

Ruiz, Luciana Mabel

Análisis Probit en el estudio de la actividad letal de los insecticidas metopreno y el sinergista butóxido de piperonilo en *Triatoma infestans*.

2021

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución – no comercial – sin obra derivada 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Ruiz, L. M. (2021) *Análisis Probit en el estudio de la actividad letal de los insecticidas metopreno y el sinergista butóxido de piperonilo en Triatoma infestans*. [tesis de grado Universidad Nacional Arturo Jauretche]

Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ <https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>



Análisis Probit en el estudio de la actividad letal de los insecticidas metopreno y el sinergista butóxido de piperonilo en *Triatoma infestans*.

Autor: Ruiz Luciana Mabel

Trabajo final para la obtención del título de Bioquímico

Director del trabajo: Dadé, Martin

Universidad Nacional Arturo Jauretche
Instituto de Ciencias de la Salud
Argentina 2021

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN, pag.3

1.1.1 La enfermedad de Chagas, **pag.3**

1.1.2 *Triatoma infestans* y su rol como vector, **pag.6**

1.2.1 El control vectorial con insecticidas piretroides, **pag.8**

1.2.2 Insecticidas, **pag.10**

1.2.3 Metopreno: mecanismo de acción, **pag.13**

1.2.4 Butóxido de piperonilo: mecanismo de acción, **pag.13**

1.3.1 Resistencia a insecticida, **pag.14**

1.3.2 Mecanismo de resistencia, **pág. 16**

1.3.2.1 Penetración reducida, **pag.16**

1.3.2.2 Detoxificación enzimática incrementada, **pag.16**

1.3.2.3 Modificación del sitio blanco, **pag.17**

1.4 Importancia de la curva dosis-respuesta, **pag.18**

2. OBJETIVOS, pag.20

3. DESARROLLO Y RESULTADOS, pag.21

3.2 Acondicionamiento y cría de los triatominos, **pag.21**

3.2 Determinación de la susceptibilidad a metopreno en ninfas de *T. infestans*, **pag.21**

3.3 Determinación del efecto sinérgico del PBO en la actividad triatomicida del metopreno y deltametrina, **pag, 22**

3.4 Estudio estadístico, **pag.22**

4. DISCUSIÓN, pag.28

INTRODUCCIÓN

1.1.1 La enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es endémica en 21 países del continente americano y está ocasionada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (OMS, 2019). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), actualmente existen entre 7 y 8 millones de infectados por *T. cruzi* y 65 millones de personas en riesgo de contraer el parásito. La cantidad de muertes anuales a causa de la enfermedad asciende a 20.000 (OMS, 2019). Más allá que la mayor cantidad de pacientes chagásicos se encuentran en países en donde la enfermedad es endémica, debido a la dinámica fluctuante de la economía mundial, que ocasiona importantes flujos migratorios en la población, la enfermedad de Chagas se ha convertido en un asunto prioritario en países en donde hasta hace unos escasos años no era detectada; por ejemplo, en España existen en la actualidad 55.000 personas portadoras del parásito (OMS, 2019).

Si bien es difícil determinar los límites de cada una de las distintas etapas de la Enfermedad de Chagas, se pueden mencionar las siguientes:

- **FASE AGUDA**, comienza cuando el parásito ingresa al hospedador. Tiene un período de incubación de 10-12 días. Se pueden desarrollar síntomas como el complejo oftalmo-ganglionar, denominado también Signo de Romaña o del ojo en compota.
- **FASE INTERMEDIA**, durante la cual se registra en la mayoría de los casos una disminución en la parasitemia, seguida de la atenuación e incluso de la involución de los síntomas observados durante la fase aguda.
- **FASE CRÓNICA**, se manifiestan las lesiones definitivas cardíacas: miocardiopatía chagásica crónica, que puede presentarse con arritmias, bloqueos, insuficiencia cardíaca o ser oligosintomática (Storino, 2010).

La mayoría de los pacientes infectados parecen saludables y no es posible detectar el daño de órganos a través de los métodos de diagnóstico clínico estándar, sino que es necesario recurrir a serología o pruebas parasitológicas para detectar la infección. Esta condición de la fase crónica de la enfermedad de Chagas se llama forma indeterminada y en la mayoría de los

pacientes persiste por tiempo indefinido. Sin embargo, varios años después de que haya comenzado la fase crónica (que dura por el resto de la vida), el 10-40% de las personas infectadas dependiendo de la zona geográfica, desarrolla lesiones en varios órganos, principalmente el corazón y el sistema digestivo. Esta condición se conoce como la forma cardíaca o digestiva de la fase crónica (Storino, 2010).

El *T. cruzi* es un protista (protozoo) de la clase *Kinetoplastea*, familia *Trypanosomatidae*. Es un parásito intracelular con un ciclo de vida heteroxénico que involucra vertebrados e invertebrados. Presenta cuatro formas distintas de involucion: *amastigota*, *promastigota*, *epimastigota* y *trypomastigota*. (Figura 1).

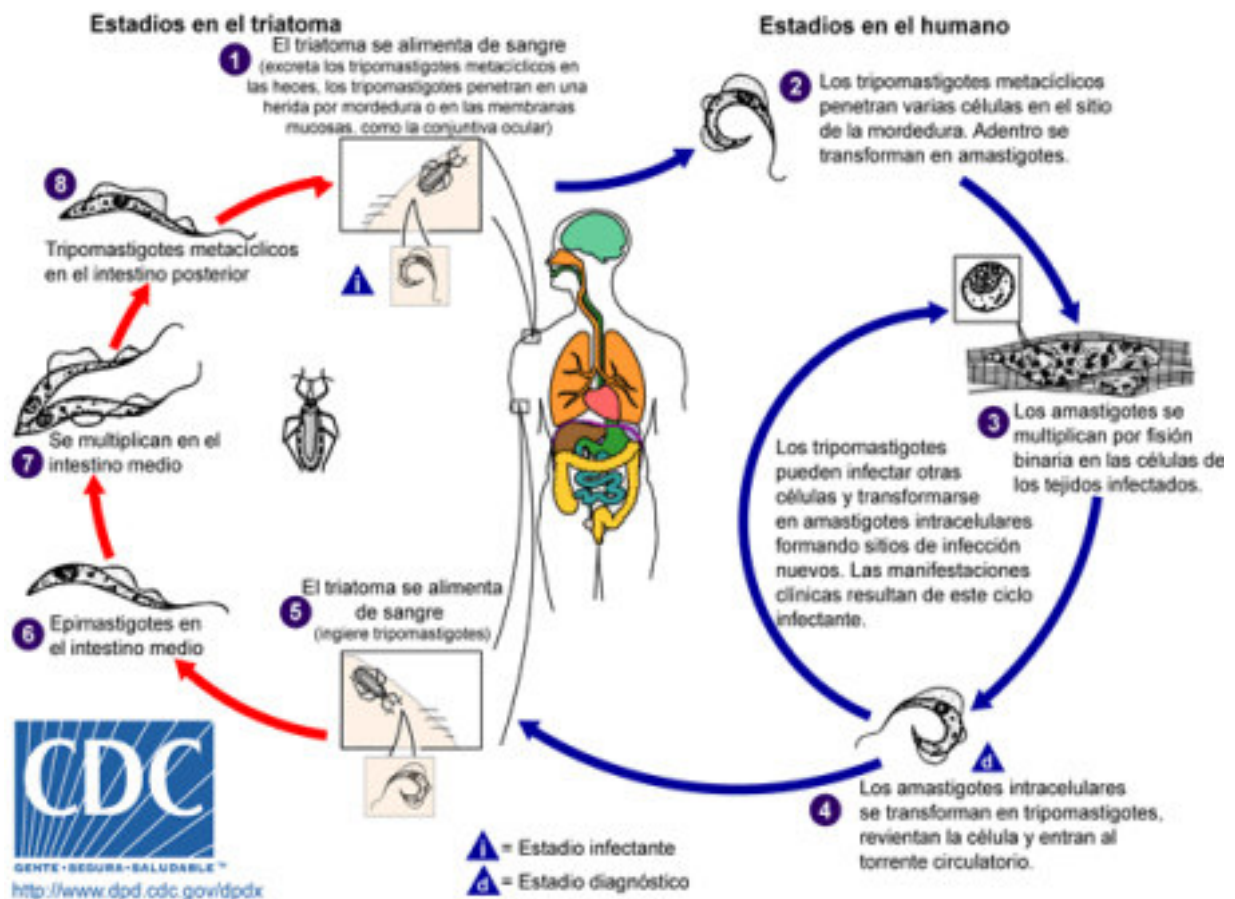


Figura 1. Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida comprende dos etapas:

- **Etapas en el ser humano:** El ciclo se inicia cuando el insecto hematofago infectado pica

a un ser humano o animal y defeca (1)

- **Etapa en el insecto o triatominos:** Cuando el insecto pica a un hospedador infectado, algunos *tripomastigotas* pasan a él a través de la sangre (5).

La infección se transmite de los reservorios, que tienen los tripomastigotes circulares, a los humanos a través de insectos triatominos hematófagos, en los cuales el parásito se multiplica y es eliminado. Los tripanomas que se encuentran en estas deyecciones penetran por el punto de la picadura (Brener, 1979).

Cuando el parásito comienza a circular en la sangre, los macrofagos los fagocitan y en su interior se transforman en *amastigotes*. También se localizan intracelularmente dentro de las fibras musculares, incluyendo el miocardio, en donde forman pseudoquistes. Los parásitos alteran las fibras musculares y comprometen la conducción nerviosa del corazón. Los daños en las vísceras huecas, como esófago y colon, llevan a dilataciones e hipertrofia de estos órganos (Storino, 2010).

Las principales vías de transmisión del parásito son la vectorial, congénita, por transfusión de sangre, trasplante de órganos, oral y por accidentes con elementos contaminados con el parásito (Figura 2).

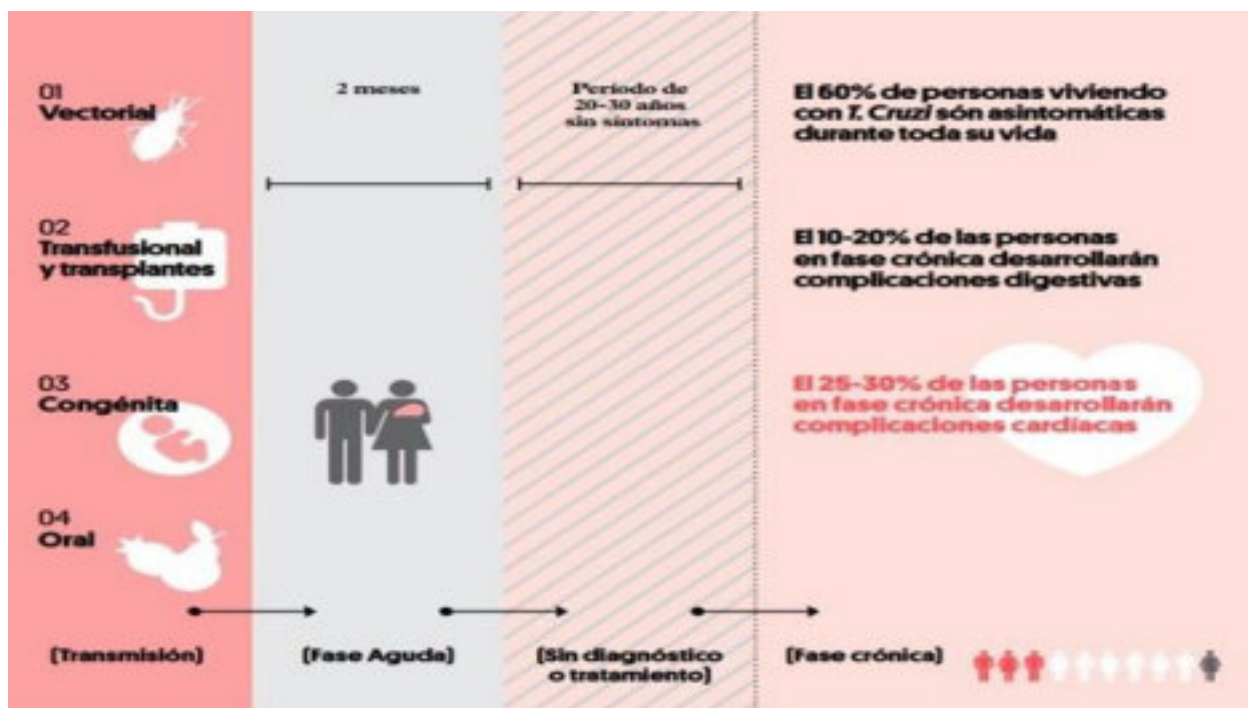


Figura 2. Principales vías de transmisión del parásito *Trypanosoma cruzi*.

En las zonas endémicas de la enfermedad, la vía vectorial es la de mayor preponderancia de infección. En América Latina, cada año se registran 30.000 nuevas

infecciones causadas por la transmisión vectorial. Cabe destacar, que el 31% de estas infecciones se registran en Argentina y Bolivia (OPS, 2018).

1.1.2. *Triatoma infestans* y su rol como vector

El principal vector de *T. cruzi* en el Cono Sur es *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), una chinche hematófaga obligada que se encuentra adaptada a hábitats domésticos y peridomésticos a lo largo de su área de distribución (Schofield, 1988), aunque también existen registros de poblaciones silvestres (Noireau y col., 2005).

Es un insecto hemimetábolo que presenta cinco estadios ninfales que comparten el hábito alimentario de los adultos (Figura 3).

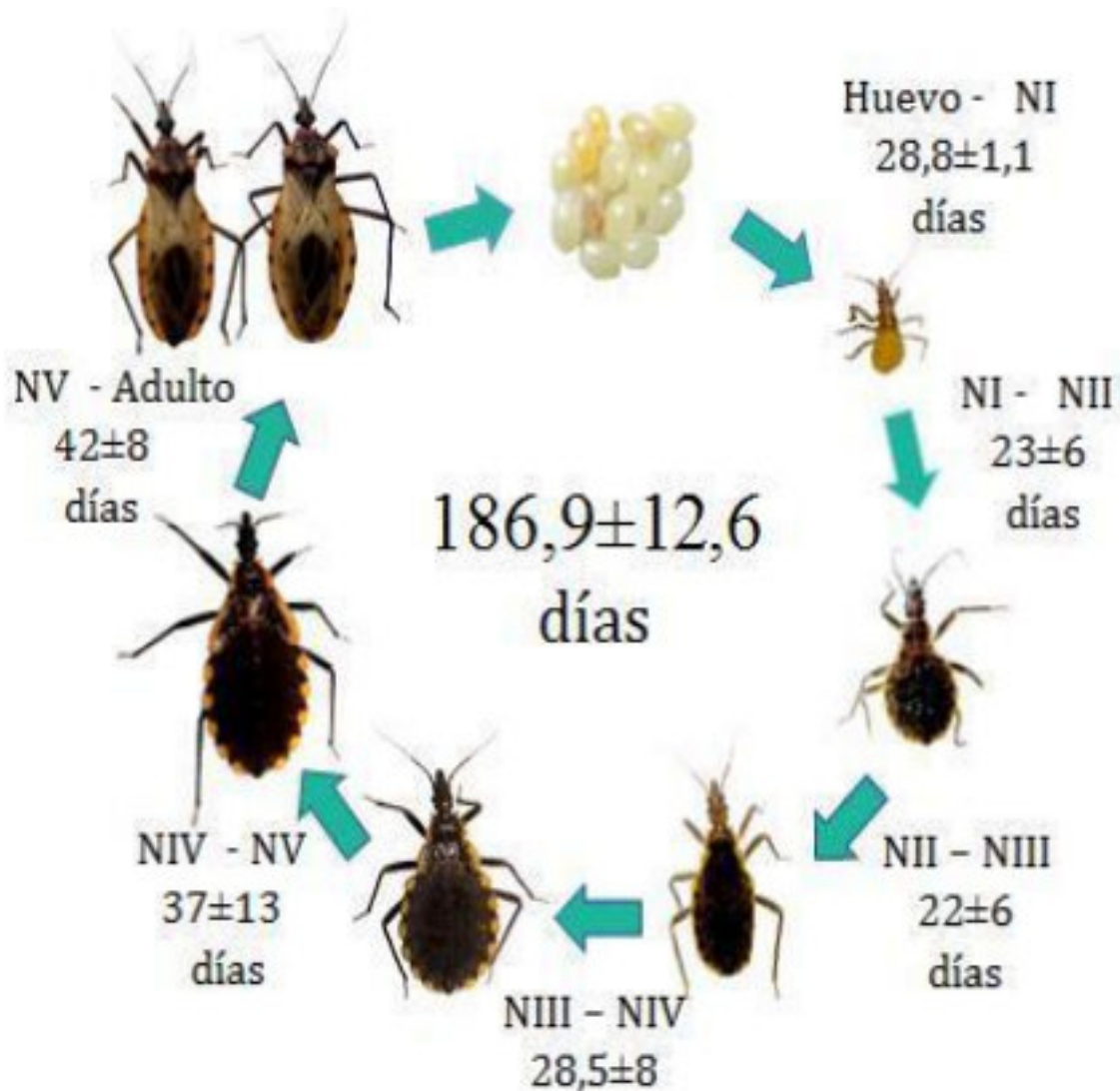


Figura 3. Ciclo de vida de *T. infestans*

Dicha característica actúa como factor determinante en el éxito de *T. infestans* como

vector de *T. cruzi*, ya que el total de la población de insectos está involucrado en el ciclo de transmisión.

Por otra parte, cada estadio ninfal necesita de solo una comida a repleción para estimular la muda, aunque la mayoría de las veces toman varias comidas más pequeñas, dado que son fácilmente interrumpidos por los huéspedes (Schofield 1994). Si bien todos los estadios de esta especie presentan hábito hematófago, existen estudios que indican que la preferencia alimentaria es variable con el estadio y el sitio de refugio. De hecho, los estudios realizados por Wisnivesky Colli y col., (1982) concluyeron que el contenido gástrico de los insectos hallados en dormitorios correspondía en mayor medida a sangre de perro, y en menor a la de humano.

Además, se detectó que las ninfas se alimentaban de perro más frecuentemente que los adultos. Por el contrario, los insectos cuyo refugio radica en el peridomicilio se alimentaron más frecuentemente de animales de cría como las cabras y gallinas. Estos estudios indicaron que los insectos de los dormitorios presentan mayor infección con *T. cruzi* que los de peridomicilios. Gürtler y col., (2005, 2007)

En trabajos previos llevados a cabo con el objetivo de determinar el rol de las mascotas en la dinámica de la enfermedad, se estableció que los perros representan un importante reservorio para la transmisión del parásito al humano. Además, la preferencia alimentaria de *T. infestans* varió entre las estaciones del año, alimentándose preferentemente de perros y gallinas en las estaciones cálidas, y de humanos en la estación fría (Gürtler y col. 1997).

Otro aspecto de la biología de *T. infestans* que lo define como un vector relevante de *T. cruzi* es su hábito nocturno. Los ciclos de actividad locomotora en esta especie se presentan al inicio de la noche y del día, y pueden estar relacionados con la búsqueda de un huésped y con el retorno al refugio, respectivamente (Lazzari 1992). En particular, la sensibilidad al dióxido de carbono es mayor durante las primeras horas de la noche, lo que sugiere que en este período se concentra la búsqueda de huésped para la alimentación (Barrozo y col. 2004). Esta información indica que *T. infestans* se alimenta fundamentalmente durante la noche, cuando sus huéspedes están en horas de descanso, reposo y por lo tanto indefensos. Su acercamiento sigiloso al huésped garantiza que pueda alimentarse a repleción y escapar, incluso teniendo un tamaño muy grande en su estadio adulto y llegando a picar en zonas de la cara (Lehane 1991). El rascado instintivo sobre la herida producida por la picadura permite el ingreso del parásito desde las heces de la vinchuca al torrente sanguíneo del huésped, manteniendo el ciclo de

transmisión activo (Figura 4).

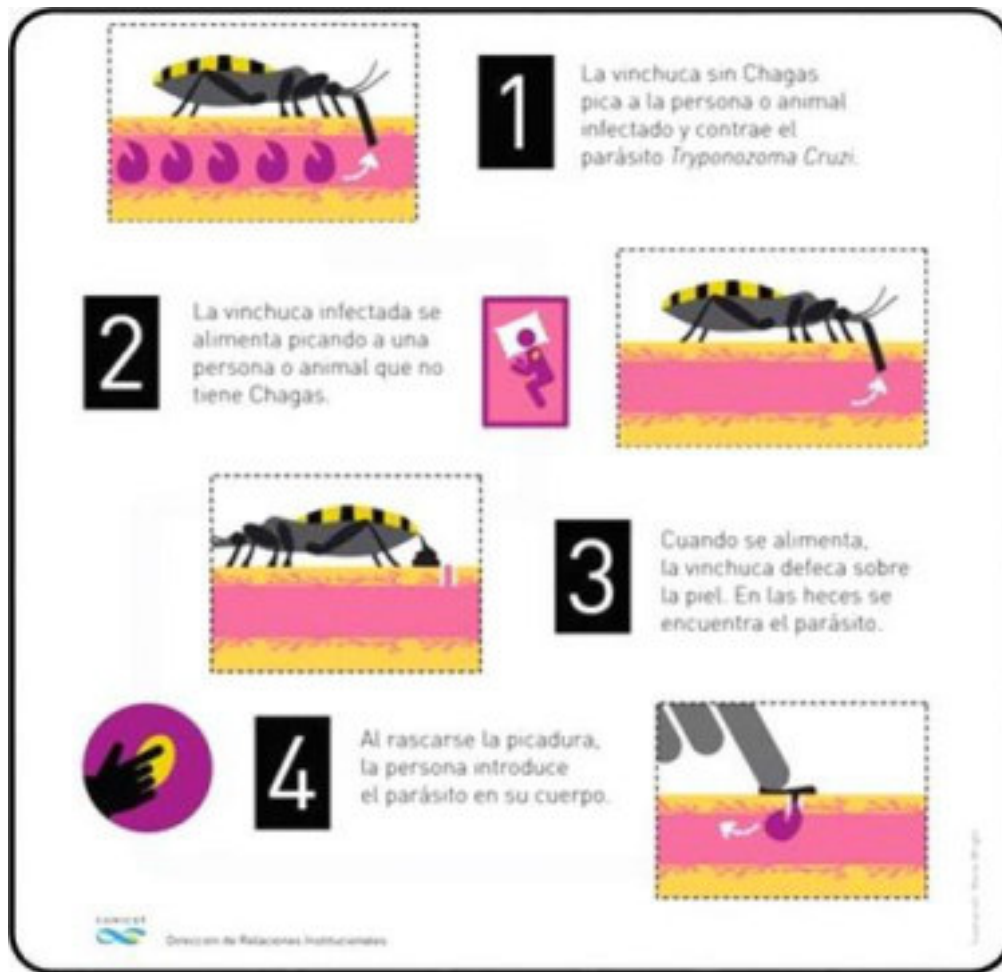


Figura 4. Ingreso del parásito desde las heces de la vinchuca

En relación a la dispersión del vector, en algunas regiones las poblaciones silvestres de *T. infestans* se encuentran en las proximidades de las áreas habitadas por seres humanos. Los vectores adultos (alados) pueden transmitir la enfermedad al entrar en contacto directo con las personas o sus alimentos e incluso pueden infestar las viviendas y establecer colonias de cría (Abad Franch 2009).

1.2.1 El control vectorial con insecticidas piretroides

Dado que no se conoce cura o vacuna para la enfermedad de Chagas, el control vectorial representa la herramienta de mayor importancia para el manejo de la patología en las zonas endémicas. Los primeros intentos de eliminar a *T. infestans* incluyeron el uso de kerosene, soda cáustica o agua hirviendo sobre las paredes de los domicilios infestados (Dias y Schofield 1999). Sin embargo, las medidas de control sistemático no comenzaron sino hasta principios de la década de 1940. Durante esta década y la siguiente, el DDT resultaba

sumamente exitoso para el manejo de los insectos de importancia médica, como los mosquitos transmisores de la malaria, y fue rápidamente adoptado para el control de los triatominos. Este compuesto posee en realidad un bajo efecto triatomicida, y representó el primer fracaso de control químico de *T. infestans* (Zerba 1999, Dias y col., 2002). Se introdujo entonces el uso de otros insecticidas organoclorados y se obtuvieron buenos resultados con el hexaclorociclohexano (HCH), cuyo isómero activo es el gamma (lindane), y con el dieldrin. A pesar de su efectividad, su alta estabilidad química y su potencial riesgo toxicológico y ecotoxicológico llevaron a su paulatino reemplazo por otros compuestos químicos con características más favorables (Dias y Schofield 1999).

Durante la década de 1970, los insecticidas fosforados como el fenitrotión y el malatión, y los carbamatos como el propoxur, fueron ampliamente utilizados para el control de los vectores de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica, debido a ser menos persistentes y no bioacumulables (Zerba 1999).

Durante la década de 1980, los insecticidas piretroides ingresaron al mercado (Casida y Quistad 1995). Desde su primera introducción al control de triatominos, estos compuestos demostraron poseer alta efectividad triatomicida, bajo riesgo ecológico y baja toxicidad para los mamíferos. Fueron además fácilmente aceptados por los pobladores de las áreas rociadas, ya que son inodoros y no dejan manchas en las paredes de las viviendas (Dias y Schofield 1999). Por otra parte, si bien estos compuestos son costosos, las bajas dosis necesarias para el control de los insectos hacen que su utilización resulte más económica que los de generaciones previas, características que han llevado a su aplicación masiva como método de control de plagas, ectoparásitos y enfermedades vectoriales.

Las campañas de tratamiento en las zonas endémicas consisten habitualmente en el rociado de las viviendas con formulaciones aprobadas para el uso domisanitario. Las estructuras peridomiciliarias deben ser fumigadas para reducir la disponibilidad de refugios y el mantenimiento del ciclo de transmisión en los alrededores de la vivienda. La dinámica de trabajo es intensa y requiere de personal calificado y una alta inversión de tiempo y dinero. Ocasionalmente las condiciones ambientales impiden el rociado de viviendas, y/o disminuyen la residualidad de los insecticidas. Estos factores han llevado a considerar otras opciones para el control de *T. infestans*, aunque ninguna de ellas se encuentra disponible en el mercado. En la actualidad, la búsqueda de opciones para el manejo integrado de *T. infestans* está dirigida a

dos herramientas posibles. Una de ellas es el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Lecuona y col., (2001) estudiaron el efecto de este hongo sobre *T. infestans* y determinaron que representa una opción viable para su control, dada su alta efectividad en ambientes de distinta temperatura y humedad. Además, determinaron que este biocontrolador es compatible con la

aplicación de deltametrina, el piretroide más utilizado para el control de *T. infestans*, lo cual sugiere que la utilización de ambas herramientas en conjunto podría constituir una medida de alto impacto en el futuro. Otros autores estudian la utilidad del Triatoma virus como controlador natural de *T. infestans*. Este virus ha demostrado poseer efectos patogénicos en cepas de *T. infestans*, y dado que presenta transmisión horizontal, se postula como una posible herramienta de manejo en el futuro (Muscio y col., 1997, Muscio y col., 2000).

1.2.2. Insecticidas

Piretroides

El desarrollo de los piretroides se realizó a partir de la modificación de la estructura química de piretrinas naturales, las cuales son extraídas del aquenio de la flor del piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* (Compositae)) (Head 1973).

Tanto las piretrinas como la mayoría de sus análogos sintéticos son compuestos altamente lipofílicos, con alto punto de ebullición y baja presión de vapor (Ruigt 1985). Actualmente *T. infestans* es controlado con el uso de insecticidas piretroides, fundamentalmente la deltametrina (Figura 5).

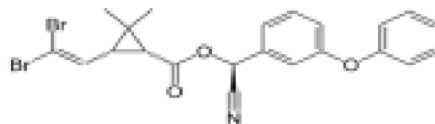


Figura 5. Estructura molecular de la deltametrina, se observa la presencia de un grupo ciano característico de los piretroides de segunda generación.

Los insecticidas piretroides actúan a nivel de los canales de sodio dependientes de voltaje en los nervios del sistema nervioso central y periférico (McCaffery 1998). Para entender el efecto neurotóxico de los piretroides, es necesario tener en cuenta que el medio

interno de la neurona en estado de reposo es negativo respecto al externo debido a las diferencias en las concentraciones de iones sodio (Na^+) y potasio (K^+) entre ambos medios. Cuando se transmite el impulso nervioso a lo largo del axón cambia la permeabilidad de la membrana debido a la apertura de canales de Na^+ , el cual ingresa y disminuye la diferencia de potencial. La membrana nerviosa recupera rápidamente su estado de equilibrio mediante el movimiento de iones Na^+ y K^+ a través de canales específicos. (Figura 6)

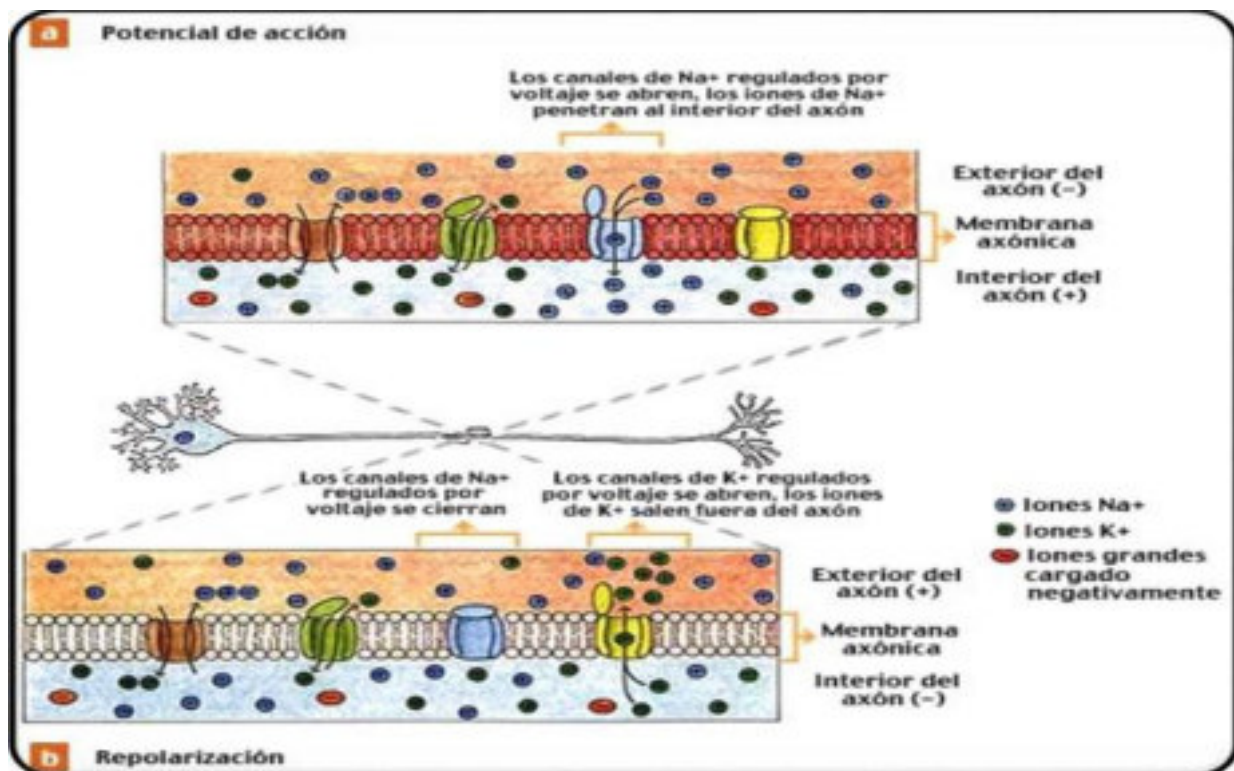


Figura 6. Transmisión normal del impulso nervioso a partir del gradiente eléctrico a través de la membrana neuronal a) Generación del potencial de acción, b) Repolarización.

Los insecticidas piretroides actúan a nivel de la membrana nerviosa en un sitio específico de los canales de Na^+ , modificando la velocidad de cierre de los mismos y alterando la transmisión nerviosa normal.

Estas moléculas mantienen los canales de sodio abiertos por más tiempo del normal, lo cual prolonga el ingreso de iones tanto durante la polarización como durante la despolarización de la membrana del axón. Como consecuencia, disminuye la velocidad de regreso al estado inactivado o de reposo y no se restablece correctamente el potencial de reposo, cercano a los -70 mV (Stenersen 2004). El cierre tardío del canal produce una despolarización luego del potencial de acción que, si es suficientemente grande, puede generar el disparo de múltiples potenciales de acción en respuesta a un solo estímulo (Dong

2007, Lund 1985).

La exposición a insecticidas piretroides se asocia con síntomas como la hiperexcitabilidad, incoordinación, temblores y convulsiones, seguidas de parálisis y eventualmente muerte. Algunos compuestos son muy efectivos en producir un rápido volteo, es decir un estado de incoordinación e inestabilidad locomotora desde el cual, dependiendo de la dosis, puede haber una completa recuperación. Además de volteo y muerte, los piretroides pueden tener un efecto repelente al insecto, o inhibir la alimentación (Ruigt 1985). El efecto repelente de los piretroides como N,N-dietil-m-toluamida (DEET) ha sido comprobado en *T. infestans*, sin verificarse diferencias entre insectos que presentan distinta tolerancia a otros piretroides (Alzogaray y col., 2000, Sfara y col., 2006). El estudio de los efectos de la intoxicación con los piretroides deltametrina y cis-permetrina demostró que estos compuestos causan hiperactividad, incoordinación y parálisis en ninfas de esta especie (Alzogaray y col., 1997, Alzogaray y Zerba 1997).

1.2.3 Metopreno

El metopreno es un análogo de la hormona juvenil (JH) que actúa como regulador del crecimiento cuando se usa como insecticida. Es un líquido de color ámbar con un ligero olor afrutado. El metopreno interfiere con el ciclo de vida de un insecto y evita que alcance la madurez o se reproduzca. Las hormonas de crecimiento juvenil deben estar ausentes para que una pupa mude a un adulto, por lo que las larvas tratadas con metopreno no podrán cambiar con éxito de pupas a adultas. Esto rompe el ciclo de vida biológico del insecto, evitando la infestación recurrente. El metopreno se considera un pesticida biológico porque en lugar de controlar las plagas objetivo mediante la toxicidad directa, el metopreno interfiere con el ciclo de vida de un insecto y evita que alcance la madurez o se reproduzca. Se usa también en la medicina veterinaria, debido a que es una sustancia activa antiparasitaria. Empleando sobre todo a perros y gatos contra las pulgas. (An Fac Med Lima 2007)

1.2.4 Butóxido de piperonilo (PBO)

El PBO es un sinérgico de plaguicidas. Por sí mismo no tiene propiedades plaguicidas. Sin embargo, cuando se añade a compuestos plaguicidas, tales como con los insecticidas; piretrina, piretroides, y carbamatos, la potencia de estos químicos es incrementada

considerablemente.

El PBO es un potente inhibidor de las enzimas monooxigenasas Citocromo P-450. Esta familia de enzimas son las principales que actúan en los mecanismos de detoxificación de muchos plaguicidas. Inhibiendo los mecanismos de detoxificación permite que las concentraciones del insecticida dentro del organismo sean mayores ya que impide su metabolización haciendo que permanezca más tiempo dentro del cuerpo del insecto u organismo a eliminar (Moore 2009).

1.3.1 Resistencia a insecticidas

La exposición de los individuos al uso intensivo de insecticidas resulta en una considerable presión de selección. Considerar que para una dosis determinada de compuesto que es aplicada sobre la población, una pequeña proporción de individuos pre adaptativamente resistentes sobreviven y se reproducen con éxito. Ante la repetida aplicación del compuesto, el aumento de la proporción de insectos tolerantes al insecticida resulta en el desarrollo de una población resistente, es decir una población que ha adquirido la capacidad de tolerar niveles de tóxico que serían letales para la mayoría de los individuos de una población normal de la misma especie (Roush y Tabashik 1990). La velocidad a la cual se desarrolla esta característica depende de la frecuencia de los genes de resistencia en la población, de la naturaleza de estos genes (recesivos o dominantes), la intensidad de la presión de selección y la tasa reproductiva de la especie (Perry y col., 1998).

De la definición propuesta se desprende la pregunta acerca de cuál es el significado de la respuesta de una población normal. ¿Existe un parámetro generalizado de respuesta a un insecticida? ¿La respuesta a un insecticida es dependiente de especie, de población? ¿Existe influencia del medio en la respuesta a un insecticida? Estos interrogantes, entre otros, llevaron a la postulación de definiciones de resistencia más modernas, como la “falta de un insecticida para controlar una población, a pesar de su efectividad en el pasado” (Robertson y col., 2007). Esta definición puede ser extendida a cambios fisiológicos, genéticos, etc, que determinan la disminución de la efectividad de un compuesto como controlador de una plaga. Como es esperable, la resistencia a un insecticida no es exclusiva de un tipo de insecto, ni de un tipo de molécula. De hecho, en la actualidad se conocen al menos 600 especies de insectos con demostrada resistencia a uno o más grupos de insecticidas. El desarrollo de resistencia en los insectos de importancia sanitaria como vinchucas y mosquitos representa un desafío para el control de las enfermedades emergentes como la malaria, el chagas y el dengue. En estos casos

existen además limitantes como la escasez de medicamentos y/o vacunas para la enfermedad, lo que ubica al control vectorial en la posición de la mejor, cuando no la única, medida de optimización de la salud en las zonas endémicas para cada enfermedad. Además, la poca disponibilidad de variantes aptas para el uso domisanitario y el cese de la comercialización de compuestos previamente efectivos para el control de insectos vectores hace de la emergencia de la resistencia una problemática no soslayable (Brogdon y McAllister 1998).

Los primeros registros de resistencia a insecticidas en vectores de enfermedades datan de la implementación del DDT, durante la década de 1940. Un ejemplo claro ocurrió con el control de *Aedes* sp, mosquitos vectores de dengue y dengue hemorrágico, que desarrollaron resistencia a tan sólo un año de la implementación de este insecticida como medida de control (Hemingway y Ranson 2000). La rotación de las medidas de control no fue suficiente para contrarrestar la disminución de la efectividad de los insecticidas en mosquitos, y en la actualidad existe vasta evidencia de la resistencia de *Culex quinquefasciatus* y *C. pipiens* (Diptera: Culicidae) a insecticidas organofosforados como el malatión, y piretroides como la permetrina (Bisset y col. 2000, Raymond y col. 2002). De la misma forma, el control químico de los piojos humanos *Pediculus humanus* (Pthiraptera: Pediculidae) rápidamente demostró su capacidad de selección para insectos más tolerantes a compuestos organofosforados y piretroides (Downs y col. 1999, Vassena y col. 2003).

La resistencia a insecticidas se encuentra profundamente ligada a los mecanismos metabólicos naturales, los cuáles presentan variaciones que determinan tres mecanismos básicos de resistencia a un compuesto: (Figura 7).

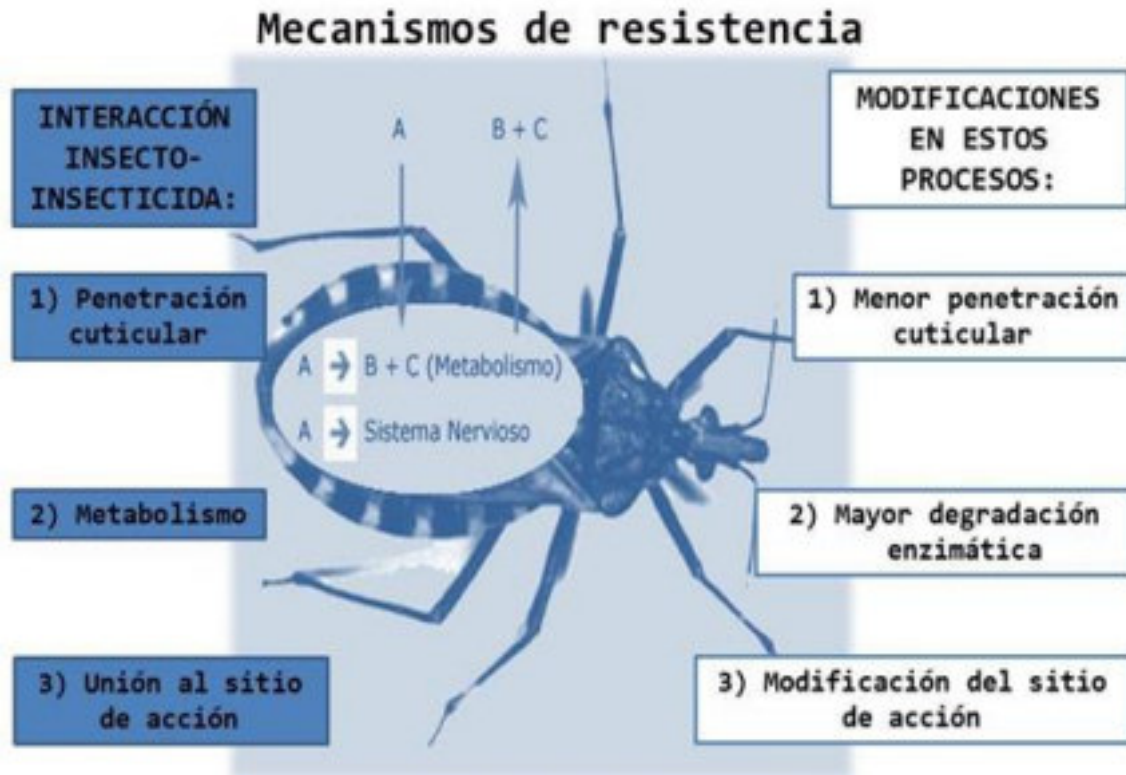


Figura 7. Mecanismo de resistencia en *T. infestans*

1.3.2 Mecanismos de resistencia

1.3.2.1 Penetración reducida

Dado que la cutícula del insecto representa la primera barrera para el ingreso de un insecticida, la penetración reducida o el entretardamiento de la llegada al sitio blanco implican una disminución de la potencial toxicidad del compuesto. Una baja tasa de penetración de insecticidas piretroides fue establecida en *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes a deltametrina y *Musca domestica* resistentes a permetrina (Ahmad y col. 2006, DeVries y Georgiou 1981). En *T. infestans*, asimismo, se ha registrado el engrosamiento de la cutícula asociado a la resistencia a la deltametrina (Juárez 1994).

1.3.2.2. Detoxificación enzimática incrementada

Los mecanismos normales de detoxificación de xenobióticos suelen presentar modificaciones en los insectos resistentes a insecticidas. Este es un mecanismo de resistencia muy extendido, y probablemente el de desarrollo más inmediato (Brogdon y McAllister 1998).

En efecto, se ha establecido el incremento de la actividad para distintas familias de

enzimas, asociados a resistencia a distintos insecticidas. El ejemplo más claro de enzimas involucradas en la resistencia es el de las oxidasas de función mixta, ya que debido a su baja especificidad y su ubicuidad son capaces de formar parte del metabolismo degradativo de numerosas sustancias. Un incremento en su actividad ha sido relacionado con resistencia a insecticidas de diverso modo de acción como organoclorados, fosforados, carbamatos y piretroides, e incluso a resistencia cruzada entre distintos insecticidas (Wilkinson 1983).

Las monooxigenasas de citocromo P-450 son un grupo de importancia en la detoxificación de xenobióticos y han sido relacionadas con altos niveles de resistencia a carbamatos en *M. domestica* (Diptera: Muscidae), a piretroides en *P. humanus capitis* o a múltiples insecticidas en *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) (Scott y Wheelock 1992, Scott 1999, Picollo y col. 2000, Huang y Han 2007). Este mecanismo de resistencia ha sido establecido en *T. infestans* resistentes a deltametrina, asociado además a un incremento en la actividad de enzimas esterasas (Santo Orihuela y col. 2008). Estas enzimas también han sido asociadas al descenso en la eficacia de insecticidas en diversas especies de insectos, como *Spodoptera exigua* y *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) resistentes a piretroides (Criniti y col. 2008, Delorme y col. 1988).

1.3.2.3 Modificación del sitio de acción:

Este mecanismo de resistencia implica que el sitio de acción del insecticida presenta mutaciones que afectan su conformación y evitan la unión con la molécula insecticida. En el caso particular de los insecticidas piretroides, se conocen al menos diez mutaciones en los genes codificantes para canales de sodio que confieren insensibilidad al sistema nervioso (Dong 2007). Estas mutaciones, comúnmente llamadas kdr (por el inglés knock down resistance), producen diferentes grados de resistencia según el grado de modificación de la unión al sitio de acción, y han sido detectadas en numerosas especies de insectos, como *M. domestica*, *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) y *Blatella germanica* (Dictyoptera: Blatellidae) (Knipple y col. 1994, Dong 1997, Dabiré y col. 2009).

La multiplicidad de mecanismos de resistencia ha sido establecida para numerosos insectos plaga. En estos casos existen varias causas contribuyendo a los niveles de resistencia, y es su combinación la que determina el resultado final de la exposición al compuesto (Figura 8). Algunos ejemplos de estas asociaciones existen en *S. exigua*, *H. armigera* (incremento de la actividad enzimática y penetración reducida) (DeVries y Georgiou 1981, Delorme y col. 1988), *M. persicae* y *Anopheles sp* (actividad enzimática incrementada y sitio de acción

modificado) (Criniti y col. 2008, Karunaratne y col. 2007).

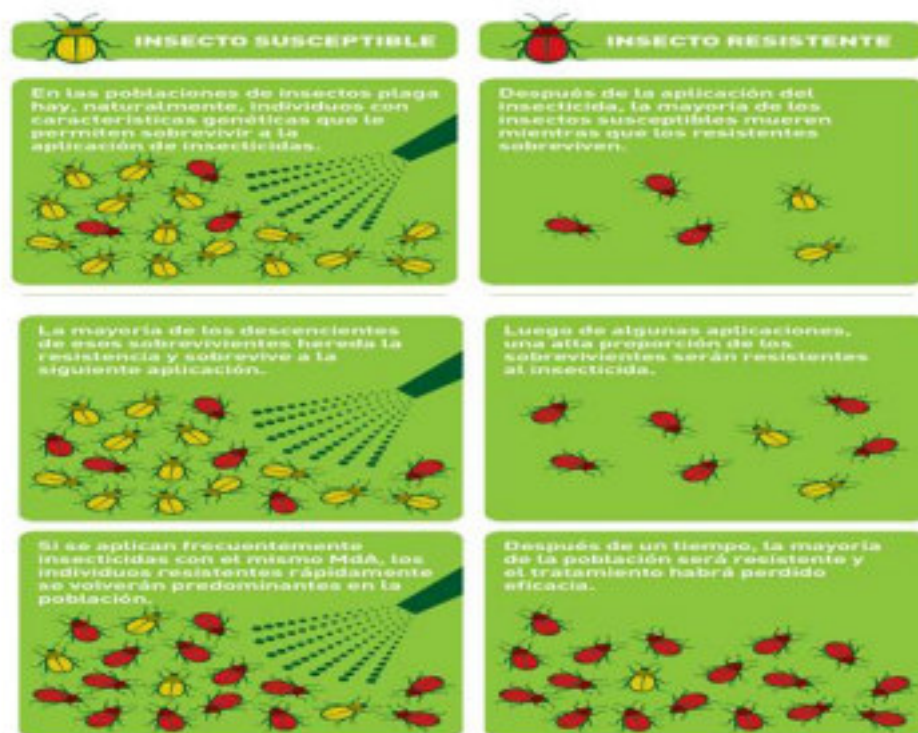


Figura 8 Presión de selección ejercida por insecticidas

1.4 La importancia de las curvas dosis-respuesta

Las respuestas cuantales ocurren cuando el resultado en un solo organismo es todo o nada. En el caso de la exposición a insecticidas, se evalúa si cada individuo responde o no un tiempo después de administrado el tóxico, considerando como respuesta la muerte y como no respuesta la supervivencia (Mougabure Cueto y Sfara 2016). De esta manera, la susceptibilidad de una población de insectos se evalúa a partir de la exposición de grupos de individuos de la misma especie tratados experimentalmente con un rango de dosis del fármaco (Busvine 1971). Cada grupo recibe una dosis determinada y la respuesta se registra como la proporción de individuos tratados que responden. La relación entre el porcentaje de mortalidad observado (eje Y) y la dosis evaluada (eje X) se representa en una curva dosis-respuesta. Se espera que concentraciones más altas del insecticida produzcan mayores proporciones de mortalidad.

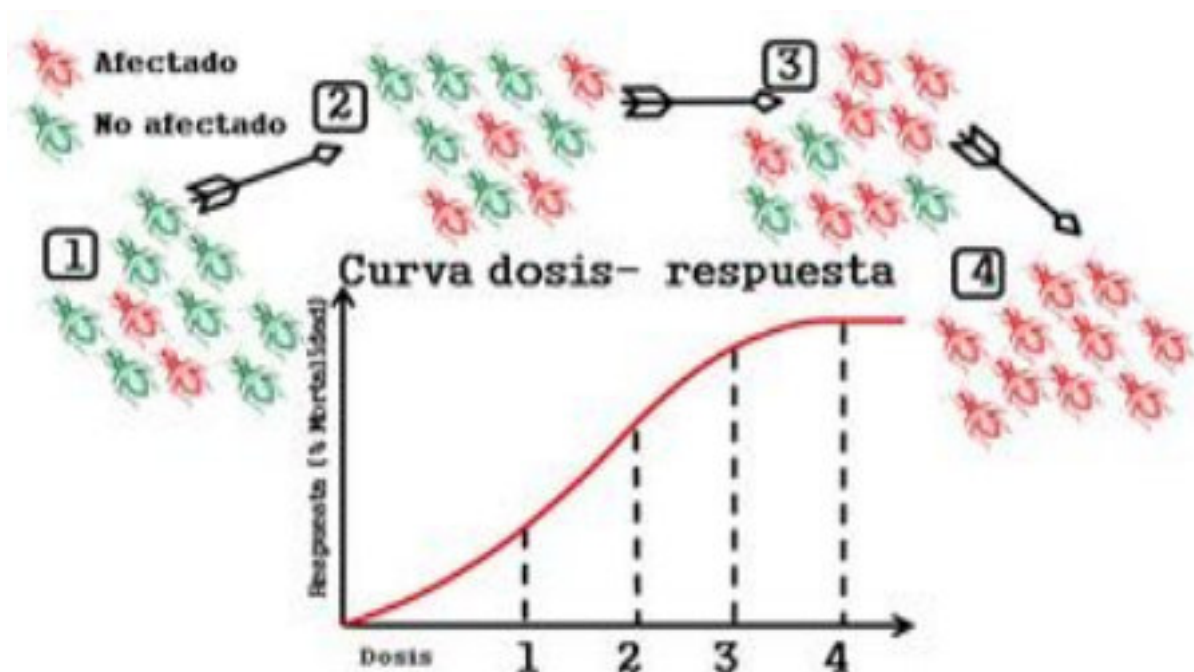
El gráfico resultante de evaluar la mortalidad frente a la dosis es una curva sigmoidea que dificulta evaluar la respuesta cerca del 0 y del 100% de mortalidad, zonas donde la respuesta alcanza asíntotas. Por lo tanto, se usa una transformación **Probit** para convertir la curva sigmoidea acumulativa en una función lineal. Esto se logra trazando líneas

perpendiculares equidistantes en el eje X de la curva dosis- respuesta separadas en términos de desviaciones estándar de la curva normal acumulada (Hewlett y Plackett 1979). De esta manera, se obtiene una escala de desvíos equivalentes normales que es lineal, al igual que la escala que se consigue si se aplica el logaritmo a la dosis. Así, al medir el porcentaje de mortalidad en términos de desviaciones estándar, llegamos a una relación lineal entre los desvíos y la dosis logarítmica. Luego, para que la respuesta sea siempre positiva, se suma 5 a los desvíos, obteniendo medidas que reciben el nombre de “probits” (una abreviatura de unidades de probabilidad). Por lo tanto, el Método Probit es un método estadístico que se basa en la distribución normal.

Este parámetro toxicológico será brindado por el software POLO-PLUS. Cabe destacar, que este software trabaja con el modelo estadístico Probit.

El gráfico de los valores probits del porcentaje de mortalidad en función del logaritmo de la dosis generan una relación lineal (Perry y col. 1998).

A partir de esta función lineal es posible obtener parámetros toxicológicos como la dosis letal 50 (DL50), que es la concentración a la que muere la mitad (50%) de los insectos tratados con el insecticida (Figura 9).



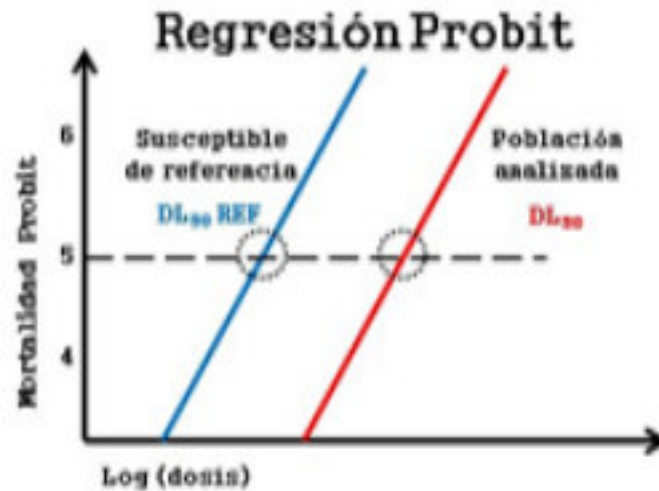


Figura 9. Curva dosis-respuesta para una población y linealización con la transformación Probit, a partir de la cual se obtiene el parámetro DL50.

OBJETIVO

2. OBJETIVO DEL TRABAJO FINAL

El trabajo final tiene como objetivo general avanzar en el conocimiento de la evolución de la resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *T. infestans*, mediante el uso de herramientas de la toxicología y el modelo estadístico Probit.

Los objetivos específicos son:

- Determinar la eficacia triatómica del insecticida metopreno y deltametrina en ninfas de *T. infestans* mediante el modelo estadístico Probit.
- Estudiar la actividad letal de la combinación de metopreno y deltametrina con el sinergista butóxido de piperonilo (PBO) en *T. infestans* utilizando el análisis Probit.

DESARROLLO Y RESULTADOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1 Acondicionamiento y cría de los triatominos:

Los ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de Artrópodos y Vectores (LabArVec), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata. Los insectos fueron colocados en contenedores de plástico de 15 cm de diámetro. La cría de los insectos se realizó en condiciones controladas de temperatura de temperatura ($28\pm 1^\circ\text{C}$), de humedad (50-70%) y un fotoperiodo de 12:12 horas (luz: oscuridad). Los ejemplares de *T. infestans* fueron alimentados con sangre de gallinas una vez por semana.

Durante el presente trabajo se utilizaron dos poblaciones de vinchucas. Una población fue iniciada con insectos enviados desde el Centro de Referencias de Vectores (CeReVe). Esta colonia fue utilizada como **referencia o susceptible**, ya que estos ejemplares son mantenidos desde el año 2010 sin exposición a insecticidas.

En cuanto a la otra colonia de insectos utilizada en este trabajo, las vinchucas iniciadoras de la colonia fueron capturadas en la localidad de Salvador Mazza, Salta, Argentina. En esta zona, las campañas de rociado con piretroides para el control de *T. infestans* son consideradas ineficaces debido a la rápida reinfestación con vinchucas que se registra en los hogares. A esta colonia se la denominó como **colonias de Salvador Mazza (CSM)**. Todos los ensayos de este trabajo final se llevaron a cabo con ninfas de quinto estadio de ambas poblaciones. La elección de este estadio del desarrollo de *T. infestans* tiene que ver con que es el estadio que mayor resistencia demostró hacia los piretroides (Germano, 2008).

Tanto las vinchucas de la colonia de referencia (CR) como las CSM fueron alimentadas sobre gallinas, una vez a la semana. Las colonias se mantuvieron a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, 60-70% de humedad relativa (HR) y un ciclo de 12:12 luz: oscuridad.

3.2. Determinación de la susceptibilidad a metopreno en ninfas de *T. infestans*

En este bioensayo se determinó la dosis de metopreno y deltametrina necesaria para matar al 50% de la población en estudio (DL_{50}). Para calcular la DL_{50} , se siguió el protocolo de la **Organización Mundial de la Salud**. Se utilizaron ninfas de V estadio de *T. infestans* con 12-15 días de ayuno post-ecdisis. El bioensayo consistió en la aplicación tópica de 1 μL del principio activo (metopreno o deltametrina) disuelto en acetona sobre la zona dorsal del abdomen de las ninfas. Para la confección de las curvas dosis-respuesta se evaluaron dosis

crecientes de los del insecticida teniendo en cuenta que al menos cuatro de estas dosis causan entre 10 y 90% de mortalidad entre las ninfas. Cada dosis fue topicada en 10 vinchucas. Luego de ser topicados, los insectos fueron alojados en recipientes rotulados registrando el estado de los insectos a las 24, 48, 72 y 96 h. Las 10 ninfas que fueron utilizadas como control sólo recibieron 1 μ L de acetona sin principio activo disuelto. El ensayo fue replicado tres veces, es decir, que cada dosis del insecticida fue topicada en 30 vinchucas

3.3 Determinación del efecto sinérgico del PBO en la actividad triatómica del metopreno y deltametrina

Para este bioensayo, 1 h antes de la administración del metopreno o deltametrina por vía tópica, los insectos fueron tratados con 1 μ g de PBO disuelto en 1 μ L acetona. Luego de transcurrido ese tiempo, la metodología de trabajo fue similar a la descrita en la sección anterior. En este ensayo se llevaron a cabo dos controles. En cada réplica 10 vinchucas recibieron 2 μ L de acetona sin principio activo disuelto y otras 10 ninfas recibieron 1 μ g de PBO disuelto en 1 μ L acetona. Cabe destacar que la dosis de PBO utilizada en este ensayo no demostró tener efectos tóxicos sobre las vinchucas, es decir, que la mortalidad de las ninfas control que recibieron 1 μ g de PBO disuelto en 1 μ L acetona no fue superior a la observada en las ninfas control que recibieron 2 μ L de acetona.

3.4 Estudio estadístico

La actividad letal del metopreno y deltametrina fue cuantificada utilizando el modelo estadístico Probit . Este modelo permite relacionar una mortalidad determinada con la dosis o concentración necesaria para provocarla. Las mortalidades registradas en los ensayos de topicación fueron analizados a través del software POLO-PLUS. Mediante el mencionado software se confeccionaron las curvas dosis-respuesta de los insecticidas evaluados. A partir de dichas curvas se calcularon las dosis necesarias para matar al 50% de los insectos evaluados

(DL₅₀). Estos valores fueron acompañados por sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC 95%).

Para conocer las diferencias de susceptibilidades entre las dos colonias de insectos que

fueron evaluados en este trabajo, se determinó el grado de resistencia al insecticida (GR_{50}), para esto se realizó la comparación de las DL_{50} entre la CR y la CSM. Cada grado de resistencia calculado fue acompañado por su correspondiente IC 95%. Dos DL_{50} fueron consideradas significativamente distintas cuando el IC 95% no incluyó al número 1,0 ($p < 0,05$). (Robertson, 2007). Este valor permite determinar la existencia o no de resistencia a cada insecticida en cada población (Robertson y Preisler 1992).

Para conocer el grado de sinergismo entre el metopreno y deltametrina con el PBO se realizó algo similar a lo antes detallado. En este caso se calculará el **grado de sinergismo** (GS_{50}), para esto se realizó el cociente entre DL_{50} (metopreno o deltametrina) / DL_{50} (metopreno o deltametrina + PBO). Nuevamente, dos DL_{50} se considerarán significativamente distintas cuando el IC 95% hallado no incluya al número 1,0. El grado de Sinergismo es el resultado de la acción de dos o más sustancias que, actuando en conjunto, provocan una respuesta mayor a la suma de los efectos que provocan por separado.

RESULTADOS

Tabla 1:

Estudio de la mortalidad de las ninfas de *T. infestans* a lo largo del tiempo:

Tto	LD ₅₀ (ng/i)	CI 95%			
		Tiempo de tratamiento (h)			
	Colonia	24h	48h	72h	96h
DM	CR	62.502 (41.131-134.704)	62.502 (41.131-134.704)	62.502 (41.131-134.704)	62.502 (41.131-134.704)
DM	CSM	22497.2 (17081.200-37509.157)	22497.2 (17081.200-37509.157)	22497.2 (17081.200-37509.157)	22497.2 (17081.200-37509.157)
DM-P	CR	25,1 ([17,7-34,8])	25,1 ([17,7-34,8])	25,1 ([17,7-34,8])	25,1 ([17,7-34,8])
DM-P	CSM	2786,9 (1453,6-4601,2)	2786,9 (1453,6-4601,2)	2786,9 (1453,6-4601,2)	2786,9 (1453,6-4601,2)
Met	CR	82.890 (50.199-253.875)	82.890 (50.199-253.875)	82.890 (50.199-253.875)	60.556 (40.675-122.65)
Met	CSM	54.073 (34.772-121.660)	37.146 (25.980-60.460)	33.569 (23.541-52.895)	33.569 (23.541-52.895)
M-P	CR	70.225 (45.434-165.032)	19.383 (14.913-24.844)	19.383 (14.913-24.844)	19.383 (14.913-24.844)
M-P	CSM	39.528 (26.698-65.125)	10.595 (8.092-13.431)	7.461 (5.712-9.271)	7.461 (5.712-9.271)

Tto: Tratamiento

Col: colonia

DM: deltametrina

Met: metopreno

M-P: metopreno + PBO

CR: colonia de referencia

CSM: colonia de Salvador Maza

LD₅₀: dosis letal 50 se expresa en ng por insecto

CI₉₅: intervalo de confianza 95%

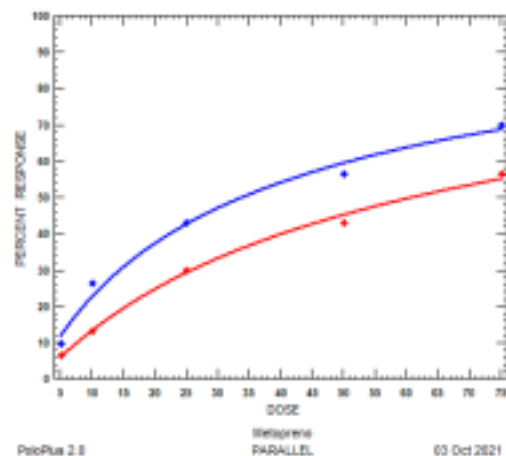
DM-P: deltametrina + PBO

Tabla 2:

Comparacion de la actividad letal de Deltametrina, Metopreno y BPO en ninfas de T.infestans susceptibles y resistentes a piretroides despues de 96hs de exposicion.

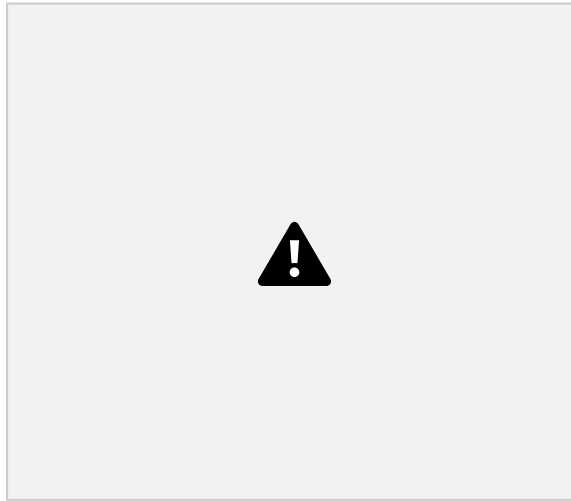
Tto	Col	Pend ± DE	LD50(ng/i)	GR50 (CI95%)	GS50 (CI95%)
DM	CR	1,34 ± 0,29	62,5 (41,1-134,7)		
DM	CSM	2,11 ± 0,45	22497,2 (17081,2-37509,1)	359,9 (191,8-675,3)	
DM-P	CR		25,1 ((17,7-34,8)		2,2 (1,2-3,8)
DM-P	CSM		2786,9 (1453,6-4601,2)		7,5 (4,9-11,1)
Met	CR	1,40 ± 0,29	60,5 (40,6-122,6)		
Met	CSM	1,40 ± 0,27	33,5 (23,5-52,8)	0,5 (0,3-0,9)	
M-P	CR	2,21 ± 0,30	19,3 (14,9-24,8)		3,1 (1,8-5,4)
M-P	CSM	3,28 ± 0,66	7,4 (5,7-9,2)	0,4 (0,2-0,6)	4,5 (2,9-7,0)

Gráfico 1: Met CSM/CR 96 hs. GR50 (CI95%)= 0,5 (0,3-0,9)

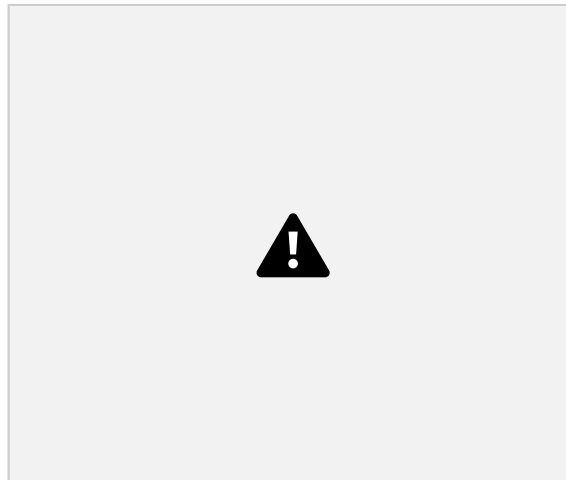


Azul: CSM Roja: CR

Gráfico 2: Met CSM/CR 96 hs. GR50 (CI95%)= 0,4 (0,2-0,6)

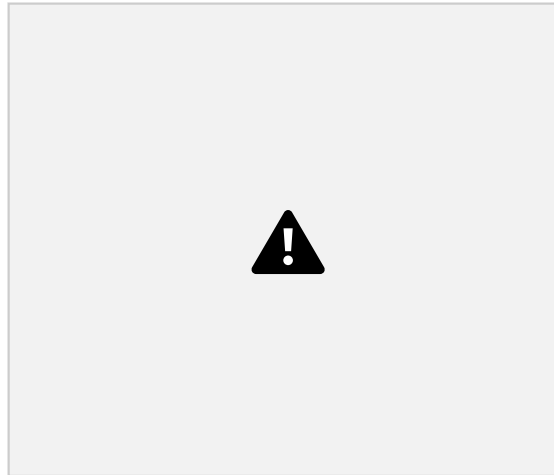


Azul: CSM Roja: CR
Gráfico 3: Met/ Met + PBO CR= $GS_{50}(CI95\%)= 3,1 (1,8-5,4)$



Azul: Met + PBO Roja: Met

Gráfico 4: Met/ Met + PBO CSM: $GS_{50}(CI95\%)= 4,5 (2,9-7,0)$



Azul: Met + PBO Roja: Met

El estudio de la actividad triatómica se llevó a cabo mediante ensayos de topicación. A partir de esta técnica se determinó la DL_{50} del metopreno y el piretroide deltametrina en las dos poblaciones de vinchucas en estudio.

Al comparar la potencia de ambos insecticidas, el metopreno demostró en ambas colonias de vinchucas una mayor potencia que la deltametrina. Cabe destacar, que si bien en el caso de la CR de vinchucas, la potencia del metopreno (DL_{50} : 60,5 ng/insecto) fue levemente superior a la observada con la deltametrina (DL_{50} : 62,5 ng/insecto), en el caso de las vinchucas CSM se reportó una diferencia importante en la actividad letal de los insecticidas, para estos insectos se necesitó una dosis 682 veces mayor de deltametrina (DL_{50} : 22497 ng/insecto) con respecto a la descrita para el metopreno (DL_{50} : 33 ng/insecto) (Tabla 2).

Al comparar la actividad letal de ambos insecticidas entre las vinchucas CR y CSM se observó una diferencia importante entre la susceptibilidad hacia la deltametrina por parte de los individuos de ambas colonias. Para las vinchucas provenientes de CSM la dosis del piretroide necesaria para eliminar al 50% de los insectos fue 360 veces superior a la registrada entre los insectos de la CR (Tabla 2). Demostrando de esta manera una importante resistencia hacia la deltametrina por parte de las vinchucas de CSM. En cuanto al metopreno, al contrario de lo observado para la deltametrina, la comparación de la DL_{50} registrada para ambas colonias en estudio, demostró una mayor susceptibilidad para los insectos provenientes de la CSM (GR_{50} : 0,4) (Gráfico 2), que para las vinchucas de la colonia de CR (GR_{50} : 0,5) (Gráfico 1).

En cuanto al efecto sinérgico del PBO en la actividad letal de la deltametrina, se pudo constatar una diferencia significativa entre lo reportado en la CR en comparación con las vinchucas provenientes de CSM. La actividad del sinergista se incrementó en las vinchucas CSM a deltametrina, reduciéndose 7.5 veces la dosis necesaria para eliminar al 50% de los insectos (Tabla 2). En comparación, el GR50 observado para las ninfas de CR fue de tan solo 2.2 (Tabla 2).

Con respecto al estudio del efecto del PBO en la actividad letal de metopreno se constató un importante efecto sinérgico en ambas poblaciones de insectos, siendo mayor, en el caso de las ninfas provenientes de CSM (Tabla 2) (Gráfico 3 y 4).

Por último, en los ensayos llevados a cabo en el presente trabajo, se determinó el tiempo necesario de cada insecticida para alcanzar su máxima actividad letal en las ninfas de *T. infestans*. Para el caso de la deltametrina el efecto máximo en ambas colonias de vinchucas fue observado a las 24 h de haber sido topicada (Tabla 1). Cabe resaltar, que este comportamiento letal no fue modificado por la presencia del sinergista PBO (Tabla 1). A diferencia de lo descrito anteriormente con la deltametrina, en el caso de las vinchucas CR se constató una actividad letal máxima del metopreno recién a las 96 h de haber sido topicado en las ninfas. En las ninfas de provenientes de CSM la actividad máxima se observó a las 72 h postopicación (Tabla 1). En las ninfas CR, la combinación de PBO con el metopreno aceleró la actividad máxima del insecticida a 48 h postratamiento (Tabla 1).

DISCUSIÓN

4. El uso masivo y continuo de un mismo tipo de insecticida sobre una determinada especie de insecto, suele traer aparejado la aparición de individuos resistentes a estas moléculas. La presión de selección ocasionada por un insecticida con alta eficacia letal es suficiente, bajo determinadas condiciones, para acortar su propia vida útil. El éxito mediato es también, su fracaso a largo plazo. Para el caso de *T. infestans* la realidad no dista mucho de lo antes expuesto. La alta actividad triatomicida demostrada por los piretroides los erigió como la única alternativa para el control de los principales vectores de *T. cruzi* en las zonas endémicas de la Enfermedad de Chagas. El uso irracional que se realizó con estos insecticidas condujo a la selección de poblaciones de vinchucas resistentes (Mougabure-Cueto y Picollo, 2015).

Ante este panorama se hace necesaria la búsqueda de moléculas con mecanismos de acción diferentes al de los piretroides y que demuestren altos índices de actividad letal en triatominos. También, se hace imprescindible determinar la factibilidad del uso de distintos métodos estadísticos que permitan cuantificar el grado de susceptibilidad/resistencia que puedan tener diferentes poblaciones de triatominos a los insecticidas en estudio.

En este trabajo, se estudió la actividad triatomicida de los insecticidas metopreno y deltametrina en una población de vinchucas de referencia y en otra proveniente de la localidad de Salvador Mazza. Cabe destacar, que la elección de estos insectos tiene que ver con que en el año 2005 se reportó en Salvador Mazza la presencia de ninfas de *T. infestans* con grados de resistencia a deltametrina de 130X (Picollo y col., 2005). También, es importante remarcar que desde el descubrimiento de las poblaciones resistentes a piretroides, en la zona de Salvador Mazza se intensificó el uso de deltametrina, es decir, se aumentaron las concentraciones del insecticida en los rociados llevados a cabo en las viviendas de la localidad. Este tipo de conductas, no solo no son una solución al problema, sino que por el contrario lo único que hacen es acelerar el proceso de selección de individuos cada vez más resistentes (Mougabure Cueto y Picollo, 2015). En consonancia con esta afirmación, el grado de resistencia a deltametrina descrito en el presente trabajo de investigación fue de 350X, confirmando no solo lo descrito por Picollo, sino que además demuestra un incremento, desde al año 2005 hasta la fecha, de más del doble en el nivel de resistencia a deltametrina por parte de vinchucas provenientes de Salvador Mazza.

En otro resultado de este trabajo de investigación se describió la actividad letal provocada por la combinación del sinergista PBO con la deltametrina. Se constató una mayor actividad sinérgica de la combinación del PBO con el piretroide en las ninfas resistentes. Este dato indica que parte de la resistencia a deltametrina presente en estos insectos podría estar relacionada con una sobre-expresión de monooxigenasas citocromo P-450. En consonancia con este resultado, Traverso y col. (2017) describieron en un trabajo realizado en ninfas de *T. infestans* resistentes a piretroides una sobre-expresión del gen CYP4 perteneciente a la familia de enzimas antes mencionada. Asimismo, es preciso destacar que si bien el PBO demostró tener un efecto sinérgico en la actividad letal de la deltametrina, este sinergista no logró revertir en su totalidad la resistencia presente en las vinchucas de Salvador Mazza. Esto estaría indicando que además de la exacerbación de la actividad de monooxigenasas citocromo P-450 podría coexistir otro mecanismo de resistencia en estos insectos. En este sentido, Sierra y col. (2016) reportaron la presencia de las mutaciones L1014F y L925I en los

canales de sodio en ninfas de *T. infestans* resistentes a piretroides provenientes de la región del Gran Chaco.

En cuanto al metopreno se observó una actividad letal similar entre ambas colonias, esto refuerza la importancia de buscar moléculas alternativas con mecanismos de acción distintos al de los piretroides para el control de *T. infestans*.

La posibilidad de observar el efecto de ambas insecticidas por un periodo de 96 h posadministración en las ninfas, nos permitió determinar un comportamiento letal distinto entre la deltametrina y el metopreno. En el caso del piretroide se observó que su actividad letal máxima se alcanzó dentro de las 24 h postopicación, mientras que para el metopreno su actividad letal máxima se constató a las 96 y 72 h postopicación para las ninfas de referencia y resistentes, respectivamente. Esta actividad letal lenta del metopreno fue puesta de manifiesto previamente en otras especies de insectos hematófagos de importancia sanitaria como los mosquitos *Aedes aegypti* y *Anopheles benarrochi*. En estos insectos la actividad letal máxima se observó recién a las 96 h luego de haber entrado en contacto con el metopreno (Castro y col., 2007).

Otro dato destacado entre los resultados obtenidos en este trabajo de investigación fue la actividad sinérgica del PBO con el metopreno. Este resultado sugiere que el PBO podría inhibir monooxigenasas Citocromo P-450 que participan en el proceso de detoxificación del metopreno en las ninfas de *T. infestans*. También, constatamos una actividad sinérgica similar del PBO en la letalidad del metopreno en ambas colonias de vinchucas. Este dato no es para nada menor, ya que podría estar indicando que las monooxigenasas Citocromo P-450 que participan en la resistencia a deltametrina no serían las mismas que realizan el proceso de detoxificación del metopreno.

En conclusión, la actividad letal similar demostrada por el metopreno en combinación con el PBO en ninfas de *T. infestans* susceptibles y resistentes a deltametrina, posiciona a este insecticida como una alternativa plausible para el control del vector. Cabe destacar, que bajo el uso racional que debe realizarse con las moléculas destinadas al control de vectores, sería conveniente que el metopreno en combinación con el sinergista PBO forme parte de un programa de rotación de insecticidas con distintos mecanismos de acción. De esta manera se podría alargar la vida útil de esta combinación de insecticidas.

En cuanto al modelo Probit, podemos afirmar que fue el modelo estadístico adecuado para determinar la diferencia de susceptibilidad a insecticidas por parte las dos colonias de

vinchucas utilizadas en este trabajo. Este modelo nos permitió cuantificar mediante la comparación de las DL50 obtenidas, la diferencia de susceptibilidad entre una población de vinchucas sin contacto con insecticidas versus individuos provenientes de una zona en donde el uso de deltametrina como método de control ha fracasado sistemáticamente durante los últimos 20 años.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- **Abad Franch, F. 2009.** Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles Prioritarias en el Ecuador. Proyecto OPS/CIDA/MSP.
- **Ahmad, M., I. Denholm, & R. H. Bromilow 2006.** Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Management Science* 62:805-810.
- **Alzogaray, R. A., A. Fontán, & E. N. Zerba 1997.** Evaluation of hyperactivity produced by pyrethroid treatment on third instar nymphs of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 35:323-333.
- **Alzogaray, R. A., & E. N. Zerba 1997.** Incoordination, paralysis and recovery after pyrethroid treatment on nymphs III of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 92:431-435.
- **Alzogaray, R. A., A. Fontan, & E. N. Zerba 2000.** Repellency of deet to nymphs of *Triatoma infestans*. *Medical and Veterinary Entomology* 14:6-10.
- **An Fac Med Lima 2007** Evaluación de la actividad larvicida del metopreno (*Altosid*)® sobre mosquitos vectores, en un área de alta transmisión *Julia Castro , Duber Díaz , Germán Correa , Fátima Medina*
- **Barrozo, R. B., & C. R. Lazzari 2004.** The response of the blood-sucking Bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. *Chemical Senses* 29:319-329.
- **Bisset, J. A., M. M. Rodriguez, C. Díaz, & A. Soca 2000.** Evolución de la resistencia a insecticidas en *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en un área de La Habana. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 52:180-185.
- **Brener Z.** O Parasito: relações hospedeiro-parasito. En: Brener Z, Andrade ZA, orgs.

Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1979:1-41. ●

Brogdon, W. G., & J. C. McAllister 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases* 4:605-613.

- **Busvine, J. R.** A critical review of the techniques for testing insecticides. *Commonwealth Agricultural Bureau* x. 2nd ed. Londres: **1971**:345.
- **Casida, J.E. y G. Quistad. 1995.** En *Pyrethrum flowers, production, Chemistry, toxicology, and uses*, Casida, J.E. and Quistad, G.B. (eds). Oxford university press, Inc. Oxford.
- **Criniti, A., E. Mazzoni, S. Cassanelli, P. Cravedi, A. Tondelli, D. Bizzaro, & G. C. Manicardi 2008.** Biochemical and molecular diagnosis of insecticide resistance conferred by esterase, MACE, kdr and super-kdr based mechanisms in Italian strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 90:168-174.
- **Delorme, R., D. Fournier, J. Chaufaux, A. Cuany, J. M. Bride, D. Auge, & J. B. Berge 1988.** Esterase metabolism and reduced penetration are causes of resistance to deltamethrin in *Spodoptera exigua* HUB (Noctuidae; Lepidoptera). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 32:240-246.
- **DeVries, D. H., & G. P. Georghiou 1981.** Decreased nerve sensitivity and decreased cuticular penetration as mechanisms of resistance to pyrethroids in a (1R)-trans-permethrin-selected strain of the house fly. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 15:234-241.
- **Dias, J. C. P., & C. J. Schofield 1999.** The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94:103-121.
- **Dias, J. C. P., A. C. Silveira, y C. J. Schofielf. 2002.** The impact of Chagas disease control in Latin America, a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97: 603- 12. ● **Diosque, P., A. M. Padilla, R. O. Cimino, R. M. Cardozo, O. S. Negrette, J. D. Marco, R. Zacca, C. Meza, A. Juarez, H. Rojo, R. Rey, R. M. Corrales, J. R. Nasser, & M. A. Basombrío 2004.** Chagas disease in rural areas of Chaco province, Argentina: epidemiologic survey in humans, reservoirs, and vectors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71:590-593.
- **Dong, K. 2007.** Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate*

Neuroscience 17-30.

- **Downs, Stafford, Harvey, & Coles 1999.** Evidence for double resistance to permethrin and malathion in head lice. *British Journal of Dermatology* 141:508-511.
- **Germano M.** Herencia y efectos demográficos de la resistencia a deltametrina en *Triatoma infestans*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, 2012a. 157p. Disponible en:
https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n5316_Germano.pdf
- **Grosso C, Blariza M, Mougabure-Cueto G, Picollo M, García B.** Identification of three cytochrome P450 genes in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans*: Expression analysis in deltamethrin susceptible and resistant populations. *Infect Genet Evol.* 2016;44: 459–470.
- **Gürtler, R. E., J. E. Cohen, M. C. Cecere & R. Chuit 1997.** Shifting host choices of the vector of Chagas disease, *Triatoma infestans*, in relation to the availability of host in houses in North-West Argentina. *Journal of Applied Ecology* 34: 699-715.
- **Gürtler, R. E., M. C. Cecere, M. A. Lauricella, R. M. Petersen, R. Chuit, E. L. Segura, & J. E. Cohen 2005.** Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73:95-103.
- **Gürtler, R. E., M. C. Cecere, M. A. Lauricella, M. V. Cardinal, & U. Kitron 2007.** Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* 134:69-82.
- **Head, S. W. 1973.** Composition of pyrethrum extract and analysis of pyrethrins, pp. 25-55. En J. E. Casida (ed.), *Pyrethrum, the natural insecticide*. Academic Press.
- **Hemingway, J., & H. Ranson 2000.** Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* 45:371-391.
- **Hewlett, P.S. y R. L. Plackett. 1979.** *The Interpretation of quantal responses in Biology*, University Park Press, Baltimore, 82pp
- **Huang, S., & Z. Han 2007.** Mechanisms for multiple resistances in field populations of common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87:14-22.
- **Karunaratne, S. H. P. P., N. J. Hawkes, M. D. B. Perera, H. Ranson, & J.**

Hemingway 2007. Mutated sodium channel genes and elevated monooxygenases are found in pyrethroid resistant populations of Sri Lankan malaria vectors. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88:108-113.

- **Knipple, D. C., K. E. Doyle, P. A. Marsella-Herrick, & D. M. Soderlund 1994.** Tight genetic linkage between the *kdr* insecticide resistance trait and a voltage-sensitive sodium channel gene in the house fly. *Proceedings of the National Academy of Science* 91:2483-2487.

- **Lazzari, C. R. 1992.** Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *Journal of Insect Physiology* 38:895-903.

- **Lecuona, R. E., J. D. Edelstein, M. F. Berretta, F. R. La Rossa, & J. A. Arcas 2001.** Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) Strains as potential agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 38:172-179

- **Lehane, M. M. 1991.** *Biology of blood-sucking insects*. Chapman & Hall. 288 pp.

- **Lund, A. E. 1985.** *Insecticides: effects on the nervous system*, En G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press, Gran Bretaña.

- **McCaffery, A. R. 1998.** Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera: a global view. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 353:1735-1750.

- **Moore (2009), G. D., Philippou, D., Borzatta, V., Trincia, P., Jewess, P., Gunning, R., Bingham, G.** An analogue of piperonyl butoxide facilitates the characterisation of metabolic resistance. *Pest Manag. Sci.* 65: 150-154

- **Mougabure Cueto, G.A., y M.I. Picollo. 2015.** Insecticide resistance in vector Chagas disease: Evolution, mechanisms and management. *Acta Tropica* 149: 70–85.
- **Muscio, O., J. L. La Torre, M. A. Bonder, & E. A. Scodeller 1997.** *Triatoma Virus* pathogenicity in laboratory colonies of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 34:253-256.

- **Muscio, O., M. A. Bonder, J. L. La Torre, & E. A. Scodeller 2000.** Horizontal transmission of *Triatoma Virus* through the fecal-oral route in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Triatomidae). *Journal of Medical Entomology* 37:271-275.

- **Noireau, F., M. G. Rojas Cortez, F. A. Monteiro, A. M. Jansen, y F. Torrico 2005.** Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? *Trends in Parasitology* 21:7- 10.

- **OMS (Organización Mundial de la Salud).** Chagas disease (American trypanosomiasis). World Health Organization Fact sheets, 2019.
- **Picollo M, Vassena C, Orihuela P, Barrios S, Zaidemberg M, Zerba E.** High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J Med Entomol.* 2005;42:637-642.
- **Raymond, M., C. Berticat, M. Weill, N. Pasteur, & C. Chevillon 2002.** Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: What have we learned about adaptation?, pp. 287-296. En A. P. Hendry and M. T. Kinnison (eds.), Springer Netherlands.
- **Robertson, J. L., y H. K. Preisler. 1992.** Pesticide bioassays with arthropods, CRC Press, Boca Ratón, FL, Estados Unidos de Norteamérica.
- **Robertson, J. L., R. M. Russell, H. K. Preisler, & N. E. Savin 2007a.** Bioassays with arthropods, 2nd ed. CRC Press, USA.
- **Roca Acevedo, G., M.I. Picollo, N. Capriotti, I. Sierra, y P.L. Santo Orihuela. 2015.** Examining mechanism of pyrethroid resistance in eggs of two populations of the Chaga's disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 52(5): 987- 1002.
- **Roush, R. T., & J. C. Daly 1990.** The role of population genetics in resistance research and management, pp. 97-152. En R. T. Roush and B. E. Tabashnik (eds.), Pesticide resistance in arthropods. Chapman and Hall, New York.
- **Ruigt, G. S. F. 1985.** Pyrethroids, pp. 183-262. En G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology.* Pergamon Press, Gran Bretaña.
- **Santo Orihuela, P. L., C. V. Vassena, E. N. Zerba, & M. I. Picollo 2008.** Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *Journal of Medical Entomology* 45:298-306.
- **Schofield, C. J. 1994.** *Triatominae: Biología y control*, Euro-Communications Publications, West Sussex. pp. 20-29.
- **Scott, J. G., & G. D. Wheelock 1992.** Characterization of a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in the housefly, pp. 16-30. En C. A. Mullin and J. G. Scott (eds.), *Molecular mechanisms of insecticide resistance. Diversity among insects.* American Chemical Society, EEUU.

- **Scott, J. G. 1999.** Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29:757-777.
- Sfara V, Zerba E, Alzogaray RA. Toxicity of pyrethroids and repellency of diethyltoluamide in two deltamethrin resistant colonies of *Triatoma infestans* Klug 1834 (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101:89–94.
- **Sfara, V., E. N. Zerba, & R. A. Alzogaray 2006.** Toxicity of pyrethroids and repellency of diethyltoluamide in two deltamethrin-resistant colonies of *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101:89-94.
- **Stenersen, J. 2004.** Chemical pesticides. Mode of action and toxicology. CRC Press, Boca Raton, EEUU.
- **Storino R.** Etapas clínicas de la Enfermedad de Chagas. En: Librería Arcadia Editorial. Atención médica del paciente chagásico. Chagas en el siglo XXI, de la enfermedad a la problemática social. 1ª ed. Buenos Aires: Librería Arcadia Editorial; 2010:127-137
- **Traverso, G., L., Lavore, A., Sierra, I., Palacio, V., Martínez Barnetche, J., Latorre Estivalis, J.M., et al., 2017.** Comparative and functional triatomine genomics reveals reductions and expansions in insecticide resistance-related gene families *PLoS Neglected Trop. Dis.* 11, 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005313>
- **Perry, A. S., Y. Yamamoto, I. Ishaaya, & R. Y. Perry 1998.** Insecticides in agriculture and environment. Retrospects and prospects. Springer. India.
- **Vassena C, Picollo M, Zerba, E.** Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med Vet Entomol.* 2000;14:51–55
- **Vassena, C. V., G. M. Cueto, P. G. Audino, R. A. Alzogaray, E. N. Zerba, & M. I. Picollo 2003.** Prevalence and levels of permethrin resistance in *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires, Argentina. *Journal of Medical Entomology* 40:447-450.
- **WHO (World Health Organization).** Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre triatominos. *Acta Toxicológica Argentina.* 1994;2:29-32..
- **Wisnivesky-Colli C, Gürtler, R.E, Solarz, N, Ruiz, AM.** Feeding patterns of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) in relation to transmission of American Trypanosomiasis in Argentina. *J Medl Entomol.* 1982;19:645-654.
- **Zerba, E.N. 1999.** Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina* 59: 41- 46.