

UNIVERSITAT DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES INDUCIDAS
EN LA TASA METABOLICA DE *Blattella*
germanica (L.) Y *Oncopeltus fasciatus*
(Dallas) POR EL TRATAMIENTO CON
HORMONA JUVENIL Y PREGOCENO II.**

Memoria presentada por
D^a M^{te} Dolores Garcerá
Zamorano para optar al
grado de Doctor en
Ciencias Biológicas.

BIBLIOTECA
FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGUES
VALÈNCIA

UMI Number: U607636

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607636

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

R. 5200

D. PASCUAL CUÑAT BROSETA, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, adscrito al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia, y D. RAFAEL MARTINEZ PARDO, Catedrático de Biología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada: "**Estudio de las alteraciones inducidas en la tasa metabólica de *Blattella germanica* (L.) y *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) por el tratamiento con hormona juvenil y precoceno II**" presentada por la Licenciada en Ciencias Biológicas D^a M^a Dolores Garcerá Zamorano, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo nuestra Dirección en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia y en el Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València, y gracias a una Beca para Tesis Doctoral concedida a D^a M^a Dolores Garcerá Zamorano por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para que así conste, expedimos y firmamos la presente en:

Valencia, 29 de Agosto de 1986.



AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincero agradecimiento al Dr. D. Pascual Cuñat Broseta, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por su constante estímulo, consejo y orientación en la realización de esta Tesis.

Al Dr. D. Rafael Martínez Pardo, Catedrático de Biología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València, por su ayuda, sobre todo en la parte quirúrgica, y apoyo para la finalización de esta Tesis.

Al Dr. D. Antonio Núñez Cachaza, Catedrático Director del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València, por sus sugerencias e interés mostrados en todo momento.

Al Dr. D. Pedro Serra Síster, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, adscrito al Servicio de Estadística del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia, por la ayuda prestada en el enfoque y realización de la parte estadística de esta Tesis. A D. Fernando López, del Servicio de Estadística del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de Valencia, por su colaboración directa en la elaboración de la parte estadística de esta Tesis.

Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València, por la cesión de los útiles necesarios para la esterilización del material utilizado en los cultivos *in vitro*.

A D^{ña} Elisabeth Barrachina, D^{ña} M^{ña} Dolores Rius y D^{ña} M^{ña} Carmen Verdeguer, por su amistad y alegre ayuda prestada en el mantenimiento de las colonias de insectos.

A todos los miembros del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València, por su paciencia en soportar mis manías, y su constante ánimo a lo largo de estos años, en especial al Dr. D. Javier Núñez de Murga, por su ayuda en la parte fotográfica; D. Juan José del Ramo Romero por su ayuda en el manejo del ordenador, y a D^a Josefina Monje Soriano por el cuidado del material de vidrio.

A mis padres y hermanos, por su preocupación y ayuda en el mecanografiado de la presente Tesis.

A Rafa, mi marido, y
Pilar, mi hija, por todo el
tiempo que esta Tesis nos
ha impedido estar juntos.

INDICE

Introducción	1
1.- Necesidad del uso de plaguicidas en agricultura.....	2
2.- Aspectos de la Fisiología de los insectos que pueden ser interesantes para el desarrollo de nuevos insecticidas.....	9
2.1.- Antagonistas de la hormona juvenil.....	16
2.2.- Métodos de valoración de los agentes agonistas y antagonistas de la hormona juvenil.....	18
3.- Respiración y metabolismo.....	22
3.1.- Sistema respiratorio en insectos.....	24
3.2.- Factores que modifican la tasa respiratoria.....	26
4.- Influencia de la hormona juvenil sobre la tasa metabólica de insectos.....	34
5.- Consumo de oxígeno y órganos de insectos.....	37
5.1.- Tubo digestivo.....	37
5.2.- Cuerpo graso.....	40
5.3.- Ovarios.....	41
5.4.- Alteraciones en la tasa metabólica de órganos aislados.....	44
Objetivos y plan de experiencias	46
Material y Métodos	49
1.- Insectos utilizados y métodos de cría.....	50
2.- Medida del consumo de oxígeno. Descripción del respirómetro.....	57
2.1.- Técnicas manométricas.....	57
2.2.- Respirómetro.....	58

2.2.1.- Baño.....	58
2.2.2.- Unidad de medida.....	60
2.2.2.1.- Cámara de referencia.....	60
2.2.2.2.- Válvula de operación.....	60
2.2.2.3.- Matraces de reacción.....	62
2.2.2.4.- Micrómetro.....	62
3.- Tratamientos	64
3.1.- Productos utilizados	64
3.2.- Tratamiento de los insectos.....	65
3.3.- Tratamiento del medio	67
4.- Técnicas quirúrgicas.....	69
4.1.- Disección de ovarios	70
4.2.- Disección del cuerpo graso.....	71
4.3.- Disección del tubo digestivo.....	76
5.- Cultivo de órganos <i>in vitro</i>	78
5.1.- Tubo digestivo.....	79
5.2.- Cuerpo graso.....	81
5.3.- Ovarios.....	81
6.- Respirimetría	82
6.1.- Respirimetría de insectos.....	82
6.2.- Respirimetría de órganos.....	85
6.2.1.- Tubo digestivo.....	87
6.2.2.- Cuerpo graso.....	87
6.2.3.- Ovarios.....	88
7.- Evaluación de los resultados	90
7.1.- Consumo de oxígeno del insecto.....	90
7.2.- Consumo de oxígeno de órganos.....	90

Resultados	92
1.- Consumo de oxígeno de insectos.....	95
1.1.- Consumo de oxígeno de <i>Blattella germanica</i>	95
1.2.- Consumo de oxígeno de <i>Oncopeltus fasciatus</i>	103
2.- Consumo de oxígeno de órganos aislados	112
2.1.- Consumo de oxígeno de órganos. Tratamiento de los insectos.....	112
2.1.1.- Tubo digestivo	112
2.1.2.- Cuerpo graso	115
2.1.3.- Ovarios.....	122
2.2.- Consumo de oxígeno de órganos. Tratamiento del medio	131
2.2.1.- Tubo digestivo.....	131
2.2.2.- Cuerpo graso.....	135
2.2.3.- Ovarios	138
Discusión	145
1.- Estudio del consumo de oxígeno en <i>Blattella germanica</i>	151
2.- Estudio del consumo de oxígeno en <i>Oncopeltus fasciatus</i>	154
3.- Estudio comparativo entre ambas especies de insectos estudiados	157
4.- Estudio del consumo de oxígeno de órganos.....	161
4.1.- Tubo digestivo	162
4.2.- Cuerpo graso	163
4.3.- Ovarios procedentes de insectos tratados.....	165
4.4.- Ovarios inmersos en medio tratado.....	169
Conclusiones	172
Bibliografía	175

INTRODUCCION

1.- NECESIDAD DEL USO DE PLAGUICIDAS EN AGRICULTURA.

El hombre siempre se ha preocupado por conseguir el máximo rendimiento en sus cosechas. Sin embargo, los destrozos causados por los insectos no le alarmaron demasiado hasta que éstos constituyeron plagas y amenazaron seriamente sus alimentos y su economía. Comenzó entonces a preocuparse en cómo atacar a estos insectos, iniciándose la era de los insecticidas.

Los primeros compuestos químicos usados como plaguicidas fueron los inorgánicos, tales como arseniatos, que actúan desprendiendo la toxina al ser hidrolizados en el estómago de los insectos.

Posteriormente comenzaron a surgir los insecticidas químicos orgánicos, utilizándose los primeros organoclorados a partir de los años 30. Estos compuestos actúan inhibiendo al enzima citocromo-oxidasa que interviene en el intercambio gaseoso, afectando así la respiración de los insectos, produciendo también una inestabilización de su sistema nervioso (Van Emden, 1977).

Estos compuestos presentan una gran persistencia y duración, que en algunos casos puede alcanzar una vida media aproximada a la vida media del hombre (Van Emden, 1977), así como una acumulación a lo largo de la cadena trófica, como es el caso del insecticida denominado DDT. Estos inconvenientes indujeron la aparición, a principios de los años 50, de los plaguicidas organofosforados, de menor duración que los anteriores pero más tóxicos que aquéllos (Ware, 1983).

Estos compuestos actúan inhibiendo la hidrólisis de la acetilcolina, acumulándose ésta en las sinapsis y produciendo una

estimulación nerviosa constante y, por tanto, parálisis tetánica (Ware, 1983).

A continuación, y siguiendo un orden cronológico, comenzaron a aparecer los carbamatos. Al igual que los organofosforados, actúan por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (Van Emden, 1977; Ware, 1983). Estos compuestos presentan una persistencia y toxicidad intermedia entre la de los insecticidas organoclorados y organofosforados.

Los piretroides, de reciente aparición, están cobrando fuerza como insecticidas, al presentar la menor toxicidad para mamíferos de entre todos los insecticidas hasta ahora mencionados. Esto se pone de manifiesto en la Tabla I, donde se aprecia la ventaja de este grupo de insecticidas frente al resto de ellos.

Estos productos son compuestos sintéticos, de estructura química semejante a las piretrinas, las cuales proceden a su vez de extractos de plantas. Los piretroides actúan provocando descargas repetitivas en varios lugares de los sistemas nervioso y muscular, siendo especialmente importantes en las uniones neuromusculares y en las sinapsis (Burt y Goodchild, 1971).

El uso de estos compuestos en la agricultura es de vital importancia para el desarrollo de un país, sobre todo si éste es agrícola. Esto se pone de manifiesto en un informe de la F.A.O. de 1963 donde se menciona el rendimiento obtenido en el producto agrícola bruto por Japón y otros países industrializados (5480 Kg/ha) cuando usaron 1,079 Tm de pesticidas/Km². Sin embargo, otros países menos desarrollados, como India, usando una cantidad media de 0,015 Tm de pesticidas/Km², sólo obtuvieron un rendimiento de 820 Kg/ha.

Tabla I.- Valores de DL₅₀ para varios tipos de insecticidas, obtenidos en ratas e insectos.

Clase	Ratas (mg/kg) ^a	Insectos (mg/kg) ^b	Cociente
Carbamatos	45	2.8	16
Organofosforados	67	2.0	33
Organoclorados	230	2.6	91
Piretroides	2000	0.45	4500

El cociente entre estos dos valores nos indica la seguridad relativa para mamíferos. a= valores de DL₅₀; b= valores de DL₅₀ obtenidos para 4 especies (Elliot, 1976).

Además, el bajo coste en la producción de insecticidas, así como su sencillez en el manejo y su fácil transporte hace que estos compuestos sean imprescindibles para combatir las plagas (Menn y Beroza, 1972), tanto aquéllas que atacan directamente a las cosechas, como las que constituyen los vectores de transmisión de enfermedades contagiosas.

Sin embargo, la utilización de algunos tipos de plaguicidas, así como el uso indiscriminado de otros, presenta una serie de desventajas tanto para las especies vecinas al insecto que se pretende combatir, como para el resto de animales y al ecosistema en general.

En este sentido cabe destacar la resistencia que pueden presentar los insectos frente al producto con que se les trate (Van Ernden, 1977), lo que implica un aumento en la dosis a emplear o un cambio del plaguicida hasta entonces utilizado. Al mismo tiempo, estos productos, al no ser selectivos, eliminan a otras especies de insectos no perjudiciales.

Por otro lado, también hay que mencionar los inconvenientes ocasionados por los plaguicidas al ecosistema sobre el que se aplican, con la consiguiente contaminación de lagos y ríos; suelos y plantas, así como su efecto sobre el hombre y Vertebrados superiores. En este último caso hay que citar la intoxicación sufrida por el hombre al manejar estos productos, así como al ingerir vegetales que han sido tratados con dichos compuestos.

También hay que hablar de la acumulación de algunos tipos de insecticidas a lo largo de la cadena trófica; por ejemplo, el DDT puede pasar desde una concentración de 0.00001 ppm en las aguas dulces, hasta 0.1 ppm en invertebrados acuáticos, 0.5-2.0 ppm en peces y 10.0 ppm en rapaces. La acumulación se produce en el tejido adiposo de los animales, y puede pasar a su sangre cuando se movilizan las grasas por efecto de una gran actividad o de stress (Duffus, 1983).

Si se hace una evaluación entre las ventajas e inconvenientes que presentan los insecticidas habituales, éstos últimos sobrepasan a las primeras, sobre todo en lo referente a la contaminación ambiental y a los efectos irreversibles que el uso indiscriminado de estos productos puede ocasionar. Sin embargo, los pesticidas permanecen en primera línea de defensa en el control de insectos cuando los daños y pérdidas en las cosechas se transforman en pérdidas económicas, y ellos son la única respuesta a un brote

severo de peste o a una emergencia (Ware, 1983), por lo que hasta que dispongamos de nuevos medios de defensa, el uso de los plaguicidas es inevitable.

Por otra parte, la humanidad es cada vez más consciente de los perjuicios que el abuso de los plaguicidas puede ocasionar al medio ambiente. Además, la resistencia de los insectos a estos compuestos y el encarecimiento de los plaguicidas químicos ha puesto de relieve la necesidad de encontrar otros medios de lucha contra los insectos.

Durante los últimos años, basándose en la Fisiología de los insectos, se ha desarrollado un nuevo tipo de insecticidas, que no tiene los inconvenientes de los convencionales.

Este nuevo tipo de productos comenzó a surgir con el descubrimiento de la juvabiona, de actividad análoga a la de la hormona juvenil. Esta hormona es imprescindible para el completo desarrollo de los insectos, así como para el normal funcionamiento de sus órganos reproductores. Por tanto, el descubrimiento de la juvabiona (hormonomimético) desencadenó toda una serie de trabajos encaminados a buscar nuevos productos que presentaran esta actividad, con la esperanza de poder utilizarlos como posibles insecticidas. Nació así lo que Williams denominó Tercera Generación de Plaguicidas (Williams, 1967).

El estudio de estos productos miméticos de la hormona juvenil (o juvenoides) ha demostrado que no presentan toxicidad para los Vertebrados (De Wilde, 1971; Bagley y Bauernfeind, 1972; Siddall y Slade, 1974), además de ser activos en muy pequeñas cantidades (Hoar, 1978) por lo que pueden ser utilizados en concentraciones menos elevadas que los insecticidas de síntesis. Por ejemplo, se ha

demostrado que, en la lucha antimosquito, algunos juvenoides han sido eficaces a concentraciones de 0.0001 ppm, sin producir efectos secundarios (Bagley y Bauernfeind, 1972). Por otro lado, estos compuestos presentan una elevada especificidad, lo que permite seleccionar las sustancias más eficaces para una especie determinada (Barrington, 1977), y al mismo tiempo no presentan ningún efecto polucionante conocido sobre el medio ambiente. Además algunos de estos juvenoides se han aislado de plantas y microorganismos (Schneiderman et al., 1960; Slama y Williams, 1966; Bowers, 1976; Lax et al., 1985).

En la actualidad se han comercializado algunos compuestos de los anteriormente mencionados, con los nombres de Altosid[®] (Metopreno), Enstar[®] (Kinopreno) y Dimilin[®] (Diflubenzuron) (inhibidor de la síntesis de quitina) que han demostrado presentar una gran actividad frente a larvas de moscas, mosquitos, plagas de frutas, vegetales, algodón, etc. (Ware, 1983).

En España, y desde hace unos años, se están llevando a cabo trabajos de investigación encaminados a la búsqueda de compuestos con actividad hormonomimética procedentes de extractos vegetales, y que puedan ser utilizados como futuros insecticidas.

No obstante, todo lo anteriormente mencionado no surte ningún efecto si no se estudia en profundidad la Fisiología de los insectos, en especial de aquellos causantes de plagas. En este sentido hay que destacar la presencia de un exoesqueleto duro que les aísla del medio, una gran facilidad de reproducción, así como un sistema hormonal propio y muy simple.

Puesto que los mecanismos fisiológicos de los insectos son característicos y, en algunos casos (como la hormona juvenil)

específicos, una manera de combatirlos será alterando dichos mecanismos, evitando así la toxicidad y acumulación que presentan los plaguicidas actuales (Williams, 1967; Slama et al., 1974). Así, se pretende atacar a los insectos actuando sobre su sistema endocrino. Para ello hace falta, como ya se ha mencionado, un estudio profundo del mismo, con especial hincapié en aquellos puntos en los que el insecto pueda ser más vulnerable.

2.- ASPECTOS DE LA FISIOLOGIA DE LOS INSECTOS QUE PUEDEN SER INTERESANTES PARA EL DESARROLLO DE NUEVOS INSECTICIDAS.

Como se ha visto anteriormente, la llamada Tercera Generación de Plaguicidas se halla encaminada a la búsqueda de nuevos insecticidas que actúen sobre el sistema endocrino de los insectos. Para ello, hace falta conocer a fondo dicho sistema, y así, poder atacar a los insectos en sus puntos débiles.

En líneas generales el sistema endocrino de insectos está constituido por las células neurosecretoras cerebrales, los *corpora cardiaca* y los *corpora allata* (Highnam y Hill, 1977).

Las células neurosecretoras producen la hormona de la activación, también llamada hormona cerebral, cuya misión es activar la secreción de ecdisona; esta hormona se almacena en los *corpora cardiaca*, desde donde se libera para ejercer su acción.

Los *corpora cardiaca* son los principales órganos de almacenamiento y liberación del material neurosecretor procedente del cerebro (Highnam y Hill, 1977).

Los *corpora allata* son glándulas endocrinas que muestran, durante el desarrollo postembrionario, una actividad cíclica en cada período de intermuda, cesando dicha actividad durante la metamorfosis y entrando de nuevo en acción cuando las hembras inician su fase reproductora. La hormona producida por estos órganos es la hormona juvenil (HJ) que interviene tanto en las fases juveniles del insecto, regulando su muda al siguiente estadio larvario, como en la fase adulta, interviniendo sobre la reproducción.

Las dos hormonas más importantes para el normal desarrollo

del ciclo vital de los insectos son la ecdisona y la hormona juvenil.

La ecdisona se produce en las glándulas protorácicas de los insectos, entrando en acción tras ser activadas por la hormona cerebral. La ecdisona es la responsable de la muda de los insectos, interviniendo también en el curtido de la nueva cutícula y en la regulación de los procesos mitóticos y de crecimiento de ciertos tejidos (Wigglesworth, 1970). Esta hormona está presente en cada uno de los pasos de un estadio larvario al siguiente, así como en el momento de la metamorfosis, es decir, en el paso ninfa-adulto en los insectos Hemimetábolos, y en el paso larva-pupa y pupa-adulto en los insectos Holometábolos (Fig. 1) (Wigglesworth, 1970; Slama et al., 1974).

La ecdisona tiene interacción con las células neurosecretoras del cerebro por un mecanismo de *feed-back* negativo (Fig. 2), por lo que al liberarse inhibe la secreción de hormona cerebral (Wigglesworth, 1970).

Por otro lado, la HJ tiene también un papel importante en la muda de los insectos, impidiendo la aparición de los caracteres adultos durante los estadios juveniles. Así, en los insectos Exopterigota, deja de segregarse esta hormona durante el último estadio ninfal, produciéndose la metamorfosis a insecto adulto (Wigglesworth, 1940). En los insectos Endopterigota, el proceso es similar, disminuyendo el nivel de HJ durante el último estadio larvario, induciendo la pupación, hasta anularse produciendo entonces la metamorfosis a adulto (Figs. 1 y 2) (Gilbert y Schneiderman, 1960).

Además, se ha comprobado que la HJ actúa en las hembras adultas como hormona gonadotrofa (Highnam y Hill, 1977), desempeñando también un papel metabólico en el control de la

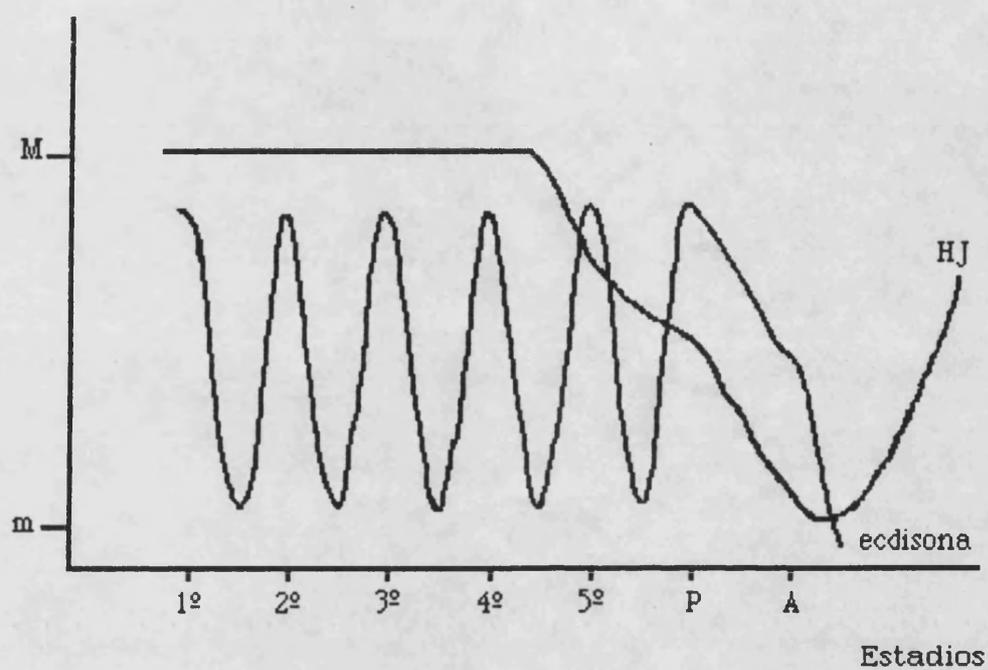


Figura 1.- Niveles de hormona juvenil (HJ) y ecdisona a lo largo del desarrollo en insectos.

M: nivel máximo; m: nivel mínimo.

1º-5º: estadios juveniles.

P: pupa; A: adulto.

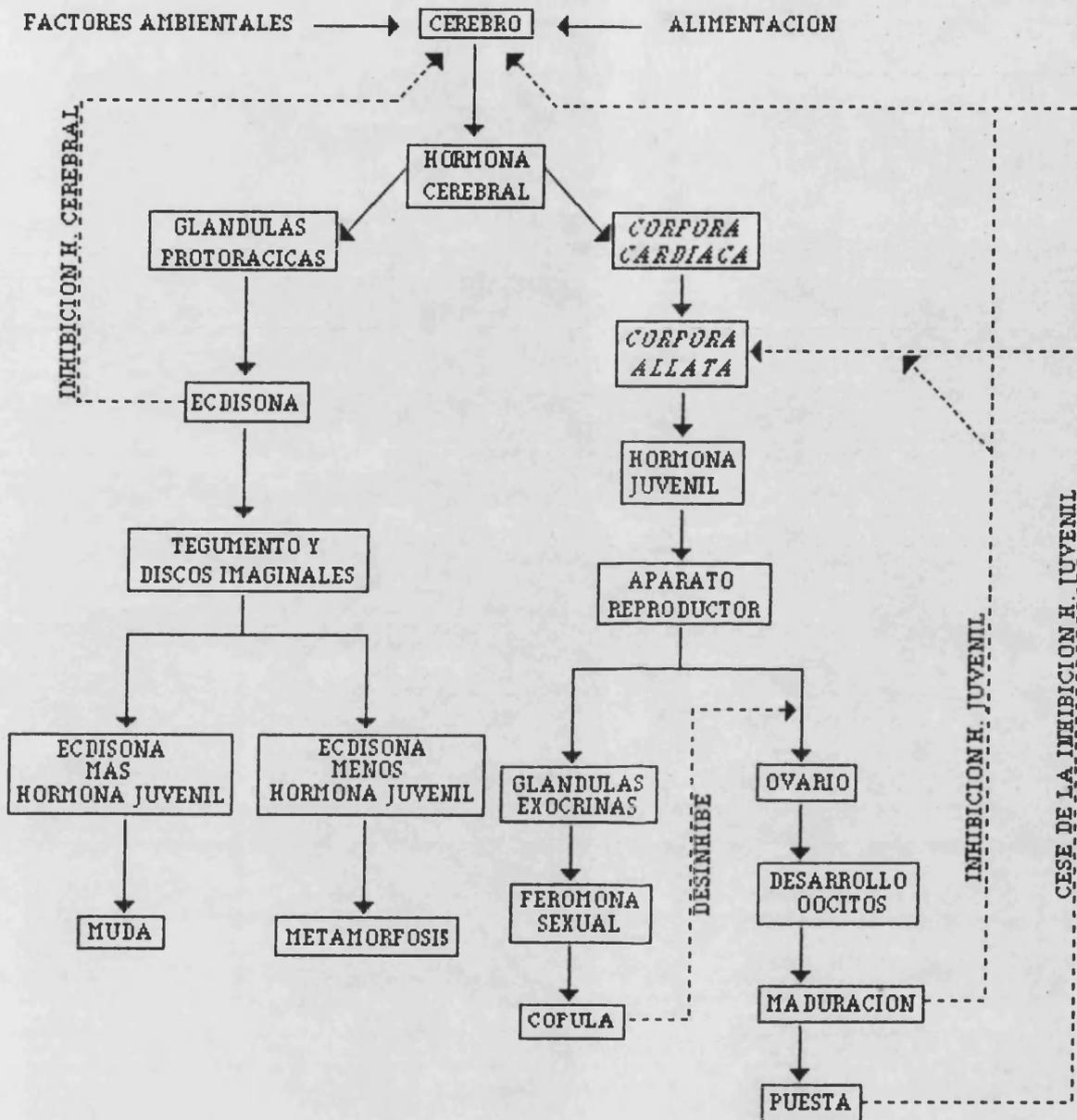


Figura 2.- Sistema endocrino de los insectos. Relaciones funcionales existentes entre los diversos órganos implicados.

vitelogenesis. Por un lado, es necesaria para que se formen los espacios interfoliculares que rodean al oocito en desarrollo (Pratt y Davey, 1972), así como para que tenga lugar la incorporación de vitelogeninas (Bell, 1969; Bell y Barth, 1971; Kelly y Davenport, 1976). Por otro lado, en diversas especies de insectos, la HJ controla directamente la síntesis de proteínas específicas por parte del cuerpo graso (Bell, 1969; Engelmann, 1970; Wyatt y Pan, 1978).

Existen, además de las ya mencionadas, otras hormonas en insectos que, si bien no intervienen directamente en su desarrollo y reproducción, sí tienen su importancia al poder ser utilizados sus análogos como reguladores del crecimiento de insectos.

Este sería el caso del bursicón, hormona presente en diversas especies de insectos y que ejerce, junto con la ecdisona, un papel importante en la regulación del curtido y oscurecimiento de la cutícula (Highnam y Hill, 1977). El Diflubenzurón, antagonista de la anterior, ya se encuentra comercializado con el nombre de Dimilin®.

Otras hormonas, importantes en el desarrollo de compuestos análogos a la HJ y su uso como posibles insecticidas, son la hormona diurética y antidiurética (Highnam y Hill, 1977; Raabe, 1982), por su relación con los sistemas de secreción de fluidos por los túbulos de Malpighio (Goldsworthy y Mordue, 1974). Por tanto influirán en la rápida eliminación de la HJ o sus análogos cuando éstos se encuentren en niveles excesivos.

Como se puede comprobar, la HJ se halla presente en los insectos sólo en determinadas fases durante su ciclo de desarrollo. Dado que esta hormona es la más importante en el crecimiento y la reproducción de los insectos, podemos actuar sobre éstos consiguiendo que la hormona se encuentre en ellos en momentos

en que no debería estarlo, o bien, haciendo que esté presente en niveles más elevados que los normales. De este modo, la HJ intervendrá modificando las etapas normales de desarrollo y reproducción de los insectos, produciendo alteraciones en los mismos (Wigglesworth, 1970; Slama et al., 1974). Esta fué la idea básica para el desarrollo de los nuevos tipos de plaguicidas.

Las alteraciones producidas por la HJ, mencionadas anteriormente, son de distinto tipo, según se apliquen a las ninfas de los últimos estadios ninfales, o a las hembras adultas (Fig. 3).

En el primer caso se produce una prolongación del estado de ninfa, apareciendo ninfas supernumerarias, cuando se trata de insectos Heterometábolos. Por lo general, estas ninfas mueren al no poder deshacerse de su exuvia en la siguiente muda (Wigglesworth, 1970; Slama et al., 1974). En los insectos Holometábolos las alteraciones se manifiestan por la aparición de larvas o pupas supernumerarias, produciéndose también individuos con caracteres intermedios entre pupa y adulto.

En el segundo caso se altera el ciclo de reproducción, produciéndose huevos inviables o quedando éstos a mitad de su desarrollo por un bloqueo de la embriogénesis (Brookes, 1972; Riddiford, 1972).

Por último, se ha comprobado que la HJ juega un papel importante en el cese de la diapausia (Slama et al., 1974), por lo que una aplicación de esta hormona o sus miméticos a insectos que se encuentran en este estado, durante periodos que les son desfavorables en cuanto a condiciones climáticas y de alimentación, provocará su muerte al no encontrarse en condiciones favorables.

No obstante lo anteriormente mencionado, el empleo de

miméticos de la HJ como plaguicidas solamente permite la obtención de los resultados deseados en el caso de insectos perjudiciales en el estado adulto, además de que sólo afectan al insecto durante el último estadio ninfal (en insectos Hemimetábolos) o durante el estado de pupa (en insectos Holometábolos), que son los estadios del desarrollo en que la HJ debe estar ausente.

2.1.- ANTAGONISTAS DE LA HORMONA JUVENIL.

Aunque las alteraciones producidas en el insecto son irreversibles, y letales en la mayoría de los casos, si la aplicación del producto no es correcta, tanto en el tiempo como en el espacio, los resultados del tratamiento pueden ser contrarios a los fines perseguidos. Es decir, si se aplican demasiado pronto, se obtienen ninfas o larvas supernumerarias, que por su mayor tamaño producen mayor daño. Si se aplican demasiado tarde, actúan como hormonas gonadotrofas, favoreciendo la reproducción de la especie que se pretende combatir (Bowers, 1976; Williams, 1976).

Así, el conocimiento de que la HJ es necesaria para que puedan tener lugar toda una serie de importantes procesos fisiológicos, condujo a la búsqueda de sustancias que presentasen una acción antihormonal (Bowers, 1976), lo que desde el punto de vista de su aplicación como sustancias insecticidas presentaría indudables ventajas frente al uso de los análogos hormonales.

Las ventajas de estos compuestos antihormonales, serían las mismas vistas para la HJ y sus análogos, pero además serían eficaces tanto sobre los insectos inmaduros, alterando el proceso normal de desarrollo, como sobre los adultos, produciendo la

esterilidad (Bowers, 1976). El descubrimiento de la juvabiona había puesto de manifiesto la presencia en plantas de compuestos con actividad de HJ (Williams, 1967), por lo que se pensó que sustancias con actividad de antihormona juvenil podrían también encontrarse en plantas, como un sistema propio de defensa contra los insectos (Bowers et al., 1976).

Así, se aislaron de la planta *Ageratum houstonianum* dos compuestos con actividad antagonista de la HJ, a los que se les dió el nombre de precocenos, debido a su capacidad para inducir metamorfosis precoz a insecto adulto (Bowers, 1976; Bowers et al., 1976).

Posteriormente, se ha podido comprobar un amplio espectro de las actividades biológicas de los precocenos, sobre todo del precoceno II (PII), en diferentes especies de insectos, fundamentalmente del orden Hemiptera (Masner et al., 1979; Bowers y Soderlund, 1981; Garcerá Zamorano et al., 1981), y también en algunas especies de Ortoptera (Nemec et al., 1978; Pedersen, 1978; Pener et al., 1978; Miall, 1980; Unnithan et al., 1980; Chênevert et al., 1981), Coleoptera (Bowers y Soderlund, 1981), y Diptera (Samaranayaka-Ramasamy y Chandbury, 1981; Wilson et al., 1983).

Entre las respuestas ocasionadas por los precocenos cabe destacar: esterilización de hembras adultas (actividad gonadotrófica), inhibición en la producción de atrayentes sexuales, metamorfosis precoz, alteraciones metabólicas en la síntesis de proteínas, etc. (Bowers et al., 1982). Todos estos efectos sugieren la inducción de una alteración en la síntesis y/o secreción de HJ en el insecto, lo cual está apoyado por los exámenes histológicos de los *corpora allata* de distintas especies sensibles a los precocenos.

Mediante los citados exámenes se ha podido demostrar la destrucción de las células parenquimáticas de dichas glándulas (Unnithan et al., 1977, 1980; Liechty y Sedlak, 1978; Schooneveld, 1979 a,b).

Por otro lado, se ha podido demostrar que, aunque los precocenos producen esterilidad permanente en aquellas especies sensibles, el tratamiento posterior con HJ o sus análogos es capaz de inducir el desarrollo de los oocitos, lo que es indicativo de que los ovarios, órgano diana de la hormona juvenil, no son afectados directamente por el tratamiento con dichos productos activos (Bowers y Martínez Pardo, 1977).

Todo lo anteriormente expuesto respecto al uso de los hormonomiméticos y antijuvenilizantes como insecticidas necesita de una investigación previa en el laboratorio. Para ello hace falta desarrollar toda una serie de métodos de evaluación de estos compuestos, a fin de agilizar dichas investigaciones así como obtener resultados en un plazo de tiempo lo más breve posible.

2.2.- METODOS DE VALORACION DE LOS AGENTES AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LA HORMONA JUVENIL.

Los primeros ensayos de valoración de la actividad de hormona juvenil realizados por Williams (1956) consistían en la inyección de extractos lipídicos de *Cecropia* en pupas. Desde entonces hasta nuestros días, se ha desarrollado toda una serie de nuevos métodos capaces de detectar trazas de actividad juvenilizante. Estos métodos se hicieron especialmente importantes desde el momento en que los compuestos miméticos de la HJ comenzaron a ser interesantes como posibles

controladores de plagas.

En unos casos, el compuesto a ensayar se aplica directamente sobre el insecto, ya sea tópicamente, por inyección, etc.. Dentro de este tipo de ensayos de aplicación directa cabe mencionar:

- *Tenebrio Unit Test* de Karlson y Nachtigall (1961) que mide la cantidad mínima de sustancia que es capaz de producir algún grado de modificación en la cutícula del adulto emergido de una pupa tratada.

- Test gonadotrófico de Kunkel (1973), modificado por Pincus (1977), en el que se mide la longitud del oocito terminal de los ovarios tras haber inyectado el producto en hembras cuya cabeza se ha ligado previamente.

También se utilizan, dentro de los ensayos de aplicación directa, los epidérmicos, por mostrar la mayor sensibilidad para el estudio de los análogos de la HJ. Dentro de este grupo el más utilizado es el *Galleria Wax Test* de Gilbert y Schneiderman (1960). Consiste en raspar un cuadrado de 1 mm sobre la cutícula del insecto, tapándolo a continuación con una mezcla al 50% de parafina y aceite de oliva al que se ha adicionado el producto a ensayar. La actividad del compuesto como juvenoide se mide por la aparición de una mancha de cutícula pupal en el lugar de la operación.

En los ensayos de aplicación indirecta se pretende que el insecto se encuentre en contacto constante con el producto que se desea estudiar, para lo cual basta tratar el entorno donde vive con el compuesto a investigar (Wright et al., 1973, 1974; Williams y Amos, 1974; DeVries y Brown, 1977). También se realiza este tipo de ensayos al tratar la comida que posteriormente va a ingerir el insecto (Wright, 1970; Wright et al., 1973, 1974; Riddiford et al.,

1975).

Especial mención merecen los ensayos *in vitro* que, aunque no se utilizan cuando se pretende estudiar las alteraciones morfológicas, ocasionadas por los distintos compuestos durante la metamorfosis, se han empleado en el estudio de sus efectos gonadotróficos. En este campo, se han usado para averiguar el papel de la HJ en la síntesis de proteínas vitelogénicas en el cuerpo graso (Brookes, 1969) y para estudiar el desarrollo del ovario y la influencia de la HJ sobre él (Laverdure, 1972, 1975).

Finalmente, el trabajo de Slama y Hodková (1975) sobre las alteraciones inducidas en la tasa metabólica de *Dermestes vulpinus* tras la aplicación de hormona juvenil exógena, ha llevado a algunos autores a estudiar dicha tasa (Kuusik et al., 1980, 1983). De esta manera, relacionan la alteración de la tasa metabólica de insectos Holometábolos previamente tratados con compuestos potencialmente bioactivos con su actividad juvenilizante.

Las técnicas de ensayo para estudiar la actividad antijuvenilizante no se han desarrollado tanto como las anteriores, debido, seguramente, a que el descubrimiento de los antagonistas de la hormona juvenil es relativamente reciente (Bowers et al., 1976).

Todas las técnicas de estudio tienen ventajas cuando se conoce la probable actividad (hormonomimética o antijuvenilizante) que presentará un compuesto. Sin embargo, cuando ésta no se conoce, presentan inconvenientes, puesto que es necesario recurrir a más de un ensayo, generalmente tres: uno que permita medir la actividad de HJ, otro que mida la actividad antagonista de ésta, y un tercero que nos indique la actividad simplemente tóxica. El

retraso en la obtención de resultados es obvio.

Los estudios realizados sobre la respiración en insectos, y la influencia de la HJ sobre ésta, parecen indicar que esta hormona induce alteraciones en la tasa respiratoria de los insectos, produciendo una respuesta hipermetabólica (Slama y Hodková, 1975; Llavador Enguix et al., 1981; Nemeč, 1985). Por otro lado se postula que la aplicación de precocenos debe disminuir dicha tasa metabólica, al ser antagonista a la hormona juvenil.

Así pues, estas variaciones en la tasa respiratoria pueden ser utilizadas para evaluar la actividad de un producto. El desarrollo de un método como el perseguido en este trabajo permitirá un estudio de los resultados más rápido que el obtenido con los métodos tradicionales, y posibilitará la determinación de la actividad de un compuesto, ya como hormonomimético o como antijuvenilizante, en un sólo ensayo.

Así pues, y para centrarnos en este tema, pasaremos a continuación al estudio de la respiración en insectos y su relación con el metabolismo.

3.- RESPIRACION Y METABOLISMO.

El oxígeno es un elemento necesario en los procesos vitales y funciones metabólicas de los organismos aerobios. Al mismo tiempo, la cantidad de este elemento presente en un ambiente determinado, a disposición de los seres vivos, llega a ser un factor condicionante en su distribución ecológica y en su supervivencia (Prosser, 1973; Medrano y Gall, 1976).

Las primeras etapas de la evolución química se presentaron en condiciones anaerobias, cuando la Tierra tenía una atmósfera reductora. El paso de atmósfera reductora a oxidante se presentó hace unos dos mil millones de años, y fué de larga duración. El porcentaje con que se presenta la fotosíntesis es de tal magnitud que todo el oxígeno atmosférico pudo haberse formado en dos mil años (Prosser, 1973).

Los términos **respiración** y **metabolismo** tienen varios significados. Se entiende por respiración externa aquellos mecanismos por los cuales el oxígeno es conducido hasta el interior del organismo y el anhídrido carbónico es expelido de él; respiración interna o metabolismo intermediario sería la suma de reacciones enzimáticas, oxidativas y no oxidativas, por las cuales se libera energía que es utilizada para realizar trabajo biológico. El metabolismo se manifiesta, pues, en términos de oxígeno consumido, calor producido o anhídrido carbónico liberado.

Debido a su fácil medida, la respiración es el factor más comunmente usado para conocer la intensidad del metabolismo aerobio, y el índice más utilizado para estudiar y comparar agentes o condiciones que afectan la tasa metabólica de un organismo o tejido vivo (Keister y Buck, 1974; Aboul-Nasr et al.,

1976).

Del mismo modo, el desarrollo postembrionario de los insectos se desarrolla como distintos ciclos, caracterizados cada uno de ellos por cambios específicos en la estructura y función, relacionados con cambios fisiológicos y condiciones hormonales particulares; por lo tanto, cada uno de estos ciclos también puede estar caracterizado por un cierto tipo específico de metabolismo total corporal (Slama y Hodková, 1975; Mahanta, 1976).

Así, Bertalanffy utiliza la respiración como una medida del anabolismo, indicando que la tasa respiratoria específica disminuye a medida que aumenta el peso, por lo que la respiración debe ser un factor dinámico que influye en el cambio de peso de un organismo, así como un monitor de los procesos fisiológicos (Bertalanffy, 1960; Knight et al., 1976). Consecuentemente, la tasa de utilización de oxígeno constituirá una medida de la actividad metabólica de cada célula y tejido en el cuerpo, y puede pensarse que su estudio revelará importantes relaciones entre eficiencia metabólica y crecimiento, en animales (Medrano y Gall, 1976).

También se ha prestado especial atención a la mejor forma de expresar la tasa respiratoria. En Vertebrados la forma más utilizada es la del peso seco de tejidos, basada en que los tejidos varían más su contenido en agua que en materia sólida.

Tales bases no serían admisibles para el caso del insecto entero, debido al aumento relativo en la tasa del exoesqueleto y a causa de que el cuerpo graso tiene una importancia diferente como sistema de reserva, según el insecto de que se trate. Además, esta idea puede reunir dos conceptos erróneos: que el agua es metabólicamente inerte, y que la hidratación de los

tejidos cambia, necesariamente, con los cambios en el contenido acuoso corporal (Keister y Buck, 1974).

3.1.- SISTEMA RESPIRATORIO EN INSECTOS.

Como ya es sabido, la respiración en los insectos se realiza a través del sistema traqueal. En este tipo de respiración, el aire llega directamente a las células metabolizadoras, sin presencia de sangre (Prosser, 1973).

Las tráqueas se ramifican por todos los órganos y apéndices de los insectos, hasta formar ramas muy finas, las traqueolas. Generalmente el aire entra en las tráqueas a través de los espiráculos, localizados en cada segmento a lo largo del tórax y abdomen (Richards y Davies, 1984).

Las traqueolas representan las ramificaciones finales del sistema traqueal, estando rodeadas de una célula palmeada, llamada célula traqueal, a modo de válvula. Las traqueolas, en algunos casos, como en los músculos del vuelo, suelen penetrar en las mismas células, pero en otros forma una envoltura superficial del tejido (Prosser, 1973; Bursell, 1974). Las traqueolas más finas suelen estar llenas de fluido.

Histológicamente las tráqueas están compuestas de una capa de células epiteliales y de una membrana basal, que se continúan directamente con las capas correspondientes que constituyen la pared corporal. La membrana cuticular forma pliegues que se disponen en espiral formando los llamados tenidios, estructuras que sirven de sostén impidiendo que se cierren los tubos por compresión (Bursell, 1974; Richards y Davies, 1984).

Para que la incorporación del oxígeno a los tejidos se pueda

llevar a cabo, hace falta que: el gas entre en el sistema traqueal, sea transportado hasta sus ramificaciones más finas, y pase desde ellas hasta las células correspondientes.

El transporte de oxígeno a las tráqueas internas parece que se realiza por simple difusión a favor de un gradiente de presión parcial, cuando se trata de insectos pequeños o inactivos. Sin embargo, en los otros casos, debe ser ayudado por una succión pasiva, asociada a una respiración discontinua, o por una ventilación activa, por la cual, mediante la compresión del tórax y abdomen del insecto, se expulsa el aire contenido en las tráqueas, siendo reemplazado con aire fresco cuando dichas zonas corporales vuelven a su lugar. En el primer caso, el CO_2 se almacena, siendo expulsado violentamente en los momentos de actividad espiracular (Miller, 1974; Richards y Davies, 1984).

El intercambio respiratorio entre las traqueolas y los tejidos depende de la difusión.

La regulación de la actividad respiratoria se debe al control de los espiráculos (apertura o cierre) y al control de la ventilación (variaciones de la frecuencia e intensidad de los movimientos respiratorios), así como a la coordinación de ambos procesos (Miller, 1974).

El movimiento de los espiráculos está regulado, en algunos casos, por la concentración de oxígeno en el aire traqueal y la acumulación de CO_2 en los tejidos, siendo, probablemente, la acción local del anhídrido carbónico el estímulo más directo, aunque no se descarta la posibilidad de una acción nerviosa a través de los ganglios de la cadena nerviosa ventral (Richards y Davies, 1984).

Los movimientos de ventilación también están regulados por

la falta de oxígeno y la acumulación de CO₂, estando relacionados con un control nervioso a través de centros locales, en el propio segmento abdominal, y por centros torácicos secundarios.

Combinando los movimientos de ventilación con una apertura y cierre adecuados de los espiráculos, se puede conseguir un flujo de aire dirigido a través del sistema traqueal.

Como es lógico, el consumo de oxígeno de los animales presenta valores diferentes, dependiendo de la especie. Sin embargo, estos valores son válidos sólo para las condiciones en las que se realizó la medida correspondiente, habiéndose demostrado que el consumo de oxígeno depende de diversos factores.

Pasamos a continuación a mencionar dichos factores y describir brevemente su forma de actuación sobre la tasa respiratoria de los insectos.

3.2.- FACTORES QUE MODIFICAN LA TASA RESPIRATORIA DE INSECTOS.

En primer lugar hay que mencionar que la **actividad** es uno de los factores intrínsecos del organismo que modifican el consumo de oxígeno, siendo, por otro lado, el más difícil de regular.

No obstante, el metabolismo basal, o consumo de oxígeno necesario para el automantenimiento, es difícil de determinar, ya que a pesar de la inmovilidad aparente de los insectos, su respiración no representa necesariamente el nivel mínimo de metabolismo necesario para sobrevivir (Keister y Buck, 1974). Las fluctuaciones observadas en la tasa respiratoria de los insectos sugieren la posibilidad de una regulación metabólica repentina,

independientemente de cualquier movimiento visible.

Generalmente se obtienen resultados de consumo de oxígeno más constantes cuando se toman medidas de metabolismo a un nivel máximo de actividad forzada, como el vuelo en los insectos (Miller, 1974), que puede originar un aumento en la tasa respiratoria de 50 a 100 veces respecto a la fase de descanso (Prosser, 1973).

Otro factor importante que influye en la tasa metabólica de los insectos son los ritmos circadianos. Los insectos, en sus ambientes naturales, poseen ritmos de actividad acordes con las circunstancias físicas que les rodean, lo que se traduce en cambios de su metabolismo (Prosser, 1973). Por lo tanto, estas variaciones se verán reflejadas en su tasa respiratoria, la cual presentará también ritmos cíclicos.

Así, se ha podido observar variaciones rítmicas del consumo de oxígeno con respecto a períodos de luz y oscuridad en varias especies de insectos (Kapoor, 1972; Chiba et al., 1973; Beck, 1980; Guerra et al., 1983). También, algunos insectos parecen disponer de sistemas compensatorios de su tasa metabólica con respecto a cambios estacionales del fotoperiodo (Horwarth y Duman, 1983).

El sexo es también un factor importante que afecta la tasa metabólica de los insectos, observándose, por regla general, un mayor consumo de oxígeno en los machos que en las hembras (Fourche, 1977a); cuando la hembra se encuentra en fase reproductora, se invierten los papeles y el macho consume menos oxígeno que la hembra. En otros casos, esta norma general es válida sólo en las etapas iniciales del desarrollo (Aboul-Nasr et al.,

1976). Finalmente se han observado casos en que la hembra presenta una tasa metabólica más elevada que el macho (Llavador Enguix et al., 1981).

En general, puede decirse que las diferencias metabólicas observadas en relación con el sexo son un reflejo de la actividad tisular, debida al diferente tono muscular y a la particular acción hormonal (Prosser, 1973; Young y Block, 1980).

Respecto a la **nutrición**, hay que mencionar que en animales que no tienen reservas suficientes, como es el caso de los insectos, el metabolismo depende principalmente de la ingestión de alimentos.

Así, se ha podido observar un aumento en la tasa respiratoria de larvas en periodo de alimentación (McEvoy, 1984), y un descenso tras la ingesta (Bosquet, 1971).

Otros autores (Aboul-Nasr et al., 1976; Young y Block, 1980) observan diferencias en el consumo de oxígeno, dependientes de la planta de la que se alimentan los insectos.

Otros factores que influyen sobre la tasa metabólica de los insectos son su **peso corporal** y su **estadio de desarrollo**, siendo relativamente difícil separar ambos conceptos.

El **peso corporal** es un factor importante si se tiene en cuenta que el índice de consumo de oxígeno se da por gramo de peso corporal, ya sea húmedo o seco, y, algunas veces, por individuo. Así, QO_2 o tasa metabólica expresaría los mililitros de oxígeno consumidos, en condiciones normalizadas de presión y temperatura, por gramo de peso y por hora.

Normalmente, en la mayoría de insectos estudiados, la tasa de consumo de oxígeno disminuye a medida que aumenta el peso corporal (Kapoor, 1974; Llavador Enguix et al., 1981) incluso cuando se estudia a diferentes temperaturas (Young, 1979; Migula et al., 1980; Howell y Voshell, 1982). Sin embargo, otros insectos no presentan esta correlación (Petitpren y Knight, 1970; Kapoor y Griffiths, 1975).

Cuando consideramos el ciclo de desarrollo, la tasa metabólica presenta variaciones entre los insectos Holometábolos y Heterometábolos.

Los primeros presentan un aumento de su tasa respiratoria a lo largo de las distintas etapas del desarrollo larvario. Después de ello se sucede una caída brusca en el consumo de oxígeno, para aumentar de nuevo en las fases anteriores a su emergencia como adulto. Esta curva metabólica en forma de U (Fig. 4) se encuentra en la mayoría de insectos Holometábolos (Guerra y Cochran, 1970; Tonapi y Mohan Rao, 1974; Aboul-Nasr et al., 1976; Mahanta, 1976; Tonzetich et al., 1976; Baker et al., 1979). Cuando el insecto llega a la edad adulta, su consumo de oxígeno es más elevado que en las etapas anteriores, fluctuando dentro de ciertos valores, dependiendo del sexo (Guerra y Cochran, 1970; Block, 1976; Baker et al., 1979; Young y Block, 1980).

En insectos Heterometábolos no está muy estudiada la relación entre consumo de oxígeno y ciclo vital de insectos. Parece ser que este grupo presentaría ciclos con aumento y disminución en su tasa respiratoria (Fig. 5), coincidiendo el incremento en la misma con la fase inmediatamente posterior a la muda, y su disminución con la etapa de intermuda (Zwicky y Wigglesworth, 1956; Slama, 1960).

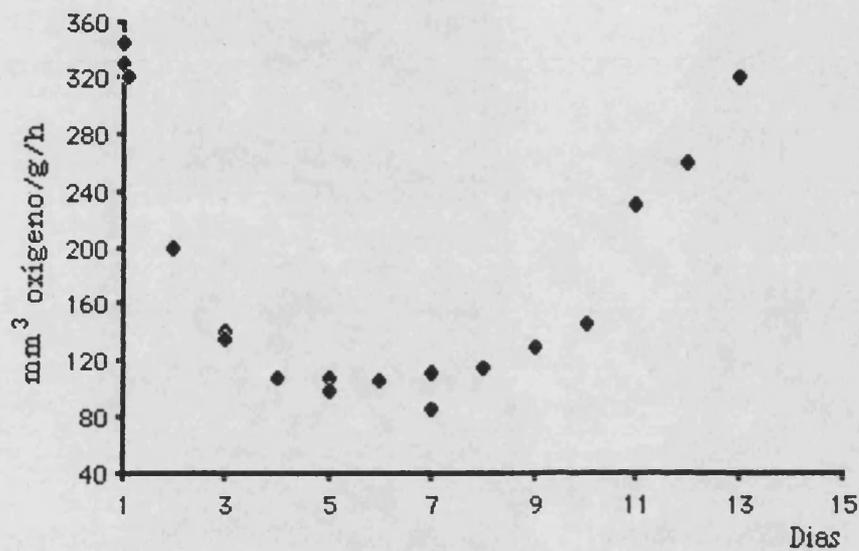


Figura 4.- Curva característica en forma de U del consumo de oxígeno de pupas de *Barathra brassicae* (Mahanta, 1976).

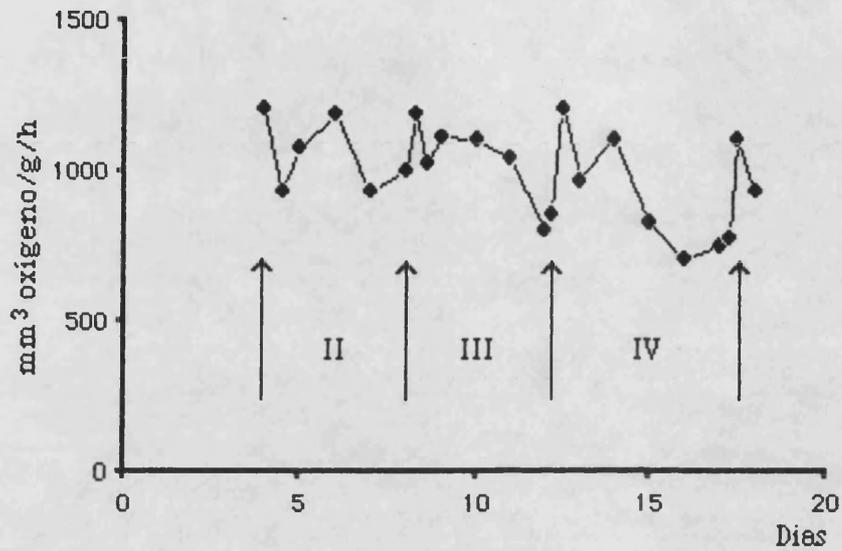


Figura 5.- Curvas de consumo de oxígeno de *Pyrrhocoris apterus* durante las fases juveniles.

II-IV: estadios juveniles. Las flechas indican el momento de la muda al estadio siguiente (modificado de Slama, 1960).

Finalmente, hay que mencionar otro factor muy importante relacionado con el consumo de oxígeno. Es la **temperatura** que influye directamente sobre la tasa respiratoria (Guillet y Fourche, 1973; Prosser, 1973; Keister y Buck, 1974; Knight y Simmons, 1975; Fourche et al., 1979; Hebling Beraldo y Garcia Mendes, 1982; Howell y Voshell, 1982), observándose que, tanto en insectos Holometábolos (Petitprey y Knight, 1970; Heiman y Knight, 1975; Fourche, 1977; Tonapi y Mohan Rao, 1977), como Heterometábolos (Berry y Brammer, 1975; Fytizas y Stavrali, 1984), el consumo de oxígeno aumenta con la temperatura hasta alcanzar un determinado límite, donde se estabiliza o decrece, debido, probablemente, a que se ha llegado a un rango de temperatura extremo para la especie cuestión de estudio.

Por otro lado, parece ser que, cuando nos acercamos a determinadas temperaturas, el consumo de oxígeno disminuye con la edad del insecto (Meyer y Schaub, 1973; Sohal et al., 1983); también está bastante aceptada la idea de que la respuesta de la tasa respiratoria a la temperatura depende en gran medida del estadio fisiológico del insecto (Fourche, 1977a,b; Modlin y Jayne, 1981).

Todas las variaciones anteriores se deben a factores ambientales extrínsecos a los insectos, o a elementos intrínsecos y específicos de una especie determinada.

Especial mención merecen las investigaciones encaminadas a estudiar las alteraciones en la tasa metabólica de los insectos cuando se les aplican sustancias que no son normales en su ecosistema. Es el caso de los insecticidas, que parecen aumentar,

inicialmente, el consumo de oxígeno de los insectos, aunque también se ha observado una disminución (Moreau et al., 1975). Otro ejemplo sería el de los **metales pesados**, existiendo diversidad de opiniones respecto a los efectos por ellos ocasionados: disminución de la tasa respiratoria (Keister y Buck, 1974; Migula, 1979); aumento, proporcional a la concentración de metal utilizada (Kapoor y Griffiths, 1976), o no alteración del consumo de oxígeno (Sohal et al., 1985).

También hay que apuntar los cambios observados en la tasa respiratoria de los insectos, relacionados, seguramente, con el **sistema hormonal**, y que pasamos a estudiar a continuación.

4.- INFLUENCIA DE LA HORMONA JUVENIL SOBRE LA TASA METABOLICA DE INSECTOS.

La hormona juvenil tiene gran importancia, tanto en el desarrollo de los insectos durante las fases juveniles, como en su reproducción, en la fase adulta, donde es imprescindible para la vitelogénesis.

En este trabajo ya se han mencionado las alteraciones originadas por dicha hormona sobre el desarrollo y la reproducción de los insectos, cuando se halla presente en momentos en que no debería estarlo. También se han descrito las relaciones entre el consumo de oxígeno de los insectos y su desarrollo, haciendo mención a las variaciones de su tasa respiratoria dependientes del grado de desarrollo del animal.

Así pues, y dado que la HJ interviene en el crecimiento y desarrollo de los insectos, otro de los factores que intervendrá en la alteración de su tasa respiratoria será las variaciones en la concentración de dicha hormona.

Como ya se ha anotado, los estudios realizados sobre la respiración indican que la tasa respiratoria de los insectos varía según factores intrínsecos, tales como peso, ciclo vital, etc. (Knight et al., 1976), y según factores extrínsecos específicos como temperatura, actividad, etc. (Aboul-Nasr et al., 1976).

En este sentido, habría que apuntar las alteraciones observadas en la tasa respiratoria de insectos, considerados en su conjunto, como consecuencia del tratamiento con HJ o sus análogos (Novak y Slama, 1962; Slama, 1965; Slama y Hodková, 1975; Kryspin-Sorensen et al., 1977; Slama y Kryspin-Sorensen, 1979; Llavador Enguix et al., 1981; Kuusik et al., 1980, 1983).

La mayoría de los trabajos realizados para estudiar las alteraciones inducidas por la aplicación exógena de HJ o sus análogos sobre la tasa respiratoria de insectos, están encaminados a la observación de tales variaciones en insectos Holometábolos (Slama y Hodková, 1975; Kryspin-Sorensen et al., 1977; Slama y Kryspin-Sorensen, 1979; Kuusik et al., 1980, 1983) que se encuentran en sus últimas fases de desarrollo larval, o en el estado de pupa, incluyendo aquí pupas diapausantes y no diapausantes. Pocos trabajos se han realizado sobre el consumo de oxígeno de insectos Holometábolos adultos y las alteraciones producidas en ellos por la HJ. Son asimismo escasos los estudios sobre insectos Heterometábolos (Novak y Slama, 1962; Slama, 1965; Llavador Enguix et al., 1981). De cualquier forma éstos se centran sobre las fases juveniles de los insectos, aunque en algún caso se mencione a los adultos (Llavador Enguix et al., 1981).

No obstante lo anteriormente citado, en todos los casos se observa un claro aumento de la tasa respiratoria de los insectos como consecuencia del tratamiento con HJ o sus análogos, lo que se ha denominado como respuesta hipermetabólica.

Este efecto parece estar correlacionado con la capacidad de la HJ o sus análogos para producir cambios a nivel de diferenciación celular, aumentando la cantidad de tejido que participa en el metabolismo activo, es decir, que los efectos son indirectos dependiendo del grado con que se inducen cambios morfológicos y fisiológicos en los tejidos reaccionantes (Novak y Slama, 1962; Sehnal y Slama, 1966; Slama y Kryspin-Sorensen, 1979).

Sin embargo, también se ha podido observar que, en algunos casos, esta respuesta hipermetabólica no está asociada con alteraciones morfológicas externas (Slama y Hodková, 1975).

Además, este fenómeno se ha correlacionado claramente con la dosis utilizada y el tipo de juvenoide aplicado.

A pesar de ello, esta respuesta no ha sido observada en todos los casos estudiados (Kryspin-Sorensen et al., 1977) e incluso en algunos se observa una marcada actividad hipometabólica cuando se prolonga el tratamiento (Fytizas y Mourikis, 1981).

Por otro lado, hay que tener presente que todos los estudios realizados concernientes al consumo de oxígeno se prolongan a lo largo de un estadio de desarrollo del insecto, o incluso de varios, alcanzando en algunos casos hasta la ecdisis al estado adulto.

Estudios relacionados con lo anteriormente expuesto serían los realizados cuando se extirpan los ovarios, órganos diana de la HJ, observándose, según el insecto de que se trate, una respiración menos intensa del animal (Caussanel y Célérrier, 1985; Clifford y Woodring, 1986), o bien no presenta ningún efecto sobre la tasa respiratoria (Couillaud y Girardie, 1984). También se ha observado que la decapitación o ligadura del cerebro de los insectos, así como la alatectomía quirúrgica, disminuyen su tasa respiratoria (Keister y Buck, 1974; Caussanel y Célérrier, 1985), por lo que cabría esperar un efecto similar al aplicar PII, compuesto de acción antagónica a la presentada por la HJ, lo que podría considerarse como una alatectomía química.

5.- CONSUMO DE OXIGENO Y ORGANOS DE INSECTOS.

Como se ha mencionado anteriormente, existe una relación inversa entre tasa respiratoria y peso corporal, cuando nos referimos al insecto en su totalidad. Al considerar los pesos relativos de los distintos órganos, no cabría esperar que el consumo de oxígeno de los distintos tejidos cambie como lo hace el metabolismo total.

Se han realizado muchos estudios sobre la tasa respiratoria en insectos, pero pocos han progresado en el sentido de las contribuciones relativas que tendrían los tejidos y procesos celulares en el metabolismo global. Los estudios realizados en este sentido se refieren, principalmente, a ovarios y cuerpo graso (Müller y Engelmann, 1968; Fourche y Ambrosioni, 1969; Brown y Chippendale, 1977; Ladel et al., 1979), y más recientemente a cerebro y recto (Houlihan y Sell, 1984; Kern, 1985).

A continuación vamos a resaltar algunos aspectos de la morfología y fisiología de aquellos órganos que se han utilizado para el estudio *in vitro* de las alteraciones de su consumo de oxígeno.

5.1.- TUBO DIGESTIVO.

Morfológicamente, el tubo digestivo puede dividirse en tres partes, de acuerdo con su origen embriológico: el intestino anterior o estomodeo y el intestino posterior o proctodeo proceden de invaginaciones ectodérmicas; el intestino medio o mesenteron, que conecta los dos anteriores, se desarrolla, probablemente, a partir del endodermo (Richards y Davies, 1984).

Cada una de estas tres partes presenta, a su vez, distintas zonas y divertículos, que pueden modificarse según el tipo de alimentación y el grupo de insectos considerado.

El estomodeo suele dividirse en: cavidad bucal, esófago, buche y molleja o proventrículo. En la unión entre el intestino anterior y medio existe, a menudo, una válvula cardíaca o esofágica.

El intestino medio suele denominarse también estómago o ventrículo, variando enormemente su forma y capacidad; suele presentar cierto número de evaginaciones o ciegos gástricos para aumentar la superficie de absorción.

El comienzo del proctodeo suele estar marcado por una válvula pilórica y la inserción de los túbulos de Malpighio; en esta región del canal alimenticio puede distinguirse hasta tres zonas: ileo, colon y recto (Bursell, 1974; Richards y Davies, 1984).

La estructura anteriormente descrita es la general para todos los órdenes de Insectos. En el caso de Hemiptera (Heteroptera), orden al que pertenece *Oncopeltus fasciatus*, insecto del que se han extraído los órganos para el estudio de su consumo de oxígeno, esta estructura tiene las siguientes modificaciones (Fig. 6):

- carecer de buche estomodeal, aunque la región anterior del intestino medio puede estar dilatada de modo comparable.

- intestino medio diferenciado en 2, 3 ó 4 segmentos: el anterior, ya mencionado, va seguido de un segmento tubular que lleva los ciegos, en aquellas especies que los poseen, estando ausentes en *Oncopeltus*.

- inclusión, en el epitelio del proctodeo, de células mayores, fuertemente basófilas, que pueden estar esparcidas o restringidas a zonas del recto, en forma de almohadilla (Richards y Davies, 1984).

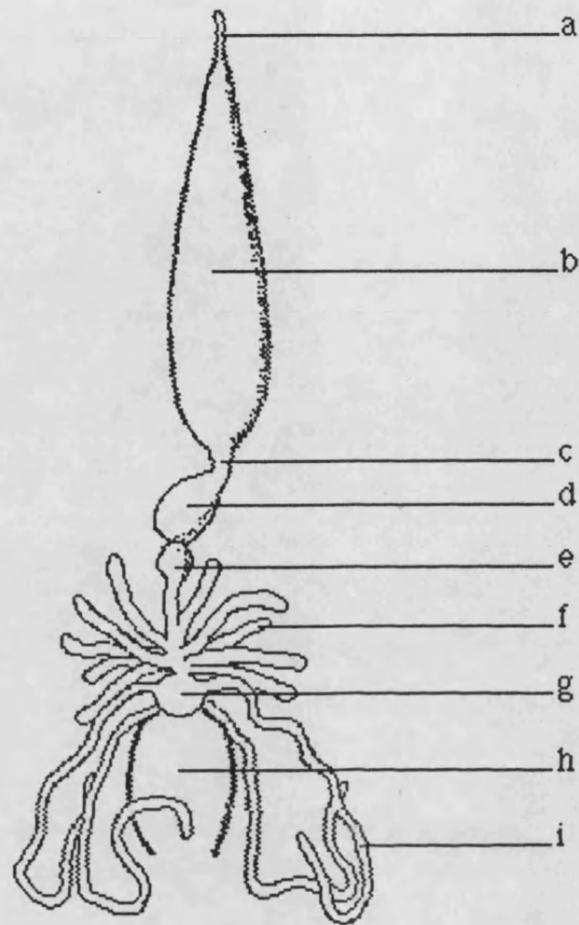


Figura 6.- Dibujo esquemático del tubo digestivo de Ligeidos (de Richards y Davies, 1984).

a: esófago.

b, c, d, e: cámaras del intestino medio.

f: ciegos gástricos.

g: íleo.

h: recto.

i: tubos de Malpighio.

Los estudios del consumo de oxígeno encontrados en la Bibliografía se han realizado sobre el recto, y apuntan a una inmediata estimulación de la tasa respiratoria relacionada con la cantidad de fluido absorbido (Houlihan y Sell, 1982, 1984).

Por otro lado, este órgano se ha elegido para el estudio de su tasa metabólica porque algunos autores (Cassier et al., 1972; Aubry, 1975; Cassier y Fain-Maurel, 1977) apuntan la existencia de cierto número de células en el epitelio gástrico cuyas características morfológicas las asemejan a células de tipo endocrino del tubo digestivo de Vertebrados.

5.2.- CUERPO GRASO.

El cuerpo graso puede considerarse como el principal órgano de almacenamiento en los insectos. Está constituido por masas o agregados irregulares de células redondeadas o polihédricas, llamadas trofocitos, que forman lóbulos y capas de tejido que revisten los órganos internos del cuerpo. Según la especie considerada, el cuerpo graso puede ser blanco, amarillo, anaranjado o verdoso. Los lóbulos del cuerpo graso están envueltos por una lámina de tejido conectivo extracelular. La disposición difusa del tejido adiposo tiene por objeto facilitar el intercambio de material entre él y la hemolinfa que lo baña.

Las variaciones en las reservas alimenticias del cuerpo graso dependen del estado de nutrición del insecto, así como de su ciclo de crecimiento y reproducción.

Debido a la importancia del cuerpo graso en el metabolismo intermediario, de su papel como almacén de reservas alimenticias y de su función como detoxicador, a menudo se ha considerado a

este tejido como el equivalente al hígado de los Vertebrados (Bursell, 1974; Richards y Davies, 1984).

Existen numerosos trabajos donde parece demostrarse que el cuerpo graso sintetiza las vitelogeninas, proteínas necesarias para el completo desarrollo de los oocitos, bajo la influencia de la HJ (Hagedorn y Kunkel, 1979; Kaczor y Hagedorn, 1980; Turunen y Chippendale, 1980). Esta es la razón por la que se ha elegido este órgano para el estudio de su tasa metabólica.

En lo que respecta al consumo de oxígeno, los pocos trabajos realizados al respecto parecen apuntar hacia una tasa respiratoria elevada, variable según el estadio de desarrollo del insecto en el momento de la extracción del tejido (Müller y Engelmann, 1968; Brown y Chippendale, 1977; Ladel et al., 1979).

5.3.- OVARIOS.

Constituyen los órganos reproductores femeninos de los insectos (Fig. 7). Generalmente es un órgano par, más o menos consistente, rodeado de una fina capa epitelial, dispuesto en la cavidad abdominal del insecto, a ambos lados del canal alimenticio. Cada órgano está compuesto por un número variable de tubos, llamados ovariolos, que se abren en el oviducto. Ambos oviductos comunican entre sí en el oviducto medio, que desemboca, a su vez, en la vagina. El número de ovariolos por ovario es distinto, según la especie, variando por lo general entre 5 y 7. En *Oncopeltus fasciatus* hay 7 ovariolos por cada ovario.

En cada ovario se puede distinguir:

- **Filamento terminal:** es una prolongación apical del ovario.

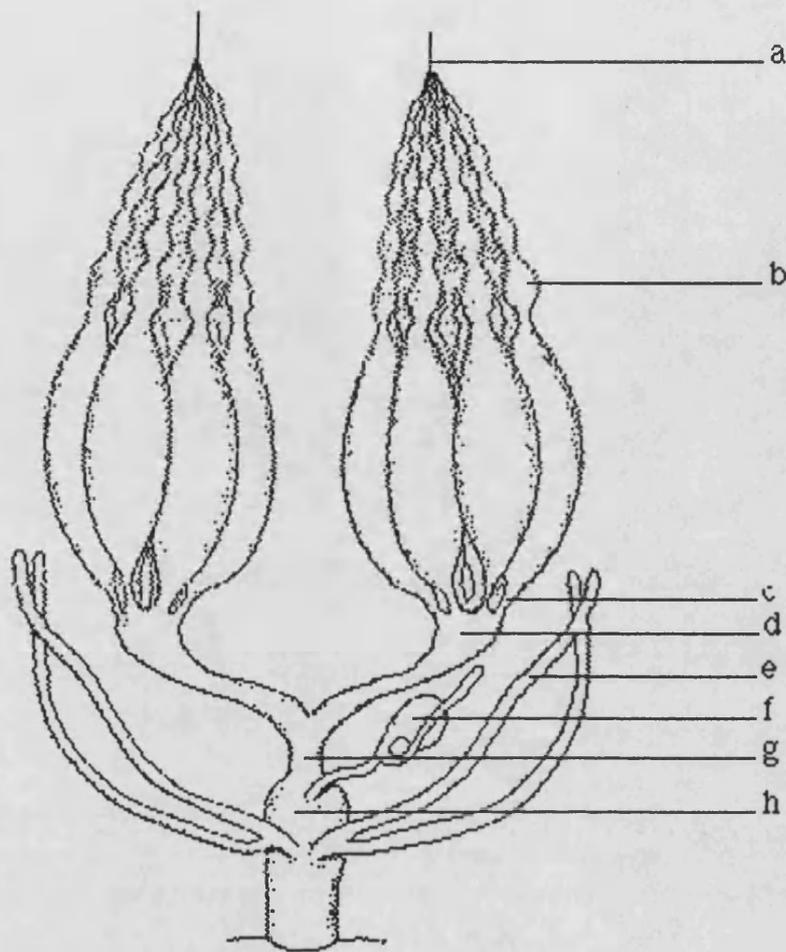


Figura 7.- Esquema de los órganos sexuales femeninos en Insectos (Highnam y Hill, 1977).

a: filamento terminal; b: ovario.

c: pedicelo; d: oviducto lateral.

e: glándula espermática;

f: glándulas accesorias; g: oviducto medio.

h: vagina.

Los filamentos terminales de los ovariolos de un ovario se unen para formar una única unidad que se une a la pared corporal para mantener los ovarios en su posición.

- **Germarium:** es la parte apical de cada ovario, consistente en una masa de células de las que se diferencian las células germinales principales y las células nutritivas. Johansson (1958), distingue, en *O. fasciatus*, tres zonas en esta región, según su actividad en diferenciar células germinales.

- **Vitellarium:** constituye la mayor parte del ovario, y contiene los oocitos en desarrollo. El epitelio folicular del vitellarium crece hasta que encierra a cada oocito en una cámara o folículo, que posteriormente segregará el corion, contribuyendo de esta manera al crecimiento del oocito.

- **Pedicelo:** zona que une el vitellarium de cada oocito con el oviducto lateral.

Según la presencia o ausencia de células nutritivas, y su localización, los ovariolos se clasifican en:

- **Panoísticos:** los oocitos se rodean de células foliculares desde su salida del germarium.

- **Politróficos:** los oocitos van acompañados, desde su salida del germarium, de células nutritivas que le suministran el alimento.

- **Telotróficos:** las células nutritivas se encuentran en el germarium y los oocitos se comunican con ellas a través de cordones nutritivos (Highnam y Hill, 1977; Richards y Davies, 1984).

Oncopeltus fasciatus presenta un ovario de tipo telotrófico (Johansson, 1958).

Por otro lado, y como ya se ha mencionado en párrafos

anteriores, la HJ juega un papel predominante en el completo desarrollo de los ovarios y posterior maduración de los oocitos. El control de la producción de vitelogeninas y liberación desde el cuerpo graso, así como su posterior incorporación en los oocitos, están regulados primeramente por la HJ (Engelmann, 1983). Por lo tanto, los ovarios serán un órgano excelente para el estudio de su tasa metabólica y las alteraciones ocasionadas por la HJ o el P II.

Por otro lado, los estudios sobre el consumo de oxígeno de este órgano apuntan a una relación entre el tamaño del ovario y su consumo de oxígeno, la cual está en función del crecimiento de los oocitos (Fourche y Ambrosioni, 1969).

5.4.- ALTERACIONES EN LA TASA METABOLICA DE ORGANOS AISLADOS.

Como se expone en apartados anteriores, la hormona juvenil juega un papel predominante en el desarrollo de los insectos durante sus fases juveniles, siendo también imprescindible en el estado adulto para el funcionamiento de sus ovarios.

Como ya se ha mencionado, el estudio del consumo de oxígeno de órganos aislados presenta una serie de inconvenientes que vienen reflejados en la poca Bibliografía encontrada al respecto (Wiens y Gilbert, 1965; Keeley y Friedman, 1967; Müller y Engelmann, 1968; Fourche y Ambrosioni, 1969; Brown y Chippendale, 1977; Ladel et al., 1979; Houlihan y Sell, 1982, 1984; Kern, 1985).

Más restrictiva todavía es aquella Bibliografía relacionada con las alteraciones producidas en dichos órganos por causas de tipo hormonal (Wiens y Gilbert, 1965; Keeley y Friedman, 1967; Müller

y Engelmann, 1968). En este sentido, los trabajos se han realizado sobre cuerpo graso, examinando las alteraciones de la tasa metabólica de este tejido ocasionadas por extractos de *corpora cardiaca*. Los resultados apuntan, en todos los casos, hacia una estimulación del consumo de oxígeno, postulándose la hipótesis de que los factores que influyen sobre el metabolismo respiratorio son intrínsecos a los *corpora cardiaca*.

**OBJETIVOS Y
PLAN DE
EXPERIENCIAS**

En 1975 Slama y Hodková investigaron las alteraciones inducidas en la tasa metabólica de *Dermestes vulpinus* por la aplicación de hormona juvenil exógena. Estas variaciones se tradujeron en una respuesta hipermetabólica, presentando dicho insecto un aumento considerable en su consumo de oxígeno.

Basándonos en este resultado, nos propusimos investigar la tasa metabólica de *Oncopeltus fasciatus* y *Blattella germanica*, así como las alteraciones inducidas en ellas por la hormona juvenil y el precoceno II.

Para ello, elegimos aquellas fases del desarrollo de los insectos más sensibles a la hormona juvenil y al precoceno II. Así, las determinaciones de la tasa metabólica se han llevado a cabo tanto en insectos del último estadio juvenil, el quinto para ambas especies, como en insectos adultos. Además, en ambos casos se han investigado las alteraciones en el consumo de oxígeno de machos y hembras, para estudiar, precisamente, si existían variaciones en el mismo debidas al sexo, puesto que en el estadio adulto la hormona juvenil es imprescindible en la hembra para el completo desarrollo de los oocitos, no teniendo ninguna acción aparente sobre los machos.

Por otro lado, siguiendo esta misma línea de trabajo y basándonos en las investigaciones de Wiens y Gilbert (1965), y Müller y Engelman (1968), sobre las variaciones de la tasa respiratoria del cuerpo graso inducidos por los *corpora cardiaca*, se ha realizado el estudio del consumo de oxígeno de órganos aislados.

Los órganos escogidos fueron:

Los ovarios, por su relación directa con la hormona juvenil, al necesitar de ésta para el normal desarrollo de los oocitos.

El cuerpo graso por su papel como sintetizador de las proteínas vitelogénicas en lo que también interviene la hormona juvenil.

El tubo digestivo porque, aunque no se ha demostrado la acción, directa o indirecta, de la hormona juvenil sobre él, parece que se postula la existencia de células de carácter endocrino en su epitelio (Cassier et al., 1972; Cassier y Fain-Maurel, 1977).

En este sentido, se ha investigado la tasa metabólica de dichos órganos provenientes de insectos previamente tratados con los compuestos cuya actividad se desea estudiar.

En una segunda experiencia se ha procedido al estudio del consumo de oxígeno de los órganos mencionados, cuando el medio en el que se encuentran inmersos durante el transcurso de la experiencia se ha tratado con hormona juvenil o con precoceno II.

MATERIAL

Y

METODOS

1.- INSECTOS UTILIZADOS Y METODOS DE CRIA.

Los insectos utilizados para la realización de las experiencias han sido *Blattella germanica* (L.) (Orthoptera, Blattariae) y *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Hemiptera, Lygaeidae).

Blattella germanica procede de una colonia mantenida en laboratorio durante más de 100 generaciones, en condiciones normalizadas de humedad y temperatura. Los insectos se encuentran en contenedores metálicos de tres litros de capacidad cuyo fondo está cubierto de una capa de serrín de madera y su parte superior interna se halla recubierta de una fina capa de vaselina, mezcla al 50% de vaselina filante y vaselina líquida, para impedir la salida de los insectos del recipiente.

Como alimento se les suministra comida para perros triturada, y agua *ad libitum* en tubos de vidrio, de unos 100 cc, tapados con una torunda de algodón. Del mismo modo se les provee de superficies de reposo adecuadas, consistentes en papeles de filtro (100-150 cm²) arrollados en espiral. Los contenedores se tapan con piezas de tela de tergal sujetas por bandas elásticas, lo que permite su fácil manejo y una ventilación adecuada (Fig. 8).

Los recipientes que contienen a los insectos se ordenan en estanterías metálicas mantenidas en una cámara en condiciones de humedad (80±5%) y temperatura (30±1°C) constantes, y oscuridad total.

Los contenedores descritos se utilizan para los distintos grupos de insectos, ya sean ninfas de 3º, 4º ó 5º estadio, ya sean adultos. Para reproducción se utiliza un contenedor especial consistente en dos recipientes, como los ya descritos, superpuestos: en el superior se sustituye el fondo por una malla metálica de tal amplitud que

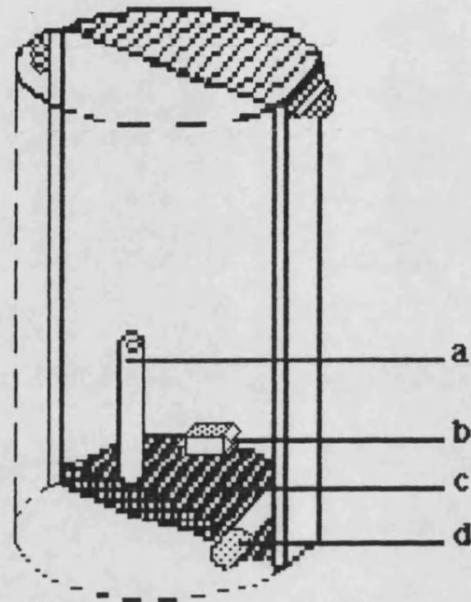


Figura 8.-Esquema de los botes utilizados para la cría de ninfas de *Blattella germanica*.

a: superficie de reposo.

b: comida.

c: capa de serrín.

d: tubo de agua.

permite el paso de las ninfas recién emergidas pero no el de las hembras (Fig. 9). En este contenedor se colocan las hembras portadoras de ooteca, y se controla su número semanalmente, retirando aquellas que ya no son portadoras y sustituyéndolas por otras en dicho estado. Al mismo tiempo se cambia el contenedor inferior, donde están las ninfas, por otro vacío. De esta forma pueden obtenerse grupos de insectos de edad conocida y homogénea.

Todos los contenedores se revisan cada semana, con el fin de reponer agua y comida, así como para realizar la limpieza de los mismos.

Oncopeltus fasciatus proviene, asimismo, de una colonia mantenida en laboratorio durante más de 50 generaciones, en una cámara a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, $70 \pm 5\%$ de humedad relativa y con un fotoperíodo de 16h de luz y 8h de oscuridad.

Los insectos, en los distintos estadios juveniles, se han mantenido en recipientes de metacrilato de unos 5 litros de capacidad, cuyo techo está sustituido por una tela de tergal para facilitar la ventilación, y cuya parte superior interna se halla recubierta de una fina capa de vaselina a fin de impedir la huida de los insectos (Fig. 10).

En el fondo de los contenedores se coloca la comida, consistente en semillas de girasol peladas, complementadas con semillas de *Asclepias* sp. También se les suministra agua *ad libitum* en viales de vidrio invertidos sobre una placa Petri de 6 cm de diámetro y rodeados de algodón. Con el fin de ampliar la superficie interna de los contenedores se han adicionado papeles de

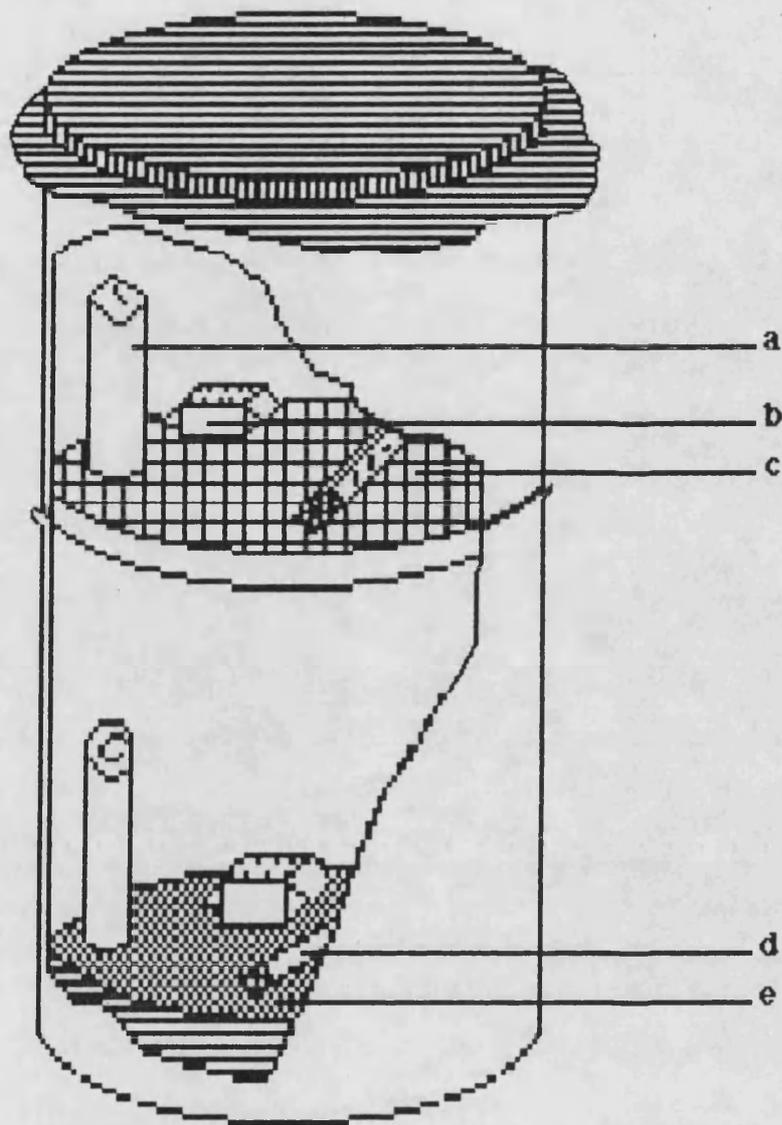


Figura 9.- Esquema de las cajas de reproducción de *Blattella germanica*.

- a: superficie de reposo; b: comida;
c: rejilla metálica; d: tubo de agua.
e: capa de serrín.

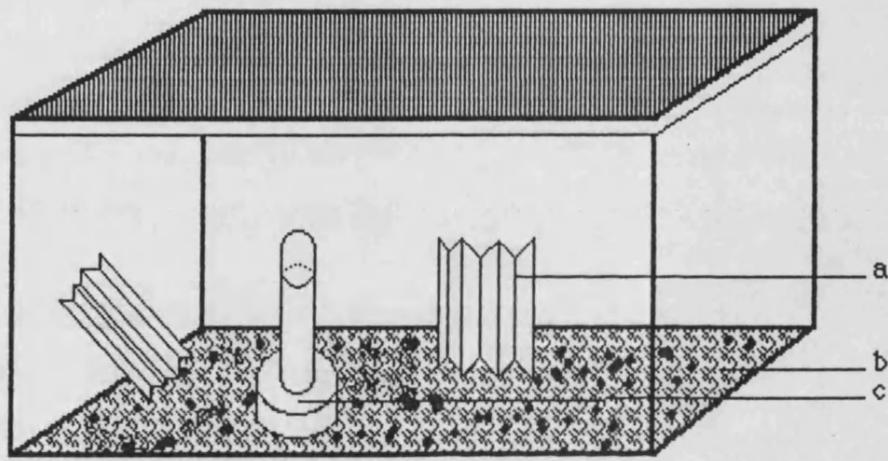


Figura 10.- Esquema de las cajas utilizadas para la cría de ninfas de *Oncopeltus fasciatus*.

a: superficie de reposo.

b: comida.

c: tubo de agua.

filtro, de unos 200-300 cm² de superficie, plegados en zig-zag, añadiendo además cortezas de semillas de girasol para cubrir el fondo de los mismos.

Al igual que en *B. germanica*, los recipientes de reproducción son distintos a los destinados para los insectos jóvenes. En el caso de *O. fasciatus* se trata de contenedores redondos de metacrilato cuyo fondo consiste en una malla metálica para facilitar el paso de los huevos a bandejas colocadas debajo, al efecto (Fig. 11). De esta forma, por un lado se impide el canibalismo por parte de los adultos hacia los huevos, y por otro se facilita la recogida de éstos, en días alternos, para obtener grupos de insectos de edades conocidas.

Todos los contenedores son revisados cada dos días a fin de reponerles la comida, y sobre todo el agua, imprescindible para estos insectos. Semanalmente se procede a la limpieza general de la colonia, cambiando los insectos a recipientes limpios.

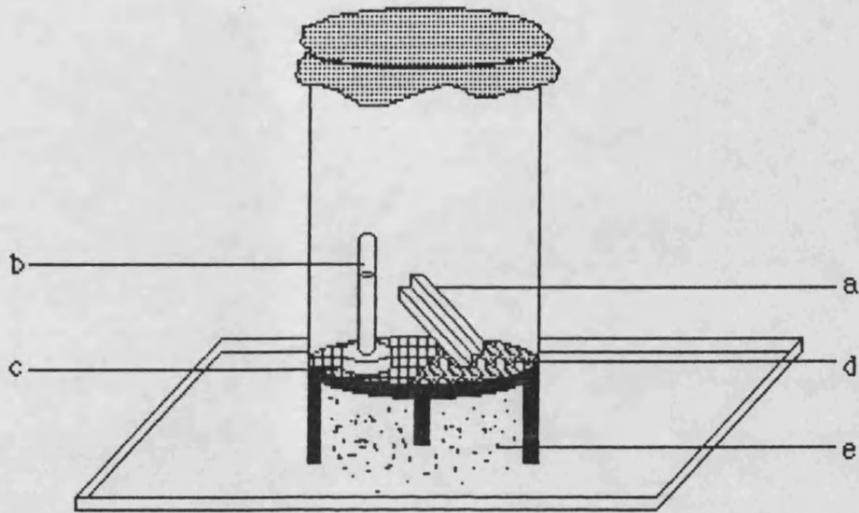


Figura 11.- Esquema del bote utilizado para la cría de insectos adultos de *Oncopeltus fasciatus*.

a: superficie de reposo.

b: tubo de agua.

c: rejilla metálica.

d: comida.

e: huevos.

2.- MEDIDA DEL CONSUMO DE OXIGENO. DESCRIPCION DEL RESPIROMETRO.

2.1.- TECNICAS MANOMETRICAS.

Las técnicas manométricas están basadas en la fórmula de los gases: $PV=RT$, siendo R una constante.

Si hacemos dos de estas variables constantes y se da algún cambio en la cantidad de gas del sistema, entonces este cambio es una medida de la cantidad de gas consumido o expulsado (Umbreit et al., 1972). Normalmente, en todas las técnicas manométricas, la temperatura es un parámetro que se mantiene constante, existiendo entonces tres técnicas fundamentales manométricas:

1) Manometría a volumen constante. Consiste en mantener el volumen constante y tomar los cambios en la presión como una medida de la variación en la cantidad de gas del sistema.

2) Manometría a presión constante. Se da lo contrario que en el caso anterior, es decir, se mantiene la presión constante y se toman los cambios de volumen como una medida de la cantidad de gas consumido o expulsado.

3) Manometría diferencial. Consiste en medir ambos cambios, tanto en volumen como en presión, y a partir de ellos medir la cantidad de gas consumido o excretado.

En muchas células, la utilización de oxígeno tiene como resultado la liberación de dióxido de carbono. Si estos dos gases son los únicos implicados, podremos medir la respiración, o incorporación de oxígeno, absorbiendo el CO_2 liberado con un álcali. En presencia del álcali, la presión de CO_2 en el aire es cero, dentro

de los límites de la medida. El intercambio de gas originado por la respiración es absorción de oxígeno más liberación de CO_2 . Pero el álcali mantiene la presión de CO_2 a cero, por lo que el cambio apreciado en el manómetro es debido únicamente a la utilización del oxígeno (Umbreit et al., 1972).

Para la determinación del consumo de oxígeno de las experiencias de la presente Tesis, se ha utilizado un respirómetro diferencial Gilson a presión constante IGRP 14, que actúa como los descritos para la técnica de manometría a presión constante, siendo diferencial al mismo tiempo.

2.2.- RESPIROMETRO.

El respirómetro diferencial a presión constante Gilson consta de un baño y 14 unidades de medida (Fig. 12).

2.2.1.- Baño.

Está equipado con dos calefactores, uno principal y otro accesorio, para aumentar más rápidamente la temperatura del mismo. Esta temperatura puede variar desde la temperatura ambiente hasta $50,00 \pm 0,02^\circ\text{C}$, y se mantiene constante gracias a la presencia de un termostato sumergido en el baño. También presenta un agitador para evitar gradaciones de temperatura en el agua del baño.

Para vigilar constantemente la temperatura, se halla sumergido continuamente en el baño un termómetro digital, con una precisión de $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

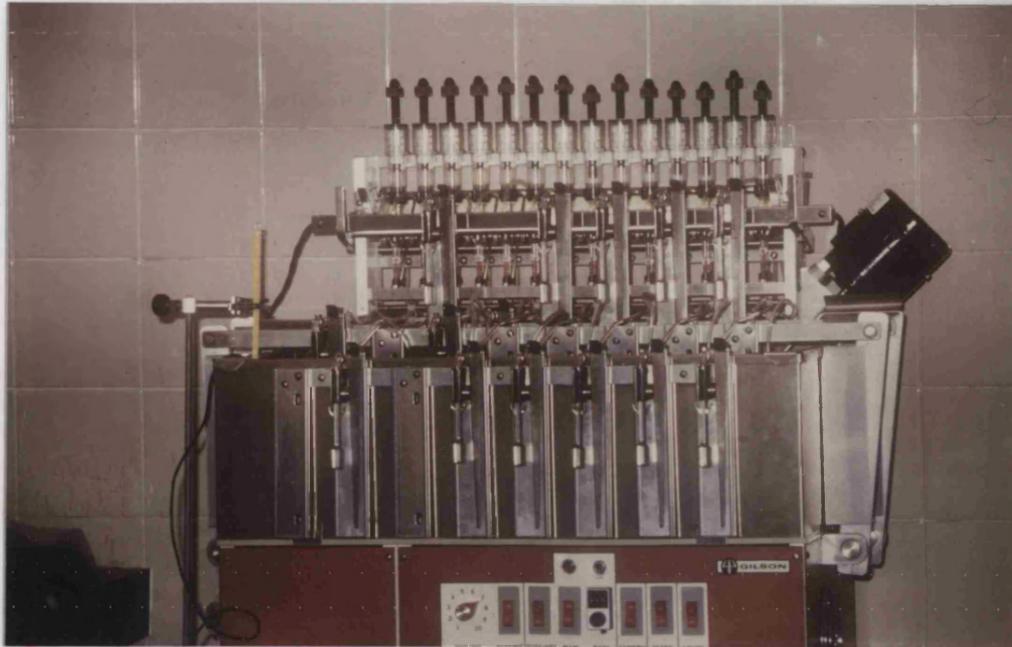


Figura 12.- Fotografía del respirómetro a presión constante Gilson IGR 14, utilizado en las experiencias.

2.2.2.- Unidad de medida.

Cada unidad de medida (Fig. 13) consta de un manómetro en forma de U, lleno de líquido manométrico. Un brazo del mismo se encuentra conectado con el **matraz de reacción**, donde va a tener lugar la experiencia, presentando además una línea, variable en su posición, que sirve para establecer el nivel inicial del fluido manométrico; el otro brazo está conectado con una **cámara de referencia**. Entre ambos brazos se encuentra la **válvula de operación**.

2.2.2.1.- Cámara de referencia (Fig. 13).- Contiene una solución de formaldehído al 0,5% en la cantidad necesaria para que el volumen de gas libre en ella sea igual al del matraz de reacción. Esta cámara sirve para minimizar el efecto que pueda tener la temperatura ambiente sobre el volumen de gas encerrado en los tubos de Tygon[®] que comunican ésta y el matraz de reacción al manómetro, y que no están sumergidos en el baño.

2.2.2.2.- Válvula de operación (Fig. 13).- Sirve para poner en comunicación ambos brazos del manómetro, en el caso de que esté abierta, igualando así la presión entre la cámara de referencia y el matraz de reacción. Ambas cámaras quedan incomunicadas al cerrar dicha válvula, en cuyo caso el matraz de reacción estará directamente conectado con el manómetro, pudiendo entonces registrarse los cambios de presión.

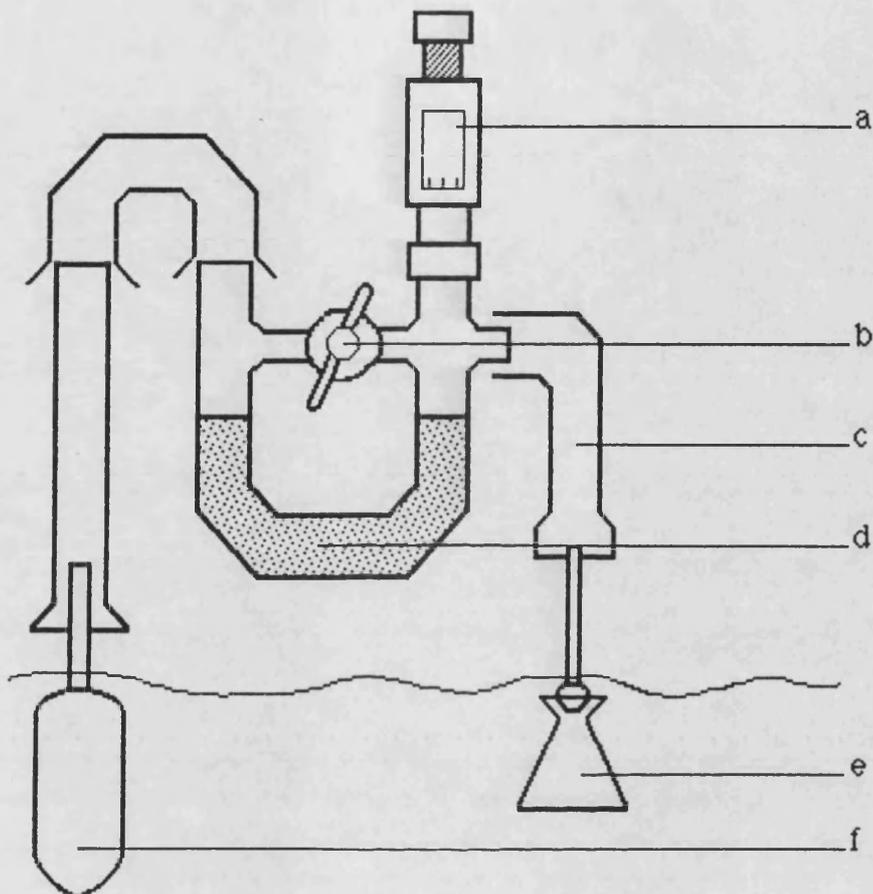


Figura 13.-Esquema de una unidad de medida.

- a: micrómetro digital.**
- b: válvula de operación.**
- c: tubo de Tygon.**
- d: líquido manométrico.**
- e: matraz de reacción.**
- f: cámara de referencia.**

2.2.2.3.- Matraces de reacción (Fig. 14).- Constan de un brazo lateral abierto, que se cierra con un tapón antes de iniciar una experiencia, y un pocillo central, donde se coloca el álcali que sirve para absorber el CO_2 desprendido por la respiración del insecto o de sus tejidos, en el caso de querer medir consumo de oxígeno de los mismos. Los matraces utilizados en nuestras experiencias tienen un volumen de unos 15 ml, aproximadamente. Su boca esmerilada se recubre de una fina capa de vaselina filante para que acople perfectamente en su rama correspondiente.

2.2.2.4.- Micrómetro.- Cada unidad de medida está también equipada con un micrómetro digital (Fig. 13) que sirve para medir los cambios de volumen ocurridos en el matraz de reacción, estando calibrado en microlitros, por lo que la medida a realizar la obtenemos directamente. Los micrómetros giran en ambas direcciones, teniendo una capacidad de medida desde 0 hasta 500 μl . Antes de iniciar una experiencia hay que ajustar los micrómetros a una cifra determinada, dependiendo de la dirección que presumiblemente tomará la reacción. Para realizar la medida hay que girar el micrómetro en la dirección adecuada hasta que el líquido manométrico vuelva a su nivel inicial.

Cada matraz de reacción está sujeto a un soporte, de manera que pueda ser sumergido en el baño o pueda ser sacado para su montaje y limpieza. La cámara de referencia se encuentra también sumergida en dicho baño. Todos los soportes se encuentran adosados a un brazo que optativamente puede oscilar con velocidad (45-140 oscilaciones/minuto) y amplitud (2,0-3,5 cm) variables.

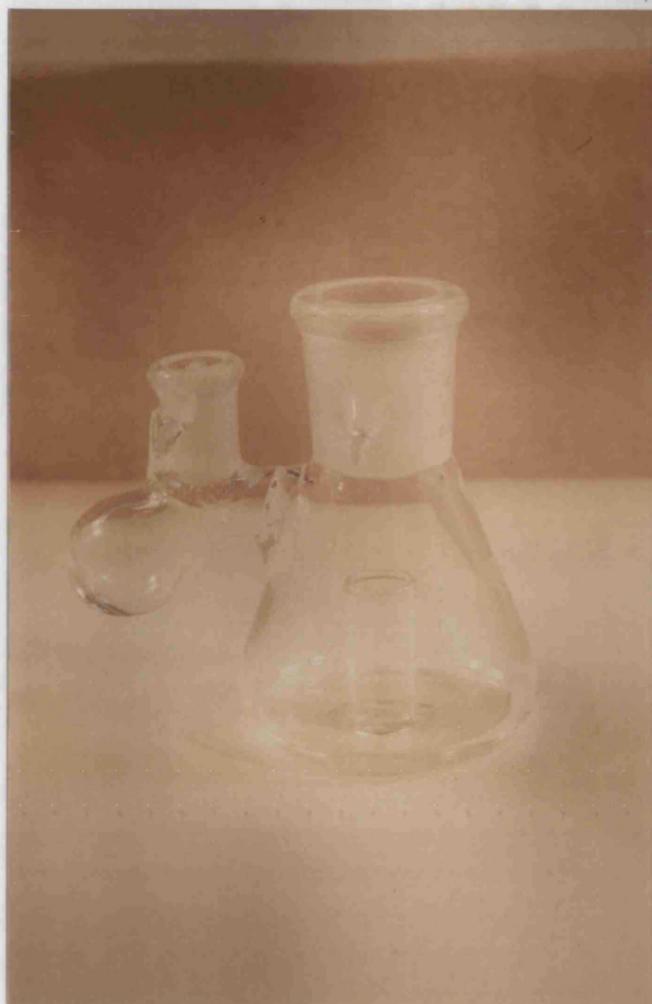


Figura 14.- Fotografía de un matraz de reacción con sus distintas partes (pocillo central, brazo lateral, etc.).

3.- TRATAMIENTOS.

3.1.- PRODUCTOS UTILIZADOS.

Los productos químicos utilizados para realizar los tratamientos han sido la hormona juvenil de Röller, (HJ de 18 átomos de carbono), y el precoceno II (6,7-dimetoxi-2,2-dimetilcromeno) (Fig. 15).

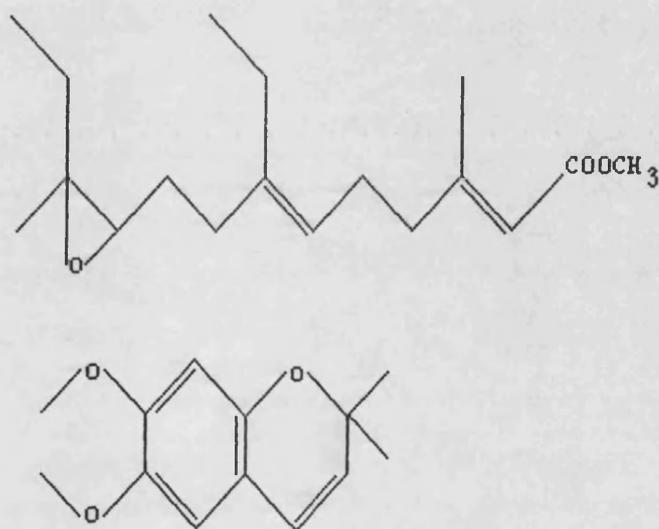


Figura 15.- Estructuras químicas de la hormona juvenil de Röller (C₁₈) (arriba) y del precoceno II (abajo).

Tanto la HJ como el PII han sido sintetizados y cedidos por la Cátedra de Química Orgánica de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de la Universidad Politécnica de Valencia.

Ambos compuestos tienen actividades antagónicas, presentando el primero de ellos una acción gonadotrófica desempeñando además un papel importante en el control de la vitelogénesis. Por otro lado, el PII presenta una actividad anti-*allatotrópica* en algunas especies de insectos, fundamentalmente del orden Hemiptera.

Este tipo de tratamiento se ha llevado a cabo para estudiar la tasa metabólica de los insectos y las posibles alteraciones causadas por los productos mencionados. También se realizaron tratamientos a los insectos cuando se pretendió investigar las alteraciones ocasionadas en el consumo de oxígeno de alguno de sus órganos, y en concreto en los ovarios, cuerpo graso y tubo digestivo.

3.2.- TRATAMIENTO DE LOS INSECTOS.

En cada caso se ha partido de una solución madre del producto a ensayar (HJ o PII) disuelto en acetona, a una concentración de 100 mg/ml. El tipo de tratamiento ha sido tópico, depositando 1 μ l de la disolución (100 μ g del producto activo) sobre la parte ventral del abdomen del insecto, utilizando para ello una microjeringa Hamilton[®] de 10 μ l, con una precisión de 0.1 μ l.

Paralelamente se han llevado a cabo experiencias control, aplicando en este caso 1 μ l de acetona, y experiencias en blanco, sin ningún tipo de tratamiento.

En todos los casos, y para facilitar el manejo de los insectos,

antes de realizar el tratamiento se les ha inmovilizado, sometiéndolos a baja temperatura (-15°C durante uno a tres minutos), tratamiento que no afecta su viabilidad.

En el caso de investigar la tasa metabólica del insecto como tal, los tratamientos se han realizado sobre individuos adultos machos y hembras de ambas especies, cuyas edades oscilaban entre 0 y 4 horas desde el momento de su emergencia a adulto. También se realizaron experiencias sobre ninfas de 5º estadio de 0-4 horas de edad en el momento del tratamiento.

Tras haber realizado el tratamiento, se han colocado los insectos en los contenedores correspondientes, separados los machos de las hembras y los insectos adultos de las ninfas, y en las mismas condiciones que el resto de la colonia.

En el caso de *Blattella germanica*, y dado que es más difícil distinguir cuándo se trata de un 5º estadio ninfal, y cuál es el sexo que le corresponde, al finalizar la experiencia se observó su evolución a adulto, para confirmar que tanto el sexo como el estadio asignados eran correctos. Para ello, se procedió a colocar cada una de ellas en un contenedor distinto, de manera que pudiera ser identificada, y se esperaba hasta el momento de su emergencia.

Cuando se trata de estudiar el consumo de oxígeno de órganos procedentes de insectos previamente tratados con los compuestos, se eligieron hembras vírgenes adultas de *O. fasciatus* con edades comprendidas entre 40-44h. Tras ser inmovilizadas con frío, se les aplicó tópicamente 1 µl de la disolución correspondiente (100 µg de producto activo) sobre la zona ventral del abdomen. Tras ello se procedió a colocarlas en frascos de vidrio de 500 cc de capacidad siendo cruzadas con machos de su misma edad, no tratados, y

pasando a continuación a la cámara de cría correspondiente.

Las disecciones se realizaron, como norma general, a las 120h, aproximadamente, de su emergencia a adultos.

En el caso de ovarios se tuvo en cuenta el grado de desarrollo de los mismos; puesto que en aquellas hembras tratadas con PII no aparecían desarrollados, y en las previamente tratadas con HJ se mostraban con un elevado grado de desarrollo, se procedió a realizar las disecciones de las hembras controles a la edad más adecuada para que el grado de desarrollo de sus ovarios coincidiera con el de aquellas tratadas con HJ o con PII. Así pues, a fin de poder comparar posteriormente los resultados del consumo de oxígeno de todo tipo de ovarios, se procedió a la disección de hembras controles con edades comprendidas entre 48 y 150h.

Cuando se practicó la disección del cuerpo graso, también se tuvo en cuenta el grado de desarrollo de los ovarios de la hembra de la que procedía. En el caso del tubo digestivo no se realizó clasificación alguna.

3.3.- TRATAMIENTO DEL MEDIO.

Uno de los objetivos propuestos al iniciar las experiencias de la presente Tesis fué investigar el consumo de oxígeno de órganos de insectos y las alteraciones producidas en los mismos cuando el medio en que se encontraban estaba tratado con los distintos productos mencionados.

Así pues, se procedió a realizar el tratamiento, bien del medio de cultivo, bien del suero salino empleado en cada caso, dependiendo del órgano a estudiar. Se realizaron disoluciones

patrón de HJ y PII en acetona a una concentración de 100 mg/ml y 200 mg/ml, respectivamente, empleándose una dosis de 0,5 µl/ml de medio, por lo que las cantidades de HJ y PII presentes fueron de 50 y 100 µg/ml de medio, respectivamente.

4.- TECNICAS QUIRURGICAS.

Los órganos utilizados para el estudio de su tasa respiratoria y las posibles alteraciones causadas en los mismos, ya sea al tratar al insecto, ya al tratar el medio donde se encuentran durante la experiencia, han sido los ovarios, el cuerpo graso y el tubo digestivo. En todos los casos los órganos han procedido de hembras adultas de *Oncopeltus fasciatus*.

Todas las disecciones se han realizado utilizando un estereomicroscopio Wild® con un objetivo de 1x, y zoom de relación 0,6:5.

Como material quirúrgico se han empleado tijeras de iridectomía para realizar las incisiones, y pinzas para espirales Dumont® número 5.

Todas las disecciones han comenzado con la paralización previa del insecto con frío durante unos minutos, cortando posteriormente sus patas metatorácicas y practicando asimismo una incisión longitudinal en ambos lados del abdomen, en la zona dorso-ventral.

A continuación se coloca al animal, en posición de *decubito supino*, sobre una placa con parafina a la que se le sujeta con alfileres entomológicos. Inmediatamente después se añade una solución salina de manera que todo el campo operatorio quede cubierto durante la disección, a fin de facilitar la misma y evitar el resecaimiento del insecto.

La solución salina empleada para la realización de las disecciones de ovarios y tubo digestivo ha sido una modificación de la utilizada por Mitsuhashi y Maramorosch (1964), con la siguiente composición:

- NaCl 7 mg/ml
- KCl 0,2 mg/ml
- MgCl₂ 0,1 mg/ml
- NaCO₃H 0,4 mg/ml.

4.1.- DISECCION DE OVARIOS (FIG. 7).

Para proceder a la disección de los ovarios, y tras sujetar al insecto a la placa de parafina, mediante un alfiler a nivel de la zona torácica, se separa cuidadosamente la cutícula abdominal ventral, cogiéndola de su unión con el tórax. A continuación se procede a eliminar el cuerpo graso circundante, muy abundante en esta zona, visualizando los ovarios. Posteriormente se eliminan las tráqueas, para lo cual se sujeta con las pinzas la rama inferior del tronco traqueal principal y se tira de él con suavidad, pero con firmeza, hasta que las traqueolas más finas se van soltando. A continuación se realiza la misma operación con la rama superior.

Finalmente, para proceder a su extracción, se practican dos incisiones anteriores, a nivel de los filamentos terminales, y otra posterior, a nivel del oviducto medio en su unión con la vagina.

Antes de realizar la medida del consumo de oxígeno, los ovarios se clasifican según su grado de desarrollo (Kelly y Davenport, 1976) en los siguientes tipos:

- A: folículos no visibles, presente solo el germarium (Fig 16 a).
- B: folículo terminal pequeño y claro, blanco, amarillento o anaranjado (Fig 16 a).

C: 1-3 grandes folículos amarillos por ovario (Fig 16 b).

D: oocito corionado (brilla con la luz) (Fig. 16 b).

E: huevos maduros en el oviducto lateral (Fig. 16 c).

En los ovarios de los tipos C, D y E hay deposición de vitelo, mientras que no lo hay en los pertenecientes a los grados A y B.

4.2.- DISECCION DEL CUERPO GRASO.

Para proceder a la disección del cuerpo graso se realizaron las mismas operaciones que en el caso de ovarios, con la excepción de utilizar como medio salino el de Ephrussi-Beadle (Ladel et al., 1979), con la siguiente composición:

- NaCl 7.49 mg/ml
- KCl 0.35 mg/ml
- CaCl₂ 0.21 mg/ml.

Cuando ya se ha eliminado la cutícula abdominal se procede a separar cuidadosamente hacia los lados el cuerpo graso, para poder eliminar los ovarios y el tubo digestivo. A continuación se separa todo el cuerpo graso abdominal de la cutícula dorsal y se procede a su extracción.

Finalmente, se eliminan las tráqueas que irrigan este tejido, con cuidado para no dañar su estructura, así como el tejido conectivo que lo envuelve (Fig. 17).

En este caso, se ha clasificado el cuerpo graso de acuerdo con el grado de desarrollo de los ovarios de la hembra de procedencia.

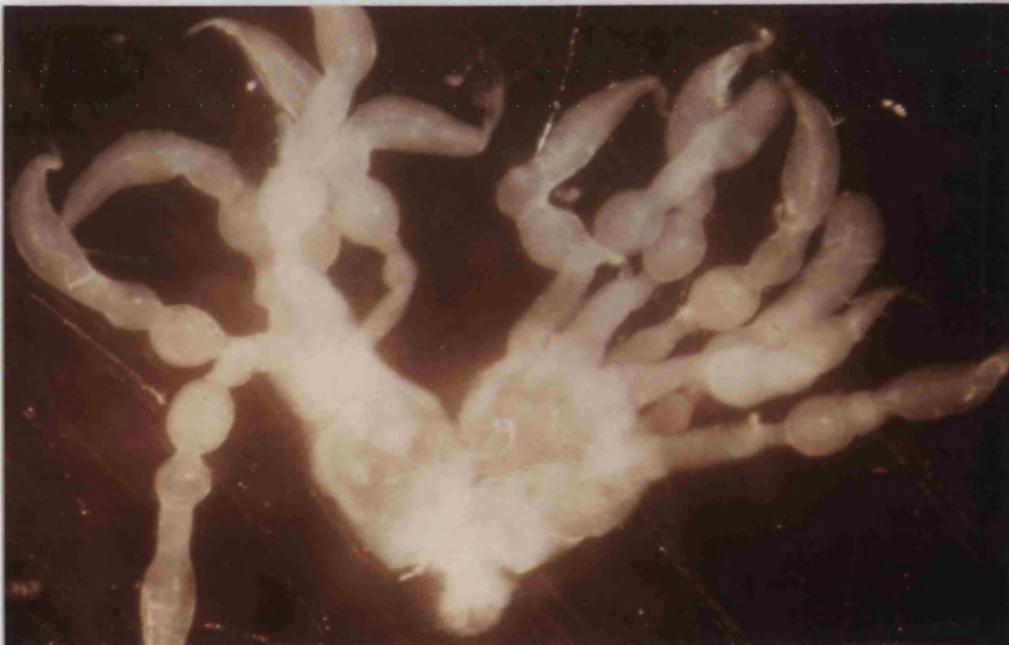


Figura 16a.- Fotografía de los ovarios de distinto grado de desarrollo. a y b indican, respectivamente, los grados A y B.

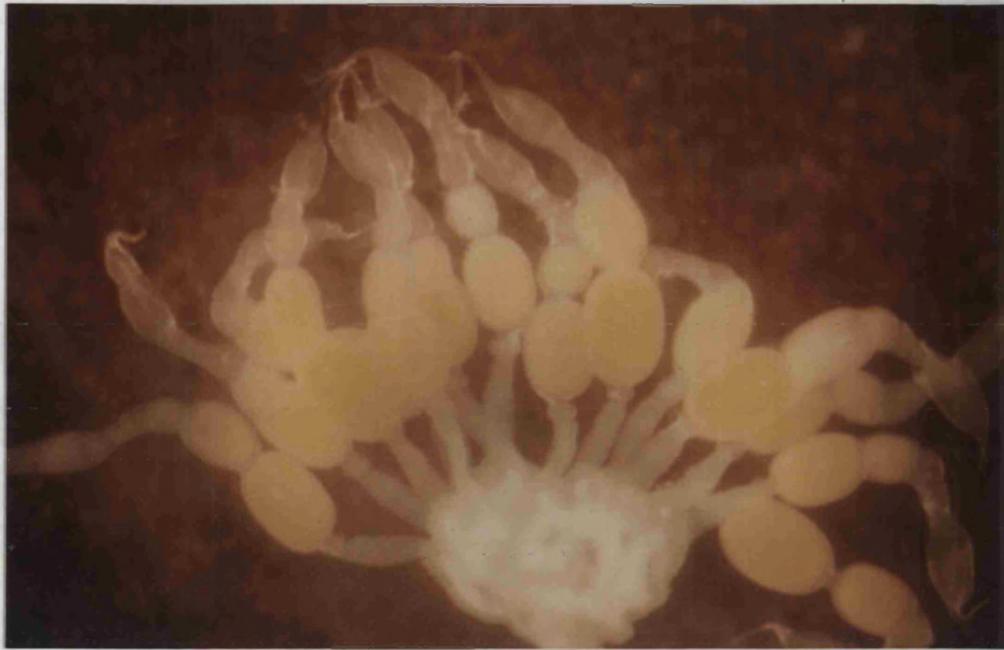


Figura 16b.- Fotografía de los ovarios de distinto grado de desarrollo. a y b indican, respectivamente, los grados C y D.

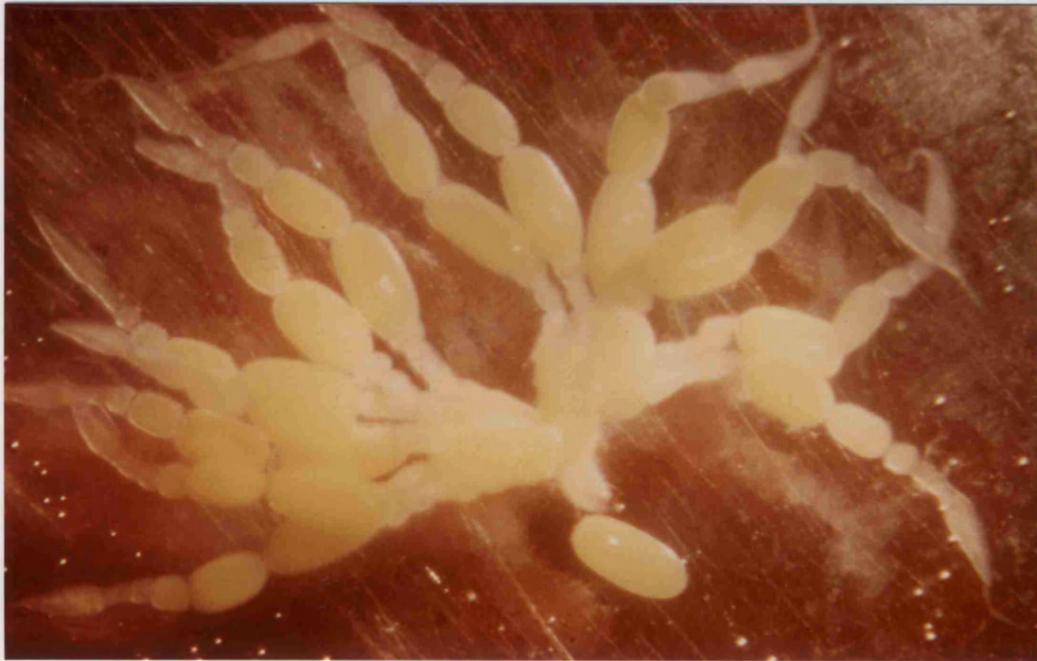


Figura 16c.- Fotografía de los ovarios de distinto grado de desarrollo. Grado E.

4.3.- DISSECCION DEL TUBO DIGESTIVO (FIG. 6)

Para extraer el tubo digestivo se procede exactamente igual que para los ovarios y cuerpo graso. Cuando se ha eliminado la



cutícula (estrófa), no contaminan el cultivo. Para ello, es necesario realizar una incisión en la parte posterior de cada uno

Figura 17.- Fotografía del cuerpo graso de mesenteron de *Oncopeltus fasciatus* una vez extraído del insecto y limpio de tráqueas.

introducir posteriormente un alfiler de 27G, unido a una jeringa de 5 cc llena de suero fisiológico, por la parte anterior de cada compartimento, realizándose así un lavado metódico del mismo. Tras el lavado con suero fisiológico se realiza otro, utilizando esta vez medio de cultivo idéntico al que se empleará para el cultivo *in vitro* con lo que se asegura que el órgano quede bañado por el medio tanto en su exterior como en su interior.

4.3.- DISECCION DEL TUBO DIGESTIVO (FIG. 6).

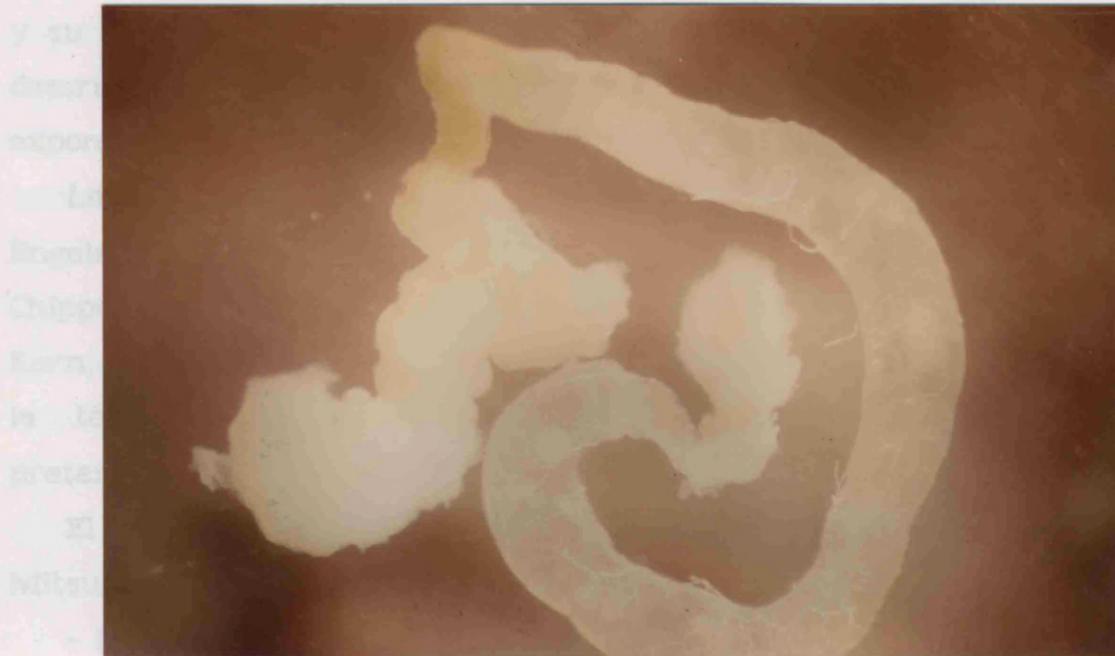
Para extraer el tubo digestivo se procede exactamente igual que para los ovarios y cuerpo graso. Cuando se ha eliminado la cutícula abdominal del insecto, se procede a eliminar tanto los ovarios como el cuerpo graso circundante. A continuación se abre, con la ayuda de unas pinzas, la cutícula torácica ventral y se localiza el tracto superior del tubo o esófago, tirando suavemente de él hacia atrás y sacándolo.

Posteriormente se procede a eliminar las tráqueas que lo circundan y la parte posterior del mismo (proctodeo), desde el lugar de unión con los túbulos de Malpighio, procurando que quede extendido en toda su longitud (Fig. 18).

Antes de proceder al cultivo del tubo digestivo así extraído, es imprescindible realizar una limpieza del mismo, a fin de que los microorganismos que se encuentran en su interior (simbiontes o simples saprófitos), no contaminen el cultivo. Para ello, es necesario realizar una incisión en la parte posterior de cada uno de los tres compartimentos en que se encuentra dividido el mesenteron de *Oncopeltus*, justo antes de cada esfínter, para introducir posteriormente la aguja de un dispositivo epicraneal de 27G, unida a una jeringa de 5 cc llena de suero fisiológico, por la parte anterior de cada compartimento, realizándose así un lavado meticuloso del mismo. Tras el lavado con suero fisiológico se realiza otro, utilizando esta vez medio de cultivo idéntico al que se empleará para el cultivo *in vitro*, con lo que se asegura que el órgano quede bañado por el medio tanto en su exterior como en su interior.

5.- CULTIVO DE ORGANOS *IN VITRO*

Para proceder a la medida del consumo de oxígeno de órganos de insectos se procedió en un principio a la disección de los mismos



- KCl 9,2 mg/ml

- MgCl₂ 0,1 mg/ml

Figura 18.- Fotografía del mesenteron de *Oncopeltus fasciatus* una vez extraído del insecto y limpio.

Para evitar las contaminaciones bacterianas que pueden alterar sustancialmente las determinaciones de consumo de oxígeno, se han fijado las siguientes condiciones de trabajo:

- Todas las disecciones se realizan en cámara de flujo laminar.

- El material quirúrgico utilizado se esteriliza con luz

5.- CULTIVO DE ORGANOS *IN VITRO*.

Para proceder a la medida del consumo de oxígeno de órganos de insectos se procedió en un principio a la disección de los mismos y su posterior cultivo. Las disecciones de los órganos ya han sido descritas en el apartado anterior, por lo que aquí sólo expondremos el cultivo de los mismos.

La Bibliografía a este respecto es bastante escasa (Müller y Engelmann, 1968; Fourche y Ambrosioni, 1969; Brown y Chippendale, 1977; Ladel et al., 1979; Houlihan y Sell, 1982, 1984; Kern, 1985), por lo que se procedió primeramente a poner a punto la técnica más adecuada para la realización de nuestras pretensiones.

El medio de cultivo utilizado ha sido una modificación del de Mitsuhashi y Maramorosch con la siguiente composición:

- NaCl 7 mg/ml
- KCl 0,2 mg/ml
- MgCl₂ 0,1 mg/ml
- glucosa 4 mg/ml
- albúmina de suero bovino, fracción V 2 mg/ml
- hepes bufer 6 mg/ml; a pH 7,4-7,5.

Para evitar las contaminaciones bacterianas que pueden alterar sustancialmente las determinaciones de consumo de oxígeno, se han fijado las siguientes condiciones de trabajo:

-- Todas las disecciones se realizan en cámara de flujo laminar.

-- El material quirúrgico utilizado se esteriliza con luz

ultravioleta; el material de vidrio con calor seco en horno Pasteur a 180°C, y los medios de cultivo por filtración a través de membrana Millipore® de 45 µm de tamaño de poro.

-- Antes de iniciar la operación el insecto se esteriliza en superficie por inmersión en alcohol de 70% y paso posterior por la llama.

-- Una vez extraído el órgano, se lava en medio de cultivo estéril, pasándolo a continuación al pocillo donde se realiza la incubación. En el fondo de dicho pocillo se colocan previamente 0,5 ml de suero fisiológico estéril, realizándose el cultivo en gota pendiente; para ello se deposita, sobre el cubre, una gota del medio de cultivo y a continuación el órgano correspondiente; al conjunto se le da la vuelta y se coloca sobre el pocillo, sellando las zonas de contacto del cubre y el pocillo con vaselina filante estéril (Fig. 19).

-- Cuando ya se ha realizado la preparación de todos los órganos a cultivar, se mantienen en estufa a 28±2°C (temperatura fisiológica del insecto), durante unas 14 horas aproximadamente, hasta el momento de colocarlos en los matraces del respirómetro donde se medirá su consumo de oxígeno.

5.1.- TUBO DIGESTIVO.

La técnica anteriormente mencionada se ha utilizado para el cultivo *in vitro* del tubo digestivo y el posterior estudio de su consumo de oxígeno. En este caso no se ha tenido en cuenta el grado de desarrollo de los ovarios de la hembra de procedencia, no realizándose, por lo tanto, ningún tipo de clasificación al respecto.

5.2 - CUERPO

El cuerpo g
digestivo, sino
Engelmann, 19
dissección y pa
suero salino
consumo de ox

5.3 - OVARIO

Los ovario
mencionada; ú
se han clasifi
ha tenido se
consumo de ox

Sin embarr
en estos result



ocupa, pasando a aplicar una modificación del método descrito por
Peurel. **Figura 19.- Fotografía de un pocillo de cultivo con el órgano en su interior.**
clasificarlos según rápidamente
la medición del consumo de oxígeno, colocándolos en los matraces
del respirómetro únicamente con suero salino, sin medio de
cultivo. De esta forma parece que la variabilidad disminuye.

5.2.- CUERPO GRASO.

El cuerpo graso no ha sido cultivado como en el caso del tubo digestivo, sino que, siguiendo la Bibliografía al respecto (Müller y Engelmann, 1969; Ladel et al., 1979), ha sido extraído mediante disección y puesto enseguida en el matraz del respirómetro, con suero salino de Ephrussi-Beadle, midiendo a continuación su consumo de oxígeno.

5.3.- OVARIOS.

Los ovarios han sido cultivados siguiendo la técnica ya mencionada; únicamente, y antes de pasar a la estufa de cultivo, se han clasificado según su grado de desarrollo, puesto que éste se ha tenido en cuenta en el momento de realizar el estudio de su consumo de oxígeno.

Sin embargo, y dado que se apreció una enorme variabilidad en estos resultados, se desechó esta técnica para el caso que nos ocupa, pasando a aplicar una modificación del método descrito por Fourche y Ambrosioni (1969), consistente en extraer los ovarios, clasificarlos según su grado de desarrollo, y realizar rápidamente la medición del consumo de oxígeno, colocándolos en los matraces del respirómetro únicamente con suero salino, sin medio de cultivo. De esta forma parece que la variabilidad disminuye.

6.- RESPIROMETRIA.

6.1.- RESPIROMETRIA DE INSECTOS.

Antes de proceder a medir el consumo de oxígeno de los insectos, ya sean adultos o ninfas de 5º estadio, ya machos o hembras, se procedió a pesar a los mismos para hallar posteriormente su tasa respiratoria.

Para ello se ha utilizado una balanza Sartorius® de 0.1 mg de precisión, empleando el método de la doble pesada, estableciendo primeramente el peso de una cajita de tamaño adecuado, pesándola de nuevo con el insecto en su interior, y hallando el peso del mismo por diferencia entre ambas.

En el caso de la especie *B. germanica*, se ha utilizado el mismo método, con la diferencia de que los insectos eran paralizados con frío antes de ser pesados, manteniéndolos a -15°C durante unos minutos. Esta inmovilización se realiza debido a que este insecto presenta una gran velocidad de movimientos, evitando de esta forma que escapen.

Antes de ser introducidos en los matraces, los insectos se han inmovilizado envolviéndolos en una gasa y sujetando sus extremos con cinta adhesiva, de manera que tuviesen suficiente aireación pero permanecieran quietos a fin de establecer su consumo de oxígeno en reposo.

Posteriormente son introducidos en el matraz correspondiente, colocándolos alrededor del pocillo central, utilizándose siempre un sólo insecto por cada matraz de medida. A continuación se añade al pocillo 0,5 ml de una solución de KOH al 20%, introduciendo también un papel de filtro de 2x3 cm doblado en zig-zag (Fig. 20).

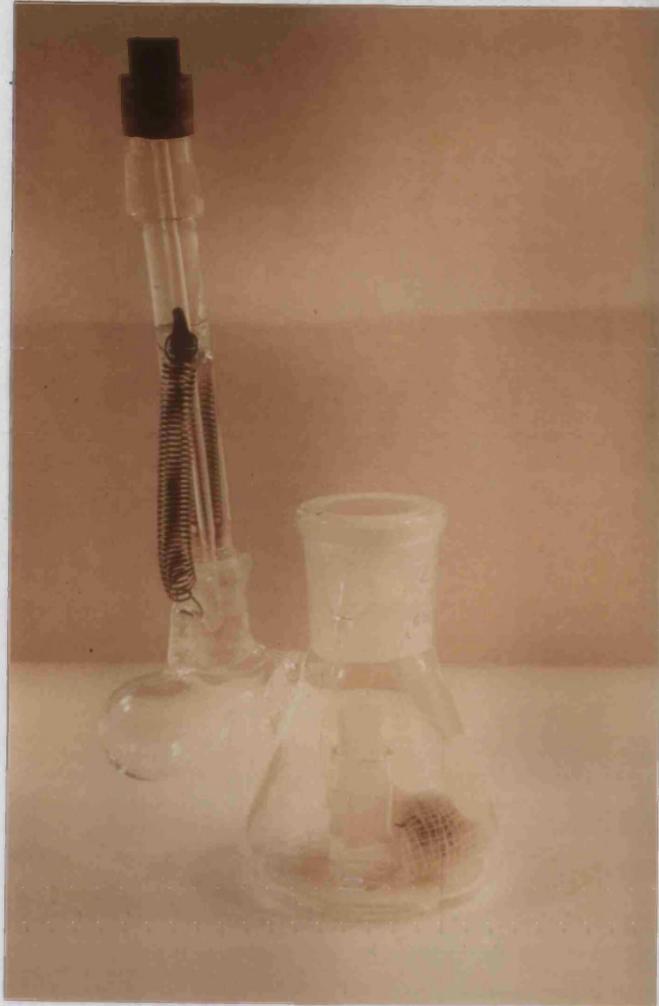


Figura 20.- Fotografía de un matraz de reacción preparado para ser montado en el respirómetro. Obsérvese el papel de filtro doblado en zig-zag y la gasa con el insecto en su interior.

La potasa tiene como misión absorber el CO_2 desprendido en la respiración por los insectos, creándose así una depresión en el interior del matraz que ocasionará un descenso del fluido del manómetro.

El papel de filtro se coloca para aumentar la superficie de reacción del KOH con el carbónico, puesto que la pequeña superficie de contacto que presenta cuando se coloca la potasa en el pocillo se satura casi inmediatamente.

Después de esta operación, se cierra el brazo lateral del matraz de reacción, sujetando el tapón correspondiente con unos muelles.

A continuación se colocan los matraces en las ramas correspondientes del manómetro, sujetándolos también con pequeños muelles, y se introducen en el baño de agua. Este baño se mantiene durante toda la experiencia a una temperatura constante de $27,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

A continuación se cierran todas las válvulas de operación y se pone en marcha la oscilación, comenzando un período de acondicionamiento que dura 70 minutos, seguidos de otros 5 con las válvulas de operación abiertas. Este período es imprescindible para atemperar los matraces de reacción y acostumar a los insectos a las condiciones de la experiencia. Cuando finaliza este período, cesa la oscilación.

Tras esta fase, se igualan los micrómetros a un valor conveniente, 200 en nuestro caso, y se cierran las válvulas de operación, comenzando entonces el período de medida que dura 3 horas. Al final de ellas, se giran todos los micrómetros hasta enrasar de nuevo el líquido manométrico, se anota el consumo de oxígeno de cada manómetro, se abren de nuevo las válvulas y se

deja transcurrir un tiempo de unos 15 minutos, tras los cuales se inicia un segundo período de medida.

En cada experiencia, y a pesar de que según el método respirométrico utilizado no sea necesario, se ha creído conveniente la utilización de un matraz blanco. Este matraz se prepara como los restantes, pero sin insecto alguno. Los valores obtenidos en el blanco se utilizan para corregir los obtenidos en las restantes unidades de medida, siguiendo el protocolo recomendado por Umbreit et al. (1972).

Al finalizar la experiencia, se desacoplan los matraces de sus ramas correspondientes y se extrae la gasa donde se encuentra el insecto, comprobando que éste se encuentre vivo. En caso contrario, se desprecia la medida.

En el momento de montar la experiencia los insectos tienen entre 14 y 18 horas de edad contadas desde el momento que mudan al estadio cuestión de estudio, es decir, a adulto o a 5º estadio ninfal.

Por cada uno de los grupos experimentales considerados se ha realizado un mínimo de 20 repeticiones, con un número total de medidas no inferior a 640.

6.2.- RESPIROMETRIA DE ORGANOS.

El estudio del consumo de oxígeno de todos los órganos se ha realizado en las mismas condiciones.

Antes de montar el respirómetro deben pesarse los órganos, para poder hallar posteriormente su tasa respiratoria. Algunos autores (Fourche y Ambrosioni, 1969) realizan la pesada tras la determinación del consumo de oxígeno, o bien tras su desecación

(Ladel et al., 1979). Dado que en nuestras condiciones de trabajo resulta extremadamente difícil la recuperación de los órganos estudiados tras la determinación respirométrica, se ha recurrido al método de la doble pesada de los órganos en fresco, antes de la determinación. Para ello, se pesa el matraz con su fluido correspondiente, se añaden los órganos en la base del mismo, junto al pocillo central, previo secado al máximo sobre un vidrio, se pesa a continuación el matraz una segunda vez, y se calcula el peso de los órganos por diferencia entre las pesadas. La balanza utilizada ha sido una Sartorius® de precisión 0.1 mg, de peso compensado.

En todos los casos se ha absorbido el CO₂ desprendido en la respiración colocando 0,5 ml de KOH al 20% en el pocillo central, así como un papel de filtro doblado en zig-zag.

Asimismo, y en todos los grupos de experimentación estudiados, se han mantenido los matraces en continua oscilación durante el tiempo que dura la experiencia, para que el intercambio de oxígeno entre la fase líquida y gaseosa sea bueno. La velocidad de oscilación ha sido de 130 movimientos por segundo.

Las experiencias se han realizado introduciendo los matraces en un baño aatemperado a $27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

Cuando se estudia el consumo de oxígeno de órganos provenientes de insectos previamente tratados; se coloca en el matraz el fluido correspondiente. Sin embargo, cuando la experiencia está encaminada al estudio del consumo de oxígeno de órganos inmersos en fluido previamente tratado con el producto activo, el tratamiento se realiza inmediatamente antes de colocar dicho fluido en el matraz correspondiente, antes de proceder a la pesada de los órganos.

6.2.1.- Tubo digestivo.

Para proceder al estudio del consumo de oxígeno del tubo digestivo, se coloca en el matraz de reacción 1,5 ml de medio de cultivo estéril. Debido al tamaño de este órgano, y a su peso, se ha utilizado siempre dos de ellos por cada determinación.

Una vez acoplados los matraces a las ramas correspondientes, se introducen en el baño atemperado, se acciona el motor de oscilación y se inicia un período de acondicionamiento de 120 minutos, con las válvulas abiertas.

En este órgano en concreto, se realizan tres medidas consecutivas de 2 horas de duración cada una, con un intervalo entre ellas de 15 minutos en el que las válvulas de operación se encuentran abiertas, siendo por tanto independientes las medidas entre sí.

Una vez finalizada la experiencia, se desmontan los matraces y se limpian cuidadosamente.

Por cada grupo experimental estudiado se ha realizado un total de 10 repeticiones, considerándose el valor medio de ellos como el correspondiente al grupo experimental considerado, con un número total de 80 medidas.

6.2.2.- Cuerpo graso.

Para medir el consumo de oxígeno del cuerpo graso, y tras su extracción, se coloca éste en el matraz de medida con 1 ml de suero salino de Ephrussi-Beadle.

En este caso, el número de órganos por matraz varía de 2 a 3, dependiendo del grado de desarrollo en que se encuentran los

ovarios de la hembra de la cual proceden.

El tiempo de acondicionamiento ha sido de 20 minutos, y se ha realizado una única medida de dos horas de duración.

Cuando finaliza la experiencia, se desmontan los matraces de sus ramas correspondientes y se extrae de cada uno de ellos el papel de filtro y la potasa. A continuación se elimina con un papel la vaselina de la porción esmerilada del matraz y se vuelca todo su contenido sobre un vidrio de reloj previamente pesado, llevándolo a estufa a 80°C hasta peso constante. Posteriormente se halla el peso seco del órgano y se realiza el estudio de su tasa respiratoria con respecto al peso seco.

El número de repeticiones por cada grupo experimental y grado de desarrollo considerado ha sido de 10, con un total de 160 medidas. Como en el caso del tubo digestivo, se ha tomado el valor medio de las 10 repeticiones como el correspondiente a cada grupo experimental.

6.2.3.- Ovarios.

Como ya se menciona anteriormente, los ovarios son extraídos del insecto, y tras agruparlos según su grado de desarrollo, se colocan en los matraces de reacción, añadiendo previamente 1,5 ml de suero salino.

Debido al distinto tamaño de los ovarios, dependiente de su grado de desarrollo, el número de ellos por matraz ha sido variable, siendo fijado por el necesario para obtener un peso mínimo de 3-4 mg, ya que con un peso inferior estaríamos trabajando en las condiciones límite del respirómetro. Así pues, se ha necesitado un mínimo de 6 ovarios de tipo A, 4 de tipo B, 2 de

tipo C y 1 de tipo D o E por cada matraz.

Después de montados los matraces en el respirómetro, se espera un tiempo de acondicionamiento de 15 minutos, con las válvulas de operación abiertas, antes de cerrarlas y proceder a una única medida de 2 horas de duración.

Se ha realizado un total de 20 repeticiones por cada grupo experimental estudiado y por cada grado de desarrollo de los ovarios, lo que supone un número total de 460 medidas. El valor medio de las 20 repeticiones de cada grupo experimental se ha considerado como el correspondiente a cada uno de ellos.

7.- EVALUACION DE LOS RESULTADOS.

7.1.- CONSUMO DE OXIGENO DEL INSECTO.

Las medidas del consumo de oxígeno vienen dadas en $\mu\text{l/insecto}/3$ horas. Tras las correspondientes operaciones son transformadas en $\mu\text{l}/\text{mg}$ peso fresco/h.

Los datos así obtenidos han sido tratados estadísticamente, siendo sometidos a un análisis de la varianza de tres vías y posteriormente, si éste lo permitía, al test de Tukey. Para ello se han estudiado ambas especies por separado, considerando en cada una de ellas tres factores: tratamiento, sexo y edad. Además, cada uno de estos factores ha presentado los siguientes grupos experimentales:

- Tratamiento: control, hormona juvenil y precoceno II.
- Sexo: machos y hembras.
- Edad: adulto y 5º estadio ninfal.

Para todos los estudios se ha utilizado únicamente el resultado obtenido en la segunda medida de las realizadas, por presentar menor variabilidad.

7.2.- CONSUMO DE OXIGENO DE ORGANOS.

Como en el caso anterior, las medidas obtenidas en los micrómetros del respirómetro representan microlitros de oxígeno consumido/órganos/2 horas, siendo transformadas en microlitros de oxígeno/mg peso fresco o seco (dependiendo del órgano)/hora.

Los datos así obtenidos han sido sometidos a un análisis de la varianza, individual para cada órgano.

En el caso del tubo digestivo, se ha utilizado para su estudio estadístico la primera de las tres medidas realizadas, por ser la más homogénea en cuanto a resultados obtenidos. En este caso el único factor considerado ha sido el tratamiento, con tres grupos experimentales: control, hormona juvenil y precoceno II.

En el caso del cuerpo graso y los ovarios, se realiza primeramente un análisis de la varianza comparando el consumo de oxígeno de los distintos grados de desarrollo considerados para el grupo control. Posteriormente se realiza un análisis de la varianza de doble vía, estudiando dos factores: grado de desarrollo del órgano considerado y tratamiento.

En los tres órganos considerados se ha estudiado, por un lado, los resultados obtenidos cuando el tratamiento se realiza sobre el insecto, y por otro aquellos obtenidos al tratar el medio en el que se encuentran inmersos los órganos durante la experiencia.

En todos los casos, y al igual que con el consumo de oxígeno del insecto *in toto*, se ha aplicado un test de Tukey en aquellos casos en que el análisis de la varianza mostraba diferencias significativas.

RESULTADOS

En primer lugar, y antes de empezar a detallar los resultados obtenidos en el presente trabajo, hay que mencionar que se han utilizado, como se indica en el correspondiente apartado de Material y Métodos, dos tipos de controles: aquellos que no han sufrido tratamiento alguno, que serán nombrados como controles blanco, y aquellos que han recibido una adecuada cantidad de acetona, disolvente de los dos compuestos químicos utilizados, y que denominaríamos como controles de acetona.

En alguno de los trabajos consultados (Kuusik et al., 1980) se menciona que el disolvente por ellos utilizado (dicloroetano) ejerce un extraordinario efecto sobre la tasa respiratoria de los insectos, aumentando el consumo de oxígeno en pocos días desde 22 mm^3 oxígeno/g/h hasta $800-900 \text{ mm}^3/\text{g/h}$. Debido a ello es por lo que se han realizado los dos tipos de controles antes mencionados, para averiguar si nuestro disolvente ejercía la misma acción sobre los insectos por nosotros utilizados (Heterometábolos, frente a los insectos Holometábolos del trabajo de Kuusik y colaboradores).

Al realizar el correspondiente estudio estadístico, se ha podido comprobar que la acetona también aumenta la tasa respiratoria de algunos de nuestros grupos experimentales. Así, este disolvente afecta de alguna manera la tasa metabólica de *Oncopeltus*, sin embargo resulta totalmente inocuo para los individuos de la otra especie estudiada, *B. germanica*.

Por todo esto, en el análisis de los resultados y su posterior tratamiento estadístico, se ha prescindido, en todos los casos, y para evitar confusiones, del control blanco, comparando los resultados con los del control acetona, que es en realidad el único control, debido a que en éste producto se disuelven tanto la HJ como el PII. Así pues, a partir de ahora cuando se haga referencia

al control, hay que tener en cuenta que se está hablando del control de acetona.

1.- CONSUMO DE OXIGENO DE INSECTOS.

Como se ha mencionado en el correspondiente apartado de Material y Métodos, el estudio de los datos obtenidos en la investigación del consumo de oxígeno de insectos se ha llevado a cabo agrupándolos por especies, realizándose un análisis de la varianza con los resultados obtenidos en todos los grupos experimentales de *Blattella germanica*, y otro similar para la especie *Oncopeltus fasciatus*.

Esta separación es lógica si se tiene en cuenta que ambas especies pertenecen a Ordenes de insectos distintos por lo que su metabolismo y forma de vida son completamente diferentes. Baste pensar únicamente que *B. germanica* es una especie que se cría en laboratorio en oscuridad total, mientras que *O. fasciatus* necesita un determinado fotoperíodo para vivir normalmente y no entrar en diapausa.

1.1.- CONSUMO DE OXIGENO DE BLATTELLA GERMANICA.

Como ya se menciona en el correspondiente apartado de Introducción, el peso corporal es uno de los factores que influye en la variación del consumo de oxígeno de los insectos, aumentando éste a medida que disminuye el peso. Así pues, en la Tabla II se expresan los valores medios, con su correspondiente desviación, de los pesos de cada uno de los grupos experimentales considerados. Como puede apreciarse, las hembras adultas presentan un peso superior al de los machos, con una diferencia considerable entre ambos grupos experimentales. Al considerar las ninfas de 5º estadio, se observa la misma pauta que para los adultos, es decir,

Tabla II.- Peso medio (mg) de los especímenes de *Blattella germanica* utilizados.

	ADULTOS	NINFAS
MACHOS	36.11±4.01	22.21±3.05
HEMBRAS	49.87±5.88	29.35±5.56

mayor peso de las hembras frente a los machos, aunque en este caso la diferencia entre ambos grupos no es tan acusada.

Al centrarnos en la tasa metabólica de los animales control, también podemos observar una diferencia en el consumo de oxígeno de los diversos grupos experimentales estudiados, siendo éste mayor en las hembras del último estadio juvenil que en los adultos, e inferior en los machos de 5º estadio y en los adultos (Fig. 21).

Cuando consideramos los individuos tratados con HJ, vemos que hay un claro aumento en el consumo de oxígeno de todos los grupos experimentales estudiados (Fig. 21). En este sentido podemos observar (Tabla III) que son los machos, adultos o de 5º estadio ninfal indistintamente, los que resultan más afectados por el tratamiento (1.32 y 1.29 μ l oxígeno/mg peso fresco/h para adultos y ninfas de 5º estadio, respectivamente, frente a 1.07 y 1.10 de los machos controles), aunque las hembras también

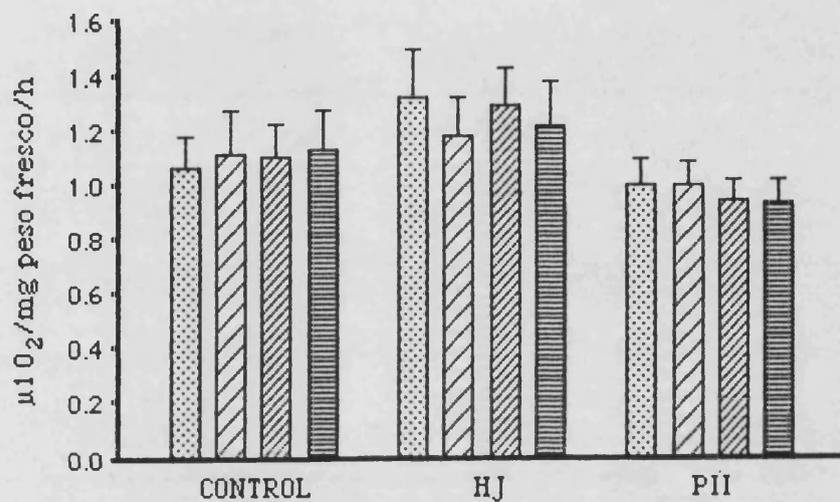


Figura 21.- Valores medios de la tasa metabólica de cada uno de los grupos experimentales de *Blattella germanica*.

■ adultos machos ▨ adultos hembras
 ▩ ninfas machos ▤ ninfas hembras

Tabla III.- Consumo de oxígeno ($\mu\text{l}/\text{mg}$ peso fresco/h) de *Blattella germanica* control y tratados con hormona juvenil (HJ) y precoceno II (PII).

		CONTROL	HJ	P II
	ADULTOS	1.07 \pm 0.12	1.32 \pm 0.14	1.00 \pm 0.11
MACHOS	NINFAS	1.10 \pm 0.13	1.29 \pm 0.13	0.94 \pm 0.10
	MEDIA	1.09 \pm 0.12	1.31 \pm 0.14	0.97 \pm 0.11
	ADULTOS	1.12 \pm 0.15	1.18 \pm 0.14	1.00 \pm 0.10
HEMBRAS	NINFAS	1.13 \pm 0.16	1.22 \pm 0.17	0.93 \pm 0.11
	MEDIA	1.12 \pm 0.15	1.20 \pm 0.15	0.97 \pm 0.11

presentan una tasa respiratoria superior a la de los individuos control (1.18 y 1.22 μ l oxígeno/mg peso fresco/hora para adultas y ninfas de 5^o estadio, respectivamente, frente a 1.11 y 1.13 de las controles).

En el tercer grupo de tratamientos, aquellos realizados al aplicar PII, se aprecia una clara disminución de la tasa metabólica en todos los grupos experimentales considerados (Fig. 21). En este caso se ve que el PII afecta por igual a ambos sexos de una misma edad, presentando mayor disminución en las ninfas de 5^o estadio (0.94 μ l oxígeno/mg peso fresco/h) que en los adultos (1.00 μ l oxígeno/mg peso fresco/h).

El estudio estadístico de estos resultados, mediante el análisis de la varianza, demuestra que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos (Tabla IV), es decir, que el tratamiento a que han sido sometidos los insectos (HJ o PII) altera su tasa metabólica. El Test de Tukey (diferencia mínima significativa de 0.05, para $p < 0.05$) (Fig. 22) nos muestra que tanto los insectos tratados con HJ como aquellos previamente tratados con precoceno II, presentan tasas metabólicas significativamente distintas de los controles.

Continuando con el estudio del análisis de la varianza, también se puede comprobar que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en la interacción tratamiento por sexo. En este sentido, y tras la realización del Test de Tukey (diferencia mínima significativa de 0.08 para $p < 0.05$) (Fig. 23), puede observarse que el PII afecta de igual forma a ambos sexos (Tabla III).

Sin embargo, cuando consideramos los valores medios del consumo de oxígeno de insectos tratados con HJ, se puede apreciar que este compuesto sí influye sobre la tasa metabólica de *B.*

Tabla IV.- Análisis de la varianza de los resultados obtenidos para *Blattella germanica*. ** Diferencias significativas para $p < 0.05$.

FACTORES	G.L.	S.C.	C.M.	F
TRATAMIENTO (T)	2	3.24137	1.62068	93.60 **
SEXO (S)	1	0.03623	0.03623	2.09
EDAD (E)	1	0.01154	0.01154	0.67
T x S	2	0.22574	0.11287	6.52 **
T x E	2	0.08622	0.04311	2.49
S x E	1	0.00322	0.00322	0.19
T x S x E	2	0.01815	0.00907	0.52
ERROR	228	3.94769	0.01731	

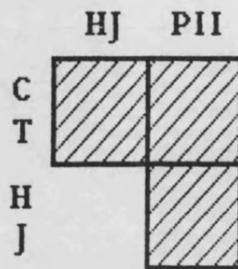


Figura 22.- Representación esquemática del test de Tukey para los tratamientos en *Blattella germanica*.

CT: control.

HJ: hormona juvenil.

PII: precoceno II.

Diferencias significativas

Diferencias no significativas

		HJ		PII	
		M	H	M	H
C T	M				
	H				
H J	M				
	H				

Figura 23.- Representación esquemática del test de Tukey para la interacción tratamiento por sexo en *Blatella germanica*.

CT: control.

H: hembras.

HJ: hormona juvenil.

M: machos.

PII: precoceno II.

 Diferencias significativas

 Diferencias no significativas

germanica de forma distinta para ambos sexos, con un marcado incremento de la tasa metabólica en los machos (1.31 μ l oxígeno/mg peso fresco/h), siendo ésta menos acusada en las hembras (1.20 μ l oxígeno/mg peso fresco/h), existiendo en ambos casos diferencias significativas con respecto a los controles.

Como resumen podríamos decir que la hormona juvenil aumenta el consumo de oxígeno de *Blattella germanica*, independientemente del grado de desarrollo considerado (adultos o 5º estadio ninfal), siendo esta acción más acusada en los machos que en las hembras. Por otro lado, el precoceno II disminuye la tasa respiratoria de estos insectos, siendo su acción de igual magnitud en ambos sexos, y también independiente de la fase de desarrollo estudiada, adulto o 5º estadio ninfal.

1.2.- CONSUMO DE OXIGENO DE *ONCOFELTUS FASCIATUS*

Como anteriormente se ha mencionado, el peso es un factor importante relacionado con el consumo de oxígeno de los insectos, de forma que a medida que aumenta el peso disminuye su tasa respiratoria. En la Tabla V se presentan los valores medios de los pesos, con su correspondiente desviación típica, obtenidos para cada uno de los grupos experimentales estudiados en *O. fasciatus*. Como puede apreciarse, esta especie sigue la misma línea general que *Blattella germanica* en cuanto a las diferencias de peso entre sexos y estadios de desarrollo, es decir, los adultos pesan más que las ninfas de 5º estadio, y dentro de cada grupo, las hembras más que los machos.

Al estudiar los resultados obtenidos para la tasa metabólica de los insectos control (Fig. 24), podemos observar que el consumo de

Tabla V.- Peso medio (mg) de los especímenes de *Oncopeltus fasciatus* utilizados.

	ADULTOS	NINFAS
MACHOS	30.15±4.83	13.70±3.00
HEMBRAS	38.12±5.77	16.38±3.67

oxígeno de los diferentes grupos considerados sigue el siguiente orden decreciente: machos de 5º estadio, hembras adultas, machos adultos y hembras de 5º estadio.

Continuando con el estudio de los resultados, al analizar los datos obtenidos para los insectos tratados con HJ puede apreciarse (Fig. 24) que, salvo en las hembras adultas, el consumo de oxígeno es más elevado que para los individuos control, con un notable aumento en las ninfas (Tabla VI), siendo éste más acusado en las ninfas macho (1.25 μ l oxígeno/mg peso fresco/h frente a 1.09 de los controles) que en las ninfas hembra (1'19 μ l oxígeno/mg peso fresco/h frente a 0.99 de las hembras control de 5º estadio juvenil).

El tercer grupo experimental, es decir, aquellos insectos que previamente han recibido PII, presenta una tasa metabólica semejante a la de los individuos control (Fig. 24), no observándose variaciones muy grandes entre ambos grupos. En este caso, los

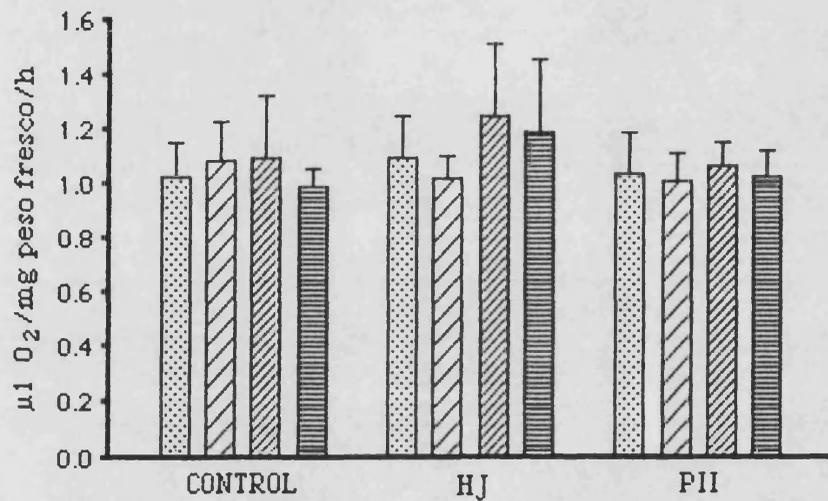


Figura 24.- Valores medios de la tasa metabólica de cada uno de los grupos experimentales de *Oncopeltus fasciatus*.

▣ adultos machos	▤ adultos hembras
▥ ninfas machos	▧ ninfas hembras

Tabla VI.- Consumo de oxígeno ($\mu\text{l}/\text{mg}$ peso fresco/h) de *Oncopeltus fasciatus* control y tratados con hormona juvenil (HJ) y precoceno II (PII).

		CONTROL	HJ	P II
	MACHOS	1.03 \pm 1.14	1.09 \pm 1.12	1.04 \pm 0.14
ADULTOS	HEMBRAS	1.08 \pm 0.14	1.02 \pm 0.13	1.01 \pm 0.09
	MEDIA	1.06 \pm 0.14	1.05 \pm 0.13	1.02 \pm 0.11
	MACHOS	1.09 \pm 0.23	1.25 \pm 0.20	1.07 \pm 0.11
NINFAS	HEMBRAS	0.99 \pm 0.14	0.19 \pm 0.23	1.03 \pm 0.11
	MEDIA	1.04 \pm 0.19	1.22 \pm 0.22	1.05 \pm 0.11

machos presentan una tasa metabólica similar, siendo las correspondientes a las hembras, tanto las adultas como las del 5º estadio, las que varían, disminuyendo el precoceno II el consumo de oxígeno en las primeras (1.01 μ l oxígeno/mg peso fresco/h frente a 1.08 de las hembras adultas control), y aumentándolo ligeramente en las hembras de 5º estadio ninfal (1.03 μ l oxígeno/mg peso fresco/h frente a 0'99 de las control).

El análisis de la varianza (Tabla VII), pone de manifiesto que los tres factores estudiados, tratamiento, sexo y fase de desarrollo, presentan diferencias significativas ($p < 0.05$), es decir, que cada uno de ellos, por sí solo, presenta diferente tasa metabólica entre los grupos establecidos.

Por otro lado, también cabe observar que la interacción tratamiento por fase de desarrollo (Tabla VII) presenta diferencias significativas ($p < 0.05$), es decir, la tasa metabólica de los adultos es significativamente distinta a la de las ninfas, dependiendo del tratamiento que estemos realizando.

Al realizar el Test de Tukey para los tratamientos (diferencia mínima significativa de 0.06 para $p < 0.05$) (Fig. 25), podemos observar que las diferencias significativas apreciadas en el análisis de la varianza correspondiente se deben exclusivamente al tratamiento con HJ, no siendo significativamente distintas las tasas metabólicas de los insectos controles y las de aquellos tratados con precoceno II.

El Test de Tukey de la interacción tratamiento por fase de desarrollo (diferencia mínima significativa de 0.10 para $p < 0.05$) (Fig. 26), nos confirma que las diferencias significativas en la tasa metabólica anteriormente mencionadas se deben al tratamiento con la HJ, y más concretamente al elevado consumo de oxígeno

Tabla VII.- Análisis de la varianza de los resultados obtenidos para *Oncopeltus fasciatus*. ** Diferencias significativas para $p < 0.05$.

FACTORES	G.L.	S.C.	C.M.	F
TRATAMIENTO (T)	2	0.47661	0.23831	9.84 **
SEXO (S)	1	0.10225	0.10225	4.22 **
EDAD (E)	1	0.22275	0.22275	9.19 **
T x S	2	0.02301	0.01150	0.47
T x E	2	0.35046	0.17523	7.23 **
S x E	1	0.03953	0.03953	1.63
T x S x E	2	0.08155	0.04077	1.68
ERROR	228	5.52356	0.02423	

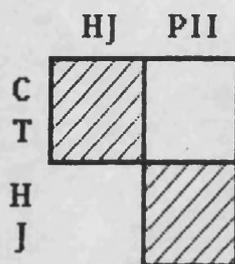


Figura 25.- Representación esquemática del test de Tukey para los tratamientos en *Oncopeltus fasciatus*.

CT: control.

HJ: hormona juvenil.

PII: precoceno II.

 Diferencias significativas

 Diferencias no significativas

		HJ		PII	
		A	N	A	N
CT	A				
	N				
HJ	A				
	N				

Figura 26.- Representación esquemática del test de Tukey para la interacción tratamiento por fase de desarrollo en *Oncopeltus fasciatus*.

A: adultos.

CT: control.

HJ: hormona juvenil.

N: ninfas.

PII: precoceno II.

 Diferencias significativas

 Diferencias no significativas

de las ninfas de 5^o estadio (Tabla VI), presentando todos los otros grupos experimentales tasas similares y formando, por tanto, una unidad homogénea frente al anterior. Es decir, las diferencias observadas en la tasa metabólica de *O. fasciatus* entre tratamientos y fase de desarrollo se deben exclusivamente al mayor consumo de oxígeno presentado por las ninfas de 5^o estadio de esta especie tratadas con HJ (Fig. 24). En el resto de casos no aparece diferencia alguna.

Como resumen al presente grupo de resultados podríamos decir que, en *O. fasciatus*, el tratamiento realizado afecta de forma distinta a ambas fases de desarrollo (Tabla VII). De este modo el tratamiento con HJ altera la tasa metabólica de las ninfas de 5^o estadio (Tabla VI), presentando éstas una respuesta metabólica aumentada a dicho compuesto, con un consumo de oxígeno de 1.22 μ l oxígeno/mg peso fresco/h, frente a 1.04 μ l de las ninfas control. Sin embargo, el tratamiento con PII no varía en absoluto la tasa metabólica de esta especie, ni en la fase adulta ni en el último estadio juvenil (1.02 y 1.05 μ l oxígeno/mg peso fresco/h, respectivamente, frente a 1.06 y 1.04 μ l oxígeno/mg peso fresco/h de los insectos control).

2.- CONSUMO DE OXIGENO DE ORGANOS AISLADOS.

Para proceder al estudio de los resultados obtenidos en el consumo de oxígeno de órganos aislados, se han separado los datos en dos grupos: por un lado los correspondientes a aquellos órganos que procedían de insectos previamente tratados con los compuestos objeto de estudio, y por otro aquéllos pertenecientes a órganos que han estado en contacto con los productos a lo largo de la experiencia.

En ambos casos, y debido a la diferencia manifiesta en estructura y función entre los órganos objeto de estudio, el análisis de los resultados se ha llevado a cabo para cada uno de los órganos por separado.

2.1.- CONSUMO DE OXIGENO DE ORGANOS. TRATAMIENTO DE LOS INSECTOS.

Como se recordará, estos órganos se extraen de insectos que han recibido 100 µg de HJ o PII unas 80 horas antes de realizarse la disección.

Los tubos digestivos se cultivan durante 14 horas hasta el momento de la determinación de su tasa metabólica, mientras que en el cuerpo graso y los ovarios se procede a dicha determinación inmediatamente después de su extracción.

2.1.1.- Tubo digestivo.

En la Tabla VIII se encuentran especificados los valores medios, con sus correspondientes desviaciones, obtenidos para la tasa

Tabla VIII.- Consumo de oxígeno (μ l/mg peso fresco/h) del tubo digestivo procedente de insectos control y tratados con hormona juvenil (HJ) y precoceno II (PII).

CONTROL	HJ	P II
0.90 \pm 0.15	1.28 \pm 0.55	1.13 \pm 0.21

metabólica del tubo digestivo.

Como puede apreciarse, los tubos digestivos procedentes de insectos control presentan la tasa metabólica más baja; los tubos digestivos extraídos de hembras previamente tratadas con HJ presentan una tasa respiratoria bastante elevada con respecto a los controles, siendo los tratados con PII los que muestran un consumo de oxígeno intermedio entre los dos anteriores (Fig. 27).

El análisis de la varianza de los datos anteriormente mencionados (Tabla IX), pone de manifiesto que no existen diferencias significativas entre tratamientos, debido, probablemente, a la desviación mostrada por los valores obtenidos para el tratamiento con la hormona.

A la vista de estos resultados se podría comentar que los tratamientos realizados no afectan al consumo de oxígeno del tubo digestivo, en las condiciones de experimentación.

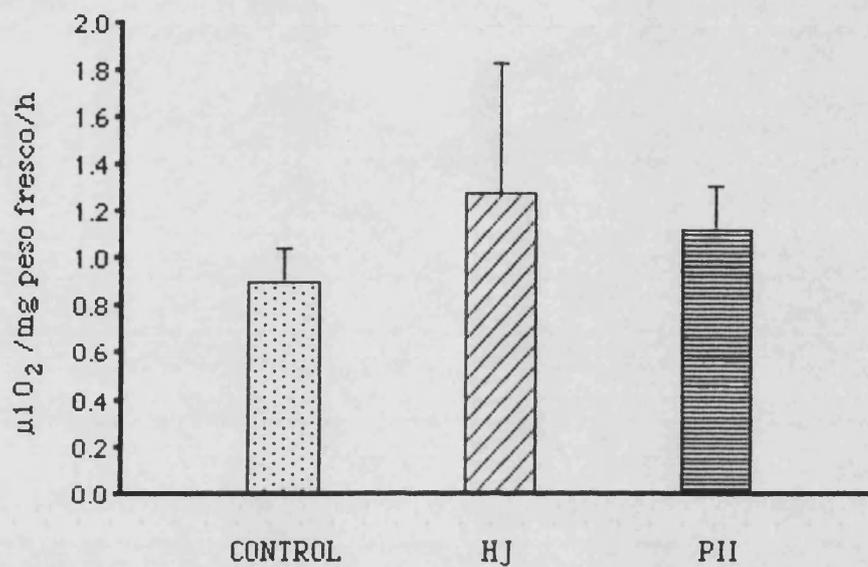


Figura 27.- Valores medios de la tasa metabólica de tubo digestivo procedente de insectos control y tratados con hormona juvenil (HJ) y con precoceno II (PII).

Tabla IX.- Análisis de la varianza de los resultados obtenidos para la tasa metabólica del tubo digestivo procedente de insectos control y tratados con hormona juvenil y precoceno II. ** Diferencias significativas para $p < 0.05$.

FACTORES	G.L.	S.C.	C.M.	F
TRATAMIENTO	2	0.71615	0.35807	2.91
ERROR	27	3.32320	0.12308	

2.1.2.- Cuerpo graso.

Los datos obtenidos en el estudio del cuerpo graso procedente de insectos tratados con los compuestos se han agrupado, de acuerdo con el grado de desarrollo de los ovarios de la hembra de procedencia. Se hace así debido a las diferencias estructurales aparentes observadas al realizar las correspondientes disecciones.

En este sentido hay que hacer notar que el tratamiento con HJ acelera el desarrollo de los ovarios, debido a su acción gonadotrófica; por ello, en el momento de realizar las disecciones, los ovarios se encontraban muy avanzados en su desarrollo, hallándose ovarios de los tipos C, D y E. Por el contrario, el tratamiento con PII, de acción antagonista a la anterior, impide la

maduración de los ovarios, por lo que al realizar las disecciones correspondientes estos órganos se encontraban muy poco desarrollados, perteneciendo a los tipos A y B.

Por tanto, para el estudio de este órgano, se ha procedido a investigar la tasa metabólica de órganos procedentes de hembras cuyos ovarios presentaran un grado de desarrollo tipo E (tratados previamente con acetona o con HJ) o un grado de desarrollo tipo A (tratados anteriormente con acetona o con PII).

En primer lugar se han estudiado los datos obtenidos para ambos grados de desarrollo considerados en el grupo control (Fig. 28), observándose valores de consumo de oxígeno más elevados para aquellos órganos procedentes de hembras con ovarios tipo E (Tabla X).

Sin embargo al realizar el análisis de la varianza de estos resultados (Tabla XI) se observa que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las tasas metabólicas de los dos grados estudiados, A y E.

A continuación se han estudiado los efectos de los tratamientos sobre la tasa de consumo de oxígeno del cuerpo graso, observándose (Tabla X) una tasa metabólica similar entre los órganos procedentes de hembras control y tratadas con HJ (los denominados tipo E) (Fig. 29). Sin embargo, el tratamiento con PII parece afectar ligeramente dicha tasa, al aumentar el consumo de oxígeno del cuerpo graso (Tabla X, Fig. 30).

No obstante, al realizar el análisis de la varianza de los datos anteriormente expuestos, se observa que ni la hormona juvenil (Tabla XII) ni el precoceno II (Tabla XIII), presentan efecto alguno sobre la tasa metabólica del cuerpo graso, al no existir diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a la de los controles.

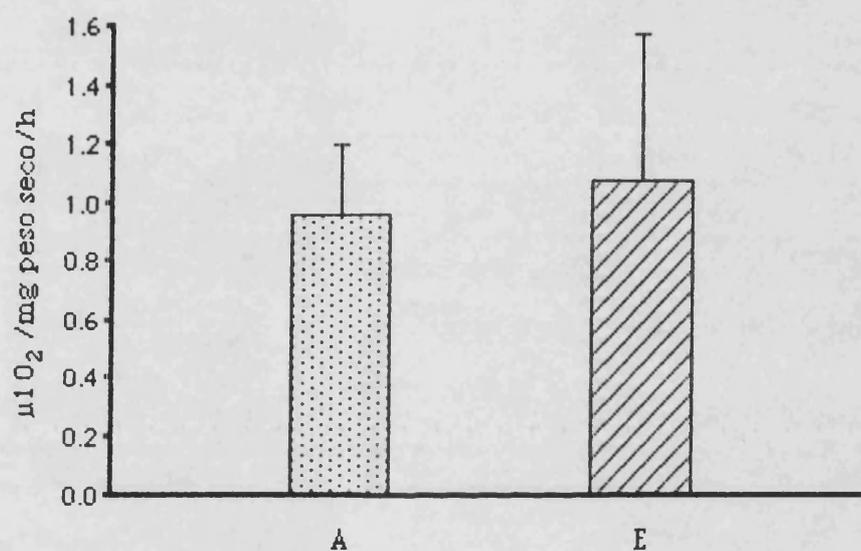


Figura 28.- Valores medios de la tasa metabólica de los dos tipos de cuerpo graso estudiados procedentes de insectos control.

Tabla X.- Consumo de oxígeno ($\mu\text{l}/\text{mg}$ peso seco/h) del cuerpo graso procedente de insectos control y tratados con hormona juvenil (HJ) y precoceno II (PII). A: ovarios con grado de desarrollo tipo A. E: ovarios con grado de desarrollo tipo E.

	CONTROL	HJ	P II
A	0.96 ± 0.24	_____	1.04 ± 0.34
E	1.08 ± 0.51	1.07 ± 0.33	_____

Tabla XI.- Análisis de la varianza de los resultados obtenidos para la tasa metabólica de los dos tipos de cuerpo graso estudiados procedentes de insectos control.

** Diferencias significativas para $p < 0.05$.

FACTORES	G.L.	S.C.	C.M.	F
GRADO	1	0.06207	0.06207	0.39
ERROR	18	2.86033	0.15891	

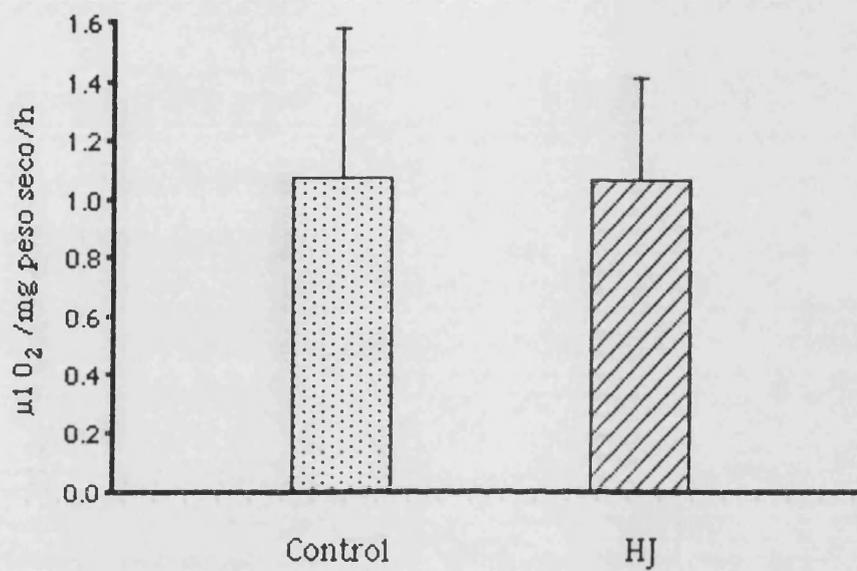


Figura 29.- Valores medios de la tasa metabólica de cuerpo graso procedente de insectos control y tratados con hormona juvenil (HJ).

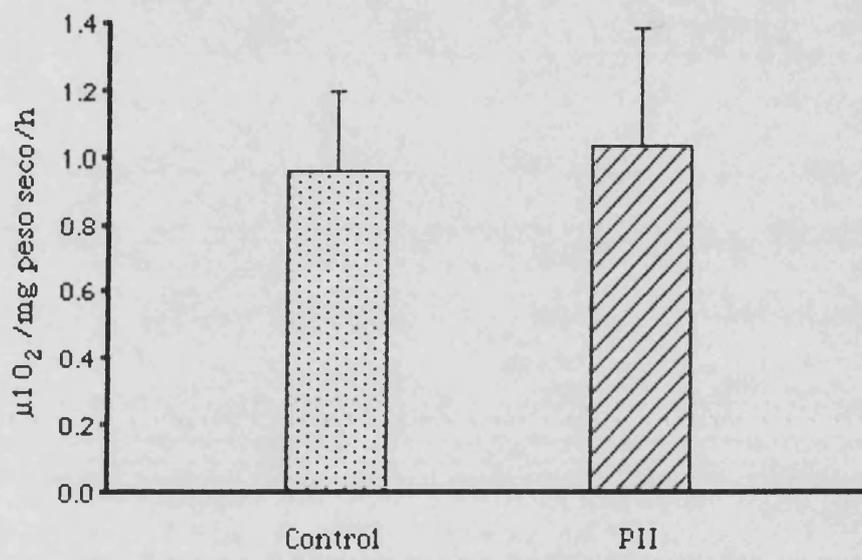


Figura 30.- Valores medios de la tasa metabólica de cuerpo graso procedente de insectos control y tratados con precoceno II (PII).

Tabla XII.- Análisis de la varianza de los resultados obtenidos para la tasa metabólica de cuerpo graso procedente de insectos tratados con hormona juvenil.

**** Diferencias significativas para $p < 0.05$.**

FACTORES	G.L.	S.C.	C.M.	F
TRATAMIENTO	1	0.00004	0.00004	0.00
ERROR	18	3.30781	0.18377	

Tabla XIII.- Análisis de la varianza de los resultados obtenidos para la tasa metabólica de cuerpo graso procedente de insectos tratados con precoceno II.

**** Diferencias significativas para $p < 0.05$.**

FACTORES	G.L.	S.C.	C.M.	F
TRATAMIENTO	1	0.02891	0.02891	0.33
ERROR	18	1.57735	0.08763	

En resumen se puede apuntar que el tratamiento realizado sobre el insecto no afecta en modo alguno a la tasa metabólica de su cuerpo graso aislado, ya sea el tratamiento con hormona juvenil, o con su antagonista, el precoceno II, en las condiciones experimentales empleadas por nosotros.

2.1.3.- Ovarios.

En primer lugar hay que mencionar que, al igual que con el cuerpo graso, los resultados del consumo de oxígeno de ovarios se han agrupado de acuerdo con el grado de desarrollo de los mismos, realizando el análisis de la varianza comparando aquellos grupos comunes tanto para el control como para los tratamientos.

Es decir, se han comparado las tasas metabólicas de los grados de desarrollo altos (tipos C, D y E) de ovarios procedentes de hembras tratadas con HJ, con las de los mismos tipos procedentes de hembras control. En el caso del PII, se ha comparado el consumo de oxígeno de los grados de desarrollo bajos (tipos A y B) con los correspondientes del grupo control.

En primer lugar se ha procedido al estudio de los datos obtenidos para el consumo de oxígeno dentro del grupo de los controles, comparando la tasa metabólica de los distintos grados de desarrollo de ovarios investigados.

Como puede apreciarse (Fig. 31) hay un descenso paulatino en el consumo de oxígeno de este órgano a medida que aumenta el grado de desarrollo. La única excepción a este comportamiento se presenta en los ovarios de tipo B, con una tasa metabólica mucho más elevada que el resto (Tabla XIV). Parece existir aquí una cierta relación de tipo lineal entre la tasa metabólica de los

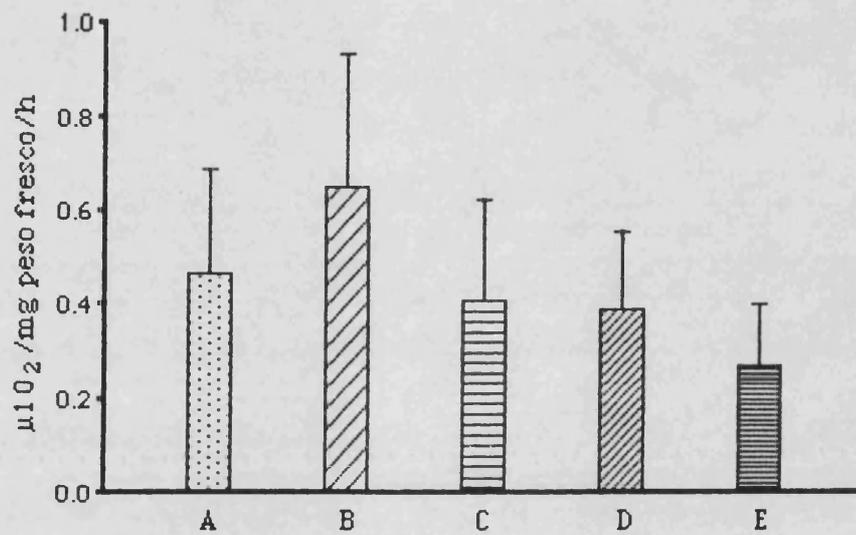


Figura 31.- Valores medios de las tasas metabólicas de ovarios de distinto grado de desarrollo procedentes de insectos control. A, B, C, D y E indican, respectivamente, los grados de desarrollo.

Tabla XIV.- Consumo de oxígeno ($\mu\text{l}/\text{mg}$ peso fresco/h) de ovarios de los distintos grados de desarrollo procedentes de insectos control.

A	B	C	D	E
0.47 \pm 0.23	0.65 \pm 0.30	0.41 \pm 0.23	0.39 \pm 0.17	0.27 \pm 0.13

Tabla XV.- Análisis de la varianza de los resultados obtenidos para la tasa metabólica de los distintos grados de desarrollo de ovarios procedentes de insectos control.

**** Diferencias significativas para $p < 0.05$.**

FACTORES	G.L.	S.C.	C.M.	F
GRADO	4	1.50965	0.37741	7.78 **
ERROR	95	4.60716	0.04850	

ovarios y su grado de desarrollo, si exceptuamos los ovarios de tipo B.

El análisis de la varianza correspondiente (Tabla XV) demuestra que realmente existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la tasa metabólica de los distintos grados de desarrollo. Mediante el correspondiente Test de Tukey (diferencia mínima significativa de 0.19, para $p < 0.05$) (Fig. 32) se puede observar que estas diferencias se deben sobre todo al consumo de oxígeno de los ovarios tipo B, que es significativamente distinto de los correspondientes a los tipo C, D y E. También hay diferencias significativas entre las tasas metabólicas correspondientes a los tipos A y E.

El estudio de los resultados obtenidos para el consumo de oxígeno de ovarios procedentes de hembras tratadas con HJ (Tabla XVI) nos muestra que, en los tres tipos de ovarios C, D y E, parece existir un ligero aumento de la tasa metabólica con respecto a los controles (Fig. 33).

Sin embargo, el correspondiente análisis de la varianza (Tabla XVII) nos muestra que no hay diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento, existiendo, sin embargo, con respecto al grado de desarrollo del ovario considerado. El Test de Tukey (diferencia mínima significativa de 0.09 para $p < 0.05$) (Fig. 34) nos indica que los tipos de ovarios C y D forman un grupo más homogéneo, presentando diferencias en la tasa metabólica, que son significativamente distintas a la de los ovarios tipo E.

Por último, se ha procedido a estudiar los resultados del consumo de oxígeno de ovarios procedentes de hembras tratadas con PII. Como se puede observar (Tabla XVIII), estos órganos presentan una tasa metabólica más elevada que la perteneciente

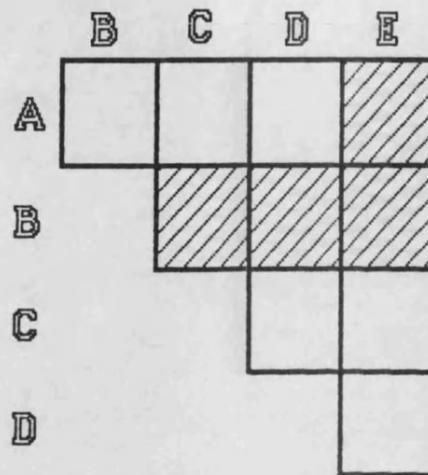


Figura 32.- Representación esquemática del test de Tukey para los distintos grados de desarrollo de ovarios considerados procedentes de insectos control.

- Diferencias significativas
- Diferencias no significativas

Tabla XVI.- Valores medios del consumo de oxígeno ($\mu\text{l}/\text{mg}$ peso fresco/h) de los distintos grados de desarrollo de ovarios procedentes de insectos control y tratados con hormona juvenil.

C	D	E
0.44 \pm 0.18	0.40 \pm 0.17	0.28 \pm 0.14

Tabla XVII.- Análisis de la varianza de los resultados obtenidos para la tasa metabólica de ovarios procedentes de insectos control y tratados con hormona juvenil.

**** Diferencias significativas para $p < 0.05$.**

FACTORES	G.L.	S.C.	C.M.	F
TRATAMIENTO (T)	1	0.01302	0.01302	0.46
GRADO (G)	2	0.56646	0.28323	10.11 **
T x G	2	0.01409	0.00704	0.25
ERROR	114	3.19477	0.02802	

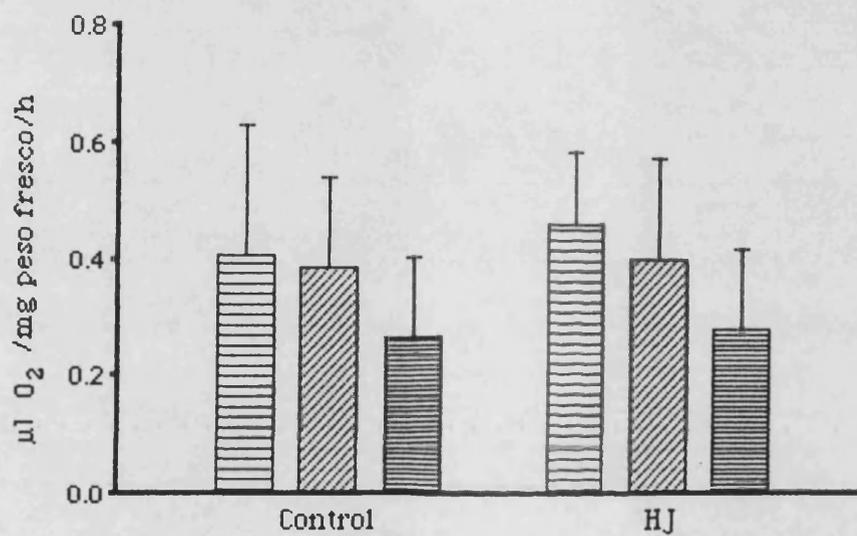


Figura 33.- Valores medios de la tasa metabólica de los distintos tipos de ovarios procedentes de insectos control y tratados con hormona juvenil (HJ).

▨ C

▨ D

▨ E

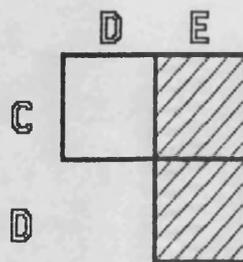


Figura 34.- Representación esquemática del test de Tukey para los distintos grados de ovarios considerados procedentes de insectos control y tratados con hormona juvenil.

- Diferencias significativas
- Diferencias no significativas

Tabla XVIII.- Valores medios del consumo de oxígeno ($\mu\text{l}/\text{mg}$ peso fresco/h) de ovarios procedentes de insectos control y tratados con precoceno II (PII).

CONTROL	P II
0.56 \pm 0.27	0.77 \pm 0.44

Tabla XIX.- Análisis de la varianza de los resultados obtenidos para las tasas metabólicas de ovarios procedentes de insectos control y tratados con precoceno II

FACTORES	G.L.	S.C.	C.M.	F
TRATAMIENTO (T)	1	0.90804	0.90804	6.66 **
GRADO (G)	1	0.00698	0.00698	0.05
T x G	1	0.52778	0.52778	3.87
ERROR	76	10.35861	0.13630	

a los controles, ya se trate de ovarios con un grado de desarrollo tipo A o tipo B indistintamente (Fig. 35). El análisis de la varianza de estos resultados nos indica que existe una clara diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la tasa metabólica de los ovarios procedentes de hembras control y de hembras previamente tratadas con PII (Tabla XIX).

En resumen podríamos decir que la tasa metabólica de los ovarios depende de su grado de desarrollo. El tratamiento de las hembras con HJ no influye sobre el posterior consumo de oxígeno de sus ovarios aislados; sin embargo, el tratamiento con PII actúa sobre los ovarios, aumentando su consumo de oxígeno.

2.2.- CONSUMO DE OXIGENO DE ORGANOS. TRATAMIENTO DEL MEDIO.

Como se menciona anteriormente, estos órganos proceden de hembras adultas de *Oncopeltus fasciatus* que no han recibido tratamiento alguno. Las disecciones se han realizado en el momento establecido para cada órgano, y los compuestos utilizados en los tratamientos se han adicionado al medio en el cual van a estar inmersos los órganos durante el tiempo que dura la experiencia.

2.2.1.- Tubo digestivo.

Al analizar la tasa metabólica del tubo digestivo, comparando los resultados obtenidos para los controles y para los tratamientos con HJ y PII (Tabla XX), podemos observar que ambos compuestos ejercen una acción similar. Así, tanto la hormona como el

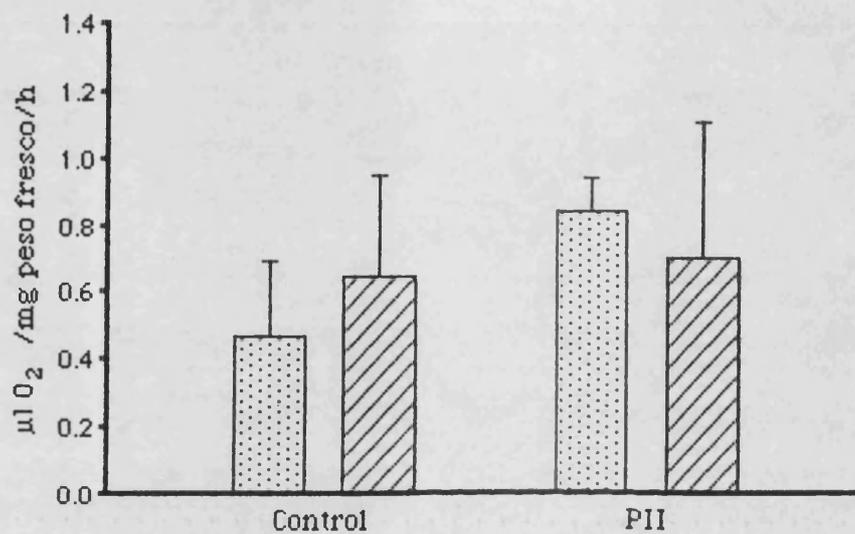


Figura 35.- Valores medios de la tasa metabólica de los distintos tipos de ovarios procedentes de insectos control y tratados con precoceno II (PII).

▣ A

▤ B

Tabla XX.- Consumo de oxígeno (μ l/mg peso fresco/h) del tubo digestivo inmerso en medio control y tratado con hormona juvenil (HJ) y precoceno II (PII).

CONTROL	HJ	P II
1.74 \pm 0.79	1.33 \pm 0.28	1.51 \pm 0.51

precoceno disminuyen la tasa metabólica del tubo digestivo cuando el tratamiento se realiza sobre el medio de cultivo, siendo este efecto más acusado en el caso de la HJ (Fig. 36).

Este resultado es contrario al observado en el caso del tubo digestivo procedente de hembras previamente tratadas, en donde la tasa metabólica resultaba aumentada por efecto del tratamiento, presentando también el PII, como en este caso, un consumo de oxígeno intermedio entre el del control y el de la HJ.

Sin embargo, el análisis de la varianza de los resultados anteriormente mencionados muestra que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) debidas al tratamiento (Tabla XXI), al igual que ocurría con la tasa metabólica del tubo digestivo procedente de insectos tratados (Tabla IX).

En definitiva podríamos decir que ni la hormona juvenil ni el precoceno II influyen sobre la tasa metabólica del tubo digestivo

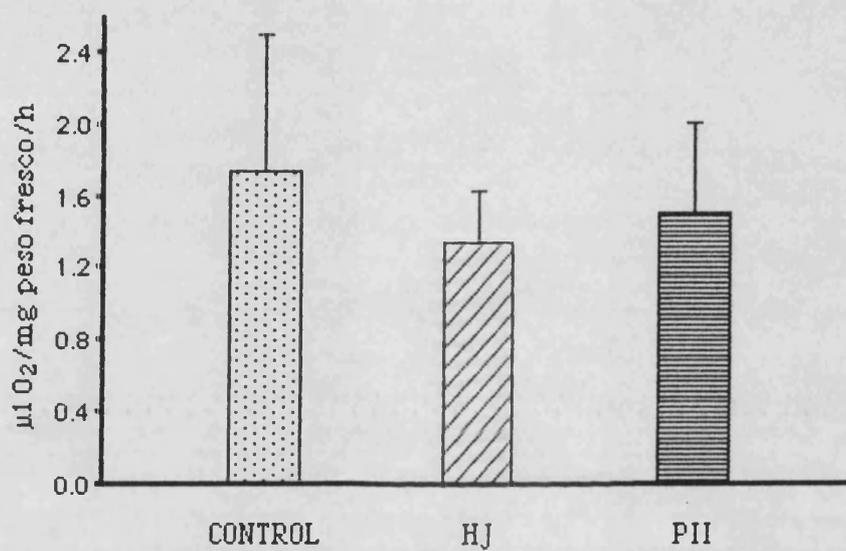


Figura 36.- Valores medios de la tasa metabólica de tubo digestivo inmerso en medio control y tratado con hormona juvenil (HJ) y precoceno II (PII).

Tabla XXI.- Análisis de la varianza de los resultados obtenidos para la tasa metabólica de tubo digestivo inmerso en medio control y tratado con hormona juvenil y precoceno II. ** Diferencias significativas para $p < 0.05$.

FACTORES	G.L.	S.C.	C.M.	F
TRATAMIENTO	2	0.84411	0.42205	1.31
ERROR	27	8.70679	0.32247	

cuando se aplican sobre el medio de cultivo en que dicho órgano se encuentra inmerso durante la experiencia.

2.2.2.- Cuerpo graso.

El estudio de la tasa metabólica del cuerpo graso, inmerso en medio previamente tratado con los compuestos ya mencionados, se ha realizado utilizando aquéllos provenientes de hembras cuyos ovarios presentaban grados de desarrollo intermedios, de los tipos B y C.

En la Tabla XXII se presentan los valores medios, y sus desviaciones, obtenidos para la tasa metabólica del cuerpo graso cuando el tratamiento se realiza sobre el medio salino en el que

Tabla XXII.- Valores medios del consumo de oxígeno ($\mu\text{l}/\text{mg}$ peso seco/h) de los distintos grados de cuerpo graso considerados, inmersos en medio control y tratado con hormona juvenil (HJ) y precoceno II (PII).

CONTROL	HJ	P II
1.34 \pm 0.86	1.01 \pm 0.27	1.11 \pm 0.35

se halla inmerso durante la experiencia. Como puede apreciarse, el tratamiento disminuye el consumo de oxígeno de este órgano, tanto en los cuerpos grasos provenientes de hembras con ovarios tipo B como en los provenientes de hembras con ovarios tipo C (Fig. 37). Este efecto es más acusado cuando el tratamiento se realiza con HJ, presentando el tratamiento con PII una acción intermedia.

Sin embargo, cuando se realiza el análisis de la varianza correspondiente, las diferencias anteriormente mencionadas no son significativamente distintas ($p < 0.05$) (Tabla XXIII).

Un resultado similar se obtiene en el caso del tubo digestivo, con una disminución en la tasa metabólica debida al tratamiento realizado (Fig. 36), pero sin llegar a ser significativas las

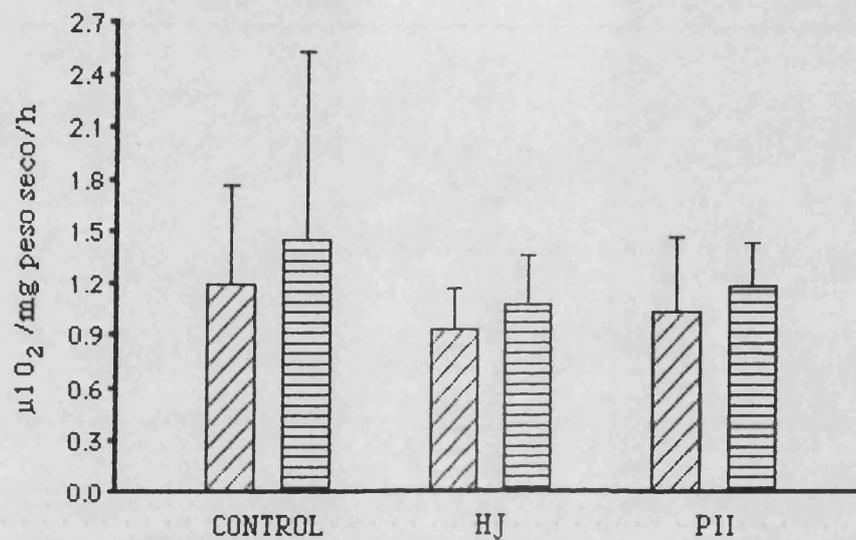


Figura 37.- Valores medios de la tasa metabólica obtenidos para distintos tipos de cuerpo graso inmerso en medio control y tratado con hormona juvenil (HJ) y precoceno II (PII).

▨ B

▨ C

Tabla XXIII.- Análisis de la varianza de los resultados de la tasa metabólica obtenidos para cuerpo graso inmerso en medio control y tratado con hormona juvenil y precoceno II. ** Diferencias significativas para $p < 0.05$.

FACTORES	G.L.	S.C.	C.M.	F
TRATAMIENTO (T)	2	1.18081	0.59040	1.73
GRADO (G)	1	0.56014	0.56014	1.64
T x G	2	0.05915	0.02957	0.09
ERROR	54	18.48181	0.34226	

diferencias observadas (Tabla XXI).

De esta manera podríamos decir que, en las condiciones utilizadas para la realización del presente trabajo, la HJ o el PII aplicados directamente al medio salino no tienen ningún efecto sobre la tasa metabólica del cuerpo graso inmerso en él.

2.2.3.- Ovarios.

Para proceder al estudio del efecto de la HJ o el PII sobre la tasa metabólica de ovarios inmersos en suero salino, primeramente se han escogido aquéllos que, teniendo un grado de

desarrollo intermedio, hubieran mostrado en la experiencia de tratamiento del insecto diferencias significativas en cuanto a su tasa metabólica (Fig. 32). Así pues, se han elegido los ovarios de los tipos B y C.

En primer lugar, se ha procedido a investigar si existían diferencias entre ambos tipos de ovarios del grupo control, es decir, de aquellos inmersos en medio salino adicionado con acetona, puesto que las medias de su tasa metabólica (Tabla XXIV) eran bastante distintas. El correspondiente análisis de la varianza (Tabla XXV) demuestra que hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la tasa metabólica de los dos grados de desarrollo del ovario considerados.

Continuando con el estudio, en la Tabla XXVI, se puede observar que el tratamiento del medio con HJ o PII influye sobre la tasa metabólica de los ovarios, de acuerdo con su grado de desarrollo. Así, el PII disminuye el consumo de oxígeno de ambos tipos de ovarios (Fig. 38), siendo este efecto más acusado en los ovarios tipo B. Por otro lado, el tratamiento con HJ también provoca una disminución de la tasa metabólica de los ovarios tipo B, más notable todavía que la ocasionada por el PII, aunque produce el efecto contrario cuando consideramos los ovarios con un grado de desarrollo tipo C.

Este efecto contrario se corrobora al realizar el correspondiente análisis de la varianza (Tabla XXVII), donde se observa que las tasas metabólicas de los tres grupos experimentales considerados (control, HJ y PII) no son significativamente distintas entre sí ($p < 0.05$), aunque tales diferencias son significativas cuando el factor a considerar es el grado de desarrollo del ovario (B y C). Además, esta significación es más patente cuando consideramos el

Tabla XXIV.- Consumo de oxígeno ($\mu\text{l}/\text{mg}$ peso fresco/h) de los distintos grados de desarrollo de ovarios considerados inmersos en medio control. B y C indican el grado de desarrollo.

B	C
0.69 \pm 0.18	0.45 \pm 0.13

Tabla XXV.- Análisis de la varianza de los resultados obtenidos para la tasa metabólica de ovarios inmersos en medio control. ** Diferencias significativas para $p < 0.05$.

FACTORES	G.L.	S.C.	C.M.	F
GRADO	1	0.60849	0.60849	24.13 **
ERROR	38	0.95813	0.02521	

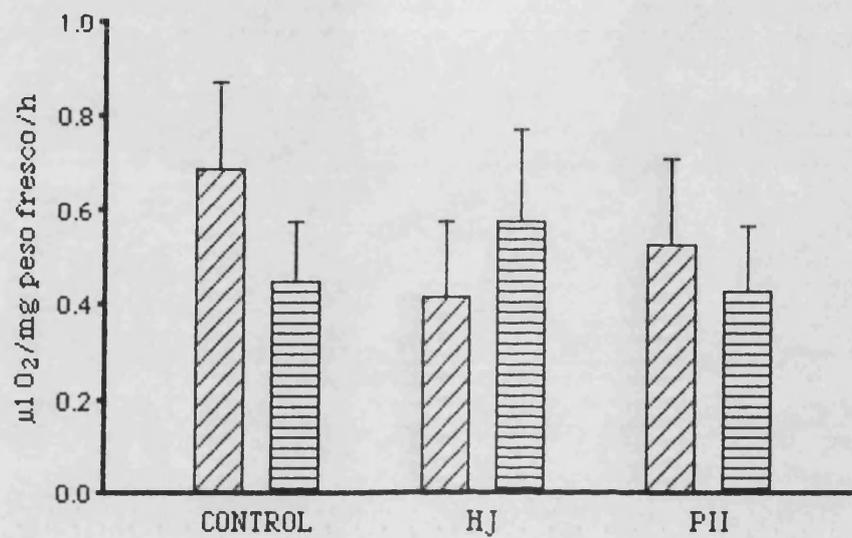


Figura 38.- Valores medios de la tasa metabólica de los distintos grados de ovarios inmersos en medio control y tratado con hormona juvenil (HJ) y precoceno II (PII).

▨ B

▨ C

Tabla XXVI.- Consumo de oxígeno ($\mu\text{l}/\text{mg}$ peso fresco/h) de los distintos grados de desarrollo de ovarios considerados inmersos en medio control y tratado con hormona juvenil (HJ) y precoceno II (PII).

	CONTROL	HJ	P II
B	0.69 \pm 0.18	0.42 \pm 0.16	0.53 \pm 0.19
C	0.45 \pm 0.13	0.58 \pm 0.20	0.43 \pm 0.14
MEDIA	0.57 \pm 0.16	0.50 \pm 0.18	0.48 \pm 0.17

Tabla XXVII.- Análisis de la varianza de los resultados obtenidos para la tasa metabólica de ovarios inmersos en medio control y tratado con hormona juvenil y precoceno II. ** Diferencias significativas para $p < 0.05$.

FACTORES	G.L.	S.C.	C.M.	F
TRATAMIENTO (T)	2	0.16982	0.08491	2.98
GRADO (G)	1	0.12947	0.12947	4.54 **
T x G	2	0.81722	0.40861	14.34 **
ERROR	114	3.24806	0.02849	

efecto de la interacción de ambos factores (tratamiento por grado).

El Test de Tukey aplicado a este último caso nos muestra (diferencia mínima significativa de 0.15 para $p < 0.05$) (Fig. 39) que las mencionadas diferencias se encontrarían entre el grado B del grupo control con respecto a los tratamientos realizados (HJ y PII), así como entre los grados B del grupo control y C del tratamiento con PII.

En suma podríamos decir que la HJ y el PII, aplicados sobre el medio salino que baña a los ovarios durante la experiencia, ejercen su efecto dependiendo del grado de desarrollo del órgano. Se observa así un incremento de la tasa metabólica de los ovarios tipo C tratados con HJ, y una disminución de la misma en el resto de casos considerados.

El efecto observado para el caso de los ovarios sigue la tónica general de los resultados obtenidos para el tubo digestivo y cuerpo graso inmersos en medio previamente tratado con los compuestos.

Al comparar el resultado obtenido en este apartado, con el presentado para los ovarios procedentes de hembras previamente tratadas, se observa que el efecto es contrario en ambos casos, lo que también se aprecia cuando se consideran los otros dos órganos estudiados.

Las diferencias observadas en la tasa metabólica respecto a los grados de desarrollo son similares a las obtenidas anteriormente (Tabla XIV), cuando el tratamiento se realiza sobre el insecto.

		HJ		PII	
		B	C	B	C
CT	B				
	C				
HJ	B				
	C				

Figura 39.- Representación esquemática del test de Tukey para los distintos grados de ovarios inmersos en medio control y tratado con hormona juvenil y precoceno II.

B, C: ovarios de tipo B y C

CT: control

HJ: hormona juvenil

PII: precoceno II.

 Diferencias significativas

 Diferencias no significativas

DISCUSSION

En el presente trabajo se han utilizado dos especies de insectos: *Blattella germanica* y *Oncopeltus fasciatus*. Ambas se crían en laboratorio con relativa facilidad, obteniéndose resultados satisfactorios y disponiendo de ellos en la cantidad necesaria y en el momento adecuado. *B. germanica* es un insecto que vive asociado con el hombre, encontrándose en almacenes, cafeterías, etc., es un insecto perjudicial (Martínez Pardo, 1977) debido a que actúa como vector de transmisión de algunas enfermedades contagiosas producidas por enterobacterias (Fernández et al., 1971; Pulver, 1973). Ambas especies pertenecen a Ordenes de insectos distintos; el primero de ellos es del Orden Ortoptera, y *O. fasciatus* pertenece al Orden Hemiptera. Aunque ambos son insectos Heterometábolos, la evolución de los segundos les ha llevado a una forma de vida y especialización completamente distinta a la de los insectos del Orden Ortoptera.

Se han elegido estas especies por su particular respuesta frente a los compuestos utilizados. Se ha demostrado que *B. germanica* es muy sensible a la hormona juvenil de Röller (Kunkel, 1973; Martínez Pardo y Ribó Canut, 1975; Martínez Pardo, 1977; Garcerá Zamorano, 1980), mostrando respuestas diferentes, según distintos autores (Bellés y Messeguer, 1981; Garcerá Zamorano et al., 1981, 1983; Bellés et al., 1985), frente al precoceno II. *O. fasciatus* es también sensible a la hormona juvenil, aunque se ha elegido principalmente por su especial sensibilidad mostrada frente al precoceno II (Bowers, 1976; Bowers et al., 1976; Bowers y Martínez Pardo, 1977; Unnithan et al., 1977; Masner et al., 1979; Müller et al., 1979).

La paralización de los insectos, antes de pesarlos y envolverlos

en la gasa, se ha llevado a cabo manteniéndolos en frío. Esta forma nos ha parecido la más correcta de las disponibles en el laboratorio (dióxido de carbono o éter etílico anestésico). El éter tiene el peligro de que puede matar a los insectos, puesto que les resulta bastante tóxico, no siendo recomendable su uso. El gas carbónico es una buena ayuda cuando se tienen que manejar insectos de movimientos muy rápidos, como es el caso de *Blattella germanica*. Sin embargo, no puede ser utilizado antes de realizar una experiencia pues podría interferir con la posterior medida del consumo de oxígeno, al ir expulsándolo el insecto poco a poco.

El pesaje de los insectos se ha realizado al iniciar las experiencias como lo hacen otros autores (Guillet, 1976; Tonzetich et al., 1976; Baker et al., 1979). Sin embargo, Petitpren y Knight (1970), Berry y Brammer (1975) y Modlin y Jayne (1981), pesan al insecto tras la realización de la experiencia.

También se ha recurrido a inmovilizar a los insectos con una gasa antes de proceder a la medida de su consumo de oxígeno. Se ha pretendido con ello evitar una excesiva tasa metabólica que sería consecuencia de la actividad. No obstante, se ha intentado estudiar la tasa metabólica de insectos en reposo, no refiriéndonos con ello a un metabolismo basal, puesto que, como se menciona en la Introducción, nunca podremos asegurar que un insecto está consumiendo únicamente el oxígeno necesario para su supervivencia, por muy quieto que se encuentre.

En este sentido, nos hemos apoyado en la técnica utilizada por algunos autores (Aboul-Nasr et al., 1976; Block, 1976; Horwath y Duman, 1983) que también inmovilizan a sus insectos para medir

su tasa metabólica. No obstante, también hay que considerar el *stress* al que deben encontrarse sometidos los insectos por el simple hecho de estar encerrados en una gasa y sin posibilidad de movimiento. Esto supondrá, probablemente, un consumo de oxígeno adicional que no puede desligarse del consumo hallado en las condiciones de medida utilizadas.

Cuando consideramos el consumo de oxígeno de órganos, hay que distinguir entre el tubo digestivo, que se ha cultivado en un medio antes de realizar la medida, y aquellos otros dos órganos cuya medida se ha realizado inmediatamente después de ser extraídos, como los ovarios y el cuerpo graso.

Inicialmente, se realizaron una serie de experiencias preliminares con el tubo digestivo y los ovarios. Para ello se cultivaban ambos órganos por separado y, tras un determinado tiempo en estufa, se procedía a la medida de su consumo de oxígeno. De esta forma se pudo apreciar que el tubo digestivo respondía de una forma bastante uniforme, encontrándose valores muy dispares en el caso del ovario. Esta diferencia podría deberse a que el tubo digestivo presenta pocas capas de células (Richards y Davies, 1984), con lo que el intercambio gaseoso entre ellas y el medio circundante es más regular. Quedó pues establecido el método para el estudio del consumo de oxígeno del tubo digestivo, ya que la Bibliografía no aportaba ninguno. Sin embargo, los ovarios, al estar formados por múltiples capas celulares, presentan un inconveniente para el intercambio gaseoso de las células más internas; tal vez por ello se encontrarían las variaciones antes mencionadas.

Debido a ello, y a las contaminaciones bacterianas observadas en varias ocasiones, se desechó este método para el estudio de la tasa metabólica de los ovarios, utilizándose el descrito por Fourche y Ambrosioni (1969) para ovarios de *Bombyx mori*, con la salvedad de utilizar como suero salino el de Mitsushashi y Maramorosch que nos había dado con anterioridad buenos resultados.

Los ovarios se agruparon según su grado de desarrollo, siguiendo los criterios de Kelly y Davenport (1976), para eliminar la variabilidad en los resultados, lo que permitió obtener respuestas mucho más reproducibles. Parece lógico pensar que según varía el grado de desarrollo del órgano, varía también su actividad metabólica y, consecuentemente, su tasa respiratoria.

Por otro lado, la medida de la tasa metabólica del cuerpo graso se estableció mediante experiencias previas, combinando las técnicas descritas (Müller y Engelmann, 1968; Ladel et al., 1979). La técnica utilizada y descrita en el correspondiente apartado de Material y Métodos ha proporcionado resultados aceptables.

Finalmente, hay que resaltar que la medida del consumo de oxígeno de los órganos se realiza en continua agitación de los matraces. La absorción de oxígeno por los tejidos se realiza a partir del oxígeno disuelto. Con la agitación de los matraces, conseguimos que los intercambios gaseosos entre la fase líquida y la fase gaseosa se realicen en buenas condiciones, asegurando así una disponibilidad continua de oxígeno a los órganos (Umbreit et al., 1972; Boemare y Maurand, 1976).

Esta agitación durante la experiencia no se realiza sólo cuando se trata de órganos aislados (Fourche y Ambrosioni, 1969; Ladel et

al., 1979; Torreblanca Tamarit, 1986), sino que también se ha utilizado cuando se mide consumo de oxígeno de larvas o pupas acuáticas (Petitpren y Knight, 1970; Berry y Brammer, 1975; Modlin y Jayne, 1981) e incluso algunos autores la utilizan para la medida de la tasa metabólica de insectos (Knight y Simmons, 1975; Aboul-Nasr et al., 1976).

1.- ESTUDIO DEL CONSUMO DE OXIGENO EN *BLATTELLA GERMANICA*.

Tal como se esperaba al inicio de las experiencias, el tratamiento con hormona juvenil incrementa la tasa metabólica de *B. germanica*, mientras que el precoceno II la disminuye (Fig. 21; Tabla III).

Hay que destacar así mismo que, a pesar de que los valores descritos para los tratamientos son significativamente distintos de los resultados presentados por los controles, no suponen una respuesta hipermetabólica o hipometabólica como la descrita para otras especies de insectos (Slama y Hodková, 1975; Slama y Kryspin-Sorensen, 1979; Kuusik et al., 1980, 1983), entendiéndose por respuesta hipermetabólica aquella en que el insecto tratado sobrepasa en varios órdenes de magnitud la respuesta del control (Slama y Hodková, 1975).

Sin embargo, la mayor parte de la Bibliografía al respecto se refiere a insectos Holometabólos (Slama y Hodková, 1975; Kryspin-Sorensen et al., 1977; Kuusik y Kogerman, 1978; Slama y Kryspin-Sorensen, 1979; Kuusik et al., 1980, 1983; Fytizas y Mourikis, 1981; Nemeč, 1985), habiéndose encontrado muy pocos estudios referidos a la acción de la HJ o sus análogos sobre el metabolismo respiratorio de insectos Heterometabólos (Novak y Slama, 1962; Slama, 1965; Llavador Enguix et al., 1981).

Conviene resaltar que no en todos los trabajos mencionados parece existir respuesta hipermetabólica al tratamiento con hormona juvenil o sus análogos (Kryspin-Sorensen et al., 1977; Kuusik y Kogerman, 1978). Por otro lado, Fytizas y Mourikis (1981) encontraron que tras una ligera estimulación inicial de la tasa

metabólica de pupas de *Heliothis armijera* (Lepidoptera) tras la aplicación del juvenoide, se producía un efecto hipometabólico a largo plazo, con una disminución de la tasa respiratoria desde 1.74 $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{h}$ a 0.47 $\mu\text{l}/\text{mg}/\text{h}$.

La respuesta al tratamiento con hormona juvenil mostrado por los machos de *B. germanica*, tanto de los adultos como de las ninfas de 5º estadio, es más intensa que la mostrada por las hembras de idéntico estadio de desarrollo.

Podría explicarse esta diferencia atendiendo a las diferencias de peso entre ambos sexos (Tabla II), lo que implicaría que a igualdad de dosis de hormona juvenil por individuo, ésta supone para los machos una mayor cantidad de producto activo por unidad de peso, dado el menor tamaño de éstos.

Sin embargo, si se considera el total de los resultados, tanto controles como tratados con precoceno II (Fig. 21), no puede considerarse válido el razonamiento, ya que no se reflejan dichas diferencias, por lo que éstas deberían atribuirse a la existencia de niveles distintos de hormona juvenil endógena en ambos sexos o a la eficacia de los mecanismos de eliminación de la hormona, probablemente diferentes en cada uno de ellos.

Los resultados obtenidos en las ninfas de 5º estadio están en concordancia con los obtenidos por los autores consultados que trabajan con insectos Heterometábolos (Novak y Slama, 1962; Llavador Enguix et al., 1981), así como con aquellos que realizan sus estudios sobre insectos Holometábolos (Slama y Hodková, 1975; Kuusik y Kogerman, 1978; Slama y Kryspin-Sorensen, 1979; Kuusik et al., 1980, 1983). La mayor tasa metabólica observada en los machos podría ser debida, probablemente, a su menor peso, lo que

estaría de acuerdo con algunos trabajos ya mencionados (Kapoor, 1974; Young, 1979; Migula et al., 1980; Howell y Voshell, 1982).

El precoceno II altera, asimismo, la tasa metabólica de *B. germanica* (Fig 21; Tabla III), a pesar de que esta especie no presenta una sensibilidad excesiva en ensayos morfogénicos (Martínez Carrau et al., 1981; Garcerá Zamorano et al., 1981, 1983). Este hecho se hallaría en aparente contradicción con los postulados acerca de que el grado de alteración en la tasa de consumo de oxígeno está directamente relacionado con el grado de inducción de cambios morfológicos (Novak y Slama, 1962; Kryspin-Sorensen et al., 1977). Por otro lado, esta es la primera vez que se estudia el efecto del precoceno II sobre el metabolismo respiratorio de un insecto Heterometábolo, por lo que no podemos tomar como referencia ningún trabajo previo.

La mejor explicación al efecto del precoceno II sobre la tasa metabólica de *Blattella germanica*, habría que buscarla en la relación existente entre allatectomía química inducida por el tratamiento con el precoceno y allatectomía quirúrgica. En este sentido, se ha demostrado que el consumo de oxígeno es menor en los insectos que han sido allatectomizados quirúrgicamente que en los individuos control (Slama, 1965; Caussanel y Célérrier, 1985), por lo que, aunque el efecto del precoceno II sobre *B. germanica* no sea tan completo como el que se produce en otras especies más sensibles, sí puede ser suficiente para causar una reducción de la tasa metabólica, aunque no lleguen a producirse alteraciones morfológicas.

2.- ESTUDIO DEL CONSUMO DE OXIGENO EN *ONCOPELTUS FASCIATUS*.

Esta especie, en su respuesta a los tratamientos efectuados, tanto con hormona juvenil como con precoceno II, no ha mostrado alteraciones que se puedan catalogar como hipermetabólicas o hipometabólicas (Fig. 24; Tabla VII). Al contrario, las respuestas han sido siempre moderadas, verificándose un aumento en la tasa metabólica de todos los estadios de *O. fasciatus* tratados con hormona juvenil, con la excepción de las hembras adultas.

Cuando nos fijamos en el análisis de la varianza correspondiente (Tabla VII) observamos que existen diferencias significativas en la interacción tratamiento por fase de desarrollo, que son debidas exclusivamente a la respuesta mostrada por las ninfas de este insecto tratadas con hormona juvenil (Fig. 25). Este comportamiento de la ninfas está de acuerdo con los resultados aparecidos en la Bibliografía para tratamientos equivalentes en insectos cuyo grado de desarrollo es similar (Novak y Slama, 1962; Slama y Hodková, 1975; Kuusik y Kogerman, 1978; Slama y Kryspin-Sorensen, 1979; Kuusik et al., 1980, 1983).

Conviene resaltar la ausencia de diferencias significativas entre las tasas respiratorias de los adultos de *O. fasciatus* tratados con hormona juvenil, y los controles. Este resultado no es fácilmente comparable, puesto que toda la Bibliografía consultada al respecto hace referencia a trabajos sobre ninfas de diferentes estadios, pero nunca sobre adultos. De acuerdo con la teoría de algunos autores (Novak y Slama, 1962; Kryspin-Sorensen et al., 1977) podría atribuirse la falta de respuesta al hecho de que la hormona

juvenil C18 utilizada en los ensayos no es la hormona con más capacidad de inducción de efectos fisiológicos en esta especie, por lo que el efecto sobre el metabolismo tampoco sería muy acusado. Sin embargo, las dosis utilizadas (100 µg de HJ por insecto) hacen poco viable esta hipótesis, siendo quizá más verosímil una explicación basada en una combinación de fenómenos: por un lado, la edad de los insectos en el momento del tratamiento (0-4 horas), y por otro la teoría postulada por algunos autores sobre el efecto metabólico de los compuestos y la relación con sus efectos fisiológicos, por lo que la respuesta a la hormona juvenil quedaría reducida al no ser éste el momento fisiológico más adecuado para su acción.

También, en contraste con las hipótesis de Novak y Slama (1962), Kryspin-Sorensen y colaboradores (1977) y Slama y Kryspin-Sorensen (1979) está el hecho de que el tratamiento con precoceno II no induce respuestas metabólicas significativamente distintas de las correspondientes a los controles (Fig. 24; Tabla VII), a pesar de que el precoceno II tiene un marcado efecto fisiológico sobre esta especie, tanto a nivel morfogénico como de reproducción, sobre todo sobre hembras adultas.

Quizá deba buscarse la explicación a este resultado en el modo de acción del precoceno II, ya que, como se ha mencionado en la Introducción, este compuesto actúa a nivel de los *corpora allata* de especies sensibles, en los que produce efectos citotóxicos irreversibles si éstos se encuentran activos (Unnithan et al., 1977, 1980; Masner et al., 1979; Schooneveld, 1979a,b; Unnithan y Nair, 1979; Soderlund et al., 1981; Brooks et al., 1979, 1984, 1985). En nuestro caso, dada la edad de los insectos en el momento del

tratamiento (0-4 horas) parece ser que el producto no sería capaz de alterar todavía el metabolismo de aquéllos, por no encontrarse sus glándulas activas.

Hay que destacar la existencia de diferencias significativas entre la respuesta dada por los insectos a los tratamientos con hormona juvenil y con precoceno II. Esto se debe fundamentalmente al hecho de que los insectos tratados con precoceno II responden de modo similar a los controles, mientras que los tratados con hormona juvenil difieren significativamente, excepto las hembras adultas. Por tanto, al comparar insectos tratados con hormona juvenil y con precoceno II estas diferencias tendrán que ser significativas.

3.-ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE AMBAS ESPECIES DE INSECTOS ESTUDIADOS.

Primeramente, hay que tener en cuenta que ambas especies de insectos, *Blattella germanica* y *Oncopeltus fasciatus*, pertenecen a Ordenes distintos, por lo cual su tasa metabólica no tiene porqué seguir los mismos patrones fijos de comportamiento frente a la hormona juvenil y al precoceno II, comunes a las dos especies.

Hecha esta salvedad, conviene destacar, sin embargo, la similitud en cuanto a las respuestas frente al tratamiento con hormona juvenil de las ninfas de 5º estadio (Figs. 21 y 24; Tablas IV y VII). Esto podría ser debido, probablemente, al hecho de que en ambas especies se trata del estadio previo a la metamorfosis, y por tanto el nivel de esta hormona circulante en hemolinfa es bajo (ver Fig. 1), con lo que el tratamiento supone un incremento de las tasas circulantes de la misma y consecuentemente de la actividad metabólica. Lo mismo ocurriría en el caso de las hembras adultas, las cuales, por su corta edad en el momento de realizar la medición de su tasa metabólica, todavía no han alcanzado el nivel suficiente de hormona juvenil para intervenir en los procesos de reproducción.

En apoyo de esta suposición están los resultados obtenidos por Denlinger y colaboradores (1984) con pupas diapausantes de *Sarcophaga crassipalpis*. Estos autores observan una serie de ciclos rítmicos en el consumo de oxígeno de las pupas, coincidentes con patrones cíclicos de actividad de la hormona juvenil.

Conviene reseñar, además, que el mecanismo por el cual se producen las respuestas hipermetabólicas en algunos insectos tratados con juvenoides no está completamente aclarado. Si se ha establecido, sin embargo, que los efectos metabólicos de la hormona juvenil son indirectos (Sehnal y Slama, 1966; Kryspin-Sorensen et al., 1977; Slama y Kryspin-Sorensen, 1979). Se asume, asimismo, que una de las principales razones fisiológicas condicionantes del hipermetabolismo en los insectos estudiados estaría ligada a su dieta completamente seca, y a la producción metabólica de agua necesaria para el crecimiento larval, la cual se obtendría como consecuencia de la oxidación de los lípidos ingeridos en la dieta. (Slama y Kryspin-Sorensen, 1979; Nemeč, 1985).

Por otro lado, los resultados obtenidos en la alteración de la tasa metabólica de insectos como consecuencia del tratamiento con HJ son comparables a los observados en otros insectos cuando se realiza otro tipo de tratamiento hormonal. Guillet y Fourche (1976) encuentran que un tratamiento con -ecdisona en pupas diapausantes de *Pieris brassicae* provoca una respuesta hipermetabólica.

Conviene hacer constancia del hecho de que la casi totalidad de los trabajos consultados se refieren a investigaciones realizadas con insectos Holometábolos (Chiba et al., 1973; Guillet y Fourche, 1973; Slama y Hodková, 1975; Tonapi y Mohan Rao, 1975; Kryspin-Sorensen et al., 1977; Baker et al., 1979; Kuusik et al., 1980; Fytizas y Mourikis, 1981; Guillet, 1984; Adamek y Fischer, 1985; Nemeč, 1985; Nielsen, 1986), muy pocos se han referido al estudio de la tasa metabólica y sus variaciones en insectos Hemimetábolos

(Novak y Slama, 1962; Slama, 1965; Llavador Enguix et al., 1981), y ninguno de ellos incluye el estudio de las respuestas en el estado adulto. Es más, la casi totalidad de los trabajos se refieren a la evolución de la tasa metabólica a lo largo de todo el ciclo de desarrollo del animal, sin estudiar las variaciones ocasionadas por agentes externos o tratamientos hormonales. En ningún caso se ha abordado el estudio de la respuesta a un tratamiento concreto en un momento puntual del desarrollo, tanto juvenil como adulto, del insecto en cuestión. Nuestro trabajo es pionero en este sentido.

Conviene mencionar, no obstante, el trabajo de Knight y colaboradores (1976) realizado sobre ninfas e insectos adultos de *Taeniopteryx nivalis* (Hemimetabola). Estos autores observaron un mayor consumo de oxígeno en las ninfas que en los adultos siendo, además, mayor en los machos que en las hembras. La respuesta de los individuos jóvenes es similar y comparable a la obtenida en *B. germanica* (Fig. 21; Tabla III), aunque en nuestro caso las hembras consumían más oxígeno que los machos. Sin embargo, *O. fasciatus* presenta un comportamiento distinto (Fig. 24; Tabla VI).

También es diferente el comportamiento de las dos especies estudiadas frente al precoceno II. Resalta el hecho de que *Blattella germanica*, que resulta insensible a este producto en los ensayos morfogénicos, presente una disminución significativa de la tasa metabólica cuando se trata con este compuesto, mientras que *Oncopeltus fasciatus*, que resulta muy sensible al mismo en dichos ensayos, no ve significativamente afectadas sus respuestas por el tratamiento.

La explicación a este fenómeno habrá que buscarla, con toda

probabilidad, en el peculiar modo de actuación del producto, tal como se ha señalado con anterioridad (Unnithan et al., 1977, 1980; Masner et al., 1979; Schooneveld, 1979a,b; Unnithan y Nair, 1979; Brooks et al., 1979, 1984, 1985), y en la propia diversidad de las dos especies objeto de estudio, para metabolizar el producto, combinada a su vez con su distinta capacidad para responder a los niveles circulantes de hormona juvenil.

4.- ESTUDIO DEL CONSUMO DE OXIGENO DE ORGANOS.

Antes de comenzar con la Discusión de los resultados obtenidos para el consumo de oxígeno de los distintos órganos estudiados, hay que hacer mención a la técnica utilizada para cada uno de ellos.

En el caso del tubo digestivo, y como la Bibliografía no aportaba ningún método al respecto, las experiencias preliminares nos indicaron que el cultivo del órgano durante unas horas en un medio adecuado era un método aceptable para el estudio que perseguíamos, por la reproducibilidad observada en los resultados. Sin embargo, los ovarios no respondieron de igual forma, por lo que se pasó a medir su consumo de oxígeno directamente, sin cultivo previo. Para el cuerpo gordo se utilizó la técnica descrita por algunos autores (Müller y Engelmann, 1968; Ladel et al., 1979), modificada para adaptarla a las características del insecto utilizado y a las posibilidades de nuestro laboratorio.

Por otro lado, también hay que hacer constar que se han elegido los órganos de *Oncopeltus fasciatus* para el estudio de su tasa metabólica por la mayor facilidad de cría de este insecto, lo que implica una gran disponibilidad en cuanto a cantidad de individuos se refiere. Además, la Bibliografía consultada muestra un mayor número de trabajos referidos al estudio de los tejidos de este insecto (Kelly y Davenport, 1976; Beel y Feir, 1977; Unnithan et al., 1977; Müller et al., 1979; Smith y Nijhout, 1983).

4.1.- TUBO DIGESTIVO.

No se ha encontrado, en la Bibliografía consultada, ningún trabajo centrado en el estudio de la tasa metabólica del tubo digestivo aislado y los efectos hormonales sobre ella. La mejor aproximación la constituyen los trabajos de Houlihan y Sell (1982, 1984) referidos a las variaciones metabólicas de abdómenes aislados, relacionadas con los fenómenos de reabsorción rectal. En nuestro caso, se ha realizado el estudio con el intestino medio, y completamente aislado del resto del insecto

Tal como puede apreciarse (Fig. 27; Tabla IX), el consumo de oxígeno del tubo digestivo procedente de hembras previamente tratadas con HJ o PII no ha mostrado diferencias significativas con respecto a los procedentes de insectos control, aunque se observa un ligero aumento en su tasa metabólica. Por otro lado, al investigar el metabolismo respiratorio de tubos digestivos inmersos en medio tratado (Fig. 36; Tabla XXI), se puede observar el mismo comportamiento, es decir, tampoco existen diferencias significativas con respecto a los controles, a pesar de que el tratamiento produce una ligera disminución del consumo de oxígeno de este órgano. Este resultado ya era esperado, y es lógico puesto que no se ha podido demostrar que la hormona juvenil o el precoceno II tengan una acción, directa o indirecta, sobre el tubo digestivo. La actividad endocrina mostrada por algunas células del mesenteron de ciertos insectos (Cassier et al., 1972; Aubry, 1975; Cassier y Fain-Maurel, 1977) no estaría relacionada con la HJ, sino con los procesos digestivos propios del insecto.

4.2.- CUERPO GRASO.

La técnica empleada en las experiencias procede de la modificación de las utilizadas por Müller y Engelmann (1968) y Ladel y colaboradores (1979). Ninguna de ellas ha podido aplicarse directamente porque, en primer lugar, las especies de insectos son distintas a la utilizada por nosotros (*Pieris brassicae*, Lepidoptera y *Leucophaea maderae*, Ortoptera), siendo, además, de tamaño mucho mayor, lo que les permite utilizar fracciones del cuerpo graso para distintas determinaciones. En nuestro caso, al ser el insecto más pequeño, se ha tenido que recurrir al empleo de cuerpos grasos procedentes de dos o más hembras.

La elección del tipo de cuerpo graso, según el grado de desarrollo de los ovarios de la hembra de procedencia, se ha basado, por un lado, en el tratamiento realizado, teniendo en cuenta que las hembras de insectos sensibles tratadas con PII nunca pueden llegar a desarrollar sus ovarios, mientras que aquéllas tratadas con HJ presentan una evolución muy rápida y por lo tanto un grado de desarrollo muy elevado.

Por otro lado, los dos tipos elegidos (A y E) representan los extremos dentro de la gama obtenida en cada tratamiento (A y B para el tratamiento con PII, C, D y E para el tratamiento con HJ). Además, alguno de los trabajos consultados (Müller y Engelmann, 1968; Ladel et al., 1979) apuntan hacia un consumo de oxígeno del cuerpo graso distinto, según el estadio de desarrollo, y la evolución de éste, del insecto de procedencia. Además, los animales en diferente estadio de desarrollo presentan un cuerpo graso con distintas características morfológicas y estructurales (Brown y

Chippendale, 1977; Rinterknecht y Roussel, 1978).

Como puede verse, los resultados de la tasa metabólica del cuerpo graso procedente de hembras previamente tratadas no muestra diferencias significativas con respecto a los controles (Tablas XII y XIII). sin embargo, cuando el tratamiento se realiza sobre el medio en el que se encuentra el órgano durante la experiencia, se observa que la HJ y el PII disminuyen su tasa metabólica (Fig. 37), aunque las diferencias observadas no son significativas (Tabla XXIII). Esto podría ser debido a las desviaciones obtenidas para los resultados del grupo control, sobre todo de aquellos órganos procedentes de hembras con ovarios tipo C.

Por otro lado, y al igual que ocurría con el tubo digestivo, la tasa metabólica del cuerpo graso inmerso en suero salino tratado durante el tiempo que dura la experiencia, es superior a la de aquél procedente de insectos control, cuando el tratamiento se realiza sobre los individuos. La explicación a este resultado sería, probablemente, que la presencia del producto químico en cuestión en el medio supondría un cierto efecto intoxicante y, por lo tanto, un aumento de la tasa metabólica del órgano inmerso en él.

Esta falta de respuesta ocasionada por los tratamientos no está en concordancia con los resultados de Müller y Engelmann (1968), que observan una disminución en la tasa metabólica del cuerpo graso procedente de hembras allatectomizadas de *Leucophaea maderae*. La allatectomía quirúrgica, como ya se ha mencionado, podría ser comparable a la allatectomía química ocasionada como consecuencia del tratamiento con precoceno II. Además, se han

observado cambios en el metabolismo respiratorio del cuerpo graso aislado, paralelos a los mostrados por el insecto *in toto*, y que parecen estar ocasionados por la actividad de los *corpora allata*, ya que las fases de actividad de esta glándula coinciden con los picos del metabolismo respiratorio (Müller y Engelmann, 1968).

Por otro lado, tampoco es esperable la ausencia de efecto de la hormona juvenil sobre el cuerpo graso, ya que éste es el órgano diana de la hormona en algunas especies de insectos (Hagedorn y Kunkel, 1979; Kaczor y Hagedorn, 1980; Turunen y Chippendale, 1980).

Al mismo tiempo, esta diferencia de efectos observada en el cuerpo graso podría ser debida al distinto comportamiento de este órgano cuando se halla en el interior del organismo o cuando se encuentra aislado. Algunos autores (Ladel et al., 1979) apuntan la posibilidad de que el cuerpo graso aislado, *in vitro*, se encontraría liberado de un posible control nervioso o endocrino.

4.3.- OVARIOS PROCEDENTES DE INSECTOS TRATADOS.

Las modificaciones introducidas en el método utilizado por Fourche y Ambrosioni (1969) para medir su consumo de oxígeno, han venido marcadas tanto por la diferencia filogenética entre el insecto utilizado por ellos (*Bombyx mori*) y *Oncopeltus fasciatus*, como por sus condiciones de cría, así como por las disponibilidades de material de nuestro laboratorio.

Respecto al número de órganos utilizado por cada matraz de reacción, ha sido distinto, dependiendo del grado de desarrollo

estudiado, para poder alcanzar unos requerimientos mínimos de peso. Esta misma técnica es utilizada también por otros autores al trabajar con larvas de mosquitos, cuyos primeros estadios de desarrollo son muy pequeños (Powers y Platzer, 1984), y también cuando se quieren obviar los efectos derivados de la variación entre animales (Pratt y Finney, 1977).

La Tabla XIV nos muestra las tasas metabólicas de los distintos grados de desarrollo de ovarios considerados para su estudio, procedentes de insectos control. Puede observarse que, a excepción de los ovarios tipo B, hay un decrecimiento paulatino del metabolismo respiratorio a medida que el ovario va alcanzando sus fases más maduras. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Fourche y Ambrosioni (1969) al estudiar la respiración *in vitro* de ovarios procedentes de distintos estadios de desarrollo de *Bombyx mori*.

La interrupción, ocasionada en el patrón de comportamiento antes descrito, de los ovarios tipo B es lógica, y su explicación parece desprenderse de los resultados: el grado A todavía no ha comenzado a desarrollarse; el B, sin embargo, supondría una máxima actividad metabólica al iniciarse la maduración de oocitos, con la consiguiente diferenciación de los tejidos que requiere un mayor aporte energético. La simple incorporación de vitelogeninas, en el ovario de grado C, así como el corionado de los oocitos y su posterior almacenamiento (ovarios tipo D y E) supondrán una menor tasa metabólica. En efecto, en los ovarios de *Bombyx mori* el crecimiento citoplásmico presenta un metabolismo respiratorio superior a la vitelogénesis (Fourche y Ambrosioni, 1969) debido, seguramente, a que la intensidad respiratoria específica del vitelo

es inferior a la del hialoplasma (Agrell, 1964).

La falta de diferencias significativas observadas entre la tasa metabólica de los ovarios tipo A y B podría deberse, dada la similitud morfológica entre ambos grados de desarrollo, a casos de clasificación errónea de órganos previa a la medida del consumo de oxígeno. Sin embargo, este error de manipulación parece insuficiente para explicar este fenómeno si atendemos a las observaciones de Fourche y Ambrosioni (1969). Dichos autores encuentran que los ovarios de *Bombyx mori* mantenidos *in vitro*, muestran tres fases sucesivas en su metabolismo. En la primera la tasa respiratoria muestra un incremento paralelo al incremento en tamaño del ovario, que se corresponde con el desarrollo del hialoplasma celular. Dicha fase puede aplicarse correctamente a nuestras fases de desarrollo A y B, con lo que la respuesta de éstos ovarios coincidiría con lo esperado según la explicación anterior.

En esta misma línea se encontrarían las respuestas observadas en los grados de desarrollo C, D y E, tanto los obtenidos a partir de insectos control como los provenientes de insectos previamente tratados con hormona juvenil (Fig. 33; Tabla XVII). Los dos primeros tipos coinciden con la segunda fase de Fourche y Ambrosioni (1969), en la que la respiración de los ovarios se incrementa en una tasa inferior a la de su desarrollo en tamaño. Estos órganos presentan, por lo tanto, una tasa metabólica inferior, que se corresponde a la de ovarios con predominio de vitelogénesis.

Por último, los ovarios con un grado de desarrollo tipo E se corresponderían con los de la tercera fase de Fourche y Ambrosioni

(1969), en los que la tasa metabólica desciende a pesar de que el tamaño sigue aumentando, y que es el periodo en que predomina el almacenamiento de oocitos ya corionados.

Esta hipótesis explica la falta de diferencias significativas debidas al tratamiento con hormona juvenil. En efecto, la actividad gonadotrófica de la hormona se refleja en una aceleración de los procesos de maduración y vitelogénesis en los ovarios de los insectos tratados, lo que se traduce en la aparición únicamente de ovarios de los tipos C, D y E cuando se examinan dichos insectos. Por lo tanto, las únicas diferencias observadas se deben al grado de desarrollo de los ovarios y no al propio tratamiento.

Finalmente, el tratamiento de los insectos con precoceno II sí ha producido alteraciones en la tasa metabólica de sus ovarios *in vitro*, con un incremento significativo en su consumo de oxígeno respecto a los controles (Fig. 35; Tabla XIX). Este aumento está ocasionado, probablemente, porque ha habido un inicio de diferenciación celular en los oocitos debido, posiblemente, a la presencia de hormona juvenil en hemolinfa. Esta hormona se habría sintetizado en las horas posteriores a la emergencia del insecto al estado adulto, y antes de que el tratamiento con PII sea completamente efectivo. Por lo tanto, este mismo tratamiento impide la continuación en la síntesis de HJ, permitiendo que los ovarios puedan conseguir un cierto desarrollo, pero sin llegar a alcanzar la madurez. No obstante, el inicio de diferenciación celular sería suficiente para aumentar la tasa metabólica, de acuerdo con las teorías citadas anteriormente (Fourche y Ambrosioni, 1969). Posiblemente, una adición posterior de hormona

juvenil provocaría una rápida maduración de los oocitos en tan sólo unas horas (Bowers y Martínez Pardo, 1977), por lo que los ovarios tipo A considerados en el tratamiento con PII serían, en realidad, ovarios mucho más avanzados potencialmente, pero realmente en un estadio de desarrollo inferior.

4.4.- OVARIOS INMERSOS EN MEDIO TRATADO.

Se han estudiado los grados de desarrollo de ovarios B y C, puesto que estos grados se entienden como representativos de dos fases de maduración de los ovarios distintas entre sí y, consecuentemente, con tasas metabólicas significativamente distintas (Tabla XXV). De este modo, cualquier comportamiento que se separase del esperado sería atribuible únicamente al tratamiento.

La Tabla XXVII muestra que no se han obtenido diferencias significativas en la tasa metabólica de los ovarios inmersos en medio tratado, debidas al tratamiento. La explicación a este fenómeno sería similar a la encontrada para estos mismos casos cuando se consideraron los ovarios procedentes de insectos tratados. Es decir, por un lado los efectos de la hormona juvenil sobre la tasa metabólica de los ovarios, dependen de su acción gonadotrófica inductora de procesos de maduración, con lo que la tasa metabólica esperada tendería a ser menor que la de los controles. Por otro lado, el precoceno II no tiene como órgano diana a los ovarios, y, por lo tanto, sus efectos directos sobre los mismos sólo podrían contemplarse como derivados de una cierta capacidad mimética de la hormona juvenil, que ya ha sido encontrada con

anterioridad por algunos autores (Kelly y Fuchs, 1978, en hembras adultas; Miall y Mordue, 1980, en ninfas).

Este mismo razonamiento permite explicar el hecho de que si existen diferencias significativas si consideramos el grado de desarrollo de los ovarios o la interacción tratamiento por grado de desarrollo. En este sentido, el Test de Tukey (Fig. 39) demuestra que cada tipo de ovario se comporta de modo diferente frente a los tratamientos y, así, existen diferencias significativas entre las respuestas de los ovarios de grado B del grupo control y B de ambos tratamientos (hormona juvenil y precoceno II). Los ovarios tratados muestran la misma tendencia descendente de su tasa metabólica observada en los ovarios procedentes de insectos tratados con HJ (Fig. 33; Tabla XVII). Hay que tener en cuenta, además, que los ovarios tipo B están a punto e iniciar la fase de vitelogénesis, y que se hallan en un medio salino carente de elementos nutritivos. En este sentido, la acción de la hormona juvenil y del precoceno II, que en este caso sería, con toda probabilidad, mimética de la de la hormona, queda reflejada en una disminución de la tasa metabólica, debida, según las teorías expuestas anteriormente (Fourche y Ambrosioni, 1969) a la inducción de fenómenos de maduración celular, en detrimento del crecimiento hialoplásmico.

En cuanto a los ovarios de grado de desarrollo tipo C, no existen diferencias significativas entre las respuestas dadas por controles y tratados, lo que confirmaría la teoría de que la HJ induce la maduración, pero una vez iniciada la vitelogénesis pierde gradualmente su capacidad para afectar decisivamente a los

ocitos en desarrollo.

El hecho de que aparezca una diferencia significativa entre la tasa metabólica de los ovarios de tipo B controles y los tratados con precoceno de grado C, es explicable por el hecho de que se trata de los dos grados de desarrollo investigados en esta experiencia, no siendo debidas tales diferencias al propio tratamiento en sí.

CONCLUSIONES

- 1.- Se describe un nuevo método para la determinación de la tasa metabólica de *Blattella germanica* y *Oncopeltus fasciatus*, aplicable a otros insectos, sencillo y con gran reproducibilidad de los resultados.
- 2.- Se describe por primera vez un método para la determinación de la tasa metabólica de mesenteron de *Oncopeltus fasciatus*.
- 3.- El tratamiento con hormona juvenil incrementa significativamente la tasa metabólica de *Blattella germanica* en los estadios de desarrollo estudiados (ninfas de 5º estadio y adultos). Dicho incremento no es comparable con las respuestas hipermetabólicas descritas para otras especies en la Bibliografía.
- 4.- El incremento de la tasa metabólica producido en los machos de *Blattella germanica* por el tratamiento con hormona juvenil es significativamente mayor que el producido en las hembras.
- 5.- El tratamiento con precoceno II disminuye la tasa metabólica de *Blattella germanica*, a pesar de que dicho producto no presenta actividad morfogénica en esta especie.
- 6.- El tratamiento de *Oncopeltus fasciatus* con hormona juvenil produce incrementos de la tasa metabólica que resultan significativos únicamente en el caso de ninfas de 5º estadio.

- 7.- El tratamiento de *Oncopeltus fasciatus* con precoceno II no produce alteraciones significativas de su tasa metabólica en las condiciones de experimentación utilizadas.
- 8.- No se han encontrado variaciones significativas en la tasa metabólica del tubo digestivo (mesenteron) o cuerpo graso debidas a los tratamientos, en las condiciones empleadas en este trabajo.
- 9.- El tratamiento de los insectos con hormona juvenil no produce alteraciones significativas en la tasa metabólica de sus ovarios, mientras que el tratamiento con precoceno II produce un incremento significativo de la misma.
- 10.- Los ovarios de distinto grado de desarrollo inmersos en medio tratado se comportan de modo diferente frente a la hormona juvenil y al precoceno II. Los ovarios de grado de desarrollo tipo B disminuyen su tasa metabólica tras el tratamiento, siendo más acusado el descenso producido por la hormona juvenil.

BIBLIOGRAFIA

- ABOUL-NASR, A.E.; E.G. ESAAC y S. EL-GOGARY. 1976. "Oxygen consumption by larvae and pupae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) reared on different host plants". *Z. ang. Ent.* **81(1)**: 78-85.
- ADAMEK, M. G. y J. FISCHER. 1985. "The oxygen consumption of non-dormant and dormant larvae of *Chironomus plumosus* (Diptera)". *J. Insect Physiol.* **31(10)**: 767-772.
- AGRELL, I. 1964. "Physiological and biochemical changes during insect development". En "*The physiology of Insecta*". 1. (Rockstein, M. ed.). Academic Press, New York. pp. 91-148.
- AUBRY, R. 1975. "Sur l'existence d'un type cellulaire mal connu, d'allure endocrine, dans le mésentéron de *Locusta migratoria*". *C. R. Acad. Sc. Paris* **281**: 1405-1407.
- BAGLEY, R.W. y J.C. BAUERNFEIND. 1972. "Field experiences with juvenile hormone mimics". En "*Insect Juvenile Hormones: Chemistry and Action*". (J.J. Menn y M. Beroza, eds.). Academic Press, New York and London. pp. 113-154.
- BAKER, J.E.; S.M. WOO y P.T.M. LUM. 1979. "Respiratory metabolism during postembryonic development in the black carpet beetle". *Ann. Entomol. Soc. Amer.* **72(5)**: 676-680.
- BARRINGTON, E.J.W. 1977. "*Introducción a la Endocrinología General y Comparada*". H. Blume ediciones. Madrid.
- BECK, S.D. 1980. "*Insect photoperiodism*". Segunda edición. Academic Press, New York.

- BEEL, C. y D. FEIR. 1977. "Effect of juvenile hormone on acid phosphatase activity in six tissues of the milkweed bug". *J. Insect Physiol.* **23(6)**: 761-764.
- BELL, W.J. 1969. "Dual role of juvenile hormone in the control of yolk formation in *Periplaneta americana*". *J. Insect Physiol.* **15**: 1279-1290.
- BELL, W.J. y R.H. BARTH. 1971. "Initiation of yolk deposition by juvenile hormone". *Nature* **230**: 220-221.
- BELLES, X. y A. MESSEGUER. 1981. "Sterilizing effects of 6,7-dimethoxy-2,2-dimethylchromene (Precocene 2) and 6,7-dimethoxy-2,2-dimethylchroman on *Blattella germanica* (L.)" En "*Juvenile Hormone Biochemistry*". (G.E. Pratt y G.T. Brooks, eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford. pp. 421-424.
- BELLES, X.; A. MESSEGUER y M.D. PIULACH. 1985. "Sterilization induced by precocenes on females of *Blattella germanica* (L.): short- and long-term effects". *Z. angew. Entomol.* **4(100)**: 409-417.
- BERRY, W.O. y J.D. BRAMMER. 1975. "The effect of temperature on oxygen consumption in *Aedes aegypti* pupae". *Ann. Entomol. Soc. Amer.* **68(2)**: 298-300.
- BERTALANFFY, L. Von. 1960. "Principles and theory of growth". En "*Fundamental aspects of normal and malignant growth*". (W.W. Nowinski, ed.). Elsevier Publishing Co., New York.
- BLOCK, W. 1976. "Oxygen uptake by *Nanorchestes antarcticus* (Acari)". *Oikos* **27**: 220-223.

- BOEIMARE, N. y J. MAURAND. 1976. "Recherches sur le métabolisme respiratoire des larves de simulies saines et atteintes de microsporidiosis". *Bull. Soc. Zool. Fr.* **101(3)**: 377-385.
- BOSQUET, G. 1971. "Evolution de la consommation d'oxygene au cours du jeûne chez *Bombyx mori* L.". *C. R. Acad. Sci. Paris* **273**: 756-759.
- BOWERS, W.S. 1976. "Discovery of insect anti-allatotropins". En "*The Juvenile Hormones*". (L.I. Gilbert, ed.). Plenum Press, New York and London. pp. 394-408.
- BOWERS, W.S. y R. MARTINEZ PARDO. 1977. "Anti-allatotropins: Inhibition of *corpus allatum* development". *Science* **197**: 1369-1371.
- BOWERS, W.S. y D.M. SODERLUND. 1981. "Chemistry and action of precocenes". En "*Regulation of Insect Development and Behaviour*". (F. Sehnal, A. Zabza, J.J. Menn y B. Cymborowski, eds.). Wroclaw University Press, Poland. pp. 309-322.
- BOWERS, W.S.; T. OHTA; J.S. CLEERE y P.A. MARSELLA. 1976. "Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants". *Science* **193**: 542-547.
- BOWERS, W.S.; P.H. EVANS; P.A. MARSELLA; D.M. SODERLUND y F. BETTARINI. 1982. "Natural and synthetic allatotoxin: suicide substrates for juvenile hormone biosynthesis". *Science* **217**: 647-648.
- BROOKES, V.J. 1969. "The induction of yolk protein synthesis in the fat body of an insect, *Leucophaea maderae*, by an analogue of the juvenile hormone". *Develop. Biol.* **20**: 459-471.

- IBROOKES, V.J. 1972. "The effect of juvenile hormone on the maturation of the oöcytes in the cockroach *Leucophaea maderae* (Fab.)". *Israel J. Entomol.* VII: 85-98.
- IBROOKS, G.T.; G.E. PRATT; A.P. OTTRIDGE y J.A. COCKS. 1984. "Effects of inhibitor on juvenile hormone III biosynthesis in *corpora allata* of the cockroach". *J. Pesticide Sci.* 9: 755-758.
- IBROOKS, G.T.; G.E. PRATT; D.W. MACE y J.A. COCHS. 1985. "Inhibitors of juvenile hormone biosynthesis in *corpora allata* of the cockroach *Periplaneta americana* (L.) *in vitro*". *Pestic. Sci.* 16: 132-142.
- IBROOKS, G.T.; A.F. HAMNETT; R.C. JENNINGS; A.P. OTTRIDGE y G.E. PRATT. 1979. Citado por Brooks et al., 1984.
- IBROWN, J.J. y G.M. CHIPPENDALE. 1977. "Ultrastructure and respiration of the fat body of diapausing and non-diapausing larvae of the corn borer, *Diatraea grandiosella*". *J. Insect Physiol.* 23(9): 1135-1142.
- IBURSELL, E. 1974. "Introducción a la Fisiología de los Insectos". Primera edición. Editorial Alhambra.
- IBURT, P. E. y R. GOODCHILD. 1971. "The site of action of pyrethrin I in the nervous system of cockroach *Periplaneta americana*". *Entomol. Exp. Appl.* 14: 179-189.
- CASSIER, P. y M.A. FAIN-MAUREL. 1977. "On the presence of endocrine cells in the midgut of several species of insects". *Arch. Zool. Exp. Gen.* 118(2): 197-209.
- CASSIER, P.; J. ALIBERT y M.A. FAIN-MAUREL. 1972. "Sur la présence de cellules de type endocrine dans l'intestin moyen de *Petrobius maritimus* Leach (Insecte apterygote, Thysanome)". *C.R. Acad. Sc. Paris* 275:2691-93.

- CAUSSANEL, C. Y M.L.CELERIER. 1985. "Consommation d'oxygene des femelles privées de mâles, d'ovaires ou de glandes endocrines chez *Labidura riparia* (Insecte, Dermaptere)". *C. R. Acad. Sci. Paris. Serie III* **301(1)**: 21-26.
- CLIFFORD, C.W. y J.P. WOODRING. 1986. "The effects of virginity and ovariectomy on growth, food consumption, fat body mass and oxygen consumption in the house cricket, *Acheta domesticus*". *J. Insect Physiol.* **32(5)**: 425-431.
- COUILLAUD, F. y A. GIRARDIE. 1984. "Ovariectomie et biosynthese de l'hormone juvénile C₁₆ (JH-3) chez le criquet migrateur". *C.R. Acad. Sci. Paris. Serie III* **298(6)**: 157-162.
- CHENEVERT, R.; J.M. PERRON; R. PAQUIN y R. PLANTE. 1981. "Morphogenetic effect of precocene I and II on *Schistocerca gregaria* (Forsk)". *Experientia* **37**:32-33.
- CHIBA, Y.; L.K. CUTKOMP y F. HALBERG. 1973. "Circadian oxygen consumption rhythm of the flour beetle, *Tribolium confusum*". *J. Insect Physiol.* **19**: 2163-2172.
- DEVRIES, D.H. y T.M. BROWN. 1977. "Significance of the urogomphal abnormality as a criterion in the test method for susceptibility of JH mimics in *Tribolium confusum*". *J. Econ Entomol.* **70(3)**: 273-276.
- DUFFUS, J.H. 1983. "*Toxicología ambiental*". Primera edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. pp. 1-173.
- ELLIOT, M. 1976. "Synthetic pyrethroids". En "*Synthetic pirethroids*". A.C.S. Symposium Series **42**: 1-28.

- ENGELMANN, F. 1970. "*The physiology of insect reproduction*". Pergamon Press, Oxford, England.
- ENGELMANN, F. 1983. "Vitellogenesis controlled by juvenile hormone". En "*Endocrinology of Insects*". (R.G.H. Downer y H. Laufer, eds.). Alan R. Liss, New York. pp. 259-270.
- FEERNANDEZ, H. y L. ZAROR. 1971. "*Blattella germanica* (cucaracha) como vector mecánico de infecciones intrahospitalarias por gérmenes gram-". *Bol. Inst. Bacteriol. Chile* **13(2)**: 105-107.
- FODURCHE, J. 1977a. "Influence de la température sur la respiration des nymphes de *Pieris brassicae* (Lépidoptère) diapausantes et non diapausantes". *C.R. Acad. Sc. Paris. Serie D* **284**: 1693-1696.
- FODURCHE, J. 1977b. "The influence of temperature on respiration of diapausing pupae of *Pieris brassicae* (Lepidoptera)". *J. Thermal Biol.* **2**: 163-172.
- FODURCHE, J. y J.C. AMBROSIONI. 1969. "Le métabolisme respiratoire au cours des métamorphoses. Respiration *in vitro* des ovaires de *Bombyx mori*". *J. Insect Physiol.* **15**: 1991-1997.
- FODURCHE, J.; G. BOSQUET; C. GUILLET y B. CALVEZ. 1979. "Cold acclimation during the wintering of diapausing pupae of *Pieris brassicae* (Lepidoptera)". *Comp. Biochem. Physiol.* **62A**: 357-362.
- FYTIZAS, E. y P.A. MOURIKIS. 1981. "Some aspects of the action of a juvenoid on the growth of *Heliothis armigera* Hbn. (Lep.: Noctuidae). III. Oxygen consumption and carbon dioxide output". *Z. angew. Entomol.* **92(2)**: 184-188.

- FYITZAS, E. y H. STAVRALI. 1984. "Reaction des adultes de *Aelia rostrata* Boh. et de *Eurygaster maura* (L) (Heteroptera, Pentatomidae) aux changements thermiques". *Z. angew. Entomol.* **97(4)**: 327-333.
- GAIRCERA ZAMORANO, M.D. 1980. "Estudio de las alteraciones inducidas en el desarrollo de *Blattella germanica* por derivados del pineno con actividad mimética de la hormona juvenil". Tesina de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia.
- GAIRCERA ZAMORANO, M.D.; T. MARTINEZ CARRAU; R. MARTINEZ PARDO y A. NUÑEZ CACHAZA. 1983. "Alteraciones morfológicas observadas en el sistema reproductor femenino de dos especies de *Lygaeidae* como consecuencia del tratamiento con precocenos". *Actas de I Congreso Iberico de Entomología I*: 269-274.
- GAIRCERA ZAMORANO, M.D.; T. MARTINEZ CARRAU; A. LLAVADOR ENGUIX; R. MARTINEZ PARDO y A. NUÑEZ CACHAZA. 1981. "Precocene II induced sterility in four insect species". En "*Juvenile Hormone Biochemistry*". (G.E. Pratt y G.T. Brooks, eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford. pp. 311-314.
- GILBERT, L.I. y H.A. SCHNEIDERMAN. 1960. "The development of a bioassay for the juvenile hormone of insects". *Trans. Am. Microsc. Soc.* **74(1)**: 38-67.
- GOLDSWORTHY, G.J. y W. MORDUE. 1974. "Neurosecretory hormones in insects". *J. Endocrinol.* **60**: 529-558.
- GUJERRA, A.A. y D.G. COCHRAN. 1970. "Respiration during the life cycle of the face fly". *J. Econ. Entomol.* **63(1)**: 918-921.

- GUERRA, A.A.; G. WIYGUL y R.D. GARCIA. 1983. "Oxygen consumption in boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), from subtropical areas of the Rio Grande valley of Texas". *Comp. Biochem. Physiol.* **74A(2)**: 263-265.
- GUILLET, CH. 1976. "Le métabolisme de diapause chez *Pieris brassicae*: les nucléotides adényliques". *Ann. Biol.* **XV(1-2)**: 77-90.
- GUILLET, CH. 1979. "Relations entre poids vif, protéines mitochondriales, adénosine triphosphate au stade larvaire chez *Pieris brassicae* (Lépidoptère) et *Drosophila melanogaster* (Diptère)". *C. R. Acad. Sci. Paris. Serie D* **289**: 493-496.
- GUILLET, CH. 1984. "Métabolisme énergétique et développement post-embryonnaire chez les insectes holométaboles". *Ann. Biol.* **XXIII(1)**: 61-80.
- GUILLET, CH. y J. FOURCHE. 1973. "La respiration chez *Drosophila melanogaster* au cours des métamorphoses. Influence de la température". *Ann. Zool. Ecol. Anim.* **5(4)**: 533-545.
- GUILLET, CH. y J. FOURCHE. 1976. "Les modifications du métabolisme énergétique lors de la levée de diapause par injection d' -ecdysone chez *Pieris brassicae*". *Bull. Biol. Fr. Belg.* **CX(1)**: 31-44.
- HAAGEDORN, H.H. y J. G. KUNKEL. 1979. "Vitellogenin and vitellin in insects". *A. Rev. Ent.* **24**: 475-505.
- HEEBLING BERALDO, M.J.A. y E. GARCIA MENDES. 1982. "The influence of temperature on oxygen consumption rates of workers of two leaf cutting ants, *Atta laevigata* (F.

- Smith, 1858) and *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908)". *Comp. Biochem. Physiol.* **71A**: 419-424.
- HEIMAN, D.R. y A.W.KNIGHT. 1975. "The influence of temperature on the bioenergetics of the carnivorous stonefly nymph, *Acroneuria californica* Banks (Plecoptera: Perlidae)". *Ecology* **56(1)**: 105-116.
- HIGHNAM, K. y L. HILL. 1977. "*The comparative endocrinology of the invertebrates*". Segunda edición. (E.J.W. Barrington y A.J. Willis, eds.). Editorial Arnold.
- HOAR, W.S. 1978. "*Fisiología general y comparada*". Ediciones Omega, S.A. Barcelona.
- HODRWATH, K.L. y J.G. DUMAN. 1983. "Preparatory adaptations for winter survival in the cold hardy beetles *Dendroides canadensis* and *Dendroides concolor*". *J. Comp. Physiol.* **151B**: 225-232.
- HODULIHAN, D.F. y D. SELL. 1982. "Stimulation of oxygen consumption with fluid absorption in insect recta". *J. Exp. Biol.* **101**: 233-254.
- HODULIHAN, D.F. y D. SELL. 1984. "The effects of temperature on the energetics of rectal fluid transport". *J. Insect Physiol.* **30(2)**: 137-143.
- HOWELL, D.A. y J.R. VOSEHLL Jr. 1982. "The effects of body weight and temperature on the metabolic rate of *Hidropsyche venularis* Banks (Trichoptera: Hydropsychidae)". *Comp. Biochem. Physiol.* **71A**: 401-405.
- JOHANSSON, A.A. 1958. "Relation of nutrition to endocrine-reproductive functions in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*". *Nytt. Mag. Zool. (Oslo)* **7**: 1-132.

- KACZOR, W.J. y H.H. HAGEDORN. 1980. "The effects of α -amanitin and cordycepin on vitellogenin synthesis by mosquito fat body". *J. Exp. Zool.* **214**: 229-233.
- KAPOOR, N.N. 1972. "Oxygen consumption of *Paragnetina media* (Walker): light-dark effect on respiratory rates". *Experientia* **28**: 1311-1312.
- KAPOOR, N.N. 1974. "Some studies on the respiration of stonefly nymph, *Paragnetina media* (Walker)". *Hydrobiologia* **44(1)**: 37-41.
- KAPOOR, N.N. y W. GRIFFITHS. 1975. "Oxygen consumption of nymphs of *Phasganophora capitata* (Pictet) (Plecoptera) with respect to body weight and oxygen concentrations". *Can. J. Zool.* **53(8)**: 1089-1092.
- KAPOOR, N.N. y W. GRIFFITHS. 1976. "The effect of copper on the oxygen consumption rates of the stonefly nymph, *Phasganophora capitata* (Pictet) (Plecoptera)". *Zoological Journal of the Linnean Society* **59**: 209-215.
- KARLSON, P. y M. NACHTIGALL. 1961. "A biological test on the quantitative determination of the juvenile hormone activity of intact extracts". *J. Insect Physiol.* **7**: 210-215.
- KEELEY, L.L. y S. FRIEDMAN. 1967. "*Corpus cardiacum* as a metabolic regulator in *Blaberus discoidalis* Serville (Blattidae). Long-term effects of cardiectomy on whole body and tissue respiration and trophic metabolism". *Gen. Comp. Endocrinol.* **8**: 129-134.
- KEISTER, M. y J. BUCK. 1974. "Respiration: some exogenous and endogenous effects on rate of respiration". En "*The*

physiology of Insecta". 6. (Rockstein, M. ed.). Academic Press, New York. pp. 469-509.

- KELLY, T.J. y R. DAVENPORT. 1976. "Juvenile hormone induced ovarian uptake of a female-specific blood protein in *Oncopeltus fasciatus*". *J. Insect Physiol.* 22: 1381-1393.
- KELLY, T.J. y M.S. FUCHS. 1978. "Precocene is not a specific antigonadotropic agent in adult female *Aedes aegypti*". *Physiol. entomol.* 297-301.
- KERN, M.J. 1985. "Metabolic rate of the insect brain in relation to body size and phylogeny". *Comp. Biochem. Physiol.* 81A(3): 501-506.
- KNIGHT, A.W. y M.A. SIMMONS. 1975. "Factors influencing the oxygen consumption of the hellgrammite, *Corydalis cornutus* (L.) (Megaloptera: Corydalidae)". *Comp. Biochem. Physiol.* 50A: 827-833.
- KNIGHT, A.W.; M.A. SIMMONS y C.S. SIMMONS. 1976. "A phenomenological approach to the growth of the winter stonefly, *Taeniopteryx nivalis* (Fitch) (Plecoptera: Taeniopterygidae)". *Growth* 40: 343-367.
- KRYSPIN-SORENSEN, I.; I. GELBIC y K. SLAMA. 1977. "Juvenoid action on the total body metabolism in larvae of a noctuid moth". *J. Insect Physiol.* 23(4): 531-535.
- KUNKEL, J.G. 1973. "Gonadotropic effect of juvenile hormone in *Blattella germanica*: a rapid, simple quantitative bioassay". *J. Insect Physiol.* 19: 1285-1298.
- KUUSIK, A. y A. KOGERMAN. 1978. "Disturbances in the metamorphosis caused by the treatment of the last instar larvae of *Leptinotarsa decemlineata* Say with

- a juvenile hormone analogue". *Eesti Nsv. Teaduste Akadeemia Toimetised* 27: 110-117.
- KUJUSIK, A.; L. METSPALU; K. HIESAAR; A. KOGERMAN; K. LAATS; O. HALDRE y T. REIMA. 1980. "An assay for juvenile hormone analogs based on their direct and indirect effects revealed in the respiratory metabolism in diapausing pupae of *Pieris brassicae* (Lepidoptera, Pieridae)". *Eesti Nsv. Teaduste Akadeemia Toimetised* 29(3): 198-211.
- KUJUSIK, A.; K. LAATS; L. METSPALU; K. HIESAAR; T. KAAL; T. REIMA; O. HALDRE; A. KOGERMAN; S. TEES y E. SEIN. 1983. "The effect of juvenoids on respiratory metabolism and bioassay based on increased metabolic rate in insects". *Eesti Nsv. Teaduste Akadeemia Toimetised* 32(2): 142-152.
- LAIDEL, J.P.; R. MOREAU y J. DITRIEU. 1979. "Etude *in vitro* du métabolisme respiratoire du tissu adipeux de *Pieris brassicae* au cours du developpment". *C.R. Sci. Soc. Biol.* 173(5): 885-891.
- LAIVERDURE, A.M. 1972. "L'evolution de l'ovaire chez la femelle adulte de *Tenebrio molitor*. La vitellogenese". *J. Insect Physiol.* 18:1369-1385.
- LAIVERDURE, A.M. 1975. "Culture *in vitro* des ovaires de *Tenebrio molitor*. Hormone juvenile, vitellogenese et survie des jeunes ovocytes". *J. Insect Physiol.* 21: 33-38.
- LAIK, A.R.; G.E. TEMPLETON y W.L. MEYER. 1985. "Isolation, purification and biological activity of a self-inhibitor from Conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*". *Phytopathology* 75: 386-390.

- LLIECHTY, L. y B.I. SEDLAK. 1978. "The ultrastructure of precocene induced effects on the *corpora allata* of the adult milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*". *Gen. Comp. Endocrinol.* 36: 433-436.
- LLAVADOR ENGUIX, A.; M.D. GARCERA ZAMORANO; T. MARTINEZ CARRAU; R. MARTINEZ PARDO y A. NUÑEZ CACHAZA. 1981. "Effects of C₁₈ juvenile hormone on the oxygen consumption rate of the cockroach *Blattella germanica* (L)". En "*Juvenile Hormone Biochemistry*". (G.E. Pratt y G.T. Brooks, eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford. pp. 295-298.
- MIAHANTA, H.C. 1976. "Respiratory intensity of pupae of cabbage moth, *Barathra brassicae* L.". *Indian J. Entomol.* 38(4): 357-362.
- MARTINEZ CARRAU, T.; R. MARTINEZ PARDO y A. NUÑEZ CACHAZA. 1981. "Detection of precocene-induced changes on the neuroendocrine complex of *Blattella germanica* by *in vivo* applied fluorochromes". En "*Regulation of Insect Development and Behaviour*". (F. Sehnal, A. Zabza, J.J. Menn y B. Cymborowski, eds.). Wroclaw University Press, Poland. pp. 405-410.
- MARTINEZ PARDO, R. 1977. "Acción insecticida de algunos miméticos de la hormona juvenil de los insectos sobre *Blattella germanica* y *Ceratitis capitata*". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia.
- MARTINEZ PARDO, R. y J. RIBO CANUT. 1975. "Efectos de algunos hormonomiméticos sobre la metamorfosis y reproducción

- de *Blattella germanica*". *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 15(3): 423-433.
- MIASNER, P.; W.S. BOWERS; M. KALIN y T. MUHLE. 1979. "Effect of precocene II on the endocrine regulation of development and reproduction in the bug *Oncopeltus fasciatus*". *Gen. Comp. Endocrinol.* 37: 156-166.
- MitcEVOY, P.B. 1984. "Increase in respiratory rate during feeding in larvae of the cinnabar moth *Tyria jacobaeae*". *Physiol. Entomol.* 9: 191-195.
- MIEDRANO, J.F. y G.A.E. GALL. 1976. "Direct and correlated responses to selection for body size and oxygen consumption in *Tribolium*". *J. Anim. Sci.* 43(4): 739-754.
- MIENN, J.J. y M. BEROZA. 1972. "*Insect Juvenile Hormones. Chemistry and Action*". Academic Press. London and New York.
- MIEYER, S.G.E. y G. SCHAUB. 1973. "Der respiratorische stoffwechsel von calliphoridenlarven in beziehung zu temperaturadaptation und regulation". *J. Insect Physiol.* 19: 2183-2198.
- MIHALL, R.C. 1980. "The morphological and behavioural effects of precocene II on *Locusta*". *J. Insect Physiol.* 26: 607-612.
- MIHALL, R.C. y W. MORDUE. 1980. "Precocene II has juvenile hormone effects in 5th instar *Locusta migratoria*". *J. Insect Physiol.* 26: 361-364.
- MIIGULA, P. 1979. "The effect of lead upon the metabolism rate by larval stages of *Euproctis chrysorrhoea* L. and *Malacosoma neustria* L. (Lepidoptera)". *Acta Biologica Katowice* 6: 63-72.

- IMIGULA, P.; E. GLOWACKA y A. KRAWCZYK. 1980. "Respiratory metabolism in jumping plant-lice *Psylloidea* (Homoptera)". *Acta Biologica Katowice* 9: 185-205.
- IMILLER, P.L. 1974. "Respiration. Aerial gas transport". En "*The physiology of Insecta*". 6. (Rockstein, M. ed.). Academic Press, New York. pp. 345-402.
- IMITSUHASHI, K. y N. MARAMOROSCH. 1964. "Leafhopper tissue culture: embryonic, nymphal and imaginal tissues from aseptic insects". *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 22: 435.
- IMODLIN, R.F. y R.D. JAYNE. 1981. "The effect of temperature on the oxygen consumption of three species of *Isoperla* (Plecoptera: Perlodidae)". *J. Freshwater Ecol.* 1(3): 299-306.
- IMOREAU, R.; C. CASTEX y M. LAMY. 1975. "Examen preliminaire de quelques aspects des effets métaboliques d'un nouvel insecticide de synthese chez deux insectes nuisibles: *Fieris brassicae* L. et *Thaumetopoea pityocampa* S. (Lepidopteres)". *Ann. Zool. Ecol. Anim.* 7(2): 161-170.
- IMULLER, H.P. y F. ENGELMANN. 1968. "Studies on the endocrine control of metabolism in *Leucophaea maderae* (Blattaria). II Effect of the *corpora cardiaca* on fat body respiration". *Gen. Comp. Endocrinol.* 11: 43-50.
- IMULLER, P.J.; P. MASNER; M. KALIN y W.S. BOWERS. 1979. *In vitro* inactivation of *corpora allata* of the bug *Oncopeltus fasciatus* by precocene II". *Experientia* 35: 704-705.
- INEMEC, V. 1985. "Effect of the hypermetabolic response to juvenoids on nutrient content in the larvae of

- Dermestes maculatus* (Coleoptera)". *Acta Entomol. Bohemoslov.* 82: 81-87.
- NEEMEC, V.; T.T. CHEN y G.R. WYATT. 1978. "Precocious adult locust, *Locusta migratoria migratorioides*, induced by precocene". *Acta Entomol. Bohemoslov.* 75: 285-286.
- NIEELSEN, M.G. 1986. "Respiratory rates of ants from different climatic areas". *J. Insect Physiol.* 32(2): 125-131.
- NOOVAK, V.J.A. y K. SLAMA. 1962. "The influence of juvenile hormone on the oxygen consumption of the last larval instar of *Pyrrhocoris apterus* L.". *J. Insect Physiol.* 8: 145-153.
- PEIDERSEN, L.E.K. 1978. "Effects of anti-juvenile hormone (precocene I) on the development of *Locusta migratoria* L." *Gen. Comp. Endocrinol.* 36: 502-509.
- PEINER, M.P.; L. ORSHAN y J. de WILDE. 1978. "Precocene II causes atrophy of *corpora allata* in *Locusta migratoria*". *Nature* 272: 350-353.
- PEETITPREN, M.F. y A.W. KNIGHT. 1970. "Oxygen consumption of the dragonfly, *Anax junius*". *J. Insect Physiol.* 16: 449-459.
- PIINCUS, D.S. 1977. "Juvenile hormone and its assay in virgin adult *Blattella germanica* females". *J. Insect Physiol.* 23: 73-77.
- POWERS, K.S. y E.G. PLATZER. 1984. "Oxygen consumption in mosquito larvae parasitized by *Romanomermis culicivorax* (Nematoda)". *Comp. Biochem. Physiol.* 78A(1): 119-122.

- PRIATT, G.E. y K.G. DAVEY. 1972. "The *corpus allatum* and oögenesis in *Rhodnius prolixus*". *J. Exp. Biol.* **56**: 201-214.
- PRIATT, G.E. y J.R. FINNEY. 1977. "Chemical inhibitors of juvenile hormone biosynthesis *in vitro*". En "*Crop protection agents*". (N. McFarlane, ed.). Academic Press Inc. London. pp. 113-132.
- PROSSER, C.L. 1973. "*Comparative Animal Physiology*". Tercera edición. (C.L. Prosser, ed.). W.B. Saunders Co., Philadelphia, London, Toronto.
- PUJL'VER, K. 1973. "Disemination of synanthropic cockroaches and their migration in some districts of a city". *Med. Parasitol. Parazit. Bolesn.* **42(1)**: 100-103.
- RAAABE, M. 1982. "*Insect Neurohormones*". Plenum Press, New York. pp. 352.
- RICCHARDS, O.W. y R.G. DAVIES. 1984. "*Tratado de Entomologia. INIMS*". Primera edición. Ediciones Omega, S.A.
- RIIDDIFORD, L.M. 1972. "Juvenile hormone and insect embryonic development: its potential role as an ovicide". En "*Insect Juvenile Hormones: Chemistry and Action*". (J.J. Menn y M. Beroza, eds.). Academic Press, New York and London. pp. 95-112.
- RIIDDIFORD, L.M.; A.M. AJAMI y C. BOAKE. 1975. "Effectiveness of insect growth regulators in the control of populations of the german cockroach". *J. Econ. Entomol.* **68(1)**: 46-48.
- RIINTERKNECHT, E. y J.P. ROUSSEL. 1979. "Ultrastructural modifications induced in the fat body cells of *Locusta migratoria*, after injection of juvenile hormones". *Bull. Soc. Zool. Fr.* **103(3)**: 359-366.

- SAMARANAYAKA-RAMASAMY, M. y M.F.B. CHANDBURY. 1981. "Precocene treatment of the female tse-tse fly *Glossina morsitans morsitans* sterilises her female offspring". *Experientia* 37: 1027-1029.
- SCHNEIDERMAN, H.A.; L.F. GILBERT y M.J. WEINSTEINS. 1960. "Juvenile hormone activity in microorganisms and plants". *Nature* 188: 1041-1042.
- SCHOONEVELD, H. 1979a. "Precocene-induced collapse and resorption of *corpora allata* in nymphs of *Locusta migratoria*". *Experientia* 35: 363-364.
- SCHOONEVELD, H. 1979b. "Precocene-induced necrosis and haemocyte-mediated breakdown of *corpora allata* in nymphs of the locust *Locusta migratoria*". *Cell Tissue Res.* 203: 25-33.
- SEHNAL, F. y K. SLAMA. 1966. "The effect of *corpus allatum* hormone on respiratory metabolism during larval development and metamorphosis of *Galleria mellonella* L.". *J. Insect Physiol.* 12: 1333-1342.
- SIDDALL, J.B. y M. SLADE. 1974. "Tests for toxicity of juvenile hormones and analogues in mammalian systems". En "*Invertebrate endocrinology and hormones, heterophyly*". (W.J. Burdette, ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp. 345-348.
- SLAMA, K. 1960. "Oxygen consumption during the postembryonic development of *Pyrrhocoris apterus* (Heterometabola: Heteroptera), and its comparison with that of Holometabola". *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 53: 606-610.

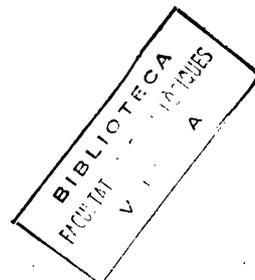
- SLAMA, K. 1965. "Effect of hormones on growth and respiratory metabolism in the larvae of *Pyrrhocoris apterus* L. (Hemiptera)". *J. Insect Physiol.* 11: 113-122.
- SLAMA, K. y C.M. WILLIAMS. 1966. "The sensitivity of the bug *Pyrrhocoris apterus* to a hormonally active factor in American paper pulp". *Biol. Bull.* 130: 135-146.
- SLAMA, K. y M. HODKOVA. 1975. "Insect hormones and bioanalogs: their effect on respiratory metabolism in *Dermestes vulpinus* L. (Coleoptera)". *Biol. Bull.* 148: 320-332.
- SLAMA, K. y I. KRYSPIN-SORENSEN. 1979. "Hypermetabolic response induced by juvenile hormone analogs in an insect". *Z. Naturforsch. Sect. C Biosci.* 34(7/8): 599-607.
- SLAMA, K.; M. ROMANUK y F. SORM. 1974. "*Insect hormones and bioanalogs*". Springer-Verlag. Wien and New York.
- SMITH, W.A. y F. NIJHOUT. 1983. "*In vitro* stimulation of cell death in the moulting glands of *Oncopeltus fasciatus* by 20-hydroxyecdysone". *J. Insect Physiol.* 29(2): 169-176.
- SOEDERLUND, D.M.; M.F. FELDLAUFER; S.Y. TAKAHASHI y W.S. BOWERS. 1981. "Mechanisms of selectivity in the action of the precocenes". (G.E. Pratt y G.T. Brooks, eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford. pp. 353-362.
- SOHAL, R.S.; K.J. FARMER; R.G. ALLEN y N.R. COHEN. 1983. "Effect of age on oxygen consumption, superoxide dismutase, catalase, glutathione, inorganic peroxides and

- chloroform-soluble antioxidants in the adult male house fly, *Musca domestica*". *Mech. ageing Develop.* **24**: 185-195.
- SOHAL, R.S.; R.G. ALLEN; K.J. FARMER y R.K. NEWTON. 1985. "Iron induces oxidative stress and may alter the rate of aging in the housefly, *Musca domestica*". *Mech. ageing Develop.* **32**: 33-38.
- TOINAPI, G.T. y H.N. MOHAN RAO. 1975. "Metabolism during the pupal development of the beetle *Dineutes indicus*". *Folia Biologica* **23(1)**: 15-19.
- TOINAPI, G.T. y H.N. MOHAN RAO. 1977. "Effect of temperature on the oxygen consumption in the larvae of *Dineutes indicus* Aube (Gyrinidae, Coleoptera)". *Hydrobiologia* **53(2)**: 113-116.
- TOINZETICH, J.; C.L. WARD y E. DENNY. 1976. "Effect of temperature and humidity on hydration and respiration in four strains of *Drosophila*". *J. Insect Physiol.* **22**: 107-113.
- TORREBLANCA TAMARIT, A. 1986. "Influencia de los metales pesados sobre el consumo de oxígeno y alteraciones del tejido branquial de *Procambarus clarkii* Girard". Tesina de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia.
- TURUNEN, S. y G.M. CHIPPENDALE. 1980. "Proteins of the fat body of non-diapausing and diapausing larvae of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*: effect of juvenile hormone". *J. Insect Physiol.* **26**: 163-169.
- UMBREIT, W.W.; R.H. BURRIS y J.F. STAUFFER. 1972. "*Manometric and biochemical Techniques*". Quinta edición. Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minnesota.

- UNNITHAN, G.C. y K.K. NAIR. 1979. "The influence of *corpus allatum* activity on the susceptibility of *Oncopeltus fasciatus* to precocene". *Ann. Entomol. Soc. Amer.* **72**: 38-40.
- UNNITHAN, G.C.; K.K. NAIR y W.S. BOWERS. 1977. "Precocene-induced degeneration of the *corpus allatum* of adult females of the bug *Oncopeltus fasciatus*". *J. Insect Physiol.* **23**: 1081-1094.
- UNNITHAN, G.C.; K.K. NAIR y A. SYED. 1980. "Precocene-induced metamorphosis in the desert locust *Schistocerca gregaria*". *Experientia* **36**: 135-136.
- WAN EMDEN, H.F. 1977. "*Control de plagas y su ecología*". Cuadernos de Biología. Ediciones Omega, S.A. Barcelona.
- WARE, G. W. 1983. "*Pesticides. Theory and application*". W.H. Freeman and Co. San Francisco.
- WIENS, A.W. y L.I. GILBERT. 1965. "Regulation of cockroach fat body metabolism by the *corpus cardiacum in vitro*". *Science* **150**: 414-416.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1940. "The determination of characters at metamorphosis in *Rhodnius prolixus*". *J. Exp. Biol.* **17**: 201-222.
- WIGGLESWORTH, V.B. 1970. "*Insect Hormones*". Oliver and Boyd. Edimbourg.
- WILDE, J. de. 1971. "The present status of hormonal insect control". *E.F.P.O. Bull.* **1**: 17-23.
- WILLIAMS, C.M. 1956. "The juvenile hormone of insects". *Nature* **178**: 212-213.
- WILLIAMS, C.M. 1967. "Third generation pesticides". *Sci. Amer.* **217**: 13-17.

- WILLIAMS, C.M. 1976. "Juvenile hormones in retrospect and in prospect". En "*The Juvenile Hormones*". (L.I. Gilbert, ed.). Plenum Press, New York and London. pp. 1-14.
- WILLIAMS, C.M. y T.G. AMOS. 1974. "Some effects of synthetic juvenile insects hormones and hormone analogues on *Tribolium castaneum*". *Aust. J. Zool.* 22: 147-153.
- WILSON, T.G.; M.H. LANDERS y G. M. HAPP. 1983. "Precocene I and II inhibition of vitellogenic oöcyte development in *Drosophila melanogaster*". *J. Insect Physiol.* 29: 249-254.
- WRIGHT, J.E. 1970. "Hormones for control of livestock arthropods. Development of an assay to select candidates with JH activity on the stable fly". *J. Econ. Entomol.* 63: 878-883.
- WRIGHT, J.E.; J.B. CAMPBELL y P. HESTER. 1973. "Hormones for control of livestock arthropods. Evaluation of two juvenile hormone analogues applied to breeding matherials in samll plot tests in Nebraska and Florida for control of the stable fly". *Environ. Entomol.* 2: 69-72
- WRIGHT, J.E.; J.B. CAMPBELL y D.D. OEHLER. 1974. "Insect growth regulators: large plot field tests against the stable fly in cattle feedlots". *J. Econ. Entomol.* 67(3): 459-460.
- WYATT, G.R. y M.L. PAN. 1978. "Insect plasma protein". *Ann. Rev. Biochem.* 47: 779-817.
- YOUNG, S.R. 1979. "Respiratory metabolism of *Alaskozetes antarcticus*". *J. Insect Physiol.* 25: 361-369.
- YOUNG, S.R. y W. BLOCK. 1980. "Some factors affecting metabolic rate in an antarctic mite". *Oikos* 34: 178-185.

ZWICKY, K. y V.B. WIGGLESWORTH. 1956. "The course of oxygen consumption during the moulting cycle of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera)". *Proc. R. Ent. Soc. Lond.* (A) 31: 153-160.



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
MARIA DOLORES GARCERA ZAMORANO
la calificación de APTO CUM LAUDE

Valencia, a 16 de OCTUBRE de 1986

El Secretario,

El Presidente

