



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas
CIPEIN (CITEDEF/CONICET/UNIDEF)



Análisis toxicológico y bioquímico de la resistencia a insecticidas en estados embrionarios y post-embrionarios de *Triatoma infestans*, vector de la enfermedad de Chagas.



Autor: Lic. Gonzalo Roca Acevedo.

Director: Dr. Pablo Santo Orihuela.

Co-Directora: Dra. María Inés Picollo.

Consejera de estudios: Prof. Dra. Adriana Brousalis.

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos

Aires. Año 2014.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE | 1 |
| Agradecimientos | 5 |
| Resumen | 10 |
| Antecedentes | 13 |
| La enfermedad de Chagas..... | 13 |
| <i>Triatoma infestans</i> | 18 |
| Aspectos históricos y distribución geográfica..... | 18 |
| Biología..... | 22 |
| Desarrollo y ciclo de vida..... | 22 |
| Embriogénesis – Etapas del desarrollo del embrión..... | 23 |
| Control químico de <i>Triatoma infestans</i> | 27 |
| Antecedentes generales..... | 27 |
| Insecticidas..... | 28 |
| Piretroides..... | 28 |
| Antecedentes y origen..... | 28 |
| Piretroides sintéticos..... | 29 |
| Modo de acción de los piretroides..... | 31 |
| Toxicocinética de insecticidas en insectos | 37 |
| Resistencia a insecticidas | 44 |
| Definición y evolución de resistencia..... | 44 |
| Mecanismos de resistencia a insecticidas..... | 47 |
| Absorción y Penetración..... | 47 |
| Metabolismo..... | 47 |
| Monooxigenasas P450..... | 47 |
| Esterasas..... | 48 |
| Excreción o secuestro..... | 50 |
| Modificación del sitio de acción..... | 50 |

| | |
|---|-----------|
| Por mutaciones del canal de sodio dependiente de voltaje <i>kdr</i> | 50 |
| Objetivos e Hipótesis..... | 54 |
| Materiales y métodos..... | 57 |
| Material Biológico..... | 57 |
| Insecticidas y Reactivos..... | 63 |
| Caracterización de la resistencia a insecticidas en los diferentes estados de desarrollo..... | 64 |
| Ensayo biológico:..... | 64 |
| Determinación de actividad de enzimas degradantes de insecticidas..... | 67 |
| Material biológico..... | 67 |
| Medición de actividad enzimática de monooxigenasas P450..... | 67 |
| Ensayos con 7-etoxicumarina..... | 67 |
| Metodología..... | 68 |
| Medición de actividad enzimática de piretroide esterasas..... | 71 |
| Permetrato de 7-cumarilo..... | 71 |
| Síntesis..... | 72 |
| Metodología de medición de piretroide-esterasas..... | 79 |
| Mutación del canal de sodio <i>kdr</i> | 81 |
| Análisis estadístico..... | 84 |
| Análisis toxicológico..... | 84 |
| Análisis enzimático..... | 86 |
| Resultados y Discusión..... | 88 |
| Análisis toxicológico..... | 88 |
| Población Susceptible de Referencia..... | 88 |
| Análisis de los resultados..... | 89 |
| Poblaciones resistentes a deltametrina..... | 92 |
| Población “Campo Largo”..... | 92 |
| Población “Entre Ríos”..... | 94 |
| Análisis de los resultados..... | 96 |
| Actividad de Monooxigenasas P450..... | 98 |

| | |
|---|------------|
| Actividad de Piretroide Esterasas..... | 101 |
| Síntesis del 7-CP..... | 101 |
| Resultado de la cromatografía gaseosa..... | 101 |
| Resultado de la cromatografía gaseosa acoplada a masa..... | 101 |
| Resultado de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear..... | 104 |
| Medición de la actividad..... | 106 |
| Análisis de los resultados..... | 108 |
| Mutación del canal de sodio <i>kdr</i> | 110 |
| Mutación L1014F..... | 110 |
| Mutación L925I..... | 112 |
| Análisis de los resultados..... | 114 |
| Otros posibles mecanismos de resistencia..... | 117 |
| Alternativas de Control: Recomendaciones..... | 119 |
| Tabla resumen de resultados..... | 121 |
| Conclusiones..... | 123 |
| Bibliografía..... | 126 |
| Publicaciones derivadas de esta tesis..... | 152 |

Agradecimientos

Agradecimientos

A María Inés Picollo, Mariné, sin su ayuda, guía, enseñanzas y apoyo no podría haber realizado esta tesis. Por su gran cariño día a día.

A Gastón, Moni, Vale, Ariel y Toti (sin un orden particular), que siempre estuvieron para charlar y ayudarme, sobre todo en los momentos finales de esta tesis.

A mi director, Pablo, por sus conocimientos brindados para realizar esta tesis.

A Eduardo Zerba, por permitirme trabajar en este gran lugar que es el CIPEIN y por su ayuda siempre que tuve la necesidad de consultarlo.

A Paola y Héctor, que siempre que los necesité me ayudaron en general y con los aspectos químicos de mi tesis.

A Patricia Juárez, Edda Villaamil y Adriana Ridolfi por sus críticas que ayudaron a mejorar notablemente la presentación de esta tesis.

A las instituciones que financiaron y permitieron la realización de esta tesis doctoral:

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Agencia de Promoción Científica y Tecnológica.

Organización Mundial de la Salud a través del programa Tropical Disease Research.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

A mi consejera de estudios, Adriana Broussalis, por su inmejorable ayuda durante la realización de esta tesis.

A Raúl Stariolo, Mario Zaidemberg, Janútolo (padre e hijo), a toda la gente de la Coordinación Nacional de Vectores y el Ministerio de Salud, por proveerme del material biológico necesario, y su colaboración en los viajes de campo.

A Lizzy y Georgi, por el aguante cuando era tarde y me ponía de mal humor ya en los fines de la tesis y por su ayuda con temas estadísticos.

A Claudia, ayudándome y preocupándose por mis poblaciones de insectos.

A Rolando y Sheila del CREG por permitirme realizar los estudios genéticos en su laboratorio y por prestarme equipamiento. A Natalia e Ivana por sentarse conmigo a hacer los ensayos genéticos y aguantar mis innumerables preguntas.

A Emilia, Raúl, Paula, Laura(s), Ceci, Agus, Santi, Mariel y Ariadna por hacer el día a día más agradable y por su buena predisposición a ayudarme siempre que necesité algo.

A Rodri, mi gran amigo, que siempre confió en mí y me apoyó en todos mis proyectos.

A mis amigos Oscar, Hernán, Iván, Sebastián y Eduardo, por su apoyo constante y confianza todos estos años.

Al Chory, Pacho, Dosis y Nico por aguantarme desde siempre con mis locuras.

¡Lo logré!

A Romi, por ser mi todo.

A mis padres, Enrique y Marta.

A mi hermano, Martín.

Resumen

Resumen

La enfermedad de Chagas es una zoonosis transmitida al hombre por *Triatoma infestans*, un insecto hematófago que se encuentra en América Central y América del Sur. El control de este insecto depende principalmente del uso de insecticidas. Sin embargo en los últimos años aumentó en Argentina y Bolivia los informes del fracaso de los rociados con insecticidas asociados a resistencia a insecticidas piretroides. Si bien existen algunos trabajos sobre expresión y mecanismos de resistencia en ninfas de *T. infestans*, existen muy pocos estudios sobre la expresión de la resistencia en huevos de poblaciones resistentes, y no existe estudios sobre la expresión de la resistencia a lo largo del desarrollo embrionario y sus posibles causas.

El objetivo de este trabajo de tesis fue analizar la expresión de resistencia a deltametrina en el huevo en desarrollo de dos poblaciones de campo provenientes de Campo Largo-Argentina, y Entre Ríos-Bolivia. Además analizar los mecanismos enzimáticos y moleculares potencialmente asociados con la resistencia a deltametrina durante el desarrollo embrionario.

Las ninfas de ambas poblaciones de campo mostraron niveles altos de resistencia a deltametrina comparadas con la población susceptible de referencia (Entre Ríos: 173x y Campo Largo: 1.108X)

Los grados de resistencia a deltametrina estimados para ambas poblaciones resistentes en huevos de 4, 7 y 12 días de desarrollo, indicaron que la resistencia se expresa desde el desarrollo temprano en huevos de *T. infestans*, y que a lo largo de todo el desarrollo embrionario los niveles de resistencia fueron mayores en Campo Largo que en Entre Ríos (1.144x, 1.193x y 822x para Campo Largo y 21x, 15x y 39x para Entre Ríos).

Tanto para la población de referencia como para las poblaciones de campo, la efectividad de la deltametrina fue menor en huevos de 12 días respecto a huevos de 4, y 7 días de desarrollo.

La actividad de las enzimas monooxigenasas P-450 no mostró incremento significativo en las poblaciones resistentes. Este resultado sugiere que no es un mecanismo contributivo a la resistencia a deltametrina. O bien que la metodología empleada no permitió detectar un incremento de alguna fracción de ese complejo enzimático. La actividad de piretroide-esterasas mostró un incremento durante el desarrollo embrionario de todas las poblaciones estudiadas, siendo los valores más altos de actividad los correspondientes a huevos de 12 días. La actividad promedio se incrementó de 13,60 a 16,27, y a 22,21 picomoles de 7-hidroxycumarina/minuto (7-OHC) en huevos de 4-, 7-, y 12 días de la población de referencia. Los valores medios para las poblaciones resistentes fueron de 16,17, 21,44 y 26,14 picomoles de 7-OHC/minuto en el caso de Entre Ríos, y de 16,04, 17,98 y 28,87 picomoles de 7-OHC/minuto para la población Campo Largo en huevos de 4-, 7- y 12 días respectivamente.

Los estudios moleculares detectaron la presencia de la mutación *kdr* (*knockdown resistance*) L1014F en las dos poblaciones de campo, indicando que el sitio de acción alterado es un mecanismo de resistencia a deltametrina en las poblaciones de campo estudiadas. La mutación *kdr* L925I descrita en otros hemípteros no fue detectada en ninguna de las poblaciones estudiadas.

Los resultados de este trabajo de tesis, demuestran que la resistencia a deltametrina expresada en huevos en desarrollo, se deben en parte a la mayor actividad de las piretroide-esterasas y a la modificación del sitio de acción. El avance del conocimiento sobre los mecanismos de resistencia a insecticidas involucrados, permitirán optimizar las campañas de control de *T. infestans*, vector de la enfermedad de Chagas.

Antecedentes

Antecedentes

La enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, conocida también como Tripanosomiasis americana o Mal de Chagas, es una enfermedad parasitaria generalmente crónica, cuyo agente etiológico es un protozoo flagelado perteneciente al orden Kinetoplástida llamado *Trypanosoma cruzi*. El ciclo de vida (Figura 1) del parásito contempla una etapa en el insecto y otra en el humano. Su forma infectante es el tripomastigote metacíclico que es fusiforme y mide 12-30 micrones incluyendo el flagelo en la parte posterior. Presenta un núcleo central y un kinetoplasto grande con ADN mitocondrial empaquetado (Moncayo y Ortiz Yanine, 2006; Colaboradores de Wikipedia, 2015a).

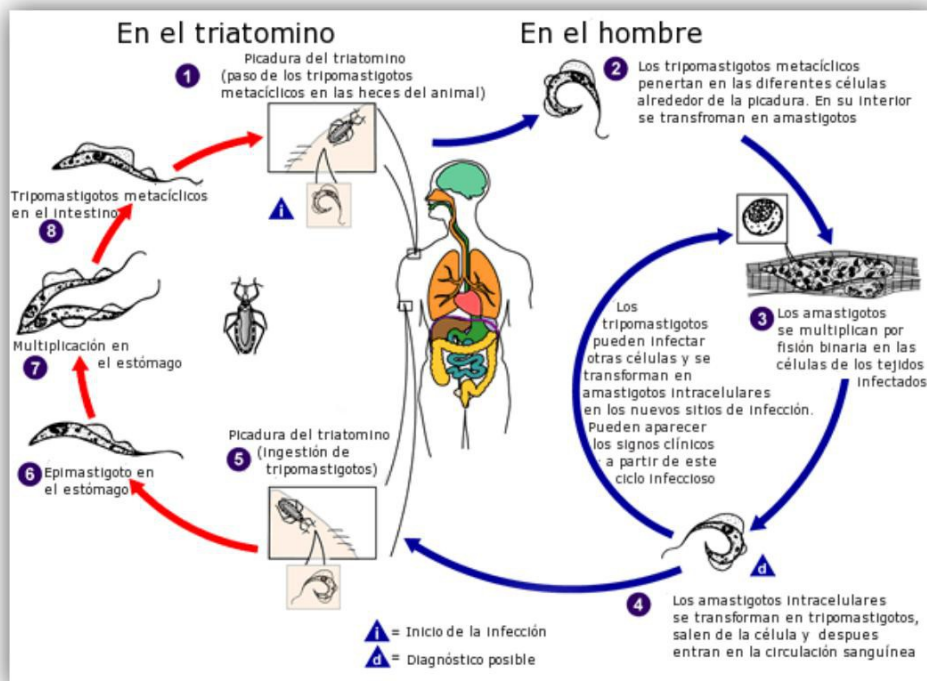


Figura 1. Esquema de la transmisión de la Enfermedad de Chagas (Colaboradores de Wikipedia, 2015b)

La enfermedad de Chagas existe nativamente en el continente americano, a pesar que actualmente se pueden encontrar infectados en todo el mundo debido a los grandes movimientos de poblaciones (Gürtler y col., 2008; Schmunis y Yadon, 2010; Ferreira y col., 2011). Su distribución en la República Argentina es amplia cubriendo toda el área del Gran Chaco, donde los habitantes rurales viven en condiciones de pobreza e indigencia (Bucher y Huszar, 1999; TDR / Organización Mundial de la Salud, 2007; Gürtler y col., 2008).

En el año 2010, se estimó que el número de infectados en la República Argentina era 2.300.000 infectados de una población de 40.091.359 personas, (7,2% de la población total). Ese mismo año, el índice de infestación domiciliar por el vector *T. infestans* fue del 2%. Existen 7.300.000 de personas expuestas a una posible infección en áreas endémicas (Gimenez y Mitelman, 2011) (Figura 2).

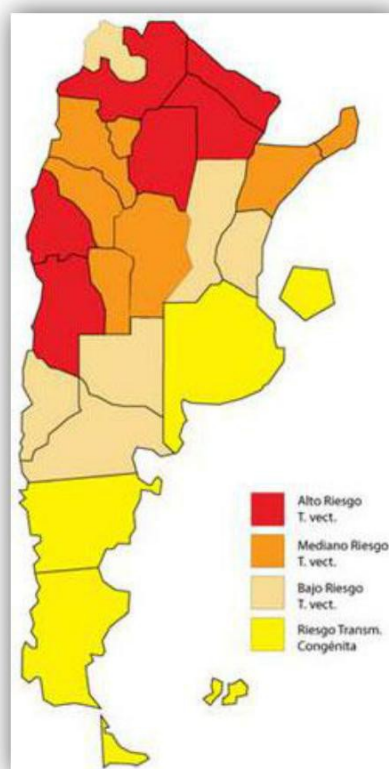


Figura 2. Riesgo de transmisión vectorial en la República Argentina
(Ministerio de Salud de la Nación, 2012).

La enfermedad de Chagas es transmitida entre seres humanos y animales principalmente a través de insectos hematófagos. En Argentina, el vector de mayor importancia es *T. infestans* (Schofield, 1994), conocido popularmente como "vinchuca". Otras vías de infección son la transmisión congénita y/o transplacentaria, por transfusión de sangre infectada, por lactancia materna, trasplante de órganos, exposición accidental en laboratorio, consumo de alimentos contaminados con triatomíneos infectados y/o heces de triatomíneos infectados (Vega Chirinos y Velarde, 2005). La persona infectada puede transitar por 3 fases de la enfermedad, asintomáticas o no y potencialmente mortales.

La fase aguda ocurre durante el transcurso de las primeras semanas y/o meses de la primo-infección. Suele presentarse con o sin síntomas, o con síntomas leves tales como como fiebre, fatiga, dolor en el cuerpo y cabeza (cefaleas), diarreas, vómitos, por lo que puede pasar en forma desapercibida y ser confundida con otra enfermedad. En ciertos casos, la inflamación local (chagoma) es signo de la infección y suele ocurrir en el lugar donde penetró el parásito. Si ocurre en el párpado del ojo donde las heces penetran al ser arrastradas al rascarse, puede aparecer el marcador más conocido de la enfermedad llamado "signo de Romaña" (figura 3). Los síntomas desaparecen luego de unas semanas o meses, pero la infección persistirá si no es tratada.



Figura 3. Niño con signo de Romaña (Torres y Salazar Schettino, 2014).

Muchos casos agudos se resuelven en un período de dos a tres meses, dando lugar a una fase crónica indeterminada en la cual la infección persiste pero no da problemas clínicos. Esta nueva fase crónica ahora llamada fase indeterminada suele ser asintomática, pero puede presentarse fiebre, anorexia, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia leve y miocarditis.

La fase crónica puede permanecer asintomática durante toda la vida o sólo por décadas, y puede presentar complicaciones cardíacas por modificaciones en el tejido del corazón (miocardiopatía) que en la etapa tardía de la enfermedad pueden llevar a insuficiencia, alteración del ritmo y/o frecuencia que pueden provocar un paro cardíaco. Las complicaciones intestinales incluyen el agrandamiento del esófago (megaesófago) o del colon (megacolon) que trae aparejado dificultades para comer o defecar. También existen complicaciones a nivel del sistema nervioso, que pueden traer aparejadas complicaciones tales como polimiositis, polineuropatías, dolor, parestesias, demencia, afecciones del sistema nervioso simpático afectando distintos órganos, meningoencefalitis, convulsiones, letargia, etc. (Sica, 2011).

En la Argentina, la lucha contra esta enfermedad conlleva un costo económico importante. El gasto anual combinado entre insecticidas, vehículos, rociado de insecticida, combustibles y salarios, asciende a \$50.357.223.000 pesos, valor muy subestimado por falta de datos fidedignos sobre costos de diagnóstico, seguimiento y tratamiento de personas infectadas. Es casi 5 veces más elevado que lo que cuesta prevenir la transmisión de la enfermedad, estimado en \$10.138.869.000 (Auger y col., 2005; Valero y Pesce, 2011).

A pesar de todas las complicaciones que trae esta enfermedad, tanto por su forma de contagio como por el curso de la enfermedad y las complicaciones que acarrea, globalmente se puede ver que las tareas sociales y de control del vector han logrado reducir la

morbimortalidad a lo largo del tiempo. Esto se puede ver en los cambios de los parámetros epidemiológicos por interrupción de la transmisión y descenso de la incidencia de esta enfermedad, entre los años 1999-2006, según TDR / Organización Mundial de la Salud, (2007):

| Parámetros epidemiológicos | 1990 | 2000 | 2006 |
|---|--------------|-------------|-------------|
| Muertes Anuales | >45.000 | 21.000 | 12.500 |
| Nuevos casos de infección humana | 30 millones | 18 millones | 15 millones |
| Nuevos casos por año | 700.000 | 200.000 | 41.200 |
| Población en riesgo | 100 millones | 40 millones | 28 millones |
| Número de países | 21 | 21 | 21 |

Triatoma infestans

Aspectos históricos y distribución geográfica

Triatoma infestans (Klug, 1834), conocida comúnmente como vinchuca es una de las 137 especies reconocidas de triatomíneos (Galvão y col., 2003).

Su importancia radica en ser el vector más importante de la enfermedad de Chagas en Argentina debido a su hábito doméstico y peridoméstico.

El ámbito doméstico son las viviendas precarias, especialmente las construidas con adobe (Figura 4), en donde el insecto puede ocultarse fácilmente de día y alimentarse con sangre de los habitantes durante la noche (Schofield, 1994).



Figura 4. Rancho típico de adobe. Cafayate, Salta

El ámbito peridoméstico son los corrales de animales criados por los habitantes, tales como cabras, ovejas, gallinas, gansos y cerdos.

Un hábitat preferido por las vinchucas son los corrales de aves (Figura 5), donde se alimentan fácilmente a pesar que el valor nutricional de la sangre de ave sea menor a la de un mamífero

(Ceballos y col., 2005; Pereira y col., 2006). Estos corrales son difíciles para aplicar insecticidas y limpiar, por lo que su supervivencia de los insectos está asegurada. Desde el punto de vista epidemiológico, representan una fuente de reinfestación del domicilio debido al movimiento de animales entre el ámbito doméstico (Reithinger y col., 2005; Cecere y col., 2006; Pereira y col., 2006) y peridoméstico (Cecere y col., 2002, 2004).



Figura 5. Ámbito peridoméstico. Corral de Aves. Salta, Argentina.

La distribución geográfica de *T. infestans* (Figura 6 A) abarca la eco-región del Gran Chaco Americano, la cual incluye zonas cálidas y secas del sudeste de Bolivia, Paraguay, y la región centro y norte de Argentina (Gorla, 2002). Se estima que en la actualidad su distribución del vector se ha reducido gracias al intensivo control químico (Figura 6 B) En Argentina, en el año 2010 se había certificado la eliminación de la transmisión vectorial en 6 de las 19 provincias endémicas (OPS/OMS, 2012).

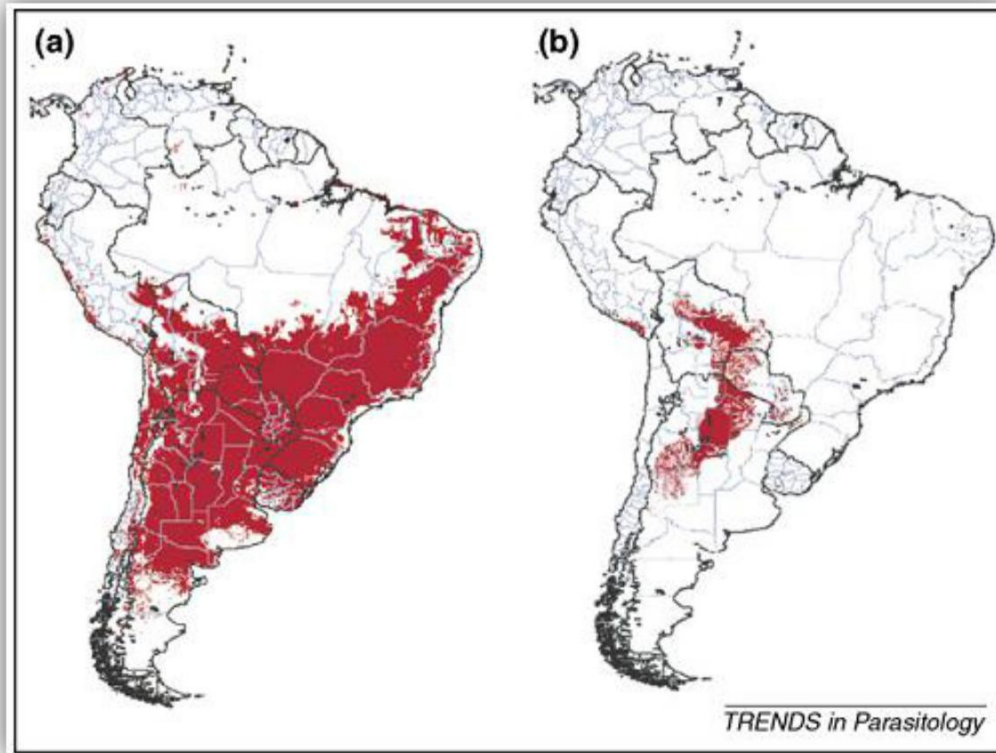


Figura 6. Distribución geográfica de *T. infestans*, (a) año 2002, (b) estimación actual (Schofield y col., 2006).

Las poblaciones estudiadas en este trabajo pertenecen al área del Gran Chaco, que comprende 1.3 millones de kilómetros cuadrados (The Nature Conservancy y col., 2005). La densidad poblacional es muy baja, menor a 5 habitantes por km², y los pueblos y asentamientos están muy dispersos y de difícil acceso. Esta área posee zonas áridas y húmedas con gran amplitud térmica, siendo las más altas las que se encuentran en el gran chaco boliviano con temperaturas que oscilan entre los 43°C en verano y 7°C en invierno. Es un área donde las condiciones para el desarrollo de enfermedades como el Chagas se ven favorecidas por los altos niveles de pobreza, y exclusión social de una población que subsiste principalmente de la explotación rural con un débil sistema de salud.

Se postula que *T. infestans* se originó en el ambiente selvático de la región de Cochabamba, Bolivia, donde fue encontrado asociado a conejillos de indias salvajes *Cavia porcellus* (Noireau y col., 1997;

Cortez y col., 2007), y también al cuis salvaje *Galea musteloides* (Torrico, 1946).

La caza y cría de estos animales por civilizaciones andinas de la región de Cochabamba, Bolivia, pudo haber causado la domesticación inicial de la vinchuca y su posterior dispersión (Dujardin y Tibayrenc, 1987). Desde ese momento, este insecto se ha diseminado por casi la mitad del continente sudamericano en forma pasiva, asociado a migraciones humanas (WHO Expert Committee, 2002). Se han descrito 2 grupos alopátricos (especiación por aislamiento) de *T. infestans* relacionados a la altitud: las poblaciones andinas y las poblaciones no-andinas. Estas poblaciones poseen diferencias a nivel genético, en especial menor cantidad de genes en las no-andinas, característica que no les impide hibridar entre sí y obtener una progenie fértil (Panzera y col., 2004).

Biología

Clasificación Científica:

Reino: Animalia
Phylum: Arthropoda
Clase: Insecta
Orden: Hemiptera
Suborden: Heteroptera
Familia: Reduviidae
Subfamilia: Triatominae
Género: *Triatoma*
Especie: *T. infestans*



Adulto, Hembra de *T. infestans*.

Desarrollo y ciclo de vida

El desarrollo de *T. infestans* es el típico de un insecto hemimetábolo. Comienza en huevo, le siguen cinco estadios larvales (ninfas), y finalmente el adulto de color pardo con un borde de bandas transversales claras y oscuras que rodea el abdomen. El tamaño varía desde 2 mm para la ninfa I hasta 3 cm para el adulto (Schofield, 1994) (Figura 7).

Todos los estados son hematófagos y conviven en el mismo hábitat. Las ninfas requieren una sola alimentación a repleción para estimular la muda. Las hembras pueden depositar hasta 600 huevos durante su vida de aproximadamente 1 año y medio. Estos huevos, eclosionan luego de 15-20 días (Picollo de Villar, 1979). Los insectos adultos copulan varias veces durante sus vidas, lo que incrementa su variabilidad genética (Schofield, 1994).



Figura 7. Ciclo de vida de las Vinchucas (Ministerio de Salud de la Nación, 2012).

Los triatominos pueden pasar hasta 200 días sin ingerir alimento, pero durante ese tiempo no podrán desarrollarse.

Son más activos a la noche, donde utilizan distintas claves químicas (CO₂) y termales (calor) para ubicar su fuente de alimento al atardecer y buscar escondite al amanecer (WHO Expert Committee, 2002; Catalá, 2011).

Embriogénesis – Etapas del desarrollo del embrión

En el momento de la oviposición el huevo es color blanco, oval, ligeramente aplastado en el lado dorsal, y cubierto por el corion transparente que permite visualizar el desarrollo embrionario. El corion representa una dura barrera mecánica debajo de la cual se encuentra la membrana vitelina (Picollo de Villar y col., 1979).

En el extremo anterior del huevo está el opérculo, que permite el intercambio de aire y la emergencia de la ninfa en el momento de la eclosión.

Del día 1 al día 3 del desarrollo, el huevo es de color amarillento y forma oval perfecta. Para el 3er día las capas embriónicas (ectodermo y mesodermo) ya están bien definidas y el ectodermo extra-embrionario ha comenzado su desarrollo.

A partir del 4to día, aparece una hendidura lateral que se incrementa cada día. Hacia el fin de este día, termina la formación de

membranas embrionarias y extraembrionarias. (Figura 8). La banda germinal es irregular en su grosor, marcando el inicio de la segmentación embrionaria. Se pueden observar también el surco neural en formación con neuroblastos y células nerviosas en cortes al microscopio.



Figura 8. Huevo de 4 días de desarrollo.

En el 7mo día aparecen 2 pequeñas manchas rojizas en la parte posterior del huevo. Son las manchas oculares y corresponden al período en el cual comienza la migración del embrión (ver figura 9). En este momento, se puede observar el neuropilo (región donde se encuentran los axones y ocurren las sinapsis), de los ganglios nerviosos y neuronas diferenciadas en la periferia (Klowden, 2013). El cordón nervioso se encuentra completamente formado. La blastokinesis comienza en este estadio del desarrollo.



Figura 9. Huevo de 7 días de desarrollo. Contraste aumentado para poder visualizar las manchas oculares rojizas.

En el 8vo día las manchas oculares están ubicadas en la parte anterior dorsal, y el huevo comienza a tomar un color anaranjado claro. La blastokinesis ha terminado.

En el 9no día aparecen rayas rojizas transversales en la parte dorsal del embrión, signo de la segmentación abdominal. En este momento el sistema nervioso ya está completo.

En el 10mo día, las manchas oculares se oscurecen, y finalizan los procesos de diferenciación de los tejidos y órganos, definiendo la forma de la cabeza, partes bucales y segmentación del tórax.

En el 11vo día, las manchas oculares son totalmente negras, y el corion es de color anaranjado oscuro.

En el 12vo día, el corion es de color rojo claro, y los músculos se encuentran bien diferenciados. Todavía no se pueden diferenciar estructuras bajo lupa (excepto las manchas oculares en la parte anterior) y el huevo es de color naranja, ver figura 10.

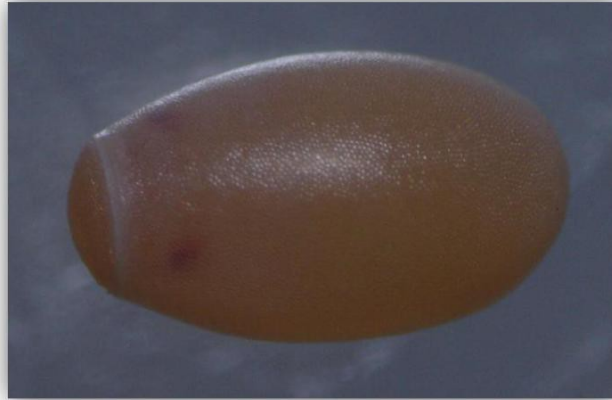


Figura 10. Huevo de 12 días de desarrollo.

En el 13vo día, el corion es de color rojo oscuro, y se visualizan los apéndices torácicos y bucales en la parte ventral.

El 14vo día el huevo es de color violeta, y se puede apreciar al embrión formado bajo microscopio estereoscópico.

El día 15 se produce la eclosión del huevo, con ruptura del opérculo (Picollo de Villar, 1979; Hinton, 1981; Picollo y Zerba, 1987; Fichera y Riarte, 1992).

Existen pocos estudios sobre la presencia de enzimas en general en el huevo de *T. infestans* en desarrollo. Sin embargo se reportó la existencia de colinesterasas durante la neurogénesis en *T. infestans*. Visciarelli y col., (2011) demostraron la presencia de actividad de acetilcolinesterasas en el día 4 de desarrollo, siendo más significativa en el día 5. Klowden (2013), informó que en el 7mo día de desarrollo se puede diferenciar el neuropilo de los ganglios nerviosos y neuronas periféricas. P de Villar y col., (1979) reportaron la detección de actividad de colinesterasas desde el 4to día de desarrollo del embrión. P de Villar y col., (1980) también informó un aumento de actividad de estererasas desde el 8vo día de desarrollo del embrión.

Control químico de *Triatoma infestans*

Antecedentes generales

Las herramientas utilizadas para reducir la incidencia de la enfermedad de Chagas fueron el control químico de los vectores, el análisis de sangre de donantes en zonas endémicas, el control de la transmisión congénita y el tratamiento de individuos infectados y casos agudos (TDR / Organización Mundial de la Salud, 2007; Coura y Dias, 2009).

Históricamente, el control del vector se realizó mediante el rociado de casas/ranchos y sus peridomicilios con insecticidas con acción residual (Gürtler y col., 2007).

En los años 50s se utilizaron insecticidas organoclorados como el DDT el beta-hexaclorociclohexano (β -HCH) en el cono sur y el gamma-hexaclorociclohexano (γ -HCH) o Lindano, en el norte de Latinoamérica. A fines de los 60's se comenzó a utilizar insecticidas anticolinesterásicos como los organofosforados y carbamatos. Y a principio de los 80's comenzó el uso de piretroides, que fueron y son la herramienta más importante en el control de triatomíneos debido a sus favorables propiedades toxicológicas (Zerba, 1999).

El uso prolongado de piretroides en las campañas de control de *T. infestans* trajo aparejada la selección de individuos resistentes de las poblaciones tratadas, y las fallas de control a campo. Las primeras evidencias de aparición de resistencia a insecticidas fue detectada en poblaciones de Brasil (Vassena y col., 2000), y numerosos focos fueron detectados en Argentina en los años subsiguientes (Picollo y col., 2005; Toloza y col., 2008; Lardeux y col., 2010; Germano y col., 2010).

Insecticidas

Piretroides

Antecedentes y origen

Los insecticidas piretroides tienen su origen en las piretrinas. Éstas son compuestos de acción insecticida natural, biosintetizados por la planta del piretro *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Esta especie vegetal acumula los componentes activos en las flores, especialmente en los aquenios, que están comprendidos por 6 componentes resultantes de la esterificación del ácido pirétrico y del ácido crisantémico con 3 variedades de alcoholes: piretrolona, jasmolona y cinerolona. Estos componentes a su vez presentan isomería. La combinación de los alcoholes con los ácidos da origen a seis componentes distintos, que se pueden apreciar en la Figura 11.

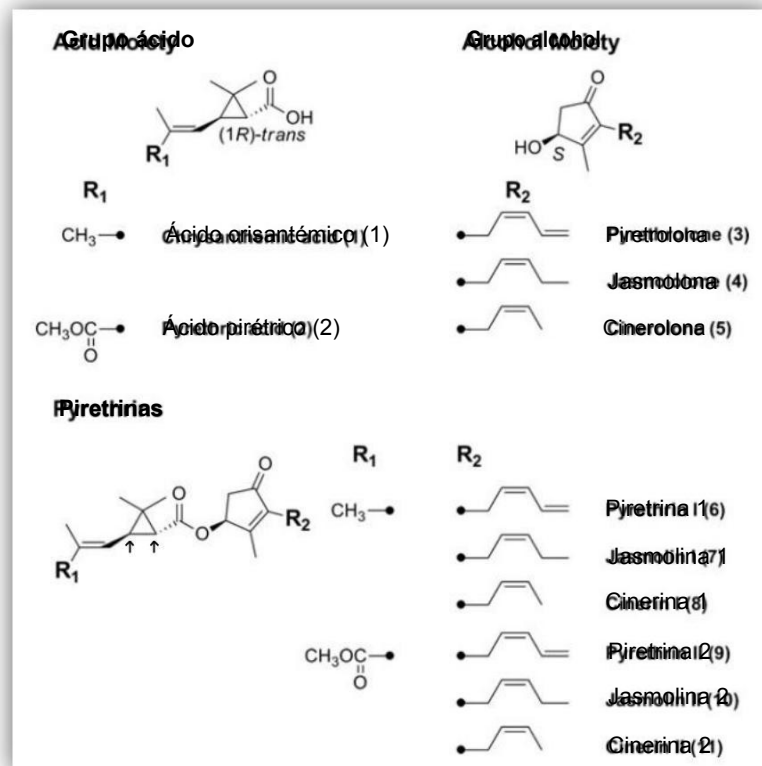


Figura 11. Componentes de las piretrinas modificado de Matsuo y Mori, (2012).

Estos compuestos naturales son rápidamente degradados por la luz solar y el oxígeno, limitando su uso. Estas características determinan que sean naturalmente sustentables porque al ser degradados rápidamente por la luz solar (baja persistencia) no contaminan el medio ambiente. Estas mismas características determinan su dificultad para ser utilizados regularmente en el control de vectores a campo. Para sobrepasar esta limitación, se han desarrollado análogos sintéticos llamados "piretroides" que son más fotoestables y potentes (Matsuo y Mori, 2012).

Piretroides sintéticos

La mayoría de los piretroides sintéticos fueron descubiertos por el reemplazo secuencial de elementos estructurales de las piretrinas con nuevas variedades estructurales seleccionadas para mantener la forma y propiedades físicas de la molécula original.

Posteriormente se descubrieron nuevos compuestos basados en las modificaciones originales de las piretrinas, con buena actividad insecticida y otras propiedades que dieron origen a las distintas generaciones de piretroides sintéticos.

La inclusión de un grupo alfa-ciano en la molécula substituyendo el 3-fenoxibencil de la fracción alcohólica, dio origen al insecticida utilizado en este trabajo, la deltametrina (Figura 12), un compuesto con mayor potencia insecticida que otros piretroides sintéticos.

Aunque la mayoría de los piretroides se encuentran en el mercado como una mezcla racémica, los formulados a base de deltametrina suelen ser presentados como un solo estereoisómero específico, 1R *cis* S alfa-cyano 3-fenoxibencil, que posee mayor actividad insecticida.

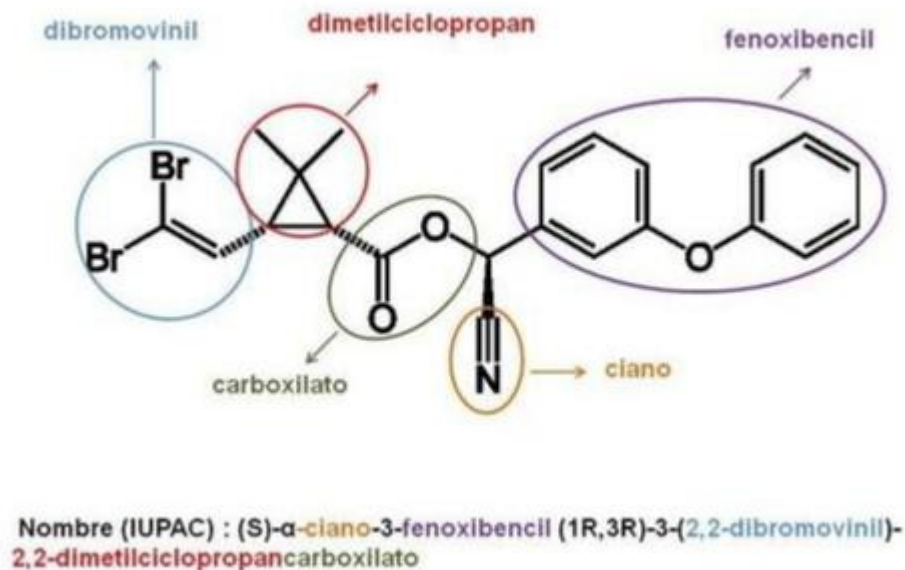


Figura 12. Molécula de Deltametrina.

Los piretroides sintéticos relacionados en estructura a la deltametrina constituyen la mayor subfamilia química de piretroides en uso actualmente (Nishizawa, 1971; Davies y col., 2007; Matsuo y Mori, 2012).

Modo de acción de los piretroides

Los insecticidas piretroides ejercen su acción sobre los canales de sodio dependientes de voltaje. Éstos son parte integral del sistema nervioso del insecto. Poseen 3 características: activación dependiente del voltaje, rápida inactivación y conducción selectiva de iones (sodio).

Un potencial de acción se inicia con un estímulo produce que el potencial eléctrico de la membrana llegue a un nivel en el cual los canales se abren, permitiendo la entrada de iones de sodio positivos dentro de la célula y despolarizando la membrana. El potencial de repolarización ocurre cuando los canales de sodio se inactivan (su estado es cerrado y previene que puedan volver a abrirse en este momento) y los canales de potasio se encuentran abiertos. Cuando la célula se vuelve a polarizar, los canales de sodio revierten a un estado cerrado, listos para volver a abrirse ante el próximo potencial de acción. Este potencial dura unos pocos milisegundos y su acción es todo o nada. En la figura 13 se puede apreciar un ejemplo de un potencial de membrana y las variaciones que sufre a lo largo de la despolarización y repolarización, junto a un esquema de los diferentes estados del canal (Menn y Hollingworth, 1985).

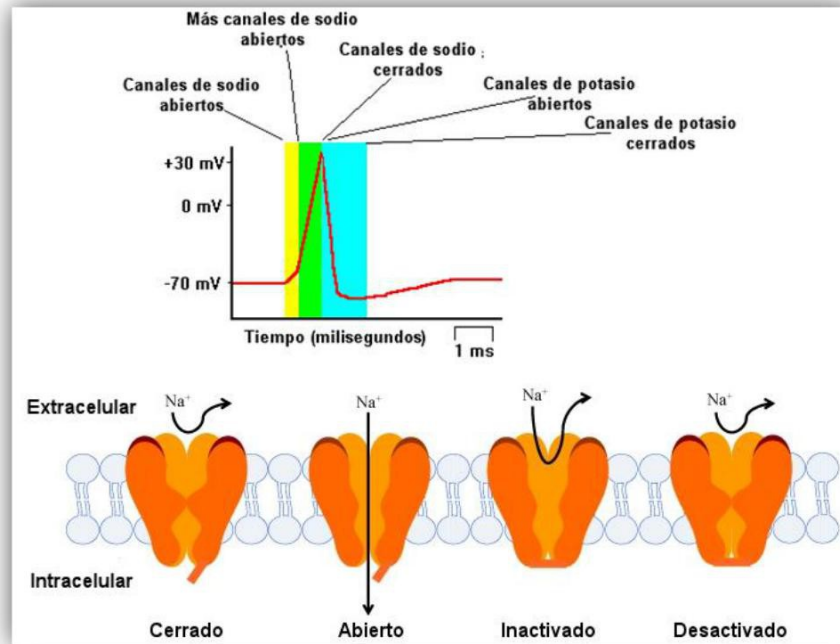


Figura 13. Modificado de Chudler, (2015) y Wakeling y col., (2012).

El canal de sodio está compuesto de una gran subunidad que es funcional por sí misma. En su primera secuencia, esta subunidad está plegada dentro de 4 dominios (I-IV). Estos dominios son similares, y cada uno posee 6 regiones (S1-S6) alfa-hélice transmembrana. S1-S4 es la región encargada de detectar cambios de voltaje del dominio, y S4 es el sensor de voltaje, ya que posee varios residuos positivamente cargados y 2 residuos hidrofóbicos responsables de monitorear cambios de voltaje.

El pequeño poro selectivo a iones de sodio está formado por loops re-ingresantes entre las hélices S5 y S6. Los loops intracelulares más grandes unen los 4 dominios. El canal en sí es un tetrámero, rotacionalmente simétrico. Los dominios se encuentran organizados alrededor del poro central, de manera que la parte intracelular de cada dominio tenga una región que detecta cambios de voltaje y una región formadora de poro. EL canal también posee una o más subunidades beta, las cuales son multifuncionales y regulan el disparo del canal y la modulación a nivel de la expresión del canal. También son células de adhesión, y se están estudiando posibles

futuros usos sobre su posibilidad de regular las subunidades . En la figura 14 se puede apreciar un diagrama y un esquema tridimensional del canal de sodio (Soderlund, 2008; Payandeh y col., 2011; Wu, 2011).

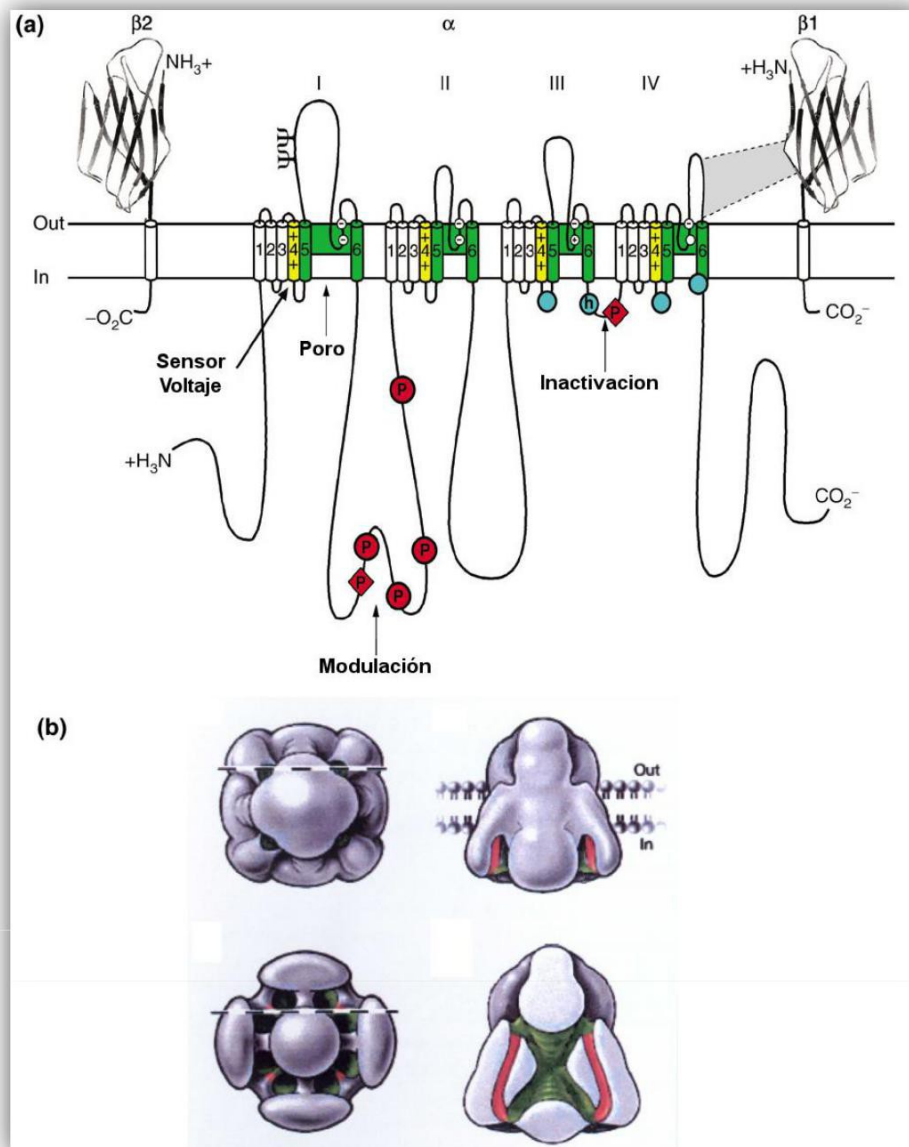


Figura 14. A) 4 dominios del canal de sodio, el poro se encuentra entre S5 y S6. Las hélices S4 en amarillo. Se muestran las 2 subunidades beta. EL loop reentrante en cada dominio marca el filtro que le da la selectividad al canal. B) Estructura 3d de la subunidad . De izq arriba a derecha abajo: vista superior, lateral, inferior, sección. Modificados de Catterall, (2001, 2012).

Existen ciertas diferencias en los modos de acción de los piretroides, dependiendo si son del tipo I o II.

Los del tipo I, llamados "no- α -cianopiretroides" que no poseen un grupo α -ciano, como son las piretrinas naturales y los sintéticos aletrina, tetrametrina, resmetrina, fenotrina y permetrina.

Los del tipo II son los " α -cianopiretroides", que poseen un grupo α -ciano, como la cipermetrina, deltametrina y al fenvalerato entre otros.

En insectos, los piretroides del tipo I provocan la imposibilidad de mantenerse en reposo "restlessness", incoordinación e hiperactividad seguidos de postración y parálisis. Los del tipo II producen una fase convulsiva a pocos minutos de la exposición, en la cual los insectos pierden la coordinación.

Está establecido que los piretroides de tipo I prolongan el período de liberación de sodio durante la fase de excitación, por cambios en los mecanismos de apertura y cierre de las bombas, causando un potencial de despolarización muy grande. Cuando este potencial excede el nivel de tolerancia de la membrana, se generan disparos repetitivos causando hiperexcitación.

En el caso de los piretroides de tipo II, al provocar una fase convulsiva muy pronunciada poseen un mejor potencial de volteo y muerte por la despolarización irreversible de los axones y sus terminales debido a las grandes descargas que generan.

Esta diferencia fisiológica se explica por el hecho que la duración de la permeabilidad de los canales de sodio se encuentra modificada en el orden de 10 a 100 milisegundos en el caso de los del tipo I, y de varios segundos o más para los del tipo II, provocando una despolarización más fuerte de la membrana. (Davies y col., 2008; Soderlund, 2010).

En la figura 15 se puede apreciar como altera un piretroide la despolarización y repolarización de un canal de sodio.

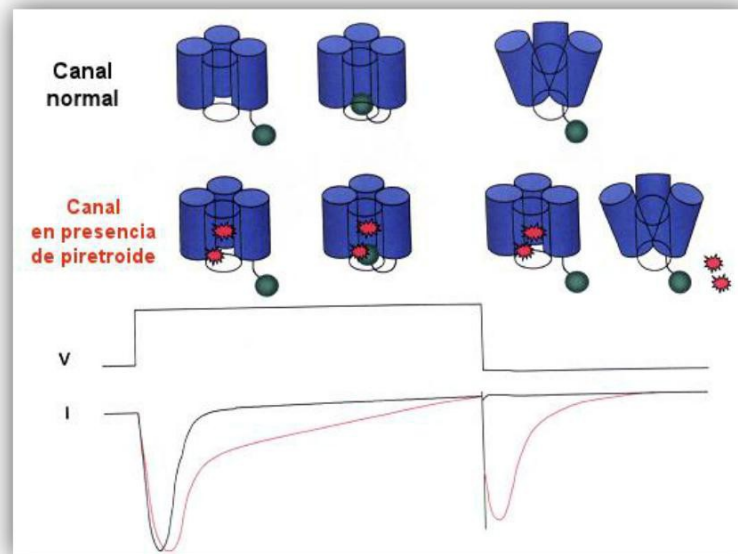


Figura 15. (V = Voltaje, I = Corriente de conducción) En el canal normal se aprecia una rápida despolarización (I, línea negra inferior) y se inactivan inmediatamente. En presencia de piretroides, se ralentiza la activación y la inactivación, provocando la recuperación del estado activo antes que el canal vuelva a cerrarse, y los canales se abren desde el estado inactivo directamente, provocando una larga cola de conducción (I, línea roja). Modificado de Atkinson (2003).

Teniendo en cuenta que sólo una pequeña cantidad de los canales de sodio es necesaria para elevar el potencial al punto de generar descargas repetitivas, se comprende porqué ambos tipos de piretroides son tan ampliamente utilizados como insecticidas (Davies y col., 2007).

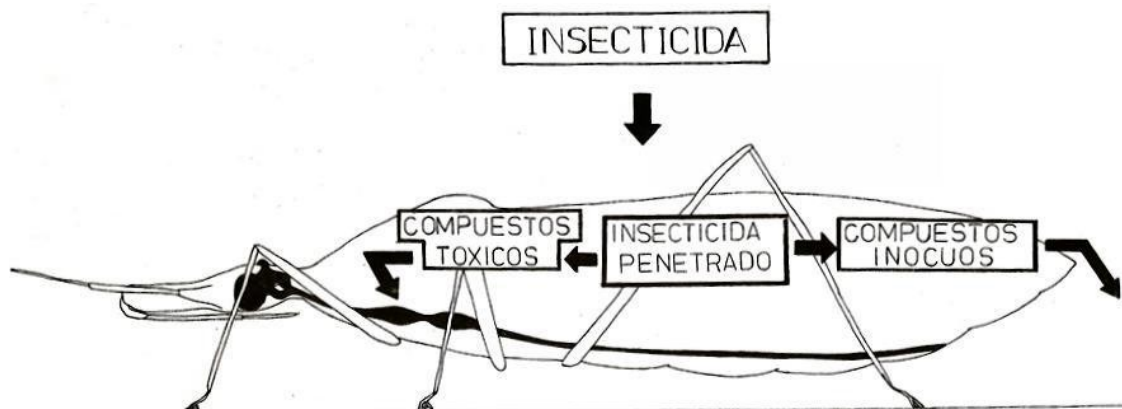
Esta clasificación no es absoluta, compuestos como la cifenotrina tienen efectos de ambos tipos, tales como ser tipo I bajo un criterio electrofisiológico (de acuerdo a como se suceden las descargas repetitivas), o ser de tipo II basado en la sintomatología *in vivo*.

A su vez, la toxicidad de los piretroides es altamente dependiente de la estereoquímica. Tanto los *cis*- como los *trans*- poseen actividad insecticida, y en gran parte dependen del alcohol que los compone. Los crisantematos que poseen un 3-fenoxibenzil suelen ser más tóxicos en configuración *cis* mientras que los isómeros *trans* de análogos de aletrina son los más tóxicos. En todo caso, para todos los análogos del ácido crisantémico, la configuración 1R del ciclopropano

C1 es un requerimiento absoluto para que tengan actividad

insecticida (Perry y col., 1998; Davies y col., 2007; Soderlund, 2010).

Toxicocinética de insecticidas en insectos



La interacción entre el insecticida y un insecto es un proceso complejo. Varios pasos pueden distinguirse, tales como la absorción y penetración, distribución, biotransformaciones activantes o inactivantes, interacción con el objetivo y su excreción. Un insecticida, para poder ejercer su efecto tóxico debe superar varios de estos pasos.

Absorción y penetración:

La vía de ingreso más importante del insecticida en el caso del control químico de *T. infestans*, es la cuticular.

La cutícula posee diferentes capas de polaridad creciente (desde el exterior hacia el interior), comenzando con una epicutícula (5% de la cutícula) que contiene ceras (hidrocarburos 12-32), ésteres de ácidos grasos, alcoholes saturados y proteínas diversas. Esta capa no posee quitina, que es un carbohidrato compuesto por monómeros de N-acetilglucosamina que conforman un polímero. Es impermeable y evita la pérdida de agua. Cubre toda la superficie del insecto excepto ciertas áreas sensoriales. Luego se encuentra la procutícula (95% de la cutícula), que está compuesta por la exocutícula y la endocutícula. La exocutícula es rígida, y no es destruida durante la muda del insecto, suele estar pigmentada y tiene poca cantidad de quitina. La

endocutícula es la capa más interna que descansa sobre la epidermis, posee alta proporción de quitina, es elástica y es destruida durante la muda. Las cutículas son flexibles, pero pueden extenderse gracias a las membranas intersegmentales, en las cuales la epicutícula se encuentra plegada y la exocutícula está casi totalmente ausente (Webb y Green, 1945; Wigglesworth, 1948; Bloomquist y Dillwith, 1985; Fontan y Zerba, 1987).

Muchos insecticidas sintéticos pueden atravesar fácilmente la capa cerosa externa de la cutícula por su propiedad lipofílica. La penetración es más eficiente en regiones donde la cutícula es más delgada, tales como las membranas intersegmentales (Fontan y Zerba, 1987). Las propiedades físicas y químicas del solvente utilizado para formular el insecticida afectan la eficiencia de la penetración. (Webb y Green, 1945).

Distribución:

Una vez que el insecticida ingresó al insecto es distribuido por medio de la hemolinfa a todo el organismo del insecto, ya sea libre o unido a proteínas (Brooks, 1976; Welling, 1977). Un incremento del secuestro puede ocurrir cuando enzimas o proteínas del insecto se unen a los insecticidas, transfiriéndolos y alejándolos del sitio donde ejercen su acción tóxica (Pittendrigh y col., 2008).

Biotransformación:

Los insecticidas lipofílicos sufren diferentes transformaciones químicas mediadas por enzimas que los transforman en compuestos más polares fácilmente excretados del organismo. Las principales enzimas que llevan a cabo estos procesos de detoxificación de

xenobioticos en insectos son las monooxigenasas P450, las esterasas y las glutatión S-Transferasas (Ortiz-Hernández y col., 2013).

Las monooxigenasas P450 son un grupo de enzimas presente en la mayoría de los organismos, incluyendo bacterias, hongos, mamíferos e insectos. Comprenden una gran familia de proteínas hemo-tiolato, que actúan tanto en compuestos endógenos y hormonas esteroideas, como en xenobióticos tóxicos que un insecto puede encontrar en su ambiente. Las monooxigenasas P450 metabolizan insecticidas por N-, O- y S-alquil hidroxilación, hidroxilación aromática, hidroxilación alifática y epoxidación, oxidación de enlaces éster y tioeter, y oxidación de nitrógeno (Figura 16) (Scott y col., 1998; Feyereisen, 1999; De Montellano, 2005; Scott, 2008).

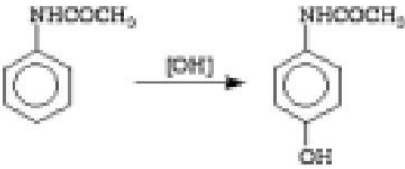
| | |
|--------------------------------|--|
| Hidroxilación aromática |  |
| Hidroxilación alifática | $R-CH_3 \xrightarrow{[OH]} R-CH_2-OH + H^+$ |
| N-Dealquilación | $R-NH-CH_3 \xrightarrow{[OH]} [R-NH-CH_2OH] \longrightarrow RNH_2 + CH_2O$ |
| O-Dealquilación | $R-O-CH_3 \xrightarrow{[OH]} [R-O-CH_2OH] \longrightarrow ROH + CH_2O$ |
| Deanimación | $R-CH(NH_2)-CH_3 \xrightarrow{[OH]} R-C(OH)(NH_2)-CH_3 \longrightarrow R-CO-CH_3 + NH_3$ |
| N-Oxidación | $(CH_3)_3N \xrightarrow{[OH]} [(CH_3)_3NOH]^+ \longrightarrow (CH_3)_3NO + H^+$ |
| Sulfoxidación | $R-S-R \xrightarrow{[OH]} [R-SOH-R]^+ \longrightarrow R-SO-R + H^+$ |

Figura 16. Ejemplos de reacciones catalizadas por el citocromo P450 (Castell, 2006).

Estas enzimas están constituidas por dos componentes: una flavoproteína NADPH-citocromo P450 reductasa y el citocromo P450 (una enzima con un grupo hemo, cuyo nombre deriva del hecho de que su forma reducida combinada con monóxido de carbono produce un complejo que absorbe a 450 nm) en forma de numerosas isoenzimas con múltiple especificidad de sustratos. La función de la reductasa es la de transferir dos electrones del NADPH al citocromo P450 para ser utilizados en la reducción del oxígeno molecular a agua pudiendo de esta manera oxidar gran variedad de sustratos orgánicos (Figura 17) (De Montellano, 2005; Devlin, 2006).

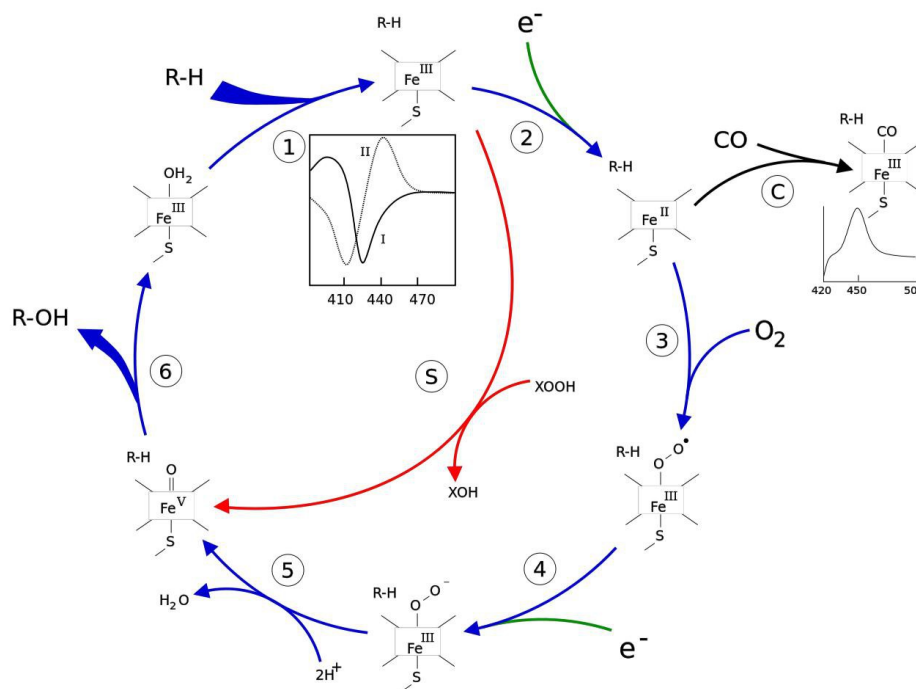


Figura 17. Ciclo catalítico para la activación y transferencia de oxígeno por el citocromo P450 (Colaboradores de Wikipedia, 2015c).

En insectos se la encuentra en el retículo endoplásmico de casi todos los tejidos (Feyereisen, 1999).

Son un grupo grande y muy bien caracterizado de enzimas que son reconocidas por su gran potencial en muchos procesos, particularmente por su capacidad de catalizar reacciones de transformación modificando numerosas moléculas orgánicas, mediante reacciones tales como la reducción y escisión de oxígeno

molecular y la fijación de un átomo de oxígeno a una gran variedad de sustratos con grandes consecuencias en el metabolismo de insectos.

La química en la que participan el Fe (Hierro), O (Oxígeno) y el centro activo hemo-tiolato de la enzima constituye el principal denominador entre la P450. La estructura restrictiva del cerramiento dado por las proteínas del grupo hemo también llamado "housing" determina qué tipo de estructuras químicas pueden tener acceso al sitio activo, es decir la selectividad de sustrato de cada CYP en particular.

Las monooxigenasas del Citocromo P450 juegan roles importantes en los organismos vivos. Algunos citocromos se encargan de catalizar reacciones de oxidación relacionadas con procesos metabólicos, tales como la síntesis o degradación de compuestos tales como hormonas, ácidos grasos. Existen otros citocromos encargados de la oxidación de xenobioticos (tóxicos o no), para permitir que sean eliminados más fácilmente (De Montellano, 2005).

Debido a su baja especificidad, las P450 metabolizan un amplio rango de insecticidas, incluyendo a los piretroides (Figura 18) (Ortiz-hernández y col., 2013).

Las principales familias de genes de citocromos microsomales (1, 2, 3 y 4) pueden ser encontradas en vertebrados. En los insectos, se encuentran en la mayoría de los tejidos, y están involucradas tanto en síntesis y degradación de ecdisteroides y hormona juvenil como en el metabolismo de xenobióticos naturales y sintéticos (Feyereisen, 1999). La gran importancia de los citocromo P450 en el metabolismo de insecticidas ha sido demostrada en insectos por Agosin, (1985) y Scott y col., (1998).

Las esterasas son hidrolasas, enzimas que principalmente hidrolizan ésteres o agregan moléculas de agua para dar alcoholes y ácidos. Existen muchos tipos de esterasas con distinta afinidad a

sustratos, distinta estructura proteica, y distinta función biológica (Li y col., 2007).

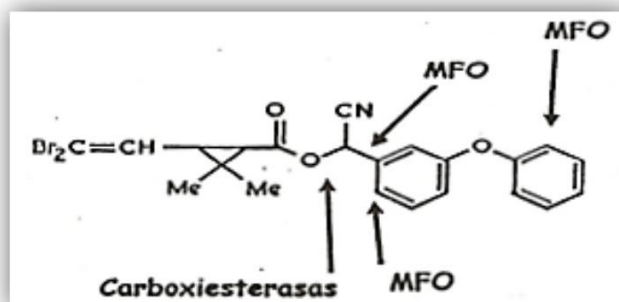


Figura 18. Ejemplo de sitios de ataque a la molécula de deltametrina por Monooxigenasas P450 y carboxiesterasas.

Las esterasas son enzimas de distribución ubicua que catalizan reacciones hidrolíticas sobre multiplicidad de sustratos, ya que hidrolizan la unión éster.

Son proteínas de bajo peso molecular y se las encuentra en su gran mayoría solubles en la hemolinfa de los insectos.

En general, en una reacción catalizada por esterasas, se hidrolizan una amplia variedad de rangos de ésteres obteniendo un alcohol y un ácido, como se indica en la figura 19.

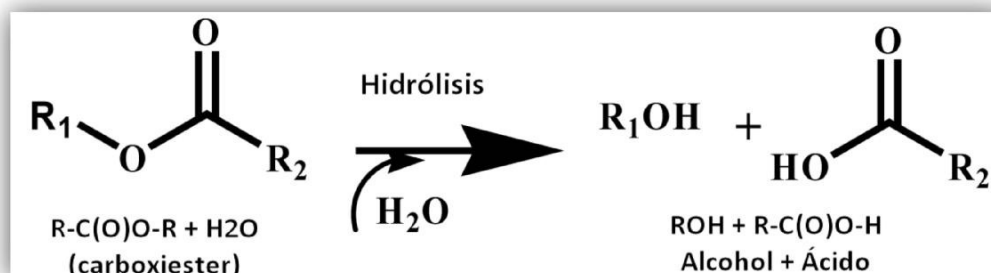


Figura 19. Reacción de hidrólisis mediada por una carboxiesterasa, modificado de Wheelock y col., (2005).

Su clasificación ha generado controversia a lo largo de la historia, debido a la alta complejidad de los diferentes criterios utilizados en su clasificación (Montella y col., 2012). Aldridge, (1953a, 1953b), propuso una clasificación basado en la interacción de las esterasas

con organofosforados. De acuerdo a esta clasificación, se pueden separar en:

Esterasa A (est-a, Arilesterasas): enzimas que hidrolizan organofosforados y poseen una cisteína acetilada en sus sitios activos.

Esterasa B (est-b, Carboxi/colinesterasas): enzimas que son inhibidas por organofosforados como el paraoxón. Y poseen una serina en su sitio activo.

Esterasa C (est-c, Acetilesterasas): no interactúan con organofosforados, y tampoco son inhibidas por ellos.

Esta clasificación es muy utilizada actualmente, debido a su facilidad de uso y la falta de otros sistemas de nomenclatura (Wheelock y col., 2005).

El comité de enzimas (una asociación patrocinada por el Comité Internacional de Nomenclatura de Bioquímica y Biología Molecular "NC-IUBMB") hasta el año 1984, a través de análisis más profundos de las esterasas, su diversidad de residuos, y un análisis más detallado de los sustratos que hidrolizan, llegaron a la siguiente clasificación:

Esterasas A o Arilesterasas: No son inhibidas por paraoxón (un insecticida organofosforado), y poseen una preferencia por compuestos alifáticos.

Esterasas B o Aliesterasas: Son inhibidas por paraoxón, y tienen una preferencia por compuestos aromáticos.

En esta clasificación más simple, los términos Est-A y Est-B son muy utilizados actualmente por diferentes autores para separar a las esterasas en 2 grupos (Montella y col., 2012).

Esta nomenclatura, se refiere a grupos de enzimas, y no a algún tipo en particular.

Resistencia a insecticidas

Definición y evolución de resistencia

“La resistencia es un cambio genético de una población en respuesta a la selección por sustancias tóxicas, que imposibilita el control en el campo” (Sawicki, 1987).

Definimos a la resistencia como la capacidad que presenta una población de soportar o tolerar altas dosis de insecticida en relación a una población normal de la misma especie (Roush y Daly, 1990).

Es un fenómeno evolutivo, el cual necesita de un análisis genético y molecular para poder ser comprendido en más profundidad. Dentro de ese marco, la resistencia puede ser causada por modificaciones en un solo locus, en un número limitado de locus, o puede estar influenciada bajo control poligénico. Dentro de una población, la herencia, la frecuencia de ciertos genes, y la presión de selección son factores muy importantes en el desarrollo de resistencia a un insecticida.

La aplicación de insecticidas en una población produce la selección de los individuos resistentes que sobreviven a la dosis aplicada. Si este proceso se da progresivamente, la proporción de individuos susceptibles en la población (A, en Figura 20) se reduce provocando el corrimiento de la curva poblacional (B, en Figura 20) donde la mayoría de los individuos de la población son resistentes (McKenzie, 1996).

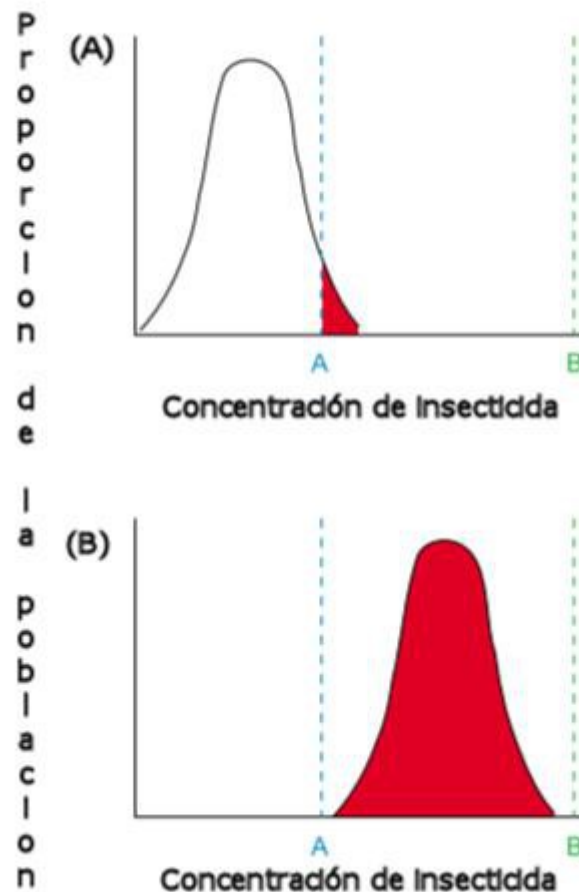


Figura 20. Resultado de la selección de individuos por insecticidas.
Curva en blanco: individuos susceptibles. En Rojo: Resistentes.

El nivel o grado de resistencia de una población se determina mediante la curva obtenida al graficar dosis-mortalidad. Esta curva, puede convertirse en una recta mediante la transformación logarítmica de las dosis y la transformación probit (probabilidad estadística de que un porcentaje de mortalidad ocurra en la población en estudio) de la mortalidad. La elección de una dosis en particular, como la DL_{50} (Dosis Letal 50, dosis de insecticida necesaria para matar al 50% de los individuos de una población), permitirá comparar la susceptibilidad de las poblaciones en estudio respecto a una población de referencia.

Para una correcta interpretación de los resultados es necesario calcular la proporción de una dosis letal respecto de otra con estimaciones de error, y la forma menos restrictiva es estimar el

intervalo de confianza al 95% para cada proporción. Esta estimación se realiza en base a los parámetros de la curva dosis respuesta obtenida mediante una regresión probit de acuerdo a Robertson y col., (2007).

El grado de resistencia es un parámetro estadístico que expresa el factor por el cual es necesario multiplicar la dosis de insecticida que produce mortalidad en un individuo susceptible para producir la misma mortalidad en individuos resistentes (Roush y Tabashnik, 1991). Es importante conocer este valor porque valores de resistencia muy altos indican que las dosis de insecticida utilizadas serán ineficientes para controlar a la población.

Mecanismos de resistencia a insecticidas

Absorción y Penetración

Como se mencionó anteriormente, una de las formas de ingreso del insecticida es la penetración por la cutícula (Bloomquist y Dillwith, 1985).

La reducción de la penetración cuticular es un mecanismo que confiere bajos niveles de resistencia a un gran rango de insecticidas, y a su vez puede mejorar los niveles de resistencia cuando actúa en conjunto con otros mecanismos. Cambios en la estructura de la cutícula son un ejemplo de este caso (Pedrini y col., 2007, 2009).

También se considera que la penetración disminuida puede darle más tiempo a las enzimas para degradar insecticidas antes que el compuesto llegue a su sitio de acción (Plapp y Hoyer, 1968). Por ejemplo, en el caso de *Musca domestica* L, se ha demostrado que la penetración reducida ocurre debido a un gen denominado *pen* (penetración), ubicado en el cromosoma III (Farnham, 1977).

Metabolismo

La resistencia metabólica se debe a la sobreexpresión o a cambios en la efectividad de ciertas enzimas, como las monooxigenasas P450 y las esterasas.

Monooxigenasas P450

Las monooxigenasas P450 son un sistema de enzimas cuyo nombre proviene del hecho de que absorben radiación electromagnética de una longitud de onda de 450 nanómetros.

Un mecanismo frecuente de resistencia en insectos es un cambio de la actividad de las monooxigenasas, o una mayor síntesis de ellas,

generando un incremento en la detoxificación de insecticidas

(Oppenoorth, 1984) tal como en el caso de los insecticidas piretroides, reportado por Yu y Nguyen, (1992); Sheppard, (1995); Bartlett y Keil, (1997); Kasai y col., (1998); Ranasinghe y col., (1998).

En *Musca domestica* se ha demostrado que la sobreexpresión de un gen del citocromo, el CYP6D1, da como resultado un aumento a la resistencia a piretroides mediada por monooxigenasas P450 (Liu y Yue, 2000).

En ciertos insectos fue demostrada la rápida "up-regulation" (incremento de expresión de un gen, en general, por el aumento de sus transcritos de RNA mensajero) de genes del citocromo ante la exposición a insecticidas piretroides como la cipermetrina, permetrina y lambda-cialotrina (Liang y col., 2015).

La utilización de inhibidores de enzimas relacionadas al citocromo P450, son una interesante alternativa para su uso con insecticidas, debido a la alta selectividad, conocidos mecanismos de acción y la posibilidad de realizar estrategias racionales de control más fácilmente (Feyereisen, 2014).

Esterasas

Las esterasas son un grupo amplio de enzimas muy importantes en el metabolismo de xenobióticos (Ortiz-hernández y col., 2013). También son importantes como mecanismos de resistencia a organofosforados, carbamatos y piretroides en insectos (Li y col., 2007).

Los mecanismos de resistencia mediados por esta familia de enzimas se deben a cambios en la regulación de la cantidad molar de enzima disponible, o a mutaciones puntuales que modifican la especificidad de la enzima por el substrato (Hemingway, 2000).

En el primer caso, se eleva la cantidad molar de la enzima por amplificación génica (Mouchès y col., 1986; Herath y col., 1987; Vaughan y Hemingway, 1995; Field y Devonshire, 1998; Karunaratne y col., 1998).

En estos casos, a pesar que el metabolismo del insecticida sea lento, la mayor cantidad de enzima secuestra el insecticida manteniéndolo alejado del sitio donde ejerce su acción tóxica. De esta manera, las enzimas tienen mayor posibilidad de degradarlo (Ffrench-Constant y col., 2004).

En el segundo caso, se ha demostrado que cambios en los genes estructurales debido a mutaciones puntuales, alteran dramáticamente la especificidad de la enzima, tal como establecieron Campbell y col., (1998) para poblaciones de *Lucillia cuprina*, y Claudianos y col., (1999) para poblaciones de *Musca doméstica*.

En el caso de *T. infestans*, estudios anteriores realizados sobre estados post-embriónicos (ninfas I), han demostrado que el incremento de actividad de esterasas está relacionada con la resistencia a deltametrina en las poblaciones argentinas provenientes del norte de la Provincia de Salta, y del sur de la Provincia de La Rioja (Santo-Orihuela y col., 2008). Estos autores establecieron un aumento en el porcentaje de individuos con mayor actividad de piretroide-esterasas en las poblaciones resistentes respecto a la de referencia. Posteriormente esos mismos autores determinaron un leve incremento de la actividad de piretroide-esterasas en huevos de desarrollo tardío (12 días de edad) de una población resistente a deltametrina de El Palmar (Bolivia) (Santo-Orihuela y col., 2013).

Excreción o secuestro

Este proceso ocurre cuando las enzimas o proteínas de un insecto se unen a las moléculas de un insecticida y las transfieren lejos del sitio de acción hacia el contenido graso y la hemolinfa para un almacenamiento seguro (Nicholson y col., 1983; Lee y Clark, 1998). Este aumento tiene un origen posible en la temprana evolución de los insectos, fuertemente influenciada por sus interacciones con plantas con flores, las cuales contienen muchos compuestos secundarios nocivos (Fraenkel, 1959).

Las enzimas de la familia de las esterasas son frecuentemente las responsables de este proceso, ya sea por unión rápida al insecticida o por acción sobre uniones éster de las moléculas tóxicas, que son metabolizadas hacia formas menos dañinas (Ffrench-Constant y col., 2004).

Modificación del sitio de acción

Existen numerosos casos de resistencia a insecticidas basados en la modificación del sitio de acción. Uno de los más importantes es la mutación puntual denominada *kdr* que afecta la efectividad de los insecticidas piretroides.

*Por mutaciones del canal de sodio dependiente de voltaje *kdr**

Los insecticidas piretroides alteran el flujo iónico actuando en la subunidad alfa de los canales de sodio sensibles al voltaje (Figura 21) (Trainer y col., 1997). El canal de sodio está conformado por 4 dominios internamente homólogos con 6 hélices transmembrana cada uno, en el cual las hélices S5 y S6 de cada dominio forman el poro central permeable a sodio y la hélice S4 (cargada positivamente con varios aminoácidos, en particular argininas) dan la sensibilidad al

voltaje del canal y de ahí deriva su nombre: VSSC (Voltage Sensitive Sodium Channel). Es conocido que los piretroides causan que el VSSC se establezca en la configuración abierta del canal prolongando este estado. Análisis genéticos revelaron que la resistencia a este insecticida se debe al cambio de un aminoácido en el segmento hidrofóbico transmembrana IIS6. Este cambio resultó en un incremento moderado de la resistencia a piretroides y se lo denominó *kdr* (*knockdown resistance*). Es una mutación recesiva y necesita de homocigosis para expresarse (los 2 alelos deben poseer la mutación) (Farnham, 1977; Davies y col., 2007; Rinkevich y col., 2012).

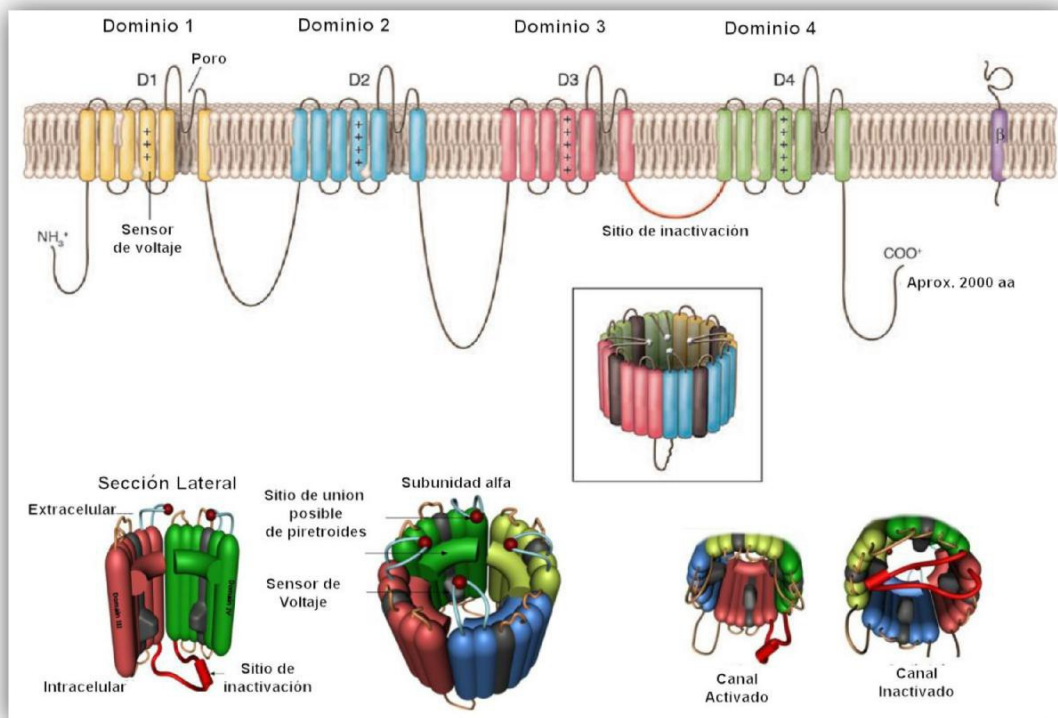


Figura 21. Diagrama del canal de Sodio dependiente de voltaje, donde se muestran los 4 dominios homólogos (I-IV), cada uno con 6 hélices transmembrana (S1-S6), modificado de Meisler y Kearney, (2005) y de Dafal, (2012)

Este mecanismo de resistencia ha sido demostrado en *T. infestans* en la cual se han descrito 2 mutaciones. Una de ellas se encuentra en el segmento hidrofóbico transmembrana del dominio 2 segmento 6 en la posición 1014 y comprende el intercambio de una Leucina por

una Fenilalanina, es una mutación puntual (L1014F) (Fabro y col., 2012). La otra mutación *kdr* fue caracterizada en *T. infestans*, y se debe a una substitución puntual de una leucina por una isoleucina, ubicada en el loop intracelular transmembrana entre los segmentos IIS4 y IIS5 en la posición 925 (L925I) (Capriotti y col., 2014).

En otras especies de insectos resistentes como *Musca doméstica*, se encontró una segunda mutación en conjunto con la L1014F, llamada M918T. Esta segunda mutación está asociada a mayores niveles de resistencia, y es llamada súper-*kdr*. Otros estudios que relacionaron la estructura de los piretroides con su actividad (SARs), demostraron que las mutaciones *kdr* dan el nivel base de insensibilidad al insecticida y las mutaciones súper-*kdr* trabajan en forma aditiva aumentando los niveles de resistencia (Farnham y col., 1987; Davies y col., 2007).

En la figura 22 se puede apreciar la ubicación de las mutaciones en el canal de sodio.

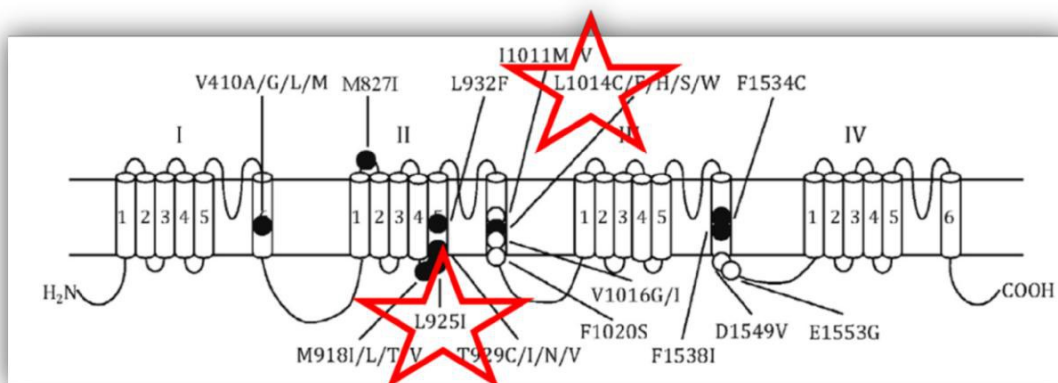


Figura 22. Ubicación de las 2 mutaciones en el canal de sodio estudiadas en esta tesis, modificado de Fabro y col., (2012).

Objetivos e Hipo tesis

Objetivos e Hipótesis

Objetivo General

Avanzar en el conocimiento del fenómeno de resistencia a insecticidas en *Triatoma infestans*, mediante el estudio toxicológico, bioquímico y molecular de la resistencia a deltametrina establecida en poblaciones de campo.

Analizar la expresión de la resistencia a deltametrina en huevos de *T. infestans* con distinta edad de desarrollo, y los posibles mecanismos involucrados en el fenómeno de resistencia.

Objetivos Específicos

1. Determinar los niveles de resistencia a deltametrina en huevos de 12 días de desarrollo y ninfas I de poblaciones de *T. infestans*, recolectadas en el norte de Argentina y Sur de Bolivia.
2. Caracterizar la expresión de la resistencia a deltametrina en distintas etapas del desarrollo embrionario de *T. infestans*.
3. Determinar la actividad de enzimas con capacidad de degradar insecticidas piretroides durante el desarrollo embrionario de poblaciones susceptibles y resistentes de *T. infestans*.
4. Detectar la presencia o ausencia de la mutación del canal de sodio *kdr* en huevos de poblaciones resistentes de *T. infestans*.

Hipótesis

La expresión de la resistencia a deltametrina en huevos de *T. infestans* varía durante el desarrollo embrionario y se relaciona con la actividad de las enzimas que degradan insecticidas piretroides (monooxigenasas y piretroide-esterasas), y con la presencia de mutaciones puntuales en el sitio de acción de la deltametrina.

Materiales y Me todos

Materiales y métodos

Material Biológico

Se utilizaron huevos y ninfas provenientes de una población susceptible criada en laboratorio y de 2 poblaciones de campo recolectadas en zonas donde se había informado previamente el fracaso de las campañas de control de vectores utilizando el insecticida piretroide deltametrina.

La población susceptible que denominaremos "REFERENCIA", fue donada por el Lic. Raúl Stariolo de la Coordinación Nacional de Control de Vectores del Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Esta población se originó a partir de insectos recolectados en la provincia de Córdoba donde no se habían registrado fallas de control al aplicar insecticidas piretroides. Esta población se consideró como una población susceptible representativa del campo. La cría de la población de referencia en el laboratorio se realizó de acuerdo a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, en un ambiente a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura, 50-70% de humedad relativa, fotoperíodo 12:12 luz-oscuridad, y alimentación semanal con sangre de paloma (WHO, 1994).

El mantenimiento de las poblaciones de campo se realizó en las mismas condiciones de cría que la población de referencia

Las poblaciones de campo fueron recolectadas en el año 2010 en viviendas infestadas de 2 áreas resistentes de Argentina y Bolivia que a continuación se describen.

La ubicación de estas 2 áreas es la siguiente:

- 1) Campo Largo, Salta, Argentina, ubicada a $22^{\circ}2'12.30''\text{S}$ $63^{\circ}56'46.92''\text{O}$ (Figuras 25, 26, 27, 29). Se trata de un área de

difícil acceso descripta geográficamente como una llanura entre cordones montañosos. Campo Largo está ubicado a una altura de 640 metros sobre el nivel del mar (msnm) y los cordones montañosos que lo flanquean a 1100 msnm, de acuerdo a las georeferencias propias y a Google (2015). La temperatura oscila entre 34°C y 21°C en verano, y entre 21°C y 9°C en invierno, y las precipitaciones promedio equivalen a 200mm en verano y casi nulas en invierno (Servicio Meteorológico Nacional, SMN, Buenos Aires, Argentina).

- 2) Entre Ríos, Tarija, Bolivia, ubicada a 21°17'44.07"S 63°56'54.36"O, de acuerdo a nuestras georeferencias (Figuras 25, 28 y 29). Entre Ríos está ubicada a 1230 msnm y comparte características climáticas similares con Campo largo, con temperaturas máximas de 45°C en verano y mínimas de 10°C en invierno. En cambio presenta mayor caudal de lluvia que alcanza a 1200 mm concentrados entre enero y marzo de acuerdo a OEA, (2009) y colaboradores de Wikipedia, (2015d).

La distancia entre las dos poblaciones estudiadas según una línea recta imaginaria es de 82km.

Para recolectar los insectos de las viviendas, la presencia de *T. infestans* se advierte durante el día debido a los rastros que dejan en las paredes luego de alimentarse en horario nocturno, cuando trepan para esconderse y liberan heces que quedan en la pared. Estas deyecciones poseen diferente color indicando su antigüedad (negras más recientes, blancas más antiguas) (Schofield, 1994; Canale y col., 2009).

Se utilizó tetrametrina al 0,2% en aerosol como elemento desalojante (Icona, Buenos Aires, Argentina). Este insecticida provoca la hiperactivación de los insectos ayudando a detectarlos y

capturarlos cuando salen de sus refugios mediante el uso de pinzas entomológicas. (Figura 23, 24). El método utilizado para la búsqueda en las viviendas fue el hora/hombre, que consiste en la búsqueda en cada vivienda por un tiempo determinado. En caso de realizar la búsqueda una persona sola, se realiza durante una hora, si son 2 personas, media hora, etc. Los tiempos de búsqueda estandarizados permiten tener cantidades representativas de insectos de cada vivienda (WHO, 1994).



Figura 23. Rastros de heces de vinchucas en la pared, de color claro las más viejas, oscuro las más recientes.



Figura 24. Búsqueda de insectos luego de utilizar el desalojante Icona.



Figura 25. Origen geográfico de las 2 poblaciones en estudio, mapa político. La línea gris indica el límite internacional.



Figura 26 – Vista tridimensional en perpendicular del paraje de Campo Largo, donde se puede apreciar el valle entre cordones montañosos. En amarillo el límite internacional Argentina-Bolivia.



Figura 27. Valle de Campo Largo, Salta.

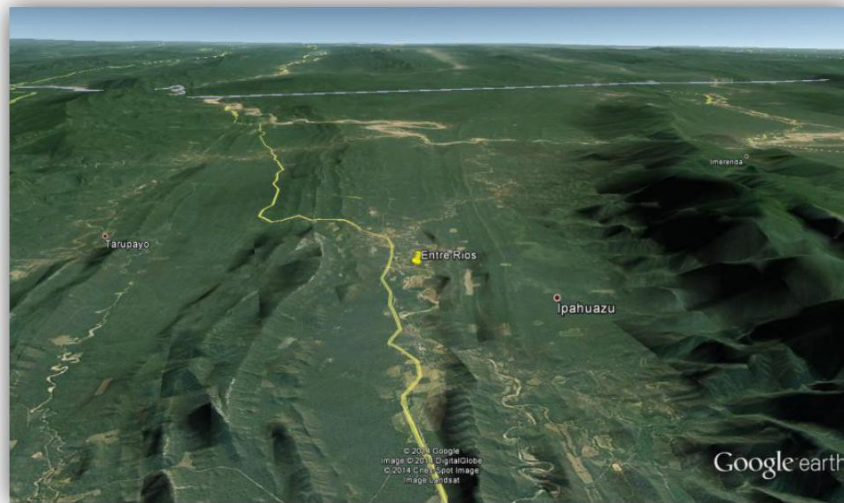


Figura 28. Vista tridimensional en perpendicular del paraje de Entre Ríos, donde se puede apreciar el valle entre cordones montañosos.



Figura 29. Comparación de la ubicación de los 2 parajes y el relieve de la zona.

Los insectos recolectados a campo fueron criados en condiciones de laboratorio para obtener individuos de la siguiente generación (F1). Los estudios sobre ninfas se realizaron de acuerdo al protocolo recomendado por WHO (1994). De acuerdo a este protocolo se seleccionaron ninfas I (primer estadio) de 2-5 días de edad, y ayunadas desde la eclosión. En estas condiciones el peso promedio de las ninfas de todas las poblaciones fue $1,2 \pm 0,2$ mg.

La selección de huevos de distintas etapas de desarrollo se realizó de acuerdo a las características morfológicas externas descritas por (María Inés Picollo de Villar, 1979) y de acuerdo a lo descrito en la introducción. Se utilizaron huevos de 4, 7 y 12 días de edad de acuerdo a las siguientes características:

Huevos de 4 días: color amarillento con una leve hendidura lateral

Huevos de 7 días: color naranja pálido con 2 manchas oculares rojizas en la parte posterior del huevo.

Huevos de 12 días: color anaranjado, con las manchas oculares en la parte anterior del huevo (próximo al opérculo).

Insecticidas y Reactivos

Ensayos biológicos:

Insecticida: El insecticida deltametrina utilizado en los estudios de aplicación tópica fue grado técnico (99,0%) adquirido de Dr Ehrnstorfer, GmbH; Augsburg, Alemania.

El solvente utilizado para diluir la deltametrina fue acetona de grado analítico de J. T. Baker, México.

Síntesis y Ensayos enzimáticos:

La 7-etoxicumarina (7-EC) y 7-hidroxycumarina (7-OHC) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

El cloruro de ácido permetrínico (mezcla racémica cis-/trans-49,1%/50,9%) fue provisto por Guillermo Wallace de Chemotecnica, Buenos Aires, Argentina.

El 2-metoxietanol (99,5%) y tolueno de grado analítico fueron comprados a Merck (Buenos Aires, Argentina).

Buffer fosfato: 7,098g de Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 en 500ml de agua destilada (0,05mM) pH = 7,2.

Buffer glicina/etanol: 3,7mg de glicina en 500ml de agua destilada, pH = 10,4.

La Trietilamina ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$) (99,9%) fue obtenida de a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

El Cl_2CH_2 , (99,5%), CH_3OH (99,5%) y el $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (99,5%) fueron obtenidos de Merck Argentina S.A.I.C. (Buenos Aires, Argentina).

Los gases nitrógeno (99,995 % de pureza) y helio (99,995 % de pureza) fueron provistos por Gases Comprimidos S.A, Buenos Aires, Argentina. El hidrógeno (99,999%) se obtuvo mediante un generador HGH-500E (China) a partir de agua Milli-Q.

Caracterización de la resistencia a insecticidas en los diferentes estados de desarrollo

Ensayo biológico:

En Ninfa I (primer estadio):

La toxicidad de la deltametrina en ninfas se determinó de acuerdo al protocolo recomendado por WHO (1994). De acuerdo a este protocolo se realizó la aplicación tópica de distintas diluciones del insecticida en acetona sobre el abdomen de cada ninfa I. El volumen aplicado fue 0,2 ul mediante una jeringa Hamilton de 10 ul modelo 701N con un dispensador automático (Figura 30).



Figura 30. Tópico de Ninfa I.

Se utilizaron al menos 10 ninfas por cada réplica, y se evaluaron concentraciones de deltametrina en un rango entre 0,0001mg/ml y 15mg/ml. Se obtuvieron valores de mortalidad entre 0% y 100%, con valores finitos que se utilizaron en el análisis estadístico.

En todos los ensayos se utilizaron insectos controles tratados solamente con acetona.

Los insectos tratados se colocaron en recipientes plásticos con papel de filtro doblado en su interior y con la tapa perforada. A las 24

horas se registró mortalidad de acuerdo a la metodología recomendada por WHO, (1994). Para ello los insectos se colocaron en el centro de un papel de filtro de 10 cm de diámetro y se observó su movilidad. Se consideró "muerto" al insecto que en un tiempo similar a los insectos controles no logró alcanzar el borde del papel por sí solo o al ser estimulado con un pincel o una pinza (WHO, 1994).

En Huevos:

Los huevos de 4, 7 y 12 días seleccionados según lo descrito anteriormente fueron tratados mediante aplicación tópica de distintas diluciones de deltametrina en acetona en el opérculo de cada huevo. Las concentraciones de deltametrina variaron entre 0,0001mg/ml y 15mg/ml). El volumen de aplicación fue 0,2ul utilizando una jeringa Hamilton modelo 701N con un dispensador automático (Figura 31). Esta metodología fue previamente desarrollada en nuestro laboratorio y reconocida internacionalmente (Tolozá y col., 2008).



Figura 31. Aplicación tópica del insecticida en el opérculo del huevo y portaobjetos con huevos preparados para su tratamiento.

Los huevos tratados se colocaron en recipientes plásticos con papel de filtro doblado y tapa perforada, y se incubaron en condiciones de cría en laboratorio. En todos los ensayos se utilizaron huevos controles tratados solamente con acetona.

El tiempo de emergencia de los huevos controles fue de 15 ± 2 días. Se consideró mortalidad de huevos tratados la no aparición de ninfas hasta 48 horas posteriores a la eclosión de todos los controles.

Determinación de actividad de enzimas degradantes de insecticidas

Material biológico

Se utilizaron huevos de 4, 7 y 12 días seleccionados de acuerdo a lo descrito en la sección material biológico de este trabajo de tesis. Los huevos seleccionados se mantuvieron en ultrafreezer (Sanyo MDF-U54V, Japón) a -86°C , de manera de poseer un stock para los estudios sobre enzimas.

Medición de actividad enzimática de monooxigenasas P450

Ensayos con 7-etoxicumarina

La medición de actividad de monooxigenasas citocromo P-450 se basó en la *o*-deetilación de la 7-etoxicumarina según el método fluorométrico descrito por Ullrich y Weber (1972) (Figura 32). Esta metodología fue posteriormente adaptada a la medición individual de actividad enzimática utilizando abdómenes de *Drosophila* por De Sousa y col., (1995). La ventaja de esta medición individual de actividad *O*-deetilasa en tejidos intactos (*ex-vivo*) es que permite la conservación del medio en el que actúan estas enzimas (unidas a membrana) con el insecto en vida, evitando la degradación de cofactores enzimáticos (Ej. NADPH) y el consecuente agregado de los mismos al trabajar con fracciones microsomales. También permite un mayor rendimiento en el procesamiento de las muestras (De Sousa y col., 1995). La técnica de medición individual fue adaptada a abdómenes de ninfas de *T. infestans* por González Audino y col.,

el caso de los blancos se agregó 100 μ l de la solución etanol/glicina para detener cualquier posible reacción enzimática.

Dentro de cada pocillo conteniendo la 7-EC (o etanol-glicina), se colocó un huevo de *T. infestans* seleccionado. Se lo cortó transversalmente, de manera cuidadosa respetando la zona central-ecuatorial de cada huevo analizado con tijera entomológica. El huevo permaneció siempre totalmente cubierto por la solución de 7-EC. (Figura 33 y 34).

La micro placa luego fue incubada por 4 hs a 30°C. Finalizada la incubación se midió la fluorescencia producida por 7-OHC que es el producto de la reacción de o-deetilación de la 7-EC. Esta fluorescencia se produce por la excitación de la 7-OHC con una longitud de onda adecuada que produce la absorción de energía. Al retornar a su estado fundamental, esta energía se libera como un cuanto lumínico (fotón), que puede ser detectado instrumentalmente (Skoog y col., 2008).

En este trabajo el equipo utilizado para cuantificar la fluorescencia fue un fluorómetro de microplacas modelo Fluoroskan Ascent fabricado por Thermo Scientific, (Helsinki, Finlandia). La longitud de onda utilizada para excitar la molécula fue de 390 nm y la fluorescencia producida fue cuantificada a una longitud de onda de 440 nm.



Figura 33. Huevos sumergidos en solución de 7-EC previo al corte transversal con tijera entomológica.

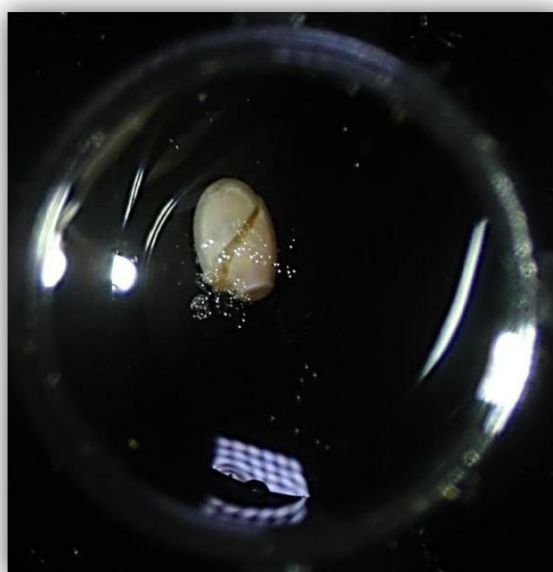


Figura 34. Huevo con corte transversal dentro del pocillo.

Los valores de Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU) se convirtieron en nanomoles de 7-OHC de acuerdo a la curva de calibración (0,00; 0,31; 0,62; 0,93; 1,23; nanomoles [nmol] de 7-OHC por pocillo) preparada en el mismo medio de reacción.

Los valores obtenidos se corrigieron de acuerdo a la fluorescencia inespecífica obtenida en los pocillos blanco.

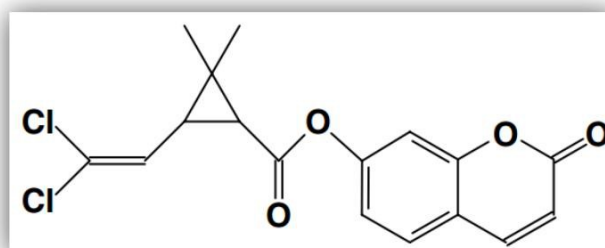
Medición de actividad enzimática de piretroide esterasas

Permetrato de 7-cumarilo

El permetrato de 7 cumarilo (7-CP) (7-Cumarilo[1R, S]cis-trans-3-[2,2-diclorovinil]-2,2-dimetil-ciclopropanocarboxilato, "7-CP") es un sustrato sintetizado en nuestro laboratorio y empleado exitosamente para medir la actividad enzimática de piretroide-esterasas en insectos (Santo-Orihuela y col., 2008; Germano y col., 2012; Santo-Orihuela., 2013).

El 7-CP posee una estructura química similar a la del insecticida piretroide permetrina (Figura 35) y su hidrólisis origina un producto fluorescente que puede ser cuantificado mediante el espectrofluorómetro. Los filtros de excitación utilizados fueron 390 nm y los de emisión 440 nm (Santo-Orihuela y col., 2006).

7-CP



Permetrina

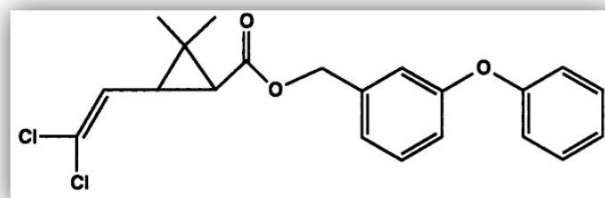


Figura 35. Comparación de la estructura química del 7-CP y del insecticida Permetrina.

Síntesis

La síntesis del 7-CP se realizó de acuerdo a la metodología publicada previamente (Santo-Orihuela y col., 2006).

El primer paso de síntesis fue la reacción de cloruro de ácido permetrínico halogenado (49,1% cis-/50,9% trans-), con 7-hidroxicumarina (7-OHC) en cantidades molares equivalentes. La reacción se realizó en presencia de trietilamina (10ul) como agente catalítico y C₆H₅CH₃ como solvente. El volumen utilizado fue el necesario para cubrir el preparado en un balón de 50ml (aproximadamente 5ml) (Figuras 36 y 37).

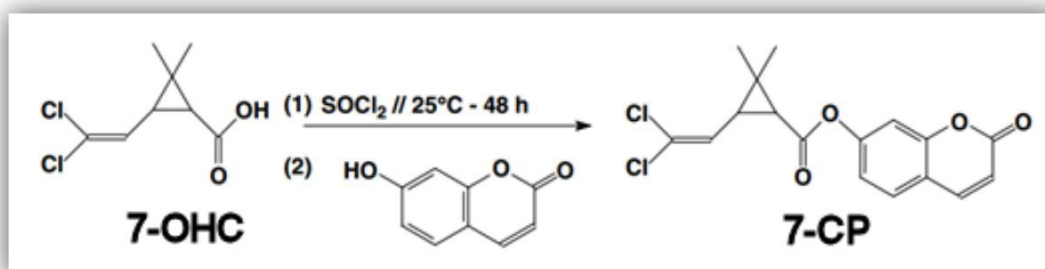


Figura 36. Síntesis del permetrato de 7-cumarilo (Santo-Orihuela y col., 2006)



Figura 37. Balón con 7-OHC + Trietilamina + Cloruro de ácido + $C_6H_5CH_3$.

La separación del 7-CP fue realizada mediante una columna de cromatografía de 40 cm de longitud y 2 cm de diámetro (Bimar Loga, CABA, Argentina). Se utilizó sílica gel grado técnico (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), (60 Å de tamaño de poro, 35-75um tamaño de partículas, malla de 230-425), y diclorometano (Cl_2CH_2) como solvente de elución (MERCK, Buenos Aires, Argentina). La columna se empaquetó con sílica gel hasta 10 cm de altura.

Se obtuvieron 3 gramos de producto impuro que fueron fraccionados en 3 partes de 1 gramo cada uno, solubilizados en 5ml de Cl_2CH_2 e introducidos en la columna. Se aplicó una presión de 0,2 bar utilizando nitrógeno. El solvente utilizado en la columna fue Cl_2CH_2 y se recolectaron fracciones de 19ml en 12 viales de 20 ml cada uno (Figura 38).

Una vez recolectadas las fracciones, se utilizó una mezcla 10:1 de Cl_2CH_2 - CH_3OH para eluir todo resto de 7-CP que podría quedar retenido en la columna.



Figura 38. Izquierda: Producto de la síntesis disuelto en Cl_2CH_2 listo para ser purificado. Derecha: Columna cromatográfica con adaptador de presión.

La aparición del producto se controló mediante cromatografía en capa delgada (placa de 10x5 cm de sílica gel, 60F₂₅₄, Merck, Alemania). En esta placa se sembraron los 2 precursores de la reacción (7-OHC y el cloruro de ácido permetrínico) y el producto obtenido de la separación, para identificar la presencia del producto de acuerdo al R_f (que representa la posición alcanzada por la muestra durante la cromatografía y se calcula como el cociente entre la distancia de la muestra desde el origen y Distancia del eluyente desde el origen), figura 39. El solvente utilizado fue Cl_2CH_2 - CH_3OH en una relación 10:1.

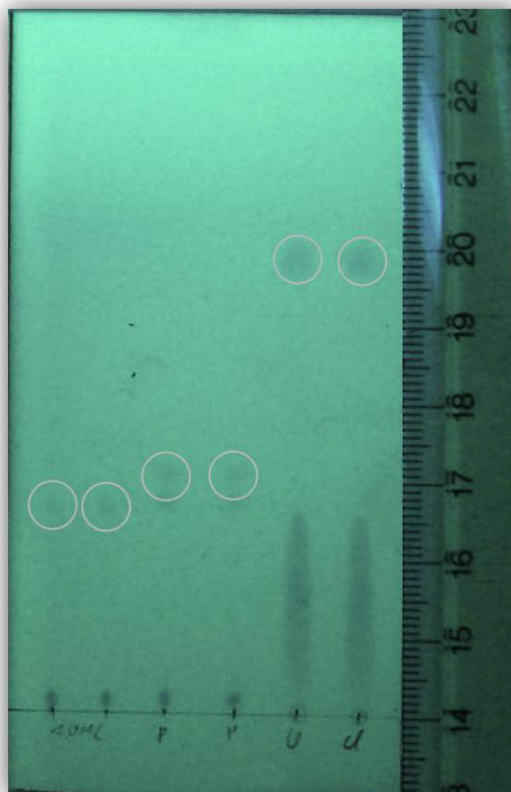


Figura 39. Seguimiento de la purificación del 7-CP mediante cromatografía en capa delgada.

El rendimiento de la reacción fue 70%.

A modo de screening, se comparó por cromatografía gaseosa el sustrato sintetizado contra una muestra de permetrato previamente sintetizada en el laboratorio.

Luego, se confirmó la síntesis del producto mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.

Cromatografía gaseosa:

Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu modelo GC-2014 con un detector de ionización por llama (Figura 40), y como patrón el 7-CP sintetizado previamente en el laboratorio.

La temperatura de inicio fue de 140°C (2 minutos), con una rampa de 12°C/min hasta 275°C (6,75 min), siendo el tiempo total de 20 minutos.

La columna utilizada fue modelo VF-5ms (Varian, USA), a un flujo de 0,91ml/minuto, y 100kPa de presión (Velocidad Lineal: 27,7 cm/seg). El inyector fue utilizado en modo split con una relación de Split 10 y una temperatura de 280°C. El gas carrier utilizado fue hidrógeno. El protocolo de GC-MS fue modificado a partir de Santo-Orihuela y col., (2006).



Figura 40. Cromatógrafo FID.

Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas:

Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu GC-17A acoplado a un espectrómetro de masa Shimadzu GCMS-QP5050A, con una columna DB5-MS (Agilent, USA) (Figura 41). El gas carrier utilizado fue helio. La temperatura inicial fue de 140°C (2 minutos) con una rampa de 12°C/min hasta 275°C, (6,75 minutos). El tiempo total fue 20 minutos.

El flujo de la columna fue 1,1ml/min a una presión de 100kPa (Velocidad Lineal: 40,3 cm/seg). El inyector se utilizó en modo Split,

con una relación de Split de 23 y 280°C de temperatura. El detector se configuró en modo SCAN con detección absoluta, 1,6kV a intervalos de 0,5 segundos, temperatura de interfaz de 280°C, tiempo de corte de solvente de 3 minutos, comienzo de lectura a los 4 minutos y una relación masa/carga de 47 a 360 con una velocidad de lectura de 1000.

El fundamento de esta técnica se centra en la identificación molecular mediante fragmentación de las mismas por distintos métodos.

En forma simplificada, este proceso consta de cuatro etapas:

- 1- Aceleración de los fragmentos mediante aplicación de un campo eléctrico.
- 2- Dispersión de los fragmentos según su relación masa/carga
- 3- Detección de dichos fragmentos registrando la carga inducida o la corriente producida por los diferentes fragmentos.
- 4- Del espectro de masas obtenido, el pico con el valor de masa/carga más elevado corresponde a la molécula ionizada sin fragmentar conocido como "ión molecular".

El pico con mayor abundancia del espectrograma recibe el nombre de pico base, y los demás picos se expresan en porcentajes de intensidad de ese valor (Skoog y col., 2008).



Figura 41 – Cromatógrafo GC-MS.

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear:

Esta metodología analítica se fundamenta en las propiedades magnéticas de algunos núcleos atómicos frente a la aplicación de un campo magnético externo. Dichos núcleos presentan una frecuencia de absorción específica de acuerdo al entorno donde se encuentran y dicha propiedad puede utilizarse para determinar la estructura de la molécula.

Esta metodología brinda información sobre el número y tipo de hidrógenos y carbonos que se encuentran en la molécula (espectro ^1H -RMN y ^{13}C -RMN). La posición en el espectro conocida y expresada como el desplazamiento químico (ppm), determina el entorno químico del núcleo. Dependiendo de este entorno químico, los diferentes protones o carbonos, dependiendo del núcleo analizado resonarán a frecuencias ligeramente diferentes. Este desplazamiento se lo conoce como desplazamiento químico, y es utilizado como medida relativa de algunas frecuencias de resonancia de referencia (Skoog y col., 2008).

Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN fueron realizados en un espectrómetro Bruker Advance DPX 400 de 400 MHz usando CDCl_3 como solvente.

Metodología de medición de piretroide-esterasas

La actividad de piretroide-esterasas fue determinada por la hidrólisis del 7-CP.

Los huevos fueron retirados del ultrafreezer (-86°C) mantenidos en hielo y trasladados a tubos tipo eppendorf conteniendo 190 ul de buffer fosfato.

Cada huevo fue depositado en el fondo de los tubos tipo eppendorf de 0,5ml y homogeneizado con mortero plástico descartable.

Posteriormente se homogenizaron a alta velocidad con un Bio-vortex a pilas (Figura 42).

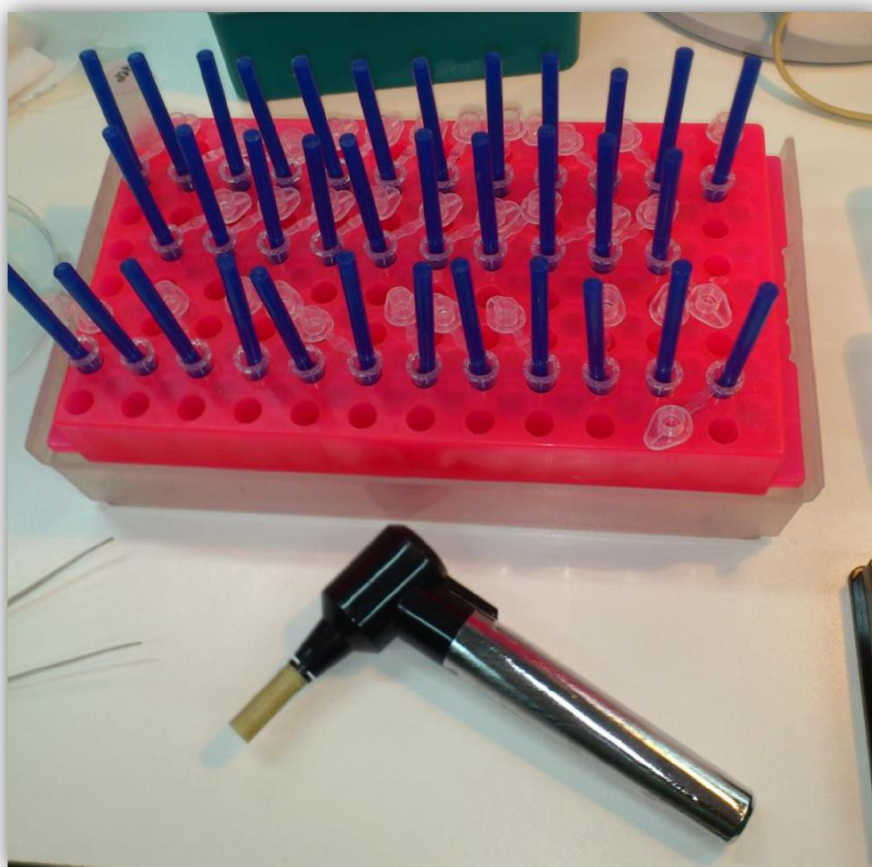


Figura 42. Bio-vortex a pilas, viales y barras de mortero dentro de los tubos tipo eppendorf conteniendo los huevos a homogeneizar.

Mediante una micropipeta (Eppendorf, Alemania), se recuperó un volumen de 200 ul de cada homogenato y se colocó en un pocillo de una microplaca de 96 wells (PerkinElmer, Massachusetts, USA).

Para iniciar la reacción enzimática se agregó a cada pocillo con homogenato de huevo, 10 μ l de 7-CP (13mg de 7-CP purificado en 10 ml de 2-metoxi-etanol, molaridad final 3,5 mM). La reacción se incubó a 25° C por 30 minutos. La fluorescencia fue medida mediante un fluorómetro de microplacas Fluoroskan Ascent de Thermo Scientific, Helsinki, Finlandia) de acuerdo a los fundamentos de la técnica descrita en la metodología de monooxigenasas P450.

Los valores de RFU (unidades de fluorescencia relativa) fueron corregidos teniendo en cuenta la fluorescencia no específica del sustrato y transformados a picomoles de 7-OHC / minuto.

En cada ensayo se utilizó una curva de calibración independiente con 7-OHC (15,42, 154,19, 308,38, 616,75, 1233,50 y 1850,25 picomoles por pocillo).

Mutación del canal de sodio *kdr*

Se analizó la presencia de 2 mutaciones puntuales en el canal de sodio recientemente descritas por el CREG, llamadas L1014F y L925I (Centro Regional de Estudios Genómicos UNLP/CONICET) (Fabro y col., 2012; Capriotti y col., 2014).

Grupos de 10 huevos fueron homogeneizados en conjunto para extraer el ADN de cada población utilizando un kit comercial (Promega, Madison, USA).

La cantidad de material genético obtenida se cuantificó (para corroborar la eficiencia de la extracción) mediante una corrida en un gel de agarosa al 1% contra un patrón de peso molecular (Solis BioDyne 100bp DNA Ladder, Estonia) utilizando el software ImageJ (NIH, Maryland, USA).

En base a la metodología de Fabro y col., (2012), para poder realizar la detección de alelos susceptibles y resistentes, es necesario aumentar la cantidad de ADN molde a utilizar. El análisis del material se realizó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) primaria en un termo-ciclador (Bioer Gene Pro TC-E-96G, Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd., Binjiang, China). El listado de primers se puede ver en la figura 43.

Antes de comenzar con la etapa llamada PASA (PCR Amplification of Specific Alleles) que permitirá detectar la mutación L1014F, es necesario incrementar la cantidad de ADN. Para ello se deben realizar 3 reacciones PCR anidadas.

La primera (PCR 1) consistió en amplificar un fragmento de 2800 pares de bases (pb) que incluye la región con las 2 mutaciones *kdr* previamente establecidas en *T. infestans* resistentes a insecticidas: L925I y L1014F. Se utilizaron 2 primers para esta PCR, Ti Fwd y Ti Rev 1.

| Nombre | Secuencia 5'-3' |
|--------------------|-----------------------------|
| Ti Fwd | TGGCCAACATTGAATTTATTGATATC |
| Ti Rev 1 / PCR1 | TGTTACGATTTGATGATAACCGGGATA |
| Ti Rev 2 / PCR2 | TGAACCTTGTTTCCAGCTGG |
| Ti Rev3 / Cont Rev | TTAACCCGAACAAGAATATA |
| Res Fwd | CAACAGTAGTTATAGGAAATTTT |
| Sen Rev | AAATATATAAAGTACTTACAAC |

Figura 43. Secuencia de los Primers Utilizados, modificado de Fabro y col., (2012).

Luego se realizó una segunda PCR con el objetivo de amplificar nuevamente el fragmento de 2800pb obtenido en el primer paso de amplificación (PCR 1) para obtener mayor cantidad de ADN. Se utilizó el mismo primer de la PCR primaria (Ti Fwd), y un primer reverse distinto (Ti Rev 2). Para confirmar la correcta amplificación, se sembró una pequeña cantidad del producto de esta reacción en un gel de agarosa al 1% con 3 ul de bromuro de etidio. Si la amplificación es exitosa se observa una banda de 2800 pb al ser irradiado mediante luz ultravioleta a 254 nm.

La tercera reacción en cadena de la polimerasa empleada (PCR 3), utiliza como molde el fragmento de 2800pb de la PCR 2, y consta de los primers "Ti Fwd" y "Cont Rev", que toman el intrón de 130 pb que posee ambas mutaciones, arrojando un fragmento "control" de 572 pb al correr el producto de la reacción en un gel.

A partir de este paso, se pueden analizar las 2 mutaciones de manera independiente, ambas desde el producto de la PCR 3.

Para analizar la presencia o ausencia de la mutación L1014F, se realizó la PCR llamada PASA.

En este caso se utilizó un set de 4 primers, de los cuales los 2 externos (Ti Fwd y Cont Rev) no son alelo-selectivos y devuelven una banda control de 572pb, y 2 primers internos "Res Fwd" y "Sen Rev" (ver Figura 44) alelo-selectivos, que solo amplifican fragmentos si el

alelo respectivo está presente. Los primers internos permiten amplificar en direcciones opuestas y generan fragmentos de diferente tamaño en combinación con los primers externos: 476pb en presencia del alelo susceptible y 130pb en presencia del alelo resistente, determinando de esta manera ambos alelos en una única reacción.

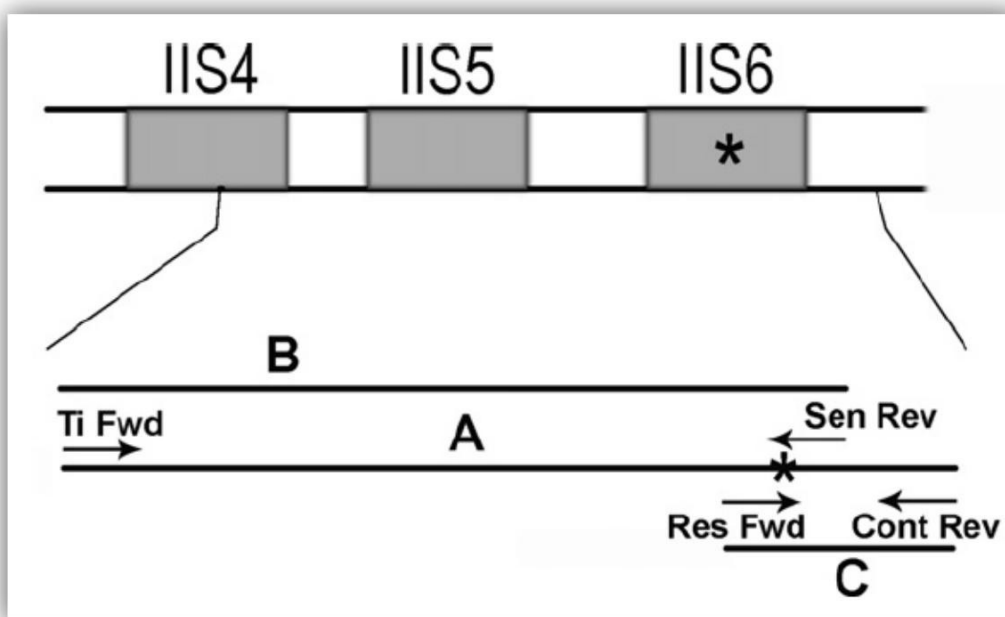


Figura 44. Diagrama de la dirección de los primers utilizados para el ensayo PASA. El asterisco indica el lugar donde se encuentra la mutación L1014F (Fabro y col., 2012).

Para analizar la presencia/ausencia de la mutación L925I, el producto de la PCR 3 se incubó con la enzima de restricción SacI (Fermentas, Maryland, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y a Capriotti y col., (2014).

El material sin digerir y el producto de esta digestión fueron analizados en un gel de agarosa al 2,5%. En caso de no estar presente la mutación, la enzima cortará la banda de 572pb dejando 2 fragmentos de 521pb y 51pb. Cuando la mutación está presente el sitio de corte es suprimido por lo que se verá una sola banda de 572pb igual a la del material sin digerir, confirmando así la presencia o ausencia de esta segunda mutación.

Análisis estadístico

Análisis toxicológico

Los datos de mortalidad a distintas dosis del insecticida deltametrina se utilizaron para estimar los valores de dosis letal 50% (DL₅₀) mediante el software PoloPlus (LeOra Software, 2002).

Los parámetros obtenidos del cálculo de DL₅₀ se utilizaron para estimar los niveles de resistencia (RR) y sus intervalos de confianza de acuerdo a Robertson (2007).

De esta manera, las proporciones entre las DL₅₀ de las poblaciones analizadas estiman el grado de resistencia con un límite de confianza del 95%, de acuerdo a lo siguiente:

i: población (1=susceptible, 2=resistente) : ordenada al origen de la población i

: pendiente de la población i

$$\hat{\mu}_i = \frac{\hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_2}{\hat{\sigma}_i}$$

Donde para h , es el punto del percentilo de la curva de la distribución probit.

Los valores de t para los niveles de respuesta más utilizados son:

| | | | | | | | | |
|-------|-------|----|------|------|------|------|------|------|
| 10 | 25 | 50 | 75 | 80 | 90 | 95 | 97,5 | 99 |
| -1,28 | -0,67 | 0 | 0,67 | 0,84 | 1,28 | 1,65 | 1,96 | 2,33 |

En nuestro caso, posee el valor 0 ya que corresponde al valor 50 de t , el valor de respuesta utilizado para comparar en este trabajo (i.e. comparados a nivel de las DL₅₀)

Luego es necesario calcular:

$$s^2 = \frac{1}{n} \left[\sum_{i=1}^n x_i^2 + 2 \sum_{i=1}^n x_i \bar{x} + n \bar{x}^2 \right]$$

Para $i = 1$ y 2

$$s^2 = \frac{1}{n} \left[\sum_{i=1}^n x_i^2 + 2 \sum_{i=1}^n x_i \bar{x} + n \bar{x}^2 \right]$$

$$= \sqrt{\frac{1}{n} \left[\sum_{i=1}^n x_i^2 + 2 \sum_{i=1}^n x_i \bar{x} + n \bar{x}^2 \right]}$$

Las estimaciones del grado de resistencia y sus límites al 95% de confianza se obtienen luego por:

Grado de resistencia: 10

Límite Inferior: $10 - 2$

Límite Superior: $10 + 2$

Este cálculo fue realizado mediante Excel 2010 (Microsoft, 2010).

Análisis enzimático

Los outliers de los datos obtenidos se descartaron mediante el uso de gráficos box-plot del software estadístico Infostat (Di Rienzo y col., 2014).

Los datos de fluorescencia fueron obtenidos y analizados inicialmente mediante el software Ascent 2.6 (Thermo Scientific, Vantaa, Finlandia) y Excel 2010 (Microsoft, 2010).

Luego, fueron analizados mediante un análisis no paramétrico de la varianza, el test de Kruskal-Wallis, y el test de comparaciones múltiples de a pares de Dunn. El software utilizado para el análisis fue Infostat (Di Rienzo y col., 2014).

Los gráficos de dispersión fueron realizados con Origin 9.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Resultados y Discusión

Resultados y Discusión

Análisis toxicológico

Población Susceptible de Referencia.

Los valores de DL₅₀ obtenidos por aplicación tópica de deltametrina en cada estadio del desarrollo del huevo y para la población de referencia se muestran en la Tabla 1 y Figura 45. A modo comparativo se muestran los valores estimados para ninfa I.

| Población | Edad | n | DL ₅₀ Deltametrina (ng/i) (IC) |
|------------|---------------|-----|---|
| Referencia | Huevo 4 días | 90 | 0,50 ^a (0,32-0,77) |
| | Huevo 7 días | 147 | 0,42 ^a (0,25-0,68) |
| | Huevo 12 días | 187 | 1,55 ^b (1,16-2,18) |
| | Ninfa I | 100 | 0,20 ^a (0,14-0,28) |

La DL₅₀ y su intervalo de confianza al 95% fue calculado de acuerdo a Robertson y col., (2007). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 1 Valores de DL₅₀ de deltametrina en la población susceptible de referencia.
 n = Número de individuos, DL₅₀ = Dosis Letal 50, ng/i = nanogramos por insecto, IC = Intervalo de Confianza

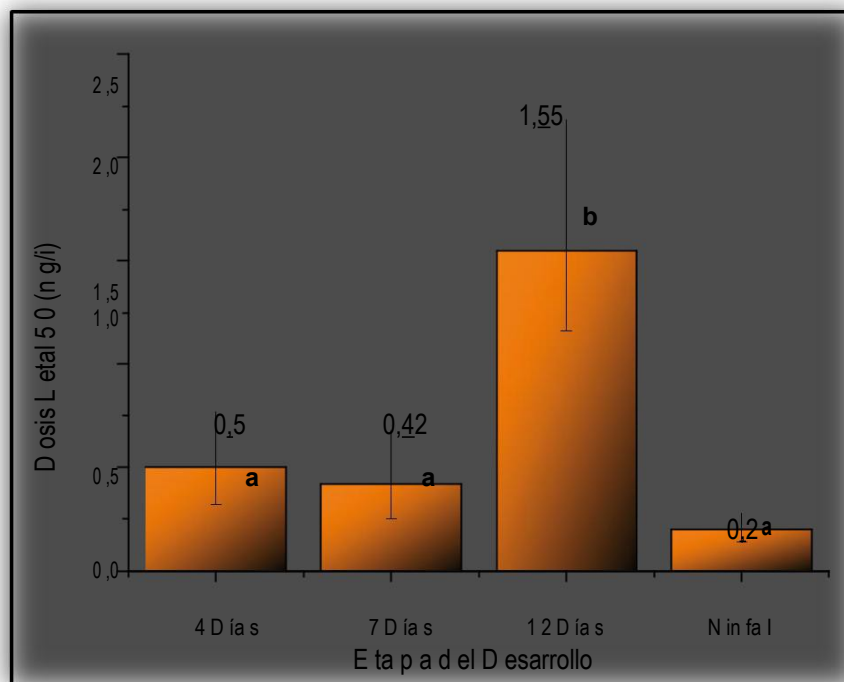


Figura 45. Dosis letal de la población susceptible de referencia en ng/insecto. Aplicación tópica de 0,2 ul de solución de deltametrina en acetona sobre el opérculo de cada huevo y sobre el abdomen dorsal de ninfas I.
Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Análisis de los resultados

Estos resultados demuestran que la toxicidad de la deltametrina es mayor en huevos de desarrollo temprano (DL_{50} de huevo de 4 días = 0,5ng/i) e intermedia (DL_{50} de huevo de 7 días = 0,42ng/i) y disminuye al final del desarrollo embrionario (DL_{50} de huevos de 12 días = 1,55ng/i).

La menor susceptibilidad de los huevos de desarrollo tardío de *T. infestans* fue previamente observada para insecticidas organofosforados por Picollo y Zerba, (1987). Estos autores demostraron que la mortalidad de huevos tratados con una determinada dosis de insecticida organofosforado (paration, mercaptotion o fenitrotion) aumentaba a medida que el desarrollo progresaba (30% a 40% para huevos de 4 días, 50% para huevos de

7 días, y de 80% a 30% para huevos de 12 días dependiendo del insecticida utilizado). Los autores concluyeron que la mayor tolerancia de los huevos en desarrollo tardío estaba relacionada con la mayor actividad de esterasas resistentes a la eserina y a la presencia de la cutícula embrionaria que debe ser atravesada por el insecticida para llegar al sitio de acción. Efectivamente, cuando esos mismos autores realizaron la aplicación tópica de ^{14}C -Paratión a huevos de desarrollo tardío (11 días) encontraron que en el momento previo a la eclosión (14 días) el 70% de la radioactividad permanecía entre el corion y la cutícula embrionaria (Picollo y Zerba, 1987).

Otro hallazgo interesante sobre la cutícula embrionaria fue publicado por Klowden, (2013), quien demostró que la última cutícula embrionaria de la langosta migratoria *Locusta migratoria* (L) es la cutícula de la larva I.

Estos resultados resaltan la importancia de la barrera cuticular y pueden explicar la menor susceptibilidad a deltametrina de huevos de 12 días demostrada en este trabajo de tesis, tanto para la población de referencia como para las poblaciones resistentes de campo. .

Considerando el método de aplicación del tóxico (aplicación tópica en el opérculo del huevo), la variación puede ser considerada como propia del embrión con mínima influencia del corion. En efecto, el opérculo de los huevos de *T. infestans* contienen una serie de canales (micropilos) responsables del intercambio de gases y líquidos con el exterior. Estos micropilos están presentes en el huevo desde el primer día de desarrollo y se mantienen constantes hasta la eclosión (P de Villar y col., 1979; Hinton, 1981; Picollo de Villar y col., 1984; Picollo y Zerba, 1987). Por el contrario, la permeabilidad a través del resto del corion difiere a lo largo del desarrollo debido a los continuos cambios en las membranas embrionarias. La aplicación tópica en opérculo asegura una similar penetración del tóxico en las distintas etapas de la embriogénesis, sugiriendo que las diferencias en

toxicidad demostradas en huevos de 4, 7 y 12 días, representan diferencias en la embriotoxicidad.

Poblaciones resistentes a deltametrina

Población "Campo Largo"

Los datos de DL₅₀ y resistencia a deltametrina en huevos de 4, 7 y 12 días, para la población "Campo Largo" se muestran en la Tabla 2 y Figuras 46 y 47.

A modo comparativo se muestran los valores estimados para ninfa I.

| Población | Edad | n | DL ₅₀ (ng/i) (IC) | RR (CL) |
|-------------|---------------|-----|----------------------------------|---------------------------------|
| Campo Largo | Huevo 4 días | 138 | 575,66 ^a (397-936) | 1144,45 ^a (609-2150) |
| | Huevo 7 días | 227 | 502,12 ^a (394-646) | 1193,26 ^a (687-2070) |
| | Huevo 12 días | 251 | 1276,85 ^b (1013-1650) | 822,34 ^a (558-1211) |
| | Ninfa I | 150 | 227,8 ^a (46-1022) | 1108 ^a (685-1790) |

La DL₅₀, RR y sus respectivos intervalos de confianza al 95% fueron calculados de acuerdo a Robertson y col., (2007).

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 2 Valores de DL₅₀ y grados de resistencia a deltametrina en la población Campo Largo n = Número de individuos, DL₅₀ = Dosis Letal 50, ng/i = nanogramos por insecto, IC = Intervalo de Confianza, RR = Grado de resistencia

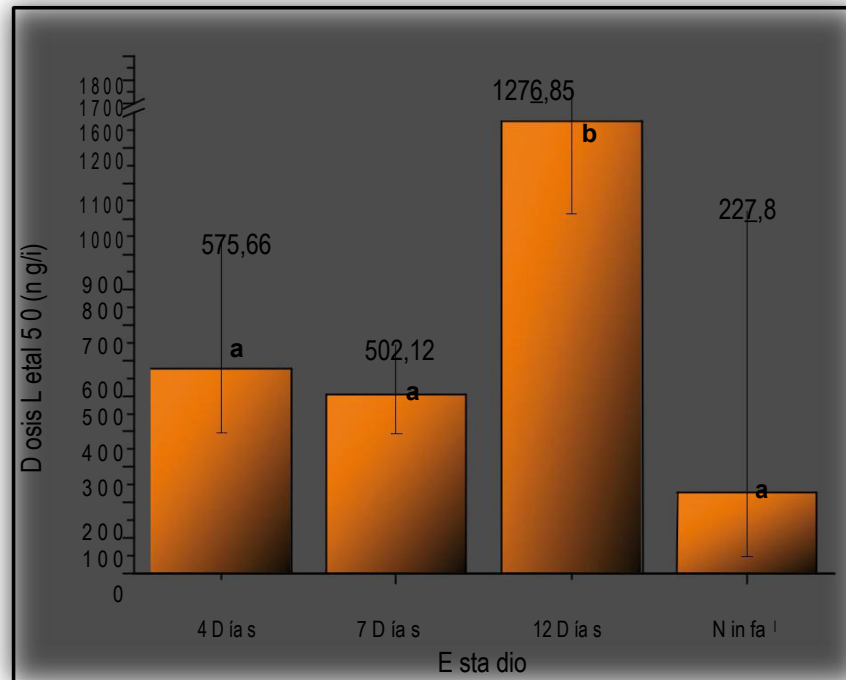


Figura 46. Valores de DL₅₀ de la población Campo Largo. Evaluados por aplicación tópica de 0,2ul de solución de deltametrina en acetona sobre el opérculo de cada huevo y sobre el abdomen dorsal de ninfas I.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

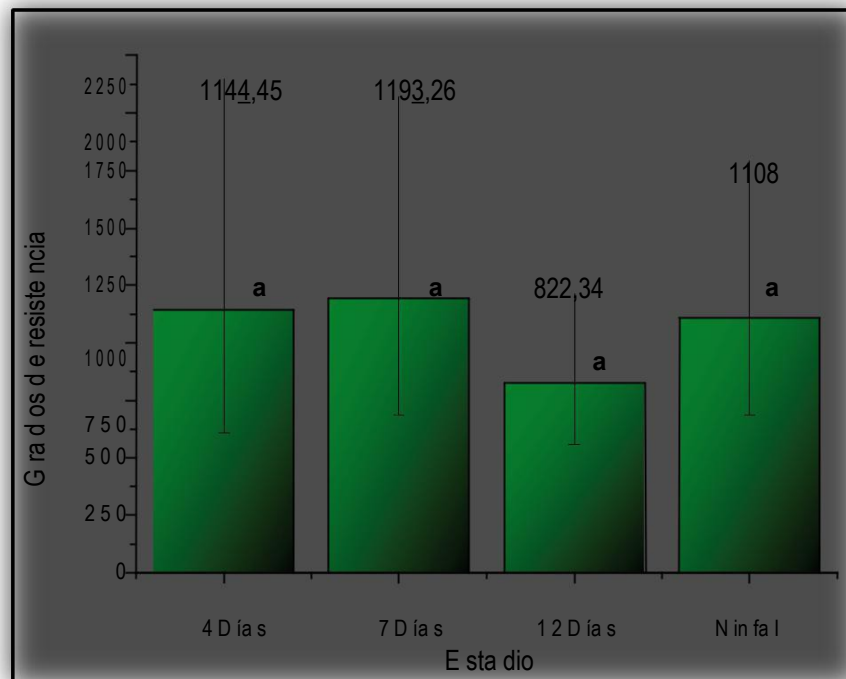


Figura 47. Grados de resistencia población Campo Largo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Población "Entre Ríos"

Los datos de DL₅₀ y resistencia a deltametrina en huevos de 4, 7 y 12 días, para la población "Entre Ríos" se encuentra en la Tabla 3 y figuras 48 y 49.

A modo comparativo se muestran los valores estimados para ninfa I.

| Población | Edad | n | DL ₅₀ (ng/i) (IC) | RR (IC) |
|------------|---------------|-----|------------------------------|-------------------------------|
| Entre Ríos | Huevo 4 días | 142 | 10,63 ^a (1-21) | 21,12 ^a (9-47) |
| | Huevo 7 días | 90 | 6,60 ^a (2-12) | 15,81 ^a (6-37) |
| | Huevo 12 días | 90 | 60,65 ^b (20-207) | 39,06 ^a (23-63) |
| | Ninfa 3 días | 130 | 35,80 ^b (21-66) | 173,80 ^b (149-230) |

La DL₅₀, RR y sus respectivos intervalos de confianza al 95% fueron calculados de acuerdo a Robertson y col., (2007).

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 2 Valores de DL₅₀ y grados de resistencia a deltametrina en la población Entre Ríos n = Número de individuos, DL₅₀ = Dosis Letal 50, ng/i = nanogramos por insecto, IC = Intervalo de Confianza, RR = Grado de resistencia

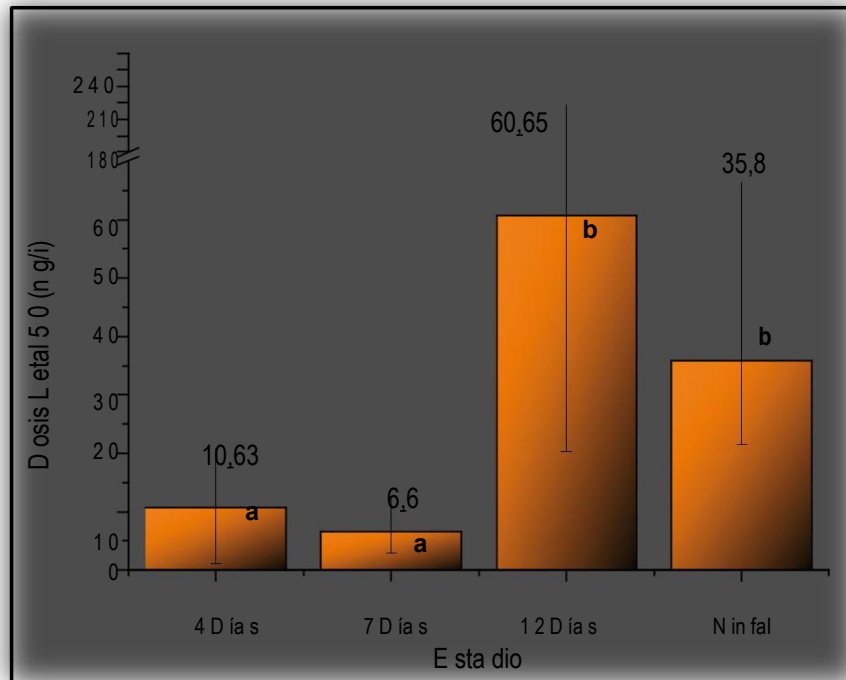


Figura 48. Valores de DL₅₀ a deltametrina de la población Entre Ríos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

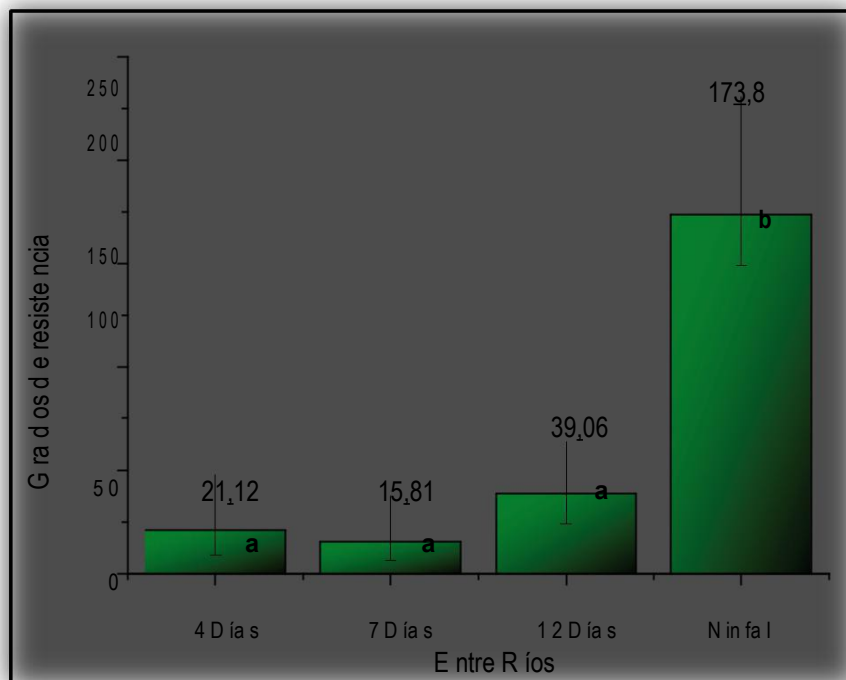


Figura 49. Grados de resistencia a deltametrina de la población Entre Ríos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Análisis de los resultados

La población Campo Largo mostró grados de resistencia a deltametrina llamativamente altos a lo largo de todo el desarrollo del huevo (1144,45x, 1193,26x y 822,34x, para huevos de 4, 7 y 12 días), y para ninfa I (1108x). De manera similar a lo descrito para la población de referencia, la susceptibilidad de los huevos de 12 días fue menor que la correspondiente a los huevos de 4 y 7 días. De todos modos, no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de resistencia establecidos para los huevos de las distintas edades y para ninfa 1.

La población Entre Ríos mostró grados de resistencia más moderados (pero significativos) que Campo Largo (21,2x, 15,81x, y 39,06x para huevos de 4, 7 y 12 días, y 173,8x para ninfa I). Como se observó en la población de referencia y en Campo Largo, la susceptibilidad de los huevos de 12 días fue menor que la correspondiente a los huevos de 4 y 7 días.

En ambas poblaciones resistentes se observó gran amplitud de los intervalos de confianza en las DL₅₀ calculadas, debido posiblemente a la heterogeneidad que posee una población recolectada en campo donde podrían coexistir individuos susceptibles y resistentes.

Los grados de resistencia estimados para estas poblaciones indican que la resistencia se expresa desde el desarrollo temprano en huevos de *T. infestans*, a pesar que el efecto tóxico mostró diferencias en distintas etapas de desarrollo. Estos hallazgos representan la primera evidencia documentada de la expresión de la resistencia a insecticidas piretroides en huevos de desarrollo temprano e intermedio de *T. infestans*.

Existen escasos trabajos sobre la expresión de la resistencia a insecticidas en huevos de insectos, y esos trabajos se realizaron solamente en huevos de desarrollo avanzado. Por ejemplo, Toloza y

col., (2008) estudiando huevos de 12 días de edad, establecieron la presencia de diferentes patrones de resistencia en huevos y ninfas de *T. infestans* de Argentina y Bolivia. En las poblaciones de Argentina, encontraron altos niveles de resistencia tanto en huevos como en ninfa I (114,28x y 133,1x), mientras que las distintas poblaciones resistentes de Bolivia mostraban huevos susceptibles sugiriendo diferentes mecanismos de resistencia en los distintos estados.

En un trabajo reciente, Santo-Orihuela y col., (2013) también utilizando huevos de 12 días de edad de *T. infestans*, estableció que los huevos de las poblaciones silvestres de distintas áreas de Bolivia poseían similar susceptibilidad que los huevos de poblaciones susceptibles de Argentina. Este estudio también estableció altos niveles de resistencia en huevos de las poblaciones domiciliadas de Argentina (44,9x y 8,10x en huevos de 12 días).

La comparación de los niveles de resistencia estimados en los trabajos previamente mencionados con la población argentina de Campo Largo indica que esta última es significativamente la más resistente a deltametrina de todas las poblaciones de *T. infestans* estudiadas hasta el presente. Esta amplia diferencia es llamativa, sobre todo considerando la cercanía geográfica de esta población con la población de Salvador Mazza, y puede ser una evidencia de los distintos perfiles de resistencia descritos previamente en *T. infestans* (Germano y col., 2012).

Actividad de Monooxigenasas P450

La actividad de monooxigenasas P450 en la población de referencia y en las poblaciones resistentes a deltametrina estudiadas, se resumen en la tabla 6 y Figura 50.

| Población | Estadio | n | Medias (picomoles 7-OHC/min/huevo) | D.E. |
|-------------|---------|----|------------------------------------|-------|
| Referencia | 4 días | 51 | 12,91 ^{ab} | 9,41 |
| | 7 días | 57 | 13,71 ^{ab} | 12,49 |
| | 12 días | 26 | 17,21 ^{bc} | 15 |
| Entre Ríos | 4 días | 66 | 12,17 ^a | 16,17 |
| | 7 días | 47 | 15,76 ^{bc} | 15,19 |
| | 12 días | 53 | 13,75 ^{ab} | 13,73 |
| Campo Largo | 4 días | 23 | 15,30 ^{abc} | 15,94 |
| | 7 días | 26 | 20,65 ^c | 13,26 |
| | 12 días | 32 | 14,02 ^{bc} | 9,8 |

H = 19,11, p = 0,0143

Para las comparaciones múltiples de a pares:

Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabla 6: Análisis estadístico por kruskal-wallis de la actividad de monooxigenasas P450 en huevos de 4, 7 y 12 días de poblaciones susceptibles y resistentes.

n = Número de individuos, D.E. = Desvío Estándar, H = Estadístico de contraste de Kruskal-Wallis, p = Nivel de significación. Letras diferentes indican diferencias significativas.

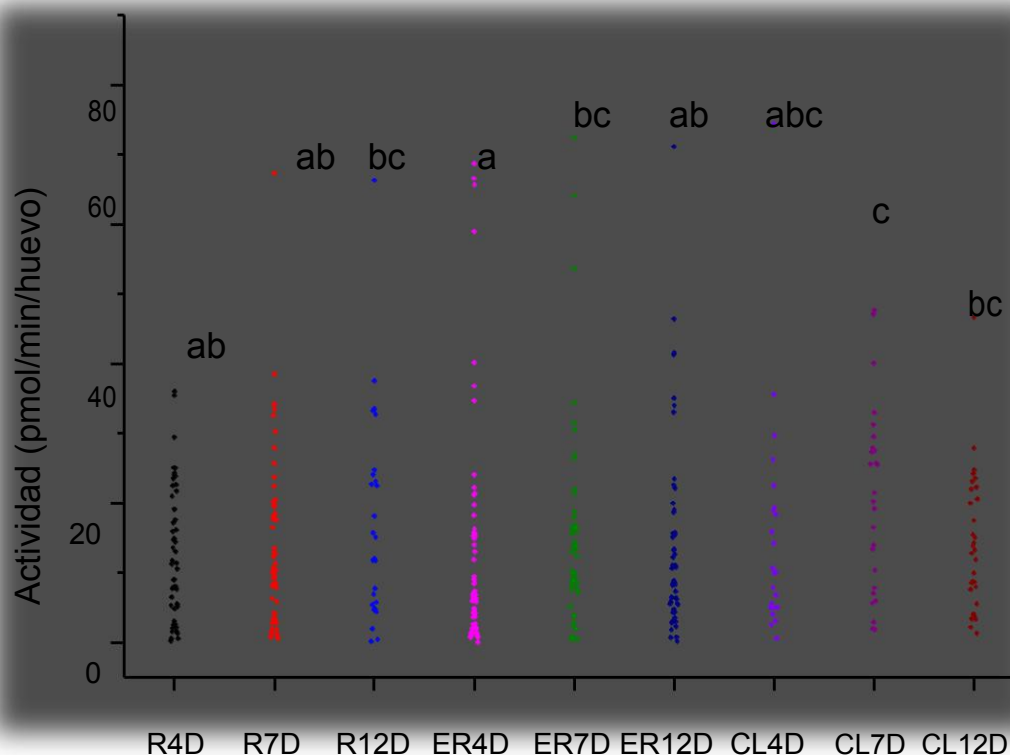


Figura 50. Actividad de monooxigenasas P450 en huevos de 4, 7 y 12 días. R = Población de Referencia. ER = Población Entre Ríos. CL = Población Campo Largo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El análisis estadístico de la actividad de monooxigenasas P450 determinadas, no evidenció diferencias significativas entre las distintas etapas de desarrollo del embrión ni entre las poblaciones estudiadas.

La actividad enzimática media fue para la población susceptible de 12,9; 13,7 y 17,2 picomoles de 7-OHC/min/huevo en huevos de 4, 7 y 12 días respectivamente.

La actividad enzimática media de la población Entre Ríos fue 12,17; 15,76 y 13,75 picomoles 7-OHC/min/huevo en huevos de 4, 7 y 12 días respectivamente.

La actividad enzimática media de la población Campo Largo fue 15,3; 20,65 y 14,02 picomoles 7-OHC/min/huevo en huevos de 4, 7 y 12 días respectivamente.

Estos resultados realizados en huevos, coinciden con estudios anteriores realizados sobre ninfas de poblaciones resistentes de *T.*

infestans. En estos estudios no se detectó incremento de actividad de monooxigenasas P450 en poblaciones recolectadas en el primer foco de resistencia detectado en Salvador Mazza-Argentina (Picollo y col., 2005). Tampoco se detectaron diferencias entre la actividad de la población de referencia y poblaciones de distintas áreas geográficas de Argentina (Salta y La Rioja) y Bolivia (Yacuiba) (Santo Orihuela y col., 2008).

En cambio, Rodríguez y col., (2011) utilizando una metodología similar a la utilizada en este trabajo de tesis (medición individual "in vivo"), detectó un aumento significativo (5,1 a 16,6 veces) de estas enzimas en larvas neonatas de 9 de las 13 poblaciones resistentes. Estos autores concluyeron que la mayor actividad de este complejo enzimático era el principal mecanismo de resistencia en la mayoría de las 13 poblaciones estudiadas.

En otros insectos, como *Anopheles gambiae* resistente a piretroides, se ha encontrado sobreexpresión de un determinado citocromo P450 de un total de 250, el CYP6P3, y eso se traducía en una mayor eficiencia para hidrolizar alfa-ciano y no-alfa-ciano piretroides (Müller y col., 2008). Otros estudios demostraron que la amplificación de un único citocromo P450 puede seleccionarse rápidamente en una población y hacerla resistente a insecticidas (Ffrench-Constant y col., 2004). Por ejemplo, CYP6D1 es el responsable de mejorar la capacidad de degradar piretroides en una cepa de *Musca domestica* según publicó Zhang y col., (2007).

Considerando que las monooxigenasas P450 son un complejo enzimático muy importante en la degradación y en la resistencia a insecticidas piretroides, sería muy interesante realizar nuevos estudios sobre la actividad de algunas isoenzimas específicas de este complejo, cuya actividad puede estar incrementada pero no ser detectada al medir la actividad de todo el complejo.

Actividad de Piretroide Esterasas

Síntesis del 7-CP

Resultado de la cromatografía gaseosa.

En la Figura 51 se pueden ver los picos correspondientes a una de las fracciones obtenidas mediante la separación cromatográfica por columna, cuyos tiempos de retención concuerdan con el del 7-CP sintetizado previamente en el laboratorio utilizado como patrón.

Los viales colectados entre las alícuotas 5 y 10 (inclusive) mostraron 3 picos. El primero es el pico de solvente. Los otros 2 picos corresponden a los isómeros, el cis- con un tiempo de retención de 20,664 min y el trans-con un tiempo de retención 21,071.



Figura 51. Cromatograma de una fracción de 7-CP purificado inyectada en el GC-FID, isómero cis- (20,664 min, izquierda), trans- (21, 071 min. derecha).

Resultado de la cromatografía gaseosa acoplada a masa

En el cromatograma del 7-CP sintetizado, los tiempos de retención obtenidos fueron de 17,802 min para los isómeros cis- y 18,091 para los isómeros trans- (figura 52). Los espectros de masas de ambos picos mostraron un ión molecular a m/z 352 (M^+ , 2), un pico base a m/z 191 ($M-RO$, 100) correspondiente a la pérdida del alcohol, y los picos a m/z 163 ($191-CO$, 47), 127 ($163-HCl$, 66) y 91 ($127-HCl$, 96) (figura 53) correspondientes a la fragmentación del ácido

permetrínico (figura 54), lo que indicaría la estructura química del permetrato de 7-cumarilo.

Los isómeros presentaron espectros de masas indistinguibles entre sí como corresponde a isómeros geométricos.

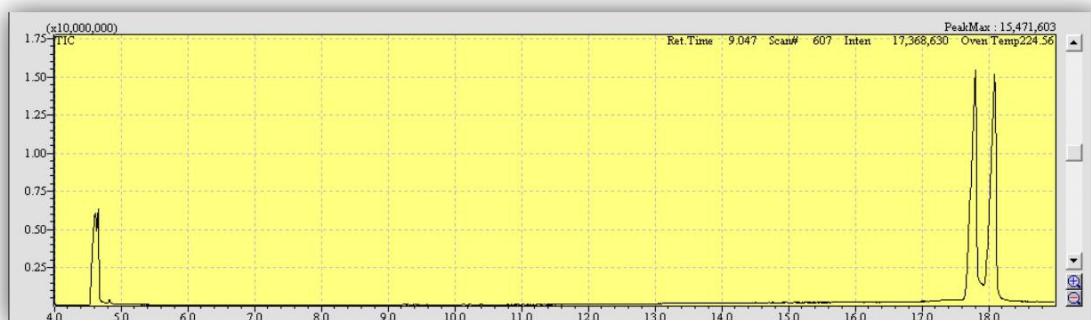


Figura 52. Picos del isómero cis- (17,802 min, izquierda) y trans- (18,091 min, derecha).

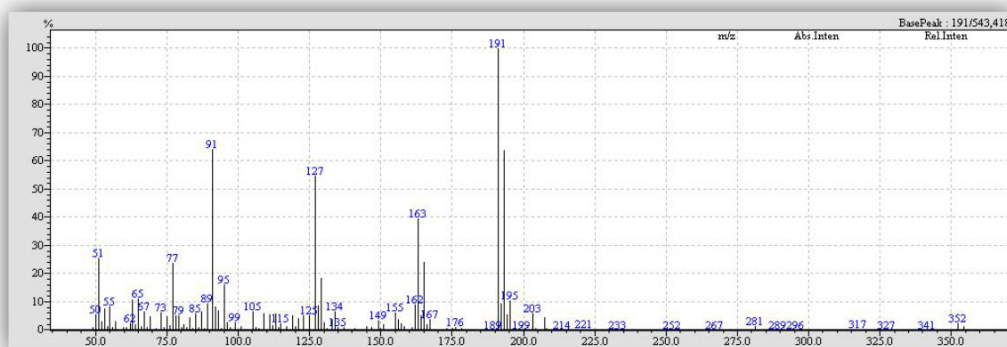
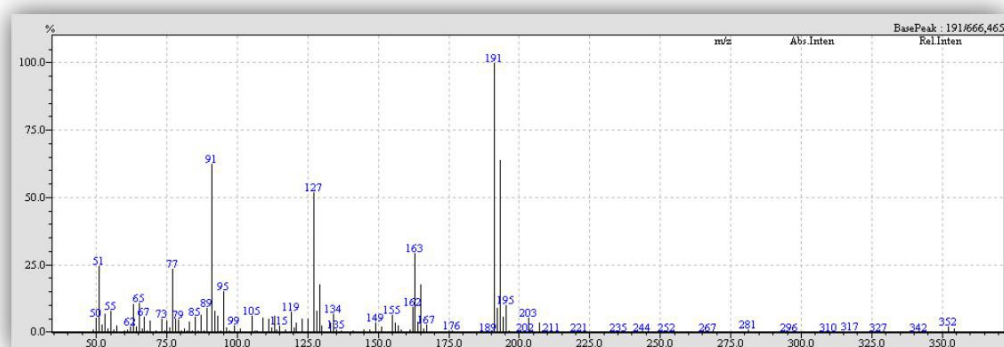
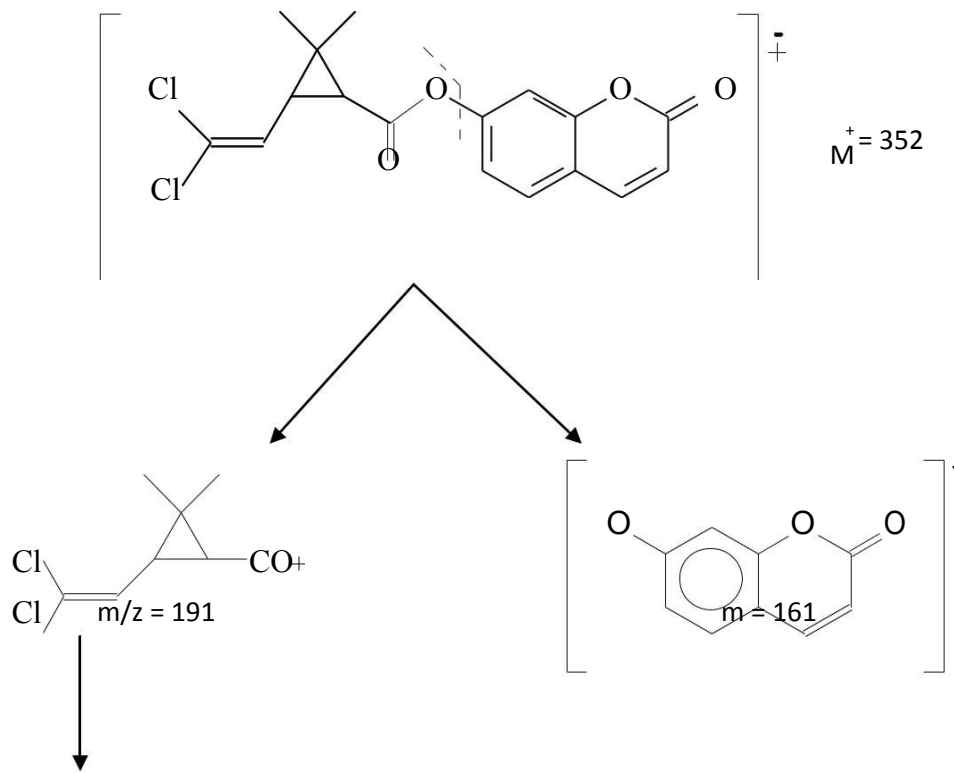


Figura 53. Espectro de masa del isómero cis (arriba) y trans- (abajo).



$m/z = 163$ (191-CO), 127 (163-HCl), 91 (127-HCl)

Figura 54. Esquema de fragmentaciones del permtrato de 7-cumarilo.

Resultado de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear

El espectro obtenido concuerda con la estructura teórica del 7-CP (Santo-Orihuela y col., 2006).

En las Tablas 7 y 8, y figuras 55 y 56 se presentan los distintos tipos de hidrógenos y carbonos asignando a cada uno su desplazamiento (δ ppm).

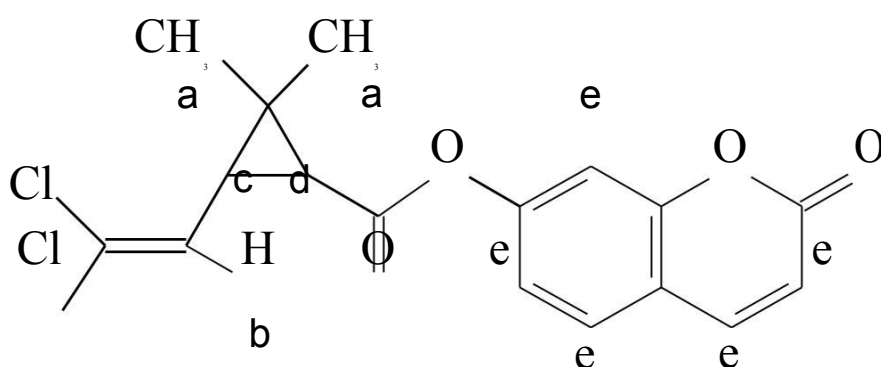


Figura 55. Cis-trans 7-CP, marcados los hidrógenos.

| Tipo Hidrógeno | δ ppm | Multiplicidad | Integración |
|----------------|--------------|---------------|-------------|
| a | 1,30-1,39 | multiplete | 6H |
| b | 6,2-6,4 | doblete | 1H |
| b* | 5.69 | doblete | 1H |
| c | 2,12-2,23 | triplete | 1H |
| c* | 2,35-2,37 | doble doblete | 1H |
| d | 1,86 | doblete | 1H |
| d* | 1,62 | doblete | 1H |
| e | 7,05-7,70 | multiplete | 5H |

Hidrógenos *: corresponden a protones trans.

Tabla 7 - Datos del espectro ^1H RMN del cis-trans- 7-CP.

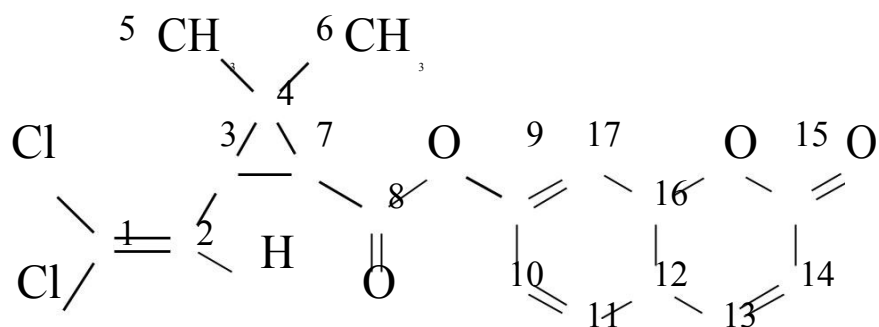


Figura 56. Cis-trans 7-CP, marcados los carbonos.

| Carbono | | Cis - trans(δ ppm) | Trans (δ ppm) |
|----------|--------|----------------------------|-----------------------|
| 5 | C2-CH3 | 14.8 | 20,1 |
| 6 | C2-CH3 | 28.2 | 30,1 |
| 4 | 2C | 28.9 | 30.3 |
| 3 | 3C | 33.5 | 33.9 |
| 7 | 1C | 31.6 | 34.4 |
| 2 | HC= | 110.4 | 110.5; |
| 10 al 14 | Ar= | 116.1; 118.4; | 116,6; 118,5; |
| | | 121.9; 123.9; | 123,0; 126,2; |
| | | 124,4 | 128.5 |
| 17 | Ar= | 128.4 | 142.8 |
| 1 | C= | 142.8 | 153.2 |
| 9 | ArOC | 153.1; 154.7 | 154,7; 160.3 |
| 8 | C=O | 168.4 | 169.1 |

Tabla 8 - Datos del espectro ^{13}C RMN del cis-trans- 7-CP

Medición de la actividad

En la Tabla 9 se resumen apreciar los datos y los resultados del análisis estadístico.

En la figura 57 se puede apreciar la distribución de la actividad enzimática en individuos de cada población y estadio (huevos de 4, 7 y 12 días) en un gráfico de dispersión de puntos.

| Población | Estadio | n | Medias (picomoles 7-OHC/min) | D.E. | Estadístico |
|-------------|---------|-----------------|------------------------------|------|-------------|
| Referencia | 4 Días | 77 | 13,60 | 2,20 | a |
| | 7 Días | 70 | 16,67 | 2,03 | b |
| | 12 Días | 51 ^f | 22,21 | 6,22 | d |
| Entre Ríos | 4 Días | 71 | 16,17 | 3,73 | b |
| | 7 Días | 74 | 21,44 | 8,15 | c d |
| | 12 Días | 75 | 26,14 | 7,33 | e |
| Campo Largo | 4 Días | 79 | 16,04 | 4,24 | b |
| | 7 Días | 77 | 17,98 | 3,34 | c |
| | 12 Días | 76 | 28,87 | 6,80 | e |

H = 326,51, P < 0,0001

Para las comparaciones múltiples de a pares:

Medias con letras diferentes son significativamente diferentes (p < 0,05).

Tabla 9: Valores promedio de actividad de piretroide esterasas en huevos de 4, 7 y 12 días de la población de referencia y resistentes. Análisis estadístico por Kruskal-Wallis de la actividad de piretroide esterasas.

n = Número de individuos, D.E. = Desvío Estándar, H = Estadístico de contraste de Kruskal-Wallis, p = nivel de significación.

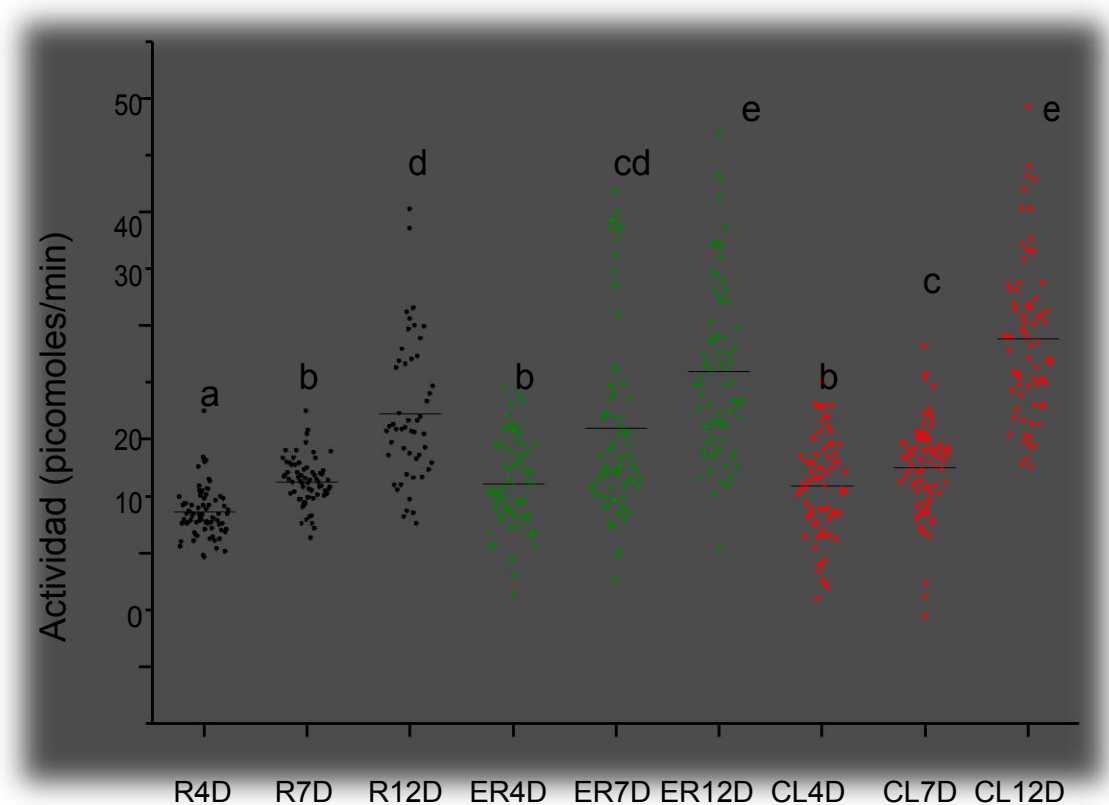


Figura 57. Gráfico de la distribución de la actividad de piretroide esterasas expresada en picomoles de 7-OHC/min en huevos de 4, 7 y 12 días para la población de referencia y las resistentes. La barra negra horizontal indica la media de todas las mediciones para cada estadio.

R = Población de Referencia susceptible. ER = Población Entre Ríos. CL = Población Campo Largo.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El análisis estadístico arroja las siguientes diferencias:

A los 4 días de desarrollo, la población de referencia posee valores significativamente menores que los de Entre Ríos y Campo Largo. No hay diferencias significativas entre las 2 poblaciones resistentes.

A los 7 días de desarrollo, la población de referencia es significativamente diferente de Entre Ríos y Campo Largo, ya que ambas poseen medias superiores pero no significativamente diferentes entre sí.

A los 12 días de desarrollo las 2 poblaciones de campo presentan medias significativamente superiores a la población de referencia, pero no son diferentes entre sí.

Análisis de los resultados

La estructura química del 7-CP, de características similares a los insecticidas piretroides, convierte a este compuesto en un sustrato con alta especificidad de piretroide-esterasas (Santo-Orihuela y col., 2006). La contribución de las piretroide-esterasas como mecanismo de resistencia a piretroides fue demostrado para estados post-embrionarios de poblaciones de vinchucas de áreas geográficas de Argentina y Bolivia por Santo-Orihuela y col., (2008). Estos autores demostraron un aumento en el porcentaje de insectos con mayor actividad de piretroide-esterasas en ninfas de las poblaciones argentinas, pero inesperadamente, encontraron menor actividad de esas enzimas en ninfas de una población resistente de Bolivia (Yacuiba). Estos resultados demuestran diferencias en el mecanismo de resistencia de acuerdo a la localización geográfica. Posteriormente esos mismos autores determinaron un leve incremento de la actividad de piretroide-esterasas en huevos de desarrollo tardío (12 días de edad) de una población resistente a deltametrina de El Palmar, Bolivia, demostrando que las piretroide-esterasas pueden estar involucradas en el desarrollo de resistencia en estados embrionarios (Santo-Orihuela y col., 2013).

De manera general, podríamos resumir que los cambios en la actividad de esterasas medidos podrían estar relacionados a un aumento en la cantidad de enzima (mayor número de copias) o a un cambio en la efectividad y/o capacidad de la enzima a nivel molecular (Hemingway, 2000).

Existen en bibliografía numerosos ejemplos de resistencia debido a incremento en la actividad de esterasas en insectos en general, pero muy escasos en huevos. Por ejemplo, Rodríguez y col., (2011) demostraron un aumento de 5 veces en la actividad de esterasas en larvas neonatas de *Cydia pomonella* resistentes a insecticidas.

Otros estudios han descrito con mayor profundidad los mecanismos involucrados en la mayor actividad hidrolítica de las poblaciones resistentes. Entre ellos, la amplificación génica (un selectivo aumento de la cantidad de copias de un gen) y la regulación alterada. Tal es el caso del Pulgón melocotonero *Myzus persicae*, donde se encontró que la resistencia estaba asociada tanto a amplificación de genes de esterasas como a la síntesis de una forma truncada de la enzima, denominada "rápida", que en ambos casos aumentaba la resistencia a insecticidas (Ffrench-Constant y col., 2004), siendo este último un caso particular que involucra un cambio molecular de la proteína.

Relacionado con este último mecanismo, la modificación de la actividad hidrolítica como consecuencia de un cambio estructural y/o conformacional de la proteína, especialmente en el sitio catalítico o de acción de las esterasas puede disminuir la susceptibilidad a piretroides. En ciertos insectos se ha demostrado que sólo aumenta la actividad hidrolítica de la enzima, pero no su cantidad molar (Lawrence y Sarjeet, 2010).

Mutación del canal de sodio *kdr*

Mutación L1014F

En el caso del estudio de la mutación L1014F *kdr*, el resultado final se interpretó directamente desde el último gel realizado en base a la metodología descripta previamente.

En el gel se puede observar una banda control de 572pb, una banda de 476pb en el caso de presencia del alelo susceptible, y una banda de 130pb en el caso de presencia del alelo resistente.

Pool de 10 huevos de cada población se homogeneizaron en el buffer provisto por el kit de extracción Promega y fueron analizados. La población de referencia mostró la secuencia de tipo salvaje solamente (476pb). En las poblaciones Campo Largo y Entre Ríos, además de la banda salvaje, también estuvo presente una banda (130pb) en el gel que indica la presencia de una mutación, que consiste en una sustitución nucleotídica de una adenina (TTA) por una timina (TTT), que provoca el cambio de una leucina por fenilalanina. Esta mutación fue identificada como mutación *kdr* L1014F en varias especies de insectos incluyendo *T. infestans* (Fabro y col., 2012) (Figura 58).

La población de referencia no posee esta mutación, pero las 2 poblaciones de campo poseen el alelo resistente. En ambos casos se puede apreciar la presencia del alelo susceptible también, lo cual puede indicar la presencia de individuos homocigotas con y sin la mutación, o la presencia de individuos heterocigotos.



Figura 58. Gel indicando presencia de la mutación L1014F. L = Ladder, marcador de peso molecular, R = Referencia Susceptible, CL = Campo Largo, ER = Entre Ríos, CR = Control Resistente.

Mutación L925I

Los resultados del ensayo para detectar la mutación L925I *kdr* demostraron la ausencia de esta mutación en las poblaciones estudiadas.

En el gel (Figura 59) se puede apreciar la corrida de cada población antes de la digestión con la enzima de restricción y luego de la digestión (L = Marcador de peso molecular, S = Población Susceptible de referencia, ER = Entre Ríos, CL = Campo Largo, R = Población resistente con la mutación L925I, a/d = antes de la digestión, d/d = después de la digestión). En caso de no estar presente la mutación, no se suprime el sitio de corte y se puede apreciar luego de la digestión una banda ligeramente más corta, 521pb, y una banda de 51pb que es muy clara y no se puede apreciar en este tipo de gel (la última banda visible del marcador de peso molecular corresponde a 100pb). En el caso del control resistente (R) al estar mutado el sitio de corte, la enzima no puede actuar y tanto antes como después de la digestión se aprecia la misma banda de 572pb.

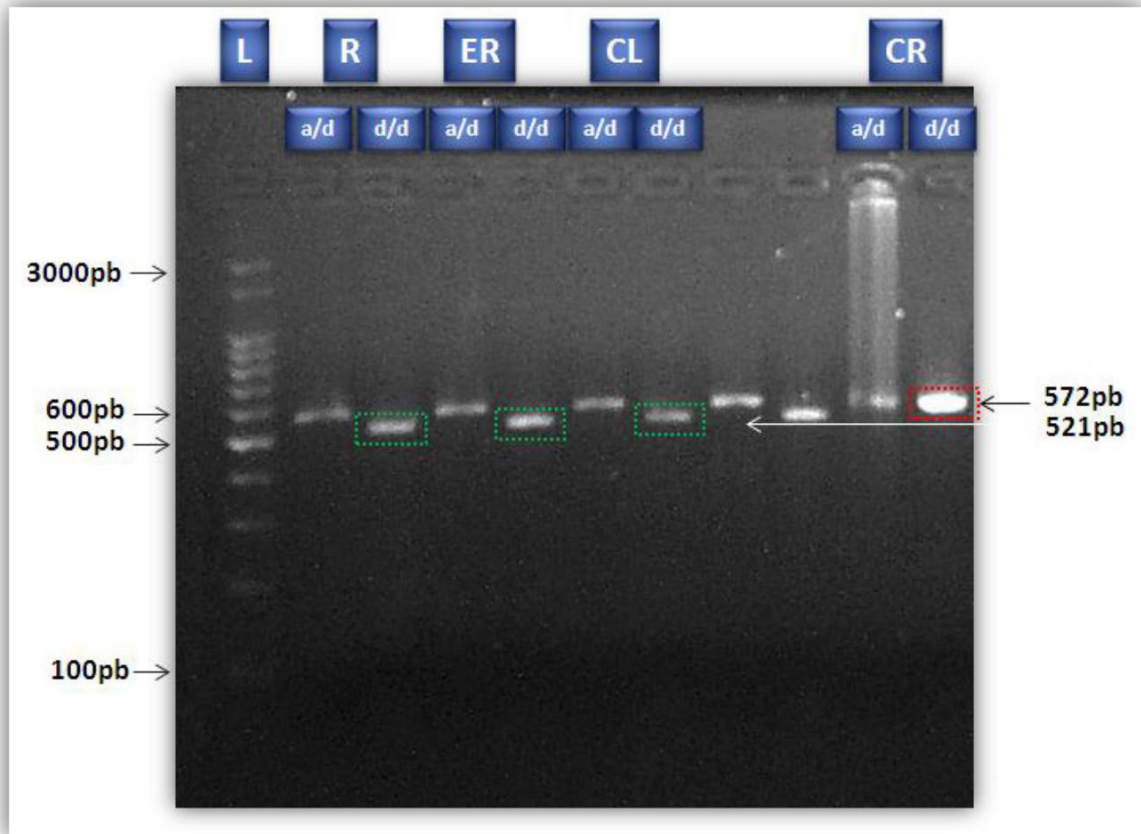


Figura 59. Gel indicando presencia/ausencia de mutación L925I. L: Ladder, marcador de peso molecular, R = Población Susceptible de Referencia, ER: Entre Ríos, CL: Campo Largo, CR: Control resistente: población con la mutación L925I, a/d: antes de la digestión, d/d: Después de la digestión. En verde: no mutado. En rojo: Mutado.

Análisis de los resultados

Los mecanismos de resistencia involucrados en los huevos en desarrollo, fueron explorados a través del análisis de mutaciones puntuales que confieren resistencia a piretroides. Estos insecticidas actúan sobre el sistema nervioso de los insectos modificando el funcionamiento normal de los canales de sodio dependientes del voltaje en las membranas de las células. Se han descrito mutaciones puntuales en el gen del canal de sodio que producen reducción en la sensibilidad a los insecticidas piretroides (gen *kdr*, knock-down resistant) (Soderlund, 2008). Este importante mecanismo de resistencia fue descrito en insectos plaga de importancia económica y sanitaria por Soderlund y Knipple (2003), y recientemente se describieron dos mutaciones en triatominos asociadas a la resistencia a deltametrina: L1014F y L925I (Fabro y col., 2012; Capriotti y col., 2014).

Los estudios realizados demostraron la presencia de la mutación L1014F en las poblaciones resistentes Campo Largo y Entre Ríos. Este hallazgo concuerda con estudios anteriores que, detectaron la presencia de esa misma mutación en una población de campo cercana al área geográfica donde fueron recolectadas las poblaciones estudiadas en este trabajo de tesis.

Las poblaciones estudiadas en este trabajo no poseen la mutación *kdr* L925I. Este hallazgo concuerda con lo reportado hasta ahora donde esta mutación sólo ha sido encontrada en insectos provenientes de la provincia de Chaco, Argentina (Capriotti y col., 2014).

De acuerdo a trabajos anteriores y en función del análisis toxicológico y bioquímico de ninfa I y huevos de 12 días, existen al menos tres perfiles de resistencia a piretroides en poblaciones de *T. infestans* de distintas áreas geográficas (Germano y col., 2012). Estos perfiles de resistencia se identificaron como Ti-R1, Ti-R2 y Ti-

R3, y se detectan en la zona argentina de Acambuco (Salta), y en zonas bolivianas: Entre Ríos (Tarija) y Mataral (Cochabamba).

El perfil Ti-R1 presenta ninfas y huevos de 12 días de edad y se caracterizó por poseer niveles moderados de resistencia a deltametrina, y con mayor actividad de piretroide-esterasas. El perfil Ti-R2 corresponde a ninfas con alta resistencia a deltametrina y baja resistencia a fipronil, huevos de 12 días con resistencia moderada a deltametrina, y mayor actividad de piretroide-esterasas. El perfil Ti-R3 presenta ninfas con baja resistencia a deltametrina, alta resistencia a fipronil, huevos de 12 días con resistencia baja a deltametrina, y actividad incrementada de piretroide-esterasas.

Las dos poblaciones analizadas en este trabajo de tesis pertenecen al área geográfica Ti-R1, donde también fue encontrada la mutación L1014F (Fabro y col., 2012). Por el contrario la mutación L925I que fue descrita para *T. infestans*, proviene de una nueva área resistente de la provincia de Chaco, Argentina (Germano y col., 2013). La mutación L925I parece ser específica de hemípteros, ya que fue descrita para la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Morin y col., 2002), la chinche de cama *Cimex lectularius* (Yoon y col., 2008) y la mosca blanca de invernadero *Trialeurodes vaporariorum* (Karatolos y col., 2012). En estas tres especies de hemípteros resistentes, los niveles de resistencia estimados fueron altos (>100x), similar a la situación de *T. infestans* de Argentina.

Las importantes diferencias entre los perfiles de resistencia hallados en distintas áreas geográficas, reflejan las diferencias ya encontradas entre poblaciones andinas (>1.700 msnm) y no andinas (entre 0 y 1.400 msnm) (Panzera y col., 2004).

En este trabajo, la población Campo Largo posee niveles de resistencia en huevos de 12 días de 822,34x y en ninfa I de 1108x. La población Entre Ríos, posee niveles de resistencia de 39,06x en huevos de 12 días y 173,80x en ninfa I. Estas 2 poblaciones sólo

poseen la mutación L1014F, aunque se desconoce su frecuencia, y ambas comparten los mecanismos de resistencia estudiados. Una alta frecuencia, implicaría que mayor cantidad de individuos de la población poseen la mutación. Considerando que los niveles de resistencia miden una respuesta poblacional y no individual, probablemente, los niveles significativamente más altos de resistencia de la población Campo Largo correspondan a una mayor proporción de individuos resistentes en la población (Ndiath y col., 2012).

Este resultado apoya la hipótesis de que altos niveles de resistencia no se dan solamente por una mutación puntual, sino que son un conjunto de distintos mecanismos. Esto también explica la gran diferencia de susceptibilidad entre las poblaciones Entre Ríos y Campo Largo, evidenciando que hay más mecanismos a estudiar para entender por qué existe esta gran diferencia de susceptibilidad.

Otros posibles mecanismos de resistencia

De acuerdo a los resultados de este trabajo de tesis, los mecanismos involucrados en la alta resistencia de los huevos durante todo su desarrollo son la mayor actividad enzimática de las piretroide-esterasas y la modificación del sitio de acción. Sin embargo, estos resultados no explican los mayores niveles de resistencia a deltametrina establecidos para todo el desarrollo embrionario en la población Argentina estudiada (1144,45- 1193,26 y 822,34 en huevos de 4, 7, y 12 días de edad) comparada con la población boliviana (21,12- 15,81 y 39,06 en huevos de 4, 7, y 12 días de edad).

Otras posibles causas podrían ser la presencia de mecanismos de resistencia no estudiados en esta tesis, como la velocidad reducida de penetración a través de la cutícula. La cutícula de los insectos es la primera barrera protectora contra cualquier agente químico (como un insecticida de contacto) o biológico. Esta barrera está diseñada principalmente para evitar la deshidratación del insecto, y pequeños cambios en su cantidad o composición relativa pueden ser dañinos y comprometer la supervivencia o competencia del insecto. En el caso de los huevos, a medida que se desarrollan, las células hexagonales que lo componen desarrollan una capa cerosa, cuya función es evitar la pérdida de agua. Esta capa también puede impedir la penetración del insecticida. Se ha demostrado que si se le extrae la capa cerosa por lavado con solventes a un adulto, aumenta la susceptibilidad a insecticidas y la mortalidad, aún con dosis sub-letales de éste (Juárez, 1994; Juárez y Fernández, 2007). Se ha encontrado que la cutícula de insectos resistentes está enriquecida en cadenas muy largas de hidrocarburos y una variedad de lípidos, llevando a una cutícula más gruesa y una disminución en la penetración de deltametrina (Pedrini y col., 2009).

Esto ha sido demostrado también en otros insectos como en la polilla *Helicoverpa armígera* donde se estableció que el tiempo de penetración de deltametrina para el individuo susceptible era 1 hora y para el resistente 6 horas (Ahmad y col., 2006). El ingreso más lento del insecticida brinda un mayor lapso de tiempo para la acción de las enzimas detoxificantes de insecticidas.

En el caso de *T. infestans* se encuentran descritas 2 mutaciones relacionadas con desarrollo de resistencia por alteración del sitio de acción del insecticida, una la que fue encontrada en las poblaciones de este trabajo llamada L1014F, y la otra sólo encontrada en poblaciones de la provincia de Chaco, Argentina, llamada L925I, ubicada en la unión transmembrana entre los segmentos IIS4-5. Esta población posee niveles de resistencia mucho más altos comparado a los valores de las poblaciones con la mutación L1014F (Morin y col., 2002; Carvajal y col., 2012; Fabro y col., 2012; Capriotti y col., 2014). Hasta el momento no se ha encontrado ninguna población de triatomíneos que posea estas 2 mutaciones simultáneamente.

Alternativas de Control: Recomendaciones

El desarrollo de resistencia a insecticidas es uno de los principales obstáculos en los programas de control de plagas. En el caso de *T. infestans*, los altos niveles de resistencia a piretroides establecidos requieren el estudio y aplicación de otras potenciales herramientas de control.

Una de estas herramientas es el hongo entomopatógeno *Bauveria bassiana* que representa un método de control biológico alternativo. Como dato adicional este organismo puede utilizarse en forma concomitante con la deltametrina (Napolitano y Juarez, 1997; Luz y col., 1998; Lecuona y col., 2001; Forlani y col., 2014).

Otra posible herramienta alternativa es el *Triatoma* virus (TrV), un virus de la familia Dicistroviridae, que afecta negativamente a *T. infestans* en varias formas: reducción de la longevidad del adulto (un tercio menos que un adulto sin infectar), y reducción de la oviposición de hembras infectadas (20% comparada a hembras no infectadas). Este virus se transmite por vía transovárica y en consecuencia, toda la progenie será infectada. Además las heces de los insectos poseen partículas virales infectivas, que ayudan a dispersar la infección. La potencialidad de este virus como agente de control de *T. infestans*, está en desarrollo (Muscio y col., 2000; Rozas-Dennis y Cazzaniga, 2000).

A estas alternativas, las mejoras edilicias (Rotondaro y col., 1997), el ordenamiento ambiental y la participación comunitaria son aristas importantes que no deben dejarse de lado en toda campaña gubernamental para intentar controlar esta enfermedad.

Tabla resumen de resultados

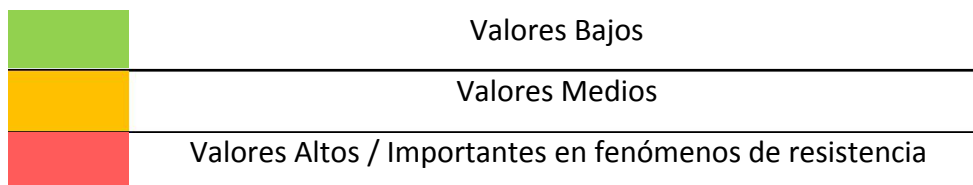
Tabla resumen de resultados

| Población | Edad | DL ₅₀ | GR | P450 | EST | kdr L1014F | kdr L925I |
|-------------------|---------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|------------|-----------|
| | Huevo 4 días | 0,50 ^a | --- | 12,91 ^{ab} | 13,60 ^a | | |
| Referencia | Huevo 7 días | 0,42 ^a | --- | 13,71 ^{ab} | 16,27 ^b | NO | NO |
| | Huevo 12 días | 1,55 ^b | --- | 17,21 ^{bc} | 22,21 ^d | | |
| | Ninfa I | 0,20 ^a | --- | --- | --- | | |
| | Huevo 4 días | 10,63 ^a | 21,12 ^a | 12,17 ^a | 16,17 ^b | | |
| Entre Ríos | Huevo 7 días | 6,60 ^a | 15,81 ^a | 15,76 ^{bc} | 21,44 ^{cd} | SI | NO |
| | Huevo 12 días | 60,65 ^b | 39,06 ^a | 13,75 ^{ab} | 26,14 ^e | | |
| | Ninfa I | 35,80 ^b | 173,80 ^b | -- | -- | | |
| | Huevo 4 días | 575,66 ^a | 1144,45 ^a | 15,3 ^{abc} | 16,04 ^b | | |
| Campo | Huevo 7 días | 502,12 ^a | 1193,26 ^a | 20,65 ^c | 17,98 ^c | SI | NO |
| Largo | Huevo 12 días | 1276,85 ^b | 822,34 ^a | 14,02 ^{bc} | 28,87 ^e | | |
| | Ninfa I | 227,8 ^a | 1108,00 ^a | --- | --- | | |

La DL₅₀, RR y sus respectivos intervalos de confianza al 95% fueron calculados de acuerdo a Robertson y col., (2007).

Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05).

Tabla 2 Valores de DL₅₀ y grados de resistencia a deltametrina en la población Campo Largo
 n = Número de individuos, DL₅₀ = Dosis Letal 50, ng/i = nanogramos por insecto, RR = Grado de resistencia



Conclusiones

Conclusiones

Este trabajo representa la primera investigación sobre mecanismos potenciales de resistencia en huevos en desarrollo de dos poblaciones de campo de *T. infestans* provenientes de áreas resistentes de Argentina y Bolivia.

Los principales logros del estudio fueron:

- ▯ La resistencia al insecticida piretroide deltametrina se expresa en todas las etapas de desarrollo embrionario de *T. infestans*. La resistencia fue significativamente mayor en huevos de vinchucas de Campo Largo respecto a las de Entre Ríos en estadios tempranos, intermedios y tardíos.
- ▯ Los estudios de los complejos enzimáticos monooxigenasas P450 y piretroide-esterasas permitieron encontrar actividad medible durante toda la embriogénesis (huevos de 4, 7 y 12 días de edad) tanto en las poblaciones susceptibles como en las resistentes.
- ▯ Los resultados mostraron que la resistencia metabólica mediada por piretroide esterasas es un factor contributivo en la resistencia a piretroides durante todo el desarrollo embrionario tanto en la población argentina (Campo Largo) como en la boliviana (Entre Ríos).
- ▯ Los estudios moleculares demostraron la presencia de la mutación puntual L1014F en el gen de los canales de sodio que indica una reducción en la sensibilidad a los piretroides en las

poblaciones de *T. infestans* resistentes de Campo Largo y de Entre Ríos.

- ▯ En síntesis, los resultados demuestran que los mecanismos involucrados en la alta resistencia de los huevos en desarrollo son la mayor actividad enzimática de las piretroide-esterasas y la modificación del sitio de acción. Sin embargo, estos resultados no explican los mayores niveles de resistencia establecidos para la población argentina comparada con la población boliviana.

Bibliografía

Bibliografía

- Agosin, M. (1985). Role of microsomal oxidations in insecticide degradation. En P. Press (Ed.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. (pp. 647-712). Pergamon, New York.
- Ahmad, Mushtaq, Denholm, Ian, y Bromilow, Richard H. (2006). Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest management science*, 62(9), 805-10. doi:10.1002/ps.1225.
- Aldridge, W. N. (1953a). Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *The Biochemical journal*, 53(1), 110-7.
- Aldridge, W. N. (1953b). Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *The Biochemical journal*, 53(1), 117-24.
- Atkinson, Susan. (2003, julio 4). *Interactions of pyrethroids with the voltage-gated sodium channel*. Recuperado de <http://eprints.nottingham.ac.uk/14490/1/275966.pdf>.
- Auger, Sergio, Casadó, Silvia, Ferreño, Diana, Newman, Marcelo, y Rollet, Raquel. (2005). La enfermedad de Chagas. Su impacto social y la respuesta del sistema de salud. Año 10 - N°46. *Boletín Científico, Asociación de Médicos Municipales de la CBA. Instituto para el desarrollo humano y la salud*. Recuperado de: <http://www.medicos-municipales.org.ar/bc0905.htm>.

- Bartlett, Gene R., y Keil, Clifford B. O. (1997). Identification and Characterization of a Permethrin Resistance Mechanism in Populations of the Fungus *Gnat Lycoriella Mali* (Fitch) (Diptera: Sciaridae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 58(3), 173-181. doi:10.1006/pest.1997.2306.
- Bloomquist, Gary J., y Dillwith, Jack W. (1985). Integument, respiration and circulation. Vol. 3, Volume 3. En G. A. Kerkut & L. I. Gilbert (Eds.), *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press.
- Brooks, Gerald Thomas. (1976). *Penetration and Distribution of Insecticides*. (C. F. Wilkinson, Ed.). Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-1-4899-2212-0.
- Bucher, E. H., y Huszar, P. C. (1999). Sustainable management of the Gran Chaco of South America: Ecological promise and economic constraints. *Journal of Environmental Management*, 57(2), 99-108. doi:10.1006/jema.1999.0290.
- Campbell, Peter M., Newcomb, Richard D., Russell, Robyn J., y Oakeshott, John G. (1998). Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(3), 139-150. doi:10.1016/S0965-1748(97)00109-4.
- Canale, Delmi, Miriam, Martín Garcia, y Spillmann, Cynthia. (2009). *Guía para el control vectorial de la enfermedad de Chagas*. Buenos Aires: Ministerio de salud, Presidencia de la Nación.
- Capriotti, Natalia, Mougabure-Cueto, Gastón, Rivera-Pomar, Rolando, y Ons, Sheila. (2014). L925I mutation in the Para-type sodium channel is associated with pyrethroid resistance in *Triatoma*

infestans from the Gran Chaco region. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(1), e2659. doi:10.1371/journal.pntd.0002659.

Carvajal, Guillermo, Mougabure-Cueto, Gastón, y Toloza, Ariel Ceferino. (2012). Toxicity of non-pyrethroid insecticides against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(5), 675-9.

Castell, José V. (2006). El metabolismo de fármacos, generación de metabolitos reactivos y su papel en el origen de las reacciones inmunológicas a fármacos. Recuperado de: http://www.uv.es/jcastell/Metabolismo_de_farmacos.pdf.

Catalá, Silvia S. (2011). The infra-red (IR) landscape of *Triatoma infestans*. An hypothesis about the role of IR radiation as a cue for Triatominae dispersal. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(8), 1891-8. doi:10.1016/j.meegid.2011.08.003.

Catterall, William A. (2001). A 3D view of sodium channels. *Nature*, 409(6823), 988-9, 991. doi:10.1038/35059188.

Catterall, William A. (2012). Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *The Journal of physiology*, 590(Pt 11), 2577-89. doi:10.1113/jphysiol.2011.224204.

Ceballos, L. a, Vazquez-Prokopec, G. M., Cecere, María Carla, Marcet, P. L., y Gürtler, R. E. (2005). Feeding rates, nutritional status and flight dispersal potential of peridomestic populations of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta tropica*, 95(2), 149-59. doi:10.1016/j.actatropica.2005.05.010.

Cecere, María Carla, Gürtler, R. E., Canale, D. M., Chuit, R., y Cohen, J. E. (2002). Effects of partial housing improvement and

insecticide spraying on the reinfestation dynamics of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta Tropica*, 84, 101-116. doi:10.1016/S0001-706X(02)00183-3.

Cecere, María Carla, Vázquez-Prokopec, Gonzalo M., Ceballos, Leonardo a, Gurevitz, Juan M., Zárate, Joaquín E., Zaidenberg, Mario, Kitron, Uriel, y Gürtler, Ricardo E. (2006). Comparative trial of effectiveness of pyrethroid insecticides against peridomestic populations of *Triatoma infestans* in northwestern Argentina. *Journal of medical entomology*, 43(5), 902-9.

Cecere, María Carla, Vazquez-Prokopec, Gonzalo M., Gürtler, Ricardo E., y Kitron, Uriel. (2004). Spatio-temporal analysis of reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) following insecticide spraying in a rural community in northwestern Argentina. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 71(6), 803-10.

Chudler, Eric H. (2015). Neuroscience for Kids. Recuperado de: <http://faculty.washington.edu/chudler/ap.html>.

Claudianos, C., Russell, R. J., y Oakeshott, J. G. (1999). The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. *Insect biochemistry and molecular biology*, 29(8), 675-86.
Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10451921>.

Colaboradores de Wikipedia. (2015a). Trypanosoma cruzi. Recuperado de: http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Trypanosoma_cruzi&ol did=80203298.

- Colaboradores de Wikipedia. (2015b). Enfermedad de Chagas. Recuperado de: http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Enfermedad_de_Chagas&oldid=80311656.
- Colaboradores de Wikipedia. (2015c). P450 Catalytic Cycle. Recuperado de: http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Cytochrome_P450&oldid=647717303.
- Colaboradores de Wikipedia. (2015d). Bolivia. Recuperado de: <http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Bolivia&oldid=80381327>.
- Cortez, Mirko Rojas, Emperaire, Laure, Piccinali, Romina V, Gürtler, Ricardo E., Torrico, Faustino, Jansen, Ana Maria, y Noireau, François. (2007). Sylvatic *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) in the Andean valleys of Bolivia. *Acta tropica*, 102(1), 47-54. doi:10.1016/j.actatropica.2007.02.014.
- Coura, José Rodrigues, y Dias, João Carlos Pinto. (2009). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl (i), 31-40. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753455>.
- Dafal, Rajendra. (2012). Sodium Channels and Their Modulators. Recuperado el 20 de abril de 2011 de: <http://www.authorstream.com/Presentation/rdafal-1367176-sodium-channel-moulators/>.

- Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R., y Williamson, M. S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB life*, 59(3), 151-162. doi:10.1080/15216540701352042
- Davies, T. G. E., Reilly, Andrias. O. O., Field, Linda M., Wallace, BA, y Williamson, Martin S. (2008). Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modelling. *Pest management science*, 1130(December 2007), 1126-1130. doi:10.1002/ps.
- De Montellano, Paul R. Ortiz. (2005). *Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry: Third edition*. (Paul R. Ortiz de Montellano, Ed.) *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry: Third edition*. Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/b139087.
- De Sousa, G., Cuany, A., Brun, A., Amichot, M., Rahmani, R., y Bergé, J. B. (1995). A microfluorometric method for measuring ethoxycoumarin-O-deethylase activity on individual *Drosophila melanogaster* abdomens: interest for screening resistance in insect populations. *Analytical biochemistry*, 229(1), 86-91.
- Devlin, Thomas M. (2006). *Bioquímica libro de texto con aplicaciones clínicas. Bioquímica libro de texto con aplicaciones clínicas*. (4ta edició.). Barcelona: Reverté.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, C. W. (2014). Infostat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Recuperado de: <http://www.infostat.com.ar>.
- Dujardin, J. P., y Tibayrenc, M. (1987). Isozyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans*

(Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *Journal of Medical Entomology*, 24(1), 4-6.

Fabro, Jésica, Sterkel, Marcos, Capriotti, Natalia, Mougabure-Cueto, Gastón, Germano, Mónica, Rivera-Pomar, Rolando, y Ons, Sheila. (2012). Identification of a point mutation associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Infection, genetics and evolution*, 12(2), 487-91. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.006.

Farnham, Andrew W. (1977). Genetics of resistance of houseflies (*Musca domestica* L.) to pyrethroids. I. Knock-down resistance. *Pesticide Science*, 8(6), 631-636. doi:10.1002/ps.2780080607.

Farnham, Andrew W., Murray, Alistair W. A., Sawicki, Roman M., Denholm, Ian, y White, Jean C. (1987). Characterization of the structure-activity relationship of *kdr* and two variants of super-*kdr* to pyrethroids in the housefly (*Musca domestica* L.). *Pesticide Science*, 19(3), 209-220. doi:10.1002/ps.2780190306.

Ferreira, Luiz F., Jansen, Ana M., y Araújo, Adauto. (2011). Chagas disease in prehistory. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 83(3), 1041-1044. doi:10.1590/S0001-37652011005000013.

Feyereisen, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*, 44, 507-33. doi:10.1146/annurev.ento.44.1.507.

Feyereisen, René. (2014). Insect P450 inhibitors and insecticides: challenges and opportunities. *Pest management science*. doi:10.1002/ps.3895.

- Ffrench-Constant, Richard H., Daborn, Phillip J., y Le Goff, Gaelle. (2004, marzo). The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends in Genetics*. doi:10.1016/j.tig.2004.01.003.
- Fichera, L. E., y Riarte, A. (1992). Embryology of *Triatoma infestans* (Klug), (Hemiptera, Reduviidae), a Chagas' disease vector. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 34(3), 211-216. doi:10.1590/S0036-46651992000300005.
- Field, L. M., y Devonshire, A. L. (1998). Evidence that the E4 and FE4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) are part of a gene family. *The Biochemical journal*, 330, 169-73.
- Fontan, A., y Zerba, E. N. (1987). Mode of Entry of Insecticides in *Triatoma infestans*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 4(4), 313-323. doi:10.1002/arch.940040408.
- Forlani, Lucas, Juárez, M. Patricia, Lavarías, Sabrina, y Pedrini, Nicolás. (2014). Toxicological and biochemical response of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* after exposure to deltamethrin. *Pest management science*, 70(5), 751-6. doi:10.1002/ps.3583.
- Fraenkel, G. S. (1959). The Raison d'Étre of Secondary Plant Substances: These odd chemicals arose as a means of protecting plants from insects and now guide insects to food. *Science*, 129(3361), 1466-1470. doi:10.1126/science.129.3361.1466.
- Galvão, C., Carcavallo, R., Rocha, DS, y Jurberg, J. (2003). Species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, 36(May), 1-36.

- Germano, M. D., Acevedo, G. Roca, Cueto, G. a. Mougabure, Toloza, a. C., Vassena, C. V., y Picollo, M. I. (2010). New Findings of Insecticide Resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) From the Gran Chaco. *Journal of Medical Entomology*, 47(6), 1077-1081. doi:10.1603/ME10069.
- Germano, Mónica Daniela, Picollo, María Inés, y Mougabure-Cueto, Gastón a. (2013). Microgeographical study of insecticide resistance in *Triatoma infestans* from Argentina. *Acta tropica*, 128(3), 561-5. doi:10.1016/j.actatropica.2013.08.007.
- Germano, Mónica Daniela, Santo-Orihuela, Pablo, Roca-Acevedo, Gonzalo, Toloza, Ariel Ceferino, Vassena, Claudia, Picollo, María Inés, y Mougabure-Cueto, Gastón. (2012). Scientific Evidence of Three Different Insecticide-Resistant Profiles in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Populations From Argentina and Bolivia. *Journal of Medical Entomology*, 49(6), 1355-1360. doi:10.1603/ME12070.
- Gimenez, Luisa, y Mitelman, Jorge E. (2011). Situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en ibero América. En Intramed (Ed.), *Libros Virtuales IntraMed - Enfermedad de Chagas Mazza en las grandes ciudades*. (p. 15). Intramed, Libro Virtual. Recuperado de: http://www.intramed.net/sitios/libro_chagas/.
- González Audino, Paola, Vassena, Claudia, Barrios, Silvia, Zerba, Eduardo, y Picollo, María Inés. (2004). Role of enhanced detoxication in a deltamethrin-resistant population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(3), 335-9. doi:/S0074-02762004000300018.

Google, Data SIO - NOAA - U.S. Navy - NGA - GEBCO, Geographer - US Dept of State, y Inav/Geosistemas SRL. (2015). Google Earth.

Gorla, DE. (2002). Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Ecología austral*, 117-127.

Gürtler, Ricardo E., Diotaiuti, Liléia, y Kitron, Uriel. (2008). Commentary: Chagas disease: 100 years since discovery and lessons for the future. *International Journal of Epidemiology*, 37(4), 698-701. doi:10.1093/ije/dyn134.

Gürtler, Ricardo E., Kitron, Uriel, Cecere, M. Carla, Segura, Elsa L., y Cohen, Joel E. (2007). Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(41), 16194-16199. doi:10.1073/pnas.0700863104.

Hemingway, J. (1995, julio 14). Mosquito carboxylesterase esta2¹ (A₂). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.270.28.17044.

Hemingway, J. (2000). The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect biochemistry and molecular biology*, 30(11), 1009-15. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10989287>.

Herath, P. R. J., Hemingway, J., Weerasinghe, I. S., y Jayawardena, K. G. I. (1987). The detection and characterization of malathion resistance in field populations of *Anopheles culicifacies* B in Sri

- Lanka. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 29(2), 157-162.
doi:10.1016/0048-3575(87)90074-5.
- Hinton, Howard Everest. (1981). *Hemiptera. Biology of Insect Eggs, Volume 2* (Primera Ed.). Pergamon Press.
- Juárez, M. P., y Fernández, G. C. (2007). Cuticular hydrocarbons of triatomines. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 147(3), 711-30.
doi:10.1016/j.cbpa.2006.08.031.
- Juárez, Patricia. (1994). Inhibition of cuticular lipid synthesis and its effect on insect survival. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 25(3), 177-191. doi:10.1002/arch.940250302.
- Karatolos, Nikos, Gorman, Kevin, Williamson, Martin S., y Denholm, Ian. (2012). Mutations in the sodium channel associated with pyrethroid resistance in the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. *Pest management science*, 68(6), 834-8.
doi:10.1002/ps.2334.
- Karunaratne, S. H., Vaughan, A., Paton, M. G., y Hemingway, J. (1998). Amplification of a serine esterase gene is involved in insecticide resistance in Sri Lankan *Culex tritaeniorhynchus*. *Insect molecular biology*, 7(4), 307-15. Recuperado de:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9723868>.
- Kasai, Shinji, Weerashinghe, Indira S., y Shono, Toshio. (1998). P450 Monooxygenases Are an Important Mechanism of Permethrin Resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 37(1), 47-56. ISSN: 07394462.
- Klowden, Marc J. (2013). Physiological Systems in Insects. En *Physiological Systems in Insects* (Second Edi., pp. 603-647).

Moscow, Idaho: Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-415819-1.00012-X.

Lardeux, Frédéric, Depickère, Stéphanie, Duchon, Stéphane, y Chavez, Tamara. (2010). Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. *Tropical medicine & international health: TM & IH*, 15(9), 1037-48. doi:10.1111/j.1365-3156.2010.02573.x.

Lawrence I, Gilbert, y Sarjeet S, Gill. (2010). *Insect Pharmacology: Channels, Receptors, Toxins and Enzymes*. Academic Press.

Lecuona, R. E., Edelstein, J. D., Berretta, M. F., La Rossa, F. R., y Arcas, J. a. (2001). Evaluation of *Beauveria bassiana* (hyphomycetes) strains as potential agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of medical entomology*, 38(2), 172-9.

Lee, Si Hyeock, y Clark, J. Marshal. (1998). Permethrin Carboxylesterase Functions as Nonspecific Sequestration Proteins in the Hemolymph of Colorado Potato Beetle. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 62(1), 51-63. doi:10.1006/pest.1998.2368.

LeOra Software. (2002). PoloPlus. Petaluma, California, USA.

Li, Xianchun, Schuler, Mary A., y Berenbaum, May R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual review of entomology*, 52, 231-53. doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151104.

Liang, Xiao, Xiao, Da, He, Yanping, Yao, Jianxiu, Zhu, Guonian, y Zhu, Kun. (2015). Insecticide-Mediated Up-Regulation of Cytochrome P450 Genes in the Red Flour Beetle (*Tribolium*

- castaneum*). *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 2078-2098. doi:10.3390/ijms16012078.
- Liu, N., y Yue, X. (2000). Insecticide resistance and cross-resistance in the house fly (Diptera: Muscidae). *Journal of economic entomology*, 93(4), 1269-75.
- Luz, Christian, Tigano, Myrian S., Silva, Ionizete G., Cordeiro, C. M. T., y Aljanabi, Salah M. (1998). Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Isolates to Control *Triatoma infestans*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(6), 839-846. doi:10.1590/S0074-02761998000600026.
- Matsuo, Noritada, y Mori, Tatsuya. (2012). *Pyrethroids: From Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide*. (Noritada Matsuo & Tatsuya Mori, Eds.) *Topics in current chemistry* (Vol. 314). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-27346-9.
- McKenzie, John A. (1996). *Ecological and Evolutionary Aspects of Insecticide Resistance*. Academic Press. Recuperado de: http://books.google.com.ar/books/about/Ecological_and_Evolutionary_Aspects_of_I.html?id=XDQgAQAAMAAJ&pgis=1.
- Meisler, Miriam H., y Kearney, Jennifer A. (2005). Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *Journal of Clinical Investigations*, 115(8). doi:10.1172/JCI25466.2010.
- Menn, J. J., y Hollingworth, R. M. (1985). Insecticides: Effects on the Nervous System. En G. A. Kerkut & L. I. Gilbert (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology: Insect control* (p. 849). Pergamon Press.
- Microsoft. (2010). Microsoft Excel. Redmond, WA.

- Ministerio de Salud de la Nación. (2012). Mapa sobre Chagas en Argentina. Recuperado de: <http://www.msal.gov.ar/>.
- Moncayo, a, y Ortiz Yanine, M. I. (2006). An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Annals of tropical medicine and parasitology*, 100(8), 663-77. doi:10.1179/136485906X112248.
- Montella, Isabela Reis, Schama, Renata, y Valle, Denise. (2012). The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(4), 437-49.
- Morin, S., Williamson, M. S., Goodson, S. J., Brown, J. K., Tabashnik, B. E., y Dennehy, T. J. (2002). Mutations in the *Bemisia tabaci* para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(12), 1781-91.
- Mouchès, C., Pasteur, N., Bergé, J. B., Hyrien, O., Raymond, M., de Saint Vincent, B. R., de Silvestri, M., y Georghiou, G. P. (1986). Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science (New York, N.Y.)*, 233(4765), 778-80.
- Müller, Pie, Warr, Emma, Stevenson, Bradley J., Pignatelli, Patricia M., Morgan, John C., Steven, Andrew, Yawson, Alexander E., Mitchell, Sara N., Ranson, Hilary, Hemingway, Janet, Paine, Mark J. I., y Donnelly, Martin J. (2008). Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS genetics*, 4(11), e1000286. doi:10.1371/journal.pgen.1000286

- Muscio, O., Bonder, M. A., La Torre, J. L., y Scodeller, E. A. (2000). Horizontal transmission of triatoma virus through the fecal-oral route in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Triatomidae). *Journal of medical entomology*, 37(2), 271-5.
- Napolitano, Roxana, y Juarez, M. Patricia. (1997). Entomopathogenous Fungi Degrade Epicuticular Hydrocarbons of *Triatoma infestans*, 344(1), 208-214.
- Ndiath, Mamadou O., Sougoufara, Seynabou, Gaye, Abdoulaye, Mazenot, Catherine, Konate, Lassana, Faye, Ousmane, Faye, Oumar, Sokhna, Cheikh, y Trape, Jean-Francois. (2012). Resistance to DDT and pyrethroids and increased *kdr* mutation frequency in *An. gambiae* after the implementation of permethrin-treated nets in Senegal. *PloS one*, 7(2), e31943. doi:10.1371/journal.pone.0031943.
- Nicholson, Russell A., Botham, Roger P., y Collins, Chrystal. (1983). The use of [³H] permethrin to investigate the mechanisms underlying its differential toxicity to adult and larval stages of the sheen blowfly *Lucilia sericata*. *Pesticide Science*, 14(1), 57-63. doi:10.1002/ps.2780140109.
- Nishizawa, Y. (1971). Development of new synthetic pyrethroids. *Bulletin of the World Health Organization*, 44(1-3), 325-36.
Recuperado de:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2428056&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Noireau, François, Flores, R., Gutierrez, T., y Dujardin., J. P. (1997). Detection of sylvatic dark morphs of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92(October 1996), 583-584.

- OEA. (2009, agosto 1). OEA - Organización de los Estados Americanos: Democracia para la paz, la seguridad y el desarrollo. Recuperado de: <http://www.oas.org/es/>.
- Oppenoorth, F. J. (1984). Biochemistry of insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, (22), 187-193.
- OPS/OMS. (2012). Anexo II - Otros determinantes importantes de la salud. En OPS OMS ARGENTINA (Ed.), *La estrategia de cooperación de la OPS/OMS con Argentina 2012-2016* (p. 61).
- Ortiz-Hernández, Ma Laura, Sánchez-salinas, Enrique, Dantán-gonzález, Edgar, y Castrejón-godínez, María Luisa. (2013). Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process. En *Biodegradation - Life of Science* (pp. 251-287). doi:10.5772/52777.
- P de Villar, M. I., Zerba, E. N., Wood, E., y de Licastro, S. (1979). Neurogenesis and occurrence of cholinesterase in eggs of *Triatoma infestans*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 65(1), 65-70. doi:10.1016/0306-4492(80)90047-7.
- P de Villar, M. I., Wood, E. J., Zerba, E. N., de Licastro, S. A., y Casabe, N. (1980). Cholinesterases and eserine-resistant esterases in the developing embryo of *Triatoma infestans* and its role as targets for inhibition in the ovicide action of parathion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 67(1), 55-59. doi:10.1016/0306-4492(80)90058-1.
- Panzerá, Francisco, Dujardin, Jean Pierre, Nicolini, Paula, Caraccio, María Noel, Rose, Virginia, Tellez, Tatiana, Bermúdez, Hernán, Bargas, María Dolores, Mas-Coma, Santiago, O'Connor, José

- Enrique, y Pérez, Ruben. (2004). Genomic changes of Chagas disease vector, South America. *Emerging infectious diseases*, 10(3), 438-46. doi:10.3201/eid1003.020812.
- Payandeh, Jian, Scheuer, Todd, Zheng, Ning, y Catterall, William a. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, 475(7356), 353-8. doi:10.1038/nature10238.
- Pedrini, Nicolás, Crespo, Rosana, y Juárez, M. Patricia. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 146(1-2), 124-37. doi:10.1016/j.cbpc.2006.08.003.
- Pedrini, Nicolás, Mijailovsky, Sergio J., Girotti, Juan R., Stariolo, Raúl, Cardozo, Rubén M., Gentile, Alberto, y Juárez, M. Patricia. (2009). Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(5), e434. doi:10.1371/journal.pntd.0000434.
- Pereira, Marcos H., Gontijo, Nelder F., Guarneri, Alessandra a, Sant'Anna, Maurício R., y Diotaiuti, Liléia. (2006). Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success. *Trends in parasitology*, 22(11), 516-20. doi:10.1016/j.pt.2006.08.012.
- Perry, A. S., Yamamoto, I., Ishaaya, I., y Perry, R. (1998). *Insecticides in Agriculture and Environment*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-662-03656-3.
- Picollo de Villar, María Inés. (1979). *Caracterización del desarrollo embrionario de Triatoma Infestans (vinchuca) y su relación con la susceptibilidad a insecticidas organofosforados*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

- Picollo de Villar, M. I., Wood, E. J., de Licastro, S. A., y Zerba, E. N. (1984). Variaciones en la acción del ovicida del paratión a lo largo del desarrollo embrionario de *Triatoma infestans*. *Chagas*, 1(2), 15.
- Picollo, M. I., y Zerba, Eduardo. (1987). *Chagas' disease vectors Volume III: Biochemical Aspects and Control*. (R. Brenner & A. Stoka, Eds.). CRC Press, Inc USA.
- Picollo, María Inés, Vassena, Claudia, Santo Orihuela, Pablo, Barrios, Silvia, Zaidemberg, Mario, y Zerba, Eduardo. (2005). High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *Journal of medical entomology*, 42(4), 637-42.
- Pittendrigh, R. B., Margam, M. V, Sun, L., y Huesing, E. J. (2008). Resistance in the Post-Genomics Age. En D. Onstad (Ed.), *Insect Resistance Management: Biology, Economics, and Prediction*. Academic Press, UK. Recuperado de: http://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=6hp384ZH0_kC&pgis=1
- Plapp, F. W., y Hoyer, R. F. (1968). Insecticide resistance in the house fly: decreased rate of absorption as the mechanism of action of a gene that acts as an intensifier of resistance. *Journal of economic entomology*, 61(5), 1298-303.
- Ranasinghe, Charani, Campbell, Bronwyn, y Hobbs, Andrew A. (1998). Over-expression of cytochrome P450 CYP6B7 mRNA and pyrethroid resistance in Australian populations of *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Pesticide Science*, 54(3), 195-202. doi:10.1002/(SICI)1096-9063(1998110)54:3<195::AID-PS813>3.0.CO;2-8.

- Reithinger, Richard, Ceballos, Leonardo, Stariolo, Raúl, Davies, Clive R., y Gürtler, Ricardo E. (2005). Chagas disease control: deltamethrin-treated collars reduce *Triatoma infestans* feeding success on dogs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(7), 502-8.
doi:10.1016/j.trstmh.2004.11.013.
- Rinkevich, Frank D., Hedtke, Shannon M., Leichter, Cheryl a, Harris, Sarah a, Su, Cathy, Brady, Seán G., Taskin, Vatan, Qiu, Xinghui, y Scott, Jeffrey G. (2012). Multiple origins of *kdr*-type resistance in the house fly, *Musca domestica*. *PloS one*, 7(12), e52761.
doi:10.1371/journal.pone.0052761.
- Robertson, Jacqueline L., Savin, N. E., Preisler, Haiganoush K., y Russell, Robert M. (2007). *Bioassays with Arthropods*, Second Edition (p. 224). CRC Press.
- Rodríguez, Marcela a., Marques, Tânia, Bosch, Dolors, y Avilla, Jesús. (2011). Assessment of insecticide resistance in eggs and neonate larvae of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(2), 151-159.
doi:10.1016/j.pestbp.2011.03.003.
- Rotondaro, Rodolfo, Cecere, Carla María, Castañera, Beatriz Mónica, y Gürtler, Ricardo Esteban. (1997). Propuestas para mejorar la vivienda rural en zonas afectadas por el mal de Chagas. *Estudios del hábitat*, 2, N°6(99), 5-16.
- Roush, R. T., y Daly, J. C. (1990). The role of population genetics in resistance research and management. En R. T. Roush & B. E. Tabashnik (Eds.), *Pesticide resistance in arthropods* (pp. 97-152). New York: Chapman and Hall.

- Roush, Richard T., y Tabashnik, Bruce E. (Eds.). (1991). *Pesticide Resistance in Arthropods*. Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-1-4684-6429-0
- Rozas-Dennis, G. S., y Cazzaniga, N. J. (2000). Effects of *Triatoma* virus (TrV) on the fecundity and moulting of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Annals of tropical medicine and parasitology*, 94(6), 633-41.
- Santo-Orihuela, Pablo L., Vassena, Claudia V, Zerba, Eduardo N., y Picollo, Maria I. (2008). Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *Journal of medical entomology*, 45(2), 298-306.
- Santo-Orihuela, Pablo Luis, Carvajal, Guillermo, Picollo, María Inés, y Vassena, Claudia Viviana. (2013). Analysing deltamethrin susceptibility and pyrethroid esterase activity variations in sylvatic and domestic *Triatoma infestans* at the embryonic stage. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(8), 1031-6. doi:10.1590/0074-0276130184.
- Santo-Orihuela, Pablo, Picollo, María Inés, González Audino, Paola, Barrios, Silvia, Zerba, Eduardo, y Masuh, Héctor. (2006). 7-Coumaryl permethrate and its cis and trans isomers as new fluorescent substrates for examining pyrethroid cleaving enzymes. *Pest management science*, 1044(April), 1039-1044. doi:10.1002/ps.
- Sawicki, R. (1987). *Definition, detection and documentation of insecticide resistance*. (M. Ford, D. Holloman, B. Khambay, & R. Sawicki, Eds.). Ellis Horwood, Chichester, England.

- Schmunis, Gabriel a., y Yadon, Zaida E. (2010). Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, 115(1-2), 14-21.
doi:10.1016/j.actatropica.2009.11.003.
- Schofield, Chris J., Jannin, Jean, y Salvatella, Roberto. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends in parasitology*, 22(12), 583-8. doi:10.1016/j.pt.2006.09.011.
- Schofield, CJ. (1994). *Triatominae: biology & control*. West Sussex. UK.: Eurocommunica Publications.
- Scott, J. G., Liu, N., y Wen, Z. (1998). Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. En *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* (pp. 121:147-155).
- Scott, Jeffrey G. (2008). Insect cytochrome P450s: thinking beyond detoxification. *Recent advances in insect physiology, toxicology and molecular biology*, 661(2), 117-124.
doi:10.1146/annurev.ento.44.1.507.
- Sheppard, C. D. (1995). Oxidative Metabolic Resistance to Cyanopyrethroids in the Horn Fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 88(6), 1531-1535.
doi:10.1093/jee/88.6.1531.
- Sica, Roberto E. P. (2011). Sistema Nervioso. En Intramed (Ed.), *Libros Virtuales IntraMed - Enfermedad de Chagas Mazza en las grandes ciudades*.
- Skoog, Douglas A., Holler, F. James, y Crouch, Stanley R. (2008). *Principios de Análisis Instrumental - Sexta Edición*. (Sergio Cervantes González, Ed.). DF: Thomson Brooks/Cole.

- Soderlund, D. M., y Knipple, D. C. (2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(6), 563-577. doi:10.1016/S0965-1748(03)00023-7.
- Soderlund, David M. (2008). Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest management science*, 616(May 2007), 610-616. doi:10.1002/ps.
- Soderlund, David M. (2010). State-Dependent Modification of Voltage-Gated Sodium Channels by Pyrethroids. *Pesticide biochemistry and physiology*, 97(2), 78-86. doi:10.1016/j.pestbp.2009.06.010.
- TDR / Organización Mundial de la Salud. (2007). *Reporte sobre la enfermedad de Chagas*. (Felipe Guhl & Janis K. LAzdins-Helds, Eds.).
- The Nature Conservancy, Fundación Vida Silvestre Argentina, Fundación para el Desarrollo Sustentable del Chaco (DeSdel Chaco), y Wildlife Conservation Society Bolivia (WCS). (2005). *Evaluación Ecorregional del Gran Chaco Americano*.
- Tolosa, Ariel Ceferino, Germano, Monica, Cueto, Gastón Mougabure, Vassena, Claudia, Zerba, Eduardo, y Picollo, María Inés. (2008). Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *Journal of medical entomology*, 45(3), 421-6.
- Torres, Martha Bucio, y Salazar Schettino, Paz. (2014). Signo temprano de Romaña. Recuperado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html>.

- Torrico, Rafael A. (1946). Hallazgo de *Eratyrus mucronatus*, infestación natural de «vinchucas» de cerro y *Eutriatoma sordida* en Cochabamba. *Anales del Laboratorio Central de Cochabamba*, 1, 19-23.
- Trainer, Vera L., McPhee, J. C., Boutelet-Bochan, H., Baker, Carl, Scheuer, Todd, Babin, Didier, Demoute, J. P., Guedin, Denis, y Catterall, William A. (1997). High affinity binding of pyrethroids to the alpha subunit of brain sodium channels. *Molecular pharmacology*, 51, 651-657.
- Ullrich, V., y Weber, P. (1972). The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes. A direct fluorometric test. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 353(7), 1171-7.
- Valero, Elina, y Pesce, Ricardo. (2011). Costos de prevención y tratamiento de la enfermedad de chagas. En Intramed (Ed.), *Libros Virtuales IntraMed - Enfermedad de Chagas Mazza en las grandes ciudades*. Intramed, Libro Virtual. Recuperado de: http://www.intramed.net/sitios/libro_chagas/costos.pdf.
- Vassena, C. V., Picollo, M. I., y Zerba, E. N. (2000). Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 14(1), 51-55.
- Vaughan, Ashley, y Hemingway, Janet. (1995). Mosquito carboxylesterase estd21 (a2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.270.28.17044

- Vega Chirinos, Silvia, y Velarde, César Naquira. (2005). *Manual de procedimientos de laboratorio de la Trypanosomiosis Americana (enfermedad de Chagas)*. Ministerio de Salud de Perú.
- Visciarelli, E. C., Chopa, C. Sánchez, Picollo, M. I., y Ferrero, A. A. (2011). Cholinesterase activity during embryonic development in the blood-feeding bug *Triatoma patagonica*. *Medical and veterinary entomology*, 25(3), 297-301. doi:10.1111/j.1365-2915.2011.00967.x.
- Wakeling, Erin N., Nea, April P., y William D, Atchison. (2012). Pyrethroids and Their Effects on Ion Channels. En R. P. Soundararajan (Ed.), *Pesticides - Advances in Chemical and Botanical Pesticides*. InTech. doi:10.5772/2609.
- Webb, J. E., y Green, R. A. (1945). On the Penetration of Insecticides Through the Insect Cuticle. *J. Exp. Biol.*, 22(1-2), 8-20.
- Welling, W. (1977). Dynamic Aspects of Insect-Insecticide Interactions. *Annual Review of Entomology*, 22(1), 53-78. doi:10.1146/annurev.en.22.010177.000413.
- Wheelock, Craig E., Shan, Guomin, y Ottea, James. (2005). Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *Journal of Pesticide Science*, 30(2), 75-83. doi:10.1584/jpestics.30.75.
- WHO. (1994). Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre Triatominos. *Acta Toxicológica Argentina*, 2, 29-32.
- WHO Expert Committee. (2002). *Control of Chagas Disease - Second report of the WHO Expert Committee World Health Organization*. Recuperado de: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf.

- Wigglesworth, V. B. (1948). The Insect Cuticle. *Biological Reviews*, 23(4), 408-451. doi:10.1111/j.1469-185X.1948.tb00566.x.
- Wu, Michelle. (2011). *Voltage-gated sodium channels*. California, USA. Recuperado de:
<http://cosmos.ucdavis.edu/archives/2011/cluster8.htm>.
- Yoon, Kyong Sup, Kwon, Deok Ho, Strycharz, Joseph P., Hollingsworth, Craig S., Lee, Si Hyeock, y Clark, J. Marshall. (2008). Biochemical and molecular analysis of deltamethrin resistance in the common bed bug (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of medical entomology*, 45(6), 1092-101.
- Yu, S. J., y Nguyen, S. N. (1992). Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 44(1), 74-81. doi:10.1016/0048-3575(92)90011-N.
- Zerba, E. N. (1999). Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina*, 59 Suppl 2, 41-6.
- Zhang, Lan, Gao, Xiwu, y Liang, Pei. (2007). Beta-cypermethrin resistance associated with high carboxylesterase activities in a strain of house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89(1), 65-72. doi:10.1016/j.pestbp.2007.03.001.

Publicaciones derivadas de esta tesis

Publicaciones derivadas de esta tesis

Listado de las publicaciones ordenado por año.

2010

M. D. Germano, G. Roca Acevedo, G. A. Mougabure Cueto, A. C. Toloza, C.V. Vassena y M. I. Picollo.

New Findings of Insecticide Resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) From the Gran Chaco

J. Med. Entomol. 47(6): 1077-1081 (2010); DOI: 10.1607/ME10069

2011

Roca Acevedo Gonzalo., Germano M. D., Santo Orihuela P. L. Mougabure Cueto G., Rojas Cortez M., Noireau F., Picollo M. I. y Vassena C. V.

Susceptibility of Sylvatic *Triatoma infestans* From Andeans Valleys of Bolivia to Deltamethrin and Fipronil.

J. Med. Entomol. 48(4): 828:835 (2011); DOI: 10.1603/ME10208

2012

Germano, Mónica., Santo Orihuela P., Roca Acevedo Gonzalo., Toloza A C., Vassena C., Picollo MI y Mougabure Cueto G.

Scientific Evidence of Three Different Insecticide-Resistant Profiles in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Populations From Argentina and Bolivia.

J. Med. Entomol. 49(6): 1355-1360 (2012); DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/ME12070>

2013

Roca Acevedo Gonzalo., Picollo M. I y Santo Orihuela P

Expression of Insecticide Resistance in Immature Life Stages of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae).

J. Med. Entomol. 50(4): 816Ð818 (2013); DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/ME12116>.

2014

Roca Acevedo Gonzalo., Picollo M. I y Santo Orihuela P.

Examining mechanisms of pyrethroid resistance in eggs of two populations of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae)

Aceptado con correcciones en el Journal of Medical Entomology.

New Findings of Insecticide Resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) From the Gran Chaco

M. D. GERMANO,¹ G. ROCA ACEVEDO, G. A. MOUGABURE CUETO, A. C. TOLOZA, C. V. VASSENA, AND M. I. PICOLLO

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN, CITEFA-CONICET); Juan Bautista de la Salle 4397 (B1603ALO), Villa Martelli, Provincia de Buenos Aires, Argentina

J. Med. Entomol. 47(6): 1077-1081 (2010); DOI: 10.1603/ME10069

ABSTRACT Chagas disease is a major health concern in Latin America, and *Triatoma infestans* (Klug, 1834) is responsible for the majority of cases of Chagas disease in the continent. After the discovery of deltamethrin highly resistant populations in the neighboring areas to Yacuiba (Bolivia) and Salvador Mazza (Argentina), we studied *T. infestans* populations north and southward, with the aim of describing the range of the resistant area. In addition, tests were conducted to describe the susceptibility to Ppronil in deltamethrin-resistant populations. Tarija populations were highly resistant to deltamethrin, showing that the resistant area is greater than previously reported. Argentinean and Paraguayan populations were susceptible or presented moderate to low levels of deltamethrin resistance. Resistance to Ppronil was found in Bolivian populations, although this insecticide was effective against Argentinean populations. This study shows that the Argentinean and Paraguayan populations are currently under successful control with deltamethrin. However, continuous resistance monitoring is necessary. We found that Ppronil is a viable option for Argentina, whereas the resistance found in Bolivia implies that new formulations are needed to control *T. infestans* in Bolivia. Further research is required to find new alternatives of control in those areas that are currently suffering from high infestation rates.

KEY WORDS *Triatoma infestans*, resistance, deltamethrin, Ppronil, Gran Chaco

Chagas disease is a major health concern in Latin America, and *Triatoma infestans* (Klug, 1834) is the main vector of this disease in the continent. After 20 yr of pyrethroid spraying campaigns (Zerba 1999), the emergence of deltamethrin resistance brings a new challenge for insect control.

Toxicological tests conducted during the late 1990s showed small levels of deltamethrin resistance associated to control campaigns in Argentina and Brazil (Vassena et al. 2000, Vassena and Picollo 2003). During 2002, though, the first field control failures against *T. infestans* from Argentina and Bolivia were reported. The toxicological tests conducted on field insects showed high deltamethrin resistance levels, which would explain the poor performance of house spraying (Picollo et al. 2005). In addition, recent studies confirmed an increasing deltamethrin resistance in northern Argentina, and the first detection of deltamethrin resistance in central Bolivia (Germano et al. 2010, Toloza et al. 2008).

After the discovery of deltamethrin highly resistant populations in the neighboring areas to Yacuiba

(Tarija, Bolivia) and Salvador Mazza (Salta, Argentina) (Picollo et al. 2005), we studied *T. infestans* populations north and southward, with the aim of describing the range of the resistant area. Moreover, after the discovery of Ppronil tolerance in the west-central area of Bolivia (Toloza et al. 2008), and considering this insecticide could be an alternative for control, we studied the response to Ppronil in deltamethrin-resistant populations. In this study, we present a survey of several areas of Argentina, Bolivia, and Paraguay concerning their response to both insecticides, and discuss their implication in this vector's control.

Materials and Methods

Insect Sampling and Rearing. Considering the first findings of deltamethrin-resistant populations at Salvador Mazza (Salta, Argentina) and Yacuiba (Tarija, Bolivia), collection sites were selected with the aim of determining the range of the deltamethrin-resistant area. Insects were collected from different areas where domiciliary infestation after insecticide treatment had been reported, and were selected in a wide range that would provide a general knowledge of the Gran Chaco situation. In Bolivia, surveyed areas were

¹ Corresponding author: Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN, CITEFA-CONICET), Juan Bautista de la Salle 4397 (B1603ALO), Villa Martelli, Provincia de Buenos Aires, Argentina (e-mail: mgermano@citefa.gov.ar).



Fig. 1. Geographical location of sampled areas.

Villamontes, Tierras Nuevas, El Palmar, and Villa El Carmen (Tarija Department). In Argentina, surveyed areas were San Carlos, Corralito and Banda Sur (Salta Province), Capital, La Noria (Santiago del Estero Province), Taco Pozo (Chaco Province), Palo Blanco (Catamarca Province), and El Nochero (Santa Fe Province). In Paraguay, the surveyed area was Jerico (Boqueron Department). Surveyed areas' geographical location is presented in Fig. 1.

Individuals were captured from infested house dwellings with the use of manual forceps and without the use of dislodging agent. Captured insects and their offspring were raised at the laboratory under controlled temperature (28 ± 1 °C), humidity (50–70%), and photoperiod (12:12 L:D). A pigeon was weekly provided as a blood meal source (WHO 1994).

Chemicals. Technical grade deltamethrin (99.0%) and pyrethrin (95.5%) used for bioassay were obtained from Ehrestorfer, Augsburg, Germany. The analytical grade acetone used for dilutions was purchased from J. T. Baker (Edo. de Mexico, Mexico).

Insecticide Susceptibility Determination. Every field sample was analyzed to account for its response to deltamethrin. Those samples that resulted in resistance to deltamethrin were also tested for pyrethrin effectiveness, as a mean to determine this compound viability as a control alternative. A laboratory strain (CIPEIN), which has been reared at the laboratory since 1975 and never exposed to insecticide treatment, was used as a reference for insecticide susceptibility (Picollo et al. 1976).

Lethal doses were determined according to the World Health Organization protocol (WHO 1994). Bioassays were conducted on the F₁ of the field-collected insects, and consisted of the topical application of 0.2 μl of insecticide in acetone solutions. The insecticide application was conducted by means of a 10 μl Hamilton syringe with automatic dispenser, on the dorsal abdomen of first instar nymphs. These were 3–5 d old and had been starved since eclosion. Three replicates of at least four doses in a range that pro-

duced between 10 and 90% mortality were conducted, and control groups received only pure acetone. Insects were held at the same laboratory conditions for 24 h, when mortality was evaluated. To this aim, treated insects were placed at the center of a circular filter paper (11 cm diameter), and their behavior was observed. Only those nymphs that were able to walk to the paper border, with or without mechanical stimulation, were considered alive.

Data Analysis. Lethal doses 50% (LD₅₀) and resistance ratios (RR) were calculated according to Robertson and Preisler (1992), using POLO Plus software (Robertson et al. 2007). Studied populations were considered resistant if the RR confidence limits did not include the number 1. LD₅₀ values are expressed in nanograms per insect units.

Results

Susceptibility values (LD₅₀), slopes of regression lines, and RR to deltamethrin in the studied populations are shown in Table 1. All Bolivian RRs were significantly 1, indicating that the studied populations were resistant to deltamethrin. Also, five Argentinean populations were resistant to deltamethrin, with RR ranging from 3.7 to 8.4. Clearly, Bolivian populations showed very high resistance levels, which resulted in significantly higher levels than those determined for the Argentinean-resistant populations. The sample from Paraguay resulted in slight resistance to deltamethrin.

Susceptibility values, slopes of regression lines, and RR to pyrethrin in the studied populations are shown in Table 2. Villa El Carmen and El Palmar populations showed RR values that differed significantly from 1 (RR 92.7 and 55.5, respectively), indicating that those populations were resistant to pyrethrin. Three Argentinean populations presented low levels of resistance to this insecticide (Banda Sur, San Carlos, and Capital). On the contrary, Tierras Nuevas and Corralito populations resulted in susceptibility to pyrethrin.

Discussion

Bolivian populations presented high levels of resistance to deltamethrin, which demonstrates that the known resistant area reported by Picollo et al. (2005) is greater than previously expected. Chemical control with deltamethrin is strongly jeopardized in Tarija department, given that doses required to eliminate insects from house dwellings are increased by a 300 factor and more. Previous findings of resistance in this department (Santo Orihuela et al. 2008) showed similar ratios of resistance to the Salvador Mazza area, but our present results demonstrate a greater level of resistance to deltamethrin. However, and even though the resistant area is extended to the north with increasingly greater resistance, this phenomenon does not affect the whole Gran Chaco area studied.

The nearest population to the Salvador Mazza-resistant area, Banda Sur, presented the highest resistance level found in the survey of Argentinean areas.

Table 1. Bioassay statistics and resistance ratios to deltamethrin in *T. infestans* from Argentina, Bolivia, and Paraguay

| Country | Province/ Department | Population | <i>n</i> ^a | SlopeSE | LD ₅₀ (ng/i) ^b (95% CL) | RR ^b (95% CL) |
|-----------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|--|--------------------------|
| Reference | | CIPEIN ^c | 125 | 2.1 0.66 | 0.1 (0.12D0.15) | D |
| Argentina | Salta | S. Mazza ^c | 90 | 1.4 0.10 | 31.1 (12.9D84.7) | 133.1 (105.6D167.7) |
| | | Banda Sur | 121 | 1.8 0.31 | 5.1 (3.07D8.70) | 39.0 (26.37D57.85) |
| | | Corralito | 138 | 3.1 0.25 | 0.02 (0.01D0.03) | 0.1 (0.07D0.18) |
| | Catamarca | San Carlos | 148 | 1.7 0.27 | 1.1 (0.51D2.54) | 8.4 (5.86D12.13) |
| | | Palo Blanco | 220 | 2.7 0.09 | 0.6 (0.07D0.69) | 4.5 (2.47D8.13) |
| | | Capital | 151 | 2.0 0.31 | 0.5 (0.27D0.80) | 3.8 (2.82D5.22) |
| | | La Noria | 145 | 1.8 0.35 | 0.04 (0.02D0.05) | 0.3 (0.15D0.45) |
| Chaco | Taco Pozo | 138 | 2.0 0.31 | 0.5 (0.22D0.80) | 3.7 (2.68D5.10) | |
| Bolivia | Tarija | El Nochero | 151 | 3.1 0.25 | 0.1 (0.11D0.14) | 0.9 (0.50D1.61) |
| | | T. Nuevas | 155 | 0.9 0.17 | 70.1 (26.63D1,240.21) | 541.6 (260.23D1,127.32) |
| | | V. El Carmen | 184 | 0.6 0.14 | 56.7 (24.47D313.15) | 438.0 (147.47D1300.60) |
| Paraguay | Boquero'n | El Palmar | 166 | 0.7 0.11 | 33.2 (23.40D53.80) | 299.8 (163.80D548.80) |
| | | Villamontes | 115 | 0.8 0.07 | 32.0 (16.45D128.06) | 247.4 (173.08D353.63) |
| | | Jerico | 90 | 1.6 0.10 | 0.5 (0.01D1.59) | 3.7 (2.99D4.52) |

ng/i, Nanograms per insect units.

a Number of insects used for bioassays.

b LD₅₀, RR, and 95% confidence limits (CL) calculated following Robertson et al. (2007).

c Data from Picollo et al. (2005).

However, this is still significantly smaller than the Salvador Mazza resistance ratio. This indicates that the resistance to the studied pyrethroid is not so high in areas that are not bordering to the resistant Yacuiba-Salvador Mazza area. Interestingly, we found an incipient resistance to deltamethrin in San Carlos, at the south of Salta province. However, its nearby population Corralito resulted in more susceptibility to deltamethrin than the reference population CIPEIN.

The insects from Catamarca, Chaco, Santa Fe', and Santiago del Estero provinces were susceptible or slightly resistant to deltamethrin. The Paraguay survey showed a small RR. These results suggest that deltamethrin is currently a considerable and valuable tool for chemical control of *T. infestans* in these areas.

Fipronil insecticide was tested on deltamethrin-resistant samples with the aim to propose this insecticide as a control alternative. This compound was effective against Argentinean and Tierras Nuevas populations, but the other populations from Tarija presented a moderated level of resistance to fipronil. Resistance to fipronil was also recently detected in central Bolivia by Toloza et al. (2008), who proved a high resistance

to this insecticide in populations with moderate resistance levels to deltamethrin. This insecticide has not been used in the field for chemical control of *T. infestans*, which implies that the resistance found is not a consequence of selection after fipronil treatment. Also, the fact that deltamethrin's action site is sodium channels, and that of fipronil is γ -aminobutyric acid-gated chlorine channels implies that the possibility of a cross-resistance phenomenon as a result of altered action site between these compounds is highly improbable. However, as fipronil presents a mode of action that is similar to that of lindane and dieldrin, it is possible that the early use of these compounds in Bolivia (Dias 1997, Schoebel 1994) would cause a cross-resistance phenomenon to fipronil. Cross-resistance between dieldrin and fipronil has been described fundamentally in cockroaches, even when dieldrin had not been used for control for several generations before the implementation of fipronil (Holbrook et al. 2003, Kristensen et al. 2005), and lindane cross-resistance to fipronil has recently been demonstrated for *Musca domestica* (Kristensen et al. 2004).

Table 2. Bioassay statistics and resistance ratios to fipronil in *T. infestans* from Argentina and Bolivia

| Country | Province/ Department | Population | <i>n</i> ^a | SlopeSE | LD ₅₀ ^b (95% CL) | RR ^b (95% CL) |
|-----------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|----------|--|--------------------------|
| Reference | | CIPEIN ^c | 150 | 1.4 0.11 | 2.1 (1.28D3.46) | D |
| Argentina | Salta | S. Mazza ^d | 180 | 0.9 0.11 | 4.9 (3.25D5.61) | 1.9 (1.00D3.70) |
| | | Banda Sur | 90 | 1.0 0.09 | 6.2 (4.36D8.98) | 3.0 (2.58D3.57) |
| | | San Carlos | 128 | 1.2 0.24 | 4.9 (2.34D12.99) | 2.2 (1.11D4.41) |
| | Santiago del Estero | Corralito | 90 | 0.7 0.23 | 2.3 (0.36D7.52) | 1.09 (0.16D7.04) |
| | | Capital | 158 | 1.1 0.18 | 4.5 (2.31D9.90) | 2.0 (1.04D3.91) |
| | | Tarija | T. Nuevas | 145 | 0.8 0.08 | 0.4 (0.20D0.60) |
| Bolivia | Tarija | V. El Carmen | 121 | 2.4 0.56 | 205.9 (148.0D267.1) | 92.7 (53.52D160.66) |
| | | El Palmar | 176 | 0.9 0.21 | 123.1 (50.7D215.3) | 55.5 (26.95D114.31) |

a Number of insects used for bioassays.

b LD₅₀, RR, and 95% confidence limits (CL) calculated following Robertson et al. (2007).

c Data from Orihuela et al. (2008).

d Data from Toloza et al. (2008).

Given that both deltamethrin and bpronicil are metabolized by monooxygenases, it may be possible that a cross-resistance phenomenon is present because of this mechanism. In research conducted by Scott and Wen (1997), monooxygenase metabolism was related to pyrethroid-bpronicil cross-resistance in *M. domestica*. Also, small resistance ratios to bpronicil were found in highly deltamethrin-resistant strains of *Spodoptera litura* that presented an increased monooxygenase metabolism (Huang and Han 2007). Whether this could be the case in *T. infestans* remains unknown.

Further interesting differences among the Yacuiba and Salvador Mazza populations were previously reported (Toloza et al. 2008). These authors demonstrated that deltamethrin resistance is expressed only in nymphs from Bolivia, whereas both the eggs and nymphs from Salvador Mazza express resistance to this insecticide. Additional toxicological evidence for these populations was provided by Santo Orihuela et al. (2008), who proved that the esterase activity was increased only in the Salta population Salvador Mazza. These toxicological differences, in addition to the results presented in this work, leave room for thought of natural differences among the different populations of *T. infestans*.

Several studies have demonstrated that populations of *T. infestans* are highly structured (Marcet et al. 2008; Pe'rez de Rosas et al. 2007, 2008), and recent research confirmed that Bolivian and Argentinean populations are part of different haplotype clusters (Monteiro et al. 1999, Piccinalli et al. 2009). However, hypothesis on *T. infestans* origin and geographic spread suggests that this insect would have its origin in the Bolivian Andes, and then migrated to the Gran Chaco area. A founder effect in the Argentinean Austral Chaco could have led to a genetic material loss, which would play an important role in the genetic structure of *T. infestans* populations (Panzer et al. 2004). The question re-mains open about the possibility of different genetic backgrounds, in addition to different selection pressure and ecological variables, allowing the different outcome of pyrethroid treatment found in both countries. Further research on nontreated populations would allow clarifying this possibility and its implications in vector control.

Finally, it is important to note that field control failures have been up to date correlated with RR that are 50 (Piccollo et al. 2005), and that small RR imply that the population is currently under successful control. In accordance with these results, the Bolivian Ministry of Health and Sports has reported vectorial infestation rates higher than 20% in the Tarija department, which could be related to the resistance found in these assays. Still, small resistance ratios indicate that field control failures must be prevented by continuous insecticide resistance monitoring and the implementation of optimal control strategies in each area (Rojas Cortez et al. 2007).

Currently, the control of *T. infestans* presents new challenges in the Southern Cone area of the Gran Chaco. The ineffectiveness of field treatments constitutes a hard to overcome obstacle in vector control,

and hence, surveillance becomes a necessity for any Chagas control initiative in this area. Further investigation on available insecticide types is required to find new alternatives of control in those areas that are currently suffering from high infestation rates. Furthermore, community participation and rural house improvement will necessarily play an important role in the future of vector control initiatives that aim to attain a sustainable approach to this neglected disease management.

Acknowledgments

We thank Mario Zaidemberg, Hector Janu'tolo, and technicians from the Coordinacio'n Nacional de Control de Vectores del Ministerio de Salud de Argentina for the coordination of field sampling in Argentina. We thank Mirko Rojas Cortez and technicians of the Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia for the coordination of field sampling in Bolivia. This work was supported by the UNICEF/United Nations Development Program/World Bank/World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases and the Consejo Nacional de Investigaciones Cientificas y Tecnicas of Argentina.

References Cited

- Dias, J.C.P. 1997. Controle da doenca de Chagas, pp. 453-468. In *Clonica e Terapeutica da Doenca de Chagas: Um Manual Pratica Para o Clinico Peral*. Fio Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- Germano, M. D., C. V. Vassena, and M. I. Picollo. 2010. Autosomal inheritance of deltamethrin resistance in field populations of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from Argentina. *Pest Manag. Sci.* 66: 705-708.
- Holbrook, G. L., J. Roebuck, C. B. Moore, M. G. Waldvogel, and C. Schal. 2003. Origin and extent of resistance to bpronicil in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 96: 1548-1558.
- Huang, S., and Z. Han. 2007. Mechanisms for multiple resistances in field populations of common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) in China. *Pestic. Biochem. Physiol.* 87: 14-22.
- Kristensen, M., J. B. Jespersen, and M. Knorr. 2004. Cross-resistance potential of bpronicil in *Musca domestica*. *Pest Manag. Sci.* 60: 894-900.
- Kristensen, M., K. K. Hansen, and K. M. Jensen. 2005. Cross-resistance between dieldrin and bpronicil in German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 98: 1305-1310.
- Marcet, P. L., M. S. Mora, A. P. Cutrera, L. Jones, R. E. Guertler, U. Kitron, and E. M. Dotson. 2008. Genetic structure of *Triatoma infestans* populations in rural communities of Santiago del Estero, northern Argentina. *Infect. Genet. Evol.* 8: 835-846.
- Monteiro, F. A., R. Pe'rez, F. Panzer, J. P. Dujardin, C. Galva'o, D. Rocha, F. Noireau, C. Schofield, and C. B. Beard. 1999. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94: 229-238.
- Panzer, F., J. P. Dujardin, P. Nicolini, M. N. Caraccio, V. Rose, T. Tellez, H. Bermudez, M. D. Bargues, Mas-Coma Santiago, J. E. O. Connor, and R. Pe'rez. 2004. Genomic changes of Chagas disease vector, South America. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 438-446.

- Pe´rez de Rosas, A., E. Segura, and B. Garc´ıa. 2007.** Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas disease vector control programmes. *Mol. Ecol.* 16: 1401D1412.
- Pe´rez de Rosas, A., E. Segura, L. Fichera, and B. Garc´ıa. 2008.** Macrogeographic and microgeographic genetic structure of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Catamarca, Argentina. *Genetica* 133: 247D260.
- Piccinali, R. V., P. L. Marcet, F. Noireau, U. Kitron, R. E. Gu´rtler, and E. M. Dotson. 2009.** Molecular population genetics and phylogeography of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in South America. *J. Med. Entomol.* 46: 796 D 809.
- Piccolo, M. I., E. Wood, E. N. Zerba, S. A. Licastro, and M. A. Ru´beda. 1976.** Laboratory test for measuring toxicity of insecticides in *Triatoma infestans*, Klug. *Acta Biolo´gica Latinoamericana* X: 67D70.
- Piccolo, M. I., C. Vassena, P. S. Orihuela, S. Barrios, M. Zaidemberg, and E. Zerba. 2005.** High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J. Med. Entomol.* 42: 637D 642.
- Robertson, J. L., and H. K. Preisler. 1992.** Pesticide Bioassays with Arthropods. CRC, Boca Rato´n, FL.
- Robertson, J. L., H. K. Preisler, and R. M. Russell. 2007.** Polo Plus, Probit and Logit Analysis: user’s guide, version 2.0. LeOra Software, FL.
- Rojas Cortez, M., R. Barrientos, E. G. Fern´andez Ara´oz, L. Ortiz, A. Sa´nchez Bustamante, A. Tamayo, E. Dura´n, J. Chungara, M. Avalos, F. Torrico, C. Billot, C. Alonso-Vega, A. De Muyneck, Y. Ordo´n‘ez, F. Fern´andez, B. Chang, F. Dura´n, A. Nogales, F. Cruz, and E. Villena. 2007.** El Programa Nacional de Chagas en Bolivia. pp. 315D327. In M. Rojas Cortez (ed.), *Triatominos de Bolivia y la Enfermedad de Chagas*. Ministerio de Salud y DeportesDPrograma Nacional de Chagas, La Paz, Bolivia.
- Santo Orihuela, P. L., C. V. Vassena, E. N. Zerba, and M. I. Piccolo. 2008.** Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J. Med. Entomol.* 45: 298 D306.
- Schofield, C. J. 1994.** *Triatominae: Biolog´ıa y Control*. Eurocomunica Publications, West Sussex, United Kingdom.
- Scott, J. G., and Z. Wen. 1997.** Toxicity of bprnil to susceptible and resistant strains of German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) and house flies (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 1152D1156.
- Toloz, A. C., M. Germano, G. M. Cueto, C. Vassena, E. Zerba, and M. I. Piccolo. 2008.** Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J. Med. Entomol.* 45: 421D 426.
- Vassena, C. V., and M. I. Piccolo. 2003.** Monitoreo de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, insectos vectores de la Enfermedad de Chagas: Revista de Toxicolog´ıa en L´ınea 3. (<http://www.sertox.com.ar/retel/n03/004.pdf>).
- Vassena, C., M. I. Piccolo, and E. Zerba. 2000.** Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med. Vet. Entomol.* 14: 51D55.
- [WHO] World Health Organization. 1994.** Protocolo de evaluacio´n de efecto insecticida sobre triatominos. *Acta Toxicolo´gica Argentina* 2: 29 D32.
- Zerba, E. 1999.** Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina* 59: 41D 46.

Received 17 March 2010; accepted 9 July 2010.

Susceptibility of Sylvatic *Triatoma infestans* From Andean Valleys of Bolivia to Deltamethrin and Fipronil

GONZALO ROCA ACEVEDO,^{1,2} GASTON MOUGABURE CUETO,¹ MONICA GERMANO,¹
PABLO SANTO ORIHUELA,¹ MIRKO ROJAS CORTEZ,³ FRANC OIS NOIREAU,^{4,5}
MARIA INES PICOLLO,¹ AND CLAUDIA VASSENA

J. Med. Entomol. 48(4): 828-835 (2011); DOI: 10.1603/ME10208

ABSTRACT We describe the susceptibility to deltamethrin and fipronil of four sylvatic *Triatoma infestans* populations from the Andean valleys of Bolivia. Fifty percent lethal doses were determined from topical application of insecticide on first instars, and mortality was assessed after 24 h for deltamethrin and 48 h for fipronil. In comparison with a reference strain from Argentina, the Bolivian populations showed deltamethrin 50 percent lethal dose ratios ranging from 1.9 to 17.4. In the case of fipronil, an insecticide never used for control of *T. infestans*, the Bolivian populations showed even higher variation in toxic response, with relative susceptibilities ranging from 0.5 to 139.2. However, although the sylvatic *T. infestans* toxicological profiles differ from each other and from those of the domiciliary population studied in this work, there were no significant differences in the activities of P450 mono-oxygenases and pyrethroid esterases between the reference strain and the studied populations.

KEY WORDS *Triatoma infestans*, insecticide susceptibility, sylvatic populations

Chagas disease, because of infection with *Trypanosoma cruzi*, is endemic to the American continent, mainly transmitted to humans by blood-sucking triatomine bugs (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). In Argentina and Bolivia, 9 million people are currently infected (Schofield et al. 2006), and the main vector of *T. cruzi* is *Triatoma infestans* (Klug, 1834).

Domestic infestations of *T. infestans* are being successfully controlled in much of the Southern Cone of South America, by spraying infested dwellings with residual pyrethroid insecticides (Dias et al. 2002, Schofield et al. 2006). However, only limited success has been achieved in the Gran Chaco of Argentina, Bolivia, and Paraguay, even in areas under intensive vector control efforts (Gürtler et al. 2007). This region is thought to represent the origin of *T. infestans* and it is there where it shows highest genetic variability (Bargues et al. 2006, Torres-Pérez et al. 2011) and emerging resistance to pyrethroid insecticides (Gürtler et al. 2004, Picollo et al. 2005, Lardeux et al. 2010, Moncayo and Yanine 2006, Cecere et al. 2006,

Tolozá et al. 2008, Santo Orihuela et al. 2008, Ceballos et al. 2009).

Characterization of the resistance developed north of Salta (Argentina) and south and center of Bolivia has shown important toxicological differences (Tolozá et al. 2008, Germano et al. 2010). Populations near the Argentinian and Bolivian border had high levels of resistance to deltamethrin, but were susceptible to fipronil, a phenylpyrazole insecticide. Populations of the Andean areas of Bolivia are of particular interest because they show different patterns of resistance in eggs and first instars than in the north of Salta, showing intermediate levels of resistance to deltamethrin and very high levels to fipronil. (Tolozá et al. 2008, Germano et al. 2010).

Research on resistance to insecticides in *T. infestans* has been focused on domiciliary populations, but recent reports provide evidence that sylvatic populations of *T. infestans* are much more widespread than previously thought (Noireau et al. 2005, Noireau 2009). The objective of the current study was to determine whether the susceptibility of sylvatic *T. infestans* populations from Bolivia is similar to that of domiciliary populations.

Materials and Methods

Insects. *T. infestans* were collected in 2007 from domiciliary (D) areas in the Department of Cochabamba, Bolivia (MataralD), and from a nearby sylvatic (S) area 2 km distant (MataralS). Additional sylvatic bugs were collected in February 2008 from other

¹ Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CITEFA-CONICET), Juan Bautista de la Salle 4397 (B1603ALO), Villa Martelli, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

² Corresponding author, e-mail: gonzalora@conicet.gov.ar.

³ Programa Nacional de Control de Chagas, Ministerio de Salud, La Paz, Bolivia.

⁴ Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France.

⁵ Instituto de Investigaciones Biológicas e Interacción Social, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia.

⁶ Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, 3iA, de la Universidad Nacional de San Martín, Buenos Aires, Argentina.

Table 1. Samples of sylvatic (S) and domiciliary (D) populations of *T. infestans* analyzed according to the collecting site in Bolivia

| Site of collection | Location (city/province) | Latitude/Longitude | Altitude meters above sea level | No. of specimens collected in the field |
|--------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---|
| NFS ^a | Susceptible reference strain | D | D | D |
| MataralND | Alquile/Cochabamba | 18 35 44,08" S/65 08 58,74" W | 1,750 | 10 |
| MataralNS | Alquile/Cochabamba | 18 36,190 S/65 07,117 W | 1,750 | 18 |
| Kirus MayuNS | Toro Toro/Potos | 17 59,302 S/65 50,281 W | 2,070 | 30 |
| IlicuniNS | Omereque/Cochabamba | 18 09,502 S/64 51,943 W | 1,580 | 10 |
| 20 de OctubreNS | Cochabamba/Cochabamba | 17 29,057 S/66 06,741 W | 2,596 | 32 |

^a Susceptible reference strain.

sites in Cochabamba (20 de Octubre-S and 20 de Octubre-D) and Potosi (Kirus-Mayu-S).

The sylvatic *T. infestans* were collected from animal piles using mouse baited traps (Cruz-Uribe et al. 1999). They were reared in Bolivia and their first descendent populations were transported to the laboratory in Argentina, where further generations were bred.

For comparison, we used a susceptible reference strain (NFS) derived from a domestic population collected in December 2004 from Santiago del Estero, Argentina, in an area where insects have since been successfully controlled with deltamethrin.

For the susceptibility test, first instars of each population were kept in enclosed boxes (30 x 30 x 30 cm) at 28 ± 1 °C, 50 ± 60% RH, and a photoperiod of 12:12 (L:D). A pigeon was weekly provided as a blood meal source (WHO 1994).

Chemicals. Technical grade deltamethrin (99.0%) and Ipropril (95.5%) were obtained from Ehrestorfer (Augsburg, Germany). Analytical grade acetone was purchased from J. T. Baker (Edo. de Mex., Mexico). The 7-ethoxycoumarin (7-EC) and 7-hydroxycoumarin (7-OHC) (umbelliferone) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The *cis-trans*

(43.8% *cis*, 56.2% *trans*)-permethrinic acid was supplied by Chemotecnica (Buenos Aires, Argentina), and thionyl chloride (SO₂Cl₂; 99%) and triethylamine (99%) were purchased from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI, USA). The 7-coumaryl[®] permethrate (7-CP) was synthesized in our laboratory by the method of Santo Ornela et al. (2006).

Topical Application Bioassays. Lethal doses were determined according to the World Health Organization protocol (WHO 1994). *T. infestans* first instars (1-2 days old; mean weight 1.3 ± 0.2 mg) present since emergence, were selected for the toxicity tests. Bioassays consisted of topical application on the dorsal abdomen with 0.2 ml of the insecticide diluted in acetone using a 10 ml Hamilton syringe with automatic dispenser. Control groups received only pure acetone.

Three replicates of at least four doses in a range that produced between 10 and 100% mortality, were conducted. Mortality was evaluated after 24 h by placing the insects at the center of a circular filter paper, 11 cm diameter, only those nymphs able to walk to the border of the filter paper were considered alive.

Statistical Analysis. Mortality data were analyzed using the POLO Plus software (LeOra Software 1987).

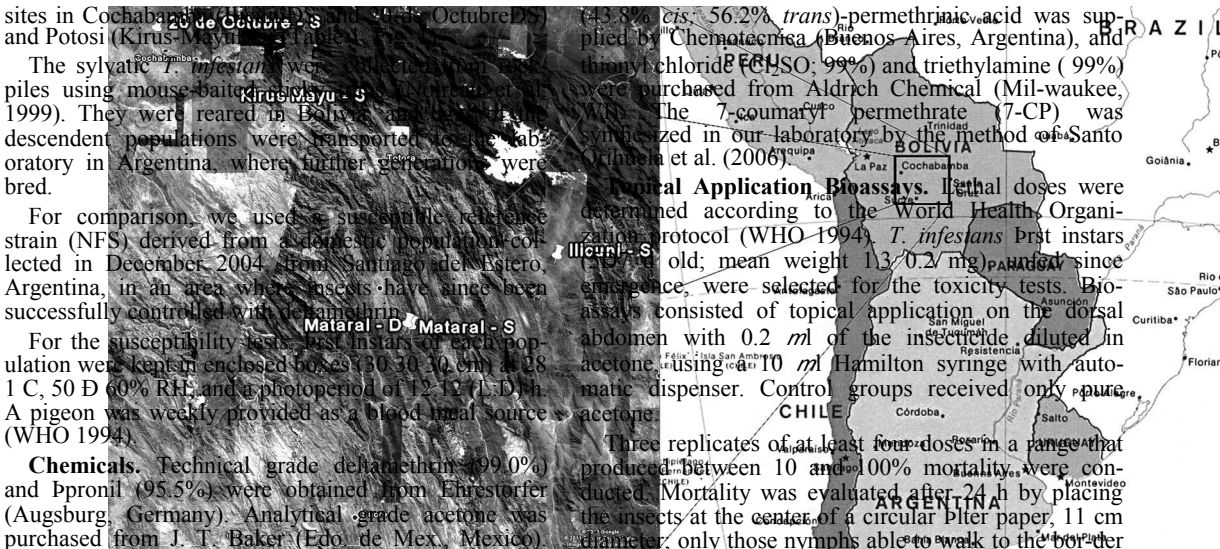


Fig. 1. Map showing study sites where *T. infestans* samples were collected. The populations collected in Bolivia were as follows: Mataral (domiciliary and sylvatic), Ilicuni (sylvatic), 20 de Octubre (sylvatic), and Kirus Mayu (sylvatic).

Table 2. Toxicity of topically applied deltamethrin to *T. infestans* first instars of a susceptible reference strain, sylvatic (S), and domiciliary (D) field populations collected from the Andean valleys of Bolivia

| Population | <i>n</i> ^a | Slope | SE | χ^2 | LD ₅₀ ng/insect (95% CL) | LDR ₅₀ (95% CL) | LD ₉₅ ng/insect (95% CL) | LDR ₉₅ (95% CL) |
|------------------------|-----------------------|-------|------|----------|--|-------------------------------|--|-------------------------------|
| NFS ^b | 120 | 3.10 | 0.26 | 0.96 | 0.13 (0.11D0.15) | D | 0.44 (0.58D0.36) | |
| MataralDD ^c | 186 | 1.11 | 0.10 | 5.17 | 2.25 (0.28D4.80) | 17.4 (11.88D25.43) | 68.31 (24.82D2,220.54) | 156.5 (78.548D311.70) |
| MataralDS | 90 | 1.55 | 0.10 | 51.34 | 1.53 (0.53D3.34) | 11.9 (9.43D14.93) | 17.46 (6.52D385.42) | 39.9 (5.08D312.96) |
| Kirus-MayuDS | 120 | 1.42 | 0.08 | 34.72 | 0.95 (0.49D1.66) | 7.4 (5.78D9.25) | 13.82 (6.33D60.50) | 31.6 (20.73D48.16) |
| 20 de OctubreDS | 120 | 1.50 | 0.15 | 25.2 | 0.88 (0.08D1.84) | 6.8 (4.98D9.26) | 10.91 (4.59D393.10) | 24.9 (15.95D38.93) |
| IlicuniDS | 120 | 1.33 | 0.10 | 4.33 | 0.25 (0.14D0.39) | 1.9 (1.44D2.56) | 4.22 (2.09D13.82) | 9.7 (5.74D16.25) |

CL, confidence limit; LD₉₅, 95% lethal dose; LDR₅₀, 50% LDR; LDR₉₅, 95% LDR (calculated following Robertson et al. 2007).

^a Number of insects used for bioassays.

^b Reference strain.

^c Data from Toloza et al. 2008.

Dose-mortality data were subject to probit analysis (Litchfield and Wilcoxon 1994) to estimate the lethal dose (nanograms per insect) required to kill 50% of treated individuals (50% lethal dose [LD₅₀]). Lethal dose ratios (LDR) and 95% confidence limits of each population were calculated, as described by Robertson et al. (2007), by comparison of the dose-response curves between the studied populations and the reference strain. Studied populations were considered resistant if the LDR confidence limits did not include the number 1.

A nonparametric test (Kruskal-Wallis) was used to compare the enzymatic activities (P450 mono-oxygenases and pyrethroid esterases) of the studied populations.

Cytochrome P450 Mono-Oxygenase. Enzymatic activities were measured for individual abdomens using 7-EC-*O*-deethylation (Bouvier et al. 1998, Gonzalez Audino et al. 2005). Fluorescence of 7-OHC was determined using a microplate fluorescence reader (Packard Fluorocount, Meriden, CT) with 400 nm excitation and 440 nm emission filters.

First-instar abdomens were placed individually into wells of a 96-well microplate containing 100 μ l of 0.05 M phosphate buffer and 4 mM 7-EC. The reaction was stopped after incubation (4 h at 30 C) by adding 100 μ l of glycine buffer (10⁻⁴ M), pH 10.4. Microplates were centrifuged at 2,000 g for 30 s in a refrigerated centrifuge for microplates (4237 R, ALC International SRL, Cologna Monzese, Italy) before and after the incubation of the enzymatic reaction at 30 C. For each population, similar wells receiving glycine buffer previous to incubation were used for blanks. The relative fluorescence units were all corrected for background hydrolysis, nonspecific fluorescence of substrate, and transformed to picomoles per minute (activity units) by using a calibration curve per replicate with dilutions of 7-OHC (60.19, 117.50, 172.50, and 224.33 total pmol/well).

Esterase Activity. Esterase activity was determined by the hydrolysis of 7-CP, a new fluorescent substrate appropriate for determining pyrethroid hydrolysis activity on individual insects (Santo Orihuela et al. 2006). For this, the insects were cooled and each nymph was homogenized in 220 μ l of phosphate buffer (pH 7.2, 0.05 M) using a plastic mortar and pestle. Reaction was initiated by adding 10 μ l of 7-CP (3.5 mM, 2-methoxy ethanol) to 190 μ l of each homoge-

nate. Incubation was performed at 25 C for 33 min, at pH 7.2. The fluorescence was measured using a microplate fluorescence reader (Packard Fluoro-count), and results were analyzed with Fluorocount and Excel 2000 software. Assays were conducted at 25 C in black 96-well polystyrene flat-bottom microtiter plates (Packard, Meriden, CT). Production of 7-OHC was monitored with excitation wave-length at 400 nm and emission at 440 nm. Activity was measured each 3 min for 33 min, such that assay was linear over the reported time. The relative fluorescence units were all corrected for background hydrolysis, nonspecific fluorescence of substrate, and transformed in picomoles per minute (activity units) using a calibration curve per duplicate with dilutions of 7-OHC (68.5, 342.69, 685.44, and 1370.8 total pmol/well).

Results

Toxicology. The sylvatic MataralDS population showed a LD₅₀ similar to that of the domiciliary insects (MataralDD) from the same area. Kirus-MayuDS and 20 de OctubreDS populations showed LD₅₀ lower than Mataral insects, but higher than those previously reported for susceptible populations (Table 2).

Susceptibility values (LD₅₀ and 95% lethal dose), slopes of regression lines, and LDR to β prionil in the studied population are shown in Table 3. MataralDD, MataralDS, and Kirus-MayuDS populations showed LDR (50%) between 23.4 and 139.2, values that differ significantly from 1, indicating that those populations were resistant to β prionil. The IlicuniDS population showed a lower level of resistance, whereas the 20 de OctubreDS population showed susceptibility to β prionil.

As the slopes of dose-response curve of the studied populations were steeper than that of the reference strain, the LDR calculated at 95% mortality levels were higher than those calculated at 50% mortality. Because the toxicity values at 50% mortality have the lowest statistical error, the discussion of results is based on LDRs obtained at that level.

We had observed that sylvatic *T. infestans* tend to be larger than domiciliary *T. infestans*, but even expressing the deltamethrin and β prionil activity as ng insect-

| applied lppronil | to | | <i>T. infestans</i> first | | ng/msect LDR05 | LD (95%CL) | 95 ng/msect LD (95%CL) | LD (95%CL) | from the | | |
|------------------|-------|------|---------------------------|-------|----------------|---|----------------------------------|----------------|----------|----------------------|-----------------------------|
| | a | b | 2 | x | | | | | 50 | 95 | Andean valley of Cochabamba |
| | Slope | SE | | | | | | | | | |
| | 1.15 | 0.11 | | 11.55 | | 2.121 (0.33, 210) | | | | | |
| | 0.75 | 0.09 | | 3.98 | | 28.66 (0.28, 41.0) (9.27, 19.25) (4.0) | (1.83, 4.16) (16.7, 46.1) (0.4) | 10 | 819.1 | (169.7) (3, 952.90) | |
| | 0.49 | 0.05 | | 13.43 | | 49.0 (0.28, 65.6) (3.4, 10.6) (4.5) (4) | (0.34, 4.16) (3.32, 10.62) (0.9) | 10 | 1,900.9 | (329.98) (1, 18, 72) | |
| | 0.78 | 0.06 | | 8.16 | | 96.8 (0.18, 25.0) (4.0, 6.0) (7.5) (4) | (0.31, 4.16) (12.6, 1.23) (0.4) | 10 | 217.7 | (72.4) (0.65, 44.3) | |
| | 0.53 | 0.09 | | 5.05 | | 1.00 (0.1, 1.0) (0.3, 1.0) (1) | | | 23.2 | (2.2) (0.23, 7.97) | |
| | 1.16 | 0.14 | | 0.96 | | 11.8 (0.07, 0.15) (3.98, 6.7) | | 30 (100) (0.8) | 5.4 | (1.65) (17.41) | |

⁹⁵: 95% lethal dose; LDR⁵⁰

⁹⁰: LDR

Number of insects -
Reference strain.

a - bioassays.
b -

ticide per insect weight unit (Table 4), their lower susceptibility is apparent.

The frequency distribution of 7-OHC activities among domiciliary and sylvatic *T. infestans* populations is shown in Fig. 2. The frequency distribution of pyrethroid esterase activity is shown in Fig. 3. In these histograms, vertical lines are marked at values of 1.44 pmol/min for mono-oxygenases and 30.7 for pyrethroid esterase activity, which represent the corresponding threshold of enzyme activity containing the majority of insects (75%) in susceptible populations.

There are no significant differences between the domiciliary, sylvatic, and reference populations in pyrethroid esterase and mono-oxygenase activity levels.

Discussion

This work presents the first study on toxicological profiles of sylvatic *T. infestans*. Those profiles included the susceptibility values to deltamethrin and pyrethrin, and the activities of detoxifying enzymes (pyrethroid esterases and mono-oxygenases), which were compared with those of a domiciliary population from the same Bolivian area and a reference colony. The toxicological profiles were different both among the Bolivian populations and between reference and Bolivian populations. All populations except one (20 de Octubre) were less susceptible than the NFS reference colony for the two insecticides, with the susceptibility to pyrethrin less than to deltamethrin. The domiciliary population, Mataral, was the least susceptible to both insecticides, followed by Mataral and Kirus-Mayu, whereas the 20 de Octubre and Illicuni populations were the most susceptible to both insecticides. These differences in the susceptibilities could not be explained by the activities of detoxifying enzymes given that there was no association between enzymatic activities and the susceptibility ratios. These comparative results support the idea that *T. infestans* from different geographic areas have different toxicological profiles determining differences in their susceptibility to insecticides (Germano et al. 2010).

The populations collected from sylvatic habitats had not been targeted by chemical control interventions. In addition, current evidence does not support a consistent flow of Andean *T. infestans* between sylvatic refuges and domestic habitats (Richer et al. 2007). In consequence, the toxicological profiles shown by sylvatic populations are unlikely to result from selection pressure with insecticide or gene flow from controlled areas, but those profiles would represent wild toxicological phenotypes. As those wild profiles were different, this study demonstrates that *T. infestans* from different geographic areas have different toxicological profiles.

As the Andean valleys in Bolivia are believed to represent the center of origin and dispersal of *T. infestans* (Bargues et al. 2006, Cortez et al. 2010), it is possible to speculate that the toxicological profiles of the sylvatic populations from Cochabamba could represent the ancestral toxicological profile of *T. infestans*. Nevertheless, phylogenetic evidence does not unequivocally support the hypothesized Andean origin

and infestans from

| Population | 05% CL | | DL | | 95% CL | | DL | | 95% CL | | DL | |
|--------------|---------------|----------|----|----|--------|----|----|----|--------|----|----|----|
| | 05% CL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL |
| | 05% CL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL |
| NFS | 1310(070.100) | 0500(11) | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL |
| MataralDD | 1590(220.880) | 1402(47) | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL |
| MataralDS | 2100(040.660) | 230(45) | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL |
| Kims-MiyuDS | 2190(410.430) | 220(76) | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL |
| 20kOcutureDS | 2330(093.370) | 0500(79) | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL |
| IlicumDS | 1590(050.130) | 070(20) | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL |

unit

#mg/g (Lambertel)

| Population | 05% CL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL | DL |
|--------------|--------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| NFS | 104.83 | 4(9.43) | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ |
| MataralDD | 22.24 | 4(1.47) | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ |
| MataralDS | 18.56 | 3(1.41) | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ |
| Kims-MiyuDS | 13.76 | | 553.53(54.04) | 553.53(54.04) | 553.53(54.04) | 553.53(54.04) | 553.53(54.04) | 553.53(54.04) | 553.53(54.04) | 553.53(54.04) | 553.53(54.04) | 553.53(54.04) |
| 20kOcutureDS | 6.35 | | 155.90(7.80) | 155.90(7.80) | 155.90(7.80) | 155.90(7.80) | 155.90(7.80) | 155.90(7.80) | 155.90(7.80) | 155.90(7.80) | 155.90(7.80) | 155.90(7.80) |
| IlicumDS | | | | | | | | | | | | |

of *T. infestans*, and instead suggests an origin in the Gran Chaco (Torres-Pérez et al. 2011). Future studies should be conducted to test those evolutionary and toxicological hypotheses.

The situation is different for the domiciliary population, which showed the lowest susceptibility to both deltamethrin and Ppronil. This result is in accordance with Toloza et al. (2008) and Germano et al. (2010), who detected a low susceptibility to Ppronil in domiciliary populations with moderate resistance to deltamethrin in the center and south of Bolivia. The toxicological profile of those populations can be interpreted in terms of resistance. As the pyrethroids alphacypermethrin and deltamethrin have been widely used for control of domestic *T. infestans* during the last decade, the evolution of pyrethroid resistance could be the consequence. However, Germano et al. (2010) discussed the possibility of cross-resistance between Ppronil and lindane or dieldrin due to the early use of these compounds in Bolivia.

The higher resistance level to Ppronil than that to deltamethrin in the domiciliary population of Mataral could be explained in terms of the alleged evolution-ary relationship between domiciliary and sylvatic populations of *T. infestans* from that area. As yet there is no evidence for recolonization of sylvatic habitats from a domiciliary population, so the hypothesis that domiciliary *T. infestans* have derived from sylvatic populations is favored. The sylvatic populations from Mataral would express the wild toxicological profile of *T. infestans* from that area, as follows: low susceptibility to deltamethrin and Ppronil, with lower Ppronil than deltamethrin susceptibility. In this context, it is possible to hypothesize that the toxicological baseline of domiciliary Mataral *T. infestans* was the wild toxicological profile of Mataral. Similarly, because the sylvatic Andean *T. infestans* showed lower susceptibility than the reference colony from Argentina, it may be that the toxicological profile of the reference susceptible population could be representing a wild toxicological profile of *T. infestans* from Argentina. This would imply the existence of different wild profiles for Argentina and Bolivia.

Toxicological differences between Argentinean and Bolivian populations were demonstrated in previous studies. Toloza et al. (2008) showed that deltamethrin resistance is shown in nymphs from Yacuiba (Bolivia), but not in eggs, whereas both the eggs and nymphs from Salvador Mazza (Argentina) express resistance to this insecticide. Toloza et al. (2008) and Germano et al. (2010) detected Ppronil resistance in Bolivia, but not in Argentina. Santo Orihuea et al. (2008), studying the same populations, showed that the esterase activity was increased only in the population of Salvador Mazza. Those differences could have resulted from selection pressure with insecticides on populations of *T. infestans* with different wild toxicological profiles.

The susceptibility and biochemical differences may relate to the genetic structure of the *T. infestans* populations. Several studies confirmed that populations of *T. infestans* from Argentina and Bolivia are highly structured, both at macrogeographical and microgeo-

Susceptible

reference strain.

a

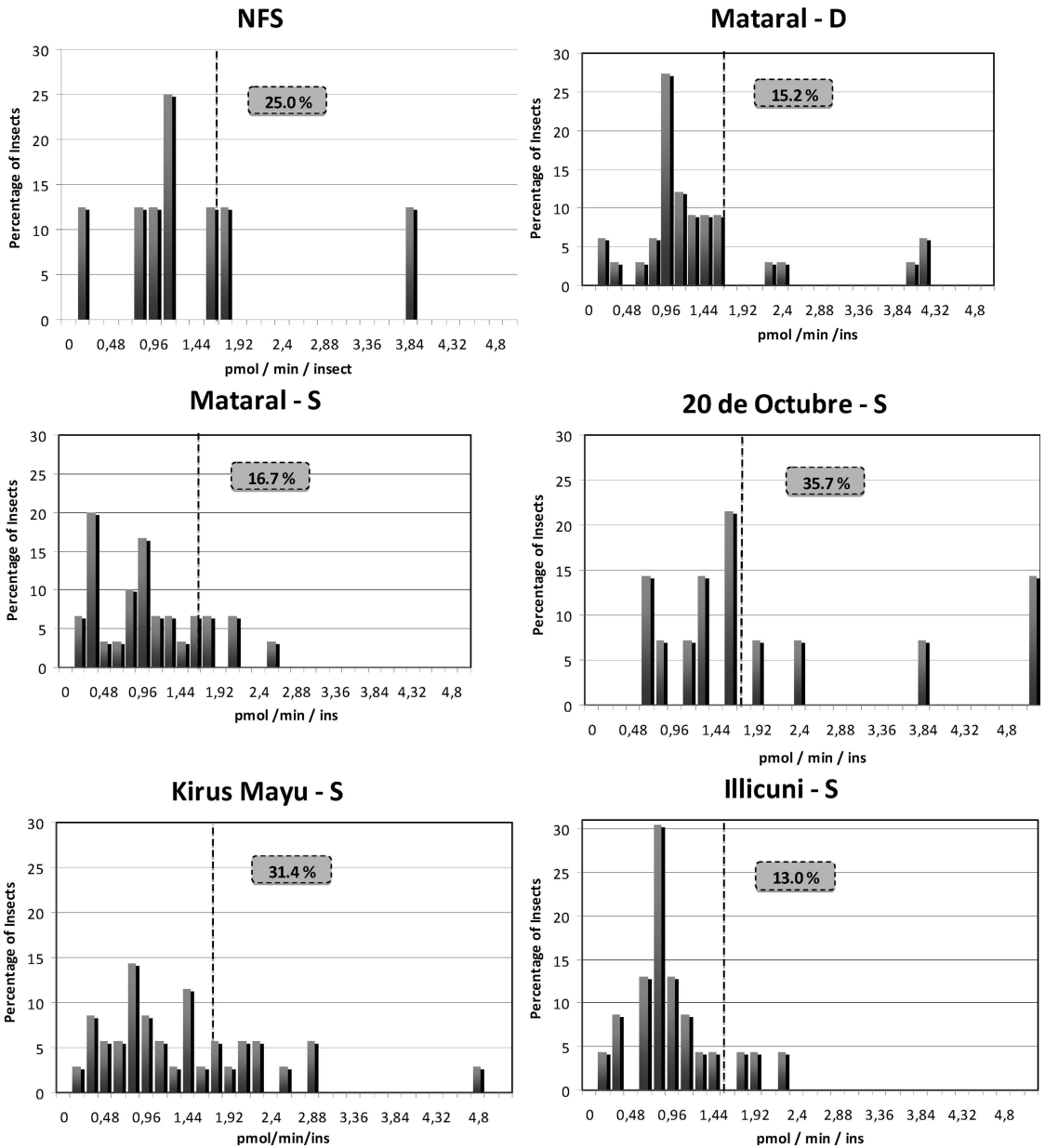


Fig. 2. Frequency distribution of P450 mono-oxygenase activity among sylvatic (S) and domiciliary (D) *T. infestans* from Andean valleys of Bolivia. Vertical lines are marked at values of 1.44 pmol/min, which represent the corresponding threshold of enzyme activity containing the majority of insects (75%) in susceptible populations. Enzyme activity as picomoles of 7-OHC per minute.

graphical levels (Pe' rez de Rosas et al. 2007, 2008; Marcet et al. 2008). Furthermore, recent research demonstrated that Bolivian and Argentinian populations are part of different haplotype clusters (Mon-teiro et al. 1999, Piccinali et al. 2009). In toxicological bioassays, the slopes of the dose-response relationships are indicators of the population's phenotypic variation, e.g., high slopes indicate little phenotypic variation. If environmental variation were constant, the slope would be an indicator of genetic variation, with

high slopes related to low genetic variation, and this would occur in populations fully susceptible or fully resistant. By contrast, populations in process of selection would have greater genetic variation, and therefore the slopes will be less steep (Chilcutt and Tabashnik 1995). This relationship seems to be observed in the susceptible population because they show higher slope values to both deltamethrin and p'ronil. Field populations show a lower slope (except for Illicuni'S and p'ronil), suggest-ing greater genetic variability.

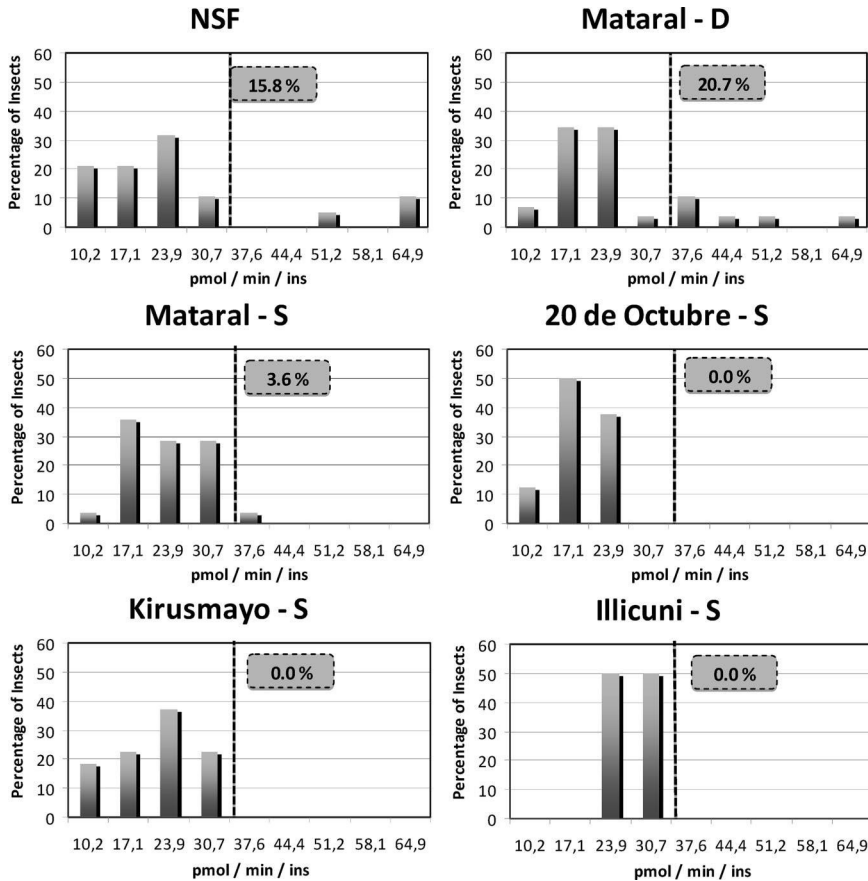


Fig. 3. Frequency distribution of pyrethroid esterase activity among sylvatic (S) and domiciliary (D) *T. infestans* from Andean valleys of Bolivia. Vertical lines are marked at values of 30.7 pmol/min, which represent the corresponding threshold of enzyme activity containing the majority of insects (75%) in susceptible populations. Enzyme activity as picomoles of 7-OHC per minute.

Acknowledgments

This work was supported by the Red Latinoamericana de Control de Vectores (RELCOV), United Nations Children's Fund/United Nations Development Program/World Bank/World Health Organization Special Program for Research and Training in Tropical Diseases, and the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas of Argentina. We thank C. Schofield for helpful comments and editorial assistance.

References Cited

- Bargues, M. D., D. R. Klisiowicz, F. Panzera, F. Noireau, A. Marcilla, R. Perez, M. G. Rojas, G. E. O'Connor, F. Gonzalez-Candela, C. Galvão, J. Jurberg, R. U. Carcavallo, J. P. Dujardin, and S. Mas-Coma. 2006. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infect. Genet. Evol.* 6: 46–62.
- Bouvier, J. C., A. Cuany, C. Monier, V. Brosse, and B. Sauphanor. 1998. Enzymatic diagnosis of resistance to deltamethrin in diapausing larvae of the codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 39: 55–64.
- Ceballos, L. A., R. V. Piccinali, I. Berkunsky, U. Kitron, and R. E. Guertler. 2009. First finding of melanic sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) colonies in the Argentine Chaco. *J. Med. Entomol.* 46: 1195–1202.
- Cecere, M. C., G. M. Vazquez-Prokopec, R. E. Guertler, and U. Kitron. 2006. Reinfestation sources for Chagas disease vector, *Triatoma infestans*, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1096–1102.
- Chilcutt, C. F., and B. E. Tabashnik. 1995. Evolution of pesticide resistance and slope of the concentration-mortality line: are they related? *J. Econ. Entomol.* 88: 11–20.
- Cortez, M. R., F. A. Monteiro, and F. Noireau. 2010. New insights on the spread of *Triatoma infestans* from Bolivia: implications for Chagas disease emergence in the South-ern Cone. *Infect. Genet. Evol.* 10: 350–353.
- Dias, J.C.P., A. C. Silveira, and C. J. Schofield. 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 603–612.
- Germano, M. D., G. Roca Acevedo, G. A. Mougabure Cueto, A. C. Toloza, C. V. Vassena, and M. I. Picollo. 2010. New findings of insecticide resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from the Gran Chaco. *J. Med. Entomol.* 47: 1077–1081.
- González Audino, P., S. Barrios, C. V. Vassena, G. A. Mougabure Cueto, E. Zerba, and M. I. Picollo. 2005. Increased monooxygenase activity associated with resistance to permethrin in *Pediculus humanus capitis*

- (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *J. Med. Entomol.* 42: 342D345.
- Gu'rtler, R. E., D. M. Canale, C. Spillmann, R. Stariolo, O. D. Salomon, S. Blanco, and E. L. Segura. 2004.** Effectiveness of residual spraying of peridomestic ecotopes with deltamethrin and permethrin on *Triatoma infestans* in rural western Argentina: a district-wide randomized trial. *Bull. W.H.O.* 82: 196 D205.
- Gu'rtler, R. E., U. Kitron, M. C. Cecere, E. L. Segura, and J. E. Cohen. 2007.** Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 16194 D16199.
- Lardeux, F., S. Depicque' re, S. Duchon, and T. Cha'vez. 2010.** Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bol'via. *Trop. Med. Int. Health.* 15: 1037D1048.
- LeOra Software. 1987.** POLO-PC: a user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Berkeley, CA.
- Litchfield, J., and F. Wilcoxon. 1994.** A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99 D113.
- Marcet, P. L., M. S. Mora, A. P. Cutrera, L. Jones, R. E. Gu'rtler, U. Kitron, and E. M. Dotson. 2008.** Genetic structure of *Triatoma infestans* populations in rural communities of Santiago del Estero, northern Argentina. *Infect. Genet. Evol.* 8: 835D 846.
- Moncayo, A., and M. I. Ortiz Yanine. 2006.** An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 100: 663D 677.
- Monteiro, F. A., R. Perez, F. Paenza, J. P. Dujardin, C. Galvao, D. Rocha, F. Noireau, C. Schofield, and C. B. Beard. 1999.** Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94(Suppl. 1): 229 D 238.
- Noireau, F. 2009.** Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104(Suppl. 1): 60 D 64.
- Noireau, F., R. Flores, and F. Vargas. 1999.** Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93: 13D14.
- Noireau, F., M. R. Cortez, F. A. Monteiro, A. M. Jansen, and F. Torrico. 2005.** Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? *Trends Parasitol.* 21: 7D10.
- Noireau, F., P. Diosque, and A. M. Jansen. 2009.** *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet. Res.* 40: 26.
- Pe'rez de Rosas, A., E. Segura, and B. Garc' a. 2007.** Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas disease vector control programmes. *Mol. Ecol.* 16: 1401D1412.
- Pe'rez de Rosas, A., E. Segura, L. Fichera, and B. Garc' a. 2008.** Macrogeographic and microgeographic genetic structure of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Catamarca, Argentina. *Genetica* 133: 247D260.
- Piccinali, R. V., P. L. Marcet, F. Noireau, U. Kitron, R. E. Gu'rtler, and E. M. Dotson. 2009.** Molecular population genetics and phylogeography of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in South America. *J. Med. Entomol.* 46: 796 D 809.
- Piccolo, M. I., C. V. Vassena., P. Santo Orihuela, S. Barrios, and E. N. Zerba. 2005.** High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective bed treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae), from northern Argentina. *J. Med. Entomol.* 42: 637D 642.
- Richer, W., P. Kengne, M. Rojas Cortez, M. M. Perrineau, A. Cohuet, D. Fontenille, and F. Noireau. 2007.** Active dispersal by wild *Triatoma infestans* in the Bolivian Andes. *Trop. Med. Int. Health* 72: 759 D764.
- Robertson, J. L., R. M. Russell, H. K. Preisler, and N. E. Savin. 2007.** Bioassays with Arthropods, 2nd ed. CRC, Boca Raton, FL.
- Santo Orihuela, P. L., M. I. Piccolo, P. Gonzalez Audino, S. Barrios, E. Zerba, and H. Masuh. 2006.** 7-Coumaryl permethrate and its *cis*- and *trans*-isomers as new fluorescent substrates for examining pyrethroid-cleaving enzymes. *Pest Manag. Sci.* 62: 1039 D1044.
- Santo Orihuela, P. L., C. V. Vassena, E. N. Zerba, and M. I. Piccolo. 2008.** Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J. Med. Entomol.* 45: 298 D306.
- Schofield, C. J., J. Jannin, and R. Salvatella. 2006.** The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 12: 583D588.
- Tolozza, A. C., M. Germano, G. Mougabure Cueto, C. V. Vassena, E. Zerba, and M. I. Piccolo. 2008.** Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J. Med. Entomol.* 45: 421D 426.
- Torres-Pe'rez, F., M. Acuna-Retamar, J. A. Cook, A. Baciga-lupo, A. Garc' a, and P. E. Cattani. 2011.** Statistical phylogeography of Chagas disease vector *Triatoma infestans*: testing biogeographic hypotheses of dispersal. *Infect. Genet. Evol.* 11: 167D174.
- [WHO] World Health Organization. 1994.** Protocolo de evaluacio'n de efecto insecticida sobre triatomos Acta. *Toxicol. Argent.* 2: 29 D32.

Received 21 September 2010; accepted 8 March 2011.

Scientific Evidence of Three Different Insecticide-Resistant Profiles in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Populations From Argentina and Bolivia

M. D. GERMANO,¹ P. SANTO-ORIHUELA,¹ G. ROCA-ACEVEDO, A. C. TOLOZA, C. VASSENA,
M. I. PICOLLO,² AND G. MOUGABURE-CUETO

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CONICET-CITEDEF), Juan Bautista de La Salle 4397, B1603ALO, Villa Martelli, Provincia de Buenos Aires, Argentina

J. Med. Entomol. 49(6): 1355D1360 (2012); DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/ME12070>

ABSTRACT *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae) is the main vector of Chagas disease in the southern cone South America. Chemical control to the vectors appears to be the best option to reduce the incidence of the disease. However, since 2002, high resistance to insecticides that correlated with field control failures was detected in *T. infestans* from Argentina and Bolivia. In this paper, we analyzed three *T. infestans* populations whose pyrethroid-resistance had been recently detected, and we defined at least three resistant profiles according to the toxicological and biochemical characteristics of the studied resistant populations. The resistance profiles were identified as Ti-R1, Ti-R2, and Ti-R3, corresponding to the Argentinean Acambuco, and the Bolivians Entre Ríos and Mataral. Ti-R1 exhibited nymphs and eggs with medium resistance level to deltamethrin (RR 32.5 and 28.6, respectively). Pyrethroid-esterases played a relevant role in deltamethrin resistance. Ti-R2 exhibited nymphs with high resistance to deltamethrin (RR 173.8) and low resistance to ppronicil (RR 12.4). Pyrethroid-esterases were involved in resistance. Moreover, eggs showed medium resistance level to deltamethrin (RR 39.1). Ti-R3 had nymphs with low resistance to deltamethrin (RR 17.4), and medium resistance to ppronicil (RR 66.8). Pyrethroid-esterases showed increased activity, and eggs possessed low resistance to deltamethrin (RR 8.4). The characterization of the resistance to pyrethroid in these *T. infestans* populations from Argentina and Bolivia do not permit the generalization of three forms of resistance profile. So far as we appear to know, the forms of mechanisms and their frequencies reported here are selected independently, so additional sites might well show additional combinations of resistance mechanisms and their frequencies.

KEY WORDS *Triatoma infestans*, insecticide resistance, toxicological profile, Chagas disease vector

Chagas disease is a chronic parasitic infection restricted to America where 15 million people present *Trypanosoma cruzi* infection or carry the disease, and 90 million people are at risk for contracting the infection (Rodrigues Coura and Pinto Dias 2009). The disease is caused by the protozoan *T. cruzi*, which is transmitted to human through the feces of infected blood-sucking insect belonging to the subfamily Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Triatoma infestans* (Klug, 1834) is responsible for most of the cases of Chagas disease in the continent (Dias and Schofield 1999). Because no treatment is available for the chronic forms of the disease, chemical control is the main action used to prevent vector borne transmission of Chagas disease. The chemical control, historically based on the use of organochlorine, organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides has led to the reduction of *T. infestans* distribution and the conse-

quent interruption of disease transmission in several areas of Southern Cone (Dias et al. 2002, World Health Organization [WHO] 2006). However, resistance to insecticides was reported in *T. infestans* from Brazil (South America) (Vassena et al. 2000). In 2002, high resistance to deltamethrin correlated with field control failures was detected in *T. infestans* in the neighboring areas to Salvador Mazza (Argentina) and Ya-cuiba (Bolivia) (Picollo et al. 2005). Later, insecticide resistance was reported for *T. infestans* populations from the geographical area of Gran Chaco of Argentina, Bolivia, and Paraguay (Tolozza et al. 2008, Germano et al. 2010). Recent studies demonstrated differences among the studied pyrethroid-resistant populations (Santo Orihuela et al. 2008, Tolozza et al. 2008). In this paper, we analyzed recently detected *T. infestans* resistant populations, and we defined at least three resistant profiles according to the toxicological and biochemical characteristics of the studied resistant populations.

¹ These authors contributed equally to this work.

² Corresponding author, e-mail: gmougabure@gmail.com.

of America

Table 1. Description of each studied sites

| Site of collection | Province country | Latitude longitude | Altitude (m.a.s.l.) | Mean temp (C) | Mean annual rainfall (mm) |
|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|----------------|---------------------------|
| Acambuco | Salta Argentina | 22 18 S 63 95 W | 800 | 21.5 | 900 |
| Entre Ros | Tarija Bolivia | 21 17 S 63 57 W | 1,230 | 19.6 | 1,300 |
| Mataral | Cochabamba Bolivia | 18 35 S 65 09 W | 1,750 | 18.8 | 540 |

Materials and Methods

The three resistance profiles of *T. infestans* populations from different areas were determined by topical bioassay of insecticides from three chemical classes (deltamethrin: pyrethroid, Ippronil: phenylpyrazole, and fenitrothion: organophosphate) against first instar nymphs and eggs, and by the measurement of the activity of the mono-oxygenase (de-ethylation) and pyrethroid-esterase detoxifying enzymes.

Study areas were Acambuco (Salta, Argentina), Entre Ros (Tarija, Bolivia), and Mataral, (Cochabamba, Bolivia). A brief description of the studied sites is shown in Table 1.

These sites are in areas where resistance was previously demonstrated (Picollo et al. 2005, Santo Orihuela et al. 2008, Toloza et al. 2008, Germano et al. 2010). They were chosen because their owners and the authorities of vector control campaigns expressed domiciliary infestation after insecticide treatment (Fig. 1).

Individuals were captured from infested dwellings with the use of manual forceps and without the use of dislodging agent. Captured insects and their offspring were raised at the laboratory under controlled temperature (28 ± 1 C), humidity (50 ± 70%), and a pho-

toperiod of 12:12 (L:D) h. A pigeon was weekly provided as a bloodmeal source (WHO 1994). A reference *T. infestans* colony was obtained from descendants of the insects provided by the Coordinación Nacional de Control de Vectores (Punilla, Córdoba, Argentina). They were reared under the same controlled laboratory conditions as field populations.

Technical grade deltamethrin (99.5%), Ippronil (97.5%), and fenitrothion (98.0%) used for bioassay were obtained from Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany. The analytical grade acetone used for dilutions was purchased from Merck Argentina, Buenos Aires, Argentina.

Bioassays. Tests to determine insecticide susceptibility were done by topical application, according to the WHO protocol (WHO 1994). The test was conducted on *T. infestans* first instar nymphs (5–7 d old, mean weight 1.3 ± 0.2 mg) starved since eclosion. Each insect was treated with 0.2 ml of the insecticide diluted in acetone on the dorsal abdomen using a 10 ml Hamilton syringe (Hamilton, Reno, NV) provided with a repeating dispenser. Deltamethrin was selected for toxicity studies because it was the main insecticide used since the 1980s in campaigns for vector control of Chagas disease. Fenitrothion was selected because it was used before deltamethrin, and Ippronil because was never used for *T. infestans* field control. Moreover, the three selected insecticides have different modes of action.

Concentrations ranged from 0.0001 to 10 mg/ml (corresponding to 0.02 and 2000 nanograms/insect) for deltamethrin, from 0.01 to 10 mg/ml (2 and 2,000 ng/i) for Ippronil, and from 0.01 to 1 mg/ml (2 and 2,000 ng/i) for fenitrothion. Ten insects were used for each replicate and each dose, and each dose was replicated at least three times. Topical application with acetone was made for controls. After treatment, insects were held at the rearing laboratory conditions for 24 h, when mortality was recorded. The criterion for mortality was inability to walk from the center to the border of a circular filter paper (11 cm diameter). Only those nymphs that were able to walk to the border of the paper with or without mechanical stimulation were considered alive. At least four doses (within the corresponding range) that produced between 10 and 90% mortality were selected for statistical analysis.

For toxicity studies, eggs of 12 d old were selected using external morphological characteristics as described previously (Picollo de Villar et al. 1979). Briefly, 12 d old eggs were orange with dark eye spots.



Fig. 1. Geographical location of studied sites and the Gran Chaco area.

Groups of at least 10 eggs per concentration were fixed to a microscope slide by a double-side adhesive tape. Treatment of the eggs was individually performed by topical application to the operculum with 0.2 ml of the insecticide diluted in acetone, by using a 10 ml Hamilton syringe, according to the method reported by Toloza et al. (2008). Final concentration ranged from 0.001 to 10 mg/ml of deltamethrin diluted in acetone. Each concentration, including acetone for controls, was replicated three times. After topical application, eggs were incubated in a rearing cabinet (FOC-225E, Velp Scientifica, Milan, Italy) at 28 °C, 50% relative humidity (RH), and a photoperiod of 12:12 (L:D) h.

Mortality data were recorded 10 d after treatment to determine the number of eggs that failed to hatch. This period of time was recorded to ensure that no delayed hatching took place in the control.

Enzyme Activity. Cytochrome P₄₅₀ Monooxygenase activities were measured using 7-ethoxycoumarin-O-deethylase, according to the direct fluorometric test for individual abdomens of *T. infestans* and *Pediculus humanus capitis* (González Audino et al. 2005). Fluorescence of 7-OHC was determined using microplate fluorescence reader (Packard Fluorocount), with 400 nm excitation and 440 nm emission filters.

First instar nymph abdomens were placed individually into wells of a 96 well micro plate containing 100 µl of 0.05 M phosphate buffer, and 4 mM 7-EC. The reaction was stopped after incubation time (4 h, 30 °C) by adding 100 µl of glycine buffer (10 mM, pH 10.4). To precipitate the abdomens in the wells, microplates were centrifuged at 2000 g for 30 s in a refrigerated centrifuge for microplates (4237 R, ALC International SRL, Cologna Monzese, Italy) before and after the incubation of the enzymatic reaction at 30 °C. For each population, similar wells receiving glycine buffer previous to incubation were used for blanks. The relative fluorescence units were all corrected for background hydrolysis, nonspecific fluorescence of substrate, and transformed to picomoles per minute (activity units) by using a calibration curve per replicate with dilutions of 7-OHC (60.19, 117.50, 172.50, and 224.33 total pmoles per well).

Pyrethroid-Esterase activity was determined by the hydrolysis of 7-coumaryl permethrate (7-CP), a new fluorescent substrate appropriate for determining pyrethroid hydrolysis activity on individual insects (Santo Orihuela et al. 2006). For this, the insects were cooled and each nymph was homogenized in 220 µl phosphate buffer (pH 7.2, 0.05 M) by using a plastic mortar and pestle. Reaction was initiated by adding 10 µl 7-CP (3.5 mM, 2-methoxy ethanol) to 190 µl of each homogenate. Incubation was performed at 25 °C for 33 min, at pH 7.2. The fluorescence was measured using a microplate fluorescence reader (Packard Fluoro-count) and results were analyzed with Fluorocount™ and Excel 2000 software. Assays were conducted in black 96-well polystyrene flat-bottom microtiter plates (Packard, Meriden, CT) at 25 °C. Production of 7-OHC was monitored with excitation wavelength at 400 nm and emission at 440 nm. Activity was measured each 3 min for 33 min, such that assay was linear over

the reported time. The relative fluorescence units values were all corrected for background hydrolysis, nonspecific fluorescence of substrate and transformed in picomoles per minute (activity units) using a calibration curve per duplicate with dilutions of 7-OHC (68.5, 342.69, 685.44, and 1,370.8 total pmoles for well).

Data Analysis. In those tests where control mortality was observed (always 15%), the mortality data were corrected using Abbott's formula (Abbott 1925). Dose-mortality data were subjected to probit regression analysis (Litchfield and Wilcoxon 1949) to estimate the lethal dose to kill 50% of population (LD₅₀) by using POLO PC (LeOra Software 2002). LD₅₀ values were expressed in nanograms per nymph (ng/i) or nanograms per egg (ng/egg). Resistant ratio (RR) and 95% CL were calculated as described by Robertson and Preisler (2007). Studied populations were considered resistant if the RR CLs did not include the number one. RR 100 was considered as high resistance, RR 10 was considered as low resistance, and RR from 10 to 100 was considered as medium resistance.

The biochemical data were plotted as the percentage of individuals responding within a particular range of values of enzyme activity (Sokal and Rohlf 1980). A reasonable threshold of enzyme activity containing the majority of insects (64%) is established for the susceptible strain, and the percentage of insects over the threshold is calculated for each enzyme and each population (Picollo et al. 2005).

Results

The susceptibility values of first instar nymphs to deltamethrin, fenitrothion, and pyrethrin are shown in Table 2. Deltamethrin was the most effective insecticide in the reference susceptible colony (LD₅₀ 0.2 ng/i), compared with pyrethrin (LD₅₀ 12.8 ng/i) and fenitrothion (LD₅₀ 11.8 ng/i). In addition, deltamethrin-resistance was assessed in all field populations (RR Mataral 17.4, RR Acambuco 32.5, and RR Entre Ríos 173.8).

The estimated values for pyrethrin indicated that the two Bolivian deltamethrin-resistant populations were resistant to this insecticide (RR Mataral 66.8, RR Entre Ríos 12.4). However, Acambuco was susceptible to pyrethrin. The toxic response to the treatment with fenitrothion was similar for the deltamethrin-resistant population and for the susceptible one, despite a slight lower susceptibility was detected in Acambuco.

The susceptibility values of eggs exposed to deltamethrin were in Table 3. All studied resistant populations had deltamethrin-resistant eggs. Eggs of Entre Ríos showed the highest RR to deltamethrin (39.1), whereas Mataral showed the lowest level (RR 8.4).

The 7-OHC mono-oxygenases (measured by de-ethylation) of deltamethrin-resistant populations on first instar nymphs showed no statistical differences (*P* 0.05), related to the reference population (1.74 0.91 picomoles/min/insect). The frequency distribution of first instar nymph pyrethroid-esterase activities

Table 2. Toxicity of deltamethrin, fipronil, and fenitrothion against first instar nymph of *T. infestans* from Argentina and Bolivia

| Insecticide | Population | N ^a | SlopeSE | χ ² | LD ₅₀ (ng/i) ^b (95% CL) | RR (95% CL) |
|--------------|------------|----------------|----------|----------------|---|----------------------|
| Deltamethrin | Reference | 90 | 2.5 0.59 | 0.1 | 0.2(0.14D0.28) | Ñ |
| | Acambuco | 169 | 1.7 0.21 | 2.1 | 6.4(4.58D8.92) | 32.5(31.8D44.6) |
| | Entre Ros | 130 | 0.7 0.06 | 7.4 | 35.8(21.46D66.37) | 173.8(149.02D230.45) |
| Fipronil | Mataral | 186 | 1.1 0.10 | 5.2 | 2.3(0.28D4.80) | 17.4(11.88D25.43) |
| | Reference | 90 | 0.8 0.58 | 5.4 | 12.8(6.25D22.7) | Ñ |
| | Acambuco | 92 | 0.6 0.19 | 1.4 | 33.3(11.13D176.81) | 2.6(0.72D9.50) |
| Fenitrothion | Entre Ros | 223 | 1.1 0.19 | 21.7 | 155.1(82.67D242.60) | 12.4(5.12D28.36) |
| | Mataral | 90 | 2.7 0.43 | 1.3 | 859.8(675.83D1099.57) | 66.8(31.01D144.13) |
| | Reference | 186 | 3.6 0.67 | 6.5 | 11.8(8.19D16.87) | Ñ |
| | Acambuco | 160 | 2.5 0.32 | 1.1 | 30.2(23.82D38.76) | 2.6(1.90D3.42) |
| | Entre Ros | 90 | 2.0 0.21 | 10.8 | 19.4(4.67D34.47) | 1.6(1.31D2.04) |
| | Mataral | 170 | 3.4 0.47 | 3.8 | 15.3(9.59D21.98) | 1.3(1.00D1.68) |

ng/i, nanograms per nymph.

a N, number of insects used for bioassays.

b LD₅₀, RR, and 95% CL calculated following Robertson and Preisler (2007).

among reference and field populations of *T. infestans* is shown in Fig. 2. The vertical line marked at values of 68.5 pmol/min/insect represented the threshold of enzyme activity containing the majority of insects (70%) in the susceptible reference population, and on each histogram the percentage of individuals exceeding this value is marked. The percentages were 27.7% for the susceptible, 0% for Entre Ros, 2.6% for Mataral, and 79.2% for Acambuco. A Kruskal-Wallis analysis demonstrated remarkable higher activity in Acambuco than the reference population (P 0.001). On the contrary, significant low activity was found in Mataral and Entre Ros populations (P 0.05).

Discussion

Three different resistance profiles were identified in the studied *T. infestans* field populations, which were called resistance type 1, 2, and 3 (Ti-R1, Ti-R2, and Ti-R3, respectively), corresponding to the Argentinean Salta Chaco (Acambuco), Bolivian Tarija Chaco (Entre Ros), and Bolivian Andean Valleys (Mataral). The Ti-R1 profile exhibited nymphs with medium resistance level to deltamethrin (RR 32.5), and they were susceptible to fipronil and fenitrothion. Pyrethroid-esterases played a relevant role in deltamethrin resistance (significantly increased activity). Moreover, eggs of Ti-R1 resistant populations had a medium resistant level to deltamethrin.

The Ti-R2 profile exhibited nymphs with high resistance to deltamethrin (RR 173.8), low resistance to fipronil (RR 12.4) and susceptibility to fenitrothion. Neither pyrethroid-esterases (deethylation)

nor P₄₅₀ monooxygenase (hydrolysis of 7-CP) showed increased activity. Moreover, eggs of Ti-R2 resistant populations showed medium resistance levels to deltamethrin (RR 39.1).

The Ti-R3 profile exhibited nymphs with low resistance level to deltamethrin (RR 17.4), medium resistance to fipronil (RR 66.8) and susceptibility to fenitrothion. Neither pyrethroid-esterases nor P₄₅₀ monooxygenase showed increased activity. Moreover, eggs of Ti-R3 resistant populations had low resistance to deltamethrin (RR 8.4).

Previous work at our laboratory has indicated high resistance levels to deltamethrin correlated with failures of chemical control in field populations of *T. infestans* in Salvador Mazza (northern Argentina) and Yacuiba (southern Bolivia) (Picollo et al. 2005, Santo Orihuela et al. 2008). Lately, Germano et al. (2010) reported new findings of insecticide resistance extended toward the north of Bolivia with increasing resistant levels (Tierras Nuevas, Villa el Carmen, El Palmar, and Villamontes), demonstrating that the resistant area in Bolivia was greater than previously expected. In contrast, in Argentina these authors reported that the high resistance area was limited to the northern border, because field populations to the south of S. Mazza-Yacuiba were susceptible or slightly resistant to deltamethrin. Additional studies about the insecticide resistance in eggs have demonstrated remarkable differences in the expression of insecticide resistance in eggs from different field populations (Toloza et al. 2008). For example, eggs from Salvador Mazza, Argentina, show high resistance to deltamethrin and lambda-cyhalothrin, while eggs from two

Table 3. Toxicity of deltamethrin in eggs of *T. infestans* populations from Argentina and Bolivia

| Population | N ^a | SlopeSE | χ ² | LD ₅₀ (ng/egg) ^b (95% CL) | RR (95% CL) |
|------------|----------------|----------|----------------|---|-------------------|
| Reference | 157 | 1.9 0.69 | 1.1 | 1.5(1.15D2.18) | Ñ |
| Acambuco | 90 | 0.7 0.10 | 5.1 | 44.5(16.45D322.50) | 28.6(16.53D49.45) |
| Entre Ros | 199 | 0.8 0.07 | 8.6 | 60.6(20.24D208.35) | 39.1(23.96D63.67) |
| Mataral | 242 | 1.3 0.25 | 3.5 | 13.0(8.60D19.25) | 8.4(5.26D13.14) |

ng/egg, nanograms per egg.

a N, number of eggs used for bioassays.

b LD₅₀, RR, and 95% CL calculated following Robertson and Preisler (2007).

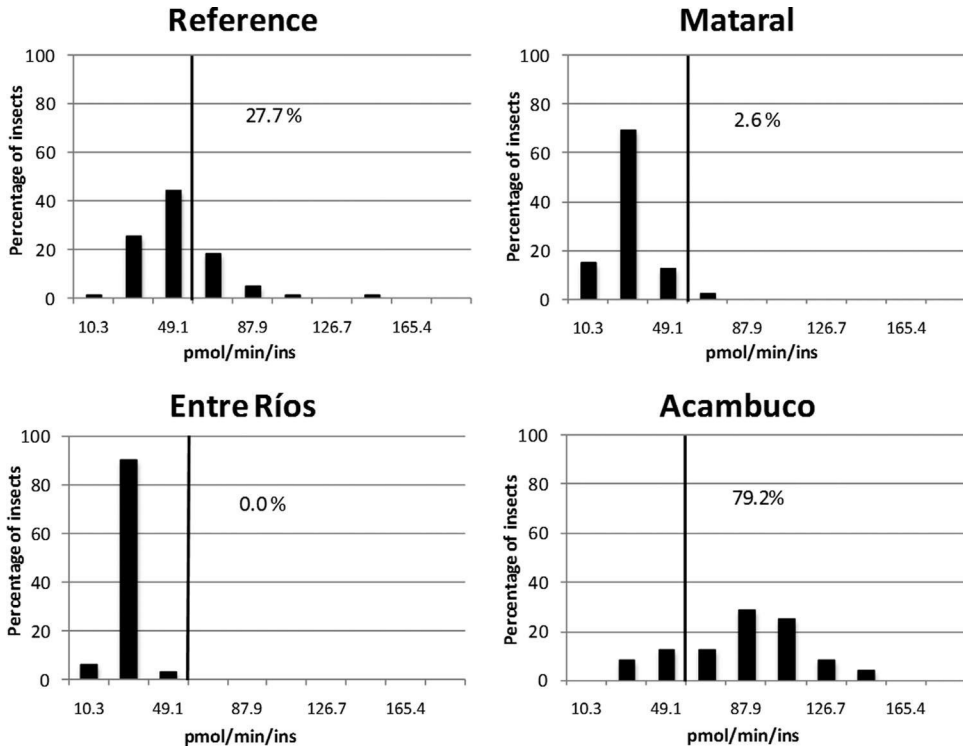


Fig. 2. Frequency distribution of permethrate-esterases in Brst instar nymphs of susceptible and deltamethrin-resistant *T. infestans*. Enzyme activity expressed as picomoles of 7-OH coumarin per minute.

areas of Bolivia are susceptible to pyrethroids. The authors concluded that the expression of insecticide resistance in eggs varies among populations and that the pyrethroid resistance diagnosed in *T. infestans* Brst instar nymphs is not indicative of resistance in the egg stage (Tolozza et al. 2008).

Evidence of different resistance profiles in *T. infestans* field populations from Argentina and Bolivia suggested an independent evolutionary process, mainly based on insecticide pressures, genetic differences of the natural populations, and/or local environmental. The insecticide pressure not seem to be the main cause, because the vector control activities with pyrethroid insecticides in the studied areas had historically been very sparse, and no campaign was conducted with Dppronil. Moreover, different susceptibility to deltamethrin and Dppronil was recently re-reported for sylvatic *T. infestans* populations from different areas in Bolivia. The differential susceptibilities of sylvatic insects would not be the result of selection pressure because the sylvatic environment was not targeted by chemical control interventions. These results demonstrated that *T. infestans* from different geographic areas has naturally different toxicological responses to insecticides (Roca Acevedo et al. 2011).

Other natural variations for *T. infestans* from several areas of Argentina and Bolivia have been reported. Monteiro et al. (1999) used mitochondrial DNA sequence variation to infer the genetic structure of nine *T. infestans* populations from Bolivia, Brazil, and Ar-

gentina. They found four haplotypes that could be separated into two clusters: one cluster consisting of insects from Bolivia and the other cluster of samples from Argentina and Brazil. Panzera et al. (2004) has reported by cytogenetic methods a clear differentiation between *T. infestans* from Andean Bolivia and Argentina.

Recently, Hernandez et al. (2011) has indicated a spatial influence of macro- and microhabitats in the phenotypic characteristics of *T. infestans* and the relationship with the potential role to invade and colonize other habitats in the arid Chaco region of Argentina.

The characterization of the resistance to pyrethroid in these *T. infestans* populations from Argentina and Bolivia do not permit the generalization of three forms of resistance profile. So far as we appear to know, the forms of mechanisms and their frequencies reported here are selected independently, so additional sites might well show additional combinations of resistance mechanisms and their frequencies. More studies about the *T. infestans* resistant field populations would help in the improvement of the vector control activities, since different insecticides should be applied to focus with different resistant profiles.

Acknowledgments

We thank Cynthia Spillmann, Mario Zaidenberg, and technicians of the National Vector Control Coordination of Ar-

gentina. Tamara Chavez and Mirko Rojas of Ministry of Health of Bolivia supported us in field sampling. This investigation received financial support from the UNICEF/ UNDP/World Bank/World Health Organization Special Programmer for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) project ID A80360, and the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) of Argentina.

References Cited

- Abbott, W. S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Dias, J.C.P., and C. J. Schofield. 1999.** The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 94: 103-121.
- Dias, J.C.P., A. C. Silveira, and C. J. Schofield. 2002.** The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97: 603-612.
- Germano, M. D., C. V. Vassena, and M. I. Picollo. 2010.** Autosomal inheritance of deltamethrin resistance in field populations of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from Argentina. *Pest Manag. Sci.* 66: 705-708.
- González Audino, P., S. Barrios, C. Vassena, G. Mougabure Cueto, E. Zerba, and M. I. Picollo. 2005.** Increased monoxygenase activity associated with resistance to permethrin in *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *J. Med. Entomol.* 42: 342-345.
- Hernández, M. L., L. B. Abraham, J. P. Dujardin, D. E. Gorla, and S. S. Catalá. 2011.** Phenotypic variability and population structure of peridomestic *Triatoma infestans* in rural areas of the Arid Chaco (Western Argentina): spatial influence of macro- and microhabitats. *Vector-Borne Zoon. Dis.* 11: 503-513.
- LeOra Software. 2002.** POLO-PC: a user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Berkeley, CA.
- Litchfield, J. T., and F. Wilcoxon. 1949.** A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Exp. Ther.* 96: 99-110.
- Monteiro, F. A., R. Perez, F. Panzera, J. P. Dujardin, C. Galvão, D. Rocha, F. Noireau, C. Schofield, and C. B. Beard. 1999.** Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 94: 229-238.
- Panzera, F., J. P. Dujardin, P. Nicolini, M. N. Caraccio, V. Rose, T. Tellez, H. Bermudez, M. D. Barges, S. Mas-Coma, J. E. O'Connor, and R. Perez. 2004.** Genomic changes of Chagas disease vector, South America. *Emerg. Inf. Dis.* 10: 438-446.
- Picollo de Villar, M.I.P., E. Zerba, E. Wood, and S. Licastro. 1979.** Neurogenesis and occurrence of cholinesterase in eggs of *Triatoma infestans*. *Comp. Biochem. Physiol.* 65: 65-70.
- Picollo, M. I., C. Vassena, P. S. Orihuela, S. Barrios, M. Zaidemberg, and E. Zerba. 2005.** High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J. Med. Entomol.* 42: 637-642.
- Robertson, J. L., R. M. Russell, H. K. Preisler, and N. E. Savin. 2007.** Bioassays with arthropods, 2nd ed. CRC, Boca Raton, FL.
- Roca Acevedo, G., G. Mougabure-Cueto, M. Germano, P. Santo Orihuela, M. Rojas Cortez, F. Noireau, M. I. Picollo, and C. Vassena. 2011.** Susceptibility of sylvatic *Triatoma infestans* from Andean Valleys of Bolivia to deltamethrin and bupronil. *J. Med. Entomol.* 48: 828-835.
- Rodrigues, C., and P. Dias. 2009.** Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 104: 31-40.
- Santo Orihuela, P. L., M. I. Picollo, P. González Audino, S. Barrios, E. Zerba, and H. Masuh. 2006.** 7-Coumaryl permethrate and its cis- and trans-isomers as new fluorescent substrates for examining pyrethroid-cleaving enzymes. *Pest Manag. Sci.* 62: 1039-1044.
- Santo Orihuela, P. L., C. V. Vassena, E. N. Zerba, and M. I. Picollo. 2008.** Relative contribution of monoxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J. Med. Entomol.* 45: 298-306.
- Sokal, R., and F. Rohlf. 1980.** *Introducción a la bioestadística*. Editorial Reverte S. A., Barcelona, Spain.
- Tolosa, A. C., M. Germano, G. M. Cueto, C. Vassena, E. Zerba, and M. I. Picollo. 2008.** Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J. Med. Entomol.* 45: 421-426.
- Vassena, C., M. I. Picollo, and E. Zerba. 2000.** Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med. Vet. Entomol.* 14: 51-55.
- (WHO) World Health Organization. 1994.** Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre triatominos. *Acta Toxicol. Argentina* 2: 29-32.
- (WHO) World Health Organization. 2006.** Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance, 6th ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Received 23 March 2012; accepted 1 July 2012.

Expression of Insecticide Resistance in Immature Life Stages of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae)

GONZALO ROCA-ACEVEDO,^{1,2} MARIA INES PICOLLO,¹ AND PABLO SANTO-ORIHUELA¹

J. Med. Entomol. 50(4): 816-818 (2013); DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/ME12116>

ABSTRACT The aim of the current study was to investigate the susceptibility to the insecticide deltamethrin and the expression of resistance to this insecticide in developing eggs and neonate nymphs of *Triatoma infestans* from two areas of Argentina (Campo Largo) and Bolivia (Entre Ríos), where resistance to this pyrethroid is suspected. Both nymphal populations showed resistance to deltamethrin, with lower resistance ratio for Entre Ríos (173) than Campo Largo (1108). Efficacy of deltamethrin on 4-, 7-, and 12-d-old eggs for both field populations were significantly lower than efficacy on eggs of the susceptible strain. This is the first documented evidence of the expression of pyrethroid resistance during the embryonic development of Chagas Disease vectors.

KEY WORDS *Triatoma infestans*, resistance, pyrethroid, insecticide

The kissing bug *Triatoma infestans* Klug is the main vector of the parasite *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease or American trypanosomiasis. Since the 1980s, pyrethroid insecticides have been the main products used to control domestic populations of this vector. However, resistance to deltamethrin and other pyrethroids associated with ineffective field treatments has been reported among areas of the Gran Chaco of Argentina and Bolivia (Picollo et al. 2005, Toloza et al. 2008, Gemio et al. 2010, Germano et al. 2010, Lardeaux et al. 2010). Initial studies demonstrated highly deltamethrin-resistant populations exist in areas neighboring Salvador Mazza (Argentina) and Yacuiba (Bolivia), with resistant ratios (RR) 133 and 154, respectively (Picollo et al. 2005, Santo Orihuela et al. 2008). Later, higher levels of resistance to deltamethrin (RR from 247 to 541) were reported for other field populations from the south of Bolivia (Tarija Department), demonstrating that resistant area occurred to a greater extent than expected pre-viously (Toloza et al. 2008).

Recently, toxicological studies demonstrated important differences in the expression of resistance in eggs of these pyrethroid-resistant populations (Toloza et al. 2008). In fact, eggs in northern Argentina expressed high levels of deltamethrin resistance (RR Salvador Mazza: 114.3), whereas eggs in southern Bolivia were susceptible to deltamethrin (RR Yacuiba: 0.56). These authors were focused on the measurement of susceptibility in older eggs (12 d old) according to previous studies on the effects of insecticides on

T. infestans eggs (Villar et al. 1980, Visciarelli et al. 2011).

The present report analyzes the expression of insecticide resistance in developing eggs of *T. infestans*. Insect embryogenesis involves numerous morphological, biochemical, and physiological events that affect the toxicity of insecticide, and probably the expression of the lower susceptibility to an insecticide. For example, the resistance may not be expressed in early embryonic eggs because the target of insecticide is not present at this stage (Picollo et al. 1979). The aim of the current study was to investigate the susceptibility to insecticides and expression of deltamethrin resistance in developing eggs and neonate nymphs of *T. infestans* field populations from two areas with resistance in Argentina and Bolivia.

Materials and Methods

Insects. Insecticide-susceptible *T. infestans* were obtained from descendants of insects from Coordinación Nacional de Control de Vectores (Punilla, Córdoba), where they were reared for 6 yr. They were reared in our laboratory for 3 yr under standard conditions of controlled temperature (28 C), humidity (50-70%), and a photoperiod of (12:12 (L:D)h), and were weekly fed on pigeons. Field *T. infestans* were collected in 2009 from infested houses in northern Argentina (Campo Largo, 22 0 19.32 S, 63 56 2.24 W) and southern Bolivia (Entre Ríos, 21 17 44.07 S, 63 56 54.36 W), where vector control campaigns based on pyrethroid insecticides were considered ineffective by the Ministries of Health of Argentina and Bolivia. Captured insects and their offspring were raised under standard conditions, and the second generation of captured insects was used for susceptibility bioassays.

¹ Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CITEDEF/CONICET), Juan Bautista de La Salle 4397, B1603ALO, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

² Corresponding author, e-mail: gonzalora@conicet.gov.ar.

Table 1. Toxicity of topically applied deltamethrin to 3-d-old first-instar nymphs and ovicidal activity of topically applied deltamethrin to *Triatoma infestans* 4-, 7-, and 12-d-old eggs of a susceptible reference colony and two insecticide-resistant populations from Argentina and Bolivia

| Population | Age | n | LD ₅₀ (ng/i) (CL) | Slope | RR (CL) |
|-------------|-----------|-----|------------------------------|------------|-------------------|
| Reference | 3-d nymph | 100 | 0.20 (0.14Ð0.28) | 1.4 0.37 | Ñ |
| Campo Largo | 3 d | 150 | 228 (46Ð1022) | 0.8 0.07 | 1,108 (685Ð1,790) |
| Entre Rõ's | 3 d | 130 | 36 (21Ð66) | 0.7 0.06 | 173 (149Ð230) |
| Reference | 4-d egg | 90 | 0.50 (0.32Ð0.77) | 1.56 0.98 | Ñ |
| | 7 d | 147 | 0.42 (0.25Ð0.68) | 1.18 0.12 | Ñ |
| | 12 d | 187 | 1.55 (1.16Ð2.18) | 1.99 0.69 | Ñ |
| Campo Largo | 4 d | 138 | 576 (397Ð936) | 2.87 0.17 | 1,144 (609Ð2,150) |
| | 7 d | 227 | 501 (394Ð646) | 2.02 0.15 | 1,193 (687Ð2,070) |
| | 12 d | 251 | 1,277 (1,013Ð1,650) | 2.27 0.30 | 822 (558Ð1211) |
| Entre Rõ's | 4 d | 142 | 10.63 (1Ð21) | 0.92 0.15 | 21 (9Ð47) |
| | 7 d | 90 | 6 (2Ð12) | 0.544 0.09 | 15 (6Ð37) |
| | 12 d | 90 | 61 (20Ð207) | 0.77 0.08 | 39 (23Ð63) |

Chemicals. Technical grade deltamethrin (99.0%) was obtained from Dr Ehrenstorfer, Augsburg, Germany. Analytical grade acetone was purchased from J.T. Baker (Estado de Me'xico, Me'xico).

Bioassays

Nymphs. First-instar nymph (35 d old; mean weight 1.3 ± 0.2 mg) starved since eclosion were selected for toxicity tests by using the methods of the World Health Organization protocol (WHO 1994). Treatment consisted of topical application on the dor-sal abdomen. Final concentrations ranged from 0.0001 to 15 mg/ml of deltamethrin in acetone. At least four different concentrations that gave between 10 and 90% mortality were used. These concentrations plus a control were assayed for each population in three replications containing at least 10 first-instar nymphs per dose. After 24 h, mortality rates of controls and treated insects were recorded as indicated by immobility according to the WHO protocol (WHO 1994).

Eggs. For toxicity studies, eggs were collected from adult rearing boxes and stored in petri dishes. Eggs of 4, 7, and 12 d were selected based on the external morphological characteristics as described by Picollo et al. (1979). Briefly, 4-d-old eggs were white with a mild depression in the center. Seven-day-old eggs were slightly more orange, with the posterior section clearer and two reddish eyespots; 12-d-old eggs were orange with dark eye spots. Groups of at least 10 eggs per concentration were fixed to a microscope slide by double-sided adhesive tape. Treatment of individual eggs was performed by topical application to the operculum with 0.2 ml of insecticide diluted in acetone, by using a 10-ml Hamilton syringe, at the same rate of concentrations and application method as used with nymphs.

After topical application, eggs were incubated in a rearing cabinet (FOC-225E, Velp Scientifica, Milan, Italy) at 28 C, 50% RH, and a photoperiod of 12:12 (L:D) h. At these laboratory conditions, the estimated hatching of control eggs is 15 d. So mortality data were assessed at 14, 11, and 6 d after topical application to 4-, 7-, and 12-d-old eggs, respectively.

Statistical Analysis. Mortality data were corrected using Abbott formula before analysis (Abbott 1925).

Dose-mortality data for eggs and first-instar nymphs of each *T. infestans* population were subject to probit analysis (Litchfield and Wilcoxon 1949) by using the Polo PC program (LeOra Software 1987) to estimate the median dose required to kill 50% of the eggs or nymphs (LD₅₀). Differences in LD (lethal dose) were determined via the lack of overlap between 95% CL (confidence level). RRs and 95% CLs were calculated as described by Robertson and Preisler (1992) by comparison with the susceptible reference strain.

Results

Susceptibility varied greatly, with LD₅₀ values ranging from 0.2 nanogram per insect (ng/i) in the reference population to 228 ng/i in Campo Largo (Table 1). Both field populations showed resistance to deltamethrin; resistant ratio for the strain from Entre Rõ's was lower than the strain from Campo Largo.

At all stages of development, the efficacy of deltamethrin on eggs of both field populations was significantly lower than its efficacy on eggs of the susceptible strain.

Moreover, the level of susceptibility was significantly lower in eggs from Campo Largo than Entre Rõ's. In Campo Largo and Entre Rios, there was not significant difference between the susceptibility levels estimated on 4- and 7-d-old eggs, but lower susceptibility was assessed in 12-d-old eggs. Similarly, 4- and 7-d-old eggs of Entre Rõ's showed similar level of deltamethrin susceptibility, but it was significantly lower in 12-d-old eggs.

Discussion

The present laboratory tests on first-instar nymphs of *T. infestans* demonstrated that the field populations from northern Argentina (Campo Largo) and southern Bolivia (Entre Rõ's) have developed high resistance to deltamethrin insecticide. The resistant level for the Argentinean population was significantly higher than that of the Bolivian one. These results are consistent with previous reports that demonstrated the emergence of insecticide resistance associated with ineffective field treatments in *T. infestans* of this endemic area of the Gran Chaco ecoregion (Picollo et

al. 2005, Santo Orihuela et al. 2008, Germano et al. 2010, Lardeux et al. 2010).

Our bioassays with eggs demonstrated that resistance to both deltamethrin in both populations was also expressed in eggs. This is the first documented evidence of the expression of pyrethroid resistance during the early embryonic development of *T. infestans*.

Few previous studies have reported the expression of insecticide resistance in insect eggs, and these studies were conducted only on late development eggs. For example, Toloza et al. (2008) using 12-d-old eggs, studied the patterns of pyrethroid resistance in nymphs and eggs of *T. infestans* from Argentina and Bolivia. These authors concluded that the expression of resistance in late development eggs varied between populations and that the pyrethroid resistance diagnosed in first nymphs was not indicative of resistance in the egg stage.

Our study also showed that deltamethrin resistance is expressed throughout embryonic development, although the toxic effect of deltamethrin was different at different stages. For the reference and both resistant populations, the susceptibility of early eggs was similar to that of intermediate eggs, but lower in 12-d-old eggs. A decrease in susceptibility to organophosphorus insecticides was also reported for later embryogenesis in *T. infestans* (Zerba and Picollo 1987). These authors reported the detection of nerve cells and cholinergic system in 4-d-old embryos of *T. infestans* and concluded that the greater tolerance of late embryos was related to the presence of the embryonic cuticle that must be crossed by the insecticide to reach the target. It has been assessed in other insects (e.g., *Locusta migratoria*) that the last embryonic cuticle is the one of the first instar larva (Klowden 2007). In *T. infestans*, topical application of radioactive parathion in 11-d-old eggs showed that 70% of the radioactivity was between the chorion and the embryonic cuticle in 12-d-old eggs (Picollo and Zerba 1987). This double barrier may justify the greater tolerance of the oldest eggs.

Acknowledgments

We thank Drs Cynthia Spillmann, Mario Zaidenberg, Raúl Stariolo, and technicians of the National Vector Control Coordination of Argentina. Tamara Chavez and Mirko Rojas of Ministry of Health of Bolivia supported us in field sampling. This investigation received financial support from the UNICEF/UNDP/World Bank/World Health Organization Special Programmer for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) project ID A80360, and the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) of Argentina.

References Cited

- Abbott, W. S. 1925.** A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Med. Entomol.* 18: 265D267.
- Gemio, A., N. Romero, M. L. Hernández, X. Alberto, X. Franz, S. S. Catalá, and D. E. Gorla. 2010.** Residual effect of microencapsulated organophosphate insecticides on the mortality of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105: 752D756.
- Germano, M., C. Vassena, and M. I. Picollo. 2010.** Autosomal inheritance of deltamethrin resistance in field populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina. *Pest Manag. Sci.* 66: 705D708.
- Klowden, M. J. 2007.** Physiological systems in insects. Chapter 3, Developmental systems, 2nd ed., pp. 137D179. Elsevier, New York, NY.
- Lardeux, F., S. Depicqre, S. Duchon, and T. Chavez. 2010.** Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. *Trop. Med. Int. Health* 15: 1037D1048.
- Litchfield, J., and F. Wilcoxon. 1949.** A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99 D113.
- Picollo, M. I., C. V. Vassena, P. Santo Orihuela, S. Barrios, and E. N. Zerba. 2005.** High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from the north of Argentina. *J. Med. Entomol.* 42: 637D 642.
- Picollo, M. I., E. Zerba, E. Wood, and S. Licastro. 1979.** Neurogenesis and Occurrence of Cholinesterase in eggs of *Triatoma infestans*. *Comp. Biochem. Physiol.* 60C: 65D70.
- Robertson, J. L., and H. K. Preisler. 1992.** Pesticide bioassays with arthropods. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Santo Orihuela, P., C. V. Vassena, E. N. Zerba, and M. I. Picollo. 2008.** Relative contribution of monooxygenase and esterase to the pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J. Med. Entomol.* 45: 298 D306.
- Toloza, A., M. Germano, G. Mougabure Cueto, C. Vassena, E. Zerba, and M. I. Picollo. 2008.** Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J. Med. Entomol.* 45: 421D 426.
- Villar, M. I. P., E. J. Wood, E. N. Zerba, S. A. de Licastro, and N. Casabe. 1980.** Cholinesterase and eserine resistant esterases in the developing embryo of *Triatoma infestans* and its role as targets for inhibition in the ovicide action of parathion. *Comp. Biochem. Physiol.* 67C: 55.
- Visciarelli, E. C., C. S. Chopa, M. I. Picollo, and A. A. Ferrero. 2011.** Cholinesterase activity during embryonic development in the blood-feeding bug *Triatoma patagonica*. *Med. Vet. Entomol.* 25: 297D301.
- WHO. 1994.** Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre triatominos. *Acta Toxicológica Argentina* 2: 29 D32.
- Zerba, E., and M. I. Picollo. 1987.** Embryogenesis and ovicide action. In Brenner, R. and A. Stoka (eds.), Chagas disease vectors, vol. III, pp. 125D137. CRC, Inc., Boca Raton, FL.

Received 18 May 2012; accepted 26 March 2013.