

INVESTIGACIONES SOBRE
MOSQUITOS
de Argentina



> **Editores**

Corina M. Berón
Raúl E. Campos
Raquel M. Gleiser
Leonardo M. Díaz-Nieto
Oscar D. Salomón
Nicolás Schweigmann



Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-544-721-9

INVESTIGACIONES SOBRE
MOSQUITOS
de Argentina

Investigaciones sobre mosquitos de Argentina / Corina M. Berón ... [et al.] ; compilado por Corina M. Berón ... [et al.] ; editado por Corina M. Berón ... [et al.] . - 1a ed. - Mar del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata, 2016.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-544-721-9

1. Biología. 2. Entomología. 3. Ecología. I. Berón, Corina M. II. Berón, Corina M., comp. III. Berón, Corina M., ed.

CDD 570

INVESTIGACIONES SOBRE
MOSQUITOS
de Argentina

CM Berón, RE Campos, RM Gleiser, LM Díaz-Nieto, OD Salomón, N Schweigmann (editores)

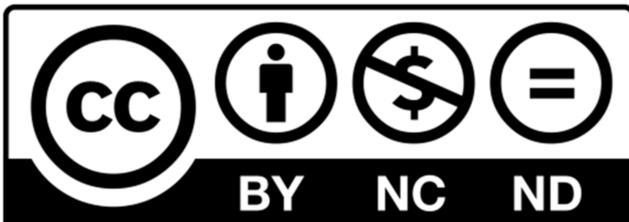
Investigaciones sobre mosquitos de Argentina



Universidad Nacional de Mar del Plata, 2016

Investigaciones sobre mosquitos de Argentina

1° edición: 2016



Esta obra se encuentra bajo Licencia Creative Commons
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada
4.0 Internacional.

Foto de tapa: *Toxorhynchites (Ankylorhynchus) purpureus* (Theobald, 1901), macho. Dr. Raúl E. Campos.

Diseño de tapa y realización de interiores: diseñadora gráfica María Cecilia Méndez Casariego, área de vinculación tecnológica, Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA - CONICET).

Avales

La presente edición cuenta con el aval académico de las siguientes instituciones:

- Centro Científico Tecnológico CONICET Mar del Plata
- Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), Universidad Nacional de La Plata - CONICET
- Centro de Investigación Esquel de Montaña y Estepa Patagónica (CIEMEP), Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco - CONICET
- Centro de Investigaciones Científicas y Transferencia de Tecnología a la Producción (CICyTTP-CONICET)
- Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (UNIDEF - CITEDEF) - CONICET
- Departamento Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes
- Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires
- Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Universidad de Buenos Aires
- Departamento de Física Juan José Giambiagi, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires
- Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral
- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata
- Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata
- Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata
- Fundación Miguel Lillo - CONICET
- Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA)
- Instituto de Diversidad y Ecología Animal (IDEA), Universidad Nacional de Córdoba - CONICET
- Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires (IEGEB), Universidad de Buenos Aires - CONICET
- Instituto de Física de Buenos Aires (IFIBA), Universidad de Buenos Aires - CONICET
- Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental (3iA), Universidad Nacional de San Martín
- Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT), Universidad Nacional de Córdoba - CONICET
- Instituto de Investigaciones Centro de Formación e Investigación en Enseñanza de las Ciencias (CeFIEC), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires
- Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC), CONICET
- Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet" (ILPLA), Universidad Nacional de La Plata - CONICET
- Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste
- Instituto de Virología "Dr. J. M. Vanella", Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba
- Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), Universidad Nacional de Córdoba - CONICET
- Instituto Multidisciplinario sobre Ecosistemas y Desarrollo Sustentable, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires
- Instituto Nacional de Medicina Tropical, Ministerio de Salud de la Nación

Indice

> SECCIÓN 1: <u>TAXONOMÍA</u>	11
<u>Coordinador:</u> Leonardo M. Díaz-Nieto	
CAPÍTULO 1: Taxonomía clásica de mosquitos. Algo de historia y de actualidad	12
Rossi GC	
CAPÍTULO 2: Taxonomía clásica de mosquitos de Argentina: estado actual y proyecciones	22
Laurito M, Stein M	
CAPÍTULO 3: Taxonomía molecular de mosquitos	33
Díaz-Nieto LM, Berrón CI, Maciá A, Berón CM	
> SECCIÓN 2: <u>DISTRIBUCIÓN</u>	46
<u>Coordinadora:</u> Marina Stein	
CAPÍTULO 4: Distribución geográfica de Culicidae de Argentina	47
Stein M, Rossi GC, Almirón WR	
CAPÍTULO 5: Modelos predictivos de distribución espacial y temporal de mosquitos	57
Estallo EL	
CAPÍTULO 6: Reconstrucción de una invasión: pasado y presente de poblaciones de <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> en Argentina	65
Albrieu Llinás G, Chiappero MB, Rondan Dueñas JC, Gardenal CN	
CAPÍTULO 7: Morfometría geométrica aplicada a la distribución geográfica de culícidos	72
Garzón M, Alem I, Schweigmann N	
> SECCIÓN 3: <u>ECOLOGÍA</u>	83
<u>Coordinadores:</u> Raúl E. Campos y Raquel M. Gleiser	
CAPÍTULO 8: Mosquitos que crían en cuerpos de agua permanentes (Subfamilia Anophe- linae)	85
Dantur Juri MJ	
CAPÍTULO 9: Mosquitos que crían en cuerpos de agua permanentes (Subfamilia Culici- nae)	94
Cardo MV	
CAPÍTULO 10: Mosquitos que crían en cuerpos de agua temporarios	105
Fischer S	
CAPÍTULO 11: Mosquitos que crían en microambientes acuáticos naturales	119
Campos RE, Gleiser RM	
CAPÍTULO 12: Mosquitos que crían en microambientes acuáticos artificiales	142
Grech MG, Ludueña-Almeida FF	
> SECCIÓN 4: <u>ECO-EPIDEMIOLOGIA DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR MOSQUITOS</u>	156
<u>Coordinadores:</u> Luis A. Diaz y Darío Vezzani	
CAPÍTULO 13: Arbovirus	157
Contigiani MS, Diaz LA, Spinsanti LI, Tauro LB	
CAPÍTULO 14: Malaria en Argentina	179
Dantur Juri MJ, Zaidenberg M	
CAPÍTULO 15: Actualización sobre <i>Dirofilariasis</i> en Argentina y el contexto en América	192
Vezzani D, Eiras DF	

INVESTIGACIONES SOBRE MOSQUITOS *de Argentina*

CAPÍTULO 16: Mapas de riesgo de enfermedades transmitidas por mosquitos Carbajo AE, Vezzani D	201
CAPÍTULO 17: Modelos matemáticos sobre mosquitos y de las enfermedades transmitidas por ellos Solari HG, Fischer S	209
> SECCIÓN 5: CONTROL DE POBLACIONES DE MOSQUITOS Coordinadora: Corina M. Berón	222
CAPÍTULO 18: Control químico de poblaciones de mosquitos Harburguer LV, Gonzalez PV, Zerba EN, Licastro S, Masuh HM	223
CAPÍTULO 19: Virus como agentes de control biológico de poblaciones de mosquitos Belaich MN, Claus JD	233
CAPÍTULO 20: Bacterias como agentes de control biológico de poblaciones de mosquitos Berón CM, Díaz-Nieto LM, Lazarte JN, Lopez RP	251
CAPÍTULO 21: Control biológico de mosquitos con <i>Ascogregarina</i> : ¿una farsa insostenible? Vezzani D, Rubio A	269
CAPÍTULO 22: Entomonematodos como agentes de control biológico de mosquitos Achinelly MF, Micieli MV	275
CAPÍTULO 23: Predadores de mosquitos Fischer S, Byttebier B, Campos RE	284
CAPÍTULO 24: Modificadores del comportamiento aplicados al control de mosquitos Gonzalez PV, Alvarez Costa A, Harburguer LV, Masuh HM	302
> SECCIÓN 6: ASPECTOS CULTURALES, PREVENCIÓN Y ACCIÓN COMUNITARIA Coordinadora: Elena B. Oscherov	316
CAPÍTULO 25: Hábitos y creencias sobre mosquitos Oscherov EB, Araujo AV, Dufek MI	318
CAPÍTULO 26: La comunicación en tiempos de dengue Salomón OD	324
CAPÍTULO 27: <i>Aedes aegypti</i> y virus Dengue: saberes y prácticas para el control Burroni NE, Peresan L, Ocampo Mallow C	339
CAPÍTULO 28: Acción comunitaria Tejerina EF, Taratagliano LC, De Lima EA, Rodríguez YM	349
> PROYECCIONES FUTURAS	359
Proyecciones, reflexiones y necesidades futuras en las investigaciones sobre mosquitos Schweigmann N	360
> ANEXO	372

Bacterias como agentes de control biológico de poblaciones de mosquitos

Corina M. Berón
Leonardo M. Díaz-Nieto
J. Nicolás Lazarte
Rocio P. Lopez

Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC) - CONICET y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA). Mar del Plata, Buenos Aires.

cberón@fiba.org.ar
leomdn@gmail.com
nlazarte@fiba.org.ar
rociolopez@fiba.org.ar

Una alternativa al uso de insecticidas sintéticos para el control de poblaciones de mosquitos vectores de diversas enfermedades lo constituyen algunos grupos de bacterias. Entre ellas, las bacterias entomopatógenas, tales como *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Goldberg y Margalith (Bti) y *Lysinibacillus sphaericus* (Meyer y Neide) han sido las más estudiadas y son ampliamente utilizadas en los programas de control de estos vectores. Estas bacterias son específicamente tóxicas contra espe-

cies de las familias Culicidae y Simuliidae a partir de dosis relativamente bajas cuando son ingeridas por estadios larvales de insectos susceptibles, y a partir de ellas se han diseñado diferentes productos formulados, disponibles comercialmente para su uso tanto doméstico como a mayor escala. Existen algunos reportes sobre algunas otras especies bacterianas que han presentado cierta toxicidad contra algunas especies de mosquitos; sin embargo, la información es escasa. Por otro lado, *Wolbachia pipientis* Hertig, α -proteobacteria, endosimbionte obligatoria, identificada originariamente en ovarios de mosquitos del género *Culex*, tiene la capacidad de manipular la sexualidad y/o la reproducción de los insectos, por lo que se está estudiando como posible agente de control de poblaciones de mosquitos. Adicionalmente, a nivel mundial se está analizando la posibilidad de manipular la microbiota presente en los sistemas digestivos de mosquitos ya sea para incorporar moléculas tóxicas contra los mismos, o para la eliminación de aquellos microorganismos indispensables para la digestión de nutrientes necesarios para el desarrollo del insecto. En este capítulo se analizan las características principales de cada uno de estos grupos bacterianos exclusivamente para su aplicación en el manejo de poblaciones de mosquitos.

Bacterias Entomopatógenas: *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis Berliner comprende un grupo de bacterias aeróbicas, Gram positivas formadoras de esporas y capaces de formar cristales de naturaleza proteica durante la esporulación, en la fase estacionaria de su ciclo celular (Fig. 1). La formación de esta inclusión cristalina, llamada cristal o cuerpo paraesporal, constituye la principal diferencia fenotípica de esta bacteria con respecto a otras espe-

cies del género *Bacillus*. Fue caracterizada inicialmente como patógena de insectos del orden Lepidoptera, aunque posteriormente se demostró su toxicidad contra insectos de otros ordenes como Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, y otros, así como de nematodos, ácaros y otros invertebrados (Vega y Kaya, 2012; Adang *et al.*, 2014).

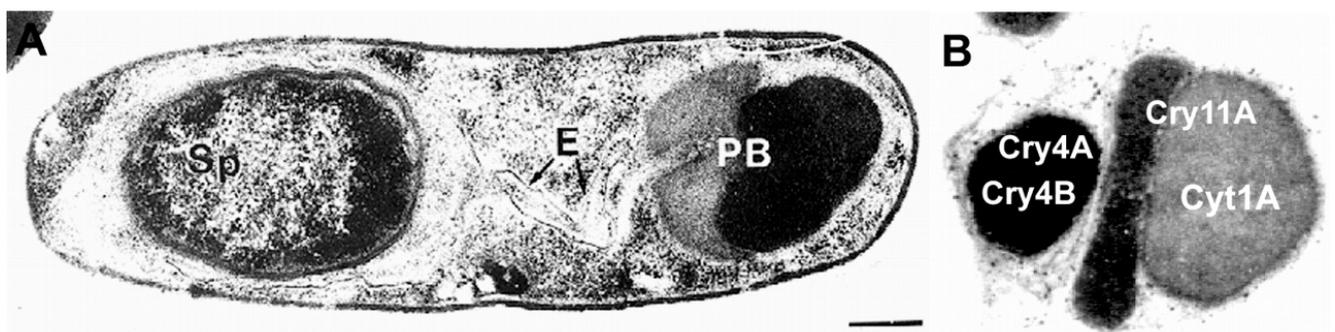


Figura 1. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Cortesía del Dr. Brian Federici, Universidad de California, Riverside, USA. A) Esporangio, Sp: espora, PB: cuerpo paraesporal, E: exosporio. B) Detalle de las proteínas Cry que componen el cuerpo paraesporal.

En particular, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, aislada en 1976 en el desierto de Negev en Israel, fue la primera subespecie de esta bacteria que demostró presentar actividad tóxica contra larvas de dípteros (Federici *et al.*, 2010), a pesar de que han sido aisladas otras subespecies mosquitocidas tales como *B. thuringiensis* subsp. *medellin* (Orduz *et al.*, 1992), *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* (Kawalek *et al.*, 1995), *B. thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* (Yu *et al.*, 1991) y otras que no han sido desarrolladas para su uso comercial.

Bti posee ocho plásmidos entre los que se encuentra un megaplásmido de aproximadamente 128 Kb denominado pBtoxis, que ha sido completamente secuenciado y donde se localizan los genes codificantes de las proteínas (o δ -endotoxinas) que

forman el complejo cuerpo paraesporal (Berry *et al.*, 2002). Estos genes se expresan comúnmente en la fase estacionaria del ciclo celular de la bacteria, siendo dependientes de la esporulación y sus productos son acumulados en la célula madre formando una inclusión cristalina que representa entre el 20 al 30 % del peso seco de un cultivo esporulado. El cristal de Bti está formado por cuatro proteínas Cry (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cry10Aa); dos proteínas citolíticas, también llamadas Cyt (Cyt1Aa y Cyt2Ba) y algunas otras proteínas vinculadas con la toxicidad, la formación y mantenimiento de la estructura del cristal y en la mejora de la viabilidad celular. La mayor parte de estas proteínas actúan a nivel del intestino medio, cuando el cristal ingresa al sistema digestivo del insecto (Berry *et al.*, 2002; Ben-Dov, 2014).

Genes *cry*

La primer secuencia nucleotídica determinada para un gen *cry* fue publicada en 1985, a partir de DNA de la cepa HD1 de la subespecie *kurstaki* (Vega y Kaya, 2012). Höfte y Whiteley (1989) presentaron un sistema de nomenclatura basado en homologías de

secuencias y espectro de acción insecticida de las proteínas codificadas por los genes *cry* (Tabla 1). Sin embargo, este criterio de clasificación presentó algunos inconvenientes ya que no existe una relación simple entre secuencia y espectro insecticida.

Tabla 1. Clasificación de las proteínas Cry según Höfte y Whiteley (1989).

Proteína	Morfología del cristal	Taxones blanco con actividad tóxica demostrada
CryI	Bipiramidal	Lepidoptera
CryII	Cúbico	Diptera - Lepidoptera
CryIII	Romboidal	Coleoptera
CryIV	Amorfo	Lepidoptera
CryV	Amorfo	Coleoptera
CryVI	Alargado	Nematodo

Para solucionar este problema, Crickmore *et al.* (1998), introdujeron un nuevo sistema de nomenclatura basado en las secuencias completas deducidas de aminoácidos de las proteínas cristal, obtenidas a partir de las secuencias nucleotídicas determinadas por medio de la secuenciación de sus genes correspondientes. Inicialmente el sistema clasificó 169 secuencias en 28 clases Cry y 2 clases Cyt, en base a un árbol filogenético. El nombre de cada toxina está caracterizado por 4 rangos dependiendo de su posición en la filogenia, por ejemplo Cry1Aa1

(Crickmore *et al.*, 1998). Como resultado de los programas de selección de nuevas cepas de *B. thuringiensis* se ha logrado secuenciar nuevos genes codificantes de toxinas insecticidas, confirmando claramente que las proteínas cristal se agrupan en forma independiente de otro tipo de toxinas, como las Cyt y, dentro de esa agrupación, se dividen en grupos con homologías diferentes. Actualmente la base de secuencias cuenta con más de 750 genes *cry* agrupados en 74 tipos diferentes (Crickmore *et al.*, 2014).

Proteínas Cry

Los distintos tipos de proteínas Cry son secuencialmente muy diferentes, a pesar de ello cuando se las compara por medio de alineamientos

de sus secuencias aminoacídicas se puede detectar la presencia de cinco bloques de secuencias conservadas en la mayoría de ellas (Adang *et al.*, 2014) y

tanto su estructura tridimensional como su modo de acción es sumamente similar; aun así, son extremadamente específicas en cuanto a su toxicidad. En la

Tabla 2 se detallan las toxinas Cry con actividad mosquitocida que se conocen hasta la fecha.

Tabla 2. Toxinas Cry con actividad tóxica contra mosquitos.

Toxina	Subespecie y/o Cepa	Especie blanco con actividad tóxica demostrada						
		<i>Aedes aegypti</i> ^a	<i>Anopheles albimanus</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	<i>Anopheles stephensi</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i> ^a	<i>Culex pipiens</i> ^a
Cry1Ab7	Bt <i>aizawai</i> Ic1	*						
Cry1Ca2	Bt <i>aizawai</i> 7.29	*		*			*	
Cry2Aa1	Bt <i>kurstaki</i> HD-1	*			*		*	
Cry2Aa2	Bt <i>kurstaki</i> HD-1	*				*		
Cry2Aa4	Bt <i>kenyae</i> HD-549	*				*	*	
Cry2Ab1	Bt <i>kurstaki</i> HD1	*		*				
Cry4Aa1	Bt <i>israelensis</i>	*		*		*	*	
Cry4Ba1	Bt <i>israelensis</i> 4Q2-72	*		*		*	*	*
Cry4Ba2	Bt <i>israelensis</i>	*						
Cry4Cb1	Bt HS18-1	*						
Cry10Aa1	Bt <i>israelensis</i>	*						
Cry11Aa1	Bt <i>israelensis</i> ONR-60A	*						
Cry10Aa2	Bt <i>israelensis</i>	*	*			*	*	*
Cry11Ba1	Bt <i>jegathesan</i> 367	*	*			*	*	*
Cry11Bb1	Bt <i>medellin</i>	*	*			*		
Cry16Aa1	Cb <i>malaysia</i> Ch18	*				*	*	
Cry19Aa	Bt <i>jegathesan</i> 367	*				*	*	
Cry19Ba1	Bt <i>higo</i>					*	*	
Cry20Aa1	Bt <i>fukuokaensis</i>	*						
Cry24Ca1	Bt FCC-41	*						
Cry27Aa1	Bt <i>higo</i>					*		
Cry30Fa1	Bt Mc28	*						
Cry30Ga1	Bt HS18-1	*						
Cry32Ba1	Bt	*						
Cry32Ca1	Bt	*						
Cry32Da1	Bt	*						
Cry39Aa1	Bt <i>aizawai</i>					*	*	
Cry44Aa1	Bt <i>entomocidus</i> INA288	*				*		*
Cry48Aa1+Cry49Aa1	Ls IAB59	*				*		
Cry52Ba1	Bt BM59-2	*						
Cry54Aa1	Bt BtMc28	*						
Cry56Aa1	Bt Ywc2-8	*						
Cry69Aa1	Bt <i>sichuansis</i> Mc28					*		

a: Especies presentes en Argentina.

Existen dos grupos de estas proteínas, uno formado por moléculas de alta masa molecular relativa (M_r), como las Cry4, Cry10 y otras, de alrededor de 170 kDa que poseen una región C-terminal conservada, de aproximadamente la mitad de la secuencia completa y que participa en la formación de la estructura tridimensional a través de enlaces disulfuro inter

e intramoleculares. A su vez, estos enlaces disulfuro son responsables de la solubilización de estas proteínas a pHs altamente alcalinos. Las proteínas Cry de baja M_r , tales como las Cry11 de Bti o Cry2, Cry19 y otras de diversas subespecies son de alrededor de 70 kDa, no poseen el dominio C-terminal y por lo tanto requieren asistencia durante el proceso de cris-

talización. De manera tal que por ejemplo, la protoxina Cry11Aa se organiza en un operón con las proteínas adicionales P19 y P20 que juegan un papel fundamental en la promoción de la formación del cristal y la mejora de la viabilidad celular, probablemente actuando como chaperonas (Berry *et al.*, 2002; Ben-Dov, 2014).

El nivel de toxicidad de las protoxinas Cry dependerá directamente de la capacidad del insecto blanco de activarlas a través del clivado por medio de proteasas presentes en el intestino medio. La estructura tridimensional de una proteína Cry activa (Cry3A) fue determinado por primera vez por medio de cristalografía por rayos X por Li *et al.* (1991) a partir de *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, determinando la

presencia de tres dominios. Esta estructura básica ha sido descrita también para las proteínas Cry4A y Cry4B (Boonserm *et al.*, 2005; 2006), así como para otras toxinas de esta familia. El dominio I, de la región N-terminal, está compuesto por siete α -hélices, de las cuales una de ellas se encuentra completamente rodeada de las otras seis. El dominio II, está formado por tres láminas β antiparalelas que rodean un centro hidrofóbico y tres bucles (*loops*) que exponen sus superficies en la región de los vértices, estas regiones expuestas de la toxina serían responsables de la unión al receptor presente en el insecto blanco. El dominio III está formado por dos láminas antiparalelas (Fig. 2).

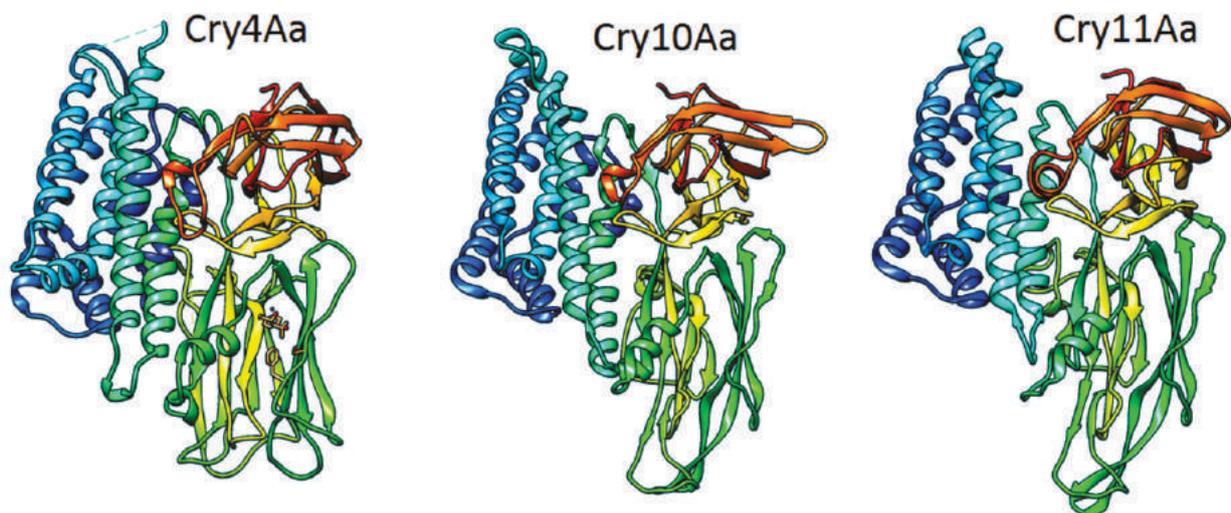


Figura 2. Estructura tridimensional de proteínas Cry. Proteína cristalizada Cry4Aa (PDB: 2C9K). Cry10Aa y Cry11Aa modelado teórico obtenido por medio del programa Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015). Visualizados en UCSF Chymera (Pettersen *et al.*, 2004).

Basándose en la estructura de tres dominios de las proteínas Cry1Aa y Cry3A se ha sugerido que las hélices del dominio I serían responsables de la formación del poro en la membrana intestinal por analogía con la estructura principal en la formación de poros de membrana en las toxinas de difteria y colicina A. El dominio II cumpliría una función importante en la unión al receptor y el dominio III jugaría un papel crítico en la integridad estructural de la toxina, así como también estaría involucrada en la unión al receptor y a la formación del poro (de Maagd *et al.*, 2003). Investigaciones recientes indican que los poros formados por las toxinas de *B. thuringiensis* son el resultado del ensamble de moléculas de toxina agrupadas con una estequiometría constante, al menos bajo condiciones experimentales determinadas. Estas estructuras oligoméricas se formarían después de la unión al receptor y antes de la inserción a la membrana y esto ocurriría de forma similar en las distintas toxinas Cry a pesar de la baja similitud

de sus secuencias (Likitvivatanavong *et al.*, 2006; Adang *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que las toxinas activas Cry4 y Cry11A se unen a las regiones apicales de las microvellosidades de las células del intestino medio, así como en los ciegos gástricos y en la región posterior del estómago en larvas de *Anopheles (Cellia) gambiae* Giles, estas toxinas así como la proteína activa Cry4Aa se unen también a las microvellosidades de las células del intestino medio de *Aedes aegypti*. En particular, la actividad mosquitocida específica de las toxinas activadas Cry4Aa y Cry4Ba estaría asociada a las diferencias estructurales tanto de sus dominios II como de los diferentes sitios de unión en los receptores del insecto blanco, de manera tal que los *loops* 2 y 3 de Cry4Aa serían los responsables de la toxicidad contra especies de los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, mientras que los *loops* 1 y 2 de la toxicidad de Cry4Ba contra *Anopheles* y *Aedes* (Ben-Dov, 2014). Se ha observado que la unión de la

toxina Cry4Aa al receptor difiere de otras proteínas Cry ya que contiene múltiples subsitios distribuidos en los dominios II y III que cooperan en esta unión. Por otro lado, se cree que tanto la toxina Cry4Aa como la Cry4Ba forman estructuras triméricas tanto en soluciones acuosas como en monocapas lipídicas, lo que facilitaría la inserción de las α -hélices del domi-

nio I en la membrana de las células intestinales del insecto. Cry4Ba activada proteolíticamente *in vitro* también puede formar oligómeros preporeo con capacidad de perforar y formar canales iónicos estables incluso sin el apoyo de los receptores (Boonserm *et al.*, 2005; 2006). La estructura tridimensional de Cry11Aa aún no se conoce.

Modo de acción de las proteínas Cry

El modo de acción de las proteínas cristal ha sido estudiado principalmente en la proteína del tipo Cry1A. Basándose en los datos disponibles se puede presentar el siguiente modelo como patrón de toxicidad general, también conocido como Modelo Clásico: ingestión de cristales por un insecto susceptible; disolución de los cristales y liberación de la protoxina; activación proteolítica de la protoxina resultando un fragmento tóxico resistente a proteasas; pasaje de este fragmento tóxico activo a través de la membrana peritrófica en el intestino del insecto; unión de la toxina a una proteína de unión específica (el receptor), presente en las células epiteliales de las microvellosidades del intestino medio; formación de oligómeros por parte de toxinas activas; inserción de las toxinas o parte de ellas dentro de la membrana celular; formación de canales iónicos; colapso del potencial transmembrana y lisis osmótica de las células, finalizando con la muerte del insecto (Adang *et al.*, 2014). La alcalinidad y la presencia de agentes reductores presentes en el intestino medio de larvas susceptibles son los factores principales que contribuyen a la solubilización del cristal. La capacidad de solubilizar proteínas Cry a distintos pHs es una de las determinantes de la especificidad de acción de algunas toxinas. En el caso particular de la protoxinas mosquitocidas, el proceso de activación difiere del modelo descrito para toxinas activas contra lepidópteros, como Cry1A, ya que por ejemplo en el caso particular de la protoxina de 70 kDa Cry11Aa, la activación proteolítica implica la eliminación de 28 residuos del extremo N-terminal y en una etapa posterior el clivado de la molécula dando como resultado dos fragmentos de 34 y 32 kDa, estos fragmentos son tóxicos únicamente si se mantienen asociados. Algo similar ocurre con la protoxina de 130 kDa Cry4Ba, que como resultado de la activación proteolítica, además de la eliminación de los fragmentos N- y C-terminal, produce dos fragmentos de 46 y 18 kDa (Bravo *et al.*, 2007) que serían esencia-

les para la actividad tóxica contra larvas de *Culex pipiens* y *Culex quinquefasciatus*.

El proceso descrito anteriormente es el más reconocido y difundido; sin embargo, los mecanismos por los cuales ocurre la unión a la membrana intestinal, la formación del oligómero y la formación del poro aún se encuentran en discusión. Uno de los modelos más aceptados actualmente es el Modelo de Unión Secuencial, que propone una compleja secuencia de eventos que involucra múltiples receptores para explicar la formación de poros en la membrana intestinal. De manera tal, que la toxina Cry activa se uniría a receptores (una aminopeptidasa N [APN] o una fosfatasa alcalina [ALP]), que se encuentran anclados en la membrana intestinal a través de un grupo glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Posteriormente, una vez que los monómeros de la toxina interactúan con el receptor GPI, los mismos son transferidos a un receptor tipo cadherina que promueve una proteólisis adicional del extremo amino terminal. Finalmente, este complejo interactuaría con el receptor GPI-APN produciendo la inserción a la membrana y la formación del poro, con la consecuente formación de canales iónicos (Ben-Dov, 2014).

Por otro lado, Zhang *et al.* (2006) ha propuesto el Modelo de Vía de Señalización, que cuestiona la secuencia de los eventos descritos anteriormente sugiriendo que la formación de poros no jugaría un papel esencial, sino que los monómeros de las toxinas Cry interactuarían con el receptor cadherina que estaría acoplado a una vía de señalización dependiente de iones Mg^{+2} que activarían una vía de señalización intracelular. Esta combinación de factores llevaría a la muerte celular. Adicionalmente se ha propuesto que el modo de acción de estas toxinas involucraría en realidad a una combinación de los dos modelos detallados anteriormente (Adang *et al.*, 2014). Los modelos propuestos se resumen en la Fig. 3.

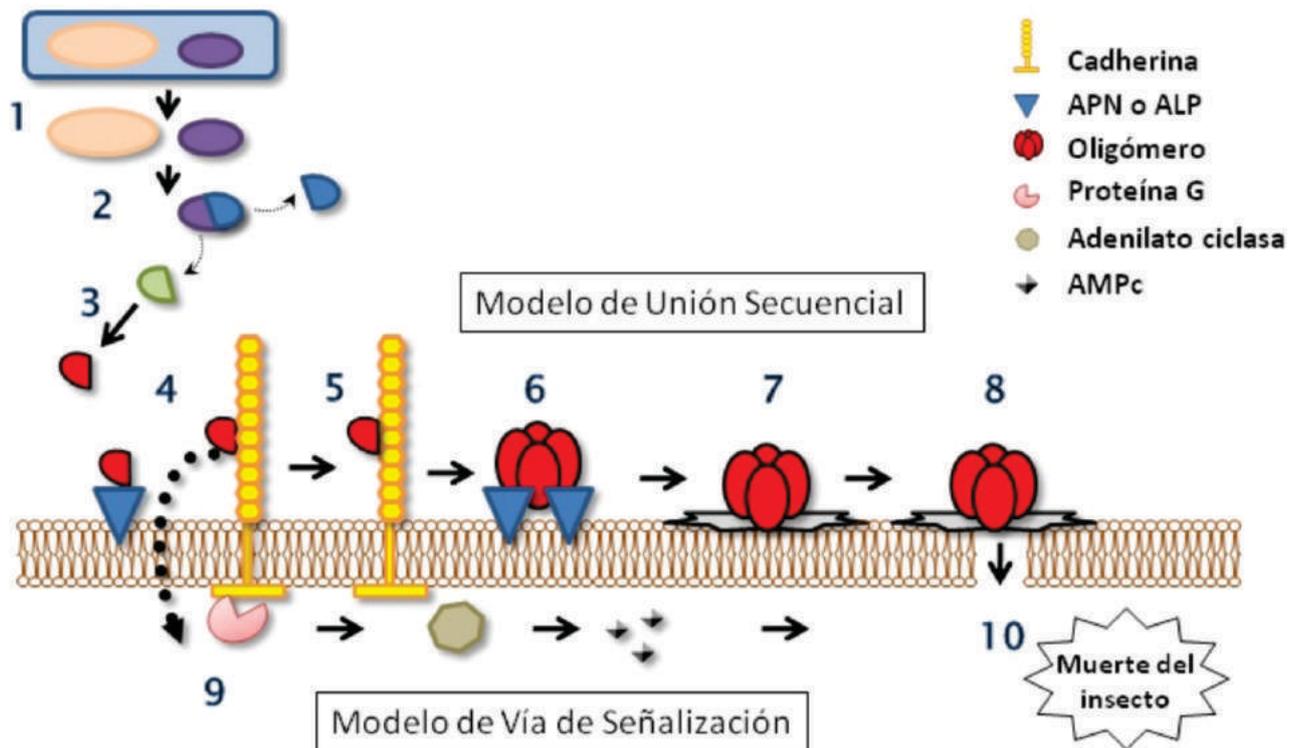


Figura 3. Modo de acción de las proteínas Cry. 1) Separación del complejo espora cristal. 2) Solubilización de los cristales (en violeta) y liberación de la protoxina (en verde). 3) Activación proteolítica de la protoxina (en rojo) resultando un fragmento tóxico resistente a proteasas. 4) Esta toxina activa puede iniciar su acción según el Modelo de Unión Secuencial, donde se produce la unión a un receptor específico aminopeptidasa N (APN), fosfatasa alcalina (ALP) o cadherina. 5) La unión al receptor cadherina inicia la formación de la estructura prepore (oligómeros). 6) Unión a receptor aminopeptidasa (como GPI-APN o GPI-ALP) que promueve la inserción de las toxinas o parte de ellas dentro de la membrana celular. 7) Inserción del oligómero en la membrana plasmática. 8) Formación de canales iónicos con el consiguiente colapso del potencial transmembrana y lisis osmótica de las células. 9) Por otro lado, el Modelo de vía de señalización propone que la toxina activa al unirse al receptor cadherina (paso 4) resulta en la activación intracelular de la proteína G y de otros factores como la adenilato ciclasa y AMPc (adenosín monofosfato cíclico) en una cascada de señalización dependiente de iones Mg^{+} . 10) Ambos modelos finalizan con la muerte del insecto (Adaptado de Soberón *et al.*, 2012; Pardo-Lopez *et al.*, 2013; Adang *et al.*, 2014).

Receptores de proteínas Cry

Existen numerosos trabajos sobre la naturaleza del sitio de unión de las proteínas Cry en intestinos de muchos insectos, de manera tal que se han podido identificar diferentes tipos de moléculas como proteínas de unión o receptores. Particularmente en mosquitos, se ha demostrado que proteínas tipo APN y ALP, ancladas a moléculas de GPI presentes en las membranas de las células epiteliales del intestino medio de larvas de *Ae. aegypti* serían los receptores de Cry4Ba (Adang *et al.*, 2014; Ben-Dov, 2014), también se han detectado α -amilasas como sitios de unión en las vesículas de las microvellosidades de las células del intestino medio de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Fernández-Luna *et al.*, 2010) y recientemente se ha descrito una proteína tipo cadherina como molécula receptora en *An. gambiae* (Adang *et al.*, 2014). Por otro lado, se han identificado como putativos receptores de Cry11Aa GPI-APN, GPI-ALP, cadherinas, α -amilasas y α -glucosidasas (Adang *et al.*, 2014; Ben-Dov, 2014).

Las APNs y ALPs son enzimas ubicuas en intestinos, se encuentran unidas a las membranas de las células epiteliales por medio de un ancla de GPI, y conjuntamente con otras enzimas, actúan en la digestión de proteínas derivadas de la dieta del insecto. Las α -amilasas y las α -glucosidasas son enzimas digestivas que catalizan la hidrólisis de almidón y la hidrólisis de enlaces glucosídicos respectivamente. Tanto las APNs y ALPs como las α -amilasas funcionan como moléculas de unión a proteínas Cry de una gran variedad de insectos (Likitvivatanavong *et al.*, 2011). Por otro lado, las cadherinas son una familia de proteínas de adhesión célula-célula, calcio-dependientes, importantes para la diferenciación y la estructura de tejidos. Son glicoproteínas transmembrana con distribución específica en los tejidos. Las primeras investigaciones realizadas por Francis y Bulla (1997) demostraron que las proteínas Bt-R1 tipo cadherinas de *Manduca sexta* (Linnaeus) se unen a proteínas Cry1Aa, Cry1Ab

y Cry1Ac, sin lograr determinar su función. Posteriormente fue sugerido que las proteínas Bt-R1 tipo cadherinas inducen cambios en la conformación de Cry1Ab que permitiría la formación de un oligómero proteico tóxico prepore (Gómez *et al.*, 2002). Recientemente también se ha demostrado que son proteínas de unión a toxinas Cry mosquitocidas (Likitvivanavong *et al.*, 2011).

La principal amenaza para el uso de toxinas Cry en el control de poblaciones de insectos es la aparición de resistencia por parte de los mismos, se ha demostrado que el mecanismo de emergencia de

la resistencia está dado principalmente por la alteración de los sitios de unión a las toxinas Cry, en las membranas de las células intestinales de las larvas de los insectos susceptibles (Ferré y Van Rie, 2002). Experimentos en sistemas *in vitro* han indicado en muchos casos la correlación entre la afinidad de unión de la toxina y la actividad insecticida, determinando que una alta toxicidad se corresponde con más cantidad de sitios de unión y mayor afinidad, y lo contrario para toxinas menos activas (de Maagd *et al.*, 2003).

Proteínas Cyt

Hasta el momento solo se ha determinado la estructura de las toxinas Cyt1Aa, Cyt2Aa y Cyt2Ba que presentan topología similar, están formadas por un dominio α - β simple compuesto por dos capas exteriores de α -hélices que rodean láminas β (Fig. 4). Estas proteínas son sintetizadas por la bacteria

también como protoxinas que deben ser solubilizadas en el intestino del insecto y proteolíticamente activadas por las proteasas presentes en el intestino medio, produciendo entonces la toxina activa de 25 kDa. En la Tabla 3 se detallan las toxinas Cyt con actividad mosquitocida descritas hasta la fecha.

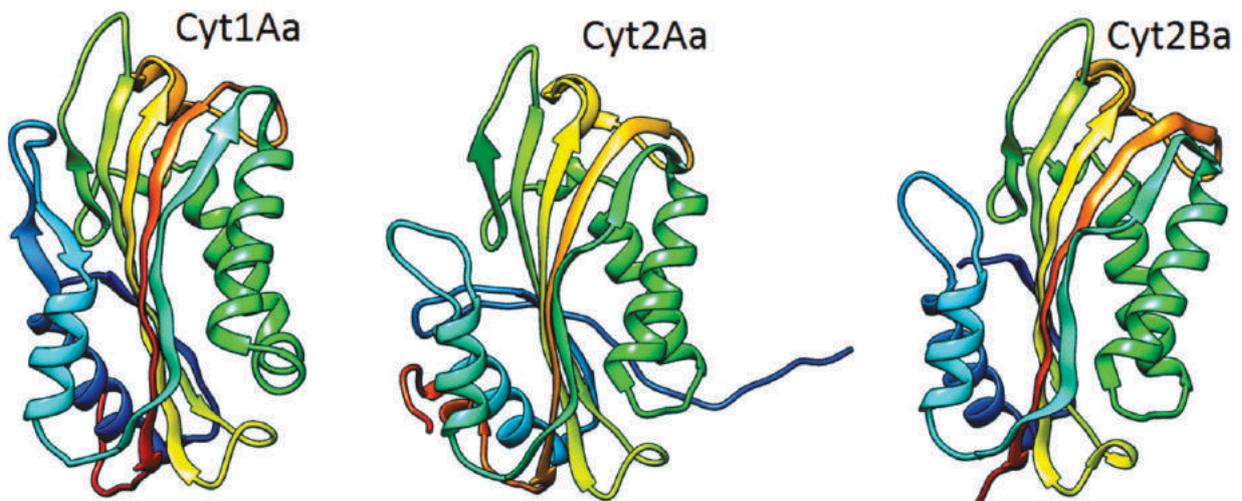


Figura 4. Estructura tridimensional de las proteínas cristalizadas Cyt1Aa (PDB: 3RON), Cyt2Aa (PDB: 1CBY) y Cyt2Ba (PDB: 2RCI). Visualizados en UCSF Chymera (Pettersen *et al.*, 2004).

Las toxinas Cyt activas tienen actividad insecticida *in vivo* y actividad citolítica *in vitro* contra diversos cultivos celulares, también producen hemólisis de eritrocitos. Con excepción de la toxina Cyt1Ca, cuya toxicidad aún no se ha determinado, las toxinas Cyt tienen un importante rol en la actividad tóxica de las subespecies mosquitocidas de *B. thuringiensis*,

ya que presentan sinergia con algunas toxinas Cry. Por otro lado, se ha demostrado que la proteína Cyt1Aa es capaz de revertir la resistencia contra toxinas como Cry4 o Cry11 por parte de poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* resistentes seleccionadas en laboratorio (Wirth, 2010).

Modo de acción de toxinas Cyt

A diferencia de lo que ocurre con las proteínas Cry, las toxinas Cyt no se unen a receptores específicos, sino que tienen una fuerte afinidad de unión a los ácidos grasos insaturados que componen la membrana de las células epiteliales del intestino medio de dípteros. Se cree que la cantidad de fosfolípidos insaturados presentes en algunas espe-

cies de este orden de insectos, mucho mayor que en otros grupos, podría ser la razón para que las toxinas Cyt tengan una mayor afinidad con las células intestinales de mosquitos *in vivo*. Esto implica un modo específico de acción diferente al de las toxinas Cry, que aún está en discusión (Ben-Dov, 2014).

Tabla 3. Toxinas Cyt con actividad tóxica contra mosquitos.

Toxina	Subespecie y/o Cepa	Especie blanco con actividad tóxica demostrada				
		<i>Aedes aegypti</i> ^a	<i>Anopheles gambiae</i>	<i>Anopheles stephensi</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i> ^a	<i>Culex pipiens</i> ^a
Cyt1Aa1	<i>Bt israelensis</i>	*		*	*	*
Cyt1Aa2	<i>Bt israelensis</i>	*	*			*
Cyt1Aa4	<i>Bt morrisoni</i> Pg14	*			*	
Cyt1Ab1	<i>Bt medellin</i>	*		*		*
Cyt2Aa1	<i>Bt kyushuensis</i>	*	*			*
Cyt2Aa2	<i>Bt darmstadiensis</i> 73E10	*			*	
Cyt2Ba1	<i>Bt israelensis</i> 4Q2	*		*	*	*
Cyt2Bc1	<i>Bt medellin</i>	*		*	*	*

a: Especies presentes en Argentina.

Para describir el modo de acción de las toxinas Cyt se han propuesto dos modelos diferentes, que no serían excluyentes uno del otro. Por un lado se encuentra el modelo que plantea que la toxina, previamente activada por proteasas intestinales, se uniría a la membrana de la célula intestinal como un monómero que sufriría cambios posteriores en su conformación. Como resultado de ello, la región C-terminal se insertaría en la membrana, mientras que la región N-terminal quedaría expuesta al exterior de

la misma. La oligomerización de las moléculas en la superficie de la membrana y la posterior penetración en ella daría como consecuencia la producción de poros en la misma, dando como resultado la disrupción celular. Por otro lado, de acuerdo al modelo de mecanismo de ruptura de la membrana tipo detergente, la toxina Cyt se adsorbería sobre la superficie de la membrana celular en forma de agregados provocando la inestabilidad en el embalaje de los lípidos que la componen (Soberón *et al.*, 2013).

Sinergismo entre toxinas Cry y Cyt

Las distintas proteínas mosquitocidas difieren tanto en su nivel de actividad como en su especificidad contra las distintas especies de mosquitos, por ejemplo, las toxinas Cry4Aa y Cyt1Aa presentan mayor toxicidad contra especies del género *Culex* que contra *Aedes*, o a la inversa como ocurre con las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa. Ensayos realizados en condiciones de laboratorio han demostrado que diferentes combinaciones de toxinas expresados en una bacteria recombinante pueden tener efectos sinérgicos (Federici *et al.*, 2007; Elleuch *et al.*, 2015).

Esto también ocurre si se combinan toxinas de una cepa de *L. sphaericus* (Ls) con la proteína Cyt1Aa de Bti contra mosquitos-Ls resistentes, recuperando de esta manera la actividad mosquitocida (Federici *et al.*, 2007; Wirth, 2010). Trabajos recientes han confirmado que cuando Cyt1Aa se introduce en la membrana celular sufre cambios en su conformación dando como resultado una alta afinidad con la toxina Cry11Aa actuando como receptor, promoviendo la oligomerización de la misma y aumentando su actividad tóxica (Cantón *et al.*, 2014). Por otra parte,

estudios sobre elementos regulatorios involucrados en la síntesis de toxinas, permitieron demostrar que

se puede manipular Bti y aumentar significativamente la expresión de sus toxinas (Federici *et al.*, 2010).

Formulados comerciales a base de *B. thuringiensis*

Los productos basados en *B. thuringiensis* han sido empleados desde 1933, siendo Francia el primer país en comercializarlo a partir de 1938. Sin embargo, su uso comercial no fue exitoso hasta la década de los '50, cuando se desarrolló la nueva tecnología de la fermentación en cultivo líquido sumergido en condiciones aeróbicas, para producir preparaciones a base de complejo espora-cristal. Las primeras formulaciones disponibles para pruebas a campo en el mercado en los EEUU datan de 1958, y ya en 1961 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* se empleaba como bioinsecticida para el control de lepidópteros susceptibles. Para mediados de los años '70 el mercado estaba dominado por la cepa HD-1, y se asumía que los lepidópteros eran los únicos insectos blanco al ataque de esta bacteria. A partir de los descubrimientos, en 1976, de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, tóxica contra larvas de mosquitos y simúlidos, y de *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, en 1983, tóxica contra algunos ordenes de coleópteros, se abrieron nuevos mercados y aumentó considerablemente el interés por obtener nuevos aislamientos de la bacteria que permitan el aumento del espectro de acción (Vega y Kaya, 2012).

En la actualidad la única subespecie de *B. thuringiensis* con actividad mosquitocida que se utiliza en forma comercial es la subespecie *israelensis* (Vega y Kaya, 2012). Los productos basados en esta bacteria son formulados del complejo espora-cristal, generalmente presentados como líquidos concentrados que deben ser resuspendidos en agua, gránulos dispersables o anillos de liberación constante que flotan en los cuerpos de agua. Los formulados comerciales a base de esta bacteria presentan como desventajas que tienen una vida media corta debido a la inactivación de las toxinas por acción de las condiciones ambientales adversas, tales como alta temperatura o exposición a radiación ultravioleta, las partículas se pueden hundir hasta el fondo del cuerpo de agua donde es aplicado, o pueden ser adsorbidas sobre las partículas de limo y materia orgánica y en consecuencia aumentar su tamaño de tal forma que no puedan ser ingeridos por larvas de mosquitos, también pueden ser consumidas por otros organis-

mos no blanco (Ben-Dov, 2014). Para superar algunos de estos inconvenientes se han desarrollado algunas investigaciones dirigidas a la generación de organismos genéticamente modificados, en los que han sido introducidos algunos genes *cry* o *cyt* individualmente o combinados en varias especies de bacterias y otros microorganismos, pero no han tenido éxito comercial. En particular y solo para mencionar un ejemplo, se han obtenido cianobacterias modelo, genéticamente modificadas, que expresan toxinas de tipo Cry4 y Cry11 (Khasdan *et al.*, 2003; Ketseoglou y Bouwer, 2012). Algunas de ellas han sido patentadas en EEUU en los años 90 (<http://www.patentstorm.us/patents/6503500-claims.html>). Recientemente se han realizado algunos trabajos en los que se han aislado cianobacterias de vida libre capaces de sobrevivir en ambientes naturales, y que a su vez son alimento de las larvas de mosquitos (Zaritsky *et al.*, 2010), brindando de esta manera estabilidad a la toxina expresada intracelularmente.

En la actualidad el mercado mundial de los plaguicidas está dominado por productos químicos sintéticos muy por encima de los productos biológicos; sin embargo, existen consideraciones ambientales y de seguridad que favorecen el desarrollo futuro de los productos biológicos. Se encuentra ampliamente demostrado que *B. thuringiensis* no es patógena para mamíferos, aves, anfibios ni reptiles, y que son altamente específicos contra los invertebrados susceptibles. El modo de acción de las proteínas Cry y Cyt difieren completamente del modo de acción de los productos convencionales, y esto hace que sean componentes clave dentro de las estrategias de manejo integrado de plagas dirigido hacia la preservación de los enemigos naturales y del manejo de resistencias a los insecticidas químicos por parte de los insectos vectores. Por otro lado, la degradación de estas toxinas en la naturaleza, que puede ser analizado como desventajoso en cuanto a su aplicación, también representa una ventaja en cuanto al efecto residual de estos productos en el ambiente, sobre todo si se compara con el tiempo necesario para la degradación de muchos pesticidas químicos.

Bacterias Entomopatógenas: *Lysinibacillus sphaericus*

Bacillus sphaericus Meyer y Neide fue renombrada en 2007 como *L. sphaericus* (Ahmed et al., 2007) en base a características fenotípicas, como la composición de su pared celular, que incluye la presencia de peptidoglicanos que contienen lisina y ácido aspártico. Son bacilos móviles, incapaces de fermentar azúcares, producen endosporas elipsoidales o esféricas ubicadas en el extremo terminal de la

célula otorgándole al esporangio una forma característica (Fig. 5). Alrededor de los años 60 Kellen et al. (1965) describieron cepas de esta bacteria como posibles patógenos de insectos; sin embargo, recién en 1973 fueron aisladas cepas altamente tóxicas con potencialidad para ser usadas en los programas de control de insectos vectores (Singer, 1973).

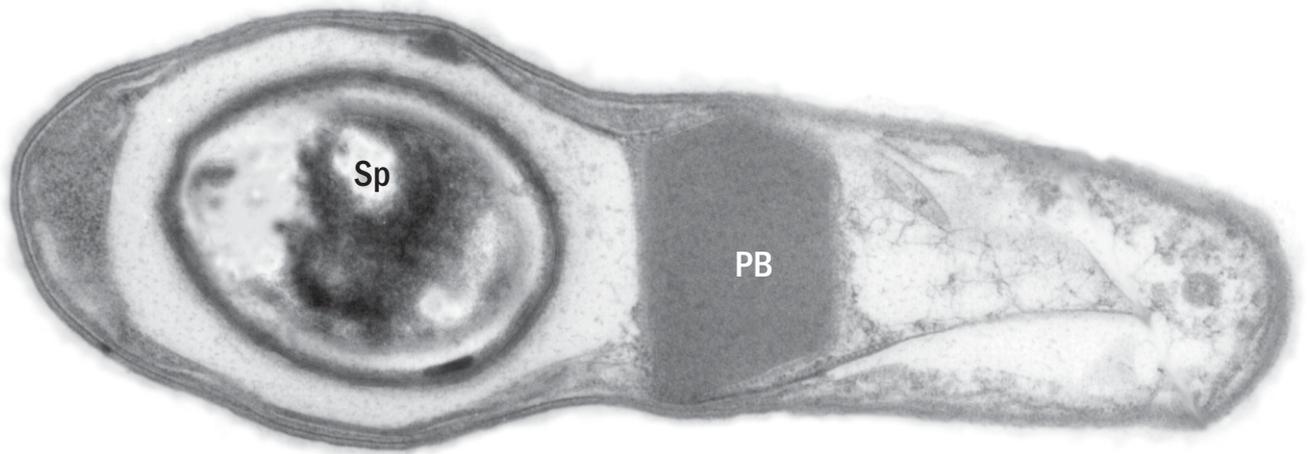


Figura 5. Esporangio de *Lysinibacillus sphaericus*, cepa 2297. Cortesía del Dr. Jean-François Charles, Instituto Pasteur, París. Sp: espora, PB: cuerpo paraesporal.

Las cepas de esta especie bacteriana se pueden dividir en cinco grupos de homología de acuerdo a sus secuencias nucleotídicas (I a V), a su vez el grupo II se divide en los subgrupos IIA y IIB (Krych et al., 1980). Los bajos porcentajes de identidad entre grupos sugieren que cada uno de ellos en realidad correspondería a una especie distinta; sin embargo, como aún no existen pruebas suficientes para diferenciarlos entre sí, estos grupos permanecen clasificados como miembros de la especie *L. sphaericus*. En particular, todas las cepas mosquitocidas pertenecen al grupo IIA aunque no todas las cepas que pertenecen a este grupo son patógenas de insectos. Son resistentes a antibióticos como cloranfenicol, estreptomycin y tetraciclina y utilizan arginina como una única fuente de carbono, estas características particulares han sido utilizadas para su aislamiento por medio del desarrollo de medios específicos enriquecidos (Yousten et al., 1985). Entre los sistemas de clasificación para diferenciar las cepas de *L. sphaericus* se han utilizado la serotipificación de antígenos flagelares y la fagotipificación. Las principales cepas utilizadas en forma comercial para el control de poblaciones de mosquitos son la

2362 y la C3-41 pertenecientes al serotipo H5a,5b (Berry, 2012).

Las cepas mosquitocidas de *L. sphaericus* producen diferentes toxinas, entre ellas las más estudiadas y específicamente tóxicas contra mosquitos son las Toxinas Mosquitocidas (Mtx) producidas durante el crecimiento vegetativo de la bacteria y la Toxina Binaria (Bin) producida durante el proceso de esporulación. A partir de la cepa SSII de baja toxicidad y de algunas otras de alta toxicidad se han identificado 4 toxinas Mtx: Mtx1 de 100 kDa, Mtx2 de 31.8 kDa, Mtx3 de 35.8 kDa y Mtx4 que aparentemente correspondería a un pseudogen (Berry, 2012). Entre ellas, la toxina Mtx1 ha sido la más estudiada, de manera tal que se ha determinado que el procesamiento proteolítico de Mtx1 por parte de enzimas digestivas, como tripsina o quimotripsina en el intestino de los mosquitos susceptibles produce un producto de 27 kDa que contiene secuencias ADP-ribosil transferasa, y un producto de 70 kDa con secuencias repetitivas y motivos similares a la lectina que podrían tener algún rol en la unión a grupos azúcar del ligando y, por tanto, en la determinación de la especificidad de la toxina. De acuerdo al

análisis de la estructura cristalina de esta toxina se ha demostrado la presencia de cuatro dominios ricina B-tipo lectina que rodean el dominio ADP-ribosil transferasa; sin embargo, no se conocen los sitios de unión a las células blanco. En particular, la cepa SSII de *L. sphaericus* es sumamente inestable en cuanto a su toxicidad, a pesar de que uno de sus componentes, la toxina recombinante purificada Mtx1, tiene un alto nivel de toxicidad contra larvas de *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti* con respecto a la toxina binaria purificada a partir de cepas de alta toxicidad (Carpusca et al., 2006). Por lo tanto, la baja toxicidad de esta cepa no se debería a una baja actividad específica de la toxina Mtx1, sino que podría deberse a la baja producción y/o a la inestabilidad de la toxina durante la esporulación. Por otro lado, se ha demostrado actividad tóxica sinérgica entre las toxinas Mtx1, Mtx2 y la proteína Cry11Aa de Bti expresadas en sistemas heterólogos (Wirth et al., 2007).

Con respecto a las toxinas Bin de alta actividad, producen la mortalidad de las larvas de los mosquitos susceptibles entre las 24 y 48 hs post ingestión, y de manera similar a lo que ocurre con las toxinas Cry y Cyt de *B. thuringiensis*, estas toxinas se acumulan como un cuerpo paraesporal cristalino formado por dos protoxinas pro-BinA y pro-BinB. Estas proteínas deben ser ingeridas por el insecto, el cristal se solubiliza gracias al pH alcalino presente en los fluidos intestinales, las protoxinas son clivadas proteolíticamente y las toxinas activas BinA y BinB se unen a células del epitelio intestinal. Hasta la fecha solo se han reportado la maltasa 1 de *Cx. pipiens* (CPM1) y su ortólogo la maltasa 3 de *An. gambiae* como moléculas receptoras. CPM1 y Agm3 son enzi-

mas digestivas que se encuentran ancladas a la membrana de las células intestinales mediante moléculas de GPI. Específicamente en larvas de *Cx. pipiens*, la unión de BinB a CPM1 provocaría la unión de BinA y posteriormente desencadenaría la actividad tóxica de esta proteína. A diferencia de lo que ocurre con las toxinas Cry, Bin no estaría asociado a la lisis de las membranas de las células epiteliales del intestino, sino a diferentes citopatologías de las cuales la aparición de vacuolas anormales con características de autolisosomas sería el mayor signo de intoxicación (Opota et al., 2011).

Se ha demostrado ampliamente que las toxinas Bin de *L. sphaericus* son capaces de producir resistencia en poblaciones de mosquitos sometidas a esta bacteria durante largos períodos de tiempo (Wirth, 2010). En estudios de aislamiento y caracterización de nuevas cepas con toxinas insecticidas diferentes, Jones et al. (2007) describieron una nueva toxina aislada a partir de la cepa IAB59 formada por dos componentes, uno de ellos la toxina de tres dominios Cry48 muy relacionada con las proteínas Cry de *B. thuringiensis*, el segundo componente es la proteína Cry49 que es un miembro de las toxinas de la familia Bin de *L. sphaericus*. Ninguno de los dos componentes tiene toxicidad en forma individual; sin embargo, el complejo purificado provoca un alto nivel de mortalidad de larvas del género *Culex*. Se ha determinado que este complejo produce cambios morfológicos en la célula blanco similares a los que ocurren durante la interacción sinérgica de las toxinas Bin y Cry11, pero la acción específica de cada componente aún no se ha determinado (de Melo et al., 2009).

Formulación y uso de *Lysinibacillus sphaericus* en programas de control de vectores

Al igual que *B. thuringiensis* esta bacteria está formulada como complejo espora-cristal y se ha producido comercialmente en diversos países, tales como Brasil, Cuba y EEUU. *L. sphaericus* persiste en los ambientes mayor tiempo que *B. thuringiensis*, tolera aguas con mayor polución y no se agrega con detritos orgánicos, se degrada por radiación UV y se sedimenta en los cuerpos de agua (Berry, 2012). Se recomienda el uso de estos formulados principalmente para el control de los géneros *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia* y *Psorophora*, también es efectivo para el control de *Aedimorphus vexans* (Meigen), *Georgecraigius atropalpus* (Coquillett), *Aedes* (*Ochlerotatus*) *fitchii* (Felt y Young), *Aedes* (*Ochlerotatus*) *intrudens* Dyar, *Aedes* (*Ochlerotatus*) *nigromaculis* (Ludlow), y *Aedes* (*Ochlerotatus*) *sti-*

mulans (Walker). En general no tiene actividad tóxica contra *Ae. aegypti* o muy poca contra la mayoría de las especies del género *Aedes*, ni contra especies de *Toxorhynchites*, cuyos estadios larvales son predadores de larvas de mosquitos (Lacey, 2007). Se ha reportado también que esta bacteria reduce la ovipostura y provoca la muerte de adultos de *Cx. quinquefasciatus* (Zahiri y Mulla, 2005), aunque el mecanismo por medio del cual esto ocurriría aún no se conoce. También se ha descrito que adultos de *Anopheles quadrimaculatus* Say tienen la capacidad disminuida de transmitir parásitos como *Plasmodium berghei* Vincke y Lips si sus larvas han sido expuestas a esporas de esta bacteria (Young et al., 1990).

Bacterias endosimbiontes: *Wolbachia pipientis*

Wolbachia pipientis (nombrada como *Wolbachia*) es una α -proteobacteria, identificada originariamente en ovarios de mosquitos del género *Culex* (Hertig y Wolbach, 1924). Esta bacteria, en la actualidad ha sido detectada en el 65 % de los insectos conocidos, algunos arácnidos, crustáceos de agua dulce y nematodos (Hilgenboecker *et al.*, 2008). Posee su genoma significativamente reducido y depende nutricionalmente de sus células hospedadoras (Wu *et al.*, 2004). Las células de esta bacteria se desarrollan dentro de estructuras vesiculares en el citoplasma de la célula del hospedador. Poco se conoce sobre la identidad de estas organelas pero aparentemente estarían limitadas a un grupo de vesículas relacionadas al complejo de Golgi cerca de la biogénesis de la membrana plasmática (Cho *et al.*, 2011). *Wolbachia* infecta principalmente las gónadas de su hospedador, donde se asegura la transmisión a la siguiente generación (de la hembra al huevo) y provoca una serie de manipulaciones en la reproducción del mismo. Esta bacteria puede causar diversos fenotipos dependiendo de la cepa bacteriana y la especie hospedadora, tales como feminización genética de machos, partenogénesis, muerte de machos, e incompatibilidad citoplasmática (IC), siendo este último el principal fenotipo que *Wolbachia* impone a sus insectos hospedadores (O'Neill *et al.*, 1997).

Cada uno de estos efectos beneficia directa o indirectamente a las hembras infectadas y por lo tanto ayuda a la dispersión de *Wolbachia* a través de la población de sus hospedadores (Charlat *et al.*, 2003). *Wolbachia* también infecta los tejidos somáticos de sus hospedadores, con distribuciones y densidades de infección que varían de acuerdo a las diferentes cepas bacterianas (Dobson *et al.*, 1999). Las infecciones en los tejidos somáticos pueden ayudar a explicar algunos de los diferentes fenotipos en mosquitos que fueron asociados con *Wolbachia*, tales como alteraciones en la vida media, modificaciones en la actividad locomotora y deficiencias que impiden la ingesta de sangre (McGraw y O'Neill, 2013).

La IC induce a una producción aberrante de la progenie originada por el cruzamiento entre machos infectados con hembras no infectadas o infectadas por otra cepa. Los machos infectados con esta bacteria poseen factores citoplasmáticos que afectan el movimiento de los cromosomas en los espermatozoides después de la fertilización. Como resultado de ello, los cromosomas paternos son eliminados produciéndose embriones haploides no viables (Oliveira y Moreira, 2012). Como estrategia de control de insectos, por medio de *Wolbachia*, se

propone mantener la “esterilidad” reproductiva, lograda por medio de cruzamientos de machos infectados con una cepa de incompatibilidad, con hembras de las poblaciones silvestres carentes de esta cepa. De manera análoga a la Técnica del Insecto Estéril (TIE), el resultado esperado será la disminución sostenida de la población de la especie que se quiere controlar (Brelsfoard *et al.*, 2008).

Esta bacteria está presente en forma natural en mosquitos de los géneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia* y *Mansonia*. Hasta el momento no se han encontrado cepas nativas infectando *Ae. aegypti* (Hoffmann *et al.*, 2015), y para el género *Anopheles* solo se encontró una cepa en la especie *An. gambiae* donde si fue identificada molecularmente (Baldini *et al.*, 2014). Sin embargo, durante investigaciones recientes, fue posible transinfectar con éxito distintas cepas de *Wolbachia*, provenientes de diferentes hospedadores, en especies de mosquitos tales como *Ae. aegypti*, *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), *Aedes (Stegomyia) polynesiensis* Marks, *An. gambiae*, *Anopheles stephensi* Liston, logrando instalar infecciones heredables estables. En estos nuevos hospedadores, patógenos tales como virus, parásitos y filarias no lograron replicarse (Hoffmann *et al.*, 2015).

La habilidad de *Wolbachia* para bloquear virus y otros microbios depende de la naturaleza de estos microorganismos y de la cepa de *Wolbachia* infectante. Por ejemplo en *Drosophila* sp. Fallén (Diptera: Drosophilidae) algunos tipos de virus (virus DNA en particular) no son afectados por la presencia de *Wolbachia* en las células del hospedador, mientras que los virus RNA parecen ser inhibidos por esta bacteria. Infecciones estables de *Wolbachia* en especies del género *Aedes* lograron bloquear diferentes serotipos del virus dengue y de otros RNA virus (Hoffmann *et al.*, 2015). La capacidad que tiene esta especie bacteriana para bloquear agentes patógenos en sistemas artificiales fue atribuida a diferentes factores. Entre ellos, la presencia de *Wolbachia* induce a la expresión de numerosos genes del sistema inmune del mosquito; por otro lado, habría competencia a nivel celular por nutrientes tales como colesterol, interacciones que implican varios metabolitos y la expresión de micro-RNAs (Sinkins, 2013). También se ha determinado en ejemplares de *Ae. aegypti* transinfectados con *Wolbachia*, que la infección con esta bacteria conduce a la inducción de estrés oxidativo y a un mayor nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) en su hospedador. Esto activaría una vía del sistema inmune del insecto que actuaría en la inhibición específica de la proliferación del virus dengue (Pan *et al.*, 2012). Por otro lado, Zélé *et al.*

(2014) estudiando el sistema natural *Cx. pipiens-Wolbachia-Plasmodium relictum*, comprobaron que la presencia de *Wolbachia* en el hospedador natural incrementa la prevalencia de la infección en el mosquito. Lo cual implicaría que los efectos de *Wolbachia* dependerán del origen de la cepa (nativa o exógena) y del hospedador involucrado. Estos aspectos deberían ser tomados en cuenta al momento de proponer

estrategias de control de vectores y / o enfermedades por medio de *Wolbachia*.

Actualmente se están desarrollando diferentes estrategias de infección de diferentes especies de mosquitos con diferentes cepas de *Wolbachia* para lograr métodos de control de estos insectos, tal como se ejemplifican en el esquema de la Fig. 6.

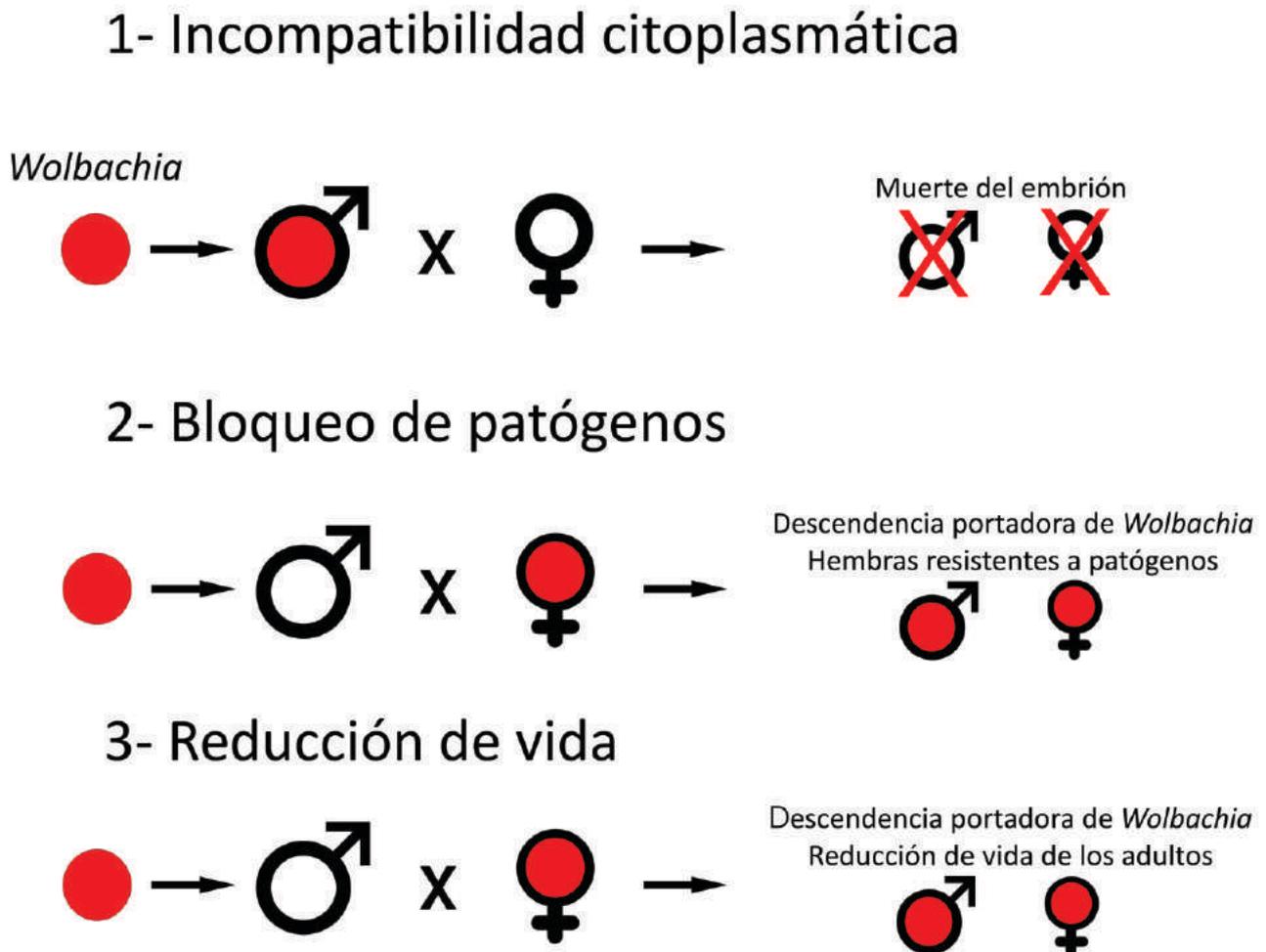


Figura 6. Control de mosquitos por medio de la bacteria endosimbionte *Wolbachia*. 1) *Wolbachia* puede ser usado de igual manera que la Técnica de Insecto Estéril liberando un gran número de machos infectados, la esterilidad se lograría por incompatibilidad citoplasmática. 2) Si se libera una gran cantidad de hembras que estén infectadas con *Wolbachia* (y que fue demostrado que inhibe el crecimiento de patógenos en los insectos), toda la descendencia llevará el simbiote y tendrán menor capacidad vectorial de distintos patógenos. 3) Si una cepa de *Wolbachia* es liberada por medio de las hembras, no solo se lograría el bloqueo del patógeno e incompatibilidad citoplasmática, sino que también se reduciría la expectativa de vida del insecto. Esto tiene el potencial de disminuir la transmisión de patógenos, ya que solo las hembras adultas de mayor tiempo de desarrollo son las responsables de su transmisión. Círculos rojos indican infección con *Wolbachia* (Adaptado de McGraw y O'Neill, 2013).

Microbiota asociada a mosquitos

Durante las últimas décadas, se han incrementado las investigaciones sobre la flora microbiana presente en mosquitos y sus posibles aplicaciones en programas de control de estos insectos, como alternativas biológicas al control químico. Tal como se ha analizado detalladamente en este capítulo

lo, las primeras bacterias estudiadas fueron las entomopatógenas, portadoras de toxinas capaces de provocar la muerte de estadios larvales, tales como algunas cepas de *B. thuringiensis* (Adang *et al.*, 2014) y de *L. sphaericus* (Berry, 2012). Más recientemente se ha determinado que existen comunidades

de microorganismos que habitan en la cutícula o en el intestino de algunos mosquitos y que tienen funciones en la nutrición, el desarrollo, la reproducción y en algunos casos en la defensa de estos insectos contra enemigos naturales (Engel y Moran, 2013; Minard *et al.*, 2013). Estos microorganismos al llegar al hemocele pueden proliferar y formar comunidades estables en los tejidos del insecto (Douglas, 2014).

Se ha demostrado que las bacterias simbiotes de dípteros tienen un rol central en el sistema inmune innato, de manera tal que algunos miembros de la flora residente promueven funciones inmunes activando efectores inmunológicos y producción de toxinas, tales como péptidos antimicrobianos y ROS que confieren resistencia a patógenos y parásitos. Las interacciones antagónicas y mutualistas entre bacterias también han sido implicadas como factores determinantes de la composición de la microbiota, por ejemplo la producción de ROS por parte de la bacteria intestinal *Enterobacter* sp. en especies de *Anopheles* reduce la posibilidad de que el insecto pueda adquirir *Plasmodium* sp. cuando se alimenta de sangre de un hospedador infectado, aunque los mecanismos moleculares de tales interacciones no se conocen (Cirimotich *et al.*, 2011). Otro ejemplo es la bacteria endosimbionte *Wolbachia pipiens* que puede influir negativamente en la eficiencia de la vectorización de patógenos tales como el virus dengue o interferir en la reproducción de Plasmodios dentro del insecto dando como resultado la disminución en los niveles de infección / infestación de los hospedadores finales (Moreira *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2010; Hoffmann y Sgrò, 2011; Ricci *et al.*, 2012).

Una estrategia aún más reciente para explotar los microorganismos simbióticos para el control de enfermedades transmitidas por vectores es la paratransgénesis, es decir, la generación de simbiotes genéticamente modificados capaces de expresar y liberar moléculas antiparásitos dentro del insecto (Coutinho-Abreu *et al.*, 2011). Para ello ya han sido probados diferentes tipos de microorganismos en condiciones de laboratorio demostrando su capacidad para bloquear parásitos que provocan malaria, a través de la expresión de una variedad de moléculas

efectoras (Fang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). El candidato ideal para el control de patógenos o parásitos por paratransgénesis será un microorganismo que tenga una asociación estable con el mosquito vector y que infecte los mismos tejidos que el agente infectante / infestante. Este microorganismo también debe ser apto de ser cultivable, manipulado genéticamente y posteriormente ser reintroducido en las poblaciones de mosquitos (Capone *et al.*, 2013). Recientemente se ha identificado una bacteria cultivable simbiote, *Asaia* sp., que se encuentra asociada con algunas especies de mosquitos colonizando órganos reproductivos y que ha sido propuesta para ser usada en paratransgénesis (Damiani *et al.*, 2010; Capone *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha determinado que algunas bacterias y levaduras son esenciales en la nutrición de mosquitos por medio de dos procesos diferentes. Por un lado, los microorganismos pueden ser una fuente de nutrientes en sí mismos mediante la lisis de las células microbianas, especialmente los microorganismos que se encuentran en el tracto digestivo, además las células microbianas que se encuentran vivas en el cuerpo del insecto pueden liberar metabolitos específicos con valor nutricional, tales como vitaminas y aminoácidos esenciales (Vega y Dowd, 2005). En segundo lugar, los microorganismos pueden modular las vías de señalización vinculadas con la nutrición, como por ejemplo la señalización de la insulina, que regula la asignación de nutrientes, especialmente a los lípidos y otras reservas de energía. Estas asociaciones han sido particularmente estudiadas en grupos de insectos que tienen dietas pobres en nutrientes o no balanceadas, como puede ser la sangre de vertebrados, deficiente en vitaminas del grupo B (Douglas, 2015). También la capacidad de los insectos a resistir y tolerar patógenos y parásitos parece estar fuertemente influenciada por la calidad nutricional, así como por otros factores fisiológicos. A pesar de los avances en el conocimiento de algunas interacciones insecto-microbiota, es poco lo que se conoce sobre bacterias nutricionales en mosquitos (Douglas, 2014).

Control Biológico de poblaciones de mosquitos por medio de bacterias patógenas, simbiotes o nutricionales en Argentina

Los estudios sobre bacterias entomopatógenas enfocados a sus posibles aplicaciones para el control de poblaciones de mosquitos en Argentina se han centrado en la prospección de cepas nativas de *B. thuringiensis* (Ibarra *et al.*, 2003; Berón y Salerno, 2006) y *L. sphaericus* (Tranchida *et al.*, 2011). Se ha

logrado aislar una cepa de *B. thuringiensis* a partir de muestras de suelo, altamente tóxica contra larvas de diversas especies de mosquitos, tales como *Ae. aegypti*, *Ae. albifasciatus*, *Cx. apicinus* y *Cx. pipiens* (Berón y Salerno, 2007; Díaz-Nieto, 2014), que ha sido parcialmente caracterizada, demostrando ser

portadora de una nueva toxina Cry, denominada Cry24Ca por el comité de nomenclatura de *B. thuringiensis*, así como otras toxinas aún no determinadas (datos no publicados). El gen *cry24Ca* (NCBI N° de acceso AM158318) ha sido clonado y expresado en un sistema heterólogo demostrando presentar actividad mosquitocida contra larvas de *Ae. aegypti* (Berón y Salerno, 2007). También se han aislado dos cepas de *L. sphaericus*, a partir de larvas muertas de *Cx. pipiens* que han resultado ser tóxicas contra especies como *Ae. aegypti*, *Ae. albifasciatus*, *An. albitarsis*, *Cx. apicinus*, *Cx. dolosus*, y *Cx. pipiens*, (Tranchida *et al.*, 2011).

Por otro lado, se han desarrollado nuevas estrategias para comenzar el aislamiento y caracterización de nuevos genes codificantes de proteínas Cry (genes *cry*). Una de ellas, se basa en la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por medio de dos etapas de amplificación, y que utiliza cebadores degenerados, lo que permite el inicio de la identificación de nuevos genes codificantes de proteínas Cry muy diversos filogenéticamente (Berón *et al.*, 2005). La otra estrategia permite la determinación de secuencias codificantes de genes *cry* en cepas de *B. thuringiensis*, por medio de cebadores degenerados, seguida por una electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), permitiendo diferenciar de forma sencilla y económica, una gran diversidad de cepas nativas en un corto tiempo (Vidal Domínguez *et al.*, 2011). Se han diseñado sistemas de cebadores específicos dirigidos a la detección de secuencias nucleotídicas codificantes de genes de los tipos *cry2*, *cry11* y *cyt* por medio de su amplificación por PCR, seguido de digestiones con enzimas de restricción específicas. Con ello se obtuvieron perfiles de restricción con fragmentos nucleotídicos de diversos tamaños (RFLP) que permitieron diferenciar entre los distintos productos de amplificación y por lo tanto entre secuencias diferentes (Sauka *et al.*, 2005; 2010; Sauka y Benintende, 2013). También se han realizado estudios de optimización de cultivos de cepas de Bti (Cieza *et al.*, 2005; Berretta *et al.*, 2013), recuperación del complejo espora-cristal a partir de los caldos de fermentación y la formulación de productos mosquitocidas. A partir de estas investigaciones se han desarrollado paquetes tecnológicos para la producción, evaluación y empleo de bioinsecticidas basados en esta bacteria que han resultado efectivos para el control de *Ae. aegypti*, y que actualmente se ofrecen en el mercado (Berretta *et al.*, 2013). Por otro lado, se analizó la interacción de la cepa comercial H14 de Bti, el insecticida químico Temephos y zoosporas del hongo *Leptolegnia chapmanii* (Seymour) en larvas de *Ae. aegypti*, en el

laboratorio y en el campo bajo condiciones controladas, obteniéndose actividad sinérgica como resultado de esa interacción (Pelizza *et al.*, 2010).

Por otro lado, en el marco de un proyecto de relevamiento de la flora microbiana de mosquitos, fueron colectados estadios larvales de diversas especies de estos insectos a partir de criaderos tanto naturales como artificiales, situados en la ciudad de Mar del Plata y alrededores (Díaz-Nieto *et al.*, 2013a; 2013b). Se analizó la presencia de cepas de *W. pipientis* en poblaciones de mosquitos de los géneros *Culex* y *Aedes* (*Ochlerotatus*) de Mar del Plata y de *Ae. aegypti* provenientes de La Plata, detectando únicamente cepas de esta bacteria en dos poblaciones diferentes de *Cx. pipiens* de la ciudad de Mar del Plata. Los análisis moleculares llevados a cabo a partir de las poblaciones portadoras de este microorganismo, permitieron determinar la existencia de dos cepas diferentes de *Wolbachia* que a su vez difieren de las descritas hasta el momento a nivel mundial. Estos resultados constituyen la primera evidencia molecular de la presencia de *Wolbachia* en poblaciones de mosquitos de Argentina (Díaz-Nieto, 2014), aunque en algunas investigaciones anteriores se han sugerido posibles indicios de poblaciones portadoras de esta bacteria (Almirón *et al.*, 1995; Humeres *et al.*, 1998), relacionando que los bajos porcentajes en la tasa de eclosión de huevos obtenidos al realizar cruzamientos entre individuos de *Cx. pipiens* y de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de distintas localidades de Argentina, podrían deberse a una posible incompatibilidad citoplasmática provocada por cepas de *Wolbachia*. Por otro lado, Micieli y Glaser (2014) detectaron *Wolbachia* en una población de *Cx. quinquefasciatus* colectada en la provincia de Buenos Aires.

Recientemente Díaz-Nieto *et al.* (2016) evaluaron el valor nutricional de diversos microorganismos durante el desarrollo de *Cx. pipiens*, determinando la tasa de supervivencia de los estadios larvales, pupas y adultos de una colonia de este insecto alimentadas con cultivos axénicos de levaduras, microalgas, bacterias y cianobacterias en condiciones de laboratorio. Adicionalmente, evaluaron la heredabilidad de estos microorganismos a partir de hembras a su descendencia, así como la selección, por parte de las hembras grávidas, de sitios de ovipostura inoculados con estos microorganismos. Estos autores demostraron que los estadios larvales de *Cx. pipiens* pueden utilizar de manera eficiente a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Meyen como fuente de alimento ya que logran completar su desarrollo hasta estado adulto de la misma manera que cuando son alimentados con dietas balanceadas; sin embargo, esta levadura no

sería transmitida a su descendencia. Se demostró también que esta colonia de mosquitos estaría naturalmente infectada por dos bacterias diferentes de los géneros *Klebsiella* sp. y *Aeromonas* sp., que ade-

más son elegidas por las hembras de *Cx. pipiens* para la selección de sitios de ovipostura. Estos microorganismos podrían ser utilizados para el desarrollo de ovitrampas tóxicas de alta especificidad.

Perspectivas

En Argentina, los productos bacterianos comerciales para el control de estadios larvales de mosquitos de importancia sanitaria están basados o en desarrollos de formulados de fabricación nacional, o directamente en la importación de productos provenientes del exterior, todos ellos obtenidos a partir de las bacterias *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, principalmente la cepa H14 y la cepa 2362 de *L. sphaericus* (ANMAT, 2015). No existe ningún producto nacional desarrollado a partir de cepas nativas ya que la obtención de registros sanitarios de productos biológicos implica altos costos y el cumplimiento de normativas complejas.

Desde los grupos de investigación que desarrollamos nuestras actividades en esta área, nuestros aportes son: i) la detección de nuevas cepas de bacterias mosquitocidas portadoras de nuevas toxinas

diferentes a las toxinas presentes en las cepas de uso comercial que podrán ampliar el espectro de acción mosquitocida, así como colaborar en el manejo de resistencias por parte de los insectos blanco; y ii) el desarrollo de sistemas bacterianos novedosos tanto de microorganismos patógenos como simbiotes y / o nutricionales que permita generar productos bioinsecticidas de industria nacional, específicos y eficientes para el control de insectos de interés sanitario, que puedan ser aplicados en el marco del manejo integrado de poblaciones de mosquitos. Estos productos podrán ser transferidos a la industria para su producción a gran escala, pero para ello será necesario el apoyo de los entes nacionales de regulación que faciliten la aprobación e implementación de este tipo de productos de industria nacional.

Bibliografía

1. Adang MJ, Crickmore N, Jurat-Fuentes JL. 2014. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism. En: Tarlochan SD, Sarjeet SG, eds. *Advances in Insect Physiology Insect Midgut and Insecticidal Proteins*. Oxford: Academic Press. pp. 39-87.
2. Ahmed I, Yokota A, Yamazoe A, Fujiwara T. 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 57: 1117-1125.
3. Almirón WR, Humeres SG, Gardenal CN. 1995. Distribution and hybridization between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 90: 469-473.
4. ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Listado de insecticidas y raticidas. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/listados/Listado_Insecticidas_Raticidas_2015.pdf.
5. Baldini F, Segata N, Pompon J, Marcenac P, Shaw WR, Dabiré RK, Diabaté A, Levashina EA, Catteruccia F. 2014. Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Nat Commun*. 5: 3985.
6. Ben-Dov E. 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. *Toxins*. 6: 1222-1243.
7. Berón C, Curatti L, Salerno G. 2005. New strategy for identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl Environ Microb*. 71: 761-765.
8. Berón CM, Salerno GL. 2006. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina potentially useful in insect pest control. *BioControl*. 51: 779-794.
9. Berón CM, Salerno GL. 2007. Cloning and characterization of a novel crystal protein from a native *Bacillus thuringiensis* isolate highly active against *Aedes aegypti*. *Curr Microbiol*. 54: 271-276.
10. Berretta M, Sauka D, Benintende G. 2013. Investigación, desarrollo y transferencia de bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis* para el control de plagas y vectores. En: Plischuk S, Consolo F, Berón C, Eds. *I Taller Argentino de patología de insectos y sus aplicaciones en biocontrol*. Universidad Nacional de Mar del Plata. pp. 55-56.
11. Berry C, O'Neil S, Ben-Dov E, Jones AF, Murphy L, Quail MA, Holden MTG, Harris D, Zaritsky A, Parkhill J. 2002. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl Environ Microbiol*. 68: 5082-5095.
12. Berry C. 2012. The bacterium *Lysinibacillus sphaericus* as an insect pathogen. *J Invertebr Pathol*. 109: 1-10.
13. Bian G, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi Z. 2010. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *Plos Pathog*. 6: e1000833.
14. Boonserm P, Davis P, Ellar DJ, Li J. 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J Mol Biol*. 348: 363-382.
15. Boonserm P, Mo M, Angsuthanasombat C, Lescar J. 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J Bacteriol*. 188: 3391-3401.
16. Bravo A, Gill SS, Soberón M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 49: 423-435.
17. Brelsfoard C, Séchan Y, Dobson S. 2008. Interspecific hybridization yields strategy for South Pacific filariasis vector elimination. *PLoS Neglect Trop Dis*. 2: e129.
18. Cantón PE, López-Díaz JA, Gill SS, Bravo A, Soberón M. 2014. Membrane binding and oligomer membrane insertion are necessary but insufficient for *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxicity. *Peptides*. 53: 286-291.
19. Capone A, Ricci I, Damiani C, Mosca M, Rossi P, Scuppa P, Crotti E, Epis S, Angeletti M, Valzano M, Sacchi L, Bandi C, Daffonchio D, Mandrioli M, Favia G. 2013. Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in Malaria Symbiotic. *Parasit Vectors*. 6: 182-195.
20. Carpusca I, Jank T, Aktories K. 2006. *Bacillus sphaericus* mosquitocidal toxin (MTX) and pierisin: the enigmatic offspring from the family of ADP-ribosyltransferases. *Mol Microbiol*. 62: 621-630.

21. Charlat S, Hurst GD, Mercot H. 2003. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends Genet.* 19: 217-223.
22. Cho KO, Kim GW, Lee OK. 2011. *Wolbachia* bacteria reside in host Golgi-related vesicles whose position is regulated by polarity proteins. *Plos One.* 6: e22703.
23. Cieza LA, Cavalitto SF, Mignone CF. 2005. Growth and toxicity of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in synthetic medium. *Curr Top Biotechnol.* 2: 75-79.
24. Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, Mulenga M, Dimopoulos G. 2011. Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science.* 332: 855-858.
25. Coutinho-Abreu IV, Zhu KY, Ramalho-Ortigao M. 2011. Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne disease: Current status and future challenges. *Parasitol Int.* 59: 1-8.
26. Crickmore N, Baum J, Bravo A, Lereclus D, Narva K, Sampson K, Schnepf E, Sun M, Zeigler DR. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponible en: <http://www.btnomenclature.info/>
27. Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 807-813.
28. Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Scuppa P, Capone A, Ulissi U, Epis S, Genchi M, Sagnon N, Faye I, Kang A, Chouaia B, Whitehorn C, Moussa GW, Mandrioli M, Esposito F, Sacchi L, Bandi C, Daffonchio D, Favia G. 2010. Mosquito-bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. *Microb Ecol.* 60: 644-654.
29. de Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE. 2003. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet.* 37: 409-433.
30. de Melo JV, Jones GW, Berry C, Vasconcelos RH, Oliveira CM, Furtado AF, Peixoto CA, Silva-Filha MH. 2009. Cry48Aa/Cry49Aa toxin from *Bacillus sphaericus* displays cytopathological effects on susceptible and Binary toxin-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. *Appl Environ Microbiol.* 75: 4782-4789.
31. Díaz-Nieto LM, D'Alessio C, Perotti MA, Berón CM. 2016. *Culex pipiens* development is greatly influenced by native bacteria and exogenous yeast. *Plos One.* 11: e0153133.
32. Díaz-Nieto LM, Maciá A, Farina JL, Parisi G, Vidal Domínguez ME, Perotti MA, Berón CM. 2013b. Distribution of mosquitoes in the south east of Argentina and first report on the analysis based on 18S rDNA and COI sequences. *Plos One.* 8: e75516.
33. Díaz-Nieto LM, Maciá A, Perotti MA, Berón CM. 2013a. Geographical limits of the Southeastern distribution of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Argentina. *Plos Negl Trop Dis.* 7: e1963.
34. Díaz-Nieto LM. 2014. Diversidad de mosquitos en Mar del Plata y caracterización de microorganismos patógenos y simbioses para el control de culicidos de importancia sanitaria. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Mar del Plata.
35. Dobson SL, Bourtzis K, Braig HR, Jones BF, Zhou W, Rousset F, O'Neill SL. 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem Mol Biol.* 29: 153-160.
36. Douglas AE. 2014. The molecular basis of bacterial-insect symbiosis. *J Mol Biol.* 426: 3830-3837.
37. Douglas AE. 2015. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annu Rev Entomol.* 60: 17-34.
38. Elleuch J, Jaoua S, Darriet F, Chandre F, Tounsi S, Zghal RZ. 2015. Cry4Ba and Cyt1Aa proteins from *Bacillus thuringiensis israelensis*: Interactions and toxicity mechanism against *Aedes aegypti*. *Toxicon.* 104: 83-90.
39. Engel P, Moran NA. 2013. The gut microbiota of insects-diversity in structure and function. *Fems Microbiol Rev.* 37: 699-735.
40. Fang W, Vega-Rodríguez J, Ghosh AK, Jacobs-Lorena M, Kang A, Leger RJS. 2011. Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. *Science.* 331: 1074-1077.
41. Federici BA, Park HW, Bideshi DK, Wirth MC, Johnson JJ, Sakano Y, Tang M. 2007. Developing recombinant bacteria for control of mosquito larvae. *J Am Mosq Control Assoc.* 23: 164-175.
42. Federici BA, Park HW, Bideshi DK. 2010. Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control. *Open Toxinol J.* 3: 83-100.
43. Fernández-Luna MT, Lanz Mendoza H, Gill SS, Bravo A, Soberon M, Miranda Rios J. 2010. An α amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Environ Microbiol.* 12: 746-757.
44. Ferré J, Van Rie J. 2002. Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol.* 47: 501-533.
45. Francis BR, Bulla LA. 1997. Further characterization of BT-R 1 the cadherin-like receptor for Cry1Ab toxin in tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midguts. *Insect Biochem Mol Biol.* 27: 541-550.
46. Gómez I, Sánchez J, Miranda R, Bravo A, Soberón M. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513: 242-246.
47. Hertig M, Wolbach S. 1924. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *J Med Res.* 44: 329-374.
48. Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren J. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett.* 281: 215-220.
49. Hoffmann AA, Ross PA, Rašić G. 2015. *Wolbachia* strains for disease control: ecological and evolutionary considerations. *Evol Appl.* 8: 751-768.
50. Hoffmann AA, Sgrò CM. 2011. Climate change and evolutionary adaptation. *Nature.* 470: 479-485.
51. Höfte H, Whiteley HR. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev.* 53: 242-255.
52. Humeres SG, Almirón WR, Sabattini MS, Gardenal CN. 1998. Estimation of genetic divergence and gene flow between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 93: 57-62.
53. Ibarra JE, del Rincón MC, Ordúz S, Noriega D, Benintende G, Monnerat R, Regis L, de Oliveira CMF, Lanz H, Rodríguez MH, Sánchez J, Peña G, Bravo A. 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl Environ Microb.* 69: 5269-5274.
54. Jones GW, Nielsen-Leroux C, Yang Y, Yuan Z, Dumas VF, Monnerat RG, Berry C. 2007. A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. *FASEB J.* 21: 4112-4120.
55. Kawalek MD, Benjamin S, Lee HL, Gill SS. 1995. Isolation and Identification of novel toxins from a new mosquitocidal isolate from Malaysia, *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Appl Environ Microb.* 61: 2965-2969.
56. Kellen WR, Clark TB, Lindegren JE, Ho BC, Rogoff MH, Singer S. 1965. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *J Invertebr Pathol.* 7: 442-448.
57. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* 10: 845-858.
58. Keteşoğlu I, Bouwer G. 2012. The susceptibility of five African *Anopheles* species to *Anabaena* PCC 7120 expressing *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* mosquitocidal cry genes. *Parasit Vectors.* 5: 220-523.
59. Khasdan V, Ben-Dov E, Manasherob R, Boussiba S, Zaritsky A. 2003. Mosquito larvicidal activity of transgenic *Anabaena* PCC 7120 expressing toxin genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 227: 189-195.
60. Krych VK, Johnson JL, Yousten AA. 1980. Deoxyribonucleic acid homologies among strains of *Bacillus sphaericus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 30: 476-484.
61. Lacey LA. 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc.* 23: 133-163.
62. Li J, Carroll J, Ellar DJ. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature.* 353: 815-821.
63. Likitvatanavong S, Chen J, Evans AM, Bravo A, Soberon M, Gill SS. 2011. Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. *J Agr Food Chem.* 59: 2829-2838.
64. Likitvatanavong S, Katzenmeier G, Angsuthanasombat C. 2006. Asn 183 in α 5 is essential for oligomerisation and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. *Arch Biochem Biophys.* 445: 46-55.
65. McGraw EA, O'Neill SL. 2013. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nat Rev Microbiol.* 11: 181-93.
66. Micieli MV, Glaser RL. 2014. Somatic *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) levels in *Culex quinquefasciatus* and 270 (Diptera: Culicidae) and resistance to West Nile virus infection. *J Med Entomol.* 51: 189-199.
67. Minard G, Mavingui P, Moro CV. 2013. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit Vectors.* 6: 146.
68. Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, Van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL. 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell.* 139: 1268-1278.
69. O'Neill SL, Hoffmann AA, Werren JH. 1997. Influential passengers: Inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford: Oxford University Press.
70. Oliveira C, Moreira L. 2012. Uso de *Wolbachia* no controle biológico. En: Termignoni C, Masuda H, da Silva Neto MAC, eds. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. pp. 1-14.
71. Opota O, Gauthier NC, Doye A, Berry C, Gounon P, Lemichez E, Pauron D. 2011. *Bacillus sphaericus* binary toxin elicits host cell autophagy as a response to intoxication. *Plos One.* 6: e14682.
72. Orduz S, Rojas W, Correa MM, Montoya AE, de Barjac H. 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. *J Invertebr Pathol.* 59: 99-103.

73. Pardo-Lopez L, Soberon M, Bravo A. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Lett.* 37: 3-22.
74. Pan X, Zhou G, Wu J, Bian G, Lu P, Raikhel AS, Xi Z. 2012. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 23-31.
75. Pelizza SA, Scorsetti AC, Bisaro V, Lastra CCL, García JJ. 2010. Individual and combined effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, temephos and *Leptolegnia chapmanii* on the larval mortality of *Aedes aegypti*. *BioControl.* 55: 647-656.
76. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. 2004. *J Comput Chem.* 25: 1605-1612.
77. Ricci I, Damiani C, Capone A, DeFreece C, Rossi P, Favia G. 2012. Mosquito microbiota interactions: From complex relationships to biotechnological perspectives. *Curr Opin Microbiol.* 15: 278-284.
78. Sauka DH, Cozzi JG, Benintende GB. 2005. Screening of *cry2* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 88: 163-165.
79. Sauka DH, Monella RH, Benintende GB. 2010. Detection of the mosquitoicidal toxin genes encoding Cry11 proteins from *Bacillus thuringiensis* using a novel PCR-RFLP method. *Rev Argent Microbiol.* 42: 23-26.
80. Sauka HD, Benintende GB. 2013. Identification of toxin genes encoding Cyt proteins from standard and Argentine strains of *Bacillus thuringiensis*. *J Trop Microbiol Biotech.* 8: 3-8.
81. Singer S. 1973. Insecticidal activity of recent bacterial isolates and their toxins against mosquito larvae. *Nature.* 244: 110-111.
82. Sinkins SP. 2013. *Wolbachia* and arbovirus inhibition in mosquitoes. *Future Microbiol.* 8: 1249-1256.
83. Soberón M, López-Díaz JA, Bravo A. 2013. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides.* 41: 87-93.
84. Soberón M, Rodríguez-Almazán C, Muñoz-Garay C, Pardo-López L, Porta H, Bravo A. 2012. *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt mutants useful to counter toxin action in specific environments and to overcome insect resistance in the field. *Pestic Biochem Physiol.* 104: 111-117.
85. Tranchida MC, Riccillo PM, Micieli MV, García JJ, Rodríguez MS. 2011. Isolation, characterization and evaluation of mosquitoicidal activity of *Lysinibacillus* strains obtained from *Culex pipiens* larvae. *Ann Microbiol.* 61: 575-584.
86. Vega FE, Dowd PF. 2005. The role of yeasts as insect endosymbionts. En: Vega FE, Blackwell M, eds. *Insect-fungal associations ecology and evolution.* New York: Oxford University Press. pp. 352.
87. Vega FE, Kaya HK. 2012. *Insect pathology.* 2^{ed}. London, Waltham, San Diego: Academic Press.
88. Vidal Domínguez ME, Pérez-Cenci M, Salerno G, Berón CM. 2011. Genetic diversity of *cry* gene sequences of *Bacillus thuringiensis* strains analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Curr Microbiol.* 62: 866-870.
89. Wang S, Ghosh AK, Bongio N, Stebbings KA, Lampe DJ, Jacobs-Lorena M. 2012. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 12734-12739.
90. Wirth M, Yang Y, Walton WE, Federici BA, Berry C. 2007. Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. *Appl Environ Microbiol.* 73: 6066-6071.
91. Wirth MC. 2010. Mosquito resistance to bacterial larvicidal toxins. *Open Toxinol J.* 3: 126-140.
92. Wu M, Sun LV, Vamathevan J, Riegler M, Deboy R, Brownlie JC, McGraw EA, Martin W, Esser C, Ahmadinejad N, Wiegand C, Madupu R, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, Durkin AS, Kolonay JF, Nelson WC, Mohamoud Y, Lee P, Berry K, Young MB, Utterback T, Weidman J, Nierman WC, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, O'Neill SL, Eisen JA. 2004. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipiensis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *Plos Biol.* 2: e69.
93. Young, MD, Undeen AH, Dame DA, Wing SR. 1990. The effect of *Bacillus sphaericus* upon the susceptibility of *Anopheles quadrimaculatus* to *Plasmodium berghei*. *J Am Mosq Control Assoc.* 6: 139-140.
94. Yousten AA, Fretz SB, Jelley SA. 1985. Selective medium for mosquito pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. *Appl Environ Microbiol.* 49: 1532-1533.
95. Yu YM, Ohba M, Gill SS. 1991. Characterization of mosquitoicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* crystal proteins. *Appl Environ Microbiol.* 57: 1075-1081.
96. Zahiri NS, Mulla MS. 2005. Non-larvicidal effects of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* on oviposition and adult mortality of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol.* 30: 155-162.
97. Zaritsky A, Ben-Dov E, Borovsky D, Boussiba S, Einav M, Gindin G, Horowitz AR, Kolot M, Melnikov O, Mendel Z, Yagil E. 2010. Transgenic organisms expressing genes from *Bacillus thuringiensis* to combat insect pests. *Bioeng Bugs.* 1: 341-344.
98. Zélé F, Nicot A, Berthomieu A, Weill M, Duron O, Rivero A. 2014. *Wolbachia* increases susceptibility to *Plasmodium* infection in a natural system. *Proc R Soc.* 281: 2013.2837.
99. Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 9897-9902.