

Expertos Invitados

● **AEDES AEGYPTI Y CULICIDOS ASOCIADOS (DIPTERA: CULICIDAE) EN LA CIUDAD DE CORRIENTES, ARGENTINA**



Columnista Experta de SIIC
Dra. Marina Stein

Jefe de Trabajos Prácticos. Responsable del Area de Entomología, Resistencia, Argentina

Introducción

Aedes aegypti (L.), vector de la fiebre amarilla urbana y del dengue, fue considerado erradicado del continente americano, incluida la Argentina, luego de la campaña continental dirigida para su control a finales de 1963.¹ El abandono de dicha campaña permitió que estos mosquitos recolonizaran varios países hacia finales de la década de 1970. En la Argentina fueron detectados nuevamente, en 1987, en provincias del nordeste como Formosa y Misiones.² En 1991 se encontraron en Quilmes, provincia de Buenos Aires,³ y en 1995, en las ciudades de Buenos Aires⁴ y Córdoba (Ministerio de Salud y Seguridad Social). En 1995, *Ae. aegypti* presentaba una distribución similar a la de 1940, es decir, antes de iniciarse la campaña de erradicación, incluso se dispersó más allá del límite sur histórico, alcanzando la provincia de La Pampa.⁵ Para esa época, la provincia de Corrientes permanecía aún libre de estos mosquitos; sin embargo, en 1997 fueron detectados en diferentes localidades de la provincia y en 1999 se los encontró en la ciudad de Corrientes.⁶

La primera epidemia de dengue en la Argentina, luego de la recolonización de *Ae. aegypti*, ocurrió en 1998 en la provincia de Salta, el virus DEN-2 fue su causa; en el 2000 se registró otro brote en Argentina por serotipo DEN-1 que afectó a las provincias de Misiones y Formosa; ambas epidemias estuvieron vinculadas con brotes en países vecinos.^{7,8} En 2002 se detectaron casos por DEN-1 en Salta y se identifica el serotipo DEN-3 en Misiones. La provincia de Corrientes limita al norte con Misiones, donde circularon los serotipos DEN-1 y DEN-3, y al este con el vecino Brasil. Si bien en la provincia de Corrientes no se registró aún un brote de dengue, varias localidades de esa provincia fueron clasificadas como de mediano y alto riesgo por el Ministerio de Salud.⁹

A pesar de la gran diversidad de mosquitos citada para la provincia de Corrientes, son escasos los trabajos relativos a estos insectos en la zona, tanto sobre individuos adultos como inmaduros. Con respecto a *Ae. aegypti*, luego de su detección en la ciudad de Corrientes, se determinó su distribución espacial y se informó sobre algunos criaderos donde fueron encontrados.¹⁰

Las características biológicas de larvas y adultos de *Ae. aegypti* variarían según las particularidades de cada localidad y de la población de mosquitos presente.¹¹ Cada localidad presenta características microclimáticas particulares, además de los aspectos económicos y sociales que hacen que cada una de ellas sea única. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar los criaderos que más aportan a la producción de individuos inmaduros de *Ae. aegypti* en la ciudad de Corrientes, así como de otros culicidos con los cuales comparten los mismos sitios de cría.

Materiales y métodos

Area de estudio

El trabajo se llevó a cabo en la ciudad de Corrientes, ubicada en el sector noroeste de la provincia homónima (27° 27' S y 58° 46' O). La precipitación anual alcanza los 1 300 mm, acumulando

mayor registro en el período estival (noviembre-marzo); la evapotranspiración potencial anual es de 1 050 mm, dejando un exceso anual de 300 mm. La humedad relativa media mensual es del 68%. La temperatura máxima absoluta en enero alcanza los 43°C, con una media de 27°C (máxima de 33°C y mínima de 21°C). En la zona norte de la provincia el clima está afectado por las condiciones locales de los sitios bajos y las aguas estancadas, que operan como fuentes permanentes de evaporación. De acuerdo con estas características, el período anual medio libre de heladas es de 345 días.¹²

Colecta de larvas y pupas

Los muestreos se realizaron en sitios de la ciudad positivos para *Ae. aegypti*, según datos del Ministerio de Salud provincial; además, se tuvo en cuenta las principales vías de acceso a la ciudad como las avenidas cercanas al puente interprovincial Chaco-Corrientes y a las rutas nacionales 5 y 12.

Entre agosto de 2001 y julio de 2002 se realizaron muestreos cada 15 días, que totalizaron 29 muestreos y cubrieron 19 barrios de la ciudad. En cada barrio se muestrearon 10 lugares en los alrededores de una vivienda identificada previamente como positiva para *Ae. aegypti*; se revisaron las viviendas lindantes al foco y los lugares públicos cercanos. Se revisaron en total 175 viviendas, 15 comercios (11 gomerías, 2 talleres mecánicos de autos, un mercado de frutas y verduras, una feria de ropa). Por representar sitios de gran concurrencia de público o por contener gran cantidad de potenciales criaderos para mosquitos, sin relación con los focos, se revisaron además 7 estaciones surtidoras de combustible, 7 gomerías, un club deportivo, la terminal de ómnibus de larga distancia, el predio universitario, 5 terrenos baldíos, un establecimiento escolar, una iglesia y el cementerio municipal (4 ha). Este último se inspeccionó dos veces (septiembre y diciembre de 2001), aunque no totalmente en cada oportunidad.

Se revisaron los recipientes capaces de contener agua en la búsqueda de larvas y pupas de mosquitos, a excepción de los tanques de agua domiciliarios ubicados en los techos de las viviendas. Los recipientes muestreados se clasificaron en tres grupos según su tamaño: 1 (< 2 l; n = 336), 2 (2-30 l; n = 178) y 3 (> 30 l; n = 17).

Siempre que fue posible, se colectaron todas las larvas y pupas que se encontraban en los criaderos con técnicas adecuadas para cada tipo de recipiente; las larvas y pupas colectadas se trasladaron al laboratorio para su cría, conservación y determinación. Las larvas de los primeros estadios se criaron en recipientes de plástico de 150 ml, en grupos de 20 individuos, conteniendo partes iguales de agua de clorada y agua del criadero; se les suministró alimento para peces tropicales, hasta obtener las larvas de cuarto estadio o sus exuvias. Las pupas colectadas se mantuvieron en grupos de no más de 15 individuos por recipiente hasta obtener los adultos. La determinación de larvas y adultos se basó en claves dilemáticas.¹³⁻¹⁵

Análisis de datos

Se comparó la abundancia de las especies predominantes en diferentes tamaños de criaderos, mediante la prueba de chi-cuadrado de Pearson (χ^2). También se estimó el riesgo relativo (RR) de encontrar alguna de las especies predominantes en un tamaño de recipiente en particular. Para las dos especies que resultaron más abundantes se calculó el coeficiente de asociación de Sorensen (I) modificado por Southwood, que oscila entre -1 (no asociadas) y 1 (asociadas completamente):

$$I = 2 \frac{J - 0,5}{A + B}$$

dónde J es el número de larvas de ambas especies cuando las 2 están presentes en los recipientes; A y B es el total de larvas de las especies 1 y 2, respectivamente, en todos los recipientes positivos.¹⁶

Resultados

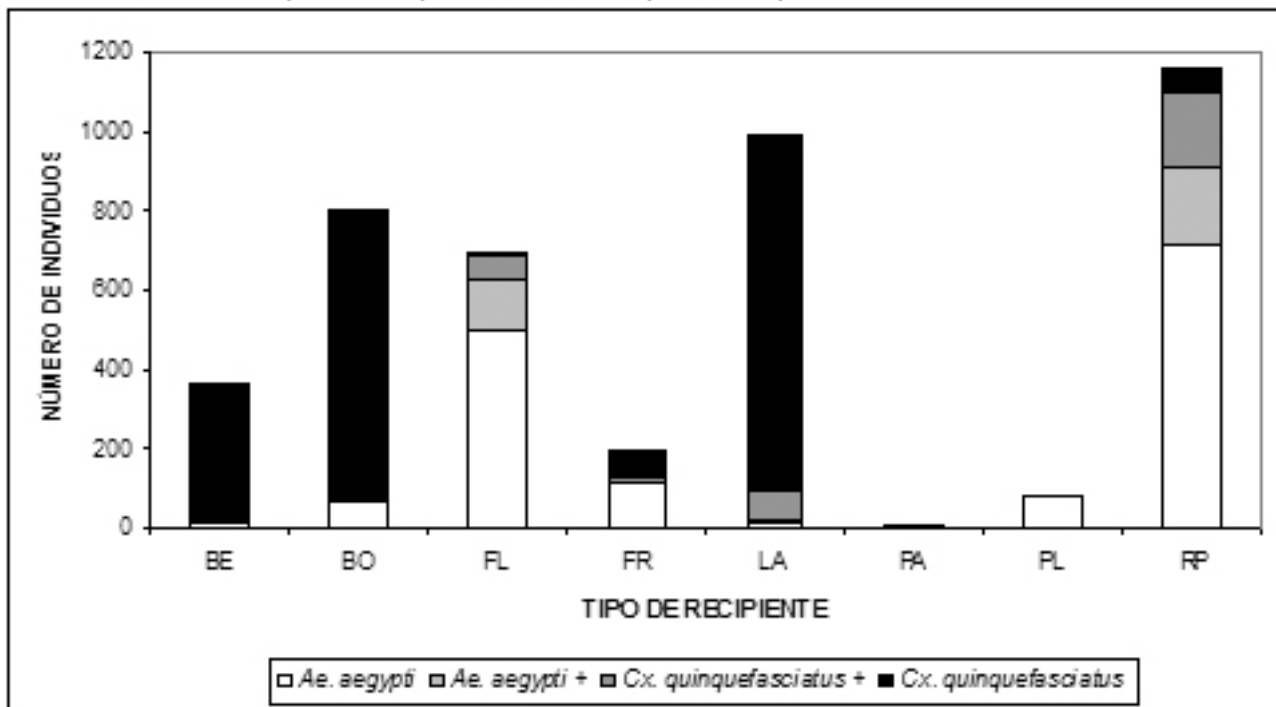
Se colectó un total de 13 213 individuos correspondientes a siete especies: *Ae. aegypti* (43%) y *Culex quinquefasciatus* (Say) (56%) fueron las predominantes; las restantes especies

representaron menos del 1%: *Cx. bidens* Dyar, *Cx. maxi* Dyar, *Cx. saltanensis* Dyar, *Ochlerotatus fluviatilis* (Lutz) y *Uranotaenia iowii* Theobald.

El 30% de las 175 viviendas revisadas resultaron positivas para larvas o pupas de culícidos y en el 23% se encontró solamente a *Ae. aegypti*. Estos mosquitos se colectaron en siete de los 19 barrios muestreados. De los lugares públicos visitados, el 17% de las gomerías resultaron positivas para *Ae. aegypti*, así como la escuela. Si bien el cementerio municipal se revisó en dos oportunidades, el resultado fue negativo las dos veces, posiblemente debido a las actividades de control de mosquitos llevadas a cabo por el municipio.

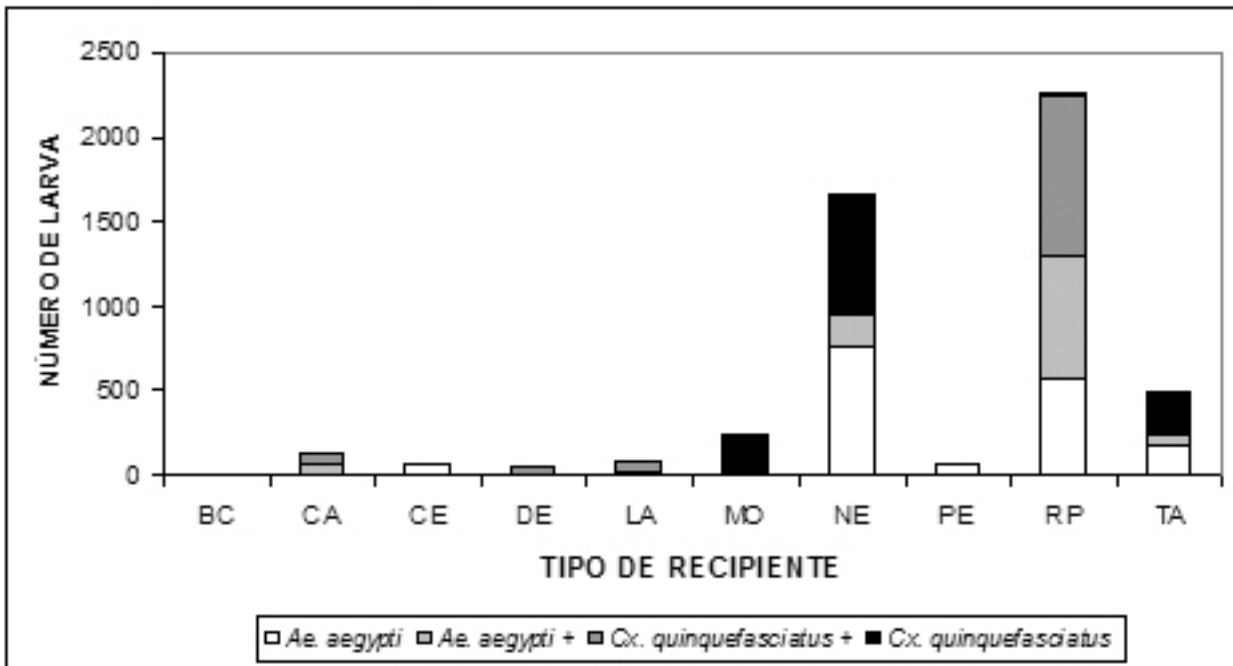
Se muestrearon 531 recipientes en total, de los cuales el 24% resultó positivo para *Ae. aegypti* o *Cx. quinquefasciatus*; ambas especies colonizaron una amplia variedad de criaderos, aunque la primera fue más ecléctica (figuras 1, 2 y 3). El 19%, 32% y 35% de los recipientes muestreados, de tamaño 1, 2 y 3 respectivamente, resultaron positivos. En promedio, tres recipientes por vivienda resultaron positivos como criaderos de mosquitos.

Figura 1. Abundancia de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* colectados, tanto por separado como asociados (+), en recipientes pequeños (tamaño 1), en la ciudad de Corrientes entre agosto de 2001 y julio de 2002. BE: bebedero; BO: botella; FL: florero; FR: frasco; LA: lata; PA: pava; PL: plantero; RP: recipiente de plástico.



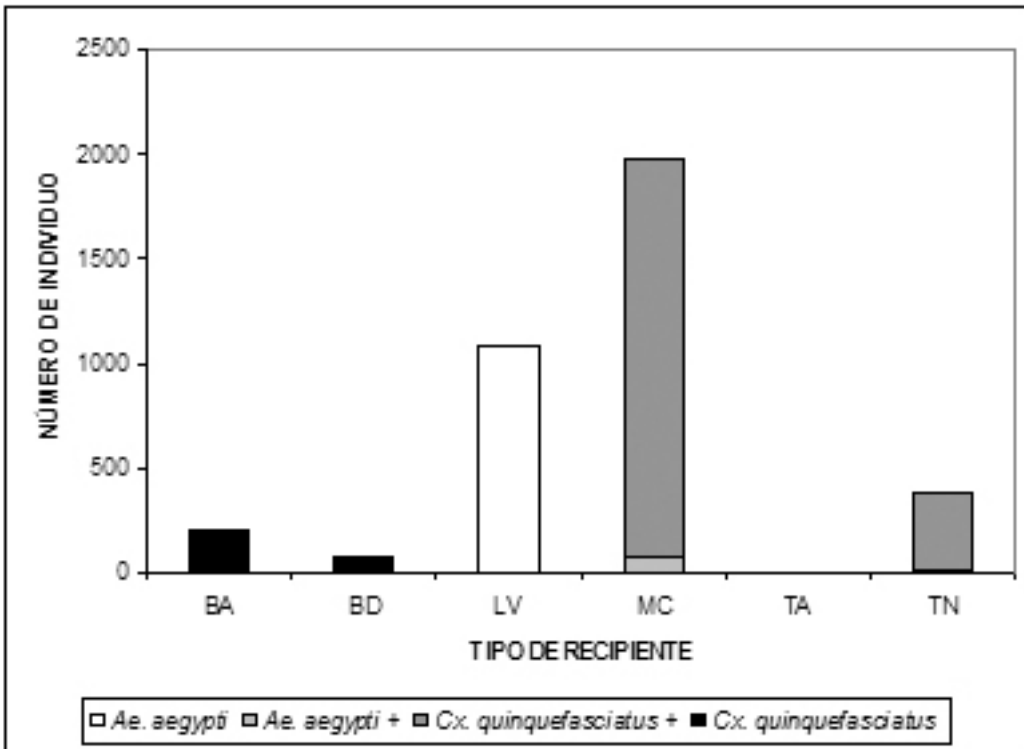
Aedes aegypti se colectó con mayor frecuencia en criaderos de tamaño 1 y 2 como floreros, recipientes de plástico, neumáticos, botellas, baldes y tachos (figuras 1 y 2). Si bien los recipientes pequeños y medianos de boca ancha representaron los principales criaderos, también se encontró un número importante de individuos en un recipiente de gran porte como un lavarropas en desuso (figura 3).

Figura 2. Abundancia de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* colectados, tanto por separado como asociados (+), en recipientes medianos (tamaño 2), en la ciudad de Corrientes entre agosto de 2001 y julio de 2002. BC: batería de camión; CA: canaleta; CE: cerámica; DE: desagüe; LA: lata; MO: mortero de mármol; NE: neumático; PE: pecera; RP: recipiente de plástico; TA: tacho.



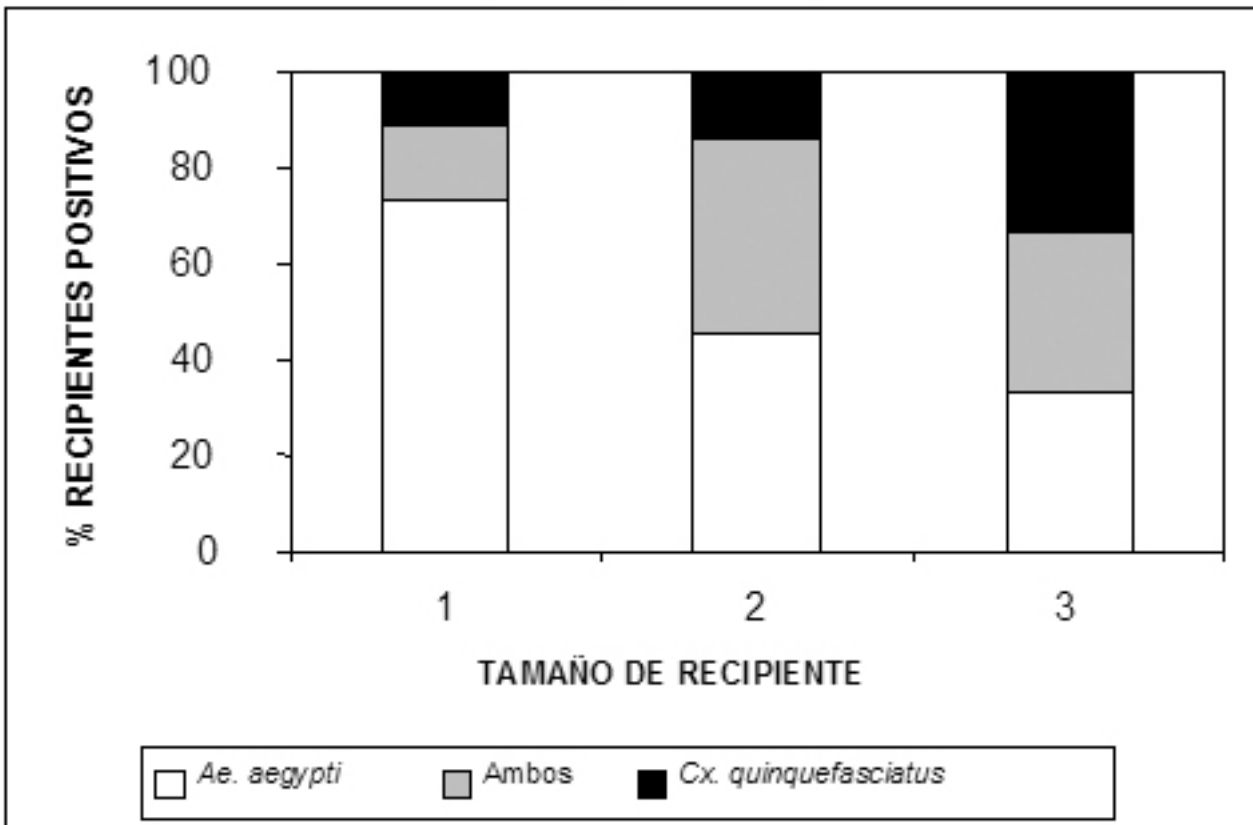
Culex quinquefasciatus también se colectó en recipientes de pequeño y mediano tamaño, como neumáticos, latas y botellas, pero a diferencia de *Ae. aegypti* fue más abundante en recipientes de gran tamaño (figuras 1, 2 y 3). De acuerdo con la prueba de χ^2 de Pearson, las abundancias registradas para *Ae. aegypti* y *C. quinquefasciatus* dependieron del tamaño de los criaderos, considerando solamente los tamaños 1 y 2 ($\chi^2 = 4.4601$, gl = 1; p = 0.0347); los recipientes de tamaño 3 no se tuvieron en cuenta para este análisis debido a su bajo número.

Figura 3. Abundancia de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* colectados, tanto por separado como asociados (+), en recipientes grandes (tamaño 3), en la ciudad de Corrientes entre agosto de 2001 y julio de 2002. BA: bañera; BD: bote de plástico; LV: lavarropa en desuso; MC: mezcladora de cemento; TA: tacho; TN: tanque.



Aedes aegypti fue más frecuente en los recipientes pequeños, frecuencia que disminuyó con el aumento de tamaño, en tanto que para *C. quinquefasciatus* ocurrió precisamente lo contrario (figura 4). La probabilidad de encontrar *Ae. aegypti* en recipientes de tamaño 1 fue 26% mayor que en el tamaño 2 (RR = 1.2576), mientras que para *C. quinquefasciatus* fue 69% mayor en recipientes de tamaño 2 con respecto al tamaño 1 (RR = 1.6867).

Figura 4. Porcentaje de recipientes positivos para *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* colectados en la ciudad de Corrientes, entre agosto de 2001 y julio de 2002.



Aedes aegypti se colectó como única especie en la mayoría de los recipientes, mientras que *C. quinquefasciatus* estuvo asociado con la primera en más del 50% de los casos (tabla 1). El coeficiente de Sorensen estimado mostró poca asociación (-0.15) entre estas dos especies.

Tabla 1. Número de veces en que cada especie de Culicidae, colectada en la ciudad de Corrientes entre agosto de 2001 y julio de 2002, se encontró sola o coexistiendo con otras especies.

| Especie | Ae. ae | Cx. qu | Cx. ma | Cx. bi | Cx. sa | Oc. fl | Ur. lo |
|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <i>Aedes aegypti</i> | 75 | 38 | 2 | 4 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Culex quinquefasciatus</i> | | 17 | 2 | 4 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Culex maxi</i> | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Culex bidens</i> | | | | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Culex saltanensis</i> | | | | | 0 | 0 | 0 |
| <i>Ochlerotatus fluviatili</i> | | | | | | 0 | 0 |
| <i>Uranotaenia lowii</i> | | | | | | | 1 |

En los neumáticos se encontró la mayor diversidad y asociación de especies. En este tipo de recipiente se colectaron hasta cuatro especies conjuntamente, *Ae. aegypti* y *C. quinquefasciatus* fueron las especies comunes; como culicidos asociados a las dos anteriormente mencionadas se colectaron *Cx. bidens* y *U. iowii*, *Cx. bidens* y *Cx. maxi* y también *Cx. maxi* y *Cx. saltanensis*. *Culex bidens*, *Cx. maxi* y *Cx. saltanensis* sólo se colectaron en neumáticos.

Se encontraron larvas de *O. fluviatilis* (n = 34) en una cacerola abandonada, en una vivienda de las afueras de la ciudad. *Uranotaenia iowii*, además de encontrarse en neumáticos, también se colectó en una canaleta de una de las viviendas muestreadas.

Discusión

Aedes aegypti y *C. quinquefasciatus* fueron las especies predominantes en el ambiente urbano estudiado. Se informó haber encontrado *Ae. aegypti* en una gran variedad de recipientes domiciliarios en Buenos Aires, Chaco y Córdoba.¹⁷⁻¹⁹ En este trabajo se encontraron tanto *Ae. aegypti* como *C. quinquefasciatus* en diferentes tipos de criaderos artificiales, lo que refuerza la importancia de las costumbres o hábitos de cada población que deben ser tenidos en cuenta a la hora de implementar medidas de control.

En coincidencia con otros trabajos,^{10,20} los neumáticos fueron los criaderos más importantes y donde se encontró la mayor diversidad de mosquitos. En Río de Janeiro (Brasil), los neumáticos también representaron el principal criadero en términos de producción de *Ae. aegypti*; además, teniendo en cuenta que la evaporación del agua en los neumáticos es baja, éstos se constituyen en óptimos criaderos durante todo el año, manteniéndose igual la proporción de neumáticos positivos para culícidos tanto en la estación seca como en la lluviosa.²¹

En Australia, se encontró *Ae. aegypti* con mayor frecuencia en recipientes pequeños y medianos,²² información que coincide con nuestros hallazgos. La productividad de los recipientes de boca angosta es baja,²³ lo que se reafirma en este estudio por cuanto sólo se colectaron 8 individuos en promedio por botella, en tanto que por neumático se colectaron 60 individuos.

Cabe recordar que las hembras de *Ae. aegypti* depositan los huevos preferentemente sobre superficies húmedas o por encima del nivel del agua del recipiente, por lo tanto, los criaderos de mediano y pequeño tamaño al resultar más efímeros, debido a que presentan mayor fluctuación en los niveles de agua, serían los preferidos por estos mosquitos. Además, hay que tener en cuenta que este tipo de recipientes son los más abundantes en los domicilios.

Al igual que en otros estudios,^{19,20,24} *Cx. quinquefasciatus* fue abundante en neumáticos, sin embargo, estos mosquitos mostraron una marcada tendencia por los recipientes de mayor tamaño. Esto podría deberse a la prolongada permanencia del agua en ellos, por lo que serían ambientes más estables y, por ende, estarían disponibles por más tiempo para que las hembras de estos mosquitos puedan depositar los huevos.

En Cuba, *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* se encontraron asociadas en los criaderos urbanos, donde la competencia por el subnicho reproductivo favorecería a la segunda especie en las campañas anti-*aegypti*.²⁵ De acuerdo con el coeficiente de Sorensen estimado en este trabajo, la asociación entre estas dos especies fue bajo, coincidiendo, además, con la preferencia que mostraron ambas especies por distinto tamaño de criaderos. También se observó una proporción inversa, en términos de abundancia, en los recipientes donde ambas especies coexistían. La baja asociación observada podría deberse a las diferentes estrategias de oviposición de estas especies. Si bien *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* pueden encontrarse en el mismo criadero, la primera preferiría ambientes más efímeros, en tanto que la segunda, buscaría ambientes más estables. Además, cuando coexisten, estas especies se sucederían en el tiempo, *Ae. aegypti* sería la primera en aparecer en el criadero tras acumularse el agua; para cuando *Cx. quinquefasciatus* pase a ser más abundante en el criadero, ya habrán emergido los adultos de *Ae. aegypti*.

Si bien en este estudio *Cx. bidens*, *Cx. maxi* y *Cx. saltanensis* sólo se encontraron en neumáticos, se citaron las dos últimas en recipientes de gran tamaño, como piletas y lavarropas en desuso (provincia del Chaco).²⁰ Por otro lado, también se encontró *Cx. maxi* en piletas y, además, en recipientes de cemento y metálicos, y *Cx. bidens* en este último tipo de recipientes (provincia de Córdoba).²⁶

Larvas de *O. fluviatilis* se colectaron en recipientes artificiales en otras regiones de nuestro país,^{26,27} en coincidencia con los datos aquí mencionados. En Brasil, estos mosquitos se encontraron frecuentemente en los floreros de los cementerios (Londrina) y se los señaló como una especie con tendencia a la domiciliación.²⁸ Este culícido sería un competente vector experimental del virus amarílico (Flaviviridae: Flavivirus),²⁹ lo cual, sumado a sus hábitos urbanos, lo hace digno de ser tenido en cuenta a la hora de realizar una vigilancia entomológica.

En general, los mosquitos del género *Uranotaenia* han sido encontrados en cuerpos de agua como lagos, lagunas y charcos preferentemente cubiertos por vegetación. En este trabajo encontramos *U. iowii* en neumáticos y en una canaleta del interior de una vivienda, es decir, en criaderos artificiales, lo que coincide con otros autores, quienes colectaron un ejemplar de esta especie en un vaso de plástico conteniendo agua de lluvia.³⁰

El virus de la encefalitis de San Luis (ESL) (Flaviviridae: Flavivirus) fue aislado a partir de *Cx. quinquefasciatus* procedente de la provincia de Santa Fe y, además, demostró ser un vector

experimental competente de cepas de este virus tanto de los EE.UU. como de la Argentina.³¹ Durante el primer brote de encefalitis por virus ESL registrado en Córdoba, y en Sudamérica, durante el verano-otoño de 2005, *Cx. quinquefasciatus* habría sido el vector de dicho virus.³² Teniendo en cuenta el gran número de individuos tanto de *Ae. aegypti* como de *Cx. quinquefasciatus* colectados en este estudio, y que ambos mosquitos están implicados en la transmisión de arbovirus que afectan al hombre, las nuevas estrategias de control a implementar deberían involucrar la participación de la comunidad por cuanto ambas especies son domésticas y se pueden combatir simultáneamente. Es importante tener en cuenta las características de los criaderos y su abundancia, para diferentes áreas geográficas, así como la distribución espacial y temporal de los mosquitos, con el propósito de orientar mejor las acciones de control. Si los neumáticos resultaron importantes criaderos, en cuanto a abundancia y diversidad de mosquitos, el enfoque de las autoridades sanitarias hacia estos criaderos debería ser integral, abarcando medidas de eliminación, reciclado y destrucción. En Venezuela, desde el gobierno se fomenta el desarrollo de empresas locales de reciclado con lo cual se apunta a disminuir la cantidad de posibles criaderos de *Ae. aegypti*.³³ Un desafío importante a encarar es el cambio de actitud en la población, para evitar que en cada vivienda haya focos de proliferación de mosquitos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kerr JA, Camargo SD, Abedi ZH. Eradication of *Aedes aegypti* in Latin America. J Am Mosq Contr Assoc 1964; 24:276-282.
2. World Health Organization. Las condiciones de la salud en las Américas. Serie Inf Téc 1990; 1:152-174.
3. Campos RE. Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. (Diptera: Culicidae) en la localidad de Quilmes (Buenos Aires, Argentina). Rev Soc Entomol Argent 1993; 52:36.
4. Junín B, Grandinetti H, Marconi JM, Carcavallo RU. Vigilancia de *Aedes aegypti* (L.) en la ciudad de Buenos Aires. Entomol Vectores, 1995; 2:71-75.
5. Almirón WR. Culicidae (Diptera) de la provincia de Córdoba. Actualizaciones en Artrópodos Sanitaria Argentina. Serie Enfermedades Transmisibles. 2002; 2:97-106.
6. Sario HR, Botinelli OR, Ulon SN, Malich H. Situación actual de riesgo de la ciudad de Corrientes. Libro de resúmenes de las III Jornadas Internacionales de Enfermedades Transmisibles. Puerto Iguazú. Argentina, 1999; pág. 50.
7. Avilés G, Rangeon G, Baroni P, et al. Epidemia por virus dengue 2 en Salta, Argentina, 1998. Medicina (Buenos Aires) 2000; 60:875-879.
8. Avilés G, Paz MV, Rangeon G, et al. Laboratory surveillance of dengue in Argentina, 1995-2001. Emerging Infectious Diseases 2003; 9(6):738-742.
9. Blanco S, Martínez MV, Ripio C, Zaidemberg M. Dengue: prevención y control. Guía para municipios. Ministerio de Salud 2000; 22 pp.
10. Borda CE, Rea MFJ, Rosa JR, Mosqueda LA, Sario H. Vector de la fiebre amarilla urbana y el dengue en la ciudad de Corrientes, Argentina. Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Libro de comunicaciones, 1999; 3:127-129.
11. Rodhain F, Rosen L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. En: Gubler DJ y Kuno G (eds.). Dengue and dengue hemorrhagic fever. Ed University Press, Cambridge UK 1997; pp. 45-61.
12. Chiozza E, Figueira R. Atlas físico de la República Argentina. 1982; vol 1, págs. 76-79.
13. Lane J. Neotropical Culicidae. I & II. Ed Ind Graf Siqueira SA. San Pablo, Brasil. 1953; 1112 pp.
14. Forattini OP. Entomología médica. Vol. II. Culicini: *Culex*, *Aedes*, *Psorophora*. Ed. Univ. São Paulo, 1965; 506 pp.
15. Darsie RF. Mosquitoes of Argentina. Part I. Keys for identification of adult females and fourth stages larvae in english and spanish (Diptera, Culicidae). Mosq Syst 1985; 17(3):153-253.
16. Service MW. Mosquito ecology: Field sampling methods. 2nd. Edition, Elsevier Science Publishers, Essex 1993; 988 pp.
17. Schweigmann N, Vezzani D, Vera T, et al. Infestación domiciliar por formas inmaduras de *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. en un foco del partido de San Martín, provincia de Buenos Aires, Argentina. Otoño de 1996. Entomol Vectores, 1997; 4:185-190.
18. Stein M, Oria GI. Identificación de criaderos de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) y cálculo de índices de infestación en la provincia del Chaco. Actualizaciones en artrópodos sanitaria argentina. Serie Enfermedades transmisibles. Publ Monográfica 2. 2002; pp. 161-166.
19. Almirón WR, Ludueña Almeida FF. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Córdoba, Argentina. Rev Soc Entomol Argent 1998; 57:6-7.
20. López J. Ecología de mosquitos (Diptera: Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de área rural do Norte do Estado do Paraná, Brasil. V Colecta de larvas em recipientes artificiais instalados em mata ciliar. Rev Saúde Pública 1997; 31(4):370-377.
21. Souza Santos R. Fatores asociados à ocorrência de formas imaturas de *Aedes aegypti* na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 1999; 32(4):373-382.

22. Tun-Lin W, Kay BH, Barnes A. The premise condition index: a tool for streamlining surveys of *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg 1995; 53:591-594.
23. Focks DA, Sackett SR, Bailey DL, Dame DA. Observations on container breeding mosquitoes in New Orleans, Louisiana, with an estimate of population density of *Aedes aegypti* (L.). Am J Trop Med Hyg 1981; 30:1329-35.
24. Oria GI, Stein M, Gorodner JO. Mosquitos, sus criaderos y factores socioculturales de la población en el nordeste argentino. Actualizaciones en entomología sanitaria argentina. Serie Enfermedades Transmisibles. Publ Monográfica 2. 2002; pp. 167-172.
25. Bisset Lazcano JA, Marquetti MC, González B, Mendizanal ME, Navarro Ortega A. Algunos aspectos del nicho ecológico de *Aedes (S.) Aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) y *Culex (C.) quinquefasciatus* (Say, 1823) (Diptera: Culicidae) en el ambiente urbano. Revista Cubana de Medicina Tropical 1987; 39(2):113-118.
26. Almirón WR, Brewer ME. Classification of immature stage habitats of Culicidae (Diptera) collected in Córdoba, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 1996; 91(1):1-9.
27. Lestani EA, Stein M, Liotta DJ, et al. Estudios preliminares de diversidad de culicifauna en recipientes artificiales de la ciudad de Posadas. 2002; www.unne.edu.ar/web/cyt/cyt/2002/06-Biológicas/B-063.
28. Lopes J, Da Silva MAN, Borsato AM, De Oliveira VDRB, De A. Oliveira FJ. *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. e a culicidofauna asociada em área urbana da região sul, Brasil. Rev Saúde Pública 1993; 27(5):326-33.
29. Bejarano JFR. Complejo patógeno de la fiebre amarilla en América. Primeras Jornadas Entomoepidemiológicas Argentinas. Segunda Parte. 1959; pp. 652-702.
30. Lourenço de Oliveira R, Heiden R, Fernández da Silva T. Algunos aspectos da ecología dos mosquitos (Diptera: Culicidae) de uma área de planície (Granjeiras Calábria), em Jacarepaguá, Rio de Janeiro. V. Criadouros. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 1986; 81(3):265-271.
31. Mitchell JC, Monath TP, Sabbatini MS. Transmission of St. Louis encephalitis virus from Argentina by mosquitoes of the *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) complex. J Med Entomol 1980; 17(3):282-285.
32. Díaz L A, Ré V, Almirón WR, et al. St. Louis Encephalitis outbreak, Argentina 2005: genotype III, re-emergency. Emerging Infectious Diseases 2006; 12(11) (en prensa).
33. Barrera R, Navarro JC, Mora Rodríguez JD, Domínguez D, González García JE. Deficiencia en servicios públicos y cría de *Aedes aegypti* en Venezuela. Bol Oficina Sanit Panam 1995; 118(5):410-423.

PREDICCIÓN DE LA CANTIDAD DE CARBOHIDRATOS UTILIZADOS DURANTE EL EJERCICIO



Columnista Experta de SIIC
Dra. Maria Pia Francescato

Assistant professor. Human physiology - Nutrition., Udine, Italia

Introducción

Una de las mejores maneras de mantener la salud física es llevar un adecuado estilo de vida que incluya la práctica de ejercicios en forma regular. En pacientes con diabetes tipo 1, se considera demostrado que el ejercicio incrementa la sensibilidad a la insulina^{1,2} y que puede ser útil, junto con la dieta y la terapia con insulina, para alcanzar y mantener un mejor control metabólico.^{3,4} No obstante, la falta de regulación insulínica durante el ejercicio conduce a frecuentes desequilibrios metabólicos, lo que desalienta a los pacientes a realizar actividad física en forma regular.⁵ En la actualidad, se consideran estrategias empíricas para prevenir la hipoglucemia.^{3,6,7} Dichas estrategias incluyen la planificación del ejercicio, modificaciones en la dosis de insulina o el consumo extra de carbohidratos. Sin embargo, en varias circunstancias, el ejercicio surge de manera espontánea y la modificación de la dosis de insulina no puede planificarse e implementarse por anticipado. Esto determina una mayor importancia de la ingestión de glucosa adicional para prevenir la hipoglucemia.

Recientemente se estudió en detalle la relación entre la concentración de insulina, la cantidad de carbohidratos utilizados como combustible durante el ejercicio y la cantidad de carbohidratos adicionales necesarios para prevenir la aparición de hipoglucemia.⁸ En particular, hallamos que en pacientes con diabetes tipo 1 el porcentaje de carbohidratos empleado como combustible, que debe ser cubierto a través de la alimentación para evitar la hipoglucemia, disminuye en relación con el incremento de tiempo transcurrido desde la última inyección de insulina. Podría plantearse que la posibilidad de estimar la cantidad de carbohidratos oxidados durante el ejercicio puede determinar mejoría en los consejos dados a los pacientes para que se ejerciten en forma regular. Los ácidos grasos y los carbohidratos son los sustratos principales para la producción de energía en

el músculo esquelético durante el ejercicio aeróbico en seres humanos bien alimentados. Su contribución relativa a la producción total de energía es función de la intensidad del ejercicio.⁹⁻¹² A su vez, por debajo del umbral anaeróbico, tanto el consumo de oxígeno como la frecuencia cardíaca aumentan en forma lineal durante el ejercicio en función de la intensidad.¹³ Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que a partir del análisis cuantitativo de estas relaciones, es posible determinar la cantidad de glucosa oxidada durante el ejercicio por latido cardíaco, lo que definimos como "pulso de glucosa".

El objetivo del presente estudio fue verificar la posibilidad de emplear la frecuencia cardíaca para estimar la cantidad de glucosa oxidada durante el ejercicio en pacientes con diabetes tipo 1 así como en controles sanos apareados.

Métodos

Participantes

Dieron su consentimiento voluntario para participar en este estudio luego de ser informados respecto de su naturaleza, propósito y posibles riesgos, 15 pacientes con diabetes tipo 1 (9 hombres, 6 mujeres; hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}) $6 \pm 1.2\%$, valores de referencia 4%-6%)¹⁴ con edades comprendidas entre 18 y 45 años (promedio 38 ± 6 años) y 15 sujetos sanos (9 hombres, 6 mujeres; 34 ± 7 años). La duración de la diabetes fue de 17 ± 8 años y la dosis media de insulina fue de 0.52 ± 0.18 UI·kg⁻¹·día⁻¹. El peso corporal y la altura promedio fueron 71 ± 9 kg y 175 ± 9 cm en pacientes diabéticos frente a 70 ± 9 kg y 175 ± 8 cm en voluntarios sanos (índice de masa corporal [IMC] 23 ± 2 kg·m⁻² frente a 23 ± 2 kg·m⁻²).

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética local y realizado de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki.

Los criterios de inclusión comprendieron: ausencia de signos clínicos de complicaciones crónicas (tasa de excreción de albúmina, evaluación ocular, variabilidad de la frecuencia cardíaca con la respiración profunda, tasa de Valsalva y tasa de la prueba de inclinación [*tilt test*]), ausencia de otra medicación además de la insulina y automonitoreo para mantener un buen equilibrio metabólico.

Protocolo experimental

Veinticuatro horas antes del estudio y durante el día del experimento, los pacientes debían mantener su dieta y dosis de insulina habitual y registrar todos los valores de glucemia. De acuerdo con los hábitos de actividad referidos por los pacientes, éstos fueron clasificados como: "entrenados aeróbicamente" (8 pacientes, 7 sanos) los sujetos que realizaban ejercicios en forma regular al menos 30 minutos durante 3 días a la semana, o "sedentarios" (7 pacientes, 8 sanos) aquellos que se ejercitaban en forma ocasional. Todos los voluntarios debían evitar realizar ejercicios extenuantes antes y durante el día del estudio. Todas las sesiones del estudio fueron realizadas durante al menos 2 horas luego de comer.

Treinta minutos antes del inicio del ejercicio, se administró a los pacientes diabéticos una cantidad extra de carbohidratos (principalmente azúcar, gotas de azúcar o galletas), calculada de acuerdo con nuestra experiencia previa.⁸ Durante el ejercicio se administraron carbohidratos en forma adicional (aproximadamente 5 g cada vez) para prevenir la disminución de la glucemia por debajo de 6 mmol·l⁻¹. En promedio, se administró a los pacientes una cantidad total de 19.6 ± 11.6 g de carbohidratos antes o durante el estudio. No se administraron carbohidratos a los controles.

El experimento comprendió 4 ejercicios realizados en un cicloergómetro (Ergomed 839E, Monark, Vansbro, Suecia), cada uno de 10 minutos de duración (por una duración total del ejercicio de aproximadamente 40 minutos). Se aumentó la intensidad que correspondió con 0.7, 1.0, 1.5 y 2.0 W·kg⁻¹ de peso corporal y 0.7, 0.95, 1.25 y 1.75 W·kg⁻¹ de peso corporal en hombres y mujeres, respectivamente.

Cada 15 segundos se midió el consumo de oxígeno (VO₂min), la producción de dióxido de carbono (VCO₂min) y la frecuencia cardíaca (FC) mediante el empleo de una unidad metabólica (K4, Cosmed, Roma, Italia) en reposo y durante los últimos 5 minutos de cada intensidad de ejercicio¹⁵ que fueron promediados durante los últimos 2 minutos.

La glucemia fue evaluada antes del ejercicio y en intervalos de 5 minutos durante el ejercicio con tiras reactivas (Glucotrend, Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). Tres minutos después del final del estudio se tomó una muestra de sangre capilar para determinar las concentraciones de lactato mediante el empleo de tiras reactivas apropiadas (Accusport, Boeringher, Manheim, Alemania).

Cálculos

El cociente respiratorio, considerado equivalente a la tasa de intercambio respiratorio (TIR), fue calculado como la relación entre el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono.¹⁶ Se consideró que la utilización neta de proteínas no contribuyó en grado significativo a la producción de energía durante el ejercicio,¹³ por lo que las tasas de oxidación de la glucosa (GLU_{ox}) fueron calculadas mediante la aplicación de ecuaciones de uso frecuente.¹⁷ Para cada sujeto se calcularon las siguientes regresiones: i) frecuencia cardíaca frente a VO₂min, ii) VO₂min frente a TIR, iii) TIR frente a tasa de oxidación de la glucosa y, finalmente, iv) FC frente a GLU_{ox}. Para las dos últimas regresiones se descartaron los valores correspondientes a la mayor intensidad del ejercicio cuando la concentración sanguínea de lactato posejercicio excedía los 4 mmol(#183;l⁻¹, que fue considerado como umbral anaeróbico. Se calculó el pulso de glucosa, es decir, la relación entre GLU_{ox} expresada por unidad de peso corporal y la frecuencia cardíaca expresada como el porcentaje de la frecuencia cardíaca teórica máxima (FC_{máx} = 220 - edad).¹⁶

Análisis estadístico

Los datos fueron tratados de acuerdo con los métodos estadísticos estándar mediante el programa SPSS versión 6.1. Se aplicó el análisis de covarianza (ANCOVA) para investigar las diferencias entre los grupos con el objetivo de ajustar los resultados del análisis de varianza para las relaciones lineales entre la variable dependiente (tasa de oxidación de la glucosa) y la covariable (frecuencia cardíaca). Fue considerado estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. Los valores fueron expresados como media \pm desvío estándar (DE).

Resultados

Todas las relaciones ejemplificadas en la figura 1 (FC vs. VO₂min, VO₂min vs. TIR, TIR vs. GLU_{ox}, y FC vs. GLU_{ox}) resultaron estadísticamente significativas ($R > 0.90$, $p < 0.05$) en pacientes con diabetes tipo 1 y en sujetos controles sanos. La tabla I resume los parámetros individuales de la relación lineal entre GLU_{ox} y FC de acuerdo con el hábito de entrenamiento referido por los participantes.

Tabla I: Parámetros individuales de la relación entre la tasa de oxidación de la glucosa y la frecuencia cardíaca de pacientes insulino-dependientes y sujetos sanos.
 Hábito de entrenamiento: A = Entrenados aeróbicamente; S = Sedentarios

| Pacientes | | | | | Controles | | | | |
|-----------|---------------------------|------------------------|-------|-------------------------|-----------|---------------------------|------------------------|-------|-------------------------|
| Sujeto | Pendiente | Corte | R | Hábito de entrenamiento | Sujeto | Pendiente | Corte | R | Hábito de entrenamiento |
| | (g·latido ⁻¹) | (g·min ⁻¹) | | | | (g·latido ⁻¹) | (g·min ⁻¹) | | |
| D01 | 0.0410 | -2.866 | 0.994 | S | H01 | 0.0390 | -3.342 | 0.991 | S |
| D02 | 0.0190 | -1.556 | 0.972 | A | H02 | 0.0224 | -1.540 | 0.999 | S |
| D03 | 0.0280 | -1.656 | 0.992 | S | H03 | 0.0152 | -0.945 | 0.998 | S |
| D04 | 0.0166 | -1.190 | 1.000 | A | H04 | 0.0089 | -0.498 | 0.974 | A |
| D05 | 0.0245 | -1.725 | 0.999 | S | H05 | 0.0144 | -1.033 | 0.995 | A |
| D06 | 0.0249 | -2.215 | 0.998 | A | H06 | 0.0266 | -1.873 | 0.998 | S |
| D07 | 0.0246 | -2.139 | 0.989 | A | H07 | 0.0257 | -1.653 | 0.998 | S |
| D08 | 0.0405 | -3.061 | 0.994 | S | H08 | 0.0328 | -1.976 | 0.990 | S |
| D09 | 0.0256 | -1.454 | 1.000 | S | H09 | 0.0132 | -0.655 | 0.980 | A |
| D10 | 0.0134 | -1.063 | 0.984 | A | H10 | 0.0344 | -2.606 | 0.997 | S |
| D11 | 0.0303 | -2.093 | 0.999 | S | H11 | 0.0143 | -0.853 | 0.998 | A |
| D12 | 0.0297 | -1.612 | 0.996 | S | H12 | 0.0210 | -1.162 | 0.998 | A |
| D13 | 0.0219 | -1.810 | 0.964 | A | H13 | 0.0221 | -1.442 | 0.997 | A |
| D14 | 0.0121 | -0.868 | 0.951 | A | H14 | 0.0231 | -1.509 | 0.995 | S |
| D15 | 0.0179 | -1.262 | 0.982 | A | H15 | 0.0207 | -1.542 | 1.000 | A |

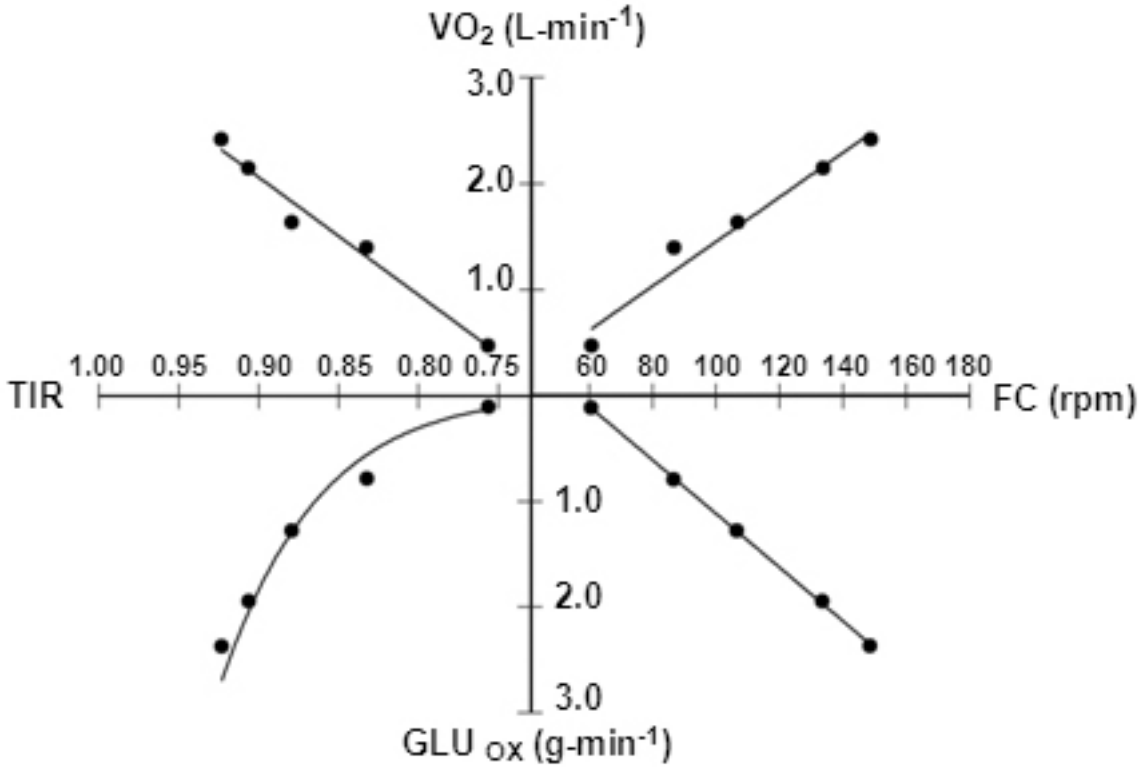


Figura 1. Panel superior derecho: consumo de oxígeno (VO_2 , l·min⁻¹) vs. frecuencia cardíaca (FC, lpm). Panel superior izquierdo: VO_2 vs. tasa de intercambio respiratorio (TIR). Panel inferior izquierdo: TIR vs. tasa de oxidación de la glucosa (GLU_{ox} , g·min⁻¹). Panel inferior derecho: frecuencia cardíaca vs. GLU_{ox} .

En la figura 2, la GLU_{ox} expresada por unidad de peso corporal es graficada en función del porcentaje de la frecuencia cardíaca teórica máxima (panel A). No se hallaron diferencias significativas para la GLU_{ox} entre hombres y mujeres (ANCOVA, efecto del sexo, $F = 0.07$, $p =$ no significativa [NS]) o entre los pacientes y los sujetos sanos (ANCOVA, efecto de grupo, $F = 0.06$, $p =$ NS), mientras que los hábitos de entrenamiento referidos por los participantes tuvieron un efecto significativo (ANCOVA, efecto del entrenamiento, $F = 9.3$, $p < 0.005$). El Panel B de la misma figura muestra la GLU_{ox} de los pacientes diabéticos de acuerdo con sus hábitos de entrenamiento. Se observaron diferencias significativas entre las dos relaciones parciales (ANCOVA, efecto del entrenamiento, $F = 108$, $p < 0.001$), y los pacientes sedentarios mostraron mayores tasas de oxidación de glucosa. Puede describirse la GLU_{ox} expresada como $mg \cdot min^{-1}$ por unidad de masa corporal mediante las siguientes ecuaciones:

$$GLU_{ox} = 0.504 (\pm 0.268) \cdot \%FC_{m\acute{a}x} - 22.11 (\pm 17.50)$$

$$GLU_{ox} = 0.679 (\pm 0.322) \cdot \%FC_{m\acute{a}x} - 22.05 (\pm 18.68)$$

para pacientes entrenados ($n = 36$; $R = 0.888$), para pacientes sedentarios ($n = 29$; $R = 0.909$). Ambas resultaron altamente significativas ($F > 127$, $p < 0.001$ en ambos casos).

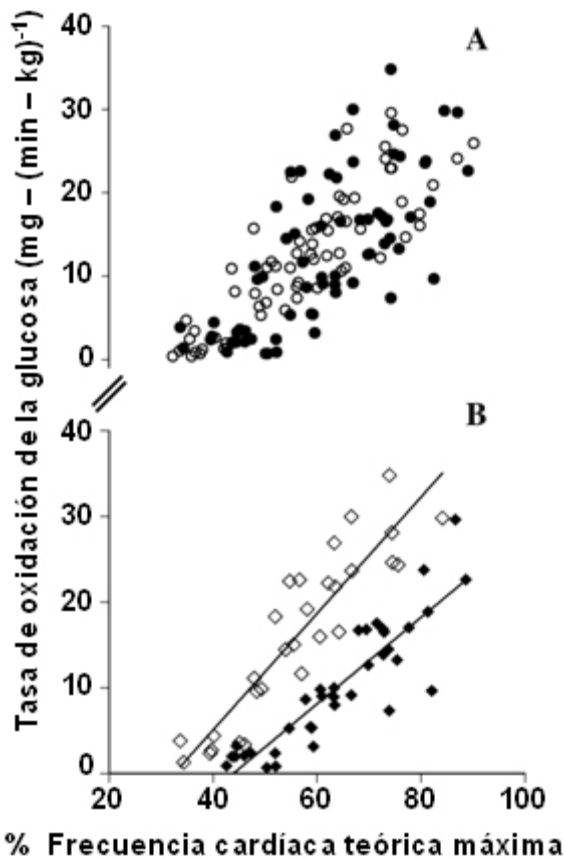


Figura 2. *Panel A.* Tasa de oxidación de la glucosa ($\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) de pacientes con diabetes tipo 1 (círculos negros) y sujetos sanos (círculos blancos) en función del porcentaje de frecuencia cardíaca máxima teórica. *Panel B.* La tasa de oxidación de la glucosa ($\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$) de los pacientes con diabetes tipo 1 entrenados aeróbicamente (rombos negros) es inferior en comparación con la de los pacientes sedentarios (rombos blancos). Ambas presentan correlación lineal con el porcentaje de frecuencia cardíaca máxima teórica (para los detalles, véase el texto).

Discusión

Un incremento de la intensidad del ejercicio se asocia con aumento global de la oxidación de la glucosa,¹⁰ mientras que la oxidación de ácidos grasos es mayor durante el ejercicio de intensidad leve a moderada.¹¹ El concepto del "cruce", introducido por Brooks y col.,¹⁸ define la intensidad de trabajo sobre la cual la energía derivada de la oxidación de la glucosa predomina sobre la derivada de la oxidación de ácidos grasos. Recientemente se confirmaron mediante técnicas isotópicas los efectos del incremento de la intensidad del ejercicio sobre el empleo de combustibles por el músculo.¹⁹ Se observó menor dependencia del empleo de carbohidratos durante el ejercicio luego del entrenamiento de resistencia,²⁰ con un aumento concomitante de la oxidación de ácidos grasos.^{9,21,22} Se estudió la interacción entre la oxidación de los lípidos y de la glucosa aun cuando las condiciones metabólicas de los voluntarios fueron modificadas mediante la infusión de soluciones lipídicas^{23,24} o por la administración de carbohidratos antes del ejercicio.^{25,26} Además, como los carbohidratos parecen tener un efecto ergogénico, se realizaron múltiples investigaciones acerca de los efectos sobre el rendimiento de la administración de estos compuestos antes o durante el ejercicio.²⁷⁻³¹

Los resultados del presente estudio confirman y amplían estudios previos y demuestran que es posible estimar la GLU_{ox} a partir de la frecuencia cardíaca. Los coeficientes de correlación entre la frecuencia cardíaca y la GLU_{ox} resultaron superiores a 0.95 en todos los voluntarios, tanto sanos como con diabetes tipo 1. Esto señala una correlación altamente significativa entre ambas variables. Esta relación es la base del concepto del "pulso de glucosa", definido como la tasa de oxidación de la glucosa expresada por unidad de frecuencia cardíaca. La validez del pulso de glucosa no debería extenderse más allá de la frecuencia cardíaca más elevada hasta la cual puede

estimarse la tasa de oxidación de la glucosa mediante calorimetría indirecta.

De hecho, las ecuaciones estequiométricas empleadas para estimar la tasa de oxidación de la glucosa mediante calorimetría indirecta se basan en la presunción de que todo el VO_2min y el VCO_2min se originan de la oxidación completa de glucosa y ácidos grasos.

Sin embargo, mientras que el VO_2min refleja en forma precisa la captación tisular de oxígeno, el VCO_2min es una estimación confiable de la producción tisular de CO_2 sólo en presencia de un *pool* estable de bicarbonato. De hecho, durante el ejercicio anaeróbico, los iones de hidrógeno libres liberados durante la glucólisis son tamponados por el bicarbonato para formar ácido carbónico, que, a su vez, es convertido en H_2O y CO_2 , con incremento de los niveles pulmonares de VO_2min . La glucólisis aumentada puede potencialmente provocar sobreestimación de la tasa de oxidación de la glucosa.

No obstante, Romijn y col. evaluaron la validez de la calorimetría indirecta a niveles elevados de intensidad³² mediante la comparación entre los valores estimados con un método isotópico en el aliento, que calcula la oxidación de grasas y carbohidratos en forma independiente de las mediciones de VCO_2min . Estos autores muestran que las tasas de oxidación de la glucosa y de los lípidos no fueron significativamente diferentes entre ambos métodos hasta 80%-85% del VO_2min máximo, que es cercano a las intensidades más elevadas investigadas en el presente estudio.

Además, en el presente trabajo, los valores correspondientes a la intensidad de ejercicio más elevada no fueron considerados cuando el nivel de lactato posejercicio excediera $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Por tanto, confiamos en que el pulso de glucosa calculado constituye una estimación razonable del verdadero valor de oxidación de la glucosa por latido cardíaco.

Los combustibles de elección para el ejercicio dependen del intervalo de tiempo transcurrido desde la última comida, lo que puede tener influencia sobre la tasa de oxidación de la glucosa determinada por el método de pulso de glucosa.

Sin embargo, se demostró que un intervalo de tiempo prolongado entre la última comida (8 a 12 hs de ayuno) se asocia con una menor tasa de oxidación de la glucosa durante el ejercicio, mientras que no se observaron diferencias significativas hasta 6 horas de ayuno.³³ Esta observación tiene mucha importancia en particular en pacientes insulino-dependientes, debido a que éstos suelen requerir una colación con carbohidratos entre dos comidas consecutivas para evitar episodios de hipoglucemia.

En pacientes con diabetes tipo 1 no obesos, sin neuropatía autonómica, las ecuaciones presentadas en este trabajo pueden ser utilizadas para calcular la GLU_{ox} durante el ejercicio a partir de la frecuencia cardíaca, fácilmente medible.

Para prevenir la hipoglucemia relacionada con el ejercicio, un porcentaje de la cantidad total de glucosa oxidada durante el ejercicio –que debe ser aportada por los alimentos– presenta relación lineal con la concentración de insulina.⁸

A partir de esto y de las relaciones entre la frecuencia cardíaca y la tasa de oxidación de la glucosa, nosotros diseñamos un software específico (ECRES, *Exercise Carbohydrate Requirement Estimating Software*)³⁴ para que los pacientes puedan estimar la cantidad de carbohidratos necesarios para prevenir la hipoglucemia inducida por el ejercicio, siempre y cuando se conozcan la terapia habitual, los hábitos de entrenamiento y las características del ejercicio propiamente dicho.

En conclusión, en pacientes con diabetes tipo 1 no obesos sin neuropatía autonómica, el “pulso de glucosa” definido como la tasa de oxidación de la glucosa expresada por unidad de frecuencia cardíaca podría ser una herramienta útil para calcular la cantidad de carbohidratos de la dieta necesarios para evitar la hipoglucemia durante el ejercicio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stallknecht B, Larsen JJ, Mikines KJ, Simonsen L, Bulow J, Galbo H. Effect of training on insulin sensitivity of glucose uptake and lipolysis in human adipose tissue. *Am J Physiol* 2000; 279:E376-E385.
2. Landt K, Campaigne B, James F, Sperling M. Effect of exercise training on insulin sensitivity in adolescents with Type I diabetes. *Diabetes Care* 1985; 8:461-465.
3. American Diabetes Association. Diabetes Mellitus and Exercise. *Diabetes Care* 1997; 20:1908-1912.
4. Rowland T, Swabda LA, Biggs DE, Burke EJ, Reiter EO. Glycemic control with physical training in insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Dis Child* 1985; 139:307-310.
5. MacDonald MJ. Postexercise late-onset hypoglycemia in insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care* 1987;

10:584-588.

6. Kemmer FW. Prevention of hypoglycemia during exercise in type I diabetes. *Diabetes Care* 1992; 15:1732-1735.
7. Landry GL, Allen DB. Diabetes mellitus and exercise. *Clin Sport Med* 1992; 11:403-418.
8. Francescato MP, Geat M, Fusi S, Stupar G, Noacco C, Cattin L. Carbohydrate requirement and insulin concentration during moderate exercise in type 1 diabetic patients. *Metabolism* 2004; 53:1126-1130.
9. Bergman BC, Brooks GA. Respiratory gas-exchange ratios during graded exercise in fed and fasted trained and untrained men. *J Appl Physiol* 1999; 86:479-487.
10. Pirnay F, Crielaard JM, Pallikarakis N, et al. Fate of exogenous glucose during exercise of different intensities in humans. *J Appl Physiol* 1982; 53:1620-1624.
11. Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, et al. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol* 1993; 265:E380-E391.
12. Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Rosenblatt J, Wolfe RR. Substrate metabolism during different exercise intensities in endurance-trained women. *J Appl Physiol* 2000; 88:1707-1714.
13. Astrand PO, Rodahl K, Dahl HA, Stromme SB. *Textbook of work physiology. Physiological bases of exercise.* McGraw Hill Series in Health Education, Physical Education and Recreation. Fourth Edition. 2003, Windsor (Canada): Human Kinetics.
14. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002; 48:436-472.
15. Hauswirth C, Bigard A, Le Chevalier J. The Cosmed K4 telemetry system as an accurate device for oxygen uptake measurements during exercise. *Int J Sports Med* 1997; 18:449-453.
16. McArdle WD, Katch FI, Katch VL. *Essentials of Exercise Physiology.* 2nd ed. 2000, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
17. Frayn KN. Calculation of substrate oxidation rates in vivo from gaseous exchange. *J Appl Physiol* 1983; 55:628-634.
18. Brooks GA, Mercier J. Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: the "crossover" concept. *J Appl Physiol* 1994; 76:2253-2261.
19. Van Loon LJC, Greenhaff PL, Constantin-Teodosiu D, Saris WHM, Wagenmakers AJM. The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. *J Physiol (Lond)* 2001; 536:295-304.
20. Coggan AR, Kohrt WM, Spina RJ, Bier DM, Holloszy JO. Endurance training decreases plasma glucose turnover and oxidation during moderate-intensity exercise in men. *J Appl Physiol* 1990; 68:990-996.
21. Turcotte LP, Richter EA, Kiens B. Increased plasma FFA uptake and oxidation during prolonged exercise in trained vs. untrained humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1992; 262:E791-E799.
22. Hurley BF, Nemeth PM, Martin III WH, Hagberg JM, Dalsky GP, Holloszy JO. Muscle triglyceride utilization during exercise: effect of training. *J Appl Physiol* 1986; 60:562-567.
23. Matzinger O, Schneiter P, Tappy L. Effect of fatty acids on exercise plus insulin-induced glucose utilization in trained and sedentary subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282:E125-E131.
24. Ravussin E, Bogardus C, Scheidegger K, Lagrange B, Horton ED, Horton ES. Effect of elevated FFA on carbohydrate and lipid oxidation during prolonged exercise in humans. *J Appl Physiol* 1986; 60:893-900.
25. Achten J, Jeukendrup AE. The effect of pre-exercise carbohydrate feedings on the intensity that elicits maximal fat oxidation. *J Sports Sci* 2003; 21:1017-1024.
26. Coyle EF, Jeukendrup AE, Wagenmakers AJM, Saris WHM. Fatty acid oxidation is directly regulated by carbohydrate metabolism during exercise. *Am J Physiol* 1997; 273:E268-275.
27. McConell GK, Canny BJ, Daddo MC, Nance MJ, Snow RJ. Effect of carbohydrate ingestion on glucose kinetics and muscle metabolism during intense endurance exercise. *J Appl Physiol* 2000; 89:1690-1698.
28. Jeukendrup AE, Raben A, Gijsen A, et al. Glucose kinetics during prolonged exercise in highly trained human subjects: effect of glucose ingestion. *J Physiol (Lond)* 1999; 515:579-589.
29. Caron A, Lavoie C, Péronnet F, Hillaire-Marcel C, Massicotte D. Oxidation of ¹³C glucose ingested before and/or during prolonged exercise. *Eur J Appl Physiol* 2004; 91:217-223.
30. Utter AC, Kang J, Nieman DC, et al. Carbohydrate supplementation and perceived exertion during prolonged running. *Med Sci Sport Exer* 2004; 36:1036-1041.
31. Jeukendrup AE. Carbohydrate intake during exercise and performance. *Nutrition* 2004; 20:669-677.
32. Romijn JA, Coyle EF, Hibbert J, Wolfe RR. Comparison of indirect calorimetry and a new breath ¹³C/¹²C ratio method during strenuous exercise. *Am J Physiol* 1992; 263:64-71.
33. Montain SJ, HopperMK, Coggan AR, Coyle EF. Exercise metabolism at different time intervals after a meal. *J Appl Physiol* 1991; 70:882-888.
34. Francescato MP, Geat M, Tosoratti E, Noacco C. ECRES, a software to prevent the exercise induced hypoglycaemia in type 1 diabetic patients: preliminary results. In: *Book of Abstracts. 11th annual Congress of the European College of Sport Science.* 5-8 July 2006, Lausanne (Switzerland).