennae in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and the mechanism of orientation to the host. J. Exp. Biol. 11: 120-139.
- Wigglesworth VB y Guillet JD, 1934.** The function of the antennae in *Rhodnius prolixus*: confirmatory experiments. J. Exp. Biol. 11: 408.
- Wigglesworth, VB, 1972.** The principles of insect physiology. Seventh Edition. Chapman and Hall, London. 827 pps.
- Wildemann, B y Bicker, G, 1999.** Nitric oxide and cyclic GMP induce vesicle release at *Drosophila* neuromuscular junction. J. Neurobiol. 39: 337-346.
- Wilson, CH, Christensen, TA y Nighorn, AJ, 2007.** Inhibition of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase signalling affects olfactory neuron activity in the moth *Manduca sexta*. J. Comp. Physiol. A 193: 715-728.
- Wingrove J, O'Farrell PH. 1999.** Nitric oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in *Drosophila*. Cell 98: 105-114.
- Wink, DA y Mitchell, JB, 1998.** Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radical Biol. Med. 25 (4/5) 343-456.
- Yamamoto, T y Bing, RJ, 2000.** Nitric oxide donors. Soc. Exp. Biol. Med. 225: 200-205.
- Yuda, M, Hirai, M, Miura, K, Matsumura, H, Ando, K y Chinzei, Y, 1996.** cDNA cloning, expression and characterization of nitric-oxide synthase from the salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*.

Ziegelberger, G, van den Berg, MJ, Kaissling, K-E, Klumpp, S y Schultz, JE, 1990. Cyclic GMP levels and guanylate cyclase activity in pheromone-sensitive antennae of the silkmoths *Antheraea polyphemus* and *Bombix mori*. *J. Neurosci.* 10 (4): 1217-1225.

Zufall, F, Firestein, S y Shepherd GM, 1994. Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Annu. Rev. Biomol. Struct.*, 23: 577-607.

Zufall, F y Leinders-Zufall, T, 1997. Identification of a long-lasting form of odor adaptation that depends on the carbon monoxide/cGMP second-messenger system. *J. Neurosci.* 17: 2703-2712.

Zufall, F y Leinders-Zufall, T, 1998. Role of cyclic GMP in olfactory transduction and adaptation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 855: 199-204.

Zufall, F y Leinders-Zufall, T, 2000. The cellular and molecular basis of odor adaptation. *Chem. Senses* 25: 473-481.