

INTERAÇÃO PARASITO- HOSPEDEIRO



Alana Maria Cerqueira de Oliveira
(Organizadora)

2

Atena
Editora
Ano 2022

INTERAÇÃO PARASITO- HOSPEDEIRO



Alana Maria Cerqueira de Oliveira
(Organizadora)

2

Atena
Editora
Ano 2022

Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Camila Alves de Cremo

Daphynny Pamplona

Gabriel Motomu Teshima

Luiza Alves Batista

Natália Sandrini de Azevedo

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

2022 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2022 Os autores

Copyright da edição © 2022 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Biológicas e da Saúde**

Profª Drª Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso

Profª Drª Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília

Profª Drª Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás



Atena
Editora
Ano 2022

Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto
Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco



Interação parasito-hospedeiro 2

Diagramação: Gabriel Motomu Teshima
Correção: Mariane Aparecida Freitas
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadora: Alana Maria Cerqueira de Oliveira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)	
I61	Interação parasito-hospedeiro 2 / Organizadora Alana Maria Cerqueira de Oliveira. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-5983-870-7 DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.707222601 1. Parasito-hospedeiro. I. Oliveira, Alana Maria Cerqueira de (Organizadora). II. Título. CDD 616.96
Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br



DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.



DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.



APRESENTAÇÃO

A Obra “Interação parasito-hospedeiro 2”, traz ao leitor cinco capítulos de relevada importância na área de Imunologia, Parasitologia e Genética. Entretanto, caracteriza-se como uma obra multidisciplinar que vai do estudo de parasitas de interesse humano a parasitas de interesses veterinário englobando os zoonóticos.

Os capítulos estão distribuídos em temáticas que abordam de forma categorizada e interdisciplinar a relação parasito-hospedeiro, as pesquisas englobam estudos de: polimorfismos genéticos, fases do ciclo de vida do parasita, expressão de citocinas, respostas imunológicas, técnicas de biologia molecular (extração de RNA, RT-PCR), técnicas de parasitologia, técnicas de imunologia, técnicas microbiológicas, transmissão zoonótica, doenças negligenciadas, virulência, patogenicidade, bioinseticida, Infecções oportunistas e resistência bacteriana.

A obra foi elaborada primordialmente com foco nos profissionais, pesquisadores e estudantes pertencentes às área de Parasitologia Médica e Veterinária e suas interfaces ou áreas afins. Entretanto, é uma leitura interessante para todos aqueles que de alguma forma se interessam pela área.

Cada capítulo foi elaborado com o propósito de transmitir a informação científica de maneira clara e efetiva, em português, inglês ou espanhol. Utilizando uma linguagem acessível, concisa e didática, atraindo a atenção do leitor, independente se seu interesse é acadêmico ou profissional.

O livro “ Interação parasito-hospedeiro 2”, traz publicações atuais e a Atena Editora traz uma plataforma que oferece uma estrutura adequada, propícia e confiável para a divulgação científica de diversas áreas de pesquisa.

Alana Maria Cerqueira de Oliveira

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

PAPEL DEL POLIMORFISMO DEL GEN HAPTOGLOBINA EN LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN CON ANTÍGENOS DE *Plasmodium vivax*

Paco Raffoul
Fernando Hernández
Albina Wide
Jacinta Capaldo
Mercedes Fernández-Mestre

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.7072226011>

CAPÍTULO 2..... 16

GIARDIA SPP. IN FREE-RANGING INTRODUCED MONK PARAKEETS AND ITS DISTRIBUTION IN SANTIAGO METROPOLIS, CHILE

Alejandra Sandoval-Rodríguez
Daniela Marcone
Raúl Alegría-Morán
Matilde Larraechea
Karina Yévenes
Fernando Fredes
Cristóbal Briceño

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.7072226012>

CAPÍTULO 3..... 36

EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA SOBRE LA MORTALIDAD DE *Triatoma infestans* SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A PIRETROIDES, EXPUESTOS A UNA CEPA NATIVA DE *Beauveria bassiana* DE LA REGIÓN CHAQUEÑA, SALTA-ARGENTINA

Linda Vanesa Baldiviezo
Nicolás Pedrini
Lucía Beatriz Nieva
Rubén Marino Cardozo

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.7072226013>

CAPÍTULO 4..... 47

PREVALÊNCIA DE CANDIDÍASE ORAL EM PACIENTES HIV POSITIVOS NO MUNICÍPIO DE NOVA IGUAÇU, RIO DE JANEIRO, BRASIL

Fernando Antonio Machado Miguel
Paulo Cesar Ribeiro
Paula Avelar da Silva Ribeiro Goulart
Marcus Heleno Borges Ribeiro
Claudia Maria Blanco Moreira Norberg
Paulo Roberto Blanco Moreira Norberg
Antonio Neres Norberg

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.7072226014>

CAPÍTULO 5.....58

**ELEMENTOS MICROBIANOS E PARASITÁRIOS ISOLADOS DE ESTUDANTES DA
ÁREA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE USUÁRIOS DE LENTES DE CONTATO**

Antonio Neres Norberg

Fernanda Castro Manhães

Paulo Cesar Ribeiro

Alcemar Antonio Lopes de Matos

Maria de Lourdes Ferreira Medeiros de Matos

Edyala Oliveira Brandão Veiga

Nicolau Maués Serra Freire (*in memoriam*)

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.7072226015>

SOBRE O ORGANIZADOR.....68

ÍNDICE REMISSIVO.....69

EFEECTO DE LA TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA SOBRE LA MORTALIDAD DE *TRITOMA INFESTANS* SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A PIRETROIDES, EXPUESTOS A UNA CEPA NATIVA DE *BEAUVERIA BASSIANA* DE LA REGIÓN CHAQUEÑA, SALTA-ARGENTINA

Data de aceite: 01/11/2021

Data de submissão: 08/10/2021

Linda Vanesa Baldiviezo

Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Naturales (FCN-UNSa)
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
Salta, Argentina
<https://orcid.org/0000-0003-2764-8002>

Nicolás Pedrini

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), CCT La Plata. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) - Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
La Plata, Argentina
<https://orcid.org/0000-0002-5383-8611>

Lucía Beatriz Nieva

Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Naturales, Cátedra de Zoología
Salta, Argentina
<https://orcid.org/0000-0003-0552-8851>

Rubén Marino Cardozo

Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Naturales, Cátedra de Fisiología Animal
Ministerio de Salud Pública de la Provincia de Salta
Salta, Argentina
<https://orcid.org/0000-0002-4968-658X>

RESUMEN: En el área endémica de *Triatoma infestans*, en la provincia de Salta-Argentina, se ha detectado la presencia de poblaciones resistentes a insecticidas piretroides y en consecuencia han ampliado su rango de distribución en los últimos años. Esto obliga a estudiar nuevas alternativas de control vectorial de la enfermedad de Chagas, tales como el biocontrol con hongos entomopatógenos. En este contexto, se evaluó la eficacia de una cepa nativa de *Beauveria bassiana* proveniente de la Región del Chaco Salteño. La virulencia se evaluó sobre grupos de ninfas de quinto estadio de *T. infestans* susceptibles y resistentes a insecticidas, expuestos a diferentes temperaturas de incubación: 19, 27 y $33 \pm 0,5$ °C con valores de humedad relativa (HR) de 35 y 90 ± 5 %. Las ninfas se inocularon con el hongo por inmersión en una suspensión de conidios con una concentración de 1×10^8 conidios/ml y controles con una solución de Tween 80 (0,01%). Los insectos tratados se colocaron en una cámara de prueba a temperatura y humedad relativa controlada según el tratamiento. Se registró diariamente la mortalidad por un periodo de 28 días post-infección. Se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($p < 0,0001$), no así, entre los distintos grupos de ninfas ($p = 0,6692$). La mortalidad para los tratamientos con una HR del 90 % fue del 100 y 88 % y el tiempo letal medio (TL50) varió entre 7,5 y 11,5 días; mientras que, para una HR del 35% la mortalidad fue ≤ 50 % con TL50 entre 26,5 y 28 días, para ambos grupos (Tukey $\alpha = 0,05$). Estos resultados preliminares indican que la cepa regional expresa mejor su patogenicidad a

una HR del 90%, independientemente de las temperaturas ensayadas y los grupos de ninfas, lo que constituye un dato muy relevante para el uso de esta cepa como bioinsecticida de *T. infestans* en futuros ensayos de campo.

PALABRAS CLAVES: *Triatoma infestans*, cepa nativa de *Beauveria bassiana*, resistencia a piretroides, control biológico, enfermedad de Chagas.

EFFECT OF TEMPERATURE AND RELATIVE HUMIDITY ON THE MORTALITY OF *TRITOMA INFESTANS* SUSCEPTIBLE AND RESISTANT TO PYRETHROIDS, EXPOSED TO A NATIVE STRAIN OF *BEAUVERIA BASSIANA* FROM THE CHAQUEÑA REGION, SALTA-ARGENTINA

ABSTRACT: In the endemic area of *Triatoma infestans*, in the province of Salta-Argentina, the presence of populations resistant to pyrethroid insecticides has been detected and consequently their range of distribution has expanded in recent years. This makes it necessary to study new alternatives for vector control of Chagas disease, such as biocontrol with entomopathogenic fungi. In this context, the efficacy of a native strain of *Beauveria bassiana* from the Chaco Salteño region was evaluated. Virulence was evaluated on groups of fifth-stage *T. infestans* nymphs susceptible and resistant to insecticides, exposed to different incubation temperatures: 19, 27 and 33 ± 0.5 °C with relative humidity (RH) values of 35 and 90 ± 5 %. Nymphs were inoculated with the fungus by immersion in a conidia suspension with a concentration of 1×10^8 conidia / ml and controls with a Tween 80 solution (0.01%). The treated insects were placed in a test chamber at controlled temperature and relative humidity according to the treatment. Mortality was recorded daily for a period of 28 days post-infection. Significant differences were found between the different treatments ($p < 0.0001$), but not between the different groups of nymphs ($p = 0.6692$). Mortality for treatments with a HR of 90% was 100 and 88% and the mean lethal time (TL50) ranged between 7.5 and 11.5 days; whereas, for an HR of 35%, mortality was $\leq 50\%$ with TL50 between 26.5 and 28 days, for both groups (Tukey $\alpha = 0.05$). These preliminary results indicate that the native strain better expresses its pathogenicity at a RH of 90%, regardless of the temperatures tested and the nymph groups, which constitutes a very important data for the use of this strain as a *T. infestans* bioinsecticide in future field trials.

KEYWORDS: *Triatoma infestans*, native strain of *Beauveria bassiana*, pyrethroid resistance, biological control, Chagas disease.

1 | INTRODUCCIÓN

Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae) es el principal vector de la enfermedad de Chagas en el Sur de América Latina y ha sido objeto de continuos programas de control para reducir el riesgo de transmisión de la enfermedad. Una de las estrategia de control empleada ha sido la aplicación, dentro de la vivienda, de insecticidas piretroides (SCHOFIELD & DÍAS, 1999). Sin embargo, se ha reconocido que esta estrategia tiene una eficacia limitada, principalmente en la Región Chaqueña que comparten Argentina, Bolivia y Paraguay (GUREVITZ *et al.*, 2013). Además, en los últimos años se ha documentado la aparición de poblaciones de *T. infestans* resistentes a piretroides en amplias regiones

de Bolivia y Argentina (CARDOZO *et al.*, 2010; GERMANO *et al.*, 2010; LARDEUX *et al.*, 2010). Estos aspectos han obligado a estudiar nuevas alternativas de control vectorial de la enfermedad de Chagas. Existe abundante información sobre la interacción *T. infestans* - *B. bassiana* que han mostrado resultados prometedores (LUZ *et al.*, 1998; JUÁREZ *et al.*, 2000; LECUONA *et al.*, 2001; PEDRINI *et al.*, 2009; FORLANI *et al.*, 2011; 2015; LOBO *et al.*, 2015; 2018; BALDIVIEZO *et al.*, 2020), incluso desde una perspectiva coevolutiva (MANNINO *et al.*, 2018).

El proceso de patogénesis depende de muchos factores que se relacionan con la interacción hongo-hospedador, como la capacidad de germinación, la tasa de crecimiento, rendimiento y la producción de esporas, entre otros factores (VARELA & MORALES, 1996; SAFAVI *et al.*, 2007; PEDRINI *et al.*, 2018). Estas propiedades permiten seleccionar cepas con características óptimas para lograr resultados de control efectivos; sin embargo, el hongo también necesita ser específico del huésped, virulento y adaptado a un entorno regional (DE LA ROSA *et al.*, 2002). En este sentido, la exploración de aislamientos locales es crucial para establecer programas de control biológico a largo plazo, efectivos y sostenibles.

En el presente trabajo, estudiamos el comportamiento de la virulencia de una cepa nativa de *B. bassiana* caracterizada por BALDIVIEZO *et al.* (2020), sobre ninfas de *T. infestans* susceptibles y resistentes a piretroides en diferentes condiciones de temperatura y humedad relativa; con el fin de evaluar su incorporación a los programas actuales de manejo de triatomíneos resistentes a piretroides en la provincia de Salta, Argentina.

2 | METODOLOGÍA

2.1 Aislamiento y cultivo de *Beauveria bassiana*

Se trabajó con la cepa nativa de *B. bassiana* denominada Bb-C001 (BALDIVIEZO *et al.*, 2020); aislada del cadáver de un *T. infestans* capturado en agosto de 2011 en la “Misión Aborigen el Cañaverál”, municipio de Santa Victoria Este, departamento Rivadavia, provincia de Salta, Argentina (22°16'52.78"S; 62°42'5.60"W) (Fig. 1).

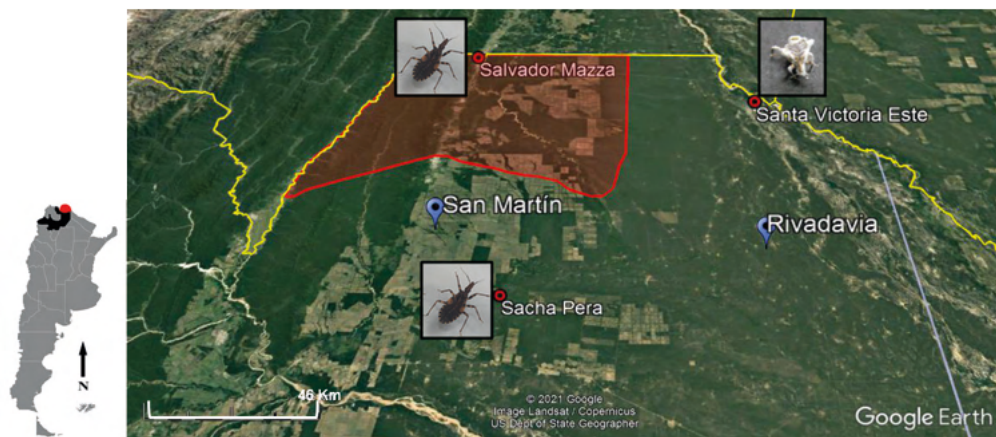


Figura 1. Muestra el lugar de procedencia de los *T. infestans* resistentes a piretroides en la localidad de Salvador Mazza y susceptibles a piretroides en la comunidad aborigen Sacha Pera, ambos lugares pertenecientes al departamento San Martín y el lugar donde se encontró la cepa nativa de *B. bassiana*, Santa Victoria Este, departamento Rivadavia, Salta-Argentina. El área en rojo, es zona de resistencia a piretroides detectada hasta el momento (PICOLLO *et al.*, 2005; CARDOZO *et al.*, 2010; GERMANO *et al.*).

La cepa se aisló del cadáver de un insecto infectado y se cultivó en Agar Papa Dextrosa (APD), a partir de esta fuente de inóculo; por aislamiento monospórico, se obtuvieron cultivos puros (Fig. 2).

La cepa se mantiene actualmente, en el cepario del Laboratorio de Investigación en Biocontroladores (LIBIOC-MSPS) a cargo del Ministerio de Salud Pública de Salta-Argentina, como cultivo esporulado en Glicerol (10 %) a - 20 °C; con el objetivo de preservarla en su estado original. Los ensayos de laboratorio, se llevaron a cabo en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Salta- Argentina (FCN-UNSa).

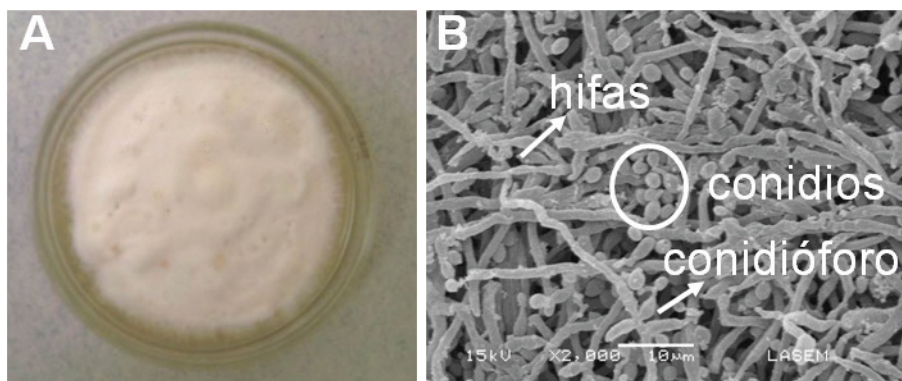


Figura 2. (A) Cultivo puro de la cepa Bb-C001 de *B. bassiana* en APD. (B) Vista al Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), marca JEOL Modelo JSM 6480 del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido (LASEM), INIQUI-CONICET, UNSa, donde se observan las estructuras del hongo.

2.2 Preparación de la suspensión de conidios, concentración y evaluación de la viabilidad

La suspensión de conidios para la realización de los bioensayos fue obtenida de la siguiente manera. A partir del cultivo puro del hongo, se sembraron placas con medio Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) suplementado con cutícula de vinchucas para incrementar su patogenicidad (GARCÍA *et al.*, 2001). Para la preparación del medio de cultivo se recolectaron vinchucas muertas del insectario del Bioterio de la FCN-UNSa, se las colocó en hipoclorito de sodio al 0,5% por 10 min., se lavó con agua destilada, luego se maceró en una solución amortiguadora fosfato pH 7,0, se adicionó 0,5 g del macerado a 100 ml del medio de cultivo SDA y se esterilizó la mezcla en autoclave a 120°C a 1 atm. de presión durante 20 min. Las placas se incubaron en estufa a 27 ± 2 °C de 10-15 días hasta observar esporulación. Los conidios se cosecharon raspando la superficie de la placa de Petri con una espátula en una cabina de bioseguridad en condiciones asépticas y se colocaron en un tubo Falcon con 15 ml de una solución estéril de Tween 80 (0,01%).

La concentración de conidios de la suspensión obtenida fue determinada por conteo directo usando un hemocitómetro o cámara de Neubauer. La misma fue ajustada a una concentración de 1×10^8 conidios/ml con Tween 80 (0,01 %) para realizar los bioensayos.

Para evaluar la viabilidad (porcentaje de germinación) se tomaron de la suspensión de conidios 5 alícuotas de 5μ cada una y se incubaron en placas con SDA a 27 ± 2 °C durante 24 horas. Se agregó azul de lactofenol y se observó al microscopio utilizando un objetivo de inmersión (100x). Se calculó el porcentaje de germinación como: $\text{N}^\circ \text{ de conidios germinados} / \text{N}^\circ \text{ total de conidios} \times 100$. Se consideró conidio germinado, a aquel cuyo tubo germinal tenía el doble del diámetro del conidio.

2.3 Cría de *Triatoma infestans*

Se trabajó con una progenie de ninfas de quinto estadio (V) de *T. infestans* susceptibles (S) provenientes de insectos capturados en “Misión Sachapera”, municipio de Tartagal, departamento San Martín (22°30'0"S; 63°50'0"W) y resistentes a piretroides (R); capturados en la localidad de Salvador Mazza, departamento San Martín (22°3'0"S; 63°42'0"W), provincia de Salta, Argentina (Fig. 1). Las colonias de insectos fueron mantenidas y criadas en condiciones controladas de temperatura (28 ± 1 °C), humedad relativa (50 -60 %) y fotoperiodo 12:12 horas (luz: oscuridad) en el insectario del Bioterio de la FCN-UNSa. Para la cría se emplearon cubas de plástico con un fondo y una tapa de malla plástica, en el fondo un soporte con una bandeja del mismo material para la recolección de los huevos en el caso de los adultos.

Los insectos fueron alimentados con sangre de ratones anestesiados con Ketamina. Todos los protocolos de cuidado animal y experimental de laboratorio se realizaron siguiendo el Reglamento del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y Estudios de Campo (CICUALEC) FCN-UNSa.

2.4 Bioensayos de infección

Para los bioensayos, las ninfas S y R de *T. infestans* fueron separadas de la cría y colocadas en frascos de plásticos, se encontraban en perfecto estado nutricional y con una semana de ayuno antes de iniciar los bioensayos. Los bioensayos consistieron en la inoculación del hongo por el método de inmersión, las ninfas fueron sumergidas de a una por vez, durante 10 segundos, dentro de una suspensión de conidios de *B. bassiana* (Bb-C001) con Tween 80 (0,01 %) a una concentración de 1×10^8 conidios/ml y una viabilidad del 90 %. Para los controles se utilizó una solución de Tween 80 (0,01 %). Una vez inoculados, los insectos fueron colocados en envases plásticos, en grupos de 10, tapados con una gasa de malla fina e incubados en una cámara de prueba a una temperatura (T°) y humedad relativa (HR) controlada según el ensayo.

2.5 Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre la mortalidad de los *T. infestans* expuestos a la cepa nativa de *B. bassiana*

Para evaluar el efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre la mortalidad de las ninfas de *T. infestans* tratadas con el hongo, el método utilizado fue modificado de LECUONA *et al.* (2001). Se utilizó una estufa con control de temperatura como cámara de prueba. Las temperaturas de incubación ensayadas fueron de 19, 27 y $33 \pm 0,5$ °C para valores de HR de 35 y 90 ± 5 %. Para obtener estos valores de HR, se utilizó silica gel para reducir y mantener la humedad dentro de la cámara al 35 % y gasas humedecidas con agua estéril para una HR del 90 %, con recambio continuo. Tanto la humedad como la temperatura, fueron monitoreadas con un Datalogger programable de Maxithermal (precisión: $\pm 0,5$ °C y $\pm 5\%$) que se colocó dentro de la cámara de prueba.

Se realizaron tres réplicas de 10 ninfas por grupo (S y R) y tratamiento (seis

combinaciones de T° y HR). Se registró la mortalidad diaria durante 28 días después de la infección fúngica. Los insectos muertos, se separaron diariamente y se colocaron en cámara húmeda a 27 °C para confirmar la muerte por micosis (Fig. 5).



Figura 5. Ninfas de *T. infestans* con signos de micosis.

2.6 Análisis estadístico

Los porcentajes de mortalidad calculados en cada tratamiento, fueron analizados estadísticamente utilizando ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples Tukey ($\alpha=0.05$). Se calculó el Tiempo Letal Medio (TL50), que informa el tiempo (días) en el que muere el 50 % de los insectos infectados en las distintas condiciones ensayadas y se construyeron curvas de supervivencia por el método de Kaplan-Meier. Se utilizó el software GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) para el análisis estadístico.

3 | RESULTADO Y DISCUSIÓN

Al comparar el efecto de las distintas T° y HR ensayadas sobre la mortalidad de las ninfas de *T. infestans*, el ANOVA mostró diferencias significativas entre ellas ($F=24,59$; $p<0,0001$), no así, entre los distintos grupos (R y S) ($F=0,19$; $p=0,6692$).

Los porcentajes de mortalidad calculados para cada combinación de temperatura y HR en los distintos grupos de ninfas, se muestran en la Tabla 1.

T (°C)	HR (%)	Susceptibles		Resistentes		Mtemp *
		Mort (%)	TL50 (días)	Mort (%)	TL50 (días)	
19	35	40	In	50 (5,7)	26,5	45 (3,4) A
	90	100	9	100	10	100 B
27	35	87 (8,8)	11,5	77 (3,3)	11	82 (4,7) B
	90	100	8	100	9	100 B
33	35	50 (6,6)	28	50 (5,9)	28	50 (8,6) A
	90	83 (8,8)	8	93 (3,3)	7,5	88 (4,7) B
Mgrupo **		76,7 (6,2) a		78,3 (5,7)a		

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad y TL50 de las ninfas de *T. infestans* tratadas con la cepa Bb-C001 de *B. bassiana* y mantenidas a diferentes temperaturas y niveles de humedad relativa.

T= Temperatura, HR= Humedad relativa, Mort= Porcentaje de mortalidad ($\pm$ SE) de ninfas susceptibles y resistentes 28 días después de la infección, TL50= Tiempo Letal para el 50 % de mortalidad, In= No alcanzo el 50 % de mortalidad. * Mortalidad media ($\% \pm$ SE) de los dos grupos para cada temperatura y humedad relativa ensayada. ** Mortalidad media ($\% \pm$ SE) de cada grupo de ninfas en todas las temperaturas y humedades relativas ensayadas. Medias seguidas de letras mayúsculas o minúsculas distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Los valores más altos de mortalidad, entre 100 % y 88 %, se registraron para los tratamientos con una HR del 90 %, para todas las temperaturas en ambos grupos de ninfas y fueron estadísticamente diferentes de los tratamientos con una HR 35 %; que exhibieron una mortalidad $\leq$ 50 %, excepto el de temperatura de 27 °C que registró un valor del 82 % (Tukey $\alpha=0,05$).

La figura 6 muestra las curvas de supervivencia para cada grupo y temperatura en ambas condiciones de HR. Las ninfas S y R expuestas a una HR del 35 %, alcanzaron una supervivencia máxima del 50 % a 19 y 33 °C; excepto a 27 °C que fue mayor. El TL50 varió entre 26,5 y 28 días. Para una HR 90 %, la supervivencia se registró por debajo del 20 % para todos los casos ensayados y los valores de TL50 oscilaron entre 7,5 y 11,5 días (Tabla 1; Fig. 6).

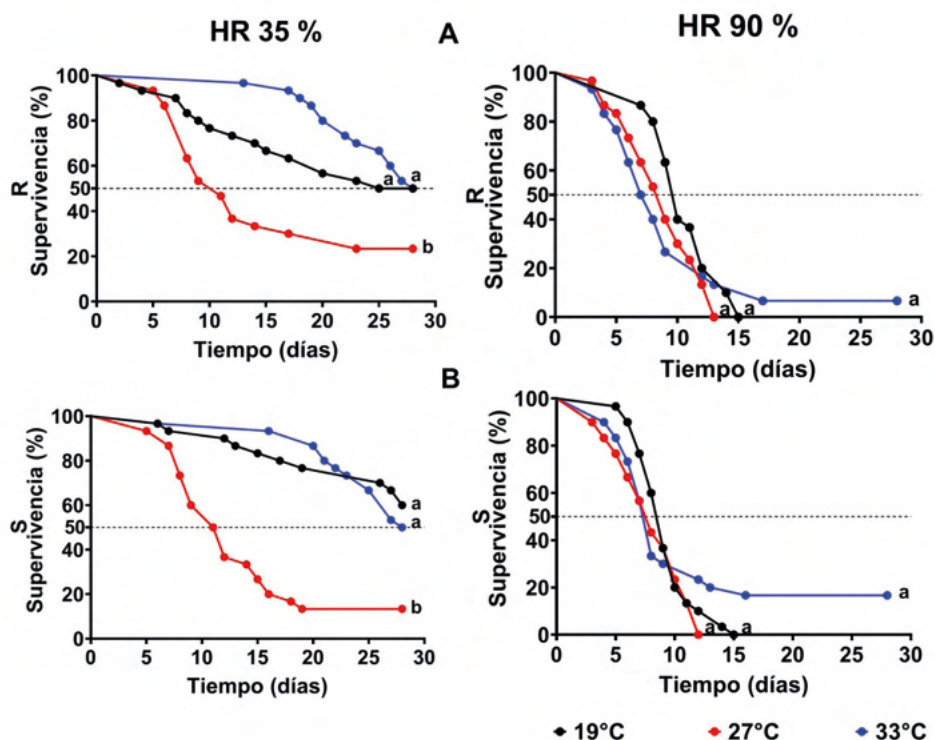


Figura 6. Curvas de supervivencia de las ninfas de *T. infestans* inoculadas con el hongo y expuestas a distintas temperaturas y humedades relativas (HR). (A) Ninfas resistentes a piretroides (R). (B) ninfas susceptibles (S). No se observaron insectos muertos en los controles. Letras distintas indican diferencias significativas en las curvas de supervivencia según la prueba de Kaplan y Meier ($\alpha = 0,05$).

Tanto para las ninfas S como R la función de supervivencia disminuyó más rápidamente a una HR del 90%, independientemente de las temperaturas evaluadas, lo que indica; que la cepa nativa de *B. bassiana* (Bb-C001) es más dependiente de la HR que de la temperatura. Estos resultados difieren de los encontrados por LECUONA *et al.* (2001), quienes mostraron que la infección de *B. bassiana* sobre *T. infestans* ocurrió independientemente de la humedad relativa.

LUZ y FARGUES (1998), señalaron que la humedad relativa es más importante para la esporulación del hongo en cadáveres de insectos que para la penetración e infección del hongo. Nuestros resultados contradicen esta afirmación, ya que en la interacción *T. infestans* – *B. bassiana*, la humedad relativa es el factor más importante involucrado en la expresión de patogenicidad independientemente de las temperaturas evaluadas.

Teniendo en cuenta que *T. infestans* es muy activo en la Región del Chaco Argentino durante la temporada más cálida (entre 25 y 32 °C) y húmeda (entre 62 % y 82%) (GORLA; SCHOFIELD, 1985), el comportamiento observado de la cepa Bb-C001 de *B. bassiana* bajo un rango de temperatura y humedad relativa similar, apoya la prueba de esta cepa como

bioinsectida en el área endémica.

4 | CONCLUSIÓN

Estos resultados preliminares indican que la cepa Bb-C001 de *B. bassiana*, expresa mejor su patogenicidad a una HR alta (90%), independientemente de las temperaturas evaluadas en ambos grupos de ninfas (S y R), lo que constituye un dato muy importante para el uso de esta cepa como un bioinsecticida de *T. infestans* en futuros ensayos de campo.

REFERENCIAS

BALDIVIEZO, L. V., PEDRINI, N., SANTANA, M. *et al.* Isolation of *Beauveria bassiana* from the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans* in the Gran Chaco Region of Argentina: Assessment of Gene Expression during Host-Pathogen Interaction. **Journal of Fungi**, 6, n. 4, p. 219, 2020.

CARDOZO, R. M., PANZERA, F., GENTILE, A. G., SEGURA, M. A. *et al.* Inheritance of resistance to pyrethroids in *Triatoma infestans*, the main Chagas disease vector in South America. **Infection, Genetics and Evolution**, 10, n. 8, p.1174-1178, 2010.

DE LA ROSA, W., LOPEZ, F. L., LIEDO, P. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology**, 95, n. 1, p.36-43, 2002.

FORLANI, L., PEDRINI, N., JUÁREZ, M. P. Contribution of the horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the overall performance of a fungal powder formulation against *Triatoma infestans*. **Research and Reports in Tropical Medicine**, 2, p.135–140, 2011.

FORLANI, L., PEDRINI, N., GIROTTI, J. R. *et al.* Biological control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* combined with an aggregation cue: field, laboratory and mathematical modeling assessment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 9, n. 5, p. e0003778, 2015.

GARCÍA, M. T. G., JIMÉNEZ, A. V., PARDEY, A. E. B. Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo. **Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)**, 60, p. 31-35, 2001.

GERMANO, M. D., ACEVEDO, G. R., CUETO, G. M. *et al.* New findings of insecticide resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from the Gran Chaco. **Journal of Medical Entomology**, 47, n. 6, p.1077-1081, 2010.

GORLA, D. E., SCHOFIELD, C. J. 1985. Analysis of egg mortality in experimental populations of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in Argentina. **Bull. Soc. Vector Ecol**, 10, p. 107-117, 1985.

GUREVITZ, J. M., GASPE, M. S., ENRIQUEZ, G. F. *et al.* Intensified surveillance and insecticide-based control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in the Argentinean Chaco. **PLoS Neglected and Tropical Diseases**, 7, n. 4, p. e2158, 2013.

JUÁREZ, M. P., CRESPO, R., CALDERÓN-FERNÁNDEZ, G. *et al.* Characterization and carbon metabolism in fungi pathogenic to *Triatoma infestans*, a Chagas disease vector. **Journal of Invertebrate Pathology**, 76, p.198–207, 2000.

LARDEUX, F., DEPICKERE, S., DUCHON, S., CHAVEZ, T. Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. **Tropical Medicine and International Health**, 15, n. 9, p.1037-1048, 2010.

LECUONA, R. E., EDELSTEIN, J. D., BERRETTA, M. F. *et al.* Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potential agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**, 38, n. 2, p.172–179, 2001.

LOBO, L. S., LUZ, C., FERNANDES, É. K. K. *et al.* Assessing gene expression during pathogenesis: Use of qRT-PCR to follow toxin production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during infection and immune response of the insect host *Triatoma infestans*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 128, p.14–21, 2015.

LOBO, L. S., GIROTTI, J. R., MIJAILOVSKY, S. J. *et al.* Synthesis and secretion of volatile short-chain fatty acids in *Triatoma infestans* infected with *Beauveria bassiana*. **Medical and Veterinary Entomology**, 32, n. 3, p. 358-364, 2018.

LUZ, C., SILVA, I. G., CORDEIRO, C. M. *et al.* *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) as a possible agent for biological control of Chagas disease vectors. **J. Med. Entomol.**, 35, p. 977-979, 1998.

LUZ, C., FARGUES, J. Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. **J. Invertebr. Pathol.**, 72, p. 97-103, 1998.

MANNINO, M. C., JUÁREZ, M. P., PEDRINI, N. Tracing the coevolution between *Triatoma infestans* and its fungal pathogen *Beauveria bassiana*. **Infection, Genetics and Evolution**, 66, p.319-324, 2018.

PEDRINI, N., MIJAILOVSKY, S. J., GIROTTI, J. R. *et al.* Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. **PLoS Neglected and Tropical Diseases**, 3, n. 5, p. e434, 2009.

PEDRINI, N. Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. **Fungal Biology**, 122, p. 538-545, 2018.

PICOLLO, M. I., VASSENA, C., ORIHUELA, P. S. *et al.* High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. **Journal of Medical Entomology**, 42, n. 4, p. 637-642, 2005.

SAFAVI, S. A., SHAH, F. A., PAKDEL, A. K. *et al.* Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **FEMS Microbiology Letters**, 270, n. 1, p.116-123, 2007.

SCHOFIELD, C.J., DÍAS, J.C. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. **Advances in Parasitology**, 42, p.1-27, 1999.

VARELA, A., MORALES, E. Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 67, n. 2, p.147-152, 1996.