

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOTIPO DE SISTEMA AUTOMATIZADO
BASADO EN LA ACTIMETRIA DE LA MOSCA *Drosophila melanogaster***

PROYECTO DE GRADO II

MARIA CAMILA VITERI NOGUERA

**UNIVERSIDAD Icesi
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
QUIMICA FARMACEUTICA
SANTIAGO DE CALI-VALLE DEL CAUCA
2014**

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOTIPO DE UN SISTEMA DE ACTIMETRÍA
PARA *Drosophila melanogaster***

MARIA CAMILA VITERI NOGUERA

PROYECTO DE GRADO II

DIR. SANTIAGO CASTAÑO PhD

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
SANTIAGO DE CALI
2014**

CONTENIDO

CONTENIDO.....	3
1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN.....	6
3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	8
3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
3.2. MARCO TEORICO Y ESTADO DE ARTE.....	10
3.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE REPELENTES SINTÉTICOS Y NATURALES.....	11
3.2.4 ACTIMETRIA COMO PARTE DE EVALUACION DE REPELENCIA.....	14
4. OBJETIVOS.....	19
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	19
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	19
5. METODOLOGÍA.....	20
5.2.1 EL BIOMODELO	20
5.2.2 DISEÑO DEL LABERINTO Y CONDICIONES AMBIENTALES.....	20
5.2.2 MÉTODO DE DETECCIÓN.....	22
5.2.3 DETERMINACION DE LA VENTANA EXPERIMENTAL Y DE FILMACIÓN.....	23
5.2.4 TRATAMIENTOS ESPECÍFICOS	24
5.3 MÉTODO ESTADÍSTICO	24
6. RESULTADOS.....	26
7. DISCUSIÓN	30
8. CONCLUSIONES	33
9. BIBLIOGRAFIA.....	34
ANEXOS	38

1. RESUMEN

Los repelentes entomológicos permiten prevenir tanto, patologías en humanos asociadas a insectos vectores, como controlar insectos plaga que en el ganado o los cultivos agrícolas generan bajas en los rendimientos productivos.

Colombia es un país biodiverso tanto en insectos vectores de patógenos, en patógenos pero también en sustancias de plantas y de otros organismos que puedan pungir como repelentes naturales específicamente contra insectos. Para hacer bioprospección de estos repelentes naturales (de nuestra biodiversidad) contra insectos se hace necesario desarrollar herramientas y metodologías que permitan estudiar y tamizar estos compuestos.

Como un aporte al estudio de los repelentes, en este trabajo se expone un sistema que permite detectar actividad repelente empleando como biomodelo, moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*).

El sistema diseñado consta de un laberinto con un receptáculo central con cuatro opciones de salida o exploración (cuatro vías dispuestas hacia cuatro puntos cardinales) en las que se disponen los odorantes según el diseño experimental del investigador. El laberinto es cerrado pero transparente en la parte superior para poder video-registrar la actividad de las moscas durante los experimentos. Hechos los experimentos, la secuencia de imágenes son procesadas empleando el software **ImageJ** que permite contabilizar la actividad de las moscas al pasar estas por puntos específicos de las salidas (que presentan a o no repelente). Con estos conteos se hacen las comparaciones estadísticas correspondientes.

Como resultados se dice que para el sistema y la metodología diseñados, la ventana de tiempo experimental comprende los primeros 10 minutos de los video-registros. Y que al exponer la población de moscas a salidas con repelente (DE Et al 20%), estas evitan transitar por las salidas en las cuales están presentes los

repelentes. Por los resultados obtenidos se sugiere que este biomodelo puede ser usado para los estudios de tamizaje de extractos o fracciones que se sospechan que son promisorias para repeler insectos.

Palabras clave

Métodos de detección, sistema confinado, estímulos exógenos, entomología, sustancias de repelencia.

SUMMARY

Insect repellents possible to prevent diseases in humans associated with disease transmission by mosquito vectors of the disease. Moreover, the repellent pest control possible that generate lower production yields in cattle or crops.

Colombia is a biodiverse country in both insect vectors of pathogens, such as in plants and other organisms with substances that can be used as natural repellents, specifically against insects. To bioprospecting of these natural repellents (from our biodiversity) against insects, it is necessary to develop tools and methodologies to study and sift these compounds.

As a contribution to the study of repellents, this paper presents a system to detect repellent activity, using as biomodel the fruit fly (*Drosophila melanogaster*).

The designed system consists of a labyrinth with a central receptacle, with four options or scan output (four tracks arranged into four cardinal points) in which the odorants are arranged in the experimental design the researcher. The maze is closed but transparent top to video-record the fly activity during the experiments. Acts experiments, the sequence of images are processed using ImageJ software that allows counting the activity of flies to go through specific points of the outputs (with present or not repellent). With these counts comparisons are relevant statistics.

As a result, it is possible to say that, for the system and methodology designed experimental time window comprising the first 10 minutes of video records. Furthermore, by exposing the fly population outflows repellent (DEET 20%), these avoid transit through them. Given these results, it is suggested that this animal model may be used for screening studies extracts or fractions suspect are promising to repel insects.

Keywords: Detection methods, confined system, exogenous stimuli, entomology, repellent substances.

2. INTRODUCCIÓN

Las investigaciones actuales sobre repelentes entomológicos (sintéticos o naturales) se ha centrado en encontrar mecanismos de acción más efectivos, eficientes y eficaces, al controlar el contacto de los insectos con el hospedero. Parte de las investigaciones son complementadas con estudios genéticos, moleculares y funcionales de los receptores de los insectos que son “dianas” para producir el efecto repelente (Montoya *et al.*2006).

Un ejemplo de repelente entomológico es el principio activo conocido como DEET (N, N dietil – m – toluamida), que está presente en muchos de los productos repelentes contra insectos, cuya función es inhibir los receptores olfatorios (OR 83b) y del que se reporta una efectividad casi del 100%.

Adicional a las estrategias de estudio de la acción de los repelentes sobre la estructura y función de los receptores de los insectos y con esto, es posible evidenciar un cambio de comportamiento de “repulsión” de los insectos ante los estímulos olorosos (odorantes repelentes) y de la correlación genética de los receptores de estos insectos sobre los que se experimenta (Katz *et al.* 2008).

Mediante estudios de estructura y función se ha logrado correlacionar la homología entre los receptores sensitivos (OR 83b) de *Drosophila melanogaster*,

con los de otros insectos como vectores de enfermedades por ejemplo el *Aedes aegypti* o el Género *Anopheles*. (Katz *et al.* 2008).

Colombia cuenta con una biodiversidad de plantas y organismos que pueden presentar agentes repelentes, sin embargo, se necesita realizar estudios de tamizaje y para esto se necesitan herramientas que permitan detectar la función repelente de extractos o fracciones de productos naturales.

Para contribuir en el estudio de identificación de sustancias repelentes, en este trabajo se propuso diseñar una herramienta experimental (automatizada) que permita hacer un pre-tamizaje de la actividad que puede generar las sustancias repelentes objeto de estudio, para ello, el sistema implementado y sugerido emplea a la mosca *Drosophila melanogaster* como biomodelo, debido a que su genoma esta mapeado en varias bases de datos, además de su facilidad de manejo que permite determinar el comportamiento ante estímulos externos como el olor a algunas sustancias.

Con esta propuesta metodológica de estudio preclínico se contribuye al estudio de la efectividad, eficiencia y eficacia de repelentes que son relacionadas con otras técnicas de evaluación de estímulos a organismos. Estas técnicas están basadas en el funcionamiento de detectores, que permiten cuantificar el cambio de comportamiento del animal como respuesta al agente que se le está exponiendo (Iniesta *et al.*1995). De las diferentes maneras de detección, las más utilizados son: visión directa, rayos X, video, acústica, o sensores (Barnard, 2005)

Para la técnica a utilizar en este trabajo se propuso emplear estrategias de uso de laberintos y detección mediante un sistema de video con una cámara de fácil acceso en el mercado. Para el estudio y el análisis estadístico de cada experimento se propuso automatizar la metodología mediante el tratamiento de las imágenes de video empleando un software especializado de libre acceso (*Image J*).

A futuro, se espera que este prototipo sirva como parte de metodologías de investigación de nuevas sustancias naturales de repelencia obtenidas a partir de animales, plantas y organismos y que posteriormente permitan realizar estudios en biomodelos más grandes. La metodología propuesta sugiere la obtención de resultados a costos muy bajos pero con una alta versatilidad y eficiencia en el análisis de datos y la economía de tiempo de experimentación (González *et al.* 2006).

3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Colombia presenta una gran biodiversidad de animales y de plantas. Por su condición de país tropical, presenta una gran variedad de insectos que pueden en primer lugar ser vectores de enfermedades endémicas e infecciosas, por ejemplo la malaria, el dengue o leishmania transmitidas por insectos vectores como mosquito *Anopheles*, *Aedes aegypty* y *Lutzomyia*, respectivamente. Como otros que potencialmente pueden atacar cultivos agrícolas como *phytohtora infestans* (responsable de perdidas agrícolas en la historia humana en los últimos 200 años) constituyéndose en un problema de salud pública y agrícola (J.M.Sanchez, 2011).

Por otro lado, posee una gran biodiversidad de especies de plantas como *Cymbopogon spp*, *Ocimum spp*, y *Eucalyptus sp*, poseedores de sustancias provenientes de metabolitos secundarios que son extraídos en forma de aceites esenciales. Estas mezclas de hidrocarburos volátiles son una diversidad de grupos funcionales cuya actividad repelente está relacionado con la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos (Neiro *et al.* 2010).

Además, de encontrar ciertos animales, cuyo mecanismo de defensa a los depredadores es la producción de sustancias tóxicas o de repelencia, por ejemplo

quinolinas sustancias químicas parte de un componente activo llamado **anisomofal o dolocodial**. Dichas sustancias de defensa son un ciclopentano o monoterpeno que confieren funciones de repelencia potenciales en insectos y predadores que son expulsadas por glándulas de dichos animales (Eisner *et al.* 2005).

Estas sustancias naturales, como forma de metabolitos secundarios, han generado interés en la investigación para nuevos productos, cuya metodología de evaluación de efectividad, está basada en la comparación del efecto de la nueva sustancia respecto al de las sustancias sintéticas ya estandarizadas como el DEET, uno de los repelentes más antiguos y efectivos de la industria farmacéutica (Peterson & Coats, 2001). Estos estudios han permitido que dichas sustancias naturales sean implementadas en el mercado por ejemplo aceite de citronella, de eucalipto, de limón y picaridina, cuyos estudios registran ser poseedoras de un largo efecto (Katz *et al.* 2008).

Todos estos aspectos justifica el desarrollo de estrategias para tamizar y evaluar odorantes repelentes de insectos y la efectividad de cada odorante, sin embargo, no se tienen equipos ni técnicas específicas lo que hace necesario implementarlas. De esta manera, dichas técnicas sean parte de metodologías de evaluación de efectividad mediante un proceso de tamizaje previo a la fase preclínica y clínica que generalmente está basado en el análisis del comportamiento de dípteros como respuesta a estímulos odorantes de repelencia.

El sistema de laberinto, es un método de detección y estudio del cambio de comportamiento de organismos, los cuales permiten determinar la respuesta de estos a estímulos. Este es un sistema cerrado, conformado por salidas o vías cuya amplitud corresponde al tamaño del organismo objeto de estudio, y está conectado a una bomba de aire que permite el arrastre de olores.

Cada laberinto o sistema está conformado por un método de detección, como rayos X, sensores de IR, video, acústica; en este caso se utiliza video, que permite

tener un registro de movimiento de la mosca y a la vez esta complementado por el software especializado **Image J**, que por escala de grises determina el paso de las moscas y así el conteo de las mismas. Estos sistemas presentan una ventaja en la determinación de la efectividad de las sustancias de repelencia, consistente en poder establecer la dosis mínima efectiva de los repelentes y de esta manera no generar efectos tóxicos innecesarios a biomodelos más grandes. Por ello, se espera que a futuro, el prototipo diseñado sea utilizado como parte de los estudios preclínicos de los repelentes, para luego seguir con ensayos más robustos que evalúen otros aspectos, conducentes a lograr la comercialización de la sustancia.

3.2. MARCO TEORICO Y ESTADO DE ARTE

Los repelentes son sustancias químicas sintéticas o naturales que generan una interrupción del contacto de insectos con el ambiente produciendo sensaciones desagradables en sus terminales sensitivos (Montoya *et al.* 2006). Los repelentes naturales, son metabolitos secundarios de plantas, animales o microorganismos, moléculas conocidas como aleloquímicos, compuestas por terpenoides, alcaloides y fenoles que brindan al organismo un mecanismo de defensa a ciertos depredadores y a su vez tener funciones terapéuticas, de repelencia o cosméticos, por lo cual son extraídas y estudiadas. Ejemplos claros de sustancias de repelencia en base a metabolitos secundarios de plantas son la citronela (*Cymbopogon nardus L.*), y eucalipto de limón. (Montoya *et al.* 2006).

Además, estudios relacionados reportan la existencia de ciertos animales, cuyo mecanismo de defensa a los depredadores es la producción de sustancias tóxicas o de repelencia, por ejemplo quinolinas que pueden estar presentes en sustancias de defensa que son expulsadas por glándulas de animales como *Oreophoetes peruana* y *A. buprestoides* que secretan un componente activo llamado **anisomofal o dolocodial**, que es un ciclopentano o monoterpeno que puede

conferir sustancias de repelencia potenciales en insectos y depredadores vertebrados (Eisner *et al.* 2005).

Por otro lado, compuestos sintéticos, presentan un largo efecto en comparación con los repelentes naturales, por ejemplo, IR3535 (3-[N-Butyl-N-acetyl]-aminopropionic acid, ethyl ester) y DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamide) principales compuestos de protección de mosquitos (Patel *et al.* 2012). En este caso, el DEET presenta una efectividad de repelencia casi del 100% en estudios con *Aedes aegypti* y el mosquito *anopheles*. Por esta razón, el DEET es utilizado como base de comparación en el estudio de nuevas sustancias de repelencia (Miot *et al.* 2004) que pueden ser igual de efectivos y con efectos secundarios menores.

Estos estudios de investigación de nuevas sustancias de repelencia puede tener una vital importancia, puesto que el uso de repelentes es una de las principales alternativas de control de contacto de vectores de enfermedades endémicas como el dengue y la malaria, además de ser utilizados en el área de la agricultura y ganadería como control de plagas de una manera menos toxica para las plantas y animales, de tal manera que su consumo sea seguro y más rentable. Por lo tanto, es importante implementar metodologías que permitan determinar la efectividad de nuevos repelentes y con ello presentar nuevas alternativas de control de contacto de dichos mosquitos hacia el hospedero (humanos, animales, plantas).

3.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE REPELENTES SINTÉTICOS Y NATURALES

Las antenas de los mosquitos presentan quimiorreceptores encargados de detectar sustancias atractivas como el dióxido de carbono y el ácido láctico presentes en la sangre de los animales, por lo tanto, los repelentes tienen la función de bloquear dichos receptores para que los mosquitos pierdan el contacto con el hospedero (Patel *et al.* 2012).

Las sustancias de repelencia sintéticos pueden presentar un efecto más largo en comparación de los repelentes naturales. El más utilizado y antiguo es el DEET cuyo mecanismo de acción consiste en bloquear los receptores de ácido láctico estudiados principalmente en mosquitos como *Aedes aegypti*, permitiendo que dichos mosquitos sean alejados del hospedero, es decir, un cambio de comportamiento como respuesta al odorante. Además, se ha registrado que este principio activo también es efectivo en otros dípteros de importancia médica como son los hematófagos Hemiptera, Siphonaptera, Hymenoptera, Acarina y Gnathobdellidae cuya sustancia es detectada en las antenas de cada individuo (Peterson *et al.* 2001).

3.2.3. *Drosophila melanogaster* COMO BIOMODELO EXPERIMENTAL

Se toma el biomodelo experimental *D.melanogaster* porque presenta una facilidad de manejo, rápida reproducción y una vida corta. Así mismo, se han realizado múltiples estudios que permiten encontrar toda la información de su genoma en base de datos (Feala *et al.* 2003).

Por otro lado, el N,N-Dietil-meta-toluamida(DEET) es la sustancia química con mayor efectividad de repelencia, por lo tanto, es utilizado como punto de comparación para la evaluación de nuevos componentes. El mecanismo de acción de este principio activo es bloquear selectivamente la activación del receptor del odorante atrayente OR-83B (receptores de ácido láctico y CO₂), de tal manera que reduzca la percepción de dichos odorantes (Sato *et al.* 2009).

La mosca de *D.melanogaster* puede servir como biomodelo experimental para evaluar efectos de repelencia, estudios de Bohbot & Dickens (2010) registran que el DEET depende de la inhibición de los receptores odorantes (ORs). Dichos receptores están involucrados en la traducción de señales químicas del ambiente de los mosquitos, cuando estos son activados las neuronas olfatorias (ORN) presentan potenciales de acción que envían la información al cerebro del mosquito. Por lo tanto, los modelos de traducción olfatoria proponen que los

odorantes están compuestos por una subunidad de unión de un ligando convencional OR, tal es el caso de la subunidad OR7 (un homólogo de OR 83b en *Drosophila melanogaster*) que permite tener una respuesta a dicho odorante. Por consiguiente, los repelentes de insectos han sido propuestos para ser agonistas o antagonistas de ORs y ORNs dependiendo del absceso o presencia de la clave del odorante (Bohbot *et al.* 2011).

En este caso, la variable experimental de estos ensayos es el cambio de comportamiento (actividad) como respuesta a un estímulo exógeno (cambio en el ambiente que puede generar respuesta). Se evaluó la respuesta al odorante repulsivo reflejado en el cambio del movimiento de la mosca, es decir, tender a discriminar el odorante, siendo una manifestación clave para el estudio de una nueva sustancia de repelencia.

En estas circunstancias, la respuesta frente a un odorante está relacionada con un mecanismo innato, un patrón o un estereotipo de comportamiento como respuesta a un odorante que puede ser la repulsión o atracción del mismo (Bohbot *et al.* 2011). Por otro lado, el comportamiento también está definido por la modificación adaptativa y el resultado de la experiencia de un comportamiento social, lo cual permite observar que en un tiempo determinado se presente un resultado repetitivo (Lehner, 1996).

De acuerdo a lo anterior, estas moscas pueden ser utilizadas en estudios de repelencia en fase preclínica, experimentos *in vivo* e *in vitro* que se diseñan para obtener la información necesaria como la toxicidad y efectividad de un principio activo (Medina *et al.* 2003). Sin embargo, se debe tener en cuenta que dicho biomodelo puede presentar cambios de comportamiento debido a factores ambientales tales como temperatura y luz, por esta razón, es importante mantener condiciones ambientales constantes (Scherck, 1977) puesto que puede generar discrepancias en los resultados de evaluación de efectividad de repelencia.

3.2.4 ACTIMETRIA COMO PARTE DE EVALUACION DE REPELENCIA

Se define el comportamiento a todo movimiento y sensaciones por las cuales el animal tiene relación con el ambiente, físico, biológico y social, como parte de la respuesta a ciertos estímulos. Estas respuestas pueden ser innatas, por lo que se espera una manifestación patrón después del estímulo externo efectuado. Por ejemplo, un desplazamiento positivo o negativo en respuesta a la exposición de un odorante atractivo o repulsivo. (Lehner, 1996).

El comportamiento, es una de las variables más importantes en el estudio de ciertos estímulos y el análisis de los efectos que pueden tener hacia la población a la que se estudia. Para ello, se han realizado diferentes experimentos y metodologías que permiten determinar la respuesta innata del biomodelo hacia el estímulo a la cual está expuesto.

Estas metodologías planteadas, están relacionadas con el avance tecnológico de los tiempos que permita la evaluación y medición de la actividad motora de un organismo en un tiempo determinado, proceso conocido como actimetría actimetría (Iniesta *et al.* 1996). Dicho proceso permite conocer el cambio de comportamiento motor o de desplazamiento que presenta el individuo como respuesta a un estímulo.

Una de las formas de evaluar la actividad y en modelos insectos como la mosca *D. melanogaster* (en función de su comportamiento) ante odorantes, es la de utilizar sistemas confinados con formas de laberintos en los que se deposita las moscas en un receptáculo o un capilar y se le da a escoger moverse por dos o más salidas. A las salidas, el investigador dispone de odorantes con efecto positivo (atrayentes) u odorantes con efectos negativos (repulsivos) según el caso.

El comportamiento natural de las moscas (*D. melanogaster*) es la de explorar el medio o el espacio confinado. La mosca se puede mover haciendo una

exploración ante las “opciones de paso” (vías posibles por las cuales pueden explorar o moverse). Sin embargo, esta exploración puede ser afectada por la presencia de un estímulo oloroso negativo (por ejemplo el de los repelentes comerciales para insectos). Por otro lado, estudios de comportamiento de *D. melanogaster* registran que la mosca puede presentar un aprendizaje después de ser sometida a dichos estímulos, haciendo que la mosca discrimine la salida con repelente (Quinn *et al.* 1974)

3.2.5 ALGUNAS PROPUESTAS METODOLÓGICAS PARA LA DETECCIÓN DE MOVIMIENTO Y SU FUNCIONALIDAD EN LA ENTOMOLOGÍA

Los estudios realizados para analizar la entomología han permitido encontrar avances en la comprensión general del comportamiento de los insectos. Dichos estudios van de la mano con los avances tecnológicos y pueden dar razón de la relación planta- insecto y respuestas olfatorias (Chapman, 2000).

Los estudios de repelencia se basan en el cambio de comportamiento de insectos biomodelos de estudio, principalmente, el *Aedes aegypti*, *anopheles* (principales vectores de transmisión enfermedades) y la *D. melanogaster*, que presentan una respuesta a odorantes y por lo tanto un cambio de comportamiento. Por otro lado, la implementación de diseños de laberintos son modelos de sistemas confinados que permiten observar la atracción o repulsión de los insectos hacia el odorante de estudio.

Algunos ejemplos de diseño de laberintos son los espacios confinados en forma de tubos en las que se observa la atracción o repulsión, tal como se muestra en el anexo (imágenes 1 a 4), dichos tubos permiten observar el “paso” de un lado a otro dependiente de los estímulos olfatorios a los que están expuestos.

Por otro lado, la existencia de laberintos en forma circular, como se muestra en los estudios de repelencia de sustancias naturales de *Azadirachta indica* y su repelencia en *Vorroa destructor*, muestra el sitio de confort de los insectos. El laberinto relacionado con *Azadirachta indica* consta de una forma circular de 8 cm

de diámetro y se divide en tres secciones que permiten establecer la preferencia dependientes del odorante.

Además, para que estos sistemas sean automatizados dependen de sistemas de detección utilizados aproximadamente desde los años 70, estos han tenido un avance tecnológico respecto a la medición y estimación del comportamiento del individuo social. Por ejemplo, el estudio de la locomoción de insectos, empleando la observación directa, mediante la ejecución de un video, la detección pasiva de la acústica, radiografía de rayos x o a través de dispositivos condensadores o detectores infrarrojo (IR) (Wutsmann *et al.* 1996).

Un ejemplo clave y relacionando con las técnicas utilizadas para evaluación de repelentes, es la “técnica del montaje superficial”, que estudia la respuesta del insecto, sometido a ciertos estímulos (cambio en el ambiente externo o interno), químicos (odorantes repulsivos, comida) o físicos (la luz, colores y temperatura), y de esta manera observar la respuesta de los individuos como cambios de comportamiento en su actividad (Iniesta *et al.* 1995).

La utilización de videos, como metodología para el estudio de comportamientos de población de individuos es una manera fiable y consistente, durante periodos de tiempo largos que registran el desplazamiento del biomodelo, y mediante software especializados, se determina la ubicación del insecto mediante el análisis de pixeles (Chen *et al.* 2009).

Dichos softwares pueden ser especializados en el registro del paso de la mosca como el conteo de pixeles en un área en específico a partir de una secuencia de imágenes obtenida del video por ejemplo **Image J** determina cuantas moscas pasan por un lado en específico, mediante una secuencia de imágenes obtenida a partir del video **Image J** ha sido utilizado en el área investigativa de biomédicas, por su capacidad de manejo de imágenes que permite determinar y procesar diferentes series de datos mediante el complemento de plugin y macros que

permiten realizar una función específica dependiendo de lo que se requiera analizar.

El uso de video como método de detección de cambio de comportamiento está el sistema BMS, por sus siglas en inglés “behavioral monitor system” que consiste en un sistema de video electrónico que registra cada trayectoria y comportamiento del individuo, mediante un espacio 3D que permite observar la respuesta al estímulo (Zou *et al.* 2011).

En cuanto al funcionamiento de detectores IR con *D. melanogaster* como biomodelo, se ha presentado metodologías y sistemas como DAM por sus siglas (monitoreo de la actividad de *Drosophila*) (Chardonnet *et al.* 2012). Este, se basa en el movimiento actimétrico de la mosca *Drosophila melanogaster*, mediante el procesamiento de un monitor compuesto por una cuadrícula perforado con 32 huecos de 7mm, a los cuales se insertan tubos de 5 mm de diámetro, con estructura confinada, conectados por una circulación de aire y equipado con un detector fotoeléctrico. Además, el registro de los datos de locomoción del insecto es de manera automática, continua y de grabación simultánea de desplazamientos de los 32 individuos. (Chardonnet *et al.* 2012).

Los detectores de infrarrojo percibidos por cada celda, transmiten en un ordenador de la colección de base de datos de DAMSystem, software especializado, también conocido como TriKinetics que a intervalos uniformes de tiempo, registra la actividad. (Chardonnet *et al.* 2012). Esto se puede comparar con el fundamento de la segunda alternativa de detección del proyecto, basado en el funcionamiento de sensores que detectan el paso de la mosca por un sistema de laberinto confinado, conectado por un flujo de aire y cuyos datos están almacenados por el software LabChart Powerlab.

Esta metodología, basada en el funcionamiento de laberintos, como sistemas confinados, fundamentados en el funcionamiento de un proceso automatizado por sensores, han sido utilizados para fines farmacéuticos, teniendo en cuenta que es

una alternativa económica y confiable para estudios preclínicos de nuevas sustancias de repelencia (Iniesta *et al.* 1995).

Estas respuestas a estímulos se analizan, dependiendo de los comportamientos sociales e individuales ya estipulados en la literatura, cuya comparación con lo observado, permite determinar si hay o no respuesta del insecto hacia el ambiente al que se está expuesto, por ejemplo, el insecto buscará la zona de confort como respuesta al estímulo, permitiendo determinar estadísticamente cuantos individuos escogen cierta área específica del laberinto (González *et al.* 2006).

Con base a lo anterior, estos modelos entomológicos están basados en el mecanismo de un comportamiento innato, mediante un estímulo exógeno, y que el estudio de los mismos está relacionados con un patrón de respuestas ya determinada (Lehner, 1996). Tal es el caso exacto de la relación de la respuesta de la mosca con el odorante (movimientos de atracción, repulsión o indiferencia respecto al estímulo determinado). De tal manera que son utilizadas en diferentes campos de estudio, como la agricultura y las ciencias de la salud, ya que con ellas se puede entender el comportamiento de los individuos, conocer la relación animal-ambiente, preservación del mismo, y la aplicación como parte de técnicas económicas de estudio para el control de plagas (Lehner, 1996).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer un prototipo de sistema experimental que permita detectar si un odorante produce efectos repulsivos en un díptero como la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*).

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Diseñar una estrategia metodológica que permita registrar, medir y estimar la repelencia de un compuesto sobre la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) en un dispositivo diseñado para este propósito.
- Probar si dicho prototipo permite estudiar la efectividad de un repelente, empleando todo el sistema diseñado.

5. METODOLOGÍA

5.2.1 EL BIOMODELO

En el prototipo de sistema experimental para estimar el efecto de un odorante sobre un organismo, se escogió como biomodelo la mosca de la fruta (variedad silvestre), *Drosophila melanogaster* (variedad silvestre), obtenidas de la colonia y cepas de la Universidad Icesi.

Para su manipulación, las moscas fueron expuestas a una temperatura de -20°C por un periodo corto de tiempo no mayor a cinco minutos para inducir “parálisis por hipotermia”.

5.2.2 DISEÑO DEL LABERINTO Y CONDICIONES AMBIENTALES

Después de revisar algunas técnicas y receptáculos empleados para detectar el efecto de odorantes repelentes sobre la actividad de moscas *D. melanogaster* (Noldus *et al.* 2001), se escogió el diseño de un espacio confinado en forma de laberinto, con un receptáculo central en el que se deposita la población de moscas para experimentar, el cual tiene cuatro salidas (cada una apunta a un punto cardinal) y cada una se conecta a un vial en donde se coloca el odorante escogido en el experimento.

Cada una de las salidas, está conectadas por el tubo de ensayo (con odorante o control) y estos a su vez a una bomba de perfusión que permite el arrastre de

aire, la imagen 6 del anexo permite dar claridad de cómo se conecta cada tubo de ensayo en cada una de las salidas y cómo será la dirección del flujo de aire.

Se establece que el flujo de aire debe tener una velocidad de 0,94ml/min, este valor es establecido para que el cumplimiento de su función (arrastre de odorante) sea óptimo y que no refleje un problema a la hora de desarrollar la metodología, razón por la cual es medido por una curva de calibración partiendo de los niveles de aire que tiene la bomba (1 a 10), estos resultados son observados con el volumen de agua disminuidos en una probeta invertida conectada por la bomba de aire en un minuto.

En el diseño mostrado en la imagen 6 del anexo, en el receptáculo central presenta una perforación que permite el flujo del aire proveniente de cada una de las cuatro salidas (cada una con o sin odorante de preferencia experimental) y a su vez el escape de aire. Por otro lado, los espacios tanto del receptáculo como de las salidas son de dimensiones algo mayores al tamaño de las moscas que permite la movilidad de estas.

Como es un sistema confinado y automatizado, el sistema es tapado por un vidrio transparente que permite que no se escape el odorante y las moscas, esto es asegurado debido que el diseño del sistema hace que no hayan fugas de aire y que la única salida sea la del receptáculo central. Además, el sistema automatizado dependiente del funcionamiento de **Image J**, el cual depende de un contraste de colores y tonalidades entre el laberinto y las moscas, por lo tanto se estableció que el laberinto sea blanco y de un tipo de polímero (acrílico) que genere dicha diferenciación y de esta manera el software logre determinar la diferenciación de píxeles en escala de grises.

Finalmente, después de que las moscas son sometidas a una parálisis bajo hipotermia, después de dos minutos, todas las moscas comienzan su actividad de exploración por todo el laberinto (el receptáculo y las cuatro salidas). Teóricamente

debería existir la misma probabilidad de exploración de la población de moscas dispuestas para el experimento a través de las cuatro entradas de no exponer alguna de las salidas a un odorante repelente.

Como método de detección del cambio de comportamiento de las moscas se escogió la cámara de video Canon (PC 2054), que filma los desplazamientos de éstas en cada una de las salidas. La cuantificación la hace el software que además permite analizar la discriminación de las rutas respecto a la presencia o ausencia de repelente.

5.2.2 MÉTODO DE DETECCIÓN

El sistema escogido para estimar la actividad de las moscas en función del “paso exploratorio de estas dentro del laberinto fue el de filmación y mediante el procesamiento de imágenes el software **ImageJ** (<http://imagej.nih.gov/ij/>) contabiliza o detecta el paso de las moscas por las salidas desde el receptáculo central. Las filmaciones se hicieron empleando la cámara de video, mediante el procesamiento de imágenes una a una.

Cada video es convertido a una secuencia de imágenes a través de un programa informático especializado denominado **Virtual dub** (<http://www.virtualdub.org/index.html>), el cual funciona en un formato de almacenamiento de video AVI. Generalmente, las cámaras de video digital, almacenan la información en un formato MVI, esto hace que deba ser cambiado a un AVI, utilizando un convertidor de videos denominado **Prism** obtenido a partir de **NCH** (M. Zamani, 2012).

La secuencia de imágenes creada por **Virtual dub** puede ser almacenada en muchos formatos. Sin embargo, la diferencia entre estos es la calidad de las imágenes guardadas que se puede presentar y la compatibilidad de los archivos

en el programa *image J*, por esta razón se debe guardar en formato TIFF o BITMAP para no tener problema en el análisis de imagen.

5.2.3 DETERMINACION DE LA VENTANA EXPERIMENTAL Y DE FILMACIÓN

El conteo de moscas se hace a partir de la detección del cambio de intensidad de la escala de grises y se complementa con la acción de diferentes plugin que permiten generar una configuración que ayude a determinar el paso de la mosca, en un sistema binario: color negro=1 (pasa) y color blanco=0 (no pasa).

Para ejecutar los experimentos fue necesario caracterizar la actividad de las moscas, comprendiendo como actividad el movimiento hacia todos los espacios del laberinto es decir, el receptáculo central y las cuatro salidas localizadas en los cuatro puntos cardinales. Se hacía necesario estimar si la actividad variaba en el tiempo. Todo esto se hizo con el propósito de establecer la “ventana experimental”.

Para establecer la ventana se propuso hacer un registro de video con una duración de 30 minutos, los cuales se observa la respuesta de exploración de cada una de las moscas hacia todos los lugares del laberinto. Para estos ensayos, se depositaron las moscas en el receptáculo central (12 individuos) y en ausencia de repelente por cuatro repeticiones.

Posteriormente, se realiza una gráfica de la cantidad de moscas en el receptáculo respecto al tiempo (cada 5 minutos) que ayuda a determinar que la ventana experimental sea 10 minutos de video.

Una vez se estableció la ventana experimental, se hace filmación de las moscas durante la fase más activa de exploración y se hacían experimentos para evaluar la influencia topológica y con odorantes (repelentes comerciales: *off* (2) y *aután* (1))

5.2.4 TRATAMIENTOS ESPECÍFICOS

Para determinar si hay una influencia topológica de la ubicación de las cuatro salidas se realizó por cuatro repeticiones ensayos sin odorante (repelentes comerciales) y se observa la exploración de las moscas por cada una de las salidas, estableciendo que no hay diferencias significativas en el paso de las moscas por cada una de las salidas.

Y por otro lado, tratamientos con odorante (repelentes comerciales *autan* y *off* respectivamente) que son puestos de manera aleatoria con el fin de observar la discriminación de la ciertas salidas que presentan el odorante. Para asignar las salidas con tratamiento, se hicieron parejas combinatorias hasta lograr doce combinaciones empleando la función *ran#* (empleando una calculadora científica) de tal manera que dos de las cuatro salidas presente odorante y dos sirvan como un control negativo. En cada una de las combinaciones se realizaron cuatro repeticiones con el fin de tener resultados repetitivos.

Los odorantes utilizados son dos repelentes comerciales con 20% DEET (*autan* y *off* respectivamente) los cuales difieren en su formulación. El odorante1: repelente comercial 1, cuyos componentes son alcohol, agua, DEET, corrector organoléptico. Y el odorante 2: repelente comercial 2, cuyos componentes son alcohol, agua, DEET, glicerina, PEG 7, glyceril, PEG 40, aceite de castor.

5.3 MÉTODO ESTADÍSTICO

El diseño de muestreo del estudio en mención, se basa en un diseño de bloques al azar, en el cual se obtuvieron datos cuantitativos ordinales provenientes de conteos realizados a través de videos tomados y para dicho análisis se utilizó el programa ***Statistica 8.0***.

Teniendo en cuenta que la actividad locomotora puede ser considerada como "marcador" de la actividad general del animal (Martin, 2004), la cantidad de moscas que entran por cada una de las salidas (control y con odorante) es un indicativo de la respuesta del individuo a la sustancia a la que se está evaluando, se evaluó la actividad de las moscas medida como la cantidad de veces que las moscas exploran y "pasan" desde el receptáculo central hacia cada salida del laberinto. Por lo tanto, se definió como variable de actividad "el paso" y la cantidad acumulada de pasos por cada una de las cuatro salidas.

En primer lugar, se establece si existe una influencia de la ubicación topológica de cada uno de los puntos cardinales de las salidas como respuesta de a mosca, por esta razón, se trata de no encontrar diferencia significativa de la ubicación topológica de cada una de las salidas representadas en el paso de las moscas a través de ellas. Y para el estudio de los efectos de los dos Odorantes en comparación con los controles, establecer que hay diferencias significativas entre las poblaciones estudiadas.

Por otra parte, en cada uno de los tratamientos se realizar una prueba de comparación múltiple, por medio de la cual se evaluó entre que bloques se encuentran las diferencias significativas observadas.

Para la interpretación de los valores obtenidos a través de los análisis mencionados se comparará el valor probabilístico calculado Vs. el valor p teórico y a su vez se complementa con las figuras de cajas y bigotes donde se detalla el comportamiento de las variables en mención, con su respectiva media, desviación estándar y error estándar.

6. RESULTADOS

Para ejecutar los experimentos fue necesario caracterizar la actividad de las moscas, comprendiendo como actividad el movimiento hacia todos los espacios del laberinto, es decir, el receptáculo central y las cuatro salidas localizadas en los cuatro puntos cardinales y así saber si la actividad era constante o variaba en el tiempo. Todo esto se hizo con el propósito de establecer la “ventana experimental” obteniéndose resultados indicados en la figura 1 y 2

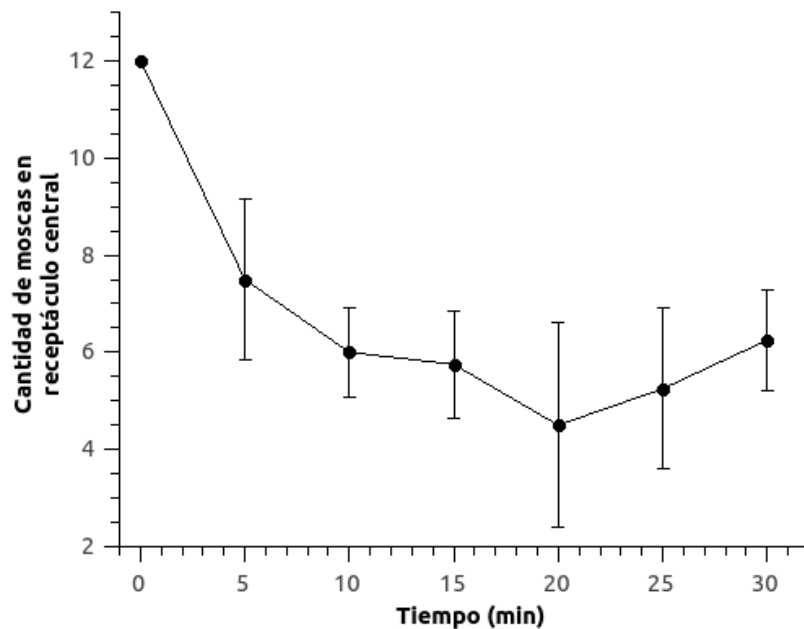


Figura 1. Variación de la cantidad de moscas presentes en el receptáculo central cada cinco minutos. La gráfica contiene los promedios y los errores medios calculados por cuatro repeticiones, los cuales iniciaban (tiempo cero) con 12 moscas dispuestas en el receptáculo central.

En los 15 primeros minutos las moscas evacuan el receptáculo central y exploran todas las salidas en el laberinto. Para obtener una muestra con mayor resolución temporal (cada dos minutos), se realizó una gráfica en donde evidencia el comportamiento de evacuación del receptáculo central (Figura 2).

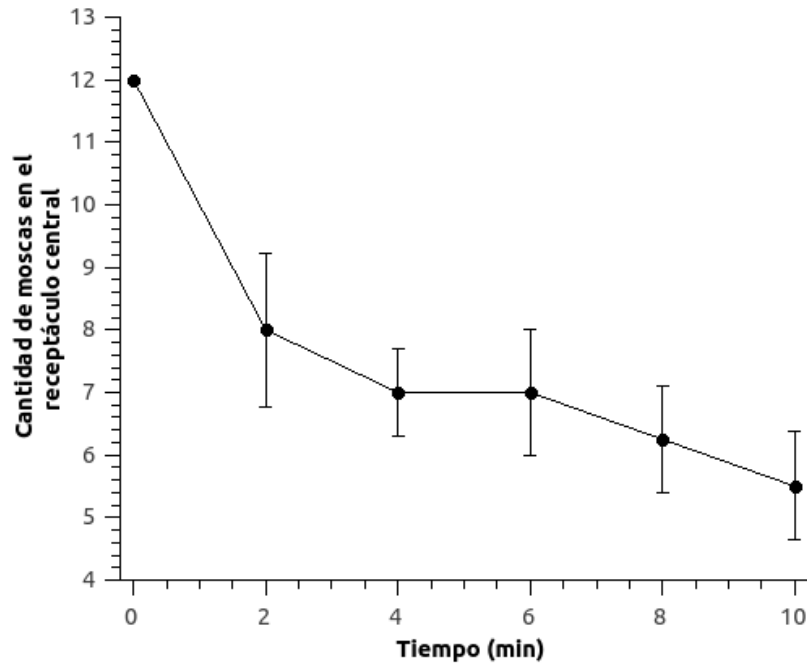


Figura 2. Variación de la cantidad de moscas presentes en el receptáculo central cada dos minutos La gráfica contiene los promedios y los errores medios calculados para cuatro repeticiones, todos iniciaban (tiempo cero) con 12 moscas dispuestas en el receptáculo central.

En las anteriores gráficas se observa la evacuación de las moscas en el receptáculo central, lo cual indica que el individuo está explorando el espacio (laberinto). Por lo tanto, al observar la figura 2, con una mayor resolución temporal, se puede notar que se presenta una curva en los primeros 10 a 15 minutos, lo cual, demuestra una caída de la población más dramática.

Por medio de la prueba de Kruskal-Wallis se evaluó: 1) Dentro de los controles topológicos, cada una de las salidas en su interior para observar la forma como se

distribuían las moscas y, 2) Entre tratamientos (Odorante 1 y Odorante 2) y controles, si existían diferencias significativas entre las salidas que presentaban alguno de los odorantes respecto a las salidas que no presentaron odorante (Controles).

En el análisis topológico realizado para la evaluación de las cuatro salidas sin odorante establece que no existe diferencias significativas (KW $p=0,8434$). Encontrándose que no existen diferencias significativas en la ubicación topológica de las moscas en el laberinto. En contraste, en el análisis de los dos odorantes respecto a los controles (KW $p=0.000$), indicando que existen diferencias significativas entre los tratamientos (Odorantes) Vs. los controles.

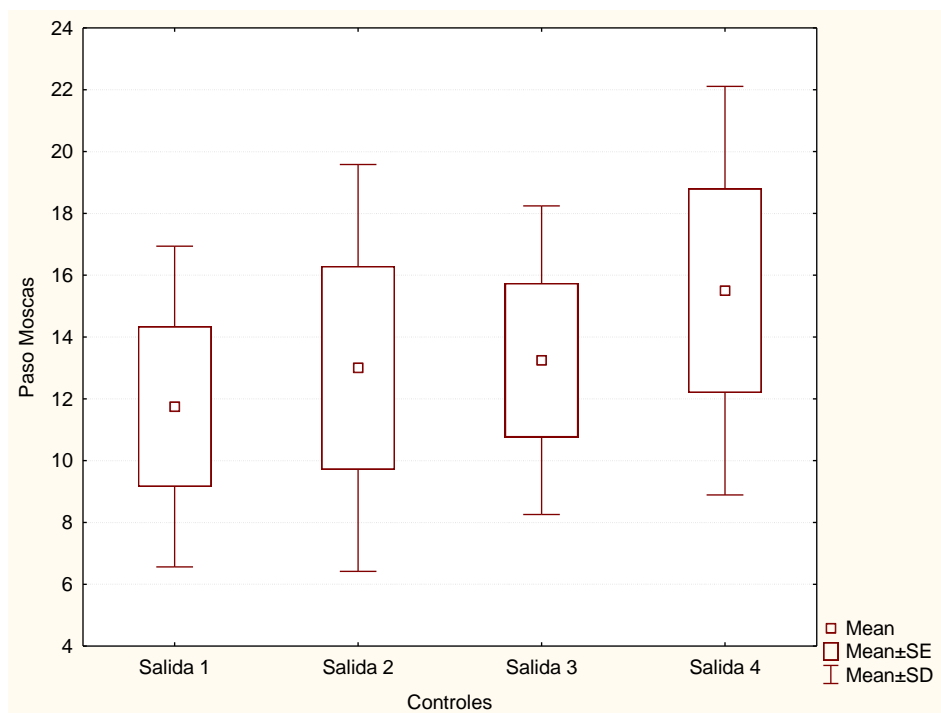


Figura 3. Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el paso acumulado de las moscas en cada salida sin repelente (control) (KW. $p= 0,8434$)

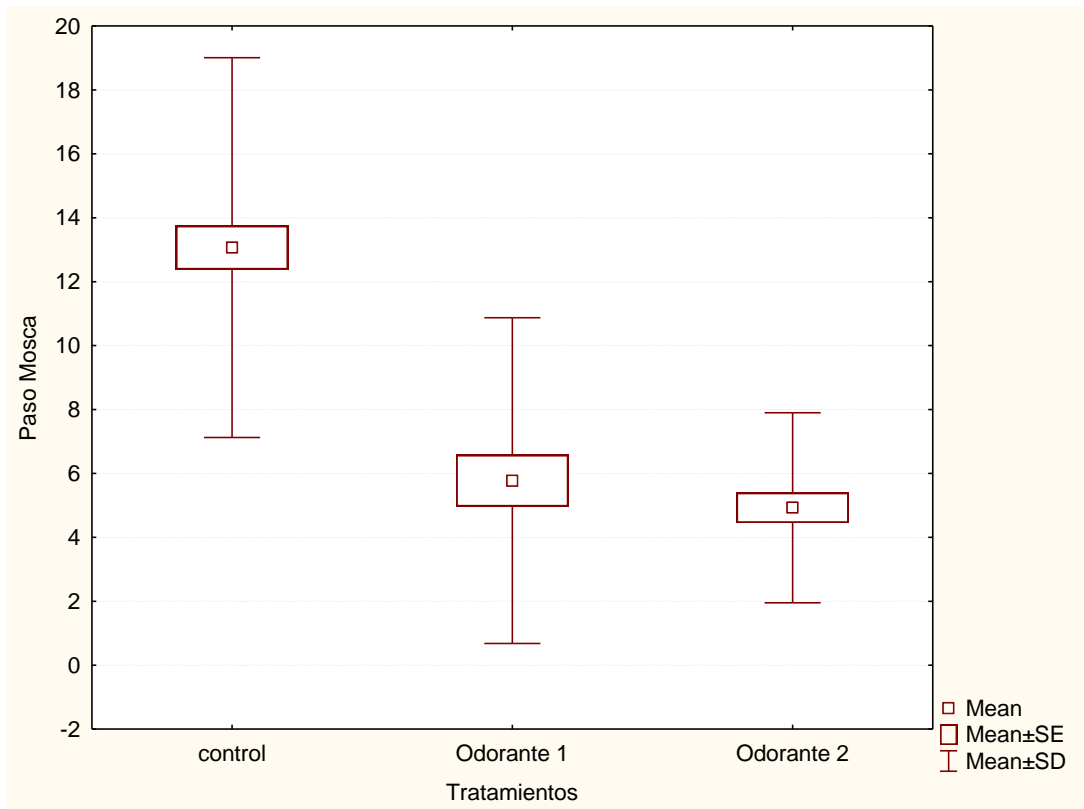


Figura 4. Diagrama de cajas y bigotes donde se muestra el paso acumulativo de las moscas para las dos salidas sin repelente (control), salida con Odorante 1 (repelente1) y odorante 2 (repelente 2) (KW $p= 0,000$)

7. DISCUSIÓN

Se estableció una metodología basada en la detección de actividad del “paso” de la mosca *D. melanogaster* como respuesta a odorantes de repelencia cuyo principio activo es el DEET. Para ello, el método dependía de una metodología de detección en la que se incluyó como una cámara de video que realizaba registros de 10 minutos de duración ya que en este lapso se daba la mayor actividad de exploración de las moscas. Este comportamiento es similar al comportamiento para la misma especie, reportados por otros autores como un comportamiento repetitivo y coordinado de las moscas (Dukas, 2008). En los resultados obtenidos para definir la ventana experimental en los 10 primeros minutos, se encontró una respuesta significativa al estímulo (laberinto), es decir, se muestra con claridad una respuesta de exploración con desplazamientos desde el receptáculo central hacia cada una de las salidas, disminuyendo aproximadamente el 50% de la población que originalmente se había depositado en el receptáculo central.

En el sistema desarrollado y expuesto en este trabajo, el uso de una cámara de video permitió registrar el comportamiento de *D. melanogaster* frente a los estímulos repelentes y los estímulos neutros dado que las moscas evitaban explorar las salidas en las cuales el aire circulante arrastraba DEET y en contraste, las moscas solo exploraron en las salidas por las cuales solo circulaba aire.

El software **ImageJ** que se usó como sistema digital para procesar las imágenes de video, permitieron la resolución temporal suficiente para que el análisis estadístico documentara el los experimentos de actividad de las moscas tanto en ausencia de repelente como en presencia de este. La metodología propuesta y el software permiten hacer análisis semiautomatizado, del comportamiento de organismos basándose en su actividad o desplazamientos exploratorios. Existen otros tipos de software que

automatizan este proceso de forma más amplia como es el ejemplo del software **Ethovision** (Noldus *et al*, 2002). Sin embargo, el software **ImageJ** actúa como un software de reputación científica y es de muy fácil adquisición.

La prueba estadística (no paramétrica) permitió demostrar que no hubo “preferencia” de exploración de las moscas que estuviera relacionada con la topología del laberinto (KW $p=0,8434$). Los resultados de las medias y errores estándar corroboran lo anterior y con esto se podría encontrar un número similar de moscas explorando y pasando hacia cada una de las cuatro salidas. En contraste, al emplear los repelentes comerciales (Off y Autan) ambos a una concentración de 20% de principio activo, se pudo demostrar que las moscas no exploraron estas salidas al compararlas con las salidas donde no estuvo presente el repelente, demostrándose con resultados de alta significancia estadística (KW $p= 0,000$). Cabe anotar que la media registrada de *off* es menor que *autan* mostrando cierta diferencia de efectividad (Sato & Touhara, 2008). Estas diferencias en las medias puede estar relacionados con la diferencias de los componentes de la formulación que coadyuvan en la duración del efecto o contrarrestar en cierta manera el grado de toxicidad del principio activo (Qiu *et al*, 1998). Al observar la formulación de los repelentes utilizados, la diferencia fundamental es que el odorante 2 (repelente comercial *autan*) solo presenta agua, etanol y un corrector organoléptico, el cual se espera que se presente un efecto rápido de acción, dado que este se puede evaporar fácilmente y por lo tanto un corto tiempo de duración reflejando de esta manera una alta variabilidad de resultados.

Por otra parte, los resultados obtenidos son coherentes debido a los comportamientos innatos de repulsión producidas por odorantes (diseñados para este propósito); como lo muestra el DEET para los insectos dípteros de importancia médica, hematófagos Hemiptera, Siphonaptera, Hymenoptera, Acarina y Gnathobdellidae cuya sustancia es detectada en las antenas de cada individuo (Peterson *et al.* 2001) y por lo tanto permiten sugerir que el sistema

propuesto en este trabajo funciona como una alternativa para evaluar la efectividad de sustancias repelentes, puesto que, el sistema presenta una fácil consecución, mantenimiento y reproductibilidad en los resultados experimentales, por lo que se sugiere como un sistema ideal para investigaciones y desarrollo, de manera confiable y económica (Barnard, 2005).

Entre las debilidades del sistema propuesto está el que solo está limitado a los cambios de comportamiento relacionados con el movimiento (atracción o repulsión). Sin embargo, el sistema permite tener de manera manual o semiautomática el comportamiento del insecto y se identifica su respuesta patrón del estímulo específico de manera similar a los resultados obtenidos en períodos de tiempo de video uniforme (Figura 1 y 2) que permite determinar el tiempo de video apreciándose comportamientos repetitivos dependientes de la respuesta que pueden reflejar las moscas (Noldus *et al.* 2001).

Finalmente, a pesar de dicha desventaja se concluye que el sistema es ideal para la determinación de funciones de repelencia de sustancias de estudio, que se puede comparar con un estándar, de tal manera que sea utilizada en metodologías de evaluación de sustancias naturales.

8. CONCLUSIONES

- Se logró establecer un sistema automatizado que permite documentar y estimar cuantitativamente la actividad de individuos de *Drosophila melanogaster* y cómo estos, pueden modificar su comportamiento en presencia de un repelente.
- Los resultados permiten concluir que para la metodología y el sistema diseñados, los registros de los experimentos deben hacerse en los primeros diez minutos y que las moscas discriminan negativamente el paso hacia las salidas con repelente.

9. BIBLIOGRAFIA

Barnard, D. R. (2005). Biological assay methods for mosquito repellents. *Journal of the American Mosquito Control Association* 21: 16-25 doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00731.x

Bohbot, J. D., Fu, L., LE, T. C., Chauh, K. R., & Cantre, C. L. (2011). Multiple activities of insect repellents on odorant receptors in mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology* (25): 436-444.

Chapman, R. F. (2000). Entomology in the twentieth century. *Annu. Rev entomol* (45): 261-285, 0066-4170/00/0107-0261

Eisner, T., Eisner, M., & Siegler, M. (2005). Class insecta Order *phasmatodea*. En *Secret Weapons* (pág. 95). Londres: Copyrigh.

Chardonnet, f., Martinez, P., Chouquet, B., Silvain, J., & Kaiser, L. (2012). An actimeter system for automated recording of foraging activity in system borer caterpillars. *entomologia experimentails applicata*, 175-180 DOI: 10.1111/j.1570-7458.2011.01212.x

Chen, S., Yeelin Lee, A., Bowens, N. M., Huber, R., & Kravitz, E. A. (2002). Fighting fruit flies: A model system for the study of aggression. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 99(8), 5664.

Choe, J. C., & Crespi, B. (1997). *Social behavior in insects and arachnids*. Cambridge: Cambridge University (pagina:316).

Debboun, M., Frances, S. P., & Strickman, D. (2007). *Insect repellents, principles, methods and uses*. United States: Taylor & Francis group.

Dukas, R. (2008). Evolutionary Biology of Insect Learning. *Annual Review Of Entomology*, 53(1), 145-160. doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093343

Feala, J. D., Coquin, L., D.Zhou, T, G. H., Paternostro, G., & D, A. M. (2003). Metabolismo como medio de adaptación a la hipoxia: perfiles metabólicos y el análisis de flujo de equilibrio. *BMC sistem biology*, 90.

Ferreira, M., & Moore, S. (2011). Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Journal.genetic architecture of*

behaviour. (10 de 11 de 2013). Obtenido de <http://mackay.gnets.ncsu.edu/MackaySite/Behavior.html>

Giménez, J. C. (27 de 09 de 2013). Obtenido de CedimCat Centre d'Informació de Medicaments de Catalunya: <http://www.cedimcat.info/html/es/dir2471/doc26947.html>

González, R., G.Otero, Villanueva, J., Pérez, J. A., & Soto, R. (2006). TOXICIDAD Y REPELENCIA DE *Azadirachta indica* CONTRA *Varroa destructor*. 741-751.

Iniesta, F., García, M., & Corbera, J. C. (1995). Sensor y aceleración para estudios de actimetría. *Branca D`estudiants de IEEE de Barcelona*, 56-59.

Katz, T. M., Miller, J. H., & Hebert, a. A. (2008). Insect repellents: Historical perspectives and new developments. *JAAD*.

Labno, C. (2013). Integrated light microscopy core. University of Chicago.1-5

Leadbeater, E., & Chittka, L. (2007). Social Learning in Insects — From Miniature Brains to Consensus Building. *Current biology* (17), 1-11 [doi:10.1016/j.cub.2007.06.012](https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.012)

Lehner, P. (1996). *Handbok of ethological methods*. Cambridge: Cambridge University Press.

M. Schleyer, T. S. (2011). A behavior-based circuit model of how outcome expectations organize learned behavior in larval *Drosophila*. *Learning & Memory*, 639-653.

M. Zamani, M. (2012). Haverflock Guide to Image Analysis with ImageJ Haverford College, Haverford PA 19041 .

Maia, M. F., & Moore, S. J. (2011). Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malaria Journal*, 10 (Suppl 1), 1-14. [doi:10.1186/1475-2875-10-S1-S11](https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-S1-S11)

Martin, J. (2004). A portrait of locomotor behaviour in *Drosophila* determined by a video-tracking paradigm. *Behavioural Processes*,67(2), 207-219. [doi:10.1016/j.beproc.2004.04.003](https://doi.org/10.1016/j.beproc.2004.04.003)

Medina, M., Arencibia, D., Lopez, Y., Diaz, D., Sifontes, S., & Infante, J. (2003). Diseños experimentales para los estudios de toxicología preclínica. *retel*.

Miot, H. A., Batistella, R. F., & K. de Almeida Batista, D. E. (2004). COMPARATIVE STUDY OF THE TOPICAL EFFECTIVENESS OF THE ANDIROBA OIL. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*.

Montoya, J. O., Giraldo, A. S., & Sousa, A. H. (2006). Efecto de repelencia de *Crotalaria juncea*, *Galactia striata* y *Cymbopogon nardus*. *Revista de biologia e ciências da terra*, 180.

Noldus, L. P., Spink, A. J., & Tegelenbosch, R. A. (2002). Computerised video tracking, movement analysis and behaviour recognition in insects. *Computers & Electronics In Agriculture*, 35(2/3), 201 PII: S0168-1699(02)00019-4.

Noldus, L. P., Spink, A. J., & Regelenbosch, R. A. (2001). EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, 33(3), 398. PMID: 11591072

Qiu, H., McCall, J., & Jun, H. W. (1998). Formulation of topical insects repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET): vehicle effects on DEET in vitro skin permeation. *International journal of pharmaceutics*, 167-176.

J.M.Sanchez. (2011). Enfermedades infecciosas en la historia Humana. Librosenred (Pagina 186).

Nerio, L., Olivero, J., & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* (101), 372-378.

Patel, E., Gupta, A., & Oswal, R. (2012). A review on: mosquito repellent methods. *International journal of pharmaceutical 2(3), chemical and biological sciences*, 310-317. ISSN:2249-9504

Peterson, C., & Coats, J. (2001). Insect repellents – past, present and future. *Insects repellents*, 155-157. doi:10.1039/B106296B

Quinn, W., Harris, W., & Benzer, S. (1974). Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. sci* (71/3), 708-712.

Sato, K., & Touhara, K. (2008). Insect Olfaction: Receptors, Signal Transduction, and Behavior. *Department of Integrated Biosciences , The University of Tokyo* (10), 121-135. doi:10.1007/400_2008_10

Stajković, N., & Milutinović, R. (2013). Insect repellents -- transmissive disease vectors prevention. *Vojnosanitetski Pregled: Military Medical & Pharmaceutical Journal Of Serbia & Montenegro*, 70(9), 854-860.doi:10.2298/VSP1309854S

Selby Chen, A. Y., Bowens, N. M., Huber, R., & Kravitz, a. E. (2002). Fighting fruit flies: A model system for the study. *PNAS* 99(8): 5664–5668
doi:10.1073/pnas.082102599

Wutsmann, G., Rein, K., Wolf, R., & Heinsenber, M. (1996). a new paradigm for operant conditioning of *Drosophila melanogaster*. *Springer-Verlag*, 429-436.

Yu-Jen, C., Yan-Chay, L., Ke-Nung, H., Sun-Lon, J., & Ming-Shing, Y. (2009). Stand-Alone Video-Based Animal Tracking System for Noiseless Application. *Instrumentation Science & Technology*, 37(3), 366-378.
doi:10.1080/10739140902832162

Sige, Z., Liedo, P., Altamirano-Robles, L., Cruz-Enriquez, J., Morice, A., Ingram, D. K., & ... Carey, J. R. (2011). Recording Lifetime Behavior and Movement in an Invertebrate Model. *Plos ONE*, 6(4), 1-7.
doi:10.1371/journal.pone.0018151

ANEXOS

Se ha registrado diferentes métodos de detección y sistemas confinados que permite determinar el comportamiento de un organismo vivo.

En esta imagen, permite determinar la atracción como respuesta innata de un odorante que represente una comida, este mediante sensores genera una manera automatizada de detección de paso del organismo.

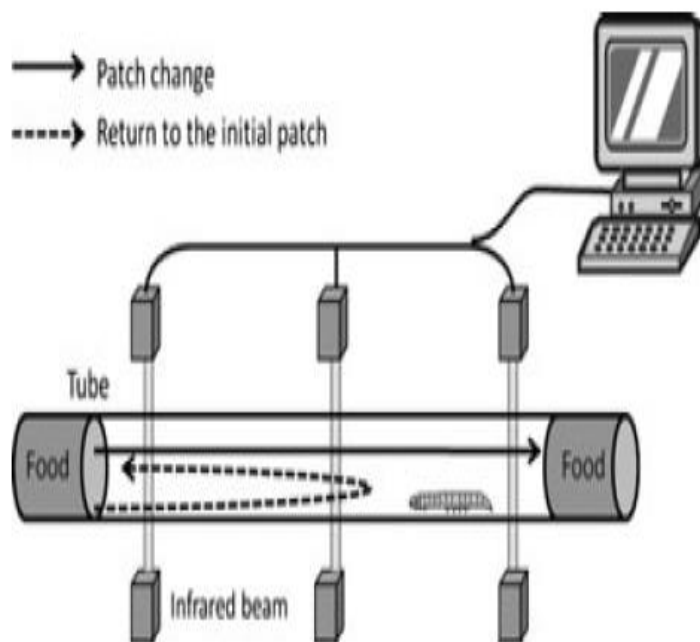


Imagen 1

El método DAM, consiste en un sistema automatizado para evaluar la atracción de un odorante hacia la mosca *Drosophila melanogaster*, contenidos en tubos de ensayo (aproximadamente 32) de silicona como forma de sistema confinado. El sistema automatizado consiste en un método de detección de sensores y que a su

vez está conectado a un medio computarizado que muestre la tendencia de preferencia de cada mosca.

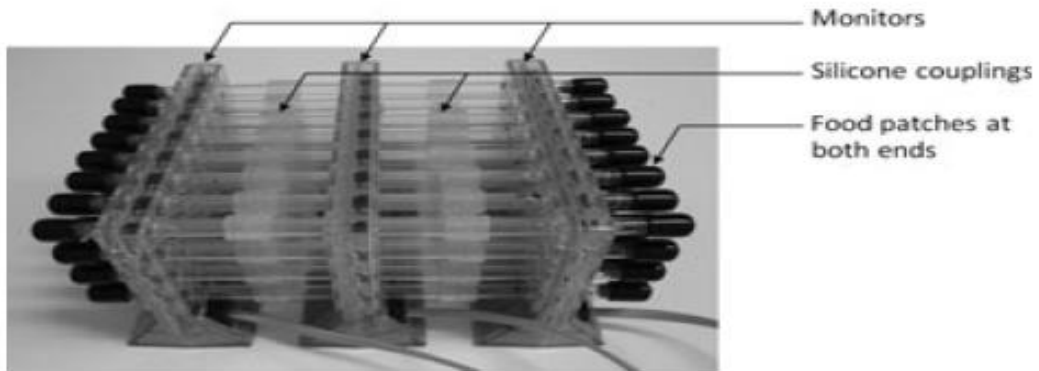


Imagen 2

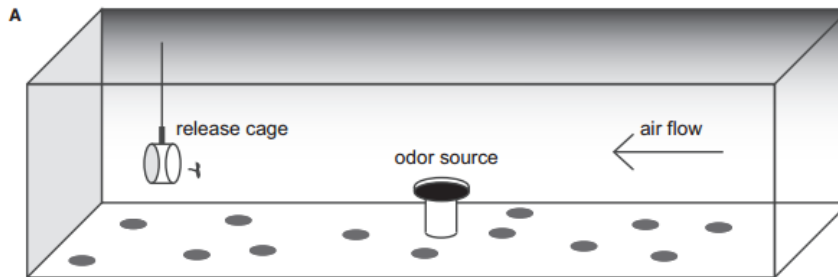


Imagen 3

En este sentido, el medio confinado debe estar conectado por una bomba de aire que permita el arrastre de olores y así sea detectado por el organismo en este caso la mosca *Drosophila melanogaster*.

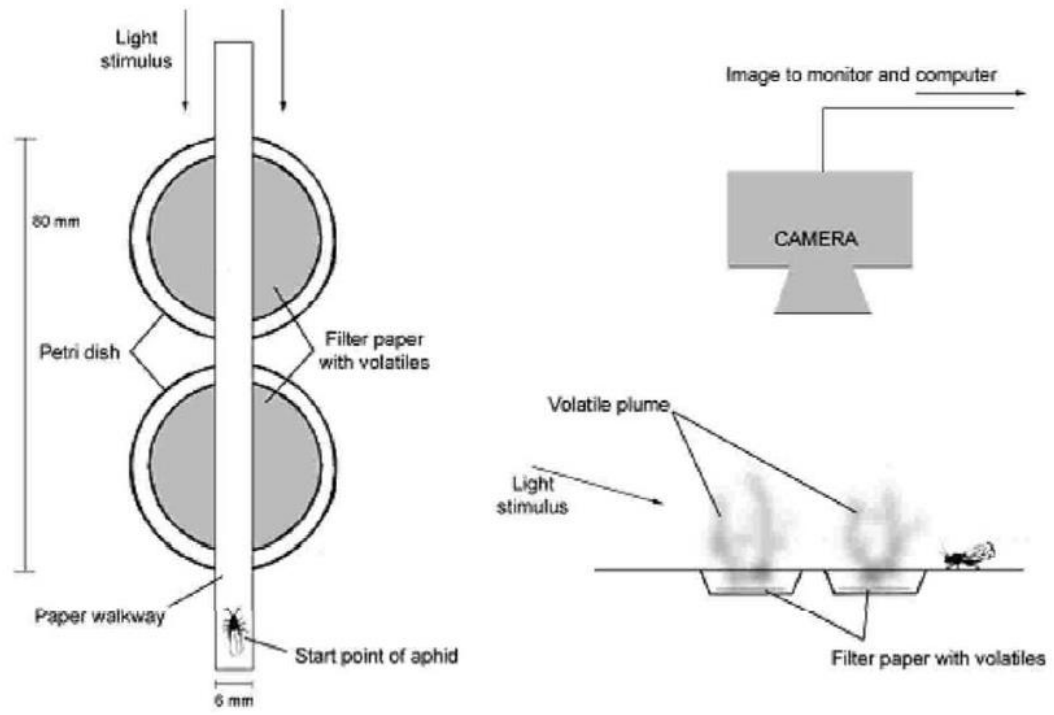


Imagen4

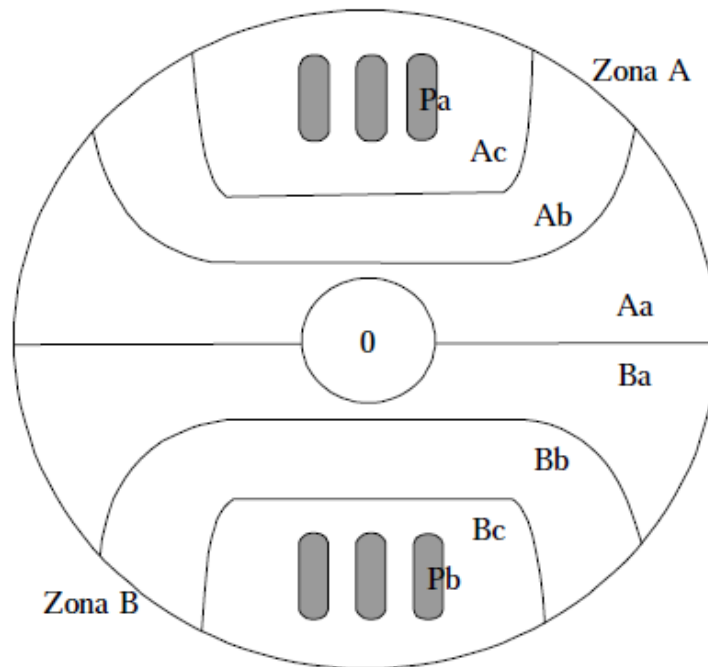


Figura 1. Zonas de distribución de la caja experimental, para las pruebas de repelencia.

Figure 1. Distribution zones of the experimental dish for repellency tests.

Imagen 5, en la que demuestra un diseño de laberinto en forma circular, que permite determinar qué zona de confort es escogida por el biomodelo.

Ahora bien, el diseño experimental cuenta con:

Un laberinto circular conectado por una bomba de aire y a su vez a tubos de ensayos que contienen el tratamiento.

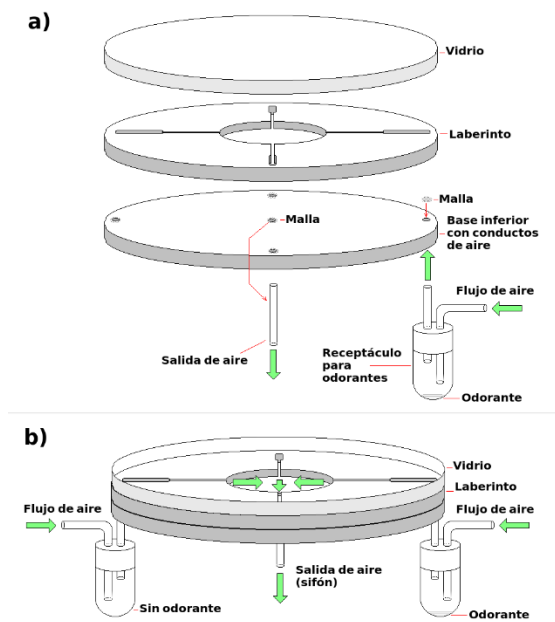
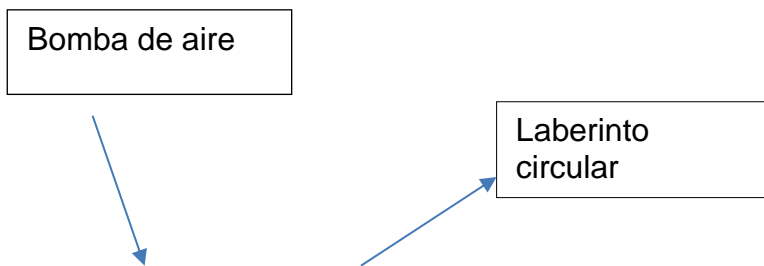
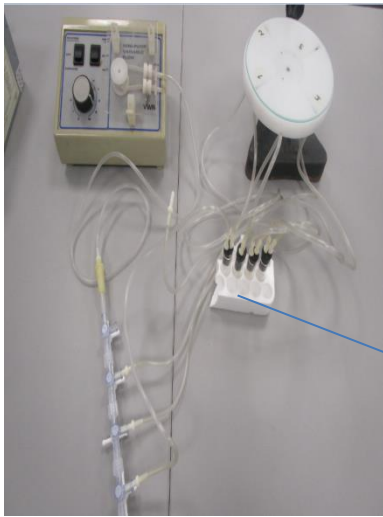


Imagen 6: diseño del montaje y dirección de flujo de aire

Diseño experimental del laberinto





Tubos con repelente

El laberinto tiene cuatro salidas, y en el centro se depositan las 12 moscas objetivo de estudio.



Si bien el uso de la cámara de video es el método de detección, se necesita del software image J para que procese los datos de manera automatizada, para ello se realiza de la siguiente manera:

USO DE *image J*

1. Como se mencionó anteriormente el software especializado realiza el análisis y procesamiento de datos a partir de una secuencia de imágenes, para ello se debe convertir el video utilizando **virtual Dub**.
2. Posteriormente, esta secuencia de imágenes se importa al software y se guarda el archivo como formato *tiff*.

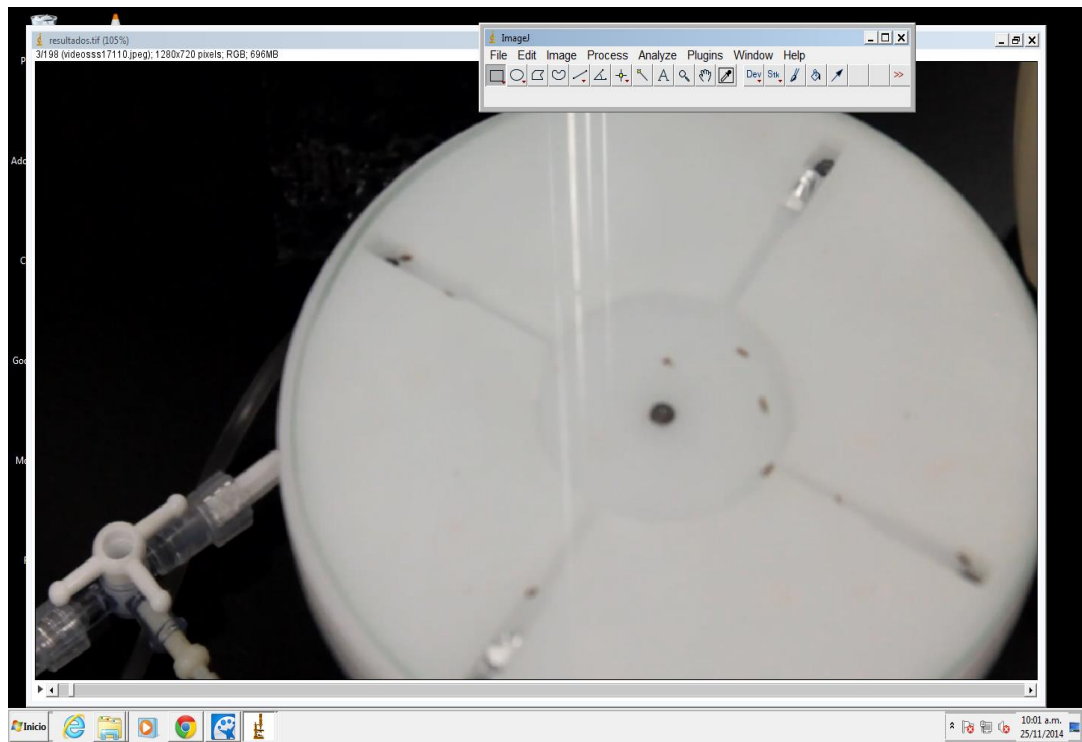


Imagen 7

3. Se debe tener una escala de grises, para ello se selecciona *image-type* y posteriormente 8bits, los cuales se relaciona a 256 niveles de grises.
4. Se hizo un contraste blanco y negro. Para ello se utilizó la opción *threshold*, que permite seleccionar el área de interés.

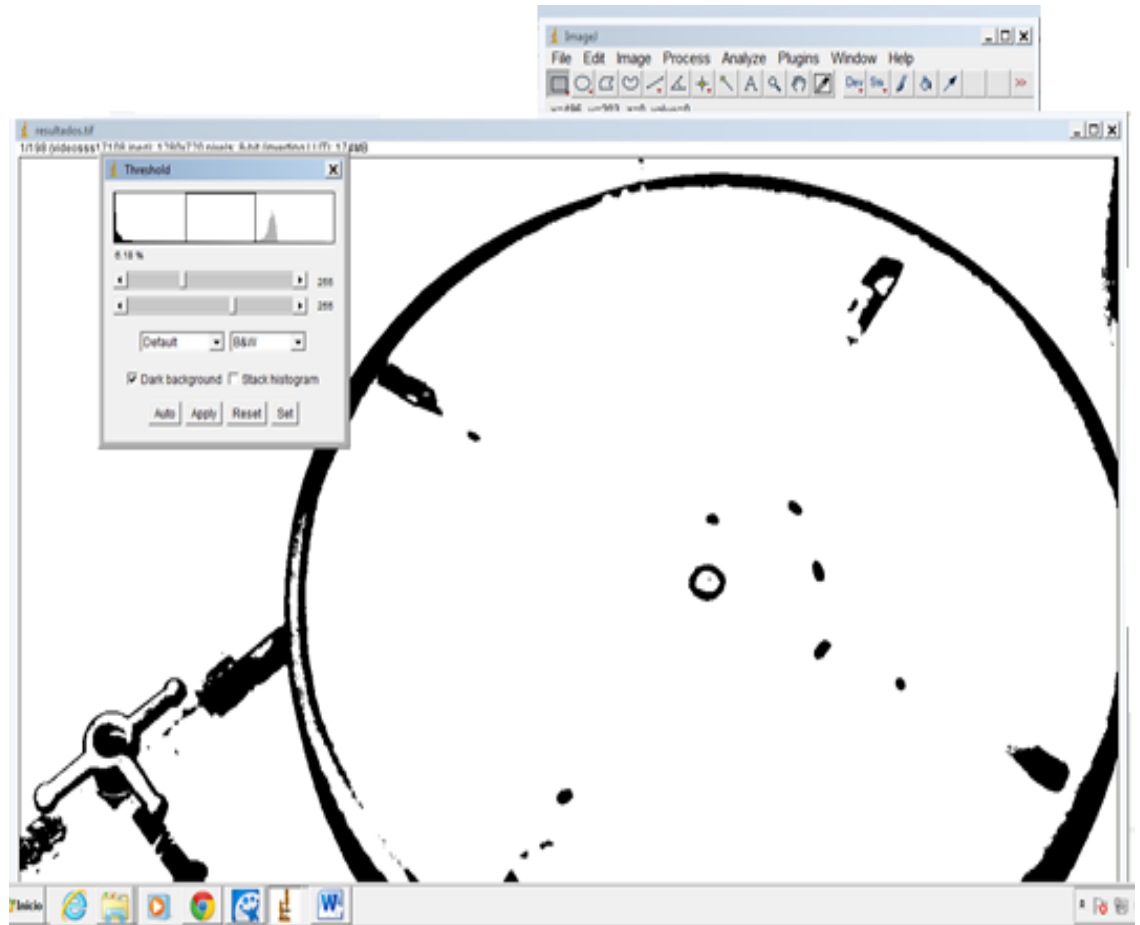


Imagen 8

Para ser más precisos al conteo de partículas en este caso el número de moscas que pase por el salida se debe especificar lo que se desea obtener, para ello:

1. Una vez seleccionada el área, se debe hacer click en "aplicar", esto creara una versión binaria de la imagen con solo dos intensidades de pixeles: blanco=0 y negro=255.

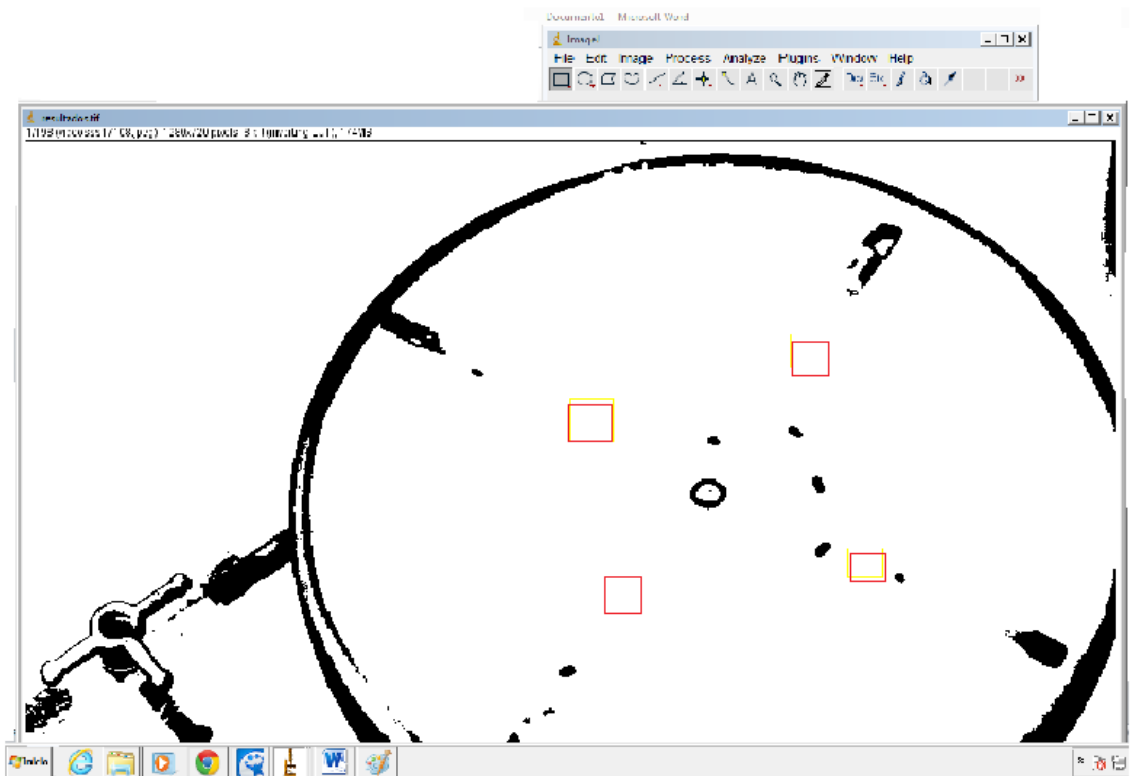


Imagen9

2. Posteriormente, para tener un comando binario de 0 y 1, en el programa se selecciona la opción ***process-binary-binaryerode***.

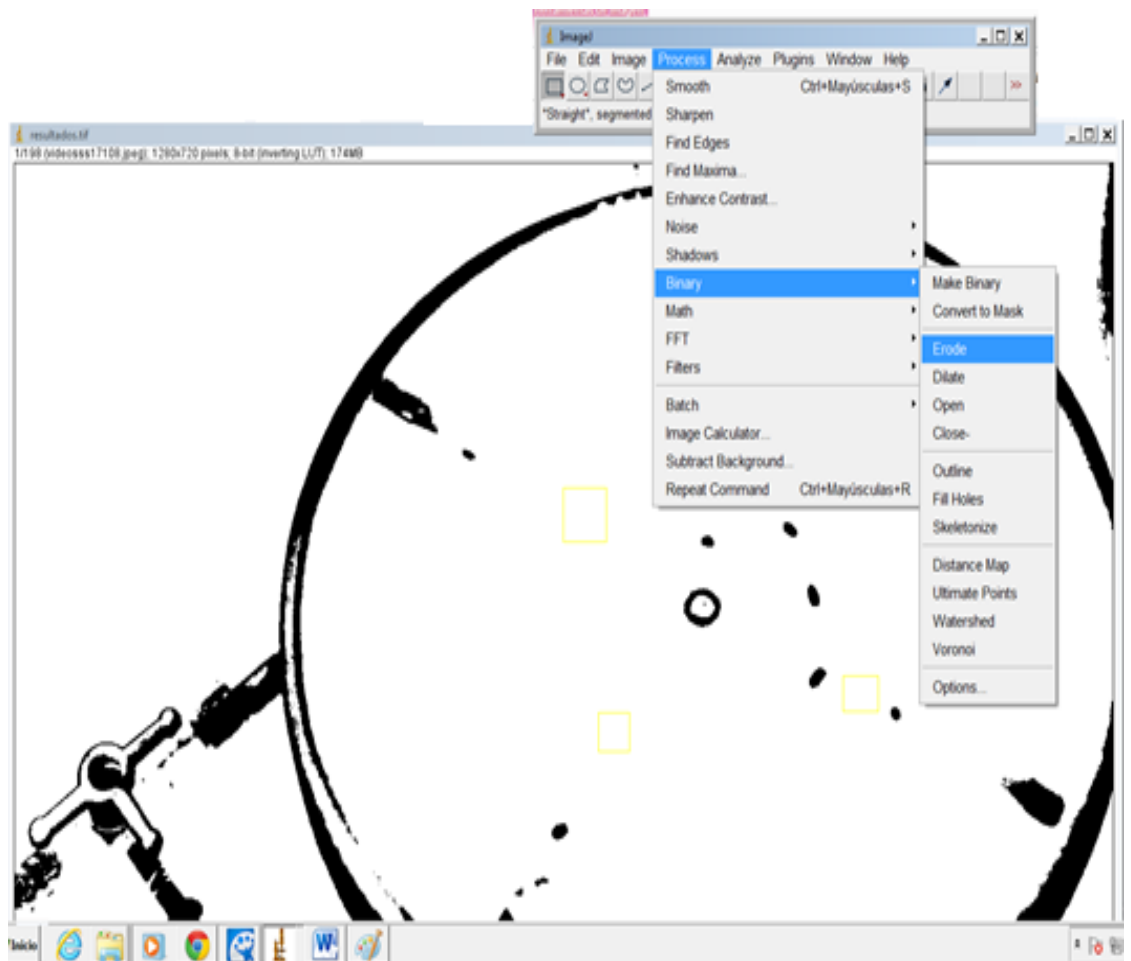


Imagen 10

3. Para el análisis de cuantas moscas pasan por cada uno de los lados del laberinto, se debe poner **analyzeparticles**, y seleccionar todas las opciones para obtener las estadísticas.

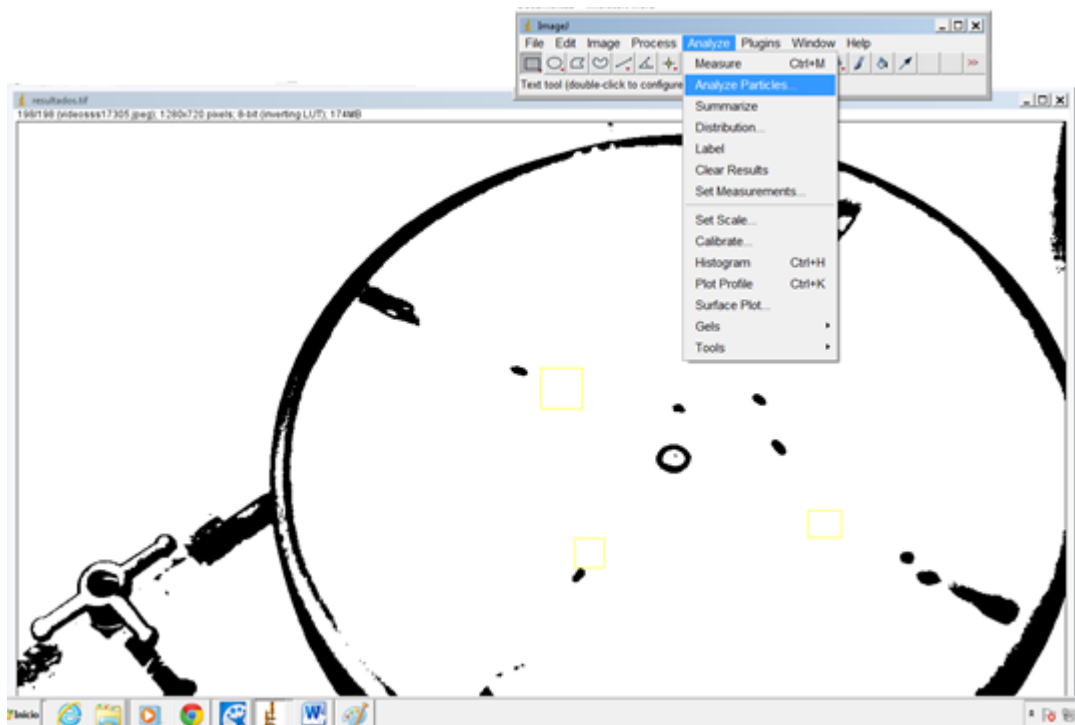


Imagen 11

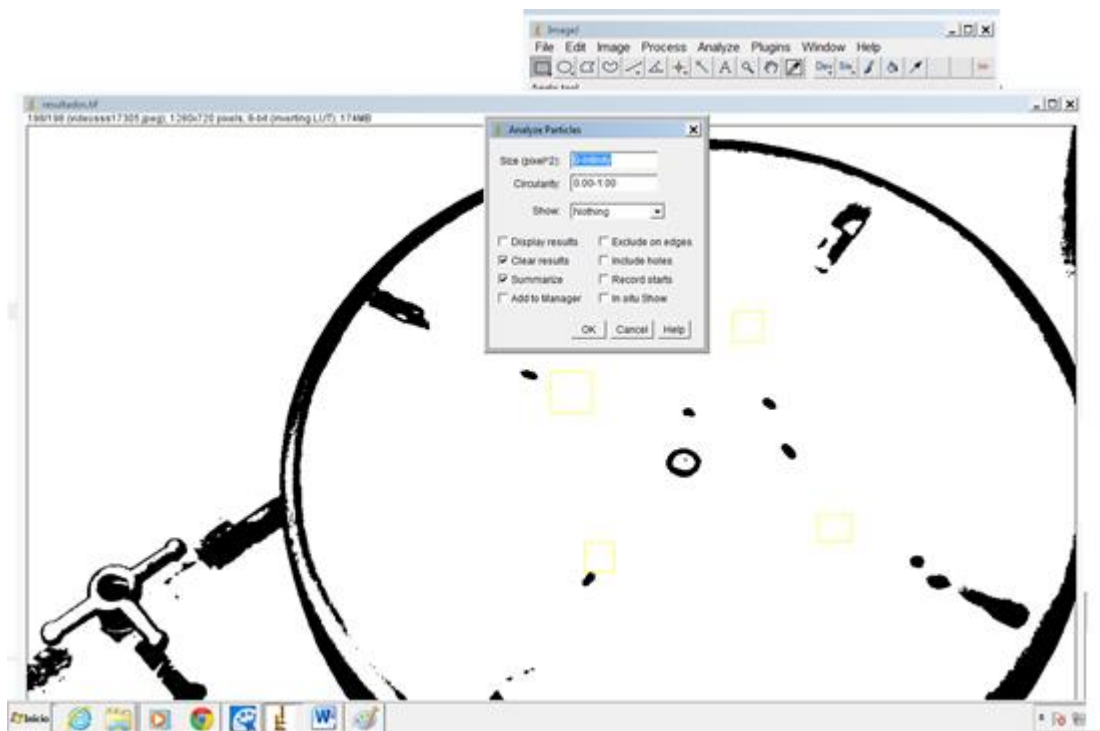
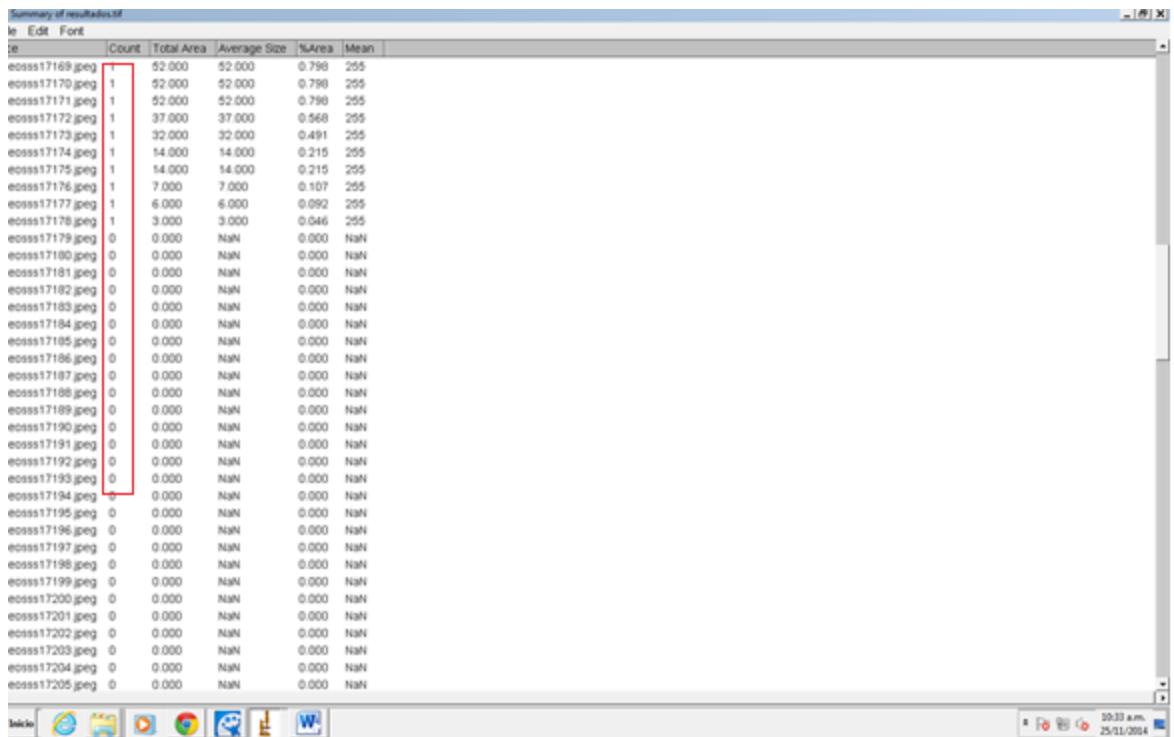


Imagen 12

Finalmente, aparece el conteo de la mosca mediante el procesamiento binario como se muestra en la siguiente imagen.



File	Count	Total Area	Average Size	%Area	Mean
e0sss17169.png	1	52 000	52 000	0.798	255
e0sss17170.png	1	52 000	52 000	0.798	255
e0sss17171.png	1	52 000	52 000	0.798	255
e0sss17172.png	1	37 000	37 000	0.568	255
e0sss17173.png	1	32 000	32 000	0.491	255
e0sss17174.png	1	14 000	14 000	0.215	255
e0sss17175.png	1	14 000	14 000	0.215	255
e0sss17176.png	1	7 000	7 000	0.107	255
e0sss17177.png	1	6 000	6 000	0.092	255
e0sss17178.png	1	3 000	3 000	0.046	255
e0sss17179.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17180.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17181.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17182.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17183.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17184.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17185.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17186.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17187.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17188.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17189.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17190.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17191.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17192.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17193.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17194.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17195.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17196.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17197.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17198.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17199.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17200.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17201.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17202.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17203.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17204.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN
e0sss17205.png	0	0 000	NaN	0.000	NaN

Imagen 13

Es importante recalcar que la metodología antes mencionada fue obtenida a partir del tutorial de image J. (Labno, 2013)