



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Estudio integral de la resistencia a insecticidas en  
*Triatoma infestans* (Reduviidae: Triatominae) del Gran  
Chaco**

Tesis presentada para optar al Título de Doctora de la Universidad de Buenos  
Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Lic. Georgina Fronza**

Director de tesis: Dr. Gastón Mougabure Cueto

Director asistente: Dr. Ariel Toloza

Consejero de Estudios: Dra. Irina Izaguirre

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN-  
UNIDEF- CONICET)

Buenos Aires, 2019

# ÍNDICE

---

<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>7</b>
 <b>INTRODUCCIÓN.....</b>	 <b>9</b>
La Enfermedad de Chagas.....	10
<i>Triatoma infestans</i> y su rol como vector .....	12
El control vectorial con insecticidas piretroides.....	14
Fracasos en el control vectorial: el problema de la resistencia.....	17
El manejo de la resistencia a piretroides .....	22
Mecanismos de resistencia .....	23
Aumento de degradación enzimática: oxidasas y esterasas.....	24
Modificación del sitio de acción: mutaciones <i>kdr</i> .....	25
El Gran Chaco .....	27
 <b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....</b>	 <b>31</b>
 <b>CAPÍTULO 1: Determinación de los perfiles de susceptibilidad y resistencia a un insecticida piretroide y un insecticida fosforado en poblaciones de <i>Triatoma infestans</i> de diferentes provincias endémicas de Argentina .....</b>	 <b>33</b>
La importancia de las curvas dosis-respuesta.....	34
Metodología para cumplir el objetivo 1 .....	38
Recolección y cría de insectos.....	39
Ensayos toxicológicos en ninfas I .....	39
Ensayos toxicológicos en huevos .....	40
Análisis estadístico .....	41
Resultados del capítulo 1.....	42
Discusión del capítulo 1 .....	52
 <b>CAPÍTULO 2: Evaluación de la importancia de la detoxificación enzimática incrementada como mecanismo de resistencia en los focos resistentes detectados .....</b>	 <b>57</b>
El estudio del mecanismo de detoxificación incrementada.....	58
Metodología para cumplir el objetivo 2 .....	60
Poblaciones analizadas .....	60
Puesta a punto .....	60

Ensayos de inhibición de oxidasas: exposición a superficies impregnadas con PBO .....	62
Ensayos de inhibición de esterasas: tóxico con TPP .....	64
Análisis estadístico .....	64
Resultados del capítulo 2 .....	66
Discusión del capítulo 2 .....	69
 <b>CAPÍTULO 3: Descripción de la presencia y la frecuencia de las mutaciones del tipo <i>kdr</i> en el canal de sodio dependiente de voltaje como mecanismo de las poblaciones resistentes</b> .....	<b>76</b>
Herramientas de Biología Molecular para el estudio de la resistencia .....	77
Metodología para cumplir el objetivo 3 .....	80
Poblaciones analizadas .....	80
Puesta a punto .....	80
Protocolo general .....	81
Mutación L1014F .....	83
Mutación L925I .....	85
Protocolo definitivo .....	86
Resultados del capítulo 3 .....	88
Discusión del capítulo 3 .....	94
 <b>CAPÍTULO 4: Caracterización de la influencia de variables ambientales implicadas en la evolución de la resistencia</b> .....	<b>99</b>
Modelado de la asociación de la resistencia con las variables ambientales .....	100
Metodología para cumplir el objetivo 4 .....	103
El GR <sub>50</sub> como variable respuesta .....	103
Predictores de resistencia .....	104
Descripción año a año .....	107
Modelado de la resistencia .....	109
Resultados del capítulo 4 .....	110
Descripción año por año .....	110
Modelado de la resistencia .....	114
Discusión del capítulo 4 .....	117
 <b>CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES</b> .....	<b>125</b>
 <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>128</b>
<b>PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO DE TESIS</b> .....	<b>148</b>

## RESUMEN

---

La enfermedad de Chagas afecta a más de un millón y medio de personas en Argentina y es transmitida principalmente por la vinchuca *Triatoma infestans* (Klug, 1834). El control químico del vector con insecticidas piretroides constituye la herramienta más utilizada para reducir la incidencia de la enfermedad. En los últimos años se han detectado fallas de control a campo en zonas del Gran Chaco Argentino, corroborándose en el laboratorio la ocurrencia de resistencia. El objetivo de esta tesis fue avanzar en el conocimiento de la evolución de la resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *T. infestans* mediante el uso combinado de herramientas de la toxicología, la genética y la ecología. Se analizó la distribución de la susceptibilidad en 69 poblaciones recolectadas en relevamientos entomológicos realizados por el Programa Nacional de Chagas y criadas en el laboratorio. Como resultado del análisis toxicológico, el 83% de las poblaciones resultaron susceptibles a deltametrina, todas ellas pertenecientes a las provincias de Mendoza, San Juan, Tucumán, Santiago del Estero, Formosa, Catamarca y Chaco. Sólo se hallaron poblaciones resistentes en el Departamento chaqueño de Gral. Güemes. En este lugar, se caracterizó un patrón toxicológico complejo, compuesto por un 23% de poblaciones susceptibles, un 41% de poblaciones con baja resistencia (sin fallas de control a campo) y un 36% de poblaciones con alta resistencia, estas últimas con los grados de resistencia (GR) más elevados detectados hasta el momento. La totalidad de las poblaciones resistentes a deltametrina resultó susceptible a fenitrotión, remarcando la importancia de este insecticida como la única alternativa de control a campo. Los ensayos bioquímicos en las poblaciones del foco resistente evidenciaron el aumento en la actividad de las enzimas degradativas oxidasas P450 y esterasas como mecanismo contributivo de la resistencia observada. Sin embargo, frecuencias altas de la mutación puntual L925I en el sitio de acción de los piretroides (el canal de sodio dependiente de voltaje) estarían determinando los GR elevados. Finalmente, se logró explicar el 70% de la variabilidad toxicológica del foco a partir de predictores de temperatura, precipitación y extensión del paraje. Las variables de rociado, usadas como indicadores de la presión de selección por parte del insecticida, no contribuyeron a explicar el patrón toxicológico.

Se propone que el ambiente podría estar modulando la presión de selección del insecticida, promoviendo la variabilidad toxicológica en una zona de gran complejidad en cuanto al control de *T. infestans*. Este conocimiento busca contribuir a generar estrategias integrales de control vectorial que permitan reducir la incidencia de la enfermedad.

**Palabras clave:** *T. infestans*, piretroides, resistencia, Gran Chaco, mecanismos, factores ambientales

**Comprehensive study of insecticide resistance in *Triatoma infestans*  
(Reduviidae: Triatominae) of the Gran Chaco**

## ABSTRACT

---

In Argentina, Chagas disease affects more than one and a half million people and is mainly transmitted by the kissing bug *Triatoma infestans* (Klug, 1834). Chemical control of the vector with pyrethroid insecticides has been the most frequently used tool to reduce the disease incidence. Recently, failures of field control have been detected in areas of the Argentinian Gran Chaco, and then the emergence of resistance has being corroborated in the laboratory. The main goal of this thesis was to advance in the knowledge of the evolution of the resistance to insecticides in field populations of *T. infestans* by the integration of several fields like toxicology, genetics and ecology. The distribution of susceptibility was analyzed in 69 populations collected in entomological surveys carried out by the National Chagas Program. From the toxicological analysis, 83% were susceptible to deltamethrin and were from the provinces of Mendoza, San Juan, Tucumán, Santiago del Estero, Formosa, Catamarca and Chaco. The only resistant populations were found in Gral. Güemes Department (Chaco province). In this area, a complex toxicological pattern was found that consisted of 23% of susceptible populations, 41% of populations with low resistance (without field control failures) and 36% of populations with high resistance. It is interesting to note that these latter possessed the highest degrees of resistance (RR) detected of the moment. All the populations resistant to deltamethrin were susceptible to fenitrothion, highlighting the importance of this insecticide as the only field control alternative. The biochemical tests in the populations of the resistant focus showed the increase in the activity of the degradative enzymes P450 oxidases and esterases as contributive mechanism of the resistance characterized. The genetics study revealed high frequencies of the L925I mutation at the site of action of the pyrethroids (the voltage-gated sodium channel) might be the responsible of the high RRs. Finally, the ecological analysis showed that 70% of the toxicological variability of the focus could be explained from temperature, precipitation and village extension predictors. Spray variables, used as indicators of the selection pressure by the insecticide, did not contribute to explain the toxicological pattern. It is proposed that the environment could be modulating the selection pressure of the

insecticide, promoting toxicological variability in an area of great complexity regarding the control of *T. infestans*. This thesis contribute to the generation of comprehensive vector control strategies that reduce the incidence of the disease.

**Keywords:** *T. infestans*, pyrethroids, resistance, Gran Chaco, mechanisms, environmental factors

# AGRADECIMIENTOS

---

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de las instituciones en las que se enmarca: el CIPEIN, el CONICET, la ANPCyT, la FCEN- UBA, el CeReVe, el Programa Nacional de Chagas de lo que hasta hace poco fue el Ministerio de Salud.

Un día de febrero llegué al CIPEIN y me recibió un triunvirato inolvidable. Ni me imaginaba que casi 5 años después, estaría inmensamente agradecida por todo lo que hicieron para que esta tesis llegue a destino.

A Mariné por poner su enorme granito de arena para que nuestro grupo funcione, por tener siempre la respuesta justa para un sinfín de preguntas.

A Gasti por los primeros meses transmitiéndome desde la teoría detrás de una  $DL_{50}$  hasta el manejo de los bichos en el insectario, pasando por nuestras elucubraciones epistemológicas y sociales. Por aportarle siempre profundidad conceptual a la tesis, por apoyar mi mundo fuera de ella y por los últimos años acompañando desde Punilla como si esos kilómetros fueran inexistentes.

A Ari por ser el ser el sostén de la cotidianidad de esta tesis: por ayudarme a pensar cuando decía que quería que se me ocurra una idea, por tirarme una soga cuando caía irremediabilmente al pozo de los resultados negativos, por encontrarle siempre la vuelta a mis inquietudes.

A l@s tres, por la confianza, la comprensión y la libertad durante el trabajo compartido.

A mis compañer@s del CIPEIN, por hacer que el laboratorio sea un lugar de aprendizaje, reflexión y rituales gastronómicos varios. A Gonza por poner toda su dedicación y sabiduría informática al servicio de esta tesis. A Marian, Fede, Lizzy y Agus por el aguante diario y la terapia colectiva. A Fer por cuidar las vinchus y a Mirtu por cuidar el papelerío. Al equipo de vóley científico que le dio un componente deportivo impensado al trabajo. A l@s ex cipeineanos/as que me ayudaron a pensar cuestiones varias sobre la vida científica (en orden de salida): Vale, Moni, Eduardo y Toti.

Al entramado imperceptible de gente y trabajo que está detrás de este manuscrito: a los técnicos del Programa que me guiaron y enseñaron en Castelli, a Selva Rodríguez por recopilar la tan necesaria información de rociado, a Paula Sartor y Yanina Maza por el soporte logístico.

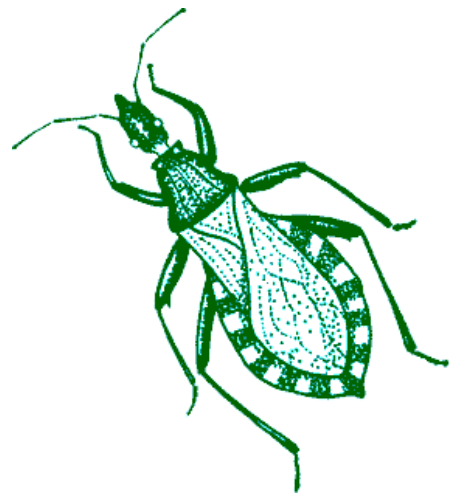


A las chicas del CREG por las horas dedicadas al aprendizaje de los protocolos y por los ánimos cuando la biología molecular se tornaba muy ingrata.

A Anibal Carbajo por darle una vuelta de tuerca al capítulo de variables ambientales y creer que de las múltiples preguntas que se desprendían podíamos pensar conjuntamente un buen proyecto de postdoc.

A Isabel Gómez Villafañe por impulsarme a seguir este camino. A Romi Piccinalli y Seba Minoli por sus aportes constructivos en nuestras reuniones de Comité de Seguimiento.

Y por afuera de esta tesis, pero transversal a todo, a l@s indispensables. A mis viej@s Miriam y Jorgito, a mis herman@s Dani y Die, a mis amigas de la vida que forman un círculo de contención invisible y poderoso: Lau, Meli, Nati, Celeschi, Jaz, Pam. A mis compañer@s de casa por mis reiteradas ausencias en el último tiempo de escritura. Al Profesorado Dora Acosta por ser el contrapeso cuando el acedemicismo me abruma. Y a Juampi, por la magia literaria, el mate con miel antes de trabajar y el amor compañero.



# INTRODUCCIÓN

# INTRODUCCIÓN

---

*“No pude descansar por haberme visto atacado por un numeroso y sanguinario grupo de las grandes chinches negras de las Pampas, pertenecientes al género *Benchuca*, una especie de *Reduvius* (...) Antes de efectuar la succión son muy delgados, pero después se redondean y llenan de sangre, y en este estado se los aplasta con facilidad (...) La herida no causaba dolor.”*  
Darwin (1845)

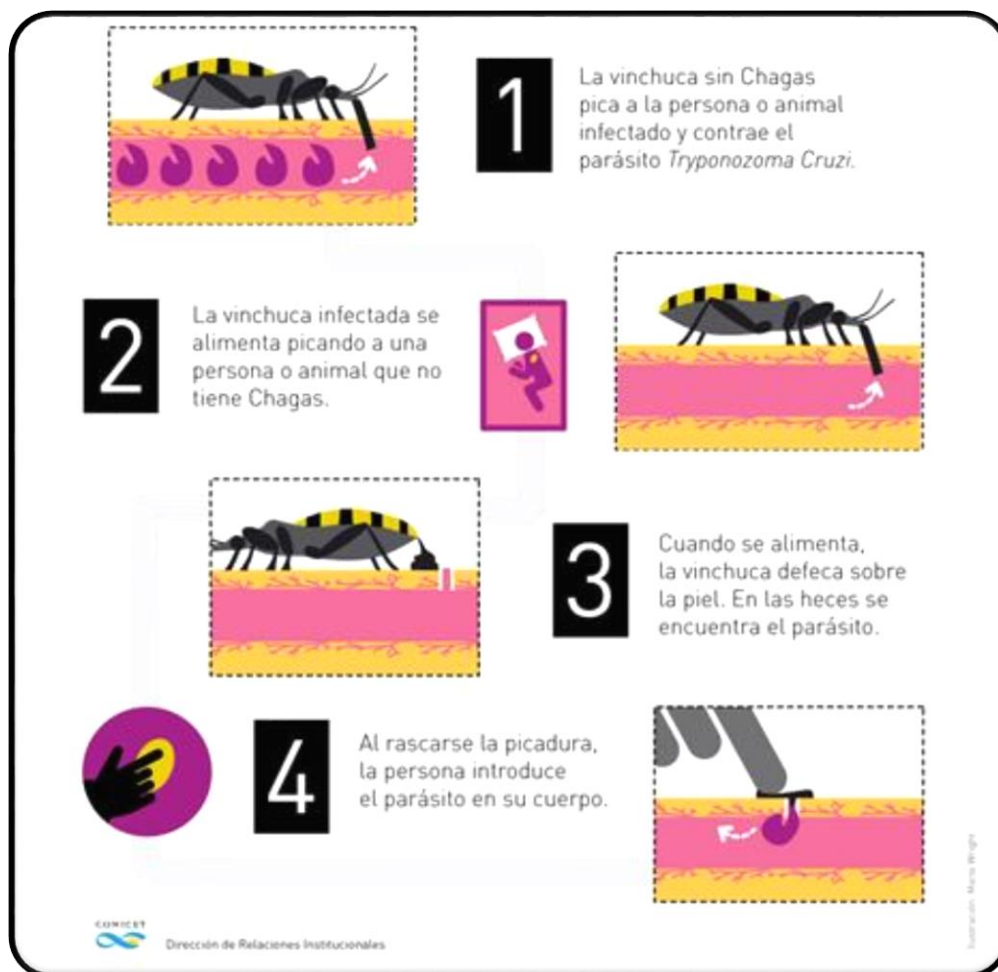
## La enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas constituye uno de los problemas de salud pública más graves de América Latina. Esta endemia, una de las más expandidas del continente, afecta entre 6 y 7 millones de personas en el mundo, de las cuales alrededor de 1,5 millones viven en Argentina (OMS 2018). Debido a los fenómenos de urbanización, globalización y migración humana de las últimas décadas, el Chagas dejó de ser un problema únicamente rural y una realidad exclusiva de Latinoamérica para transformarse en una problemática cosmopolita (Briceño León y Galván 2007). De esta manera, también se ha extendido a Europa, Canadá, Nueva Zelanda y Australia (Schipper et al. 1980, Perez Molina et al. 2011, Jackson et al. 2014).

La enfermedad pasa por dos etapas sucesivas, una fase aguda y una fase crónica. La primera dura de 6 a 8 semanas. Una vez concluida, la mayoría de los pacientes infectados parecen saludables y no es posible detectar el daño de órganos a través de los métodos de diagnóstico clínico estándar, sino que es necesario recurrir a serología o pruebas parasitológicas para detectar la infección. Esta condición de la fase crónica de la enfermedad de Chagas se llama forma indeterminada y en la mayoría de los pacientes persiste por tiempo indefinido. Sin embargo, varios años después de que haya comenzado la fase crónica (que dura por el resto de la vida) el 10-40% de las personas infectadas, dependiendo de la zona geográfica, desarrolla lesiones en varios órganos, principalmente el corazón y el sistema digestivo. Esta condición se conoce como la forma cardíaca o digestiva de la fase crónica (OMS 2002).

El agente etiológico es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Este parásito asume diferentes tipos morfológicos y funcionales que se alternan entre hospedadores invertebrados y vertebrados, presentando distintas formas replicativas e infectivas en los

dos grupos (Rojas Cortez et al. 2007). *T. cruzi* tiene un ciclo de vida complejo con formas extra e intracelulares y la cronicidad de la patogénesis ha contribuido a que esta tripanosomiasis sea una enfermedad "silenciosa" y muy postergada en políticas de salud pública (Flores Ferrer et al. 2017). El parásito se transmite a los seres humanos y a otros mamíferos a través de las deyecciones de insectos hemípteros hematófagos, conocidos como vinchucas. Actualmente se conocen más de 140 especies de triatominos (Lazzari et al. 2013), de las cuales más de la mitad se infectan en forma natural con el *T. cruzi* (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas. Fuente: Dirección de Relaciones Institucionales CONICET.

Las especies de vinchucas vectoras más importantes desde el punto de vista epidemiológico son aquellas que colonizan las viviendas humanas y están generalmente confinadas a los ambientes domésticos y peridomésticos de las zonas rurales, semirurales y periurbanas (Schofield 1994). De esta manera, la domiciliación es uno de los factores

que define el nivel de contactos humanos/vector, que a su vez tiene implicancias importantes a la hora de diseñar intervenciones de control eficientes (Dujardin et al. 2002, Waleckx et al. 2015, Abad Franch 2016).

Otras formas de transmisión del parásito son la transfusión de sangre, el trasplante de órganos de donantes infectados, la transmisión congénita de madres infectadas a hijos/as, la ingestión de sustancias contaminadas con los excrementos de los insectos infectados y algunos casos aislados de accidentes laborales. Sin embargo, los registros epidemiológicos indican que las formas anteriores son menos frecuentes que la transmisión vectorial. Incluso, a partir del año 2000 se ha registrado un aumento de casos agudos de Chagas con origen vectorial notificados por distintas provincias argentinas, aún teniendo en cuenta que pueden ser solo una pequeña fracción de los ocurridos (Gürtler 2007).

Es preciso mencionar que, dadas las características del contexto donde el Chagas existe, se trata de un problema complejo, profundamente social, que supera los límites de lo biomédico. En consecuencia, requiere aproximaciones de investigación, prevención, control y tratamiento que brinden respuestas integrales, acordes a las particularidades de los escenarios actuales (Sanmartino 2006, Briceño León y Galván 2007).

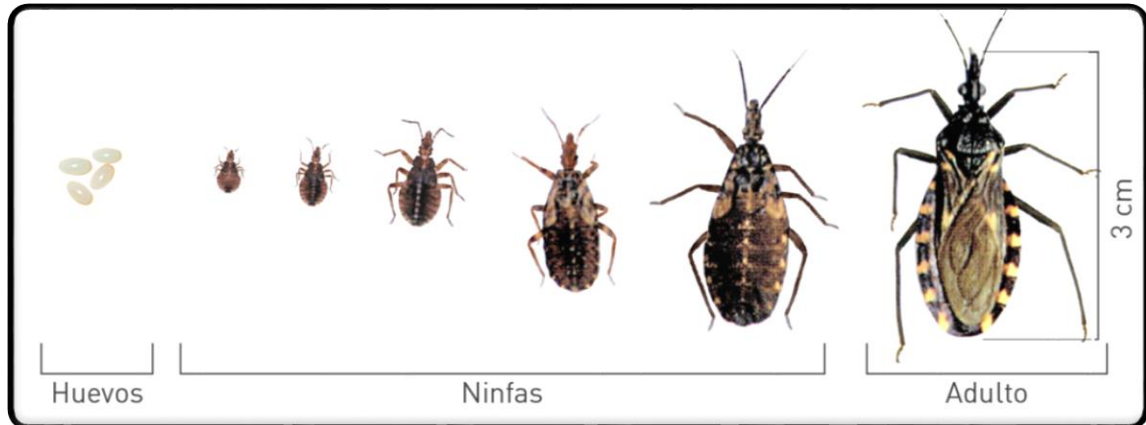
### ***Triatoma infestans* y su rol como vector**

El principal vector de *T. cruzi* en el Cono Sur es la vinchuca *Triatoma infestans* (Klug 1834) (Hemiptera: Reduviidae), una chinche hematófaga obligada que se encuentra adaptada a hábitats domésticos y peridomésticos a lo largo de su área de distribución (Schofield, 1988), aunque también existen registros de poblaciones silvestres (Noireau et al. 2005) (Figura 2).



**Figura 2.** La vinchuca hematófaga *T. infestans*.

Es un insecto hemimetábolo que presenta cinco estadios ninfales que comparten el hábito alimentario de los adultos. Dicha característica actúa como factor determinante en el éxito de *T. infestans* como vector de *T. cruzi*, ya que el total de la población de insectos está involucrado en el ciclo de transmisión (Figura 3).



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

Por otra parte, cada estadio ninfal necesita de solo una comida a repleción para estimular la muda, aunque la mayoría de las veces toman varias comidas más pequeñas, dado que son fácilmente interrumpidos por los huéspedes (Schofield 1994). Si bien todos los estadios de esta especie presentan hábito hematófago, existen estudios que indican que la preferencia alimentaria es variable con el estadio y el sitio de refugio. De hecho, los estudios realizados por Wisnivesky Colli et al. (1982) concluyeron que el contenido gástrico de los insectos hallados en dormitorios correspondía en mayor medida a sangre de perro, y en menor a la de humano. Además, se detectó que las ninfas se alimentaban de perro más frecuentemente que los adultos. Por el contrario, los insectos cuyo refugio radicaba en el peridomicilio se alimentaron más frecuentemente de animales de cría como las cabras y gallinas. Estos estudios indicaron además que los insectos de los dormitorios presentaban mayor infección con *T. cruzi* que los de peridomicilios. Gürtler et al. (2005, 2007) estudiaron el rol de las mascotas en la dinámica de la enfermedad y determinaron que tanto perros como gatos representan importantes reservorios para la transmisión del parásito al humano. Además, la preferencia alimentaria de *T. infestans* varió entre las estaciones del año, alimentándose preferentemente de perros y gallinas en las estaciones cálidas, y de humanos en la estación fría (Gürtler et al. 1997).

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

En relación a la dispersión del vector, en algunas regiones las poblaciones silvestres de *T. infestans* se encuentran en las proximidades de las áreas habitadas por seres humanos. Los vectores adultos (alados) pueden transmitir la enfermedad al entrar en contacto directo con las personas o sus alimentos e incluso pueden infestar las viviendas y establecer colonias de cría (Abad Franch 2009). Vázquez Prokopec et al. (2004) estudiaron la dispersión por vuelo hacia los peridomicilios en el Gran Chaco y determinaron que ocurría en el verano tardío, asociada con el bajo grado nutricional de los insectos (estimado como peso/ longitud) y las altas temperaturas. Por lo tanto, en esta ecorregión, donde *T. infestans* está ampliamente distribuida, debe prestarse especial atención a los eventos de recolonización posteriores al control.

## El control vectorial con insecticidas piretroides

Dentro del área de la salud pública, la tripanosomiasis americana es difícil de tratar. Sólo se cuenta con dos drogas, nifurtimox y benznidazol, que deben ser aplicadas en los primeros días posteriores a la infección y bajo supervisión médica, dado que no están exentas de efectos secundarios. El tratamiento es más efectivo cuanto más reciente sea la infección y menor sea la edad del paciente, ya que ambas drogas son mejor toleradas por niños/as (Bern et al. 2007). Además, *T. cruzi* es antigénicamente complejo y puede provocar reacciones autoinmunitarias, por lo tanto, la posibilidad de elaborar una vacuna segura y eficaz se considera hoy como muy remota (Tyler y Engman 2001). Por estos

motivos, los programas de control en países endémicos se basan principalmente en la detección en donantes de sangre para reducir el riesgo de transmisión transfusional, la detección temprana en mujeres gestantes infectadas para evitar la transmisión materna y, sobre todo, la eliminación de los vectores triatomínicos domésticos (OMS 2006).

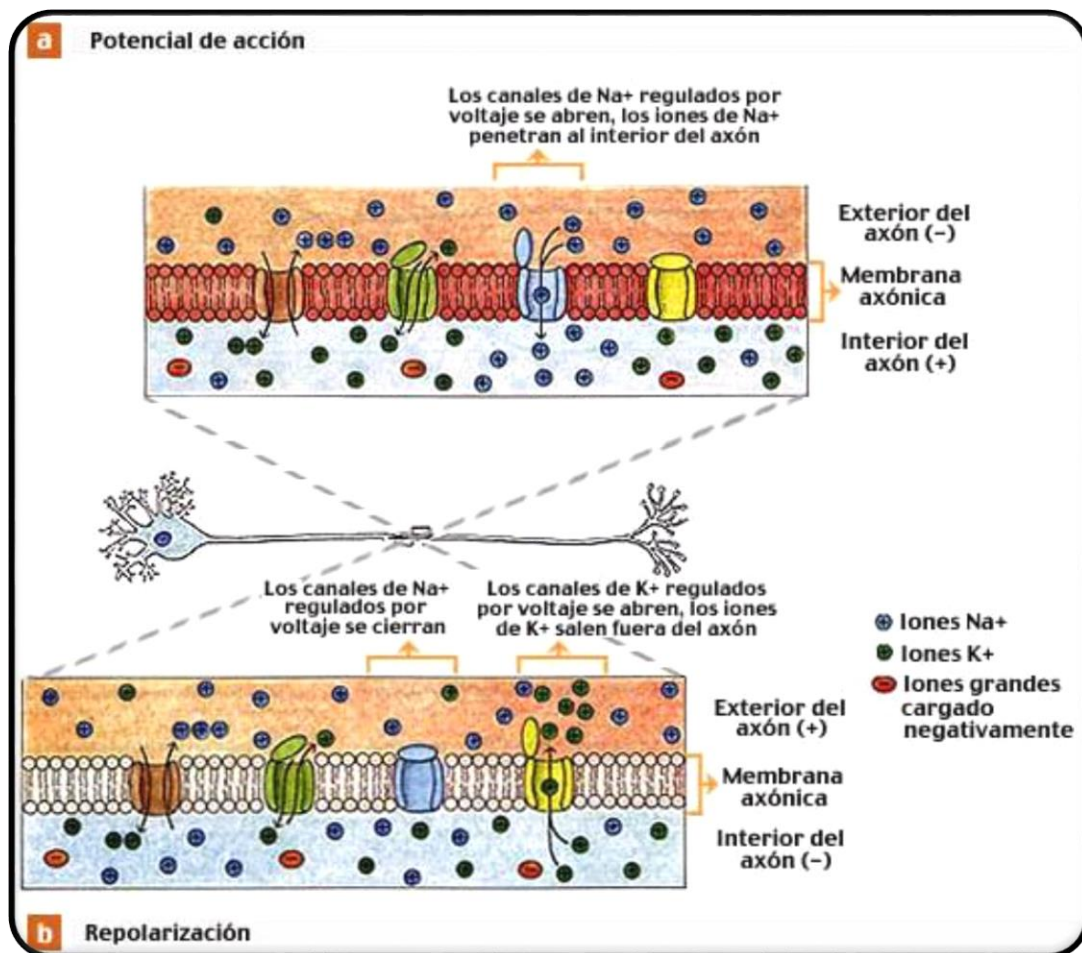
En Argentina, el Programa Nacional de Chagas (PNC) comenzó a operar en 1962 bajo una estructura vertical y logró una rápida disminución de la prevalencia de infestación doméstica por *T. infestans* en el centro y el norte del país durante su primera década de actividad (Segura et al. 2000, Segura 2002). En sus más de 50 años de historia, la infestación se redujo en todas las provincias respecto de los índices previos al programa y se avanzó sobre el control de la transmisión transfusional. Esto trajo aparejado una significativa caída de la seroprevalencia nacional de *T. cruzi* con valores de 10,1% (1965-69) hasta llegar a un 1,9% (1993), medida a través de casi 1,8 millones de varones conscriptos diagnosticados (Segura et al. 2000). Por lo tanto, el horizonte presente y futuro de las acciones de control corresponde a una estrategia de vigilancia epidemiológica permanente bajo amplia participación de la comunidad, para prevenir la recolonización de los vectores (Pinto Dias 2007). En este sentido, el control químico de insectos vectores se ha convertido en la principal estrategia para reducir la incidencia de la enfermedad.

Los insecticidas piretroides se han utilizado desde los años ochenta en forma exitosa, con alta efectividad sobre los insectos y bajo riesgo toxicológico en humanos (OMS 2002). En el caso particular de los triatomínicos domiciliados, los piretroides han mostrado mayor efectividad en el intradomicilio que en los peridomicilios lindantes que albergan animales domésticos (Zerba 1999, Gürtler et al. 2004). Estos insecticidas, variantes sintéticas y más estables de las piretrinas naturales, generan intoxicación por efectos potentes sobre el sistema nervioso central y periférico de los insectos (Soderlund 1995, Bloomquist 1996, Perry et al. 1998, Zlotkin 1999).

Para entender el efecto neurotóxico de los piretroides, es necesario tener en cuenta que el medio interno de la neurona en estado de reposo es negativo respecto al externo debido a las diferencias en las concentraciones de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) entre ambos medios. Cuando se transmite el impulso nervioso a lo largo del axón cambia la permeabilidad de la membrana debido a la apertura de canales de  $\text{Na}^+$ , el cual ingresa y disminuye la diferencia de potencial. La membrana nerviosa recupera rápidamente su



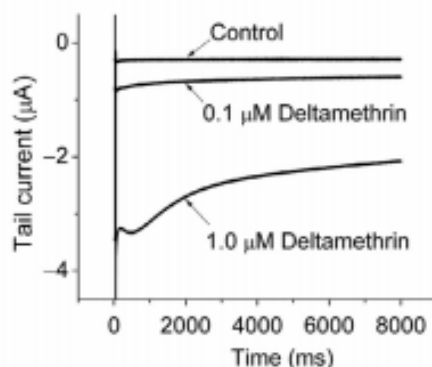
estado de equilibrio mediante el movimiento de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de canales específicos (Figura 4).



**Figura 4.** Transmisión normal del impulso nervioso a partir del gradiente eléctrico a través de la membrana neuronal. **a.** generación del potencial de acción, **b.** repolarización.

Los insecticidas piretroides actúan a nivel de la membrana nerviosa en un sitio específico de los canales de  $\text{Na}^+$ , modificando la velocidad de cierre de los mismos y alterando la transmisión nerviosa normal. Registros intracelulares en axones de invertebrados y vertebrados mostraron distintos efectos de estos insecticidas sobre la propagación de potenciales de acción. Algunos piretroides provocan descargas repetitivas en las membranas nerviosas, mientras que otros bloquean la conducción de impulsos (Naumann 1990). Por estas y otras características relacionadas con la estructura química, se los clasifica en Tipo I y II. Los piretroides tipo II, dentro de los cuales se encuentra la

deltametrina, son los más potentes (Bloomquist 1996) (Figura 5). Como resultado de la perturbación de la transmisión nerviosa normal, se inicia una serie de síntomas de intoxicación que terminan con la muerte del insecto (Stenersen 2004).



**Figura 5.** Corriente ( $\mu\text{A}$ ) en función del tiempo (ms) en condición normal (Control) y en presencia de deltametrina (0.1 y 1.0  $\mu\text{M}$  Deltamethrin). El potencial de acción se modifica y, como consecuencia, la conducción del impulso nervioso se interrumpe. Extraído de Tatebayashi y Narahashi (1994).

Pese a la alta eficiencia mostrada por los piretroides, en las últimas décadas se registró en distintas zonas del Gran Chaco la presencia de triatomíneos intradomiciliarios posteriormente a la fumigación con deltametrina (Vazquez Prokopec et al. 2009).

### Fracasos en el control vectorial: el problema de la resistencia

El control inefectivo de vinchucas de campo ha sido observado en el Gran Chaco pese a los esfuerzos intensivos realizados en la ecorregión bajo la Iniciativa del Cono Sur (Gürtler 2009). La misma fue lanzada en 1991 y tuvo como objetivos eliminar la transmisión transfusional de *T. cruzi* y las poblaciones domésticas y peridomésticas de *T. infestans* de toda la región (Dias et al. 2002, Silveira 2002). Sin embargo, que no se cumplan por completo estos objetivos ambiciosos podría deberse a que la evidencia disponible en ese entonces indicaba que *T. infestans* no poseía focos silvestres (con excepción de los valles andinos de Bolivia), era muy susceptible a los insecticidas piretroides y presentaba poca variabilidad genética de la cual pudiese emerger la resistencia a los insecticidas (Gürtler 2007). Más tarde, diversos estudios realizados en el Gran Chaco aportaron evidencia para contradecir estas tres suposiciones (Noireau et al.

2000, 2005, Picollo et al. 2005, Piccinalli et al. 2009). Como consecuencia, en los años siguientes se ubicó a gran parte de la ecorregión dentro de la zona del área endémica donde la transmisión vectorial no logró ser interrumpida (Figura 6).



**Figura 6.** Situación de la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas en América en el año 2016. Fuente: Organización Panamericana de la Salud.

El control insatisfactorio puede explicarse por varias causas biológicas, genéticas y ambientales, así como por la evolución de la resistencia a los insecticidas (Gürtler et al. 2004, Picollo et al. 2005, Vázquez Prokopec et al. 2009, Gürtler 2009). Esta es un proceso poblacional, consecuencia de dos factores principales: la presencia de individuos con capacidad hereditaria para resistir el insecticida (es decir, individuos de baja susceptibilidad) y la presión de selección a través del insecticida (Tabashnik 1989). Para una dosis determinada de compuesto que es aplicada sobre la población, una pequeña proporción de individuos de baja susceptibilidad sobrevive y se reproduce con éxito. Ante

la repetida aplicación del compuesto, el aumento de la proporción de insectos tolerantes al insecticida resulta en el desarrollo de una población resistente, es decir una población que ha adquirido la capacidad de tolerar niveles de tóxico que serían letales para la mayoría de los individuos de una población normal de la misma especie (Roush y Daly 1990). Como resultado visible, se observan fallas de un insecticida para controlar una población, a pesar de su efectividad en el pasado (Robertson et al. 2007a).

Los primeros estudios realizados en Argentina detectaron focos de baja resistencia a deltametrina en algunos departamentos de las provincias de San Luis, La Rioja, Mendoza, Catamarca y Salta que no comprometieron la efectividad del control químico en el campo (Vassena y Picollo 2003). En el año 2002, estudios de laboratorio determinaron altos niveles de resistencia a deltametrina en vinchucas recolectadas en la ciudad de Salvador Mazza, Departamento de San Martín, al norte de Salta. En concordancia con estos resultados, las autoridades del Ministerio de Salud de Argentina informaron que la campaña de intervención con insecticidas piretroides en el norte de Salta no había sido efectiva (Picollo et al. 2005). Poco tiempo después se reportó una situación similar en la localidad fronteriza de Yacuiba en el departamento de Tarija, al sur de Bolivia (Figura 7).



**Figura 7.** Zonas con poblaciones de *T. infestans* resistentes a piretroides en Argentina, Bolivia y Perú detectadas hasta el momento. Adaptado de Mougabure Cueto y Picollo (2015).

El fracaso en el control químico representa un problema sanitario de gran importancia porque el aumento en la densidad de los insectos vectores de la enfermedad de Chagas está directamente vinculado con un aumento en el número de personas infectadas. En consecuencia, en las últimas décadas se ha intensificado el estudio de la resistencia en *T. infestans* a partir de la extensión de los monitoreos desde el foco de Salvador Mazza-Yacuiba, el primero de los detectados asociado a fallas de control en campo, hacia otras zonas de ambos países. La situación detectada no fue la misma para

Bolivia y para Argentina. En Bolivia, no se encontraron poblaciones domiciliadas con grado de resistencia (GR) menores a 100 y el área resistente se encontraba muy extendida, abarcando los departamentos de Tarija, Cochabamba, Chuquisaca y La Paz (Picollo et al. 2005, Toloza et al. 2008, Germano et al. 2010a, Lardeaux et al. 2010). En contraposición, en Argentina, se encontraron poblaciones resistentes en distintas localidades de Salta, pero el área de alta resistencia se circunscribía a la zona fronteriza en la localidad de Salvador Mazza y sus barrios aledaños, como La Pista y El Sauzal (Picollo et al. 2005, Santo Orihuela et al. 2008, Toloza et al. 2008, Germano et al. 2010). En localidades relativamente cercanas como Madrejones y Acambuco, los GR, si bien resultaron altos, fueron significativamente menores a 100 y disminuyeron drásticamente hacia el sur de la provincia de Salta (Corralito y San Carlos) (Fabro et al. 2012, Germano et al. 2010, 2012).

En los últimos años, se han detectado poblaciones resistentes en la provincia de Chaco: los lugares fueron Pampa del Indio (de baja resistencia en el Departamento San Martín), La Esperanza y El Malá (de muy alta resistencia, asociadas a ineficaces campañas de control en el Departamento General Güemes) (Carvajal et al. 2012, Gurevitz et al. 2012, Germano et al. 2013). Hay que destacar que todas estas poblaciones se encuentran en la zona del Gran Chaco donde el control vectorial no ha sido interrumpido por las distintas iniciativas que tuvieron como objetivo reducir la incidencia de la enfermedad.

Luego de casi dos décadas de estudios, la resistencia a insecticidas en *T. infestans* se evidencia como un problema complejo: evolucionó en diferentes áreas de la distribución geográfica de la especie, presenta diferentes perfiles en diversas áreas y distintos mecanismos que la promueven evolucionaron en diferentes poblaciones (Picollo et al. 2005, Toloza et al. 2008, Pedrini et al. 2009, Fabro et al. 2012, Germano et al. 2010, 2012, Capriotti et al. 2014). Incluso, Germano et al. (2013) detectaron que en el ya mencionado Paraje La Esperanza la población de insectos de una vivienda podía seguir un proceso de selección con insecticidas de manera independiente a lo que le ocurría a insectos de otras viviendas, evento que concuerda con la significativa estructuración genética micro y macrogeográfica detectada en la especie (Perez de Rosas et al. 2007, Piccinali et al. 2018). Por lo tanto, la evolución de la resistencia requiere un abordaje multidisciplinario que involucre diversas escalas espaciales.

La aparición de individuos resistentes en una población es muy difícil de predecir, por lo que es importante detectar la resistencia al nivel más bajo posible para interrumpir

el proceso de selección en el área endémica (Mougabure Cueto y Picollo 2015). Para cumplir este objetivo, el Laboratorio de Investigación en Triatomíneos del Centro de Referencia de Vectores (LIT- CeReVe- Ministerio de Salud de la Nación) elaboró junto al PNC un protocolo de manejo de la resistencia en el área endémica argentina.

## El manejo de la resistencia a piretroides

El manejo de la resistencia a insecticidas en *T. infestans* está determinado y condicionado por las particularidades biológicas, operativas y culturales asociadas al control de los vectores de la enfermedad de Chagas. Esto hace que algunas típicas recomendaciones expresadas por comités de expertos y organismos no puedan ser implementadas (Mougabure Cueto y Picollo 2015). Las medidas que puedan retardar la evolución de la resistencia mientras aún no haya fracasos de control a campo se ven dificultadas por la escasa variedad de formulados efectivos alternativos a los piretroides. Tampoco se ha implementado el uso de refugios para individuos susceptibles o estrategias similares que permitan mantener en baja frecuencia los genes resistentes por tratarse de insectos vectores de una enfermedad.

En cuanto a otras alternativas al control químico tradicional, no han sido desarrolladas al momento estrategias eficientes de control biológico o de modificación del comportamiento. En este contexto, en Argentina se cuenta por el momento sólo con insecticidas piretroides, principalmente la deltametrina en su formulación suspensión concentrada. En segundo lugar, están los insecticidas organofosforados fenitrotión y malatión en sus formulaciones como polvo mojable. Por razones de potencia, selectividad, riesgo toxicológico, calidad de las formulaciones y recepción de las mismas por parte de los pobladores de las áreas endémicas, la rotación preventiva entre piretroides y organofosforados (por ejemplo, entre deltametrina y fenitrotión) no es recomendable.

Por otro lado, el uso de potes fumígenos que combinan distintos insecticidas piretroides como permetrina y beta- cipermetrina con organofosforados como 2,2 diclorovinil dimetil fosfato ha sido empleado exitosamente (Zerba et al. 1989). Su elevada capacidad de penetración en lugares de difícil acceso lo vuelve una opción favorable para el tratamiento de viviendas construidas con materiales con hendiduras, como barro, adobe, machimbre y paja. Sin embargo, debido a que la residualidad es baja y el proceso de preparado de las viviendas muy riguroso, su uso se ha limitado a la fase de ataque y en estrategia en combinación con el rociado clásico.

Por todo lo mencionado, el rociado de viviendas con piretroides según el protocolo correspondiente es la opción a utilizar mientras no se detecten focos resistentes que comprometan el control en campo (Recuadro 1).

El monitoreo toxicológico continuo implica que la resistencia no será estudiada a partir de las fallas de control en una determinada localidad, sino que se evaluará en insectos recolectados en todas las localidades antes del rociado e independientemente de la eficacia del mismo. Así, de esta manera es posible detectar la

resistencia en el laboratorio en niveles bajos o incipientes y adelantarse al problema pensando estrategias integrales de manejo que tiendan a su resolución. Para esto, es importante incluir el estudio de los mecanismos que la promueven.

**Recuadro 1. El protocolo de rociado con piretroides** establece una primera visita a las casas para realizar la evaluación entomológica y analizar la infestación domiciliaria. En función de lo encontrado, se evalúa cómo proceder en una segunda visita:

\* *0% de infestación domiciliaria*: no se realiza rociado y se evalúa cada 6 meses según vigilancia de rutina.

\* *Índice de infestación domiciliaria menor a 5%*: se rocían con deltametrina las viviendas positivas y las que se encuentran en un radio de 500 metros a la redonda (tratamiento selectivo).

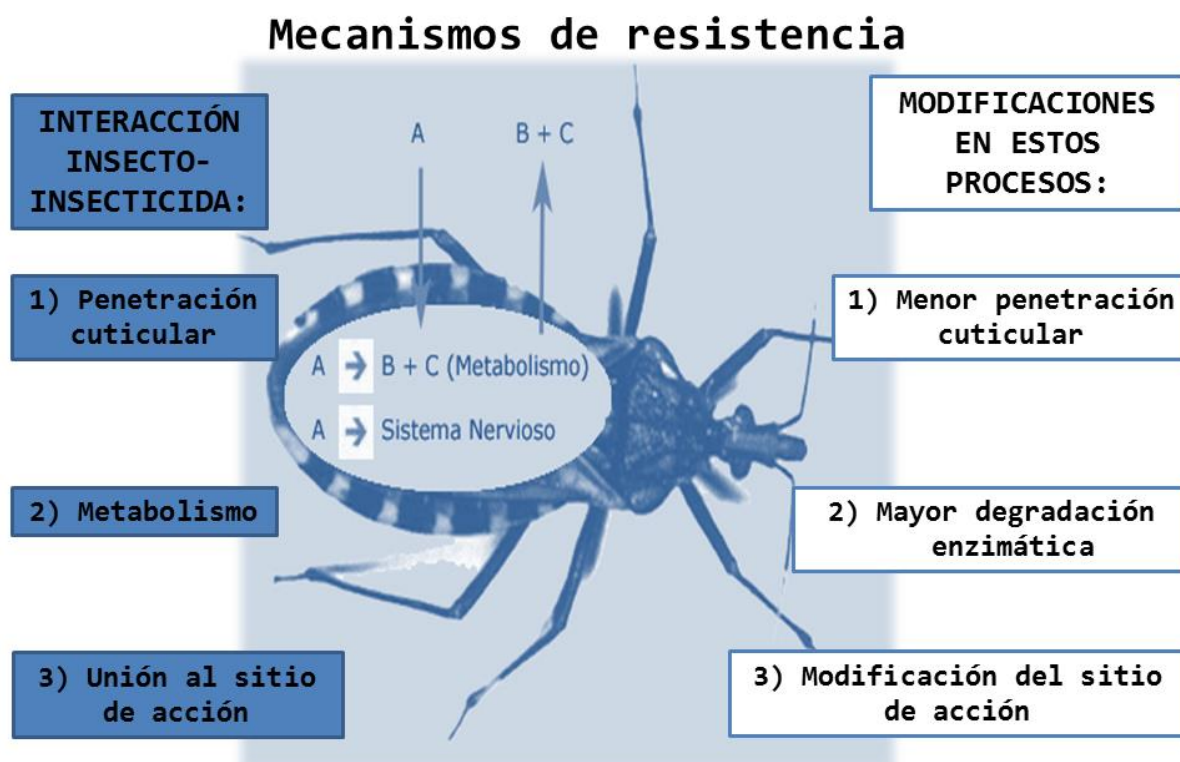
\* *Índice de infestación domiciliaria mayor a 5%*: se rocía con deltametrina el 100% de las viviendas (tratamiento de ataque).

## Mecanismos involucrados en la evolución de la resistencia

Los insecticidas actúan a nivel de blancos fisiológicos indispensables, como es el caso del sistema nervioso sobre el que actúan los productos neurotóxicos utilizados en el control vectorial de la enfermedad de Chagas (Vassena et al. 2007). Las moléculas de piretroides que logran ejercer su acción tóxica entraron en contacto con el insecto, penetraron en el organismo, evitaron la degradación, fueron transportadas hasta el sitio de acción e interactuaron con él.

Los mecanismos involucrados en el fenotipo resistente están asociados a modificaciones en uno o varios de los distintos pasos toxicocinéticos/ toxicodinámicos ocurridos durante la interacción insecto-insecticida, principalmente la disminución en la tasa de penetración del insecticida, el aumento de su tasa de detoxificación y las modificaciones en el sitio de acción (Oppenoorth 1985, McKenzie 1996) (Figura 8).





**Figura 8.** Mecanismos de resistencia como consecuencia de la modificación de algunos de los pasos en la interacción insecto-insecticida.

La reducción de la penetración cuticular es un mecanismo que confiere bajos niveles de resistencia a un gran rango de insecticidas y a su vez puede potenciar los niveles de resistencia cuando actúa en conjunto con otros mecanismos (Pedrini et al. 2007, 2009). Los últimos dos mecanismos (mayor degradación enzimática y modificación del sitio de acción), por el contrario, son más frecuentes y están asociados a mayores niveles de resistencia. Por este motivo, tienen una importancia relativa más grande y serán abordados en este trabajo de tesis.

### *Aumento de degradación enzimática: oxidasas y esterasas*

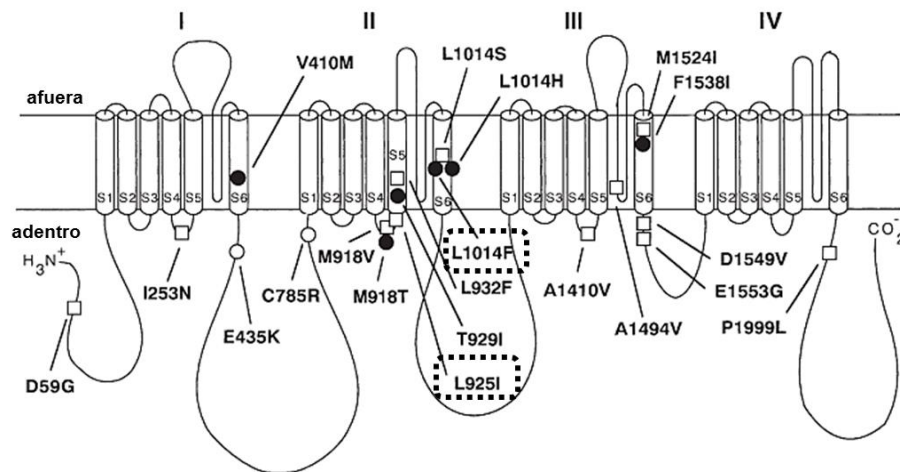
De los posibles mecanismos de resistencia, uno de los más importantes y estudiados es el aumento en la tasa de degradación enzimática del insecticida. Una mayor tasa de degradación enzimática en comparación a la de individuos susceptibles puede ocurrir por un aumento de la afinidad de la enzima por su sustrato (mutaciones en genes estructurales) o por un aumento en la cantidad de moléculas enzimáticas (cambios en los patrones de expresión). En ambos casos la consecuencia es una mayor actividad de las

enzimas que metabolizan al insecticida (Zhu y Snodgrass 2003). En el metabolismo de los insecticidas piretroides, las enzimas involucradas son mayormente el complejo P450 (mono-oxigenasas u oxidasas de función mixta) y las esterasas. Las oxidasas de los insectos están involucradas en el metabolismo de compuestos endógenos, así como en el catabolismo de los xenobióticos tales como toxinas de plantas e insecticidas y en la evolución de la resistencia (Feyereisen 2005). Las esterasas, por otro lado, son un grupo amplio de enzimas importantes en el metabolismo de xenobióticos y están involucradas en la promoción de resistencia a organofosforados, carbamatos y piretroides en una amplia variedad de insectos (Li et al. 2007, Ortiz Hernández et al. 2013). Estudios previos del CIPEIN describieron la asociación del incremento en la actividad de oxidasas y esterasas con la baja efectividad de deltametrina en poblaciones de *T. infestans* de las provincias de San Luis y Salta (González Audino et al. 2004, Picollo et al. 2005, Santo Orihuela et al. 2008). Todos ellos, al igual que el estudio de Lardeux et al. (2010) en Bolivia, propusieron que la aplicación de un sinergista de la actividad piretroide disminuía los niveles de resistencia, pero no alcanzaba a suprimirla completamente. Esto sugiere la existencia de otros mecanismos contributivos a la resistencia no asociados a la actividad enzimática, como podría ser la modificación del sitio de acción.

#### ***Modificación del sitio de acción: mutaciones kdr***

Otro mecanismo de resistencia importante es la modificación en la molécula donde el insecticida ejerce su acción tóxica, es decir, el sitio de acción. Estas modificaciones generan resistencia individual por alterar negativamente la interacción con el tóxico manteniendo la funcionalidad del sitio de acción. En el caso de la resistencia a piretroides, las modificaciones ocurren en el canal de sodio dependiente de voltaje (sitio de acción de estos insecticidas). Se han reportado alrededor de veinte mutaciones puntuales de nucleótido simple (SNPs) en el gen que codifica para este canal distribuidas a lo largo de sus cuatro dominios homólogos (I-IV) en una gran variedad de insectos plaga (Soderlund y Knipple 2003) (Figura 9). Recientemente se han descrito por primera vez en triatomíneos dos mutaciones puntuales en el gen del canal de sodio en insectos provenientes de poblaciones resistentes (Fabro et al. 2012, Capriotti et al. 2014). Ambas reciben su nombre por la sustitución que se lleva a cabo en la región ortóloga del gen “*para*” de la mosca *Musca domestica*, especie modelo en la caracterización de estas mutaciones desde la década del cincuenta. La primera mutación determina la sustitución

de una leucina por una fenilalanina en el segmento hidrofóbico transmembrana número 6 (S6) del dominio II en la posición 1014 (L1014F) y es la más habitual de las sustituciones asociadas a resistencia en el canal de sodio en insectos (Soderlund y Knipple 2003). La segunda, se expresa como una sustitución puntual de una leucina por una isoleucina, ubicada en el loop intracelular transmembrana entre los segmentos IIS4 y IIS5 en la posición 925 (L925I).



**Figura 9.** Estructura transmembrana extendida del canal de sodio dependiente de voltaje que muestra los cuatro dominios internamente homólogos (I-IV), cada uno con seis hélices transmembrana (S1-S6). Se muestra la ubicación de las 20 mutaciones caracterizadas en distintas especies y se marcan las detectadas en *T. infestans*. Adaptado de Soderlund y Knipple (2003).

Los estudios de las últimas décadas proporcionan evidencia convincente de que las mutaciones puntuales son la causa principal de la sensibilidad neuronal reducida a los piretroides y, por ende, generan "resistencia al volteo" (*Knockdown resistance* o simplemente *kdr*) (Morin et al. 2002, Huang et al. 2004, Yoon et al. 2008, Kasai et al. 2009, Martins et al. 2009, Zhu et al. 2010, Karatolos et al. 2012, Madeiros Barros et al. 2012, Davila Barboza et al. 2018). Esto conlleva consecuencias graves en el uso sostenido de los insecticidas a campo (Soderlund y Knipple 2003). Por lo tanto, la detección temprana de este mecanismo constituye una herramienta clave a la hora de anticipar el problema complejo de la resistencia en zonas donde la eliminación de *T. infestans* ha fallado, como es el caso del Gran Chaco.

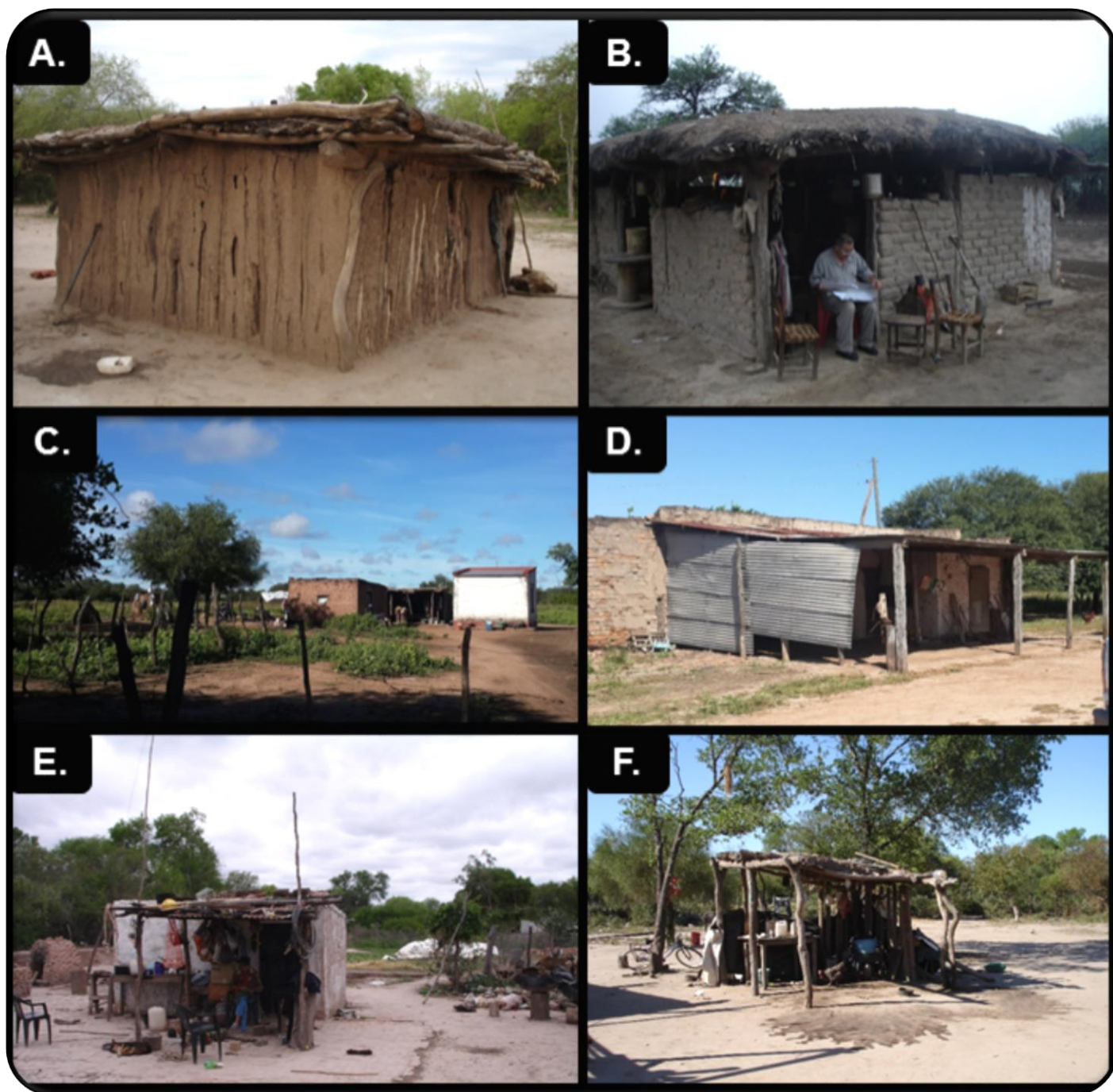
## El Gran Chaco

El Gran Chaco abarca alrededor de 1,3 millones de km<sup>2</sup> que se extienden sobre el norte de Argentina, el este de Bolivia y el oeste de Paraguay (Gorla y Noireau 2010). Incluye dos ecorregiones definidas: el Chaco Húmedo y el Chaco Seco, con un amplio gradiente climático y particularidades geológicas que generaron una gran diversidad de ambientes y alta diversidad biológica (Gürtler 2007). Se caracteriza por ser en toda su extensión una llanura semiárida con baja densidad humana (aproximadamente 0,5-5 habitantes por km<sup>2</sup>) y poblados rurales muy dispersos, a los que suele ser difícil acceder (The Nature Conservancy 2005). La vegetación es un mosaico de bosques secundarios de madera dura, arbustales, sabanas secas e inundables, esteros, bañados y salitrales. Las temperaturas pueden variar desde -10°C hasta un record histórico de 49°C. Las precipitaciones anuales se hallan entre los 350 hacia el oeste y los 1300 mm hacia el este, lo cual ha limitado la agricultura de secano en el centro y oeste del Chaco y ha favorecido la desertificación en algunas zonas (Gürtler 2007).

En gran parte del Gran Chaco, los cambios en el uso y propiedad de la tierra junto con la rápida expansión del cultivo de la soja a gran escala durante los años noventa han causado un fuerte impacto sobre el paisaje. Esto causó la degradación y pérdida irreversible de bosques naturales y su biodiversidad, así como de la estructura socioeconómica de las poblaciones campesinas, que se vieron obligadas a migrar hacia los centros urbanos. En la actualidad, se calcula que entre el 50% y 70% de la población rural del Chaco Argentino tiene necesidades básicas insatisfechas (NBI) y en Bolivia el valor llega al 76%. La escasez de agua dulce limita fuertemente el desarrollo de grandes zonas del Chaco y aumenta los índices de pobreza, según indica el Informe sobre Desarrollo Humano del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo de 1997.

Las viviendas, típicamente construidas con adobe y paja o cañas o aún más precarias, constituyen un hábitat muy apropiado para *T. infestans* y las estructuras peridomésticas generalmente juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la abundancia poblacional de triatominos de diversas especies cercanas a los domicilios (Segura et al. 2000, Biancardi et al. 2003). El ambiente peridoméstico es un riesgo importante como fuente de triatominos, ya que en él se pueden encontrar cabras, caballos, cerdos, gallinas que sirven de alimento a los triatominos; además de gallineros, corrales y materiales de construcción, que hacen de refugio (Figura 10). Estas estructuras

peridomiciliares se encuentran en muchas ocasiones lindantes a los dormitorios, a las cocinas o a otras áreas de actividad humana (Gürtler 2007).



**Figura 10.** Viviendas de los parajes del departamento General Güemes, provincia del Chaco, construidas de: **A.** barro, **B.** adobe, **C. y E.** ladrillo cocido, **D.** ladrillo cocido con anexos de chapa. **F.** peridomicilio típico.

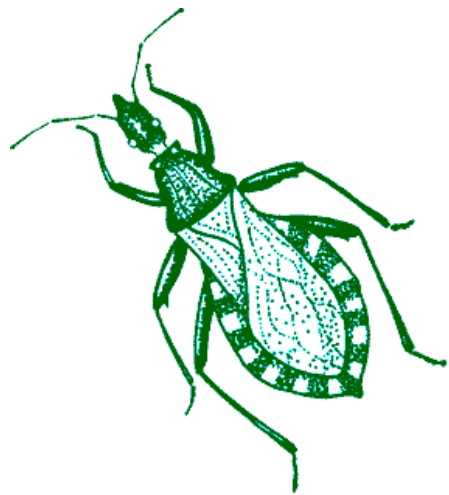


La vigilancia vectorial en la zona ha sido irregular, menos intensa que en otras áreas, costosa e insostenible cuando se tienen en cuenta los últimos cincuenta años. Además, el sistema de transmisión de la enfermedad de Chagas muestra una alta resiliencia, que se manifiesta en una gran capacidad de recuperación en un tiempo limitado luego de las campañas de fumigación con insecticidas residuales como los piretroides (Gürtler 2009). Para añadir complejidad a la problemática, los piretroides empleados dejan focos residuales peridomésticos y esto genera una recurrente recolonización doméstica en ausencia de una vigilancia efectiva. Los recientes hallazgos de focos silvestres de *T. infestans* de distintos tipos y de resistencia a los insecticidas piretroides en el Chaco argentino y boliviano añaden nuevos desafíos (Gürtler 2007).

Como consecuencia de todo lo anterior, el Gran Chaco constituye la última frontera del control de *T. infestans*. Muestra una muy alta seroprevalencia materna de *T. cruzi* y la prevalencia de infestación de *T. infestans* en esta zona sigue siendo alta, alcanzando valores del 30%. Inclusive, en un estudio realizado en 2003 sobre una muestra de población aborigen del Gran Chaco Argentino, perteneciente a comunidades qom, wichí y pilagá de las provincias de Formosa y Chaco, se observó una prevalencia general de infección del 55,83% (Sotelo et al. 2004).

Se sabe que la ecología de *T. infestans* y los patrones de transmisión del parásito pueden variar entre ecorregiones dependiendo del clima, el ambiente, las prácticas humanas y el origen étnico (Gurevitz et al. 2011). Los estudios ecológicos tradicionales se han centrado en la influencia de variables ambientales en la distribución de *T. infestans* como primera aproximación al estudio espacial del riesgo de transmisión en el Gran Chaco (Gorla 2002, Espinoza et al. 2014, Gaspe et al. 2015, Brito et al. 2017, Espinoza Echeverria et al. 2017). Teniendo en cuenta que la evolución de la resistencia en esta zona es uno de los factores que dificultan el control vectorial, se requieren nuevos abordajes que analicen la importancia del ambiente. Como primera aproximación a la resistencia considerada como variable respuesta, Bustamante Gomez et al. (2016) realizaron una revisión bibliográfica de 24 artículos que reportaban resistencia en Argentina, Bolivia, Brasil y Paraguay y, mediante el uso de modelos lineales generalizados, encontraron una relación entre la distribución de la resistencia y cinco variables ambientales. Sin embargo, los modelos fallaron al describir la ocurrencia de una población altamente resistente en Chuquisaca (Bolivia) y 5 de las 13 poblaciones del sur del Departamento de General Güemes (Provincia de Chaco, Argentina), área donde se localizan las poblaciones con

mayores niveles de resistencia detectadas hasta el momento (Carvajal et al. 2012, Germano et al. 2014, Sierra et al, 2016). Esto pone en evidencia la complejidad ambiental del centro del Gran Chaco Argentino y la necesidad de incorporar al relevamiento de resistencia el estudio de las variables ambientales que la promueven en el área endémica de nuestro país.



## **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**



# OBJETIVOS E HIPÓTESIS

---

## Objetivos de esta tesis

La tesis tiene como **objetivo general** avanzar en el conocimiento de la evolución de la resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *Triatoma infestans*, mediante el uso combinado de herramientas de la toxicología, la genética y la ecología.

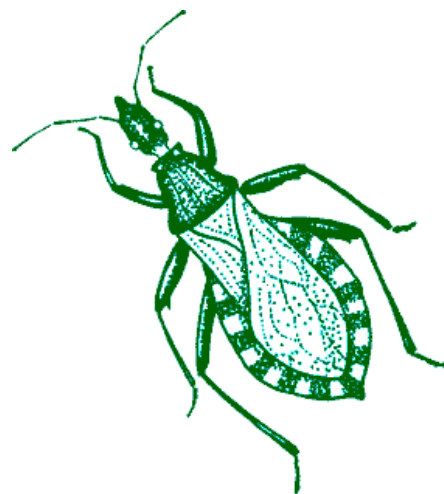
Los objetivos específicos son:

1. Determinar los perfiles de susceptibilidad y resistencia a un insecticida piretroide y a un insecticida fosforado en poblaciones de *T. infestans* de diferentes provincias endémicas de Argentina.
2. Evaluar la importancia de la detoxificación enzimática incrementada como mecanismo de resistencia en los focos resistentes detectados.
3. Describir la presencia y la frecuencia de las mutaciones de resistencia al volteo (*kdr*) en el canal de sodio dependiente de voltaje de las poblaciones resistentes.
4. Caracterizar la influencia de variables ambientales implicadas en la evolución de la resistencia.

## Hipótesis de esta tesis

Las hipótesis de trabajo son las siguientes:

1. a) Poblaciones de diferentes zonas del área endémica del país han desarrollado distintos perfiles y niveles de resistencia al insecticida piretroide deltametrina, sugiriendo que la resistencia ha evolucionado de manera independiente en cada zona.  
b) Las poblaciones resistentes son susceptibles al insecticida fosforado fenitrotión, usado como alternativa de control.
2. Niveles bajos de grado de resistencia se explican por una actividad incrementada de las enzimas detoxificantes oxidasas P450 y/o esterasas.
3. Niveles altos de grado de resistencia se explican por una frecuencia alta de mutaciones puntuales en el canal de sodio dependiente de voltaje (L1014F y L925I).
4. Existen variables ambientales en el Gran Chaco que favorecen la evolución de susceptibilidad reducida.



# CAPÍTULO 1

**Determinación de los perfiles de susceptibilidad y resistencia a un insecticida piretroide y a un insecticida fosforado en poblaciones de *Triatoma infestans* de diferentes provincias endémicas de Argentina**

# CAPÍTULO 1

---

## La importancia de las curvas dosis-respuesta

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

También se evalúa la respuesta frente a la dosis cero del insecticida. En caso de haber mortalidad natural en estos controles, se ajusta con la fórmula de Abbott's (Abbott 1925):

$$\text{Mortalidad corregida} = \frac{P - P_0}{100 - P_0} \times 100$$

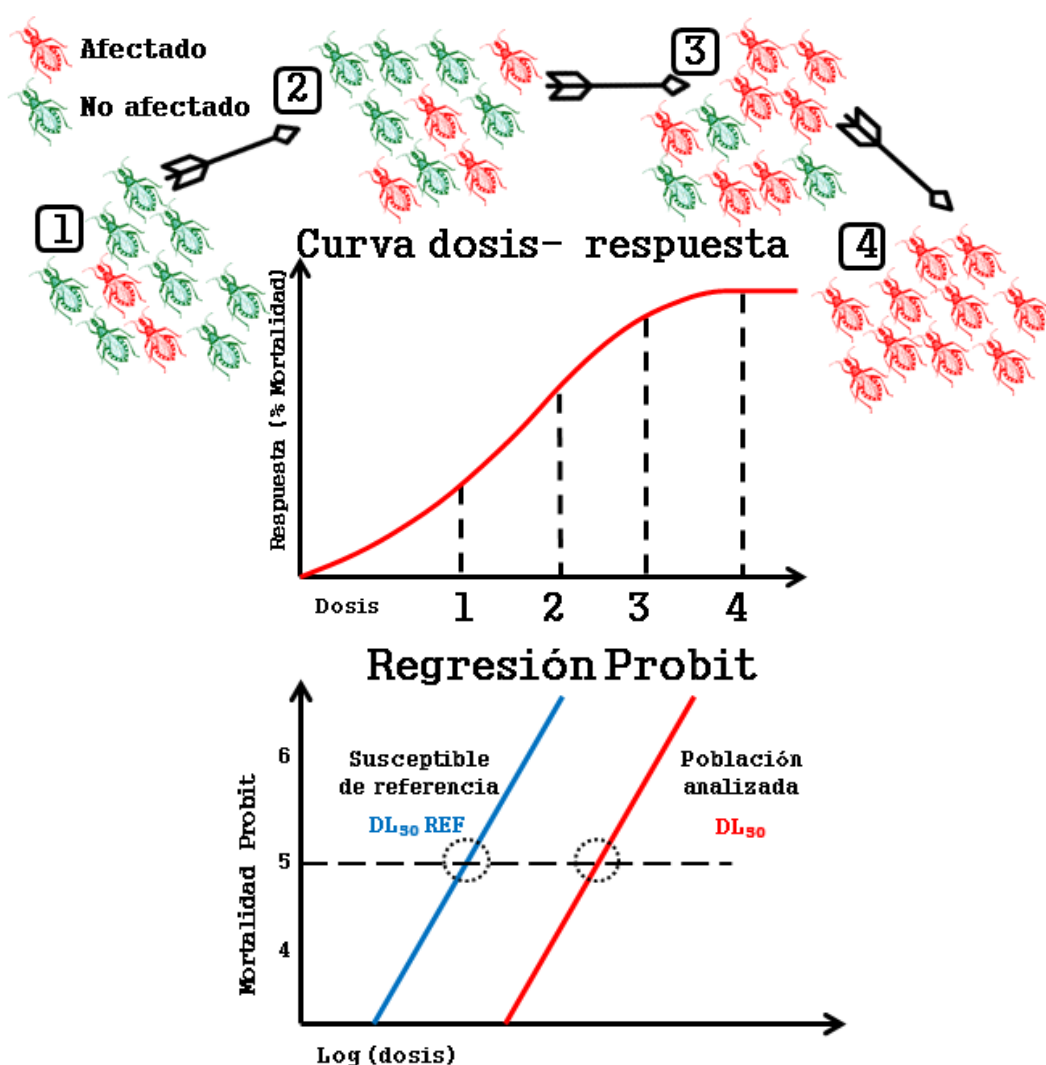
### **Ecuación 1.** Fórmula de Abbott.

Donde P es el porcentaje de mortalidad de los insectos tratados y P<sub>0</sub> es el porcentaje de mortalidad de los insectos del control. Este ajuste puede realizarse cuando la mortalidad de los controles no excede el 20% o cuando la mortalidad se obtiene a partir de un número alto de réplicas.

El gráfico resultante de evaluar la mortalidad frente a la dosis es una curva sigmoidea que dificulta evaluar la respuesta cerca del 0 y del 100% de mortalidad, zonas donde la respuesta alcanza asíntotas. Por lo tanto, se usa una transformación Probit para convertir la curva sigmoidea acumulativa en una función lineal. Esto se logra trazando líneas perpendiculares equidistantes en el eje X de la curva dosis- respuesta separadas en términos de desviaciones estándar de la curva normal acumulada (Hewlett y Plackett 1979). De esta manera, se obtiene una escala de desvíos equivalentes normales que es

lineal, al igual que la escala que se consigue si se aplica el logaritmo a la dosis. Así, al medir el porcentaje de mortalidad en términos de desviaciones estándar, llegamos a una relación lineal entre los desvíos y la dosis logarítmica. Luego, para que la respuesta sea siempre positiva, se suma 5 a los desvíos, obteniendo medidas que reciben el nombre de “probits” (una abreviatura de unidades de probabilidad).

El gráfico de los valores probits del porcentaje de mortalidad en función del logaritmo de la dosis generan una relación lineal (Perry et al. 1998). A partir de esta función lineal es posible obtener parámetros toxicológicos como la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), que es la concentración a la que muere la mitad (50%) de los insectos tratados con el insecticida (Figura 11).



**Figura 11.** Curva dosis-respuesta para una población y linealización con la transformación Probit, a partir de la cual se obtiene el parámetro DL<sub>50</sub>.

Luego, el método del cociente de dosis letal establece que a partir de la relación entre la  $DL_{50}$  de la población analizada y la  $DL_{50}$  de una cepa susceptible usada como referencia, se pueda estimar el parámetro toxicológico grado de resistencia ( $GR_{50}$ ). Este valor permite determinar la existencia o no de resistencia a cada insecticida en cada población (Robertson y Preisler 1992). Es decir, es una medida de respuesta relativa al insecticida que expresa cuántas veces más insecticida se debe aplicar para obtener la misma mortalidad que en la cepa susceptible de referencia.

El estudio de susceptibilidad se ha realizado tradicionalmente en zonas puntuales del área endémica donde se sospechaba la existencia de poblaciones resistentes por contar con reportes de fallas de control a campo. El objetivo de este capítulo fue extender el relevamiento a distintas provincias de Argentina para poder conocer la distribución geográfica de la susceptibilidad a deltametrina en *T. infestans*, anticiparse así al problema de la resistencia y evaluar la respuesta al insecticida alternativo fenitrotión. La consecuencia observacional que se esperó ver fue que los grupos de insectos de distintas zonas del país presentaran diferentes valores de mortalidad al recibir el insecticida deltametrina. También se esperó que todos ellos mostraran alta mortalidad frente al fenitrotión. Para llevar a cabo este objetivo, se hizo hincapié en el registro de una zona del Gran Chaco Argentino en la que previamente se habían detectado localidades con insectos resistentes

## Metodología para cumplir el objetivo 1

### *Recolección y cría de insectos*

Las poblaciones de campo de *T. infestans* fueron recolectadas por técnicos del PNC como procedimiento de rutina del monitoreo de resistencia. Durante la etapa de relevamiento entomológico, se realizaron búsquedas activas tanto en domicilio como en peridomicilio de al menos 15 hembras y 15 machos procedentes del número máximo posible de viviendas para obtener muestras representativas de los distintos parajes (Figura 12).



**Figura 12.** Recolección de muestras de *T. infestans* en el campo.

Se colectaron insectos provenientes de 69 parajes de diferentes departamentos de las provincias argentinas de Mendoza, San Juan, Tucumán, Santiago del Estero, Formosa, Catamarca y Chaco. De esta manera, se definió como **población de estudio** al grupo de insectos recolectado por paraje.

Los insectos fueron trasladados al CeReVe, para ser evaluados en cuanto a su positividad (Figura 13).





**Figura 13.** Poblaciones de *T. infestans* de campo en su paso por el CeReVe.

Aquellas vinchucas de campo en las que no pudo ser detectada la presencia de *T. cruzi* fueron alimentadas en el laboratorio y enviadas posteriormente al CIPEIN (Figura 14).



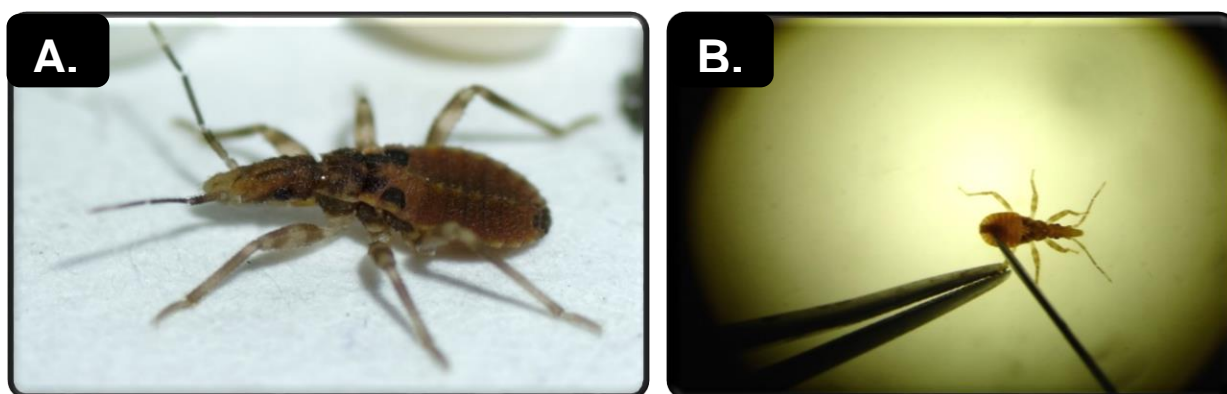
**Figura 14.** Poblaciones de *T. infestans* colectadas en el campo en cría en el CIPEIN.

Una vez en su destino final, fueron criadas respetando la clasificación por población en condiciones controladas de temperatura ( $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), de humedad (50-70%) y un fotoperíodo de 12:12 horas (luz: oscuridad). Se les proporcionó una paloma por semana como fuente de sangre siguiendo el protocolo de la OMS (1994). Se utilizó la cepa Stariolo como susceptible de referencia, obtenida a partir de la descendencia de insectos provistos por el CeReVe. Esta cepa, caracterizada bioquímica y genéticamente por Roca Acevedo et al. (2015), nunca estuvo en contacto con insecticidas.

### *Ensayos toxicológicos en ninfas I*

El primer ensayo toxicológico fue realizado en ninfas I provenientes de la cría de los insectos de campo. La utilización de la descendencia responde principalmente a dos necesidades: que sean insectos libres de *T. cruzi* y que, en caso de haber resistencia, ésta tenga base genética (caso contrario, estaríamos en presencia de algún mecanismo de disminución de susceptibilidad no hereditario). Más aún, el primer estadio ninfal garantiza que sea más sencillo estandarizar los protocolos y obtener una cantidad considerable de insectos en las condiciones requeridas: ayunados, con 5-7 días de vida y un peso medio de  $1,3 \pm 0,2$  mg (OMS 1994).

El bioensayo para determinar la susceptibilidad a deltametrina (99% de pureza, Dr. Ehrenstorfer, Alemania) consiste en la aplicación tópica en la parte dorsal del abdomen de una microgota de  $0,2\ \mu\text{l}$  del insecticida disuelto en acetona de grado analítico (Merck, Argentina) (Figura 15). La gota se suministra con una jeringa Hamilton de  $10\ \mu\text{l}$  (Hamilton, Reno, NV) provista de un dispenser de 50 descargas (Hamilton PB- 600-1) que asegura la deposición de una gota de  $0,2\ \mu\text{l}$  por cada descarga.



**Figura 15.** A. Ninfa I utilizada en los bioensayos y B. Aplicación tópica de la microgota de la solución del insecticida en la parte dorsal del abdomen.



El primer paso de la evaluación de resistencia consistió en aplicar a 3 grupos de 10 insectos cada uno la dosis discriminante (DD), que es por definición la concentración del insecticida que causa el 99% de mortalidad en individuos de la cepa susceptible. La DD de deltametrina fue de 2 ng por insecto, es decir, una concentración de 0,01 mg/ml de deltametrina en solución acetónica (Picollo et al. 2005). El protocolo tradicional establece que porcentajes de mortalidad inferiores al 100% en dos de tres réplicas topicadas con DD son indicadores de resistencia (OMS 1994, 2000). Sin embargo, debido a la variabilidad observada entre dosis, se empleó el criterio de Brown y Pal (1973), que establece un umbral del 80% de mortalidad frente a la DD. De esta manera, con un ensayo de dosis única fue posible detectar la presencia de individuos resistentes en poblaciones provenientes del campo. Los controles consistieron en todos los casos en grupos de 10 insectos topicados únicamente con el solvente (acetona).

A aquellas poblaciones catalogadas como resistentes frente a la DD se les realizó un ensayo dosis-respuesta que consistió en la aplicación de al menos cuatro dosis de deltametrina en acetona, en un rango entre 0,0001 y 10 mg/ml. Nuevamente, se usó un grupo de 10 insectos para cada dosis, los controles se realizaron con acetona y se hicieron por lo menos 3 réplicas por dosis. Esto último se debe a que para disminuir el riesgo de obtener resultados sesgados y calcular los valores de  $DL_{50}$  con un  $p < 0,05$ , se requiere un mínimo de 30 insectos por concentración (Robertson et al. 2007b). Después de la exposición, los insectos se mantuvieron en una cámara de cría (FOC-225E, Velp Scientifica, Milán, Italia) a  $28 \pm 1$  ° C, 50% de humedad relativa y un fotoperíodo de 12:12 horas (luz:oscuridad) durante 24 hs, al cabo de las cuales se evaluó la mortalidad de los insectos. El criterio para la mortalidad fue la incapacidad para caminar desde el centro hasta el borde de un papel de filtro Whitman circular de 11 cm de diámetro. Solo aquellas ninfas que pudieron alcanzar el borde del papel de filtro, con o sin estimulación mecánica con pinzas metálicas, fueron consideradas vivas (OMS 1994).

Luego, en estas poblaciones se probó una DD de fenitrotión (98% de pureza, Dr. Ehrenstorfer, Alemania) de 100 ng por insecto (0,5 mg/ml fenitrotión en acetona) siguiendo el mismo protocolo.

### *Ensayos toxicológicos en huevos*

Una vez detectadas las poblaciones resistentes, el siguiente ensayo toxicológico fue la determinación de la susceptibilidad a deltametrina en huevos de 11-12 días de edad,

que fueron seleccionados a partir de las características morfológicas externas descritas por Picollo de Villar (1979): color naranja con dos manchas oscuras cerca del opérculo. Estos huevos fueron pegados con cinta bifaz a un cubre objetos en grupos de 10 (Figura 16). Luego, cada uno recibió en su opérculo una microgota de 0,2  $\mu$ l del insecticida diluido en acetona, utilizando la misma jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l (Picollo et al. 1976). Siguiendo el protocolo de Toloza et al. (2008), la DD fue de 20 ng de deltametrina por huevo (0,1 mg/ml deltametrina en acetona). Nuevamente, los controles recibieron solo acetona. Después de la aplicación tópica, los huevos se incubaron en la cámara de cría. La mortalidad se evaluó 10 días después del tratamiento a partir de la determinación del número de huevos que no pudieron eclosionar. Este período permitió verificar si se produjo una eclosión tardía en el control (Toloza et al. 2008).



**Figura 16.** Huevos pegados sobre el cubreobjetos y detalle de la aplicación sobre el opérculo de la microgota de la solución del insecticida.

#### *Análisis estadístico*

Con los datos de mortalidad de ninfas I a diferentes concentraciones de deltametrina se construyeron las curvas dosis-respuesta y se realizó un análisis Probit (Litchfield y Wilcoxon 1949). De la pendiente de estas curvas se extrajeron las  $DL_{50}$  para cada población y de la relación entre éste parámetro toxicológico y la  $DL_{50}$  de la cepa susceptible de referencia se estimó el  $GR_{50}$  de la población. Dado que la proporción entre las dosis propaga el error de los cálculos de las mismas dosis, los valores de los  $GR_{50}$  se expresaron junto con sus intervalos de confianza (IC) del 95% (Robertson et al. 2007b).

Las poblaciones de campo se consideraron resistentes cuando los  $GR_{50}$  fueron significativamente diferentes de 1 (es decir, cuando el 95% de IC del  $GR_{50}$  no incluía el número uno).  $GR_{50} < 10$  se consideró como resistencia baja,  $10 < GR_{50} < 100$  se consideró como resistencia media, y  $GR_{50} > 100$  se consideró como resistencia alta (Germano et al. 2012). Cuando fue posible, también se determinaron los niveles de resistencia que afectaban al 90% de los individuos expuestos ( $GR_{90}$ ) siguiendo la misma metodología.

Todos los datos de los bioensayos se analizaron con el software POLO PLUS (LeOra 2007), corrigiendo los valores de mortalidad con la fórmula de Abbott.

## Resultados del capítulo 1

Los ensayos toxicológicos realizados en ninfas I mostraron que la susceptibilidad a deltametrina se encontró extendida a lo largo del área endémica. De esta forma, la mayoría de las 69 poblaciones fueron susceptibles, representando un 83% del total de poblaciones evaluadas. Estas poblaciones, correspondientes a las provincias de Mendoza, San Juan, Santiago del Estero, Tucumán, Formosa y Catamarca, exhibieron una mortalidad superior al 80% al ser tratadas con DD (Tabla 1).

Provincia	Departamento	Sitio de colección	% de mortalidad con DD (n total)	Susceptibilidad a deltametrina
<b>Mendoza</b>	Lavalle	Asunción	94 (16)	Susceptible
	Lavalle	San Pedro	100 (10)	Susceptible
	Lavalle	Nueva California	100 (6)	Susceptible
	Lavalle	San José	100 (5)	Susceptible
	Lavalle	California	100 (10)	Susceptible
	Lavalle	El Forzudo	100 (24)	Susceptible
	Lavalle	El Retamo	95 (19)	Susceptible
<b>San Juan</b>	Calingasta	Sorogayense	90 (41)	Susceptible
	Calingasta	La Isla	81 (27)	Susceptible
	Calingasta	Hilario	100 (34)	Susceptible
	Calingasta	El Zonda	92 (121)	Susceptible

<b>Santiago del Estero</b>	Choya	La Represa	96 (23)	Susceptible
	Choya	Pozo del Campo	82 (33)	Susceptible
	Choya	San Justo	91 (44)	Susceptible
	Choya	Balde Pozo	93 (14)	Susceptible
	Choya	Las Peñas	100 (9)	Susceptible
	Choya	San Pedro	100 (30)	Susceptible
	Guasayán	Famatina	81 (21)	Susceptible
	Guasayán	Pampa Pozo	100 (15)	Susceptible
	Guasayán	El Symbol	89 (36)	Susceptible
	Guasayán	Las Chacras	95 (40)	Susceptible
<b>Catamarca</b>	Fray Esquiú	La Falda de los Mazza	80 (94)	Susceptible
<b>Formosa</b>	Ramón Listra	Camino del Acha	100 (25)	Susceptible
	Ramón Listra	María Cristina	78 (40)	Susceptible
	Ramón Listra	Santa Teresa	98 (41)	Susceptible
	Guasayán	El Galpón	93 (41)	Susceptible
<b>Tucumán</b>	Graneros	Palo seco	80 (85)	Susceptible
	Graneros	La Barranca	94 (68)	Susceptible
	Graneros	El Simbol	96 (25)	Susceptible
	Graneros	Los Chañarcitos	80 (46)	Susceptible
	Graneros	Los Árboles Grandes	80 (61)	Susceptible
	Tafí del Valle	Tafí del Valle	100 (31)	Susceptible
<b>Chaco</b>	Güemes	Pampa Argentina	3 (66)	Resistente
	Güemes	Pampa Almirón	13 (16)	Resistente
	Güemes	El Ñandú	13 (40)	Resistente
	Güemes	Campo Alto	2 (41)	Resistente
	Güemes	El Asustado	0 (31)	Resistente
	Güemes	La Rinconada	0 (30)	Resistente
	Güemes	El Juramento <sup>a</sup>	5 (41)	Resistente

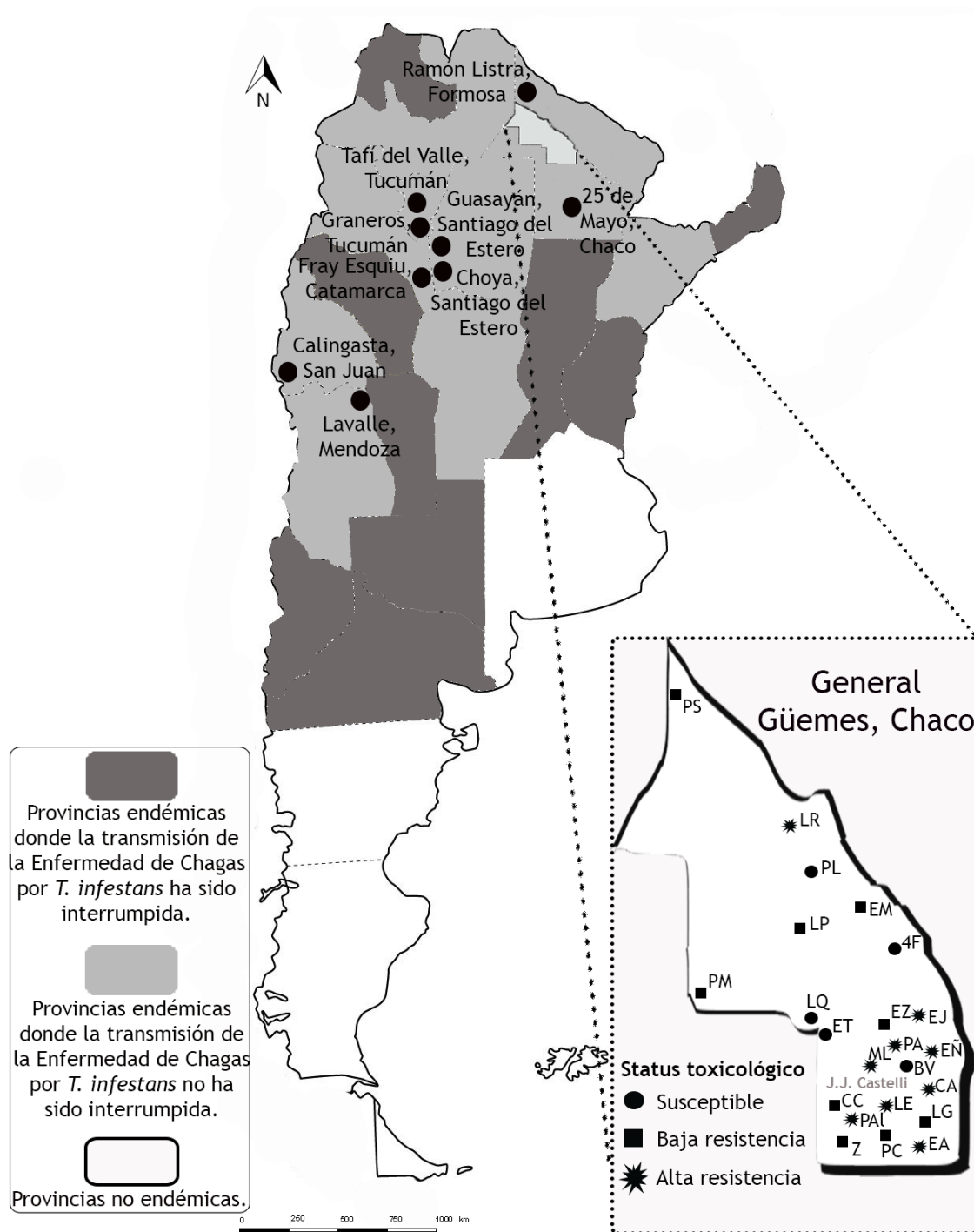
Güemes	El Malá <sup>b</sup>	0 (30)	Resistente
Güemes	La Esperanza <sup>c</sup>	19 (61)	Resistente
Güemes	El Maulle	90 (40)	Susceptible
Güemes	Los Pereyras	93 (40)	Susceptible
Güemes	Zaparinqui	100 (30)	Susceptible
Güemes	Pozo Colorado	83 (30)	Susceptible
Güemes	El Zanjón	77 (82)	Resistente
Güemes	Palma Sola	77 (31)	Resistente
Güemes	Palo Marcado	92 (50)	Susceptible
Güemes	Colonia Castelli	84 (70)	Susceptible
Güemes	La Gerónima <sup>a</sup>	63 (106)	Resistente
Güemes	Bella Vista	88 (41)	Susceptible
Güemes	4 de febrero	100 (30)	Susceptible
Güemes	Los Quirquinchos	82 (42)	Susceptible
Güemes	Los Placeres	100 (30)	Susceptible
Güemes	El Techat	92(77)	Susceptible
25 de Mayo	Lote 40	96 (81)	Susceptible
25 de Mayo	Colonia Waltieri	100 (46)	Susceptible
25 de mayo	Lote 39	100 (97)	Susceptible
25 de mayo	El Milagro	97(35)	Susceptible
25 de mayo	La Tambora	94 (31)	Susceptible
25 de Mayo	Paso de Oso	94 (86)	Susceptible
25 de Mayo	Lote 42	97 (65)	Susceptible
25 de Mayo	Lote 39	100 (82)	Susceptible
25 de Mayo	La Madrid	96 (76)	Susceptible
25 de Mayo	Lote 24	94 (49)	Susceptible
25 de Mayo	La Matanza	87 (62)	Susceptible
Quitilipi	Legua 4	98 (55)	Susceptible

Quitilipi	El Zanjón	81 (75)	Susceptible
Quitilipi	La Matanza	99 (88)	Susceptible

---

**Tabla 1.** Susceptibilidad a deltametrina en poblaciones de campo de *T. infestans* de diferentes provincias endémicas de Argentina. <sup>a</sup> Extraído de Sierra et al. (2016), <sup>b</sup> Extraído de Carvajal et al. (2012), <sup>c</sup> Extraído de Germano et al. (2014).

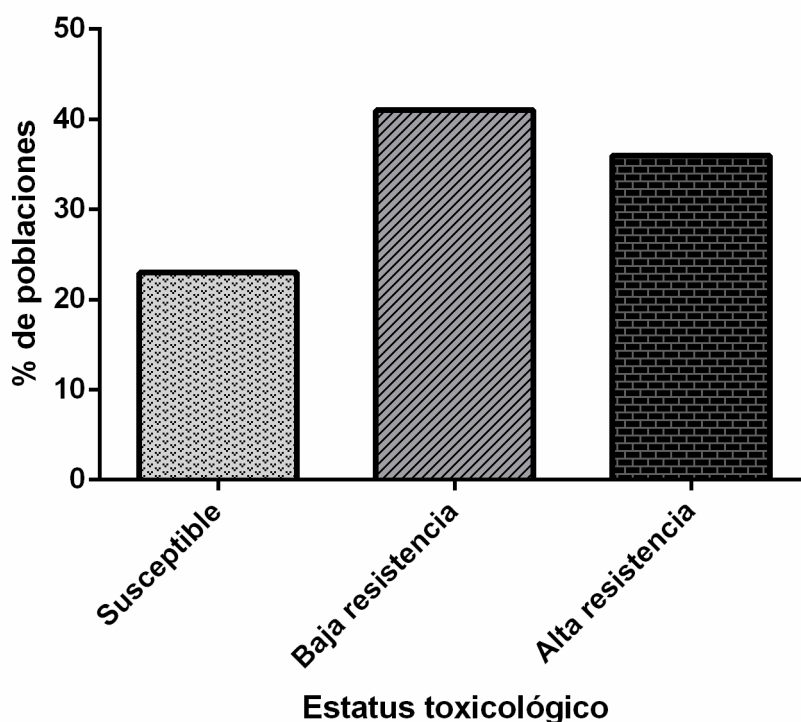
Sólo se encontraron poblaciones resistentes con tasas de mortalidad inferiores al 80% y en algunos casos cercanas a cero en la provincia de Chaco, más específicamente en el Departamento de General Güemes (Figura 17). Dada la relevancia de este lugar en la distribución de la resistencia, se decidió calcular los parámetros toxicológicos (DL<sub>50</sub>, GR<sub>50</sub>, GR<sub>90</sub> cuando fue posible, % de mortalidad con fenitrotión en ninfas I y con deltametrina en huevos) para todos los parajes del Departamento, independientemente de haber sido catalogadas antes como resistentes o susceptibles. A partir del cálculo de las DL<sub>50</sub> de estas poblaciones, algunas de las que habían sido clasificadas como susceptibles en la Tabla 1, fueron reclasificadas como de baja resistencia en la Tabla 2. Esto ocurrió para los parajes El Maulle, Los Pereyras, Zaparínqui, Pozo Colorado, Palo Marcado y Colonia Castelli.



**Figura 17.** Departamentos con localidades susceptibles y detalle del foco resistente del Departamento General Güemes, Chaco. Abreviaturas de las poblaciones: EJ= El Juramento, ML= El Malá, LE= La Esperanza, PA= Pampa Argentina, Pal= Pampa Almirón, EÑ= El Ñandú, CA= Campo Alto, EA= El Asustado, LR= La Rinconada, LG= La Gerónima, EM= El Maulle, LP= Los Pereyras, Z= Zaparinqui, PC= Pozo Colorado, EZ= El Zanjón, PS= Palma Sola, PM= Palo Marcado, CC= Colonia Castelli, 4F= 4 de Febrero, LQ= Los Quirquinchos, PL= Los Placeres, BV= Bella Vista, ET= El Techat.

Los niveles de susceptibilidad a deltametrina fueron muy variables, con valores de  $DL_{50}$  para ninfas I que oscilaron entre 0,038 y 1664 nanogramos por insecto (ng/i) (Tabla 2). De estas poblaciones, el 23% fueron susceptibles, el 41% presentaron baja resistencia y el 36% restante tenían alta resistencia (Figura 18).

### Poblaciones del foco resistente de General Güemes (Chaco)



**Figura 18.** Distribución de las poblaciones del Departamento General Güemes, Chaco, en función de su nivel de resistencia.

Se determinaron los  $GR_{50}$  más elevados hasta el momento. Teniendo en cuenta la existencia de poblaciones caracterizadas previamente en la zona, como El Juramento, El Malá y La Esperanza, se confirmó la persistencia de un foco resistente de alta heterogeneidad toxicológica, de extensión aún no definida. Incluso, en algunas poblaciones como Pampa Argentina, Campo Alto, El Asustado y La Rinconada, la mortalidad con la dosis más alta aplicada (10 mg/ml) fue inferior al 50% y sus valores de  $DL_{50}$  fueron  $> 200$ . Como no fue posible obtener una estimación finita, se realizó un cálculo estimativo de la resistencia a partir del cociente de estas  $DL_{50} > 200$  y la  $DL_{50}$  de la cepa susceptible de referencia. De esta manera, se consideró que los  $GR_{50}$  eran superiores a 1000.



Los huevos tratados con deltametrina mostraron el mismo estatus toxicológico que las ninfas I en cada población y todas las poblaciones estudiadas del foco resistente fueron susceptibles a fenitrotión, el único insecticida alternativo a los piretroides aprobado para ser utilizado por el PNC para el control a campo (Tabla 2).

Ninfas I								Huevos	
Deltametrina				Fenitrotión		Deltametrina			
Población (latitud, longitud)	n	Pendiente ± DE	X²	DL <sub>50</sub> (ng/i) (IC del 95%)	GR <sub>50</sub> (IC del 95%)	GR <sub>90</sub> (IC del 95%)	Estatus toxicológico	% Mortalidad con DD (n de insectos testeados)	% Mortalidad con DD (n de huevos testeados)
Referencia (Stariolo)	171	1,41 ± 0,35	11,31	0,18 (0,03-0,35)	-	-	Susceptible	100 (30)	100 (0)
El Juramento (25°54'S, 60°24'O) <sup>a</sup>	227	0,53 ±0,09	3,34	1664 (676- 6590)	> 2000	NA	Alta resistencia	100 (40)	-
El Malá (25°56'S, 60°27'O) <sup>b</sup>	90	1,0 ±0,4	15,54	134 (100- 182)	1031 (909,1- 1213,3)	NA	Alta resistencia	93 (42)	0 (90)
La Esperanza <sup>c</sup> (26°3'S, 60°27'O)	224	0,64 ±0,12	28,63	30,32 (10,21- 79,71)	233,42 (116,78- 466,57)	NA	Alta resistencia	100 (41)	-
Pampa Argentina (25°52'00.1"S, 60°33'20.77"O)	251	7,72	2,20	> 200	> 1000	NA	Alta resistencia	100 (30)	6,5 (31)
El Ñandú (25°56'54"S,60°19'59"O)	251	0,96 ± 0,23	18,95	115,2 (49,6- 453)	500 (200- 1000)	NA	Alta resistencia	100 (30)	0 (30)
Campo Alto (26°0'9"S, 60°14'25"O)	190	1,78 ± 0,81	9,61	> 200	> 1000	NA	Alta resistencia	100 (17)	20 (30)
El Asustado (26°5'10"S, 60°18'22"O)	255	1,11 ±0,74	15,48	> 200	> 1000	NA	Alta resistencia	100 (32)	2 (10)

La Rinconada (24°55'14"S, 61°24'15"O)	198	0,60 ±0,19	68,59	> 200	> 1000	NA	Alta resistencia	100 (30)	0 (32)
La Gerónima (26°4'S, 60°16'O) <sup>a</sup>	356	0,92 ±0,12	13,82	0,71 (0,27- 1,57)	3,89 (1,63- 9,26)	11,76 (4,10- 34,48)	Baja resistencia	98 (58)	-
El Maulle (25°27'42"S, 60°55'10"O)	210	2,20 ± 0,33	18,21	0,87 (0,58- 1,27)	4,72 (2,11-10,63)	2,24 (1,04- 4,83)	Baja resistencia	96,7 (30)	-
Los Pereyras (25°28'55"S, 61°11'12"O)	302	5,39 ±1,06	37,00	1,08 (0,82- 1,26)	5,68 (2,72-12,66)	1,26 (0,66- 2,41)	Baja resistencia	93,3 (30)	-
Zaparinqui (26°3'53"S, 60°34'31"O)	120	2,31 ± 0,43	7,22	0,61 (0,36- 0,98)	3,29 (1,43-7,52)	1,46 (0,64- 3,34)	Baja resistencia	100 (31)	93 (30)
Pozo Colorado (26°3'59"S, 60°30'29"O)	110	2,58 ± 0,80	2,07	0,96 (0,41- 1,35)	5,21 (2,16- 12,50)	2,03 (0,88- 4,67)	Baja resistencia	100 (30)	100 (30)
El Zanjón (25°43'16"S, 60°43'54"O)	370	2,05 ± 0,25	22,72	0,74 (0,57- 0,92)	4,03 (1,81- 8,93)	2,11 (1,04- 4,27)	Baja resistencia	100 (30)	70 (30)
Palma Sola (24°14'30"S, 62°16'50"O)	222	1,88 ± 0,34	17,37	0,77 (0,46- 1,13)	4,18 (1,81- 9,62)	2,49 (1,07- 5,78)	Baja resistencia	100 (30)	100 (30)
Palo Marcado (24°37'4"S, 62°6'30"O)	384	1,80 ±0,17	187,66	0,67 (0,37-1,30)	3,97 (1,78- 8,77)	2,11 (1,01- 4,41)	Baja resistencia	90 (30)	87 (31)
Colonia Castelli (26°0'38"S, 60°39'18"O)	179	2,08 ±0,34	18,34	0,56 (0,31-0,85)	3,06 (1,31- 7,14)	1,56 (0,73- 3,36)	Baja resistencia	100 (30)	25 (20)
4 de febrero (25°34'58"S, 60°47'52"O)	118	1,07 ±0,27	2,45	0,04 (0,02-0,07)	0,19 (0,10-0,51)	0,37 (0,08- 1,69)	Susceptible	-	-
Los Quirquinchos (25°42'1"S, 60°55'1"O)	155	0,50 ±0,11	2,30	0,04 (0,004- 0,12)	0,20 (0,04-1,05)	9,71 (1,00- 90,91)	Susceptible	-	-

Los Placeres (25°18'7"S, 61°10'56"O)	140	1,01 ± 0,21	1,09	0,04 (0,02-0,07)	0,21 (0,10-0,53)	0,38 (0,10- 1,38)	Susceptible	-	-
Bella Vista (25°57'15"S, 60°22'34"O)	251	1,07 ± 0,18	12,87	0,37 (0,20- 0,60)	2,02 (0,80- 5,10)	3,94 (1,35- 11,49)	Susceptible	-	-
El Techat (25°42'44"S, 60°53'59"O)	168	2,12 ± 0,32	14,48	0,44 (0,24- 0,68)	2,38 (1,01- 5,62)	1,19 (0,56- 2,53)	Susceptible	-	-

**Tabla 2.** Efecto toxicológico de la deltametrina y el fenitrotión sobre poblaciones de campo de *T. infestans* de General Güemes, Chaco. <sup>a</sup> Extraído de Sierra et al. (2016), <sup>b</sup> Extraído de Carvajal et al. (2012), <sup>c</sup> Extraído de Germano et al. (2014). La población Pampa Almirón no fue analizada por falta de material biológico. n= número de insectos utilizados en el bioensayo, ES= error estándar, ng/i= nanogramos por insecto, 95% IC= intervalo de 95% de confianza, GR= grado de resistencia. En aquellas poblaciones donde la mortalidad a la mayor dosis de insecticida usada fue inferior al 50%, consideramos la dosis a la cual la pendiente comenzó a achatare (DL<sub>50</sub>~1mg/ml ≡ 200ng/i), por lo que informamos como “DL<sub>50</sub>>200” y los GR fueron considerados como > 1000. ND= información no disponible (en esas poblaciones no fue posible estimar GR<sub>90</sub>).

## Discusión del capítulo 1

En el primer capítulo se propuso evaluar la susceptibilidad de distintas poblaciones del área endémica de *T. infestans* al insecticida piretroide deltametrina y al fosforado fenitrotión utilizado como alternativa para el control a campo. Afortunadamente, la mayoría de las 69 poblaciones evaluadas fueron susceptibles a deltametrina, reforzando su importancia como herramienta para los programas de control vectorial en la región. Los primeros reportes de resistencia a deltametrina vinculados a acciones de control químico deficientes corresponden a las localidades de Salvador Mazza (norte de Argentina) y Yacuiba (sur de Bolivia) (Picollo et al. 2005, Santo Orihuela et al. 2008). Estos estudios informaron que el área resistente estaba restringida a la frontera argentino-boliviana. Más tarde, Germano et al. (2010) estudiaron varias localidades de Argentina y Bolivia e informaron nuevos hallazgos de resistencia a deltametrina en poblaciones hacia el norte y hacia el sur de la frontera argentina-boliviana, con  $GR_{50}$  cercanos a 500. Esto puso en evidencia que la extensión de la resistencia era mayor a la esperada. El relevamiento toxicológico realizado por Lardeux et al. (2010) en Bolivia informó que sólo el 28% de las poblaciones eran susceptibles, demostrando que la resistencia a deltametrina se hallaba altamente extendida a lo largo del país, con valores de  $GR_{50}$  que oscilaban entre 6 y 491. La situación presentada en este capítulo parecería ser opuesta a la de Bolivia: la resistencia a deltametrina fue detectada en el 17% de las poblaciones analizadas y todas ellas se vieron restringidas al Departamento de General Güemes (Provincia de Chaco).

Aunque la resistencia a los insecticidas en los triatominos es un problema grave, éste parecería estar restringido al área central del Gran Chaco argentino, el principal lugar donde el control y la eliminación de *T. infestans* ha fallado. En los últimos 20 años, esta ecorregión se caracterizó por la discontinuidad y heterogeneidad de las acciones de control químico contra los triatominos, con carencia o con muy pocas intervenciones registradas (Mougabure Cueto y Picollo 2015). Específicamente, en esta tesis se encontró una agrupación de localidades con niveles variables de resistencia en los alrededores de J.J. Castelli, ciudad cabecera del Departamento chaqueño de General Güemes. Este patrón complejo se caracterizó por una alta heterogeneidad toxicológica compuesta por tres categorías: poblaciones susceptibles, de baja y de alta resistencia. Lardeux et al. (2010) propuso que la heterogeneidad en los niveles de resistencia a deltametrina probablemente provenga de la presión no homogénea por parte de los insecticidas. De

hecho, las frecuencias de rociado pueden variar entre las localidades y el efecto del insecticida puede ser distinto incluso entre intradomicilio y peridomicilio de una misma vivienda. Es más probable que ocurra la degradación de insecticidas por parte de las variables ambientales en el peridomicilio, lo que podría promover una selección diferente en comparación al entorno del intradomicilio (Mougabure Cueto y Picollo 2015). Así, la selección de individuos expuestos a dosis subletales (en el peridomicilio) y dosis letales (en el domicilio) conducirían a la evolución de perfiles toxicológicos diferentes (Gressel 2011). Germano et al. (2013) encontraron diferencias importantes en el estado de resistencia a nivel microgeográfico en La Esperanza (una de las localidades del foco resistente caracterizado en este capítulo), lo que sugiere un alto nivel de estructuración de las poblaciones de *T. infestans* sobre las que luego el insecticida ejercería su presión selectiva. Varios estudios genéticos previos demostraron que las poblaciones de *T. infestans* están altamente estructuradas (Pérez de Rosas et al. 2007, Pizarro et al. 2008, Segura et al. 2009), mostrando alta variabilidad genética a través de su rango de distribución (Piccinalli et al. 2009). Por lo tanto, la posible aplicación de insecticida de manera heterogénea en combinación con la alta estructuración poblacional de la especie podría explicar la heterogeneidad de los fenotipos toxicológicos caracterizados.

Sin embargo, no se descarta que en General Güemes puedan existir poblaciones con baja susceptibilidad natural (es decir, con tolerancia a deltametrina). Algunos estudios de poblaciones silvestres de *T. infestans* de Bolivia han encontrado una susceptibilidad diferencial a deltametrina. Estas poblaciones fueron recolectadas de un hábitat selvático sin intervenciones de control químico y parece muy poco probable que hayan estado expuestas a cualquier tipo de insecticida (Roca Acevedo et al. 2011, Depickere et al. 2012, Bustamante Gómez et al. 2014). Por lo tanto, poblaciones silvestres de *T. infestans* de diferentes áreas geográficas del país parecerían tener diferentes grados de susceptibilidad natural a deltametrina. Mougabure Cueto y Picollo (2015) plantearon que la discontinuidad de las acciones de control en algunas áreas del Gran Chaco, donde se encuentran parajes con poblaciones de *T. infestans* con altos grado de resistencia, lleva a especular acerca de la presencia de poblaciones tolerantes a los insecticidas, proponiendo la hipótesis de que algunas variables ambientales de la ecorregión del Chaco podrían seleccionar individuos con alta tolerancia sin la presencia del insecticida. Es necesario profundizar este abordaje para identificar si hay variables ambientales

implicadas en la promoción de esta tolerancia natural o, en interacción con el insecticida, de resistencia a insecticidas en las poblaciones del foco resistente.

La persistencia de vectores que favorecen la transmisión de *T. cruzi* podría estar potenciada por factores no necesariamente relacionados con la resistencia. Es decir, podría haber discontinuidad en el espacio y el tiempo de las intervenciones de control químico, alta densidad de triatomíneos en estructuras peridomésticas que albergan animales domésticos, falta de disponibilidad del insecticida, eventos de reinfestación o colonización desde zonas rurales cercanas o incluso desde focos silvestres (Porcasi et al. 2006, Gürtler et al. 2007, Vazquez Prokopec et al. 2009). Como se propuso en el párrafo anterior en relación a las variables ambientales implicadas en la promoción de resistencia, la influencia de las acciones de control y de los niveles de infestación sobre la resistencia será evaluada en el capítulo 4 en este trabajo de tesis.

En este relevamiento se encontraron las poblaciones con los niveles de resistencia más altos a deltametrina hasta el momento, con valores de GR<sub>50</sub> que excedían el 1000. Estos altos niveles de resistencia podrían deberse (al menos en parte) a las alteraciones en el sitio de acción de los insecticidas, el canal de sodio dependiente de voltaje, como se demostró en varias especies de insectos de importancia económica y sanitaria (Soderlund y Knipple 2008). Zhu et al. (2010) investigaron la distribución y el alcance de la sensibilidad neuronal reducida a los piretroides y DDT, denominado "resistencia al volteo" (*kdr*) en poblaciones de chinches en los Estados Unidos y encontraron que era el mecanismo principal de resistencia. Descubrieron que muy pocas poblaciones eran resistentes a deltametrina por el mecanismo de actividad de detoxificación incrementada por parte de las enzimas monooxidasas P450. Recientemente, dos mutaciones puntuales en el canal de sodio asociado a la resistencia a los piretroides, L1014F y L925 (en la numeración de la secuencia de aminoácidos de la mosca doméstica canal de sodio) se describieron en dos poblaciones resistentes de *T. infestans* (Capriotti et al. 2014, Fabro et al. 2012). Algunos estudios en mosquitos y piojos determinaron una fuerte relación causal entre el genotipo *kdr* y la susceptibilidad a los piretroides (Reimer et al. 2008, Toloza et al. 2014). Esto permitió a los autores proponer que las mutaciones del tipo *kdr* están causalmente relacionadas con la resistencia y ser utilizadas como un marcador efectivo y práctico en las acciones de monitoreo. Esta asociación también podría estar presente en *T. infestans* y explicar la existencia de poblaciones con altos niveles de resistencia determinados por altas frecuencias de las mutaciones L1014F o L925 (Sierra et al. 2016).

Por otro lado, los bajos niveles de resistencia a los piretroides podrían deberse a una disminución de la penetración cuticular o a un aumento del metabolismo. Tanto el mecanismo de detoxificación enzimática incrementada como las modificaciones en el sitio de acción serán abordados en los capítulos 2 y 3.

En cuanto a los huevos, aquellas poblaciones expuestas a deltametrina mostraron el mismo estatus toxicológico que el exhibido por ninfas I. Estos resultados son consistentes con el estudio de Toloza et al. (2008), donde los huevos de la población argentina de Salvador Mazza fueron tan resistentes a deltametrina como las ninfas. Este resultado llevó a los investigadores a sugerir que los niveles similares de resistencia encontrados para huevos y ninfas de primer estadio podrían deberse a la expresión de mecanismos similares de resistencia en ambas etapas. El mismo estudio encontró que las poblaciones Sucre y Yacuiba (Bolivia) exhibían ninfas con alta resistencia a la deltametrina, mientras que sus huevos mostraban niveles medios de resistencia al insecticida. Esto podría implicar que la expresión de la resistencia a los insecticidas en los huevos varía entre poblaciones argentinas y bolivianas, y la resistencia a los piretroides diagnosticada en ninfas I no siempre sería indicativa de la resistencia en la etapa de huevo. Además, Amelotti et al. (2011) mostró que las hembras dentro de un rango de edad pueden producir individuos con variación en la susceptibilidad y esto podría explicar al menos en parte las diferencias en la susceptibilidad entre grupos de insectos (entre poblaciones, colonias, etapas, etc.). Para aumentar la confiabilidad de los resultados obtenidos, este estudio siguió la recomendación de que los individuos utilizados en bioensayos se seleccionaran al azar de la descendencia de un número mínimo de diez hembras de edad desconocida.

Finalmente, todas las poblaciones resistentes estudiadas fueron susceptibles a fenitrotión. Las únicas formulaciones de insecticidas aprobadas para su uso en el control de campo de *T. infestans* en Argentina son las que contienen el piretroide deltametrina o los organofosforados fenitrotión y malatión (Carvajal et al. 2012). Como se mencionó anteriormente, el fenitrotión presenta un bajo coeficiente de seguridad y su uso en una estrategia de retraso de la posible evolución de la resistencia a piretroides (mediante rotación con piretroides) no es recomendada. Sin embargo, es imprescindible contar con un insecticida alternativo para poblaciones en las que la resistencia se haya manifestado y genere fallas de control a campo. A pesar de las desventajas que presenta este fosforado como insecticida y formulado, se utilizó con éxito en el manejo de poblaciones de los dos



focos descriptos hasta el momento: Salvador Mazza (junto con el malatión, Zaidenberg 2012) y La Esperanza (Germano et al. 2014). En este sentido, es importante mencionar el manejo que se está realizando en el paraje de alta resistencia (GR> 1000) Pampa Argentina (Maza et al. 2018). Luego de la caracterización toxicológica de la población dentro del marco de este trabajo de tesis, se comenzó un plan de manejo integrado de la resistencia. Para eso, se realizaron reuniones con los diferentes actores del paraje (agentes sanitarios, referentes comunitarios y representantes del Programa de Chagas de la Provincia de Chaco) para comunicar el problema de la resistencia. Luego de los relevamientos entomológicos, la toma de datos sociológicos y la determinación de resistencia a nivel casa realizados en noviembre 2017, se procedió a utilizar el pote fumígeno Musal® en fase de ataque en las viviendas positivas en tres ciclos consecutivos durante el período agosto-octubre 2018. Este formulado, además del fenitrotión y el malatión ya descriptos, es el único aprobado que cuenta con un insecticida de un gupo químico al que los insectos son susceptibles, el organofosforado volátil diclorvos (DDVP). Se espera que el DDVP al 7%, incluso combinado con dos piretroides que no ejerzan control (2% de permetrina y 1.3% de beta- cipermetrina) despliegue su poder de volteo y letal de manera exitosa. Por lo tanto, se presenta como una alternativa prometedora para el tratamiento selectivo de los parajes de alta resistencia detectados en esta tesis. Los resultados de la intervención aún se encuentran en la etapa de análisis.



## **CAPÍTULO 2**

**Evaluación de la importancia de la detoxificación enzimática incrementada  
como mecanismo de resistencia en los focos resistentes detectados**

## CAPÍTULO 2

---

### El estudio del mecanismo de detoxificación incrementada

La alta heterogeneidad toxicológica caracterizada en el foco resistente de General Güemes reforzó la necesidad de identificar los mecanismos causantes de la resistencia individual y su peso relativo en el patrón descripto. Los insecticidas piretroides usados en el control vectorial de *T. infestans* son variantes sintéticas y más estables de las piretrinas naturales. Las piretrinas, constituyentes tóxicos del extracto de piretro de las flores de *Chrysanthemum spp*, son seis ésteres formados por la combinación de dos ácidos (crisantémico y pirétrico) con tres alcoholes (piretrolona, cinerolona y jasmolona) (Perry et al. 1998). Los mecanismos de detoxificación de los insectos transforman los xenobióticos o compuestos que provienen del exterior en moléculas polares a través de las reacciones de fase I y fase II. La fase I incluye oxidación, reducción e hidrólisis, mientras que la fase II se produce a través de reacciones conjugadas que convierten los productos primarios de la fase I en derivados solubles en agua que faciliten la excreción (Mamidala et al. 2011). Los principales sistemas enzimáticos que metabolizan piretroides en insectos son las esterasas que hidrolizan el éster y las oxidasas (denominadas también complejo P450, monooxigenasas u oxidasas de función mixta) involucradas en las distintas hidroxilaciones y también en la hidrólisis del éster (Ruigt 1985).

El rol central que tienen las enzimas P450 y esterasas en el metabolismo de los piretroides determina que ciertas modificaciones en su actividad y/o expresión tengan como consecuencia individuos que toleran dosis más altas del insecticida que aquellos que no tienen esas modificaciones. Los cambios pueden ser cualitativos (mutaciones en los genes estructurales de las enzimas que llevan a un aumento en la afinidad por el insecticida) o cuantitativos (mutaciones que afectan los patrones de expresión génica de o eventos de amplificación génica que llevan a un aumento del número de enzimas). En ambos casos, el resultado es un incremento en el proceso de detoxificación que puede constituir un mecanismo de resistencia (Oppenoorth 1985, Mc Kenzie 1996). Efectivamente, en muchos insectos, la resistencia a piretroides se ha asociado con cambios en los niveles de expresión de ciertos P450s (Liu y Scott 1998, Kasai et al. 2000, Pridgeon et al. 2003), así como con cambios estructurales en la enzima que llevan a un aumento en su actividad catalítica (Zhu y Snodgrass 2003). De manera similar, la

resistencia a piretroides se ha asociado a la actividad elevada de enzimas esterasas que hidrolizan los enlaces éster presentes en los insecticidas (Corbel y N'Guessan 2013).

El estudio del metabolismo incrementado como mecanismo de resistencia puede llevarse a cabo de diferentes formas. La caracterización de la actividad enzimática por métodos bioquímicos mediante el uso de sustratos específicos de esterasas permitió detectar resistencia metabólica en poblaciones de *T. infestans* del Chaco argentino y boliviano, tanto en ninfas I (Santo Orihuela et al. 2008) como en huevos de desarrollo tardío (Santo Orihuela et al. 2013, Roca Acevedo et al. 2015). Otra forma de analizar la detoxificación incrementada es a partir de la detección de mutaciones o del aumento de expresión genética. Como aplicación de estas técnicas moleculares, Traverso et al. (2017) comparó los transcriptomas de cuatro vectores de la enfermedad de Chagas y encontró que un gen de la superfamilia de los citocromos P450 (el CYP4) estaba sobreexpresado significativamente en individuos de *T. infestans* resistentes a piretroides. Este resultado llevó a los autores a proponer que la detoxificación enzimática parecería ser un mecanismo extendido que confiere resistencia en la especie. Las metodologías anteriores permiten describir el funcionamiento del mecanismo y aportar evidencia a su participación en la promoción del fenotipo resistente, pero no permiten asegurarlo.

La tercera forma de estudiar el mecanismo es inhibiendo bioquímicamente las enzimas mediante el uso de compuestos tales como el *inhibidor de oxidasas* butóxido de piperonilo (PBO) y el *inhibidor de esterasas* trifenil fosfato (TPP). Éstos aumentan la eficacia de los insecticidas al bloquear las vías metabólicas que los descomponen, por lo que también son denominados *sinergistas*. El sinergista PBO aumenta la toxicidad de los insecticidas al inhibir el metabolismo oxidativo por P450s mediante la formación de un complejo inhibidor de metabolitos (Casida 1970, Hodgson y Levi 1998). Su efecto sinergista ha sido ampliamente utilizado, no solo para aumentar la efectividad de los insecticidas, sino también para comprender la participación de las P450 en la resistencia, en particular de organofosforados y piretroides (Glynne Jones 1998, Romero et al. 2009). Así, el nivel de sinergismo de piretroides con PBO es mayor cuando las P450 están involucradas en la resistencia a los insecticidas (Kasai et al. 1998, Wu et al. 1998). De manera similar, el sinergista de esterasas TPP permite detectar el metabolismo incrementado por este grupo heterogéneo de enzimas.

Entonces, el uso de inhibidores presenta la ventaja de permitir la manipulación experimental de una variable y evaluar luego las consecuencias, llevando a inferir el

grupo enzimático involucrado en la resistencia. Esto se debe a que, si se aplica el inhibidor y disminuye la resistencia, entonces su involucramiento es altamente probable. Por lo tanto, la consecuencia observacional en ambos casos es un aumento de la mortalidad de los insectos previamente tratados con el inhibidor correspondiente.

## Metodología para cumplir el objetivo 2

### *Poblaciones analizadas*

Algunas de las 23 poblaciones de campo provenientes del foco resistente de General Güemes (Provincia de Chaco, Argentina) fueron seleccionadas para ser criadas en el laboratorio. El criterio de selección respondió a la necesidad de tener representados en el estudio de inhibición los dos niveles de resistencia detectados en el relevamiento, así como contar con material biológico suficiente para realizar los ensayos. Por lo tanto, se usaron individuos de primera o segunda generación descendientes de los insectos recolectados en los parajes:

- Baja resistencia: Colonia Castelli, Pozo Colorado.
- Alta resistencia: El Ñandú, El Asustado, La Rinconada, Pampa Argentina.

A diferencia del capítulo 1, se utilizó CIPEIN como cepa susceptible, también usada como referencia en Picollo et al. (2005). El objetivo de emplear esta cría como referencia fue corroborar los valores calculados en esta tesis con los informados en el trabajo mencionado, que representa un estudio fundante de inhibición enzimática en *T. infestans*.

### *Puesta a punto*

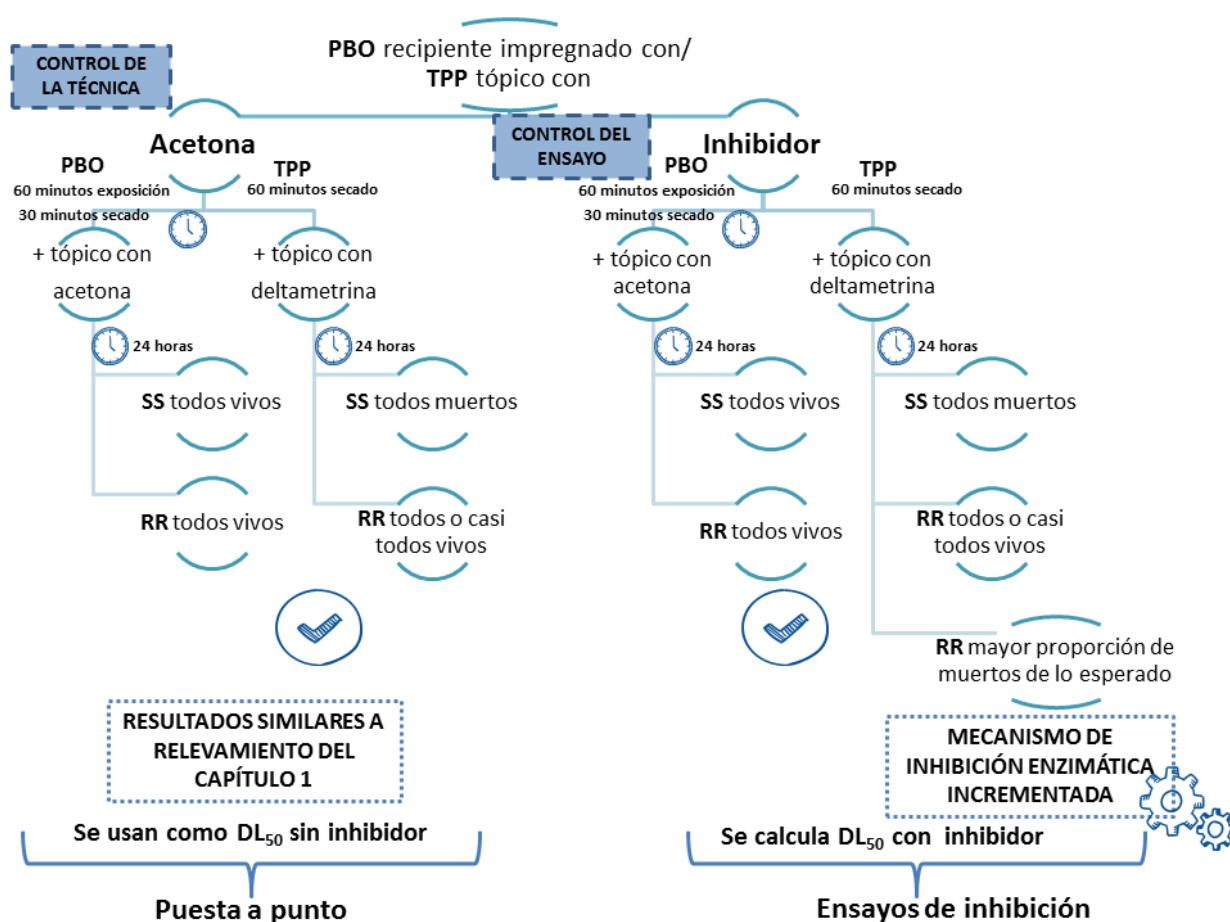
Durante la puesta a punto de los ensayos de inhibición enzimática se evaluó si la técnica interfería en la viabilidad de los insectos y si las  $DL_{50}$  sin inhibidor se modificaban respecto a las obtenidas en el capítulo 1. De esta manera, se expusieron insectos de las poblaciones de interés a las mismas condiciones experimentales requeridas para la determinación de  $DL_{50}$  en presencia de los inhibidores, pero reemplazando estos compuestos por acetona. De manera resumida:

- En el caso del PBO (metodología adaptada de Santo Orihuela et al. 2017): se expusieron grupos de 10 insectos a superficies impregnadas con 1,5 ml de acetona durante 60 minutos. Al cabo de este período, los insectos fueron dejados durante 30 minutos bajo campana. Finalmente, se realizó el tópico de manera similar a la

descrita en el capítulo 1, probando varias soluciones acetónicas de deltametrina en el rango de concentraciones que iba de 0.001 a 1 mg/ml y usando la acetona como control.

- En el caso del TPP (metodología adaptada de Picollo et al. 2005): se topicaron grupos de 10 insectos con acetona y 60 minutos después se los expuso a un segundo tópico con soluciones de deltametrina o sólo con acetona a modo de control.

Dado que los resultados en estos ensayos de control de la técnica fueron similares a los ya obtenidos, se usaron los valores de  $DL_{50}$  informados en el capítulo 1 a modo de  $DL_{50}$  sin inhibidor. Por otro lado, para obtener la  $DL_{50}$  en presencia de ambos inhibidores, se expusieron los insectos a superficies impregnadas con PBO, mientras que otros grupos de las mismas poblaciones se topicaron con TPP (Figura 19).



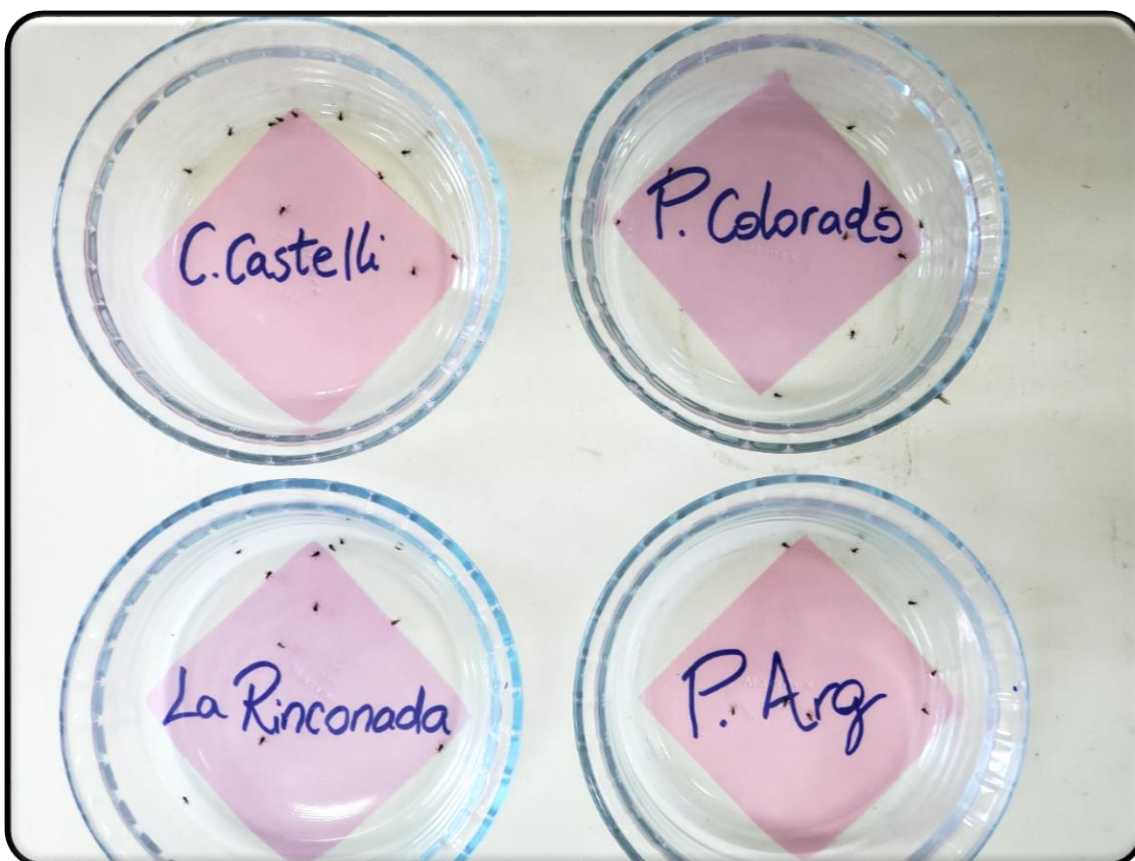
**Figura 19.** Esquema de la puesta a punto y de los ensayos de inhibición enzimática con los resultados esperados.

Tanto para los ensayos de inhibición con PBO como con TPP, la metodología siguió con la determinación tradicional de la curva dosis-respuesta para cada población en presencia de cada sinergista. El detalle de los procedimientos se encuentra en los siguientes apartados.

#### *Ensayos de inhibición de oxidasas: exposición a superficies impregnadas con PBO*

La exposición de insectos al inhibidor de oxidasas PBO (92,3% de pureza, Chemotécnica) se realizó siguiendo la metodología adaptada por Santo Orihuela et al. (2017). La misma propone el uso de recipientes de vidrio circulares con una base de 95 cm<sup>2</sup> de área y 6 cm de altura. Las bases fueron impregnadas con 1,5 ml de solución de la dosis subletal 3,17 mg/ ml de PBO diluído en acetona según especificó el protocolo. La impregnación se realizó mediante movimientos circulares continuos que garantizaron una cobertura pareja de la superficie. Al cabo de una hora de secado bajo campana, la acetona se evaporó y la concentración final de PBO en la base de los recipientes fue de 500 mg/ m<sup>2</sup>.

Se expusieron grupos de 10 ninfas I a las superficies impregnadas durante 60 minutos. Durante este tiempo, se las dejó caminar libremente por la base del recipiente (Figura 20).



**Figura 20.** Ninfas I de las distintas poblaciones caminando por los recipientes impregnados con PBO.

Luego, los grupos se retiraron del recipiente impregnado y se colocaron en un contenedor limpio bajo campana durante 30 minutos. Durante ese tiempo, se esperó que los insectos se secaran mientras la inhibición se hacía efectiva. Una vez concluido el período, las ninfas recibieron la aplicación tópica de 0,2  $\mu$ l de solución de insecticida mediante micro jeringa Hamilton. Se evaluaron soluciones de diferentes concentraciones de deltametrina para construir una curva dosis-respuesta en presencia del inhibidor, cada una con al menos 3 réplicas. Al igual que en el capítulo 1, se comenzó con una DD de deltametrina y después se realizaron al menos tres réplicas de otras concentraciones para obtener la curva para cada población. El control del ensayo consistió siempre en el tópico con acetona en los insectos expuestos previamente al PBO para descartar que el inhibidor estuviera interfiriendo en la viabilidad de los insectos (control del ensayo en la Figura 19). Las ninfas tratadas fueron mantenidas en la cámara de cría mencionada en la metodología para cumplir el objetivo 1 y se midió mortalidad al cabo de 24hs siguiendo



el mismo protocolo usado para obtener las  $DL_{50}$  del relevamiento toxicológico ya descrito.

El control de la técnica fue realizado únicamente durante la puesta a punto y ya fue descrito en esa sección (ver puesta a punto).

#### *Ensayos de inhibición de esterasas: tópico con TPP*

El ensayo con el inhibidor de esterasas TPP (99%, Janssen Chimica, Bélgica) consistió en un doble tópico siguiendo el protocolo de Picollo et al. (2005). La metodología de ese trabajo propone la aplicación tópica de 0,2  $\mu$ l de la dosis subletal máxima del inhibidor medida en una cepa susceptible: 1  $\mu$ g por insecto. Esto se logró preparando soluciones de 5 mg/ ml de PBO en acetona.

Transcurridos 60 minutos del primer tópico, se realizó un segundo tópico con la solución correspondiente del insecticida. El control consistió en el tópico con acetona para descartar que el inhibidor estuviera interfiriendo en la viabilidad de los insectos (control del ensayo en la Figura 19). Nuevamente se comenzó con una DD de deltametrina y después se realizaron al menos 3 réplicas de otras concentraciones para obtener la curva dosis-respuesta para cada población.

El control de la técnica fue realizado únicamente durante la puesta a punto y ya fue descrito en esa sección (ver puesta a punto).

#### *Análisis estadístico*

Los datos de mortalidad de ninfas I a diferentes concentraciones de deltametrina en presencia de inhibidores se usaron para construir curvas dosis-respuesta y llevar a cabo el análisis Probit correspondiente tal como fue descrito en el capítulo 1 (Litchfield y Wilcoxon 1949). Luego, se analizaron de dos maneras diferentes:

- Por un lado, **se estimó el  $GR_{50}$  con su intervalo de confianza (IC) del 95% de cada población en presencia de ambos inhibidores (+PBO, +TPP) y se lo comparó con los  $GR_{50}$  sin inhibidor informadas en el capítulo 1.** El  $GR_{50}$  con inhibidor se obtuvo a partir de la relación entre la  $DL_{50}$  de la población de interés con el inhibidor y la  $DL_{50}$  de la población susceptible de referencia con el mismo inhibidor (Ecuación 2). Como se describió en la introducción al capítulo 1, no se trató estrictamente de un cociente, sino de una estimación realizada por el análisis

Probit (Robertson et al. 2007b). Se esperaba que el GR<sub>50</sub> con inhibidor disminuyera si el mecanismo de detoxificación enzimática evaluado estaba involucrado en la resistencia.

$$GR_{50} \sim \frac{DL_{50} \text{ población de interés con el sinergista}}{DL_{50} \text{ población susceptible con el sinergista}}$$

**Ecuación 2.** Estimación simplificada del GR<sub>50</sub> con inhibidor.

- Por otro lado, se estimaron los coeficientes de sinergismo (CSs) con ambos inhibidores para cada población (Ecuación 3) y se los comparó con los de la población susceptible de referencia. Cada CS se obtuvo a partir de la relación entre la DL<sub>50</sub> de la población de interés sin sinergista y la DL<sub>50</sub> de la misma población con sinergista:

$$CS = \frac{DL_{50} \text{ población de interés sin el sinergista}}{DL_{50} \text{ población de interés con el sinergista}}$$

**Ecuación 3.** Coeficiente de sinergismo.

Valores de CS mayores a 1 indican que el sinergista inhibió enzimas y, por lo tanto, disminuyó la DL<sub>50</sub> (se visualiza al analizar el desplazamiento horizontal en la tabla de resultados). Sin embargo, esto puede suceder tanto en poblaciones resistentes como susceptibles, por lo que el CS por sí mismo no dice nada acerca del sinergismo y debe ser analizado en relación al CS de la susceptible de referencia. De esta manera, se esperaba que el CS de la población analizada fuera mayor que el CS de la susceptible de referencia si el mecanismo de detoxificación enzimática evaluado estaba involucrado en la resistencia.

Todos los datos de los bioensayos se analizaron con el software POLO PLUS (LeOra 2007), corrigiendo los valores de mortalidad con la fórmula de Abbott.

## Resultados del capítulo 2

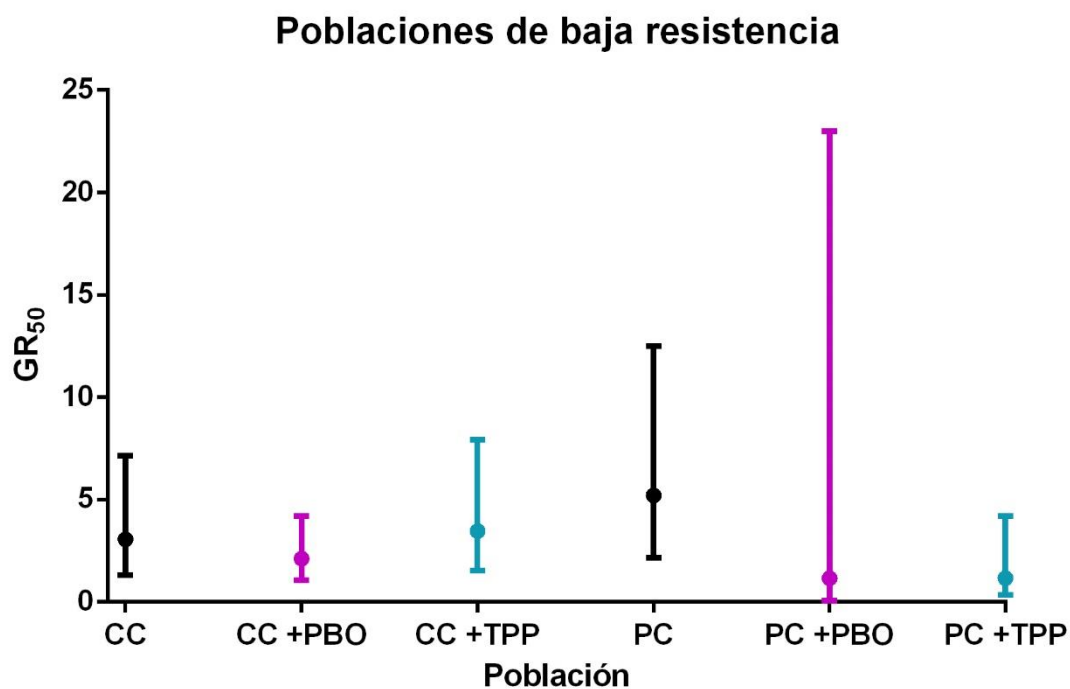
Los valores toxicológicos obtenidos para la cepa susceptible de referencia (CIPEIN) sin exposición, en presencia de PBO (+PBO) y de TPP (+TPP) se superpusieron con los reportados en Picollo et al. (2005). Además, como sucedió en ese trabajo, los valores de las tres DL<sub>50</sub> para la población susceptible (sin inhibidor, +PBP, +TPP) fueron similares. En este sentido, que los intervalos de confianza (IC) de los tratados con inhibidor se solaparan con los sin tratar, sugirió que los inhibidores no modificaron significativamente procesos metabólicos mediados por oxidasas y esterases involucrados en la viabilidad de los insectos (Tabla 3).

	Tratamiento con deltametrina		
	Sin inhibidor	+PBO	+TPP
Parámetro	<b>N</b> <b>Pendiente ± DE</b> <b>DL<sub>50</sub> (ng/i) (IC 95%)</b> <b>GR<sub>50</sub> (IC 95%)</b> <b>CS</b>		
Población	CIPEIN (cepa de referencia)	150 3,10± 0,26 0,13 (0,11- 0,15)	90 2,32± 0,24 0,31 (0,09- 0,58)
			112 1,34± 0,39 0,30 (0,03- 0,59)
			0,42 0,43
	Colonia Castelli	179 2,08 ±0,34 0,56 (0,31-0,85) 3,06 (1,31- 7,14)	306 1,50± 0,23 0,67 (0,32- 1,04) 2,13 (1,08- 4,20)
			0,84 0,54
Población	Pozo Colorado	110 2,58 ± 0,80 0,96 (0,41- 1,35) 5,21 (2,16- 12,50)	76 0,23± 0,12 0,412 1,17 (0,06-23)
			93 1,00± 0,35 0,35 (0,04- 0,78) 1,17 (0,33- 4,20)
			2,33 2,74
	El Ñandú	251 0,96 ± 0,23 115,2 (49,6- 453) 500 (200-1000)	188 1,05± 0,15 24,05 (10,03- 81,35) 83,33 (29,41- 200)
			4,79
Población	La Rinconada	198	64 209
			66

	0,60 ±0,19 > 200 >1000	0,60 ±0,19 >200 >1000 1	0,35± 0,15 >200 >1000 1
El Asustado	255 1,11 ±0,74 > 200 > 1000	267 0,36± 0,11 > 200 >1000 1	201 1,21± 0,50 > 200 >1000 1
Pampa Argentina	251 7,72 > 200 > 1000	149 1,50± 0,46 >200 >1000 1	224 1,08± 0,30 >200 >1000 1

**Tabla 3.** Toxicidad de la deltametrina con y sin inhibidores. DE= desvío estándar, ng/i= nanogramos por insecto, 95% IC= intervalo de 95% de confianza, GR<sub>50</sub>= grado de resistencia, CS= coeficiente de sinergismo (DL<sub>50</sub> sin inhibidor/ DL<sub>50</sub> con inhibidor).

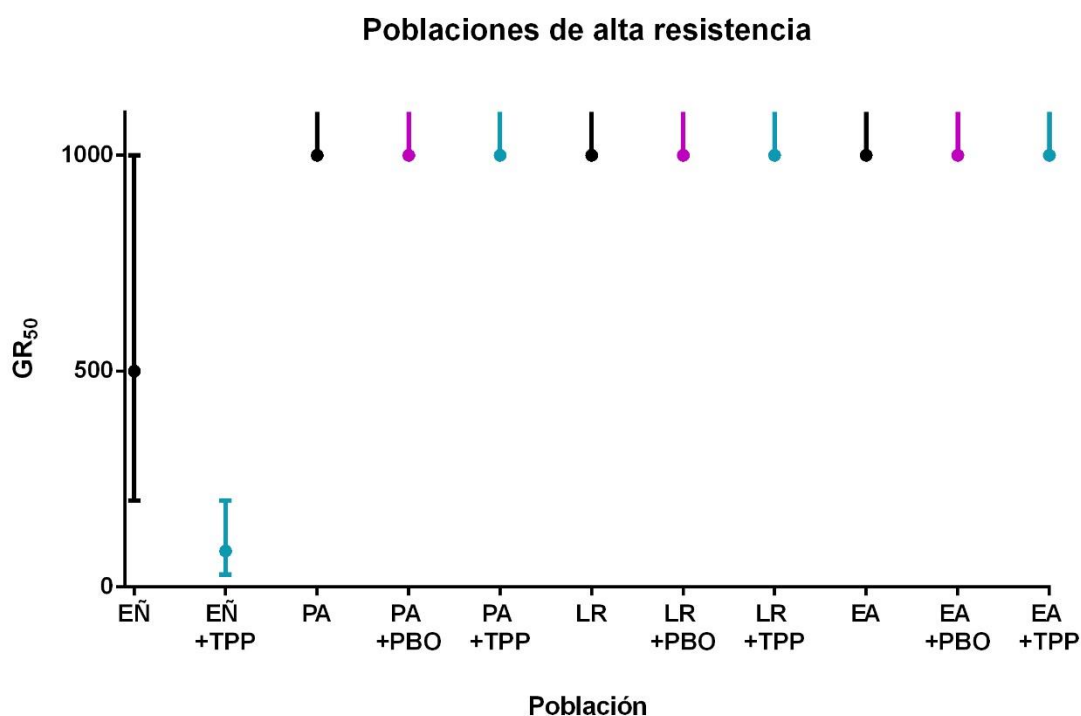
Los GR<sub>50</sub> de las poblaciones de baja resistencia expuestas previamente a los inhibidores presentaron alta variabilidad, lo que provocó un solapamiento en sus IC respecto a los valores obtenidos sin inhibidor en el capítulo 1(Figura 21).



**Figura 21.** GR<sub>50</sub> y sus IC para las poblaciones de baja resistencia sin inhibidor, con PBO (+PBO) y con TPP (+TPP).

De las dos poblaciones evaluadas, Pozo Colorado (PC) presentó un solapamiento menor y una tendencia más clara de reducción de los valores absolutos de  $GR_{50}$  en presencia de PBO y TPP. Esta disminución permitió inferir que las enzimas oxidasas y esterasas estarían involucradas en la detoxificación incrementada del insecticida. En consecuencia, el CS fue considerablemente mayor al de la cepa susceptible en ambos casos: 2,33 +PBO (versus 0,42 en la cepa susceptible) y de 2,74 +TPP (versus 0,43 en la cepa susceptible).

Dentro de las poblaciones de alta resistencia se destacó El Ñandú (EÑ), que mostró una disminución significativa de los parámetros toxicológicos: el  $GR_{50}$  pasó de tener un valor de 500 a ser 83,33 +TPP, con un IC que apenas llegó a tocarse en su extremo superior con el de la población sin inhibidor (Figura 22).

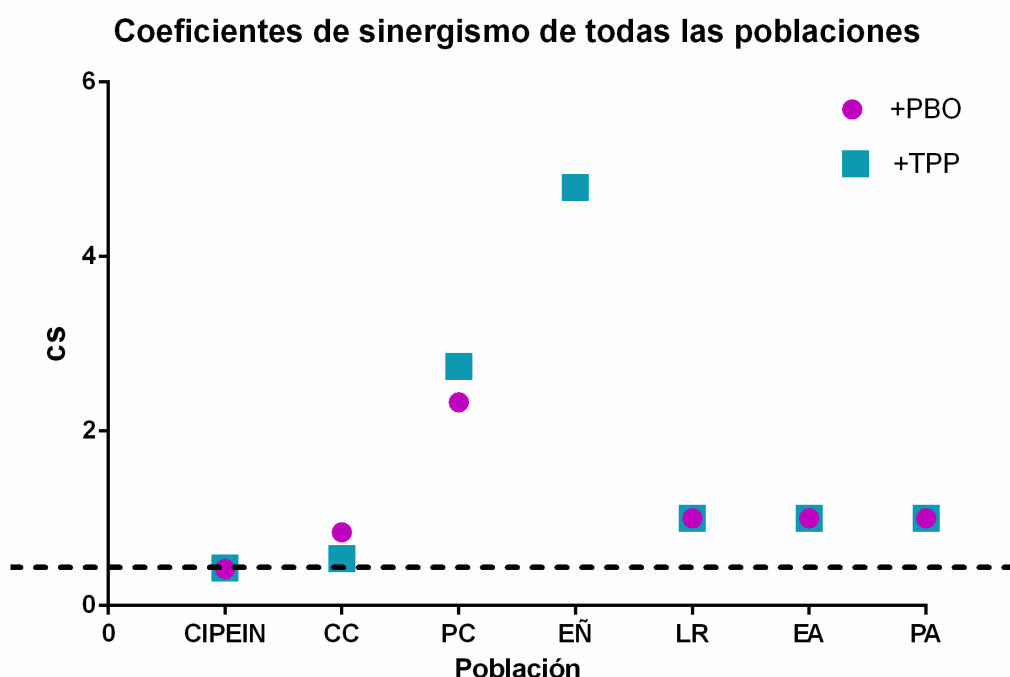


**Figura 22.**  $GR_{50}$  y sus IC de las poblaciones de alta resistencia sin inhibidor, con PBO (+PBO) y con TPP (+TPP).

En el mismo sentido que lo anterior, el CS de la población El Ñandú +TPP fue 4,79. Ambos resultados podrían estar indicando un efecto contributivo de las esterasas a la alta resistencia manifestada por esta población. La detoxificación incrementada por parte de oxidasas no pudo ser evaluada por falta de material biológico. La cría de insectos colectados a campo en este paraje sufrió una disminución poblacional muy grande durante

el invierno 2017. Si bien fue suplementada con adultos recolectados en el campo posteriormente, nunca se logró tener material biológico suficiente para completar los ensayos toxicológicos.

El resto de las poblaciones resistentes (La Rinconada, El Asustado, Pampa Argentina) no mostraron disminuciones significativas en sus  $GR_{50}$ , presentando valores muy altos en presencia de ambos inhibidores ( $GR_{50} > 1000$ , Figura 22) y, en consecuencia, CS iguales a 1 (Figura 23).



**Figura 23.** Coeficientes de sinergismo (CS) con PBO (+PBO) y con TPP (+TPP). La línea punteada marca los valores de la cepa susceptible de referencia (CIPEIN) para facilitar la comparación con las poblaciones de baja y alta resistencia.

## Discusión del capítulo 2

Luego de la aplicación de inhibidores, la disminución de la resistencia en las poblaciones Pozo Colorado y El Ñandú sugiere que la detoxificación enzimática incrementada es un mecanismo promotor de resistencia presente en el foco heterogéneo de General Güemes. Dentro de las poblaciones de resistencia baja, Colonia Castelli no modificó significativamente sus parámetros toxicológicos. Por el contrario, Pozo Colorado mostró una disminución del  $GR_{50}$  en presencia de ambos sinergistas, y ésta fue

lo suficientemente grande como para que la población pueda considerarse susceptible (los IC +PBO y +TPP pasaron a incluir al valor 1). En el otro extremo del gradiente de estatus toxicológico, las cepas de alta resistencia con  $GR > 1000$  no parecerían tener efecto de estos grupos de enzimas. Sin embargo, podría pensarse que estas poblaciones presentan metabolismo detoxificante incrementado pero que la disminución en sus  $GR_{50}$ s luego de la inhibición aún sea estimada de manera no finita (es decir, que sigan estimándose como  $GR > 1000$ ). Si esto sucediera, podría haber metabolismo incrementado no detectable por la metodología utilizada. Como situación intermedia podría plantearse la población El Ñandú, ya que dentro de las de alta resistencia, tiene una estimación finita del  $GR_{50}$  a deltametrina y mostró sinergismo en presencia del inhibidor de esterasas TPP. A diferencia de lo observado en Pozo Colorado, la disminución no fue lo suficientemente grande como para cambiar de estatus toxicológico y siguió considerándose de resistencia alta. Finalmente, se ha demostrado que la deltametrina induce la expresión de tres genes del citocromo P450 tanto en poblaciones susceptibles como resistentes (Grosso et al. 2016). Por lo tanto, no debería descartarse la posibilidad de que en algunas poblaciones exista metabolismo incrementado de oxidasas pero que se manifieste luego de un evento de inducción por el propio insecticida, y por lo tanto sin posibilidad de ser inhibido según la metodología utilizada en el presente trabajo, como se vio en La Esperanza (Grosso et al. 2016), población resistente del foco de General Güemes.

La actividad incrementada de oxidasas es un mecanismo de resistencia frecuente y ha sido ampliamente caracterizado en diversas especies de relevancia sanitaria (Berge et al. 1998, Scott 1999, Feyereisen 2005, Bass y Field 2011, David et al. 2013, Corbel y N'Guessan 2013). Como ejemplo de la aplicación de métodos bioquímicos, Hung y Sun (1989), utilizaron etoxicoumarina como sustrato y encontraron que los homogenatos de larvas de polilla *Plutella xylostella* resistente a los fenvalerantes poseían una actividad 100 veces mayor que los insectos susceptibles. Bouvier et al. (1998) informaron una mayor actividad de la etoxicoumarina-desetilasa medida a nivel individual en placas de microtitulación en la polilla resistente a deltametrina *Cydia pomonella*. Más tarde, Rodríguez et al. (2011) realizó una medición individual *in vivo* en la misma especie y detectó un aumento significativo (de 5,1 a 16,6 veces) de la actividad de este complejo enzimático en larvas en nueve de las trece poblaciones resistentes analizadas.

La contribución de esta familia de enzimas a la degradación de insecticidas se ha demostrado en *T. infestans* de diferentes regiones de Argentina, Brasil y Bolivia (Vassena

et al. 2000, González Audino et al. 2004, Picollo et al. 2005, Santo Orihuela et al. 2008, Roca Acevedo et al. 2011). González Audino et al. (2004) examinaron la actividad de enzimas detoxificantes en poblaciones de *T. infestans* resistentes ( $GR_{50} = 7,9$ ) de la provincia de Salta. Mientras que las esterasas no mostraron diferencias claras, la actividad de las P450, medida por el ensayo de 7-etoxicoumarina-O-desetilación, reveló un aumento significativo en las poblaciones resistentes respecto a las susceptibles. Sin embargo, es importante señalar que en los estudios mencionados se caracterizaron poblaciones con grados de resistencia más bajos que los descritos en esta tesis. Teniendo en cuenta que en el foco heterogéneo de Güemes posee los niveles de resistencia más altos registrados hasta el momento ( $GR_{50} > 1000$ ), surge la necesidad de entender el peso relativo de distintos mecanismos haciendo hincapié en aquellos que promuevan los niveles más elevados.

Dentro de la gran diversidad de estudios genéticos, Edi et al. (2014) estudiaron la resistencia a insecticidas en el mosquito transmisor de malaria *Anopheles gambiae* y propusieron a los genes del grupo CYP6P como candidatos en la participación de la desintoxicación mediada por el citocromo P450. Específicamente, la sobreexpresión de CYP6P3 ha sido asociada en diversos trabajos a la resistencia a piretroides en la especie (Djouaka et al. 2008, Müller et al. 2008) y caracterizada luego en poblaciones de campo (David et al. 2013). Además, se ha identificado el gen ortólogo CYP6P9 en poblaciones resistentes de otra especie transmisora de malaria, *Anopheles funestus* (Wondji et al. 2009, Riveron et al. 2013) y se sabe que los genes de las enzimas de ambas especies pueden metabolizar piretroides de tipo I y II (Stevenson et al. 2011). Otros estudios demostraron que la amplificación de un único citocromo P450 puede seleccionarse rápidamente en una población y hacerla resistente a insecticidas (French Constant et al. 2004). Por ejemplo, CYP6D1 es el responsable de mejorar la capacidad de degradar piretroides en una cepa de *Musca domestica* (Zhang et al. 2007). Por todo lo anterior, las monooxigenasas P450 son un complejo enzimático muy importante en la degradación y en la resistencia a insecticidas piretroides en muchas especies de insectos. La gran abundancia de algunos miembros de genes de estas familias específicas en triatomíneos los hace candidatos para realizar estudios fisiológicos y genéticos.

A la luz de lo anterior, Traverso et al. (2017) analizaron el patrón de expresión de los genes de estas superfamilias en los transcriptomas de tres especies vectoras de la enfermedad de Chagas: *Triatoma dimidiata*, *T. pallidipennis* y *T. infestans*, además de



compararlos con la información disponible de *Rhodnius prolixus* y otros insectos. Los autores encontraron expansiones de genes de las enzimas glutatión-transferasas (GST) de clase Sigma, CYP3 de la superfamilia citocromos P450 (CYP) y del clado E en la superfamilia de colinesterasas (CCE), proponiendo que esos genes presentaban el principal potencial de detoxificación en todas las especies de triatominos analizadas. Además, los ensayos de PCR en tiempo real les permitieron identificar un aumento en la expresión del gen CYP4 en El Juramento, una de las poblaciones de *T. infestans* resistentes a piretroides del foco de General Güemes. Este resultado está en concordancia con Grosso et al. (2016), que demostró la sobreexpresión de un gen CYP4 en la población resistente La Esperanza (también perteneciente al mismo foco) y sugirió que éste podría ser un mecanismo extendido de la resistencia a piretroides de la especie. En consecuencia, los estudios moleculares recientes apuntan a una participación del metabolismo oxidativo en los altos niveles de resistencia a los piretroides detectados en triatominos de la ecorregión del Gran Chaco.

En relación a las esterasas, el proceso de detoxificación incrementada por parte de este grupo de enzimas también ha sido caracterizado en diversas especies de importancia económica y/o sanitaria, como es el caso de las poblaciones del mosquito *Culex pipiens* que mostraron resistencia a insecticidas organofosforados (Chevillon et al. 1995). También en la oruga del tabaco *Helicoverpa armigera* los ensayos enzimáticos sugirieron que la actividad de esterasas correlacionaba positivamente con la resistencia a la cipermetrina (Achalake et al. 2009).

La mayor parte de los estudios de metabolismo incrementado de esterasas en *T. infestans* se basan en mediciones de actividad enzimática y de inhibición. Se ha demostrado la relación entre la actividad incrementada de estas enzimas y la resistencia a deltametrina en ninfas provenientes de las provincias de Salta y La Rioja (Santo Orihuela et al. 2008). Los autores encontraron un aumento en el porcentaje de individuos con mayor actividad piretroide-esterasa en las poblaciones resistentes respecto a la susceptible. Posteriormente caracterizaron un leve incremento de la actividad en huevos de la población resistente a deltametrina de El Palmar, Bolivia (Santo Orihuela et al. 2013). Otro estudio realizado en estadios inmaduros encontró una actividad mayor de las esterasas en huevos de doce días de la población boliviana de Entre Ríos (GR<sub>50</sub> 173) y la argentina Campo Largo (GR<sub>50</sub> 1108) (Roca Acevedo et al. 2015). Este resultado es consistente con la menor susceptibilidad a la deltametrina reportada para los huevos

tardíos en comparación con los huevos de desarrollo temprano (cuatro días de edad) y medio (siete días de edad) (Roca Acevedo et al. 2013). Por otro lado, las poblaciones de baja resistencia del Departamento de Santa Cruz (Bolivia) que mostraron actividad incrementada de oxidasas fueron sometidas al análisis bioquímico de las esterasas piretroides y también mostraron actividad incrementada, lo que indicó una posible contribución de ambos grupos enzimáticos a la susceptibilidad alterada (Santo Orihuela et al. 2017). Todos estos estudios llevan a la idea que la resistencia a los piretroides basada en esterasas en *T. infestans* podría tener múltiples orígenes y remarcan la importancia del esclarecimiento de la contribución relativa de cada mecanismo asociado a la resistencia a deltametrina.

En cuanto a la metodología utilizada en el presente estudio, es decir, la determinación de detoxificación incrementada por medio de inhibidores, estudios en diferentes especies plaga como *Tribolium castaneum* y *Helicoverpa armígera* detectaron que el PBO no podía suprimir por completo la resistencia a los piretroides (Collins 1990, Ru et al. 1998). De manera similar, Romero et al (2009) detectaron resistencia residual en chinches de cama *Cimex lectularius* luego del tratamiento con PBO, infiriendo que las P450 estarían involucradas en promover la resistencia a deltametrina, pero no serían el único mecanismo responsable. Como mecanismo alternativo propusieron la disminución de la penetración cuticular, el aumento de la desintoxicación metabólica por glutatión transferasas o por esterasas y la disminución de la sensibilidad del sitio de acción por mutaciones *kdr*. Sobre el último mecanismo hay fuerte evidencia en la especie, como es el caso de las poblaciones de Nueva York caracterizadas por Yoon et al. (2008). Estas eran 264 veces resistentes a deltametrina, no mostraron diferencias detectables en la actividad metabólica de las enzimas glutatión transferasas, ni en las esterasas, ni en las 7-etoxicumarina O- dietilasas, pero sí se encontraron dos mutaciones puntuales en el gen del canal de sodio: V419L y L925I.

Específicamente en los vectores de la enfermedad de Chagas, Vassena et al. (2000) demostraron que la resistencia a los piretroides en una población de *T. infestans* de Brasil (GR<sub>50</sub> 7) y una de *R. prolixus* de Venezuela (GR<sub>50</sub> 11,4) se reducían con PBO, sugiriendo al metabolismo oxidativo incrementado como causa de la resistencia. Este resultado concuerda con el estudio fundante en el esclarecimiento de mecanismos de resistencia en las poblaciones de *T. infestans* que causaron las primeras fallas de control a campo en el norte de Argentina (Picollo et al. 2005). La aplicación tópica de PBO

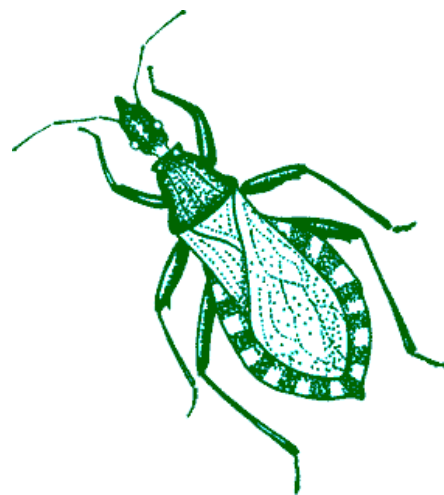
produjo una reducción del nivel de resistencia de 133,1 a 101,1 en Salvador Mazza, luego corroborada por la actividad incrementada de la monooxigenasa P450 medida en insectos individuales a través de la etoxicoumarina-O-deetilasa. Sin embargo, la pequeña magnitud del aumento llevó a los autores a postular que la participación de las monooxigenasas interactuaba con otros mecanismos de resistencia, como la insensibilidad de las membranas nerviosas (relacionada con la presencia de una mutación *kdr*) o la permeabilidad cuticular, ambos mecanismos detectados en estudios posteriores (Pedrini et al. 2009, Fabro et al. 2012, Capriotti et al. 2014). Cockburn (1976) había detectado que la resistencia al organoclorado Dieldrin en una cepa de *R. prolixus* se debía principalmente a cambios en la penetración cuticular. Luego, Pedrini et al. (2009) desarrolló un procedimiento estandarizado para medir el grosor de la cutícula en el segundo tergito de *T. infestans* por microscopia electrónica de barrido. Esta medición indicó que el tegumento de los insectos resistentes era más grueso que el de los susceptibles ( $32,1 \pm 5,9 \mu\text{m}$  versus  $17,8 \pm 5,4 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,0001$ ). Además, los diferentes parámetros del contenido de hidrocarburos de la cutícula en peso ajustado mostraron aumentos significativos en la cepa resistente, lo que sugiere que un transporte selectivo de hidrocarburos a la superficie podría estar relacionado con el fenotipo de sensibilidad reducida.

En un estudio reciente, Santo Orihuela et al. (2017) vieron que las poblaciones de campo de *T. infestans* de baja resistencia de Guasuanti, Itapicoe y El Cruce (Departamento de Santa Cruz, Bolivia) pretratadas con PBO mostraban una susceptibilidad a la deltametrina similar a la de la cepa susceptible de referencia. Sin embargo, los valores de la actividad de la monooxigenasa P450 fueron altamente variables entre poblaciones. Esto podría reflejar la especificidad de cada isoenzima de esta gran familia involucrada en el mecanismo de resistencia a cada tipo de insecticida en particular (Schama et al. 2016). Por lo tanto, la familia de enzimas específicas evaluadas mediante los ensayos bioquímicos podría no ser específicamente responsable de la resistencia observada y se remarca la importancia de complementar los estudios bioquímicos con técnicas moleculares que detecten enzimas individuales involucradas en el mecanismo de resistencia en cada población (Ibrahim et al. 2015, Grosso et al. 2016). Sin embargo, a pesar que las técnicas moleculares y bioquímicas permiten la descripción funcional y estructural de las modificaciones en los sistemas enzimáticos, los estudios de inhibición enzimática (como otras técnicas de supresión de componentes y funciones)

permite efectivamente determinar rol de estas enzimas y sus modificaciones en el fenotipo resistente. La modificación del nivel de resistencia luego de la inhibición de un grupo enzimático es una fuerte evidencia de su papel en la resistencia individual y, además, permite de cuantificar su contribución a través de la proporción en que el grado de resistencia disminuye luego de la inhibición.

Por otro lado, el efecto sinergista del PBO se ha utilizado ampliamente para aumentar la efectividad de organofosforados y piretroides (Glynne Jones 1998, Romero et al. 2009). La propagación de la resistencia a piretroides en el mosquito transmisor del dengue, Zika y chikungunya *Aedes aegypti* llevó a la búsqueda de estrategias alternativas para el tratamiento de mosquiteros y demás materiales (Bonnet et al. 2009). Para ello, se evaluaron mezclas de DEET y propoxur que mostraban una interacción positiva, reproduciendo la efectividad alta de los piretroides. Los autores vieron que la sinergia entre ambos compuestos desaparecía en presencia de un inhibidor de oxidasas pero no con el inhibidor de esterasas. Esto sugirió que las oxidasas desempeñaban un papel clave en las interacciones que ocurrían entre el DEET y los inhibidores de la colinesterasa. El conocimiento de este tipo de interacción permitió proponer el uso combinado de insecticidas y repelentes en el control a campo y pensar estrategias integrales que tiendan a la disminución de la incidencia de enfermedades transmitidas por vectores.

Teniendo en cuenta las investigaciones previas y complementando los resultados de esos estudios con los de esta tesis, el mecanismo de detoxificación incrementada por parte de las enzimas oxidasas y esterasas parecería explicar en parte la resistencia en la provincia de Chaco. La consecuencia observacional que se esperaba se cumplió en algunas de las poblaciones analizadas. Por ello, la resistencia metabólica podría ser un mecanismo contributivo dentro del foco heterogéneo de Güemes, pero no parecería ser el principal. Por lo tanto, se remarca la importancia de abordar el estudio de otros mecanismos que puedan estar promoviendo los altos niveles de resistencia caracterizados, como las mutaciones de tipo *kdr* en el sitio de acción de los piretroides, el canal de sodio dependiente de voltaje.



## CAPÍTULO 3

**Descripción de la presencia y la frecuencia de las mutaciones del tipo *kdr* en el canal de sodio dependiente de voltaje como mecanismo de las poblaciones resistentes**

# CAPÍTULO 3

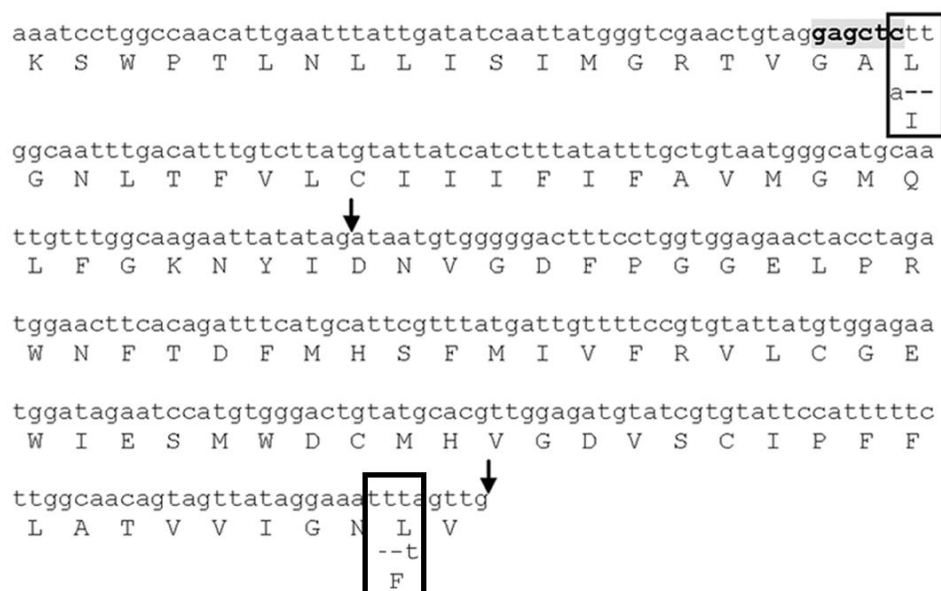
---

## Herramientas de biología molecular para el estudio de la resistencia

Los estudios moleculares representan una herramienta sumamente útil para el mejoramiento del control vectorial y, particularmente, del manejo de poblaciones resistentes. Los piretroides ejercen su acción tóxica sobre el sistema nervioso de los insectos al modificar la función de los canales de sodio dependientes de voltaje en las membranas de las células excitables. En la década del 50' se observó resistencia a la rápida acción de volteo y al efecto letal que tenían los piretroides y el DDT en *Musca domestica*. El gen asociado a este tipo de resistencia en esa especie modelo era un alelo recesivo localizado en el cromosoma 3. El fenómeno y el alelo descriptos fueron llamados en inglés “knockdown resistance” (resistencia al efecto de volteo, abreviado *kdr*) y se comenzó a utilizar este término genérico para referirse a la reducción en la sensibilidad a los piretroides causada por mutaciones puntuales en el gen del canal de sodio (Soderlund 2008). Más tarde, en 1978 se identificó en otra cepa de *M. domestica* un factor con las mismas características que el *kdr* (resistencia al volteo, recesivo, en el cromosoma 3 y resistencia cruzada entre DDT y piretroides) pero que confería un mayor nivel de resistencia, por lo que se denominó super-*kdr*. Resistencia similar al *kdr* (*kdr*-like) fue encontrada en dípteros, lepidópteros y dictiópteros, muchos de ellos de gran interés económico y sanitario (Oppenoorth 1985, Soderlund y Bloomquist 1990, Soderlund y Knipple 2003). La mayoría de las modificaciones se encontraron en el dominio II de esta gran proteína de membrana, particularmente en la región comprendida entre los segmentos transmembrana S4 y S6.

Como puntapié inicial de la caracterización de la resistencia al volteo en *T. infestans*, se encuentran los estudios realizados en el Laboratorio de Genética y Genómica Funcional, del Centro Regional de Estudios Genómicos (CREG, La Plata), en colaboración con el CIPEIN. Fabro et al. (2012) clonaron y secuenciaron el dominio II del canal de sodio de individuos de poblaciones de diferentes niveles de susceptibilidad. En todos los clones individuales de la población salteña de Madrejones (GR= 35,7 (27,03-47,62)) hallaron una timina en lugar de una adenina que se traducía en una fenilalanina en vez de una leucina, similar a lo que ocurría con la mutación *kdr* L1014 caracterizada en moscas. En contraposición, vieron que las secuencias de los clones de la cepa susceptible CIPEIN presentaban la condición salvaje (wild type).

La variedad de perfiles y niveles de resistencia descrita en las poblaciones de campo de *T. infestans* (Picollo et al. 2005, Toloza et al. 2008, Germano et al. 2010, Carvajal et al. 2012), llevaron a Capriotti et al. (2014) a sugerir la existencia de otros alelos asociados a la susceptibilidad reducida. De esta manera, lograron identificar la L925I, una mutación *kdr* que, a diferencia de la L1014F, se ha identificado únicamente en hemípteros (Morin et al. 2002, Yoon et al. 2008, Karatolos et al. 2012). El análisis de los clones secuenciados de El Malá, una de las poblaciones resistentes del foco de General Güemes caracterizado en el capítulo 1 (GR= 1031), mostró que todos los clones individuales presentaban una sustitución de la citosina original por una adenina (Figura 24).



**Figura 24.** Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la porción del dominio II del canal de sodio de *T. infestans* donde se ubican las mutaciones asociadas a resistencia. El primer recuadro corresponde a la posición de la L925I, el segundo a la L1014F, las flechas indican los intrones, el sombreado marca el sitio de restricción de la SacI. Adaptado de Capriotti et al. (2014).

Esta mutación se traduce en una isoleucina en la secuencia de aminoácidos donde debería haber una leucina y se ubica en un bucle intracelular del canal, entre los segmentos transmembrana IIS4 e IIS5, como se vio en otras especies (Soderlund 2008). Como era de esperar, los individuos de la cepa susceptible mostraron la secuencia

wildtype. La caracterización electrofisiológica por expresión *in vitro* en ovocitos de *Xenopus laevis* demostró que la sustitución de L925I disminuye significativamente la potencia piretroide (Usherwood et al. 2007).

Los dos trabajos propusieron metodologías rápidas basadas en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) secuenciales para detectar las mutaciones puntuales en grupos de insectos provenientes del campo. En el caso de la L1014F, el protocolo utiliza reacciones alelo-específicas (Fabro et al. 2012). En el caso de la L925I, dado que la sustitución de citosina por adenina altera un sitio de restricción de la enzima *SacI*, el método se basa en la diferencia de bandas que se obtienen al digerir con esta enzima fragmentos del canal de individuos susceptibles y resistentes (Capriotti et al. 2014, Figura 23).

Luego, Sierra et al. (2016) evaluaron la sensibilidad de los ensayos moleculares de detección de *kdr*. Para ello, caracterizaron poblaciones de individuos de distintas generaciones de laboratorio (G2, G3, G10, G11 y G12) provenientes de localidades de las provincias argentinas de Salta y Chaco y de los departamentos bolivianos de Santa Cruz y Tarija. Al aplicar el protocolo al ADN genómico, los resultados fueron similares a los obtenidos por secuenciación, lo que permitió concluir que los métodos pueden usarse de manera confiable en una amplia gama de poblaciones con un límite inferior de sensibilidad del 5%. Por lo tanto, los insectos se podrían agrupar para hacer un diagnóstico rápido de alelos *kdr* en el campo, incluso si éstos aparecen en baja frecuencia o si hay individuos heterocigotas. Los autores también confirmaron la presencia de las mutaciones en dos focos diferenciados: la L1014F en la frontera boliviano-argentina y la L925I en el Chaco argentino. Las frecuencias fueron variables y no mostraron la asociación esperada con la resistencia. Sin embargo, es importante considerar que se usaron poblaciones de laboratorio y que el número de individuos que se logró caracterizar por población fue relativamente bajo.

Los protocolos de biología molecular son sumamente útiles para la detección temprana de la resistencia a piretroides, un requisito esencial para el diseño racional de las campañas de control vectorial de la enfermedad de Chagas. Además, su uso en focos de alta heterogeneidad toxicológica, como la reportada en General Güemes, permite poner a prueba si la frecuencia alta de mutaciones puntuales en el canal de sodio dependiente de voltaje explica niveles elevados de grado de resistencia. Para aportar evidencia a esta hipótesis, se espera detectar las sustituciones L1014F y/o L925I en el



ADN de los insectos de las poblaciones analizadas, con frecuencias altas en aquellas que muestran niveles de resistencia elevados.

### Metodología para cumplir el objetivo 3

#### *Poblaciones analizadas*

Se determinó la presencia y frecuencia de *kdr* en las mismas poblaciones del foco resistente de General Güemes en las que se realizaron los ensayos de inhibición enzimática descriptos en el capítulo 2, con excepción de El Asustado, de la que no se contó con material suficiente:

- Baja resistencia: Colonia Castelli, Pozo Colorado. Dentro de esta categoría, se adicionó la población El Maulte.
- Alta resistencia: El Ñandú, La Rinconada, Pampa Argentina.

Se usó la población Bella Vista como cepa susceptible de referencia del foco resistente.

Los individuos fueron colectados en el campo y separados por poblaciones como se mencionó en la metodología para cumplir el objetivo 1. Una vez que se obtuvo el material necesario para realizar el test de determinación de la resistencia (capítulo 1) y se garantizó la cría para los ensayos de actividad enzimática (capítulo 2), se enviaron los adultos de campo al freezer para facilitar su conservación. Luego, se extrajo el ADN de cada individuo freezeado mediante un kit comercial (Promega, Madison, USA).

Se realizaron extracciones individuales de ADN a partir de diferentes fuentes:

- Insecto entero
- Tres patas
- Seis patas
- Partes blandas obtenidas por disección y extracción de gónadas, músculos alares y sistema nervioso

La cantidad de material genético obtenida en cada extracción individual se cuantificó mediante el uso de un NanoDrop (ThermoFisher, Argentina) para comparar la eficiencia de cada tipo de material.

#### *Puesta a punto*

El protocolo de detección de las mutaciones puntuales se realizó originalmente en el CREG. Luego, la técnica fue trasladada y puesta a punto en el CIPEIN. Para este

objetivo, se amplió el Laboratorio de Biología Molecular del CIPEIN. Se utilizaron las metodologías propuestas por Fabro et al. (2012) y Capriotti et al. (2014) para detectar las mutaciones L1014F y L925I en homo o heterocigosis en grupos de 10 insectos de cada población. En ambas técnicas, se puede determinar la presencia de al menos un individuo resistente dentro del grupo caracterizado (Sierra et al. 2016). Una vez obtenida la información de presencia/ausencia de ambas mutaciones en el pool, se buscó llevar el protocolo a nivel individuo para obtener el dato de cada insecto y calcular así las frecuencias de *kdr*. De esta manera, se determinó cuántos de los 10 insectos que antes habían sido agrupados contenían el alelo resistente L1014F y L925I en homo o heterocigosis. En resumen:

Para la **determinación de presencia/ausencia**, se realizaron pooles de 10 individuos a partir de 1µl de ADN de cada uno. Del volumen final de 10 µl se tomó lo necesario para usar de molde en la PCR general (1,5 µl).

Para la **determinación de frecuencias**, se usaron las extracciones cuantificadas de cada insecto garantizando una concentración mínima de 100 ng/µl de ADN. Esta concentración respondió a condiciones establecidas en el CREG y fue la que mostró mayor eficiencia de las evaluadas en el CIPEIN.

### ***Protocolo general***

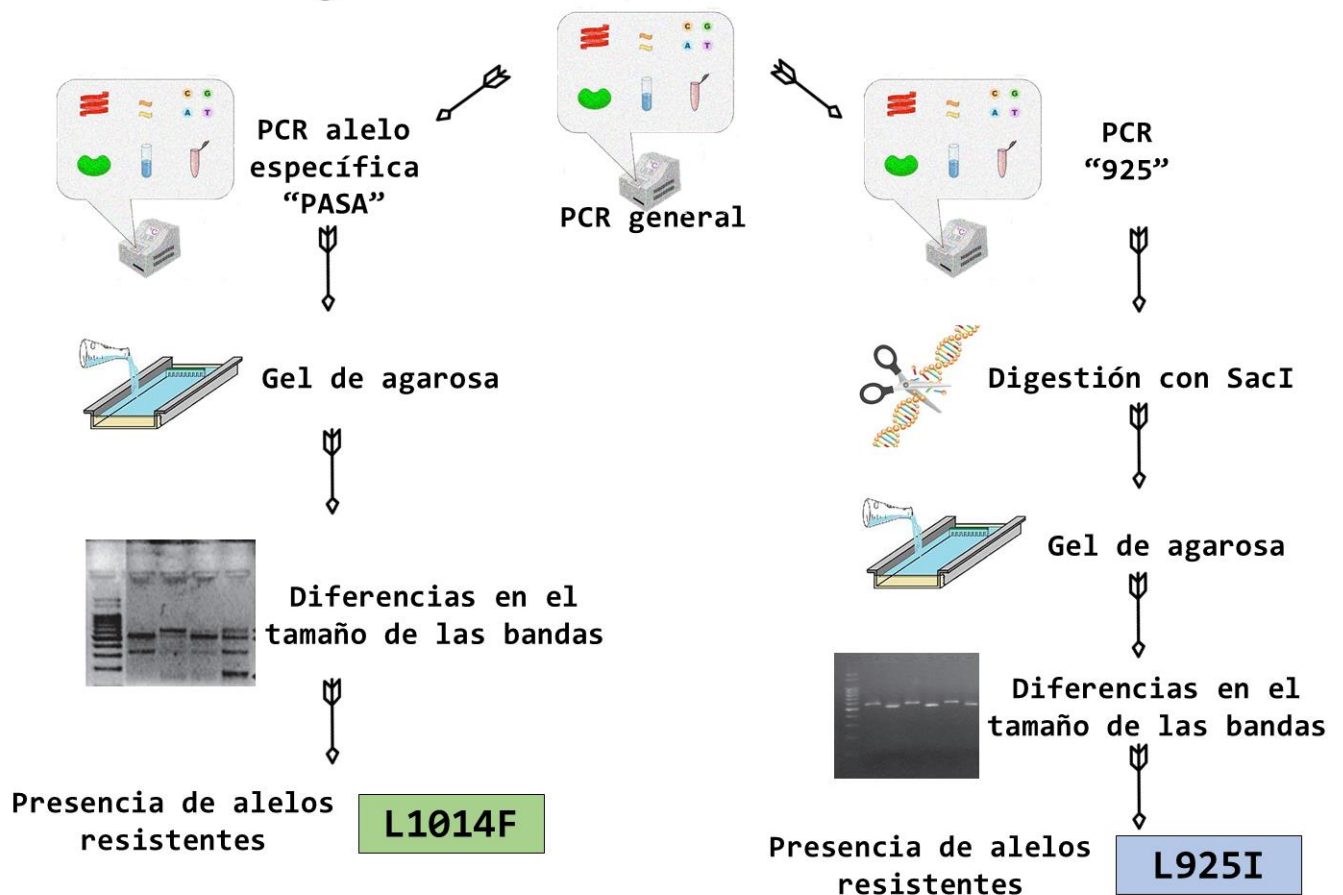
La detección de alelos resistentes requirió aumentar la cantidad de ADN extraído. Por este motivo, ambos protocolos comenzaron con una PCR general en un termociclador (Bioer Gene Pro TC-E-96G, Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd., Binjiang, China) para amplificar el fragmento del canal de 2800 pares de bases (pb) que incluye a la región con las dos mutaciones *kdr*. Originalmente, esta PCR inicial utilizó los primers Ti Fwd y Ti Rev 3 (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Argentina). Luego, se reemplazó el Ti Fwd original (5´ TGG CCA ACA TTG AAT TTA TTG ATA TC- 3´) por la versión modificada propuesta en Santo Orihuela et al. (2017) (5´ GAT ATC A.AT TAT GGG TCG AAC TG- 3´), que es un corrimiento de 21 pb río abajo respecto al original. Esta incorporación aumentó la eficiencia de la técnica, pero cabe aclarar que los fragmentos obtenidos a partir de las PCR´s fueron levemente más pequeños que los citados en la bibliografía.

Tomando como base el producto obtenido de la PCR inicial, el protocolo se adaptó en función de la mutación puntual que se buscó detectar:

- Para detectar la L1014F: se realizó una PCR alelo específica denominada “PASA” (PCR Amplification of Specific Alleles) con un set de 4 primers, según Fabro et al. (2012).
- Para detectar la L925I: se usó otra PCR denominada simplemente “925” con un set de 2 primers, seguida de digestión con la enzima endonucleasa de restricción SacI, según Capriotti et al. (2014).

El esquema general del protocolo se resume en la Figura 25.

## Protocolo general de detección de mutaciones *Kdr*



**Figura 25.** Esquema general del protocolo para detectar las mutaciones L1014F y L925I en poblaciones de *T. infestans*.

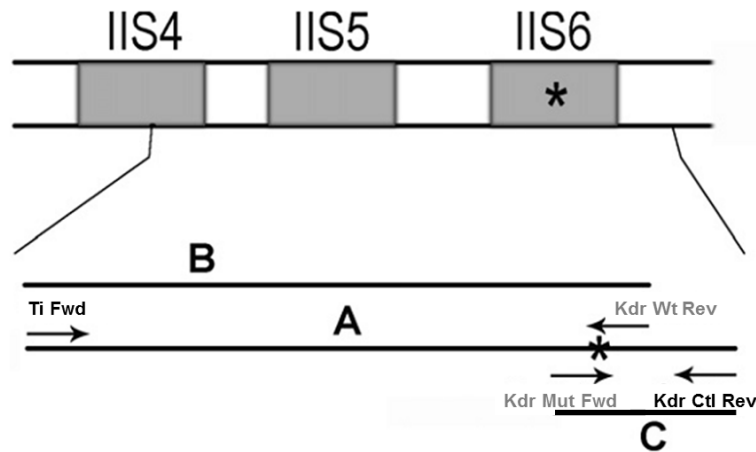
Los primers utilizados conservaron los nombres asignados en el CREG. En la Tabla 4 se presentan junto al nombre que recibieron en otros trabajos, sus secuencias 5´-3´ y la reacción en la que participaron.

Nombre	En otros trabajos	Secuencia 5'-3'	Reacción
Ti Fwd	Tifw2plm (Santo Orihuela et al. 2017)	GATATCAAT TATGGGTCGAACTG	Todas
Ti Rev 3	Ti Rev 1 (Fabro et al. 2012, Capriotti et al. 2014, Sierra et al. 2016)	TGTTACGATTTGATGATAACCGGGATA	PCR general
Kdr Ctl Rev	Ti Rev 3 (Capriotti et al. 2014) Cont Rev (Fabro et al. 2012, Sierra et al. 2016)	TTAACCCGAACAAGAATATA	PASA, PCR 925
Kdr Mut Fwd	Res Fwd (Fabro et al. 2012, Sierra et al. 2016)	CAACAGTAGTTATAGGAAATTTT	PASA
Kdr Wt Rev	Sen Rev (Fabro et al. 2012, Sierra et al. 2016)	AAATATATAAAGTACTTACAAC	PASA

**Tabla 4.** Primers empleados en los distintos pasos del protocolo para detectar las mutaciones L1014F y L925I en poblaciones de *T. infestans*.

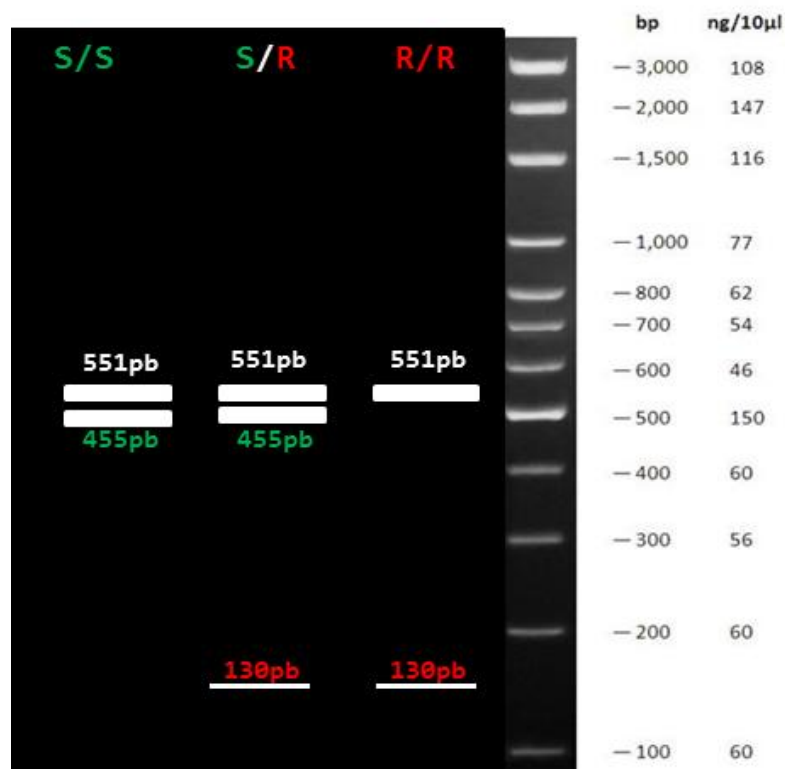
#### **Mutación L1014F**

Para detectar la mutación L1014F, se realizó la PCR específica PASA. La misma utiliza el fragmento de 2800 pb de la PCR general como molde y un set de cuatro primers. Los dos primers externos (Ti Fwd y Kdr Ctl Rev) no son alelo-selectivos y permiten obtener una banda control de 551. Los dos primers internos (Kdr Mut Fwd y Kdr Wt Rev), por el contrario, son alelo-selectivos, entonces amplifican fragmentos solo si el alelo respectivo está presente. Así, los primers internos permiten amplificar en direcciones opuestas y generar fragmentos de diferente tamaño en combinación con los externos: 455 pb en presencia del alelo susceptible, 130 pb en presencia del alelo resistente y ambos fragmentos para el heterocigota, determinando de esta manera los dos alelos en una única reacción (Figura 26).



**Figura 26.** Esquema de la región del canal de sodio amplificado por PASA. Los rectángulos grises representan los segmentos transmembrana, el asterisco marca la posición de la mutación L1014F y las flechas la ubicación de los 4 primers. Se muestra la ubicación y longitud relativa de los fragmentos de ADN genómico amplificados (A= fragmento de control de 551 pb, B= fragmento del alelo susceptible de 455 pb, C= fragmento resistente de 130 pb). Adaptado de Fabro et al. (2012)

Luego, el producto de PASA se sembró en un gel de agarosa al 2% con la ayuda de un loading de siembra 6x (Promega, Madison, USA). Se usó un marcador de peso molecular de 100 pb de precisión (Embiotec, Argentina) para cuantificar el tamaño de las bandas esquematizadas en la Figura 27.

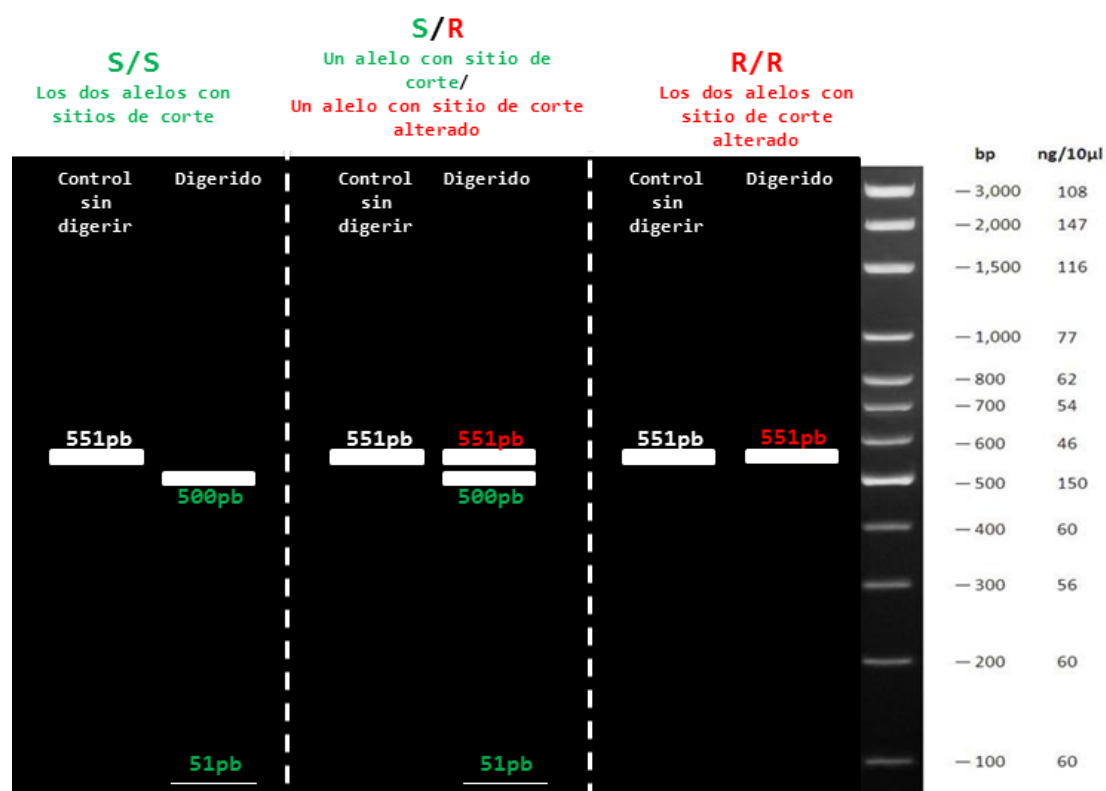


**Figura 27.** Esquema del patrón de bandas esperadas al analizar la mutación L1014F en gel de agarosa. El origen de siembra se encuentra en la parte superior.

#### *Mutación L925I*

Para detectar la mutación L925I se realizó la PCR 925 que utiliza como molde el fragmento de 2800 pb de la PCR general y los primers Ti Fwd y Kdr Ctl Rev. Éstos arrojan un fragmento control de 551 pb que puede visualizarse en un gel de agarosa al 1% a modo de confirmación de la técnica.

Luego, el producto de la PCR 925 se incubó con la enzima de restricción SacI (Fermentas, Maryland, USA) durante tres horas a 37°C. El material sin digerir y el producto de esta digestión fueron analizados en un gel de agarosa al 2%. La enzima corta la banda de 551 pb y deja dos fragmentos, uno de 500 pb y otro de 51 pb. El último, por ser muy pequeño, en ocasiones no se ve. Cuando la mutación está presente, el sitio de corte es suprimido y solo se ve una banda de 551 pb igual a la del material sin digerir. Si el individuo es heterocigota, el resultado es una combinación de los dos casos anteriores (Figura 28).



**Figura 28.** Esquema del patrón de bandas esperadas al analizar la mutación L925I en gel de agarosa. El origen de siembra se encuentra en la parte superior.

### Protocolo definitivo

La puesta a punto de la técnica presentó dos grandes dificultades: la adecuación de condiciones del CREG al CIPEIN y la adaptación del protocolo original de detección de mutaciones *kdr* (presencia en pool de individuos) al nivel de detección que se buscó lograr en esta tesis (presencia en individuo, es decir, frecuencia en grupos de 10 individuos). Por lo tanto, el protocolo general requirió la modificación de diversos pasos, entre los que se encuentran:

- El reemplazo de la enzima taq polimerasa Pegasus (Embiotec, Argentina) en la PCR 925 por una Platinum de alta especificidad (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Argentina). Esta última, se usaba originalmente solo en la PCR general y en el PASA.
- La incorporación de la técnica de secuenciación como alternativa al PASA para detectar la L1014F y a la digestión con SacI para identificar la L925I. Se envió el producto de la PCR 925 de algunos individuos a la Unidad de Genómica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Este fragmento de 551

pb contiene ambas mutaciones, por lo tanto, mediante el uso de un secuenciador fue posible identificar las mutaciones puntuales L1014F y L925I dentro de la secuencia obtenida.

- La optimización de parámetros específicos de las sucesivas PCR's: temperaturas y tiempos en los pasos de desnaturalización, apareamiento de primers y extensión, el número de ciclos y la relación enzima taq-cofactor.

Los protocolos presentados en la Tabla 5 son los definitivos, es decir, tienen todas las modificaciones incorporadas a lo largo de este trabajo de tesis.

		PCR general	PASA	PCR 925	Digestión
Master mix	H <sub>2</sub> O (μl)	22,1	34,6	21,3	5,3
	Buffer (μl)	3	5	3	2
	dNTP's (μl)	0,6	1	0,6	
	Cofactor (μl)	1,8	3	1,5	
	Primers (μl)	0,6 Ti Fwd/ 0,6 Ti Rev 3	1,1 Ti Fwd/1,1 Kdr Ctl Rev/ 1,1 Kdr Mut Fwd/ 1,1 Kdr Wt Rev	0,9 Ti Fwd/ 0,9 Kdr Ctl Rev	
	Taq polimerasa Platinum(μl)	0,3	0,5	0,3	
	Molde (μl)	1 de ADN genómico	1,5 de PCR general	1,5 de PCR general	12 de PCR 925
	BSA (μl)				0,2
	SacI (μl)				0,5
	Desnaturalización inicial (1 ciclo)		5 minutos		
Condiciones de PCR			95°C		
	Desnaturalización (30 ciclos)		30 segundos		
			95°C		
	Pegado primers (30 ciclos)	30 segundos 60°C	50 segundos 52°C	40 segundos 52°C	
	Elongación (30 ciclos)	4 minutos	52 segundos 72°C	30 segundos	



Extensión final	10 minutos
(1 ciclo)	72°C
Conservación	6°C

**Tabla 5.** Protocolos de PCR y digestión empleados para la detección de las dos mutaciones estudiadas en *T. infestans*.

### Resultados del capítulo 3

De todas las fuentes de extracción de ADN, las partes blandas del insecto presentaron mayor eficiencia. Se observó que, cuando el individuo adulto había sido freezeado vivo con al menos una semana de ayuno, el material obtenido al ser diseccionado era óptimo para el protocolo de PCR's. Los insectos en esas condiciones presentaban una concentración de ADN por encima de los 100 ng/μl (promedio y error muestral de todos los insectos analizados  $236,61 \pm 28,07$  ng/μl). Además, de todas las fuentes usadas, fue la única que presentó valores de pureza dentro del rango esperado: absorbancia medida a 260/280 mayor a 1,7 para evitar contaminación ácida por fenoles cuticulares, pero menor a 2 para evitar contaminación básica.

La sustitución aminoacídica L1014F no estuvo presente en ninguna de las poblaciones caracterizadas del foco resistente de General Güemes, por lo que la totalidad de los individuos caracterizados resultaron homocigotas susceptibles para esta mutación (Tabla 6).

Población	GR <sub>50</sub> (I.C. 95%)	Status toxicológico	Mutación L1014F		Mutación L925I	
			Presencia	Frecuencia	Presencia	Frecuencia
Bella Vista	2,02 (0,80- 5,10)	Susceptible	Ausente	0/2	Ausente	0/2
Colonia Castelli	3,06 (1,31- 7,14)	Baja resistencia	Ausente	0/3	Ausente	0/3
El Maulle	4,72 (2,11-10,63)	Baja resistencia	Ausente	0/2	Ausente	0/2
Pozo Colorado	5,21 (2,16- 12,50)	Baja resistencia	Ausente	0/6	Presente	2/6
El Ñandú	500 (200-1000)	Alta resistencia	Ausente	0/9	Presente	9/9
La Rinconada	> 1000	Alta resistencia	Ausente	0/3	Presente	3/3
Pampa Argentina	> 1000	Alta resistencia	No se logró amplificar			

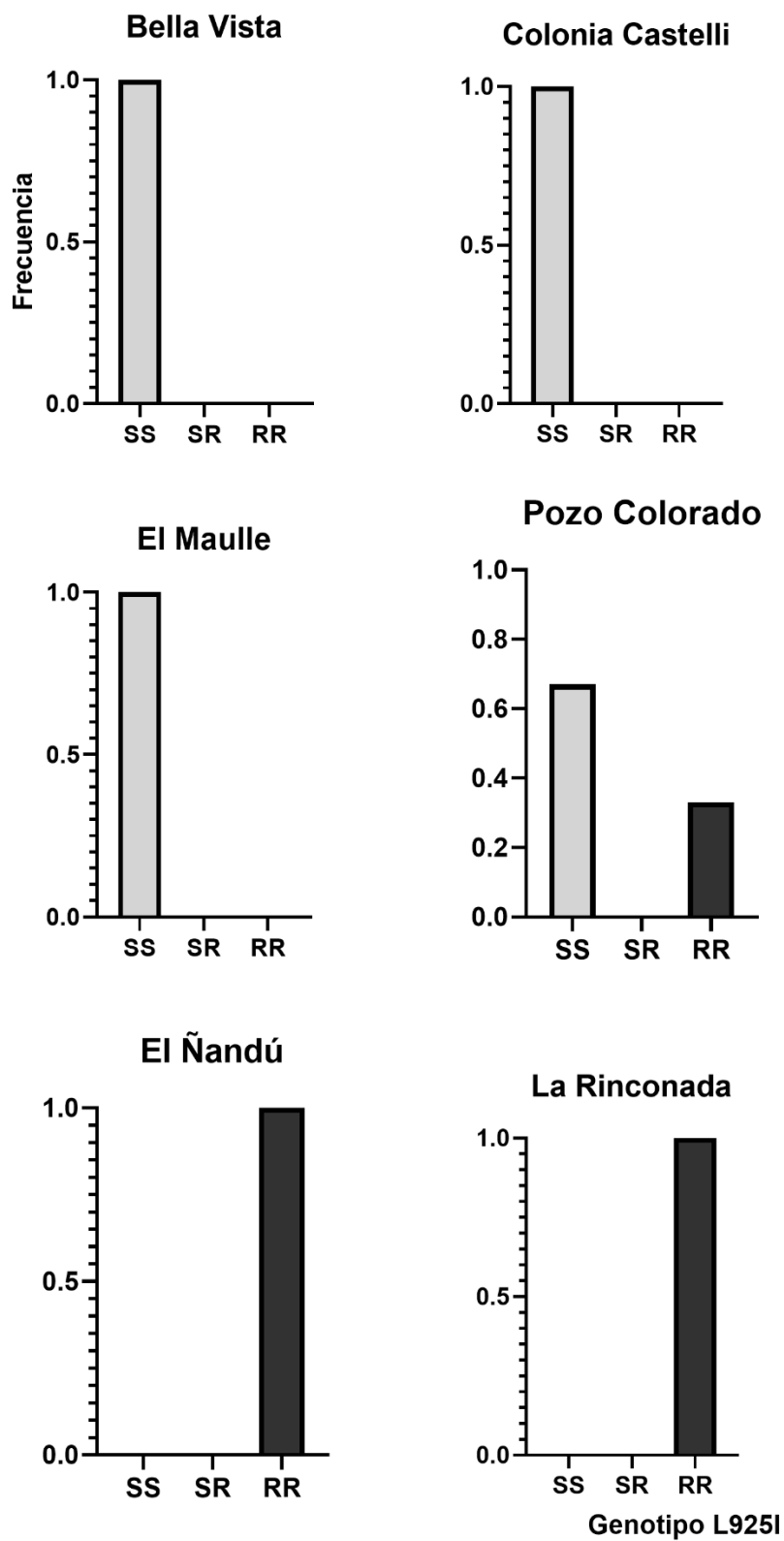
**Tabla 6.** Valores toxicológicos y frecuencia de mutaciones *kdr* de las poblaciones de *T. infestans* analizadas del foco resistente del departamento de Gral. Güemes, Chaco.

Por otro lado, la sustitución L925I estuvo ausente en la población susceptible Bella Vista y en las de baja resistencia Colonia Castelli y El Maulle, pero se registró su presencia en homocigosis en la población de baja resistencia Pozo Colorado y en las de alta resistencia El Ñandú y La Rinconada (Tabla 6 y Figura 28).

En la población Pampa Argentina no fue posible amplificar la región del canal que contiene las mutaciones, motivo por el cual no se obtuvo el dato de presencia/ausencia ni la frecuencia de L1014F y L925I. Esta misma dificultad se encontró al analizar algunos de los individuos de las otras poblaciones. Si bien se buscó describir la presencia de las mutaciones en al menos 10 insectos por población, en muchos de ellos no fue posible aplicar el protocolo de manera exitosa. Por lo tanto, las frecuencias se calcularon sobre un número bajo de adultos por población: 2 individuos en Bella Vista y El Maulle, 3 en Colonia Castelli y La Rinconada, 6 en Pozo Colorado y 9 en El Ñandú.

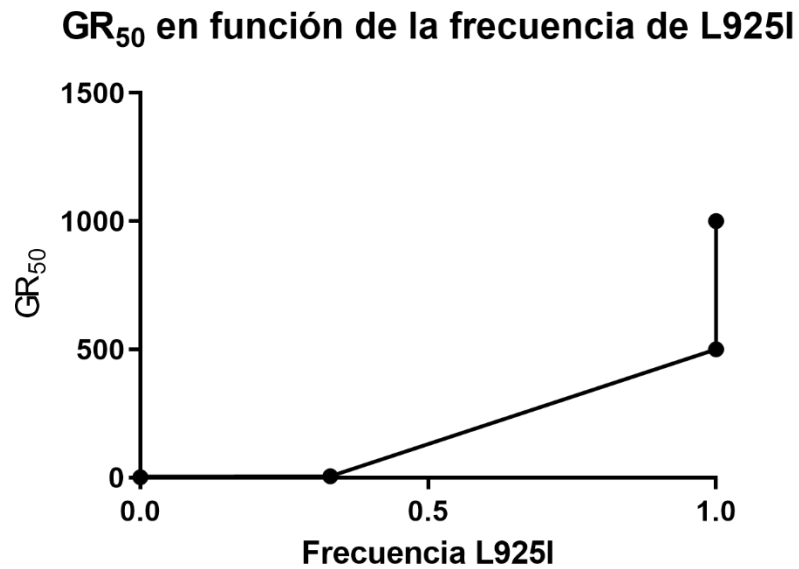
Pese al bajo n analizado, se observó una tendencia clara en las frecuencias de los genotipos de la L925I: la población susceptible no mostró el alelo resistente (frecuencia 1 de homocigotas susceptibles), las de resistencia baja no lo presentaron o lo presentaron en baja frecuencia (0,67 homocigotas susceptibles y 0,33 homocigotas resistentes), mientras que las de alta resistencia tuvieron el alelo resistente en frecuencia alta (frecuencia 1 de homocigotas resistentes) (Tabla 6 y Figura 29).

## Frecuencias de los genotipos L925I



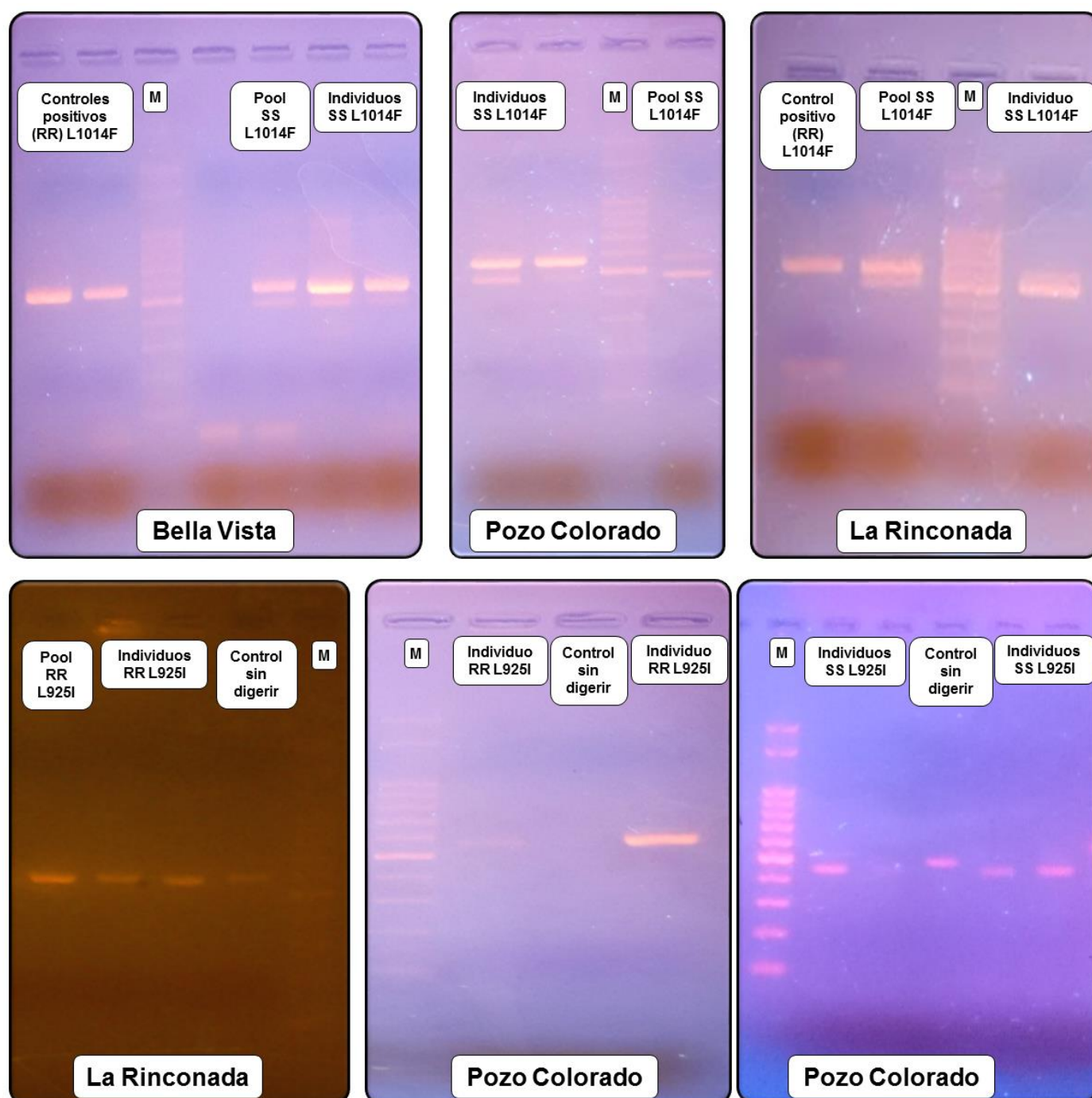
**Figura 29.** Frecuencia de genotipo homocigota susceptible (SS), heterocigota (SR) y homocigota resistente (RR) para la L925I en cada población.

Por lo tanto, la tendencia parecería indicar que cuanto mayor es la frecuencia de la mutación puntual L925I, mayor es el grado de resistencia. Esta asociación positiva se esquematiza en la Figura 30.



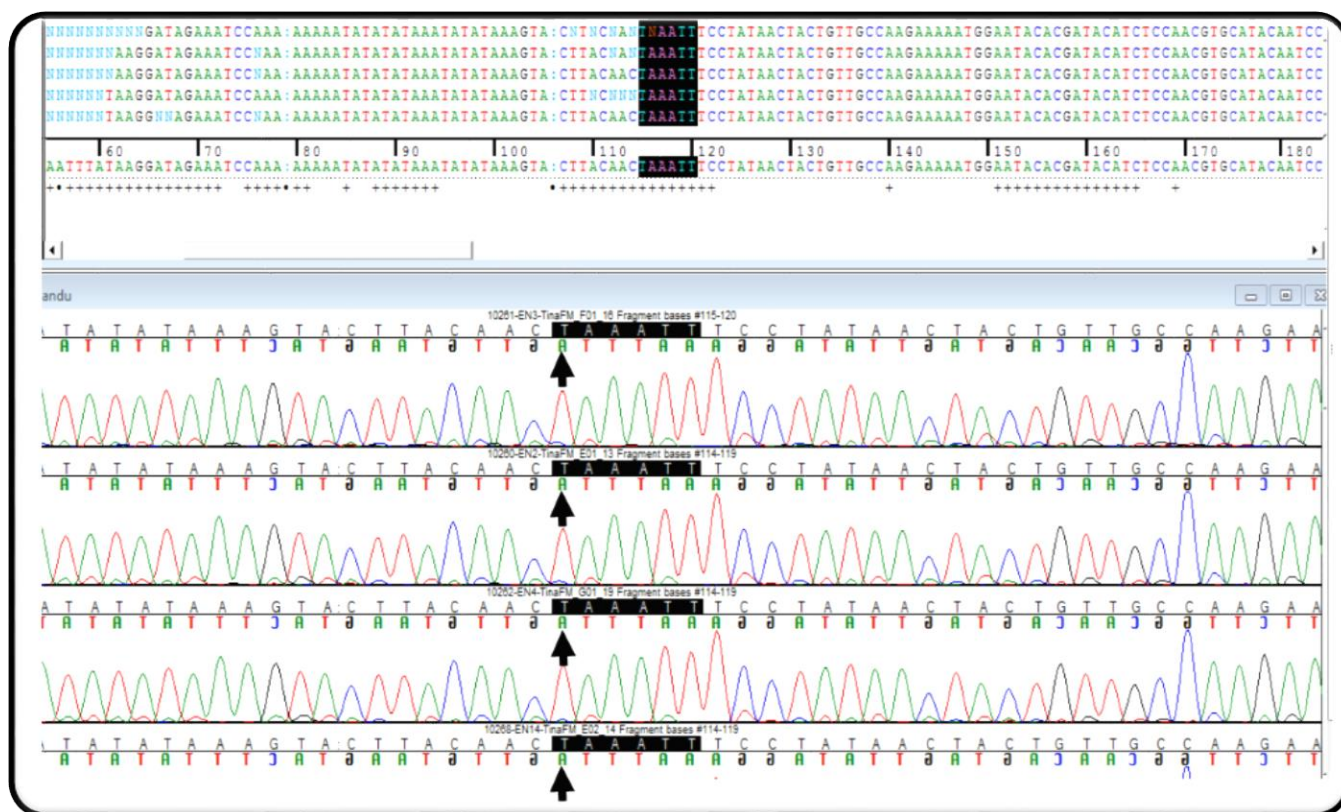
**Figura 30.** Asociación positiva entre los grados de resistencia del foco resistente de General Güemes y las frecuencias de *kdr*. Todos los individuos portadores de la L925I resultaron homocigotas.

Si bien el protocolo general permite diferenciar a los individuos homocigotas de los heterocigotas, los últimos no fueron detectados en los geles analizados (Figura 31).



**Figura 31.** Geles de agarosa en los que se ve el patrón esperado para homocigotas susceptibles L1014F (arriba), homocigotas susceptibles y resistentes L925I (abajo). M= marcador de peso molecular. Los controles positivos para la L1014F son individuos homocigotas resistentes de la población salteña Campo Largo caracterizada en Roca Acevedo et al. (2013, 2015).

La incorporación del paso de secuenciación del fragmento del canal permitió confirmar que todos los individuos eran homocigotas susceptibles para la L1014F,



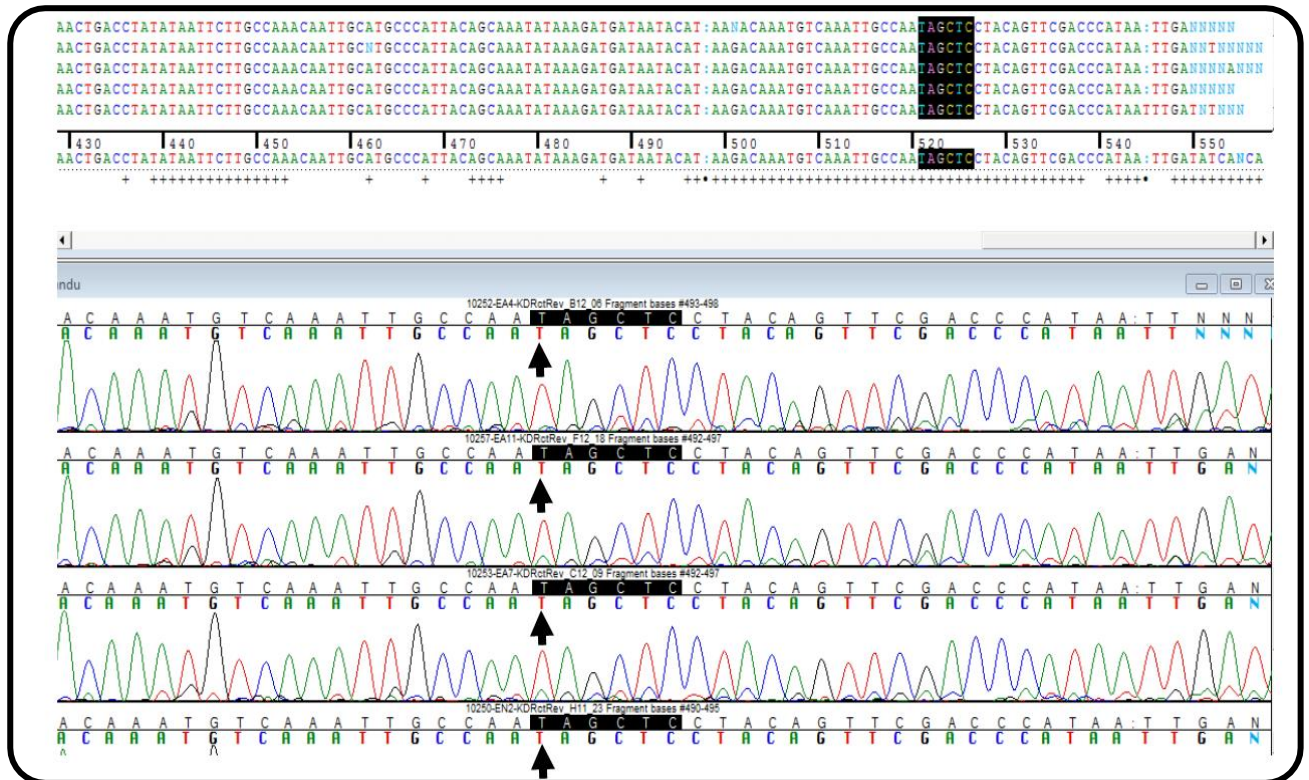
presentando una adenina en la posición 115 de la secuencia (condición susceptible, Figura 32).

**Figura 32.** Secuencia del canal de sodio de un individuo de El Ñandú en el que se visualiza una adenina en la posición 115, indicadora de susceptibilidad para la L1014F. La secuencia debe ser leída en sentido inverso a la presentada en la Figura 23.

En relación a la L925I, dado que el primer Ti Fwd modificado se hibrida a sólo 9 bases río arriba del sitio donde se encuentra la mutación puntual, la sustitución no se visualizó en la hebra secuenciada utilizando ese iniciador. Por lo tanto, sólo se analizó si la citosina (condición susceptible) había sido sustituida por la adenina (condición resistente) en la secuencia obtenida con el primer Ti Rev 3. La secuenciación bidireccional no es esencial para la detección de mutaciones heterocigotas (u homocigotas) siempre que se obtengan datos de la secuencia de interés de alta calidad en una dirección (Ellard et al. 2016). Por lo tanto, la posición 520 de la hebra correctamente secuenciada se usó de referencia para inferir qué había en su complementaria, tomando



la ausencia de dobles picos en los cromatogramas como indicador de homocigosis. En el complemento al revés del fragmento presentado en la introducción de este capítulo, se observó que la guanina (condición susceptible) había sido sustituida por la timina (condición resistente) en individuos de las poblaciones Pozo Colorado, El Ñandú y La Rinconada (Figura 33).



**Figura 33.** Secuencia del canal de sodio de un individuo de El Ñandú en el que se visualiza una timina en la posición 520 (condición resistente para la L925I) y ausencia de dobles picos pronunciados, permitiendo inferir homocigosis. La secuencia debe ser leída en sentido inverso y complementario a la presentada en la Figura 24 de la introducción.

### Discusión del capítulo 3

Se logró describir la presencia y frecuencia de las mutaciones en el canal de sodio dependiente de voltaje en las poblaciones del foco resistente de General Güemes. No se registró presencia de la mutación L1014F en ninguna de las poblaciones analizadas. La mutación L925I, por el contrario, se detectó en una población de baja resistencia y en dos de alta resistencia. Por otra parte, pese a haberse caracterizado un número bajo de insectos, parecería existir una asociación positiva entre el grado de resistencia y la

frecuencia de la mutación L925I. Finalmente, todos los individuos portadores de la sustitución L925I resultaron ser homocigotas.

Estos resultados concuerdan con los registros que describen las mutaciones *kdr* distribuidas a lo largo del Gran Chaco y circunscriben la mutación L1014F al foco resistente de la frontera argentino-boliviana y la sustitución L925I al foco de General Güemes (Fabro et al. 2012, Capriotti et al. 2014, Roca Acevedo et al. 2015, Sierra et al. 2016). Esta última se ha asociado a niveles de resistencia elevados y se ha observado que las poblaciones que la presentan muestran GR<sub>50s</sub> más altos que los registrados en poblaciones portadoras de la sustitución L104F (Capriotti et al. 2014). La mutación L925I se ha descrito hasta el momento sólo en otros hemípteros: la mosca blanca de hoja plateada *Bemisia tabaci* (Morin et al. 2002), la chinche común *Cimex lectularius* (Yoon et al. 2008) y la mosca blanca de invernadero *Trialeurodes vaporariorum* (Karatolos et al. 2012). En las tres especies, las poblaciones portadoras de la mutación presentaron niveles de resistencia > 100, como es el caso de las poblaciones de *T. infestans* descritas en este trabajo de tesis.

No se registraron alelos resistentes en la población susceptible Bella Vista ni en las de baja resistencia Colonia Castelli y El Maulle, mientras que en la de baja resistencia Pozo Colorado la mutación mostró una frecuencia de 0.33 y en las dos de alta resistencia (El Ñandú y La Rinconada) presentó una frecuencia de 1. Por lo tanto, se podría pensar que niveles altos de resistencia se explican en gran parte por una frecuencia alta de la mutación puntual L925I en el canal de sodio dependiente de voltaje. Capriotti et al. (2014) propuso que, dada la discontinuidad histórica en el control químico sumada a la alta frecuencia en la que se encuentra el alelo resistente, el gen del canal de sodio con la mutación L925I podría representar el alelo wildtype de los insectos de la zona. En el escenario evolutivo planteado por los autores, lo más probable sería que el alelo esté presente en todas las poblaciones estudiadas, independientemente del estatus toxicológico. Sin embargo, los resultados de este capítulo llevan a pensar que las fallas a campo registradas en las poblaciones de alta resistencia en el foco de General Güemes estarían asociadas, o podrían reflejar, la fijación del alelo resistente. En el contexto del control químico, este escenario poblacional y la posible asociación mutación-grado de resistencia descrita promueve rápidamente la construcción de la hipótesis que afirma que la presión de selección con piretroides es la principal causa de la elevada frecuencia



de la mutación L925I y, en consecuencia, de la existencia de las poblaciones de alta resistencia.

Tanto el Ñandú como La Rinconada presentaron alta frecuencia del alelo resistente para la sustitución L925I. La primera de estas poblaciones, con un GR<sub>50</sub> estimado en 500 y un I.C. que va del 200 al 1000, mostró también la contribución del mecanismo de detoxificación enzimática incrementada por parte de esterasas. La alta resistencia observada en este paraje podría ser el resultado de la combinación de los dos mecanismos detectados. La Rinconada, en cambio, se encuentra dentro del grupo de poblaciones con los GR<sub>50</sub> más altos registrados hasta el momento. En ninguna de ellas se registró actividad enzimática incrementada y, al menos en La Rinconada, la resistencia parecería estar explicada íntegramente por la alta frecuencia de *kdr*. Sin embargo, sería necesario aumentar el número de individuos caracterizados y también de poblaciones analizadas dentro de este estatus toxicológico. La adaptación del protocolo para las poblaciones de alta resistencia fue particularmente compleja. De hecho, no se logró amplificar ADN genómico de ningún insecto de Pampa Argentina. La perspectiva a futuro incluye seguir trabajando en estas poblaciones y también en las de resistencia baja, para evaluar la presencia de frecuencias intermedias de L925I o incluso de individuos heterocigotas.

La mutación L925I no se detectó en la población de baja resistencia Colonia Castelli, en la cual tampoco se había detectado actividad enzimática incrementada. Sin embargo, no se puede descartar el efecto contributivo de otro mecanismo que confiera bajos niveles de resistencia, como podría ser la penetración cuticular reducida. Además, es necesario tener en cuenta la limitación en el número total de individuos caracterizados. Podría suceder que, al aumentar en número de insectos descriptos, el alelo resistente sea detectado, como sucedió con la población de baja resistencia Pozo Colorado, que mostró una frecuencia de 0,33 para el genotipo homocigota resistente, además de la contribución enzimática descripta en el capítulo 2.

La limitación en el bajo número total de insectos debería superarse con la sensibilidad descripta por Sierra et al. (2016). En ese trabajo, propusimos que los protocolos son capaces de detectar la presencia de la mutación en pooles de insectos con una sensibilidad del 5%. Esto quiere decir que, al analizar un grupo de 20, debería detectarse la presencia de la mutación si tan solo un individuo la portara, ya sea en homo como en heterocigosis. Sin embargo, como conclusión respecto a las metodologías

utilizadas en este capítulo, se propone que el protocolo no funciona de igual manera en todas las poblaciones. En consecuencia, podría pensarse que, si el método no detecta la presencia de la mutación, no se deba necesariamente a que ninguno de los 10 insectos la porte, sino a que los primers replicaron exitosamente el fragmento de solo algunos de ellos (y esto último no ser representativo de la situación poblacional). La sensibilidad diferencial del método podría deberse a la alta variabilidad descripta por estudios previos en las regiones no codificantes de la porción del dominio II caracterizada (Fabro et al. 2012, Capriotti et al. 2014). Si bien esta alta variabilidad entre poblaciones (e incluso entre individuos de una misma población) implican mutaciones silenciosas, podrían alterar el funcionamiento normal de los primers y el desarrollo apropiado de la técnica.

Este trabajo de tesis se propuso dilucidar el peso relativo de los distintos mecanismos de resistencia en las zonas con poblaciones de *T. infestans* con baja susceptibilidad a deltametrina, y en este capítulo se focalizó sobre uno de los principales mecanismos (la modificación en el sitio de acción) a través del estudio de la presencia/ausencia y de las frecuencias en campo de las mutaciones puntuales en el gen del canal de sodio asociadas a resistencia a piretroides.

Se destaca como resultado haber confirmado la presencia de la L925I en el foco resistente de General Güemes. Además, se pudo aportar evidencia a la hipótesis que propone a esta mutación como mecanismo predominante en la zona. Si bien se ha documentado la presencia de mutaciones puntuales *kdr* en numerosas especies (Kasai et al. 2009, Martins et al. 2009, Zhu et al. 2010, Madeiros Barros et al. 2012, Davila Barboza et al. 2018), la asociación entre sus frecuencias y el grado de resistencia a piretroides ha recibido poca atención hasta el momento. Como ejemplo de la confirmación de esta relación positiva se demostró que la baja susceptibilidad de catorce poblaciones de campo de *M. domestica* estaba fuertemente asociada a frecuencias altas del alelo L1014F (Huang et al. 2004). Como evento llamativo, en ese estudio se encontró que incluso después de muchos años sin uso de insecticidas, el porcentaje de moscas homocigotas susceptibles era bajo y en cambio había mayor proporción de heterocigotas (~77%) que lo esperado por equilibrio de Hardy-Weinberg. Los autores propusieron la existencia de una ventaja del heterocigota a través de efectos pleiotrópicos como había sido sugerido previamente por Foster et al. (2003). Esta mayor adaptación al ambiente sin insecticida de los insectos que portan el alelo resistente podría llevar a un aumento natural de la frecuencia y resultar en una población tolerante al insecticida. En las poblaciones resistentes de Gral. Güemes,

donde la frecuencia del alelo L925I que reduce la sensibilidad a piretroides parecería ser alta, sería interesante evaluar si el escenario es similar al de las moscas de campo, si la presión de selección con insecticida sostenida en el tiempo fue el factor determinante o si pudo existir una combinación entre factores ambientales e insecticida. Por lo tanto, en el siguiente capítulo se evaluarán los registros de acciones de control realizadas por el Programa Nacional de Chagas como indicadores de la presión de selección ejercida por los piretroides en la zona estudiada y diferentes variables ambientales en su posible asociación con los fenotipos toxicológicos.



## **CAPÍTULO 4**

**Caracterización de la influencia de variables ambientales implicadas en la evolución de la resistencia**

# CAPÍTULO 4

---

## Modelado de la asociación de la resistencia con las variables ambientales

El relevamiento toxicológico del capítulo 1 demostró una alta variabilidad en los niveles de susceptibilidad en el foco resistente de General Güemes. La heterogeneidad en los grados de resistencia podría deberse a una presión de selección no homogénea por parte del insecticida, a la diversidad de los mecanismos que promueven resistencia, a la alta estructuración genética de las poblaciones de *T. infestans* y/o a la influencia de variables ambientales (Mougabure Cueto y Picollo 2015). Por lo tanto, una vez avanzada la caracterización de los mecanismos promotores de resistencia en el foco heterogéneo, se buscó esclarecer la influencia de distintas variables ambientales en la variabilidad toxicológica descripta.

En un estudio realizado en Bolivia, Lardeux et al. (2010) propusieron que la heterogeneidad en los niveles de resistencia a la deltametrina podría deberse a una presión no homogénea por parte del insecticida, ya que las frecuencias de rociado pueden variar entre parajes sumado a que dosis iguales pueden impactar diferente en ambientes intra y peridomésticos. Esto último se debe a que las estructuras peridomésticas se encuentran más expuestas al medio ambiente que los espacios del intradomicilio, lo que hace más probable que las variables ambientales degraden los insecticidas y promuevan un proceso selectivo diferente en comparación con el entorno intradomiciliario (Gürtler et al. 2004, Mougabure Cueto y Picollo 2015). De esta manera, podría ocurrir un tipo de selección de baja susceptibilidad en el peridomicilio debido a la exposición de los individuos a dosis subletales a nivel poblacional (que no matan al 100% de los insectos). En esta situación sobrevivirían los insectos menos susceptibles dentro de la distribución “natural” de susceptibilidades de la población presente. Otro tipo de selección de baja susceptibilidad podría ocurrir en el intradomicilio debido a la exposición, durante un período prolongado de tiempo, de los individuos a dosis letales a nivel poblacional (que matan al 100% de los insectos). En esta segunda situación sólo sobrevivirían, si es que están presentes, aquellos insectos que tienen una extrarordinaria baja susceptibilidad, es decir, que están por fuera de la distribución “natural” de susceptibilidades de la población presente. La consecuencia final de ambas situaciones sería la evolución de perfiles toxicológicos heterogéneos o, lo que es lo mismo, de poblaciones resistentes con diferentes sustratos

bioquímicos y genéticos (Mougabure Cueto y Picollo 2015). Estos escenarios teóricos no excluyen la posibilidad de que en ambos ambientes ocurra el mismo proceso selectivo o, que en un paraje la resistencia haya evolucionado mayormente en los peridomicilios y en otro haya evolucionado mayormente en los intradomicilios.

Un estudio realizado por el CIPEIN en La Esperanza, uno de los primeros parajes resistentes que se caracterizaron del foco resistente de General Güemes, evaluó la susceptibilidad a deltametrina a nivel microgeográfico (Germano et al. 2013). Se vio que algunas casas hospedaban insectos resistentes a deltametrina, mientras que otras hospedaban insectos susceptibles, sin asociación entre el estado toxicológico y la ubicación original de los insectos dentro de las viviendas (es decir, estructuras domésticas o peridomésticas). Esas diferencias a nivel microgeográfico resaltan la compleja distribución espacial de los fenotipos toxicológicos de insectos que permanecen después de las acciones de control químico y sugieren un alto nivel de estructuración poblacional en *T. infestans* sobre el cual el insecticida ejercería su presión selectiva. Estudios previos demostraron esta alta estructuración genética en poblaciones de *T. infestans* a diferentes niveles geográficos (Pérez de Rosas et al. 2007, Segura et al. 2009) y propusieron una variabilidad genética muy rica a través de su rango de distribución (Piccinalli et al. 2009). Por lo tanto, la aplicación heterogénea de insecticidas combinada con la alta estructuración poblacional en *T. infestans* podrían explicar la heterogeneidad de los fenotipos toxicológicos (Fronza et al. 2016).

Hasta el momento, el estudio de los efectos de los factores ambientales y del rociado con insecticidas, y su posible interacción, sobre la distribución de la resistencia a los insecticidas piretroides en *T. infestans* ha recibido poca atención. La ventaja que presenta este tipo de abordajes es que a partir de información observacional se puede aportar explicación al problema complejo de la evolución y distribución de la resistencia en vectores de enfermedades. Como primer acercamiento a la resistencia como variable respuesta, Bustamante Gomez et al. (2016) realizaron una recopilación bibliográfica de 24 artículos que reportaban resistencia a piretroides en *T. infestans*. Encontraron una relación entre la distribución de la resistencia con cinco variables ambientales utilizando un modelo lineal generalizado. Los estudios ecológicos tradicionales, en cambio, analizaron la influencia de los predictores ambientales y de rociado en la distribución o abundancia de *T. infestans* sin focalizar en las diferencias toxicológicas entre las poblaciones. En esta línea, Espinoza et al. (2014) utilizaron los registros del Programa de

Chagas del departamento boliviano de Cochabamba para calcular los efectos de las acciones de control sobre las tasas de infestación de viviendas (DIR). Un modelo lineal mixto (con el municipio como factor aleatorio) sugirió que las campañas de rociado con insecticidas tuvieron efectos muy fuertes y duraderos sobre las DIR, con valores más altos en los municipios dominados por bosques secos montanos. Espinoza Echeverría et al. (2017) propusieron dos modelos alternativos para describir la infestación de casas en el municipio de Toro Toro (Potosí, Bolivia). Uno de ellos explicó el 57% de la variación con cuatro variables ambientales (dos relacionadas con la temperatura y dos con la precipitación). El segundo modelo explicó el 53% con una sola variable, la temperatura mínima del mes más frío, un hallazgo similar al reportado para la distribución geográfica de *T. infestans* en el cono sur de Sudamérica (Gorla 2002). De manera similar, Brito et al. (2017) evaluaron la invasión de casas por vectores de la enfermedad de Chagas en la transición de Amazonas-Cerrado mediante una regresión binomial negativa. Encontraron diferentes efectos de temperatura y precipitación, lo que les permitió proponer que *Rhodnius pictipes*, *R. robustus*, *R. neglectus* y *Panstrongylus geniculatus* parecían ser bastante sensibles a las altas temperaturas y su presencia era menos común en ambientes más perturbados.

El abordaje de la resistencia a deltametrina como variable respuesta en el foco heterogéneo de General Güemes lleva a las siguientes preguntas: ¿el control químico es lo suficientemente variable como para generar heterogeneidad toxicológica entre parajes?, ¿los factores ambientales son lo suficientemente variables en la escala estudiada como para promover variación biológica, incluida la susceptibilidad toxicológica, entre los parajes?, ¿los factores ambientales contribuyen al efecto diferencial del insecticida entre los parajes? Para intentar responder estos interrogantes, en este capítulo se evaluó la asociación entre poblaciones de *T. infestans* resistentes a deltametrina y diferentes variables ambientales, como la temperatura, la disponibilidad de agua, la extensión del paraje, la infestación y la intensidad de los eventos de rociado. Para aportar evidencia a la hipótesis que propone la existencia de variables ambientales en el Gran Chaco que favorecen la evolución de susceptibilidad reducida, se espera que los predictores usados en la elaboración de los modelos estadísticos se asocien a la heterogeneidad en los niveles de resistencia descriptos en el capítulo 1.

## Metodología para cumplir el objetivo 4

### *El GR<sub>50</sub> como variable respuesta*

Como se mencionó en la introducción al capítulo 1, el grado de resistencia permite determinar la existencia o no de resistencia al insecticida a partir de la relación entre la dosis letal que mata al 50% de los individuos tratados y la dosis letal que produce el mismo efecto en una cepa susceptible de referencia. A partir de la estimación Probit, el GR<sub>50</sub> es una variable continua que da cuenta del número de veces que una población es más resistente que la cepa susceptible de referencia. En este capítulo, la variable respuesta GR<sub>50</sub> fue considerada una variable discreta en la elaboración de los modelos, con valores  $\geq 1$  (Tabla 7). La clasificación tradicional en susceptibles, resistencia baja, media y alta no se usó en los modelos ya que se consideró que llevaría a la pérdida de información. Esta categorización sólo se usó a modo de referencia en la descripción de la ubicación geográfica de los parajes presentada como resultado del análisis exploratorio *Tree* descripto más adelante. En algunas poblaciones como Pampa Argentina (PA), Campo Alto (CA), El Asustado (EA) y La Rinconada (LR), donde la mortalidad a la dosis más alta de insecticida aplicada (10 mg/ ml) fue inferior al 50% y no fue posible obtener una estimación finita de los GR<sub>50</sub>s, se asignó el valor 1000 en los modelos. De manera similar, para el paraje El Juramento (EJ, en Sierra et al. 2016), el GR<sub>50</sub> fue estimado como  $> 2000$  y en los modelos se le asignó el valor 2000.

Paraje	Ubicación geográfica	C	GR <sub>50</sub> (I.C 95%)	GR <sub>50</sub> en los modelos
El Juramento (EJ)	25°54'S, 60°24'O	25	> 2000	2000
El Malá (ML)	25°56'S, 60°27'O	14	1031 (909,1- 1213,3)	1031
Campo Alto (CA)	26°0'9''S, 60°14'25''O	20	> 1000	1000
Pampa Argentina (PA)	25°52'00.10''S, 60°33'20,77''O	172	> 1000	1000
El Asustado (EA)	26°5'10''S, 60°18'22''O	120	> 1000	1000
La Rinconada (LR)	24°55'14''S, 61°24'15''O	8	> 1000	1000
El Ñandú (EÑ)	25°56'54''S, 60°19'59''O	25	500 (200- 1000)	500
La Esperanza (LE)	26°3'S, 60°27'O	145	233,42 (116,78- 466,57)	233
Los Pereyras (LP)	25°28'55''S, 61°11'12''O	50	5,68 (2,72-12,66)	5
Pozo Colorado (PC)	26°3'59''S, 60°30'29''O	71	5,21 (2,16- 12,50)	5
El Maulle (EM)	25°27'42''S, 60°55'10''O	35	4,72 (2,11-10,63)	4
Palma Sola (PS)	24°14'30''S, 62°16'50''O	50	4,18 (1,81- 9,62)	4
El Zanjón (EZ)	25°43'16''S, 60°43'54''O	62	4,03 (1,81- 8,93)	4



Palo Marcado (PM)	24°37'4''S, 62°6'30''O	81	3,97 (1,78- 8,77)	3
La Gerónima (LG)	26°4'S, 60°16'O	50	3,89 (1,63- 9,26)	3
Zaparinqui (Z)	26°3'53''S, 60°34'31''O	405	3,29 (1,43-7,52)	3
Colonia Castelli (CC)	26°0'38''S, 60°39'18''O	700	3,06 (1,31- 7,14)	3
Bella Vista (BV)	25°57'15''S, 60°22'34''O	33	2,02 (0,80- 5,10)	2
El Techat (ET)	25°42'44''S, 60°53'59''O	84	2,38 (1,01- 5,62)	2
4 de Febrero (4F)	25°34'58''S, 60°47'52''O	55	0,19 (0,10-0,51)	1
Los Quirquinchos (LQ)	25°42'1''S, 60°55'1''O	56	0,20 (0,04-1,05)	1
Los Placeres (PL)	25°18'7''S, 61°10'56''O	35	0,21 (0,10-0,53)	1

**Tabla 7.** Parajes del foco resistente. C = número de casas del paraje. GR<sub>50</sub> = grado de resistencia, I.C. 95% = intervalo del 95% de confianza. GR<sub>50</sub> en los modelos= la variable respuesta se consideró discreta en los modelos Poisson.

### *Predictores de resistencia*

Se utilizó información ambiental de diferentes fuentes para construir las variables explicativas para modelar los GR<sub>50</sub>s (Tabla 8).

Los datos de temperatura y precipitación se extrajeron del conjunto de datos WorldClim (<http://www.worldclim.org>) que caracteriza las condiciones climáticas sobre la superficie de la Tierra durante 1950-2000 en un formato de cuadrícula, con una resolución de píxel de 1 km<sup>2</sup> (Hijmans et al. 2005). Las variables incluyeron 19 estadísticas bioclimáticas derivadas de la precipitación total mensual, la temperatura media mensual, mínima y máxima. Bio1 a Bio11 incluyeron variables relacionadas con la temperatura, mientras que Bio12 a Bio19 estuvieron relacionadas con la lluvia.

La otra información ambiental se extrajo de una base de datos proporcionada por el PNC que contenía informes de acciones de control durante los años 2005-2015 realizadas sobre las localidades/parajes donde se recolectaron las muestras de insectos estudiadas durante la presente investigación. Las variables de extensión se refirieron al número de casas del paraje (C) y al número de casas evaluadas en el paraje (CE). Las variables de infestación se refirieron al número de casas positivas en el paraje, es decir, las casas con presencia de *T. infestans* en el intradomicilio (+I), en el peridomicilio (+P), en ambos lugares al mismo tiempo (+IP) o en la suma total de intradomicilio y peridomicilio (+T). Las variables de rociado que dieron cuenta de la presión de selección

ejercida por el insecticida piretroide aplicado, fueron el número de eventos de rociado (frecuencia) o el número de casas rociadas (CR) durante el período analizado.

Se evaluaron tres grupos de variables predictoras:

- La **sumatoria** y el **valor promedio** durante los 11 años analizados de CE, +I, +P, +IP, +T y CR.
- Teniendo en cuenta la alta variabilidad en el número de casas (C) entre parajes, también se evaluó **el valor de CE, +I, +P, +IP, +T, CR relativizado por el número de casas** (la sumatoria durante los 11 años analizados/el número de casas del paraje).
- Considerando la alta variabilidad en el número de casas evaluadas (CE) entre parajes, se probó **el valor de +I, +P, +IP, +T, CR relativizado por el número de casas evaluadas** (la sumatoria durante los 11 años analizados/el número de casas evaluadas del paraje).

De las tres categorías, la mejor para los modelos fue la segunda. Los valores relativizados por el número de casas explicaron mejor la distribución de la variable respuesta, con modelos de mejor ajuste y coeficientes significativos. Por lo tanto, se muestran en la Tabla 8 los predictores relativizados y, de ahora en más, cuando se mencionan  $CE_r$ ,  $+I_r$ ,  $+P_r$ ,  $+IP_r$ ,  $+T_r$ ,  $CR_r$  en el modelado de los  $GR_{50s}$ , se hará referencia a ellos.

Grupo	Nombre	Significado	Promedio (d.e.)
Temperatura y disponibilidad de agua	Bio1	Temperatura media anual	22,17 (0,26)
	Bio2	Media de la temperatura mensual (máx- mín)	13,63 (0,17)
	Bio3	Isoterma (BIO2 / BIO7) (* 100)	54,40 (0,26)
	Bio4	Temperatura estacionalidad (desviación estándar * 100)	403,66 (2,02)
	Bio5	Temperatura máxima del mes más cálido	34,49 (0,23)
	Bio6	Temperatura mínima del mes más frío	9,43 (0,20)
	Bio7	Temperatura rango anual (BIO5-BIO6)	25,06 (0,35)
	Bio8	Temperatura media del trimestre más húmedo	26,56 (0,18)
	Bio9	Temperatura media del trimestre más seco	17,03 (0,20)
	Bio10	Temperatura media del cuarto más cálido	27,14 (0,19)
	Bio11	Temperatura media del trimestre más frío	16,90 (0,16)
	Bio12	Precipitación anual	868,95 (82,34)
	Bio13	Precipitación del mes más húmedo	136,33 (11,32)
	Bio14	Precipitación del mes más seco	15,24 (3,71)
	Bio15	Precipitación Estacionalidad (Coeficiente de variación)	59,86 (4,88)
	Bio16	Precipitación del trimestre más húmedo	356,52 (18,57)
	Bio17	Precipitación del trimestre más seco	53,38 (11,00)
	Bio18	Precipitación del trimestre más cálido	337,57 (11,21)
	Bio19	Precipitación del trimestre más frío	75,19 (13,67)
Extensión	C	Número de casas del paraje	160,58 (107,76)
	CE <sub>r</sub>	Número de casas evaluadas durante 2005- 2015/ número de casas del paraje	2,57 (2,20)
Infestación	+I <sub>r</sub>	Número de casas positivas en el intradomicilio durante 2005- 2015/ número de casas del paraje	0,48 (0,38)
	+P <sub>r</sub>	Número de casas positivas en el peridomicilio durante 2005- 2015/ número de casas del paraje	0,22 (0,24)
	+IP <sub>r</sub>	Número de casas positivas en el intra y en el peridomicilio durante 2005- 2015/ número de casas del paraje	0,18 (0,16)
	+T <sub>r</sub>	Número total de casas positivas durante 2005- 2015/ número de casas del paraje	0,88 (0,61)
Rociado	CR <sub>r</sub>	Número de casas rociadas durante 2005- 2015/ número de casas del paraje	2,21 (1,81)
	Frec	Número de eventos de rociados durante 2005- 2015	3,62 (1,80)

**Tabla 8.** Variables explicatorias ambientales y su significado. El subíndice indica que el predictor se probó relativizado por el número de casas del paraje en el modelo. El valor promedio y el desvío estándar (d.e.) se calculó para todos los parajes a lo largo de los 11 años analizados.

#### *Descripción año por año*

El estudio de la asociación entre los GR<sub>50</sub>s y las variables ambientales se realizó mediante modelos lineales generalizados (GLM) con distribución de errores Poisson y función de enlace log. Como solo se contaba con un valor de GR<sub>50</sub> para cada población durante todo el período analizado, la unidad de análisis fue el paraje donde se recolectó cada población. Por este motivo, el año no fue tenido en cuenta en los GLM y solo se realizó un análisis descriptivo año por año de los valores de infestación y de rociado provistos por el PNC. Los parajes analizados fueron 21 porque se eliminó a Bella Vista debido a la falta de información de control químico.

En la descripción año por año, se realizaron dos abordajes diferentes:

- Para explorar la variabilidad en la infestación y el rociado entre los 21 parajes a lo largo del período analizado: se calcularon los **valores promedio de las variables explicativas CE, +I, +P, +IP, +T y CR.**

Esto se logró a partir de la sumatoria de los números de casas (evaluadas, positivas en intra, peridomicilio, en ambos lados, en el total, rociadas) de los 21 parajes, dividido el número de parajes, que fue 21 en los 11 años analizados (Tabla 9).

Grupo	Variable	Obtención del promedio por año
Extensión	CE	Sumatoria del número de casas evaluadas ese año en los 21 parajes/ 21 parajes
	+I	Sumatoria del número de casas positivas en el intradomicilio ese año en los 21 parajes/ 21 parajes
Infestación	+P	Sumatoria del número de casas positivas en el peridomicilio ese año en los 21 parajes/ 21 parajes
	+IP	Sumatoria del número de casas positivas en el intra y peridomicilio ese año en los 21 parajes/ 21 parajes
	+T	Sumatoria del número total de casas positivas ese año en los 21 parajes/ 21 parajes
Rociado	CR	Sumatoria del número de casas rociadas ese año en los 21 parajes/ 21 parajes

**Tabla 9.** Obtención de promedios por año de las variables explicatorias: CE: casas evaluadas, +I: número de casas positivas en el intradomicilio, +P: número de casas positivas en el peridomicilio, +IP: número de casas positivas en el intra y peridomicilio, +T: número total de casas positivas, CR: número de casas rociadas.

- Para analizar la magnitud de la infestación y del rociado dentro del área estudiada, se calcularon los **porcentajes que representaban los números de casas de las variables explicativas CE, +I, +P, +IP, +T y CR en un total de 2263 casas del foco resistente de General Güemes.**

La proporción se obtuvo a partir de la sumatoria de los valores de número de casas (evaluadas, positivas en intra, peridomicilio, en ambos lados, en el total, rociadas) de los 21 parajes, dividido el número de casas totales, que fue 2263 en los 11 años analizados. Luego, el porcentaje se logró al multiplicar por cien la proporción obtenida (Tabla 10).

Grupo	Variable	Obtención del porcentaje por año
Extensión	CE	(Sumatoria del número de casas evaluadas ese año en los 21 parajes/ 2263 casas)*100
	+I	(Sumatoria del número de casas positivas en el intradomicilio ese año en los 21 parajes/ 2263 casas)*100
Infestación	+P	(Sumatoria del número de casas positivas en el peridomicilio ese año en los 21 parajes/ 2263 casas)*100
	+IP	(Sumatoria del número de casas positivas en el intra y peridomicilio ese año en los 21 parajes/ 2263 casas)*100
	+T	(Sumatoria del número total de casas positivas ese año en los 21 parajes/ 2263 casas)*100
Rociado	CR	(Sumatoria del número de casas rociadas ese año en los 21 parajes/ 2263 casas)*100

**Tabla 10.** Obtención de porcentajes por año de las variables explicatorias: CE: casas evaluadas, +I: número de casas positivas en el intradomicilio, +P: número de casas positivas en el peridomicilio, +IP: número de casas positivas en el intra y peridomicilio, +T: número total de casas positivas, CR: número de casas rociadas.

### *Modelado de la resistencia*

Los GLM se realizaron utilizando los paquetes lme4 (Bates et al. 2013) y MASS (Venables y Ripley 2002) del software R (R Core Team 2013). En todos los casos, los modelos de Poisson mostraron sobredispersión, por lo que se supuso una distribución binomial negativa de los datos para el análisis (Zuur et al. 2009).

Todas las variables explicativas fueron estandarizadas. Se utilizaron diagramas X-Y para identificar el comportamiento cuadrático y se corroboró luego si la inclusión de un término cuadrático mejoraba los modelos (esto sucedió cuando: p-valores de los coeficientes cuadráticos < 0,05, p-valores de las pruebas de razón de verosimilitud (LRT) < 0,05, valores bajos de AIC). Se realizó un análisis preliminar de *Tree* para identificar las variables explicativas que generaban agrupaciones. Esta prueba (una extensión a un número *n* de variables del enfoque de clasificación cruzada simple) clasifica los objetos en las celdas, de modo que los objetos en dichas celdas son similares entre sí, pero diferentes de los objetos en otras celdas. La similitud se juzga por la puntuación en una variable dependiente o de criterio dada (Armstrong y Andress 1970). Antes del modelado

multivariado, se realizó un análisis preliminar univariado para cada predictor. Luego, se probó la colinealidad entre ellos generando una matriz de correlaciones de pares utilizando el coeficiente de correlación de rango de Spearman. Si dos variables estaban correlacionadas  $> \pm 0,80$ , las variables que explicaban menos en el univariado se excluían del modelado final. Una vez que se identificó el conjunto de variables explicativas sin colinealidad y con efecto univariado significativo, se realizó un procedimiento manual paso a paso para evaluar las variables restantes (Zuur et al. 2009). Las reglas de decisión para agregar variables se basaron en pruebas de razón de verosimilitud (LRT) de modelos binomiales negativos al comparar los modelos anidados en cada paso.

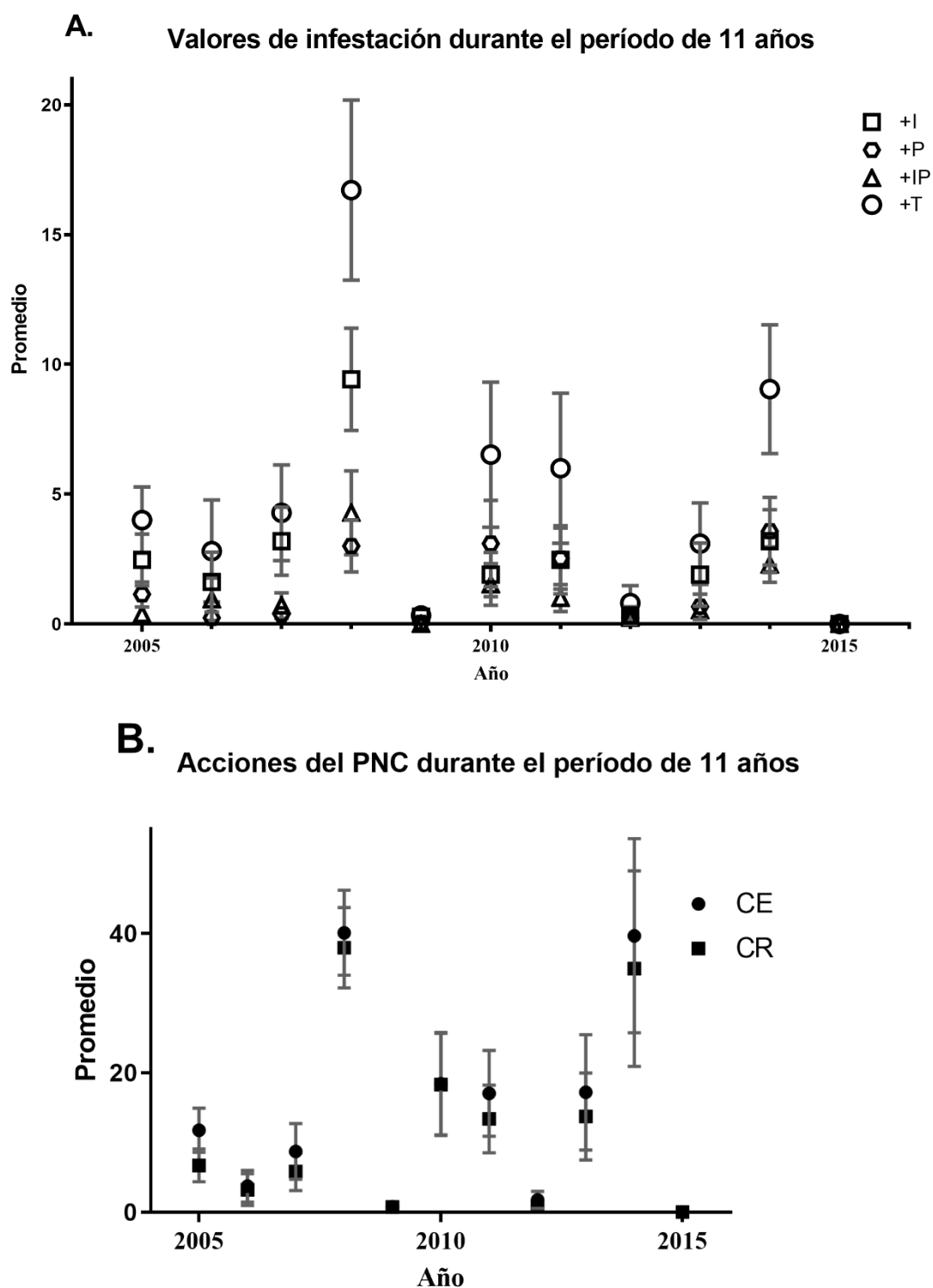
La colinealidad entre variables explicativas en cada modelo estimado se verificó utilizando el factor de inflación de varianza (vif) del paquete car de R, considerando solo las variables con  $vif < 5$  (Zuur et al. 2010). La selección del modelo se basó en los criterios de información de Akaike. Los residuos estandarizados se representaron en función de los valores ajustados (para comprobar la falta de ajuste de los residuos) y la normalidad se verificó gráficamente (cuantiles de datos contra cuantiles normales). Finalmente, se agregaron las coordenadas geográficas en busca de cualquier poder explicativo adicional para verificar que no quedara ninguna tendencia espacial (Legendre 1993).

## Resultados del capítulo 4

### *Descripción año por año*

El análisis exploratorio descriptivo de las variables ambientales mostró que las acciones de control del PNC se distribuyeron a lo largo del período analizado, excepto en 2015 cuando no aparecieron registros en la base de datos.

Los **valores promedio** mostraron variabilidad entre los 21 parajes analizados, tanto en los valores de infestación medidos por el PNC (Figura 33A), como en las acciones llevadas adelante por el mismo (casas evaluadas y casas rociadas, Figura 33B) a lo largo de los 11 años analizados. El promedio de casas positivas fue en todos los casos inferior al promedio de casas evaluadas (CE), infiriendo que en ningún caso la totalidad de las casas evaluadas resultó positiva. El promedio de casas rociadas (CR) fue similar a las casas evaluadas (CE), lo que pone de manifiesto el cumplimiento del protocolo del PNC que establece que el insecticida debe aplicarse en casas con y sin presencia de insectos.



**Figura 33.** Valor promedio de los 21 parajes analizados para cada año y error muestral para: **A.** valores de infestación: +I = número de casas positivas en intradomicilio, +P = número de casas positivas en peridomicilio, +IP = número de casas positivas en intra y peridomicilio, +T = número total de casas positivas, **B.** CE: casas evaluadas, CR = casas rociadas.



Por otro lado, los **porcentajes** que representaron tanto los valores de infestación, como las casas evaluadas y rociadas dentro de las 2263 casas totales del foco también fueron variables (Tabla 11). En el foco resistente, el porcentaje promedio de casas positivas en el intradomicilio (+I) fue de 2,26%, el porcentaje de casas positivas en peridomicilio (+P) fue de 1,26%, el porcentaje de casas positivas en intradomicilio y peridomicilio al mismo tiempo (+IP) fue del 1%, y el porcentaje total de viviendas positivas (+T) fue de 4,52%.

Sin embargo, teniendo en cuenta que el porcentaje de casas evaluadas (CE) fue bajo en el foco resistente (13,43% en promedio), se relativizaron los valores anteriores por el número de casas evaluadas. Estos valores de porcentajes de casas positivas en el intra, en el peri, en ambos, en el total y rociadas dentro de las casas que se evaluaron se muestran en la Tabla 11 como “% de las casas evaluadas” para cada año descripto. Los mismos permitieron obtener cifras más representativas de la situación: **16,83% para +I, 9,24% para +P, 7,26% para +IP y 33,66% para +T** para todo el período.

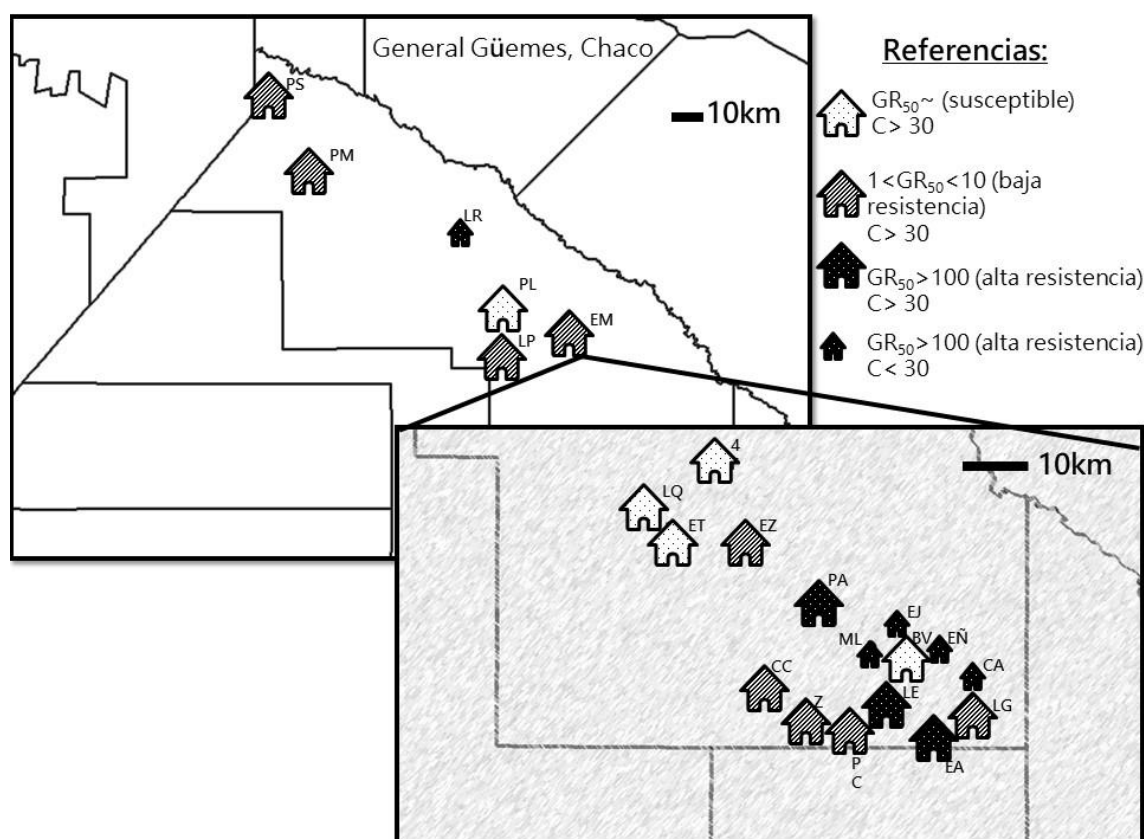
El porcentaje total de casas positivas relativizado por el número de casas evaluadas es similar al índice de infestación que se calcula en las acciones del PNC. El protocolo establece que, si el índice (estimado a partir del número de casas positivas totales sobre el número de casas evaluadas) supera el 5%, debe rociarse la totalidad del paraje. Considerando que para todo el foco el porcentaje de casas positivas fue 33,66% y el porcentaje de casas rociadas fue inferior a 100%, se analizó la tabla de datos original y se vió que en algunos parajes y en algunos años el postulado se cumplió, mientras que en otros no.

Año		CE	+I	+P	+IP	+T	CR
2005	Número de casas	247	52	24	8	84	141
	% del foco resistente	10,91	2,3	1,06	0,35	3,72	6,23
	% de las casas evaluadas		21,05	9,72	3,24	34,01	57,09
2006	Número de casas	78	34	5	20	59	68
	% del foco resistente	3,45	1,5	0,22	0,88	2,61	3
	% de las casas evaluadas		43,59	6,41	25,64	75,64	87,18
2007	Número de casas	183	67	8	15	90	122
	% del foco resistente	8,09	2,96	0,35	0,66	3,98	5,39
	% de las casas evaluadas		36,61	4,37	8,2	49,18	66,67
2008	Número de casas	842	198	63	90	351	797
	% del foco resistente	37,21	8,75	2,78	3,98	15,51	35,22
	% de las casas evaluadas		23,52	7,48	10,69	41,69	94,67
2009	Número de casas	16	6	1	0	7	15
	% del foco resistente	0,71	0,27	0,04	0	0,31	0,66
	% de las casas evaluadas		37,5	6,25	0	43,75	93,75
2010	Número de casas	387	40	65	32	137	385
	% del foco resistente	17,1	1,77	2,78	1,41	6,05	17,01
	% de las casas evaluadas		10,34	16,8	8,27	35,4	99,48
2011	Número de casas	358	52	53	21	126	281
	% del foco resistente	15,82	2,3	2,34	0,93	5,57	12,42
	% de las casas evaluadas		14,53	14,8	5,87	35,2	78,49
2012	Número de casas	37	7	5	5	17	17
	% del foco resistente	1,63	0,31	0,22	0,22	0,75	0,75
	% de las casas evaluadas		18,92	13,51	13,51	45,95	45,95
2013	Número de casas	361	40	14	11	65	288
	% del foco resistente	15,95	1,77	0,62	0,49	2,87	12,73
	% de las casas evaluadas		11,08	3,88	3,05	18,01	79,78
2014	Número de casas	833	67	75	48	190	734
	% del foco resistente	36,81	2,96	3,31	2,12	8,4	32,44
	% de las casas evaluadas		8,04	9	5,76	22,81	88,12
2015	Sin acciones de control registradas						
Promedio	Número de casas	303	51	28	22	102	258
	% del foco resistente	13,43	2,26	1,26	1	4,52	11,44
	% de las casas evaluadas		16,83	9,24	7,26	33,66	85,15

**Tabla 11.** Número absoluto de casas, porcentaje (%) que representan del foco resistente (n= 2263 casas) y porcentaje (%) que representan de las casas evaluadas (considerando las casas evaluadas por año) durante 2005-2015. Variables explicatorias: CE: casas evaluadas, +I: número de casas positivas en el intradomicilio, +P: número de casas positivas en el peridomicilio, +IP: número de casas positivas en el intra y peridomicilio, +T: número total de casas positivas, CR: número de casas rociadas.

### *Modelado de la resistencia*

El análisis exploratorio de *Tree* sugirió que la variable número de casas del paraje (C) dividió los GR<sub>50</sub>s en dos grupos. Así, cuando el número de casas del paraje fue inferior a 30, el valor promedio de la variable respuesta GR<sub>50</sub> fue 1106. Por otro lado, cuando el número de viviendas fue superior a 30, se registraron valores bajos de GR<sub>50</sub>s. La Figura 34 muestra la ubicación geográfica de los 22 parajes (incluido Bella Vista), el GR<sub>50</sub> correspondiente y una representación de la magnitud de C.



**Figura 34.** Ubicación geográfica, GR<sub>50</sub> y número de casas (C) en los parajes de General Güemes.

Los análisis univariados mostraron que las variables de temperatura Bio1, Bio7, Bio10, Bio11 y las variables de precipitación Bio15 y Bio18 se asociaron negativamente con los GR<sub>50</sub>s. Además, la variable número de casas (C) se asoció negativamente con GR<sub>50</sub>, mientras que las variables relativizadas “número de casas evaluadas” (CE<sub>r</sub>) y “casas rociadas” (CR<sub>r</sub>) se asociaron débil y positivamente con el GR<sub>50</sub>. En todos los análisis, la asociación fue significativa (p-valor < 0,05, excepto CE<sub>r</sub> y CR<sub>r</sub>, que mostraron una significancia cercana a 0,06). Debido a la alta correlación entre CE<sub>r</sub> y CR<sub>r</sub> (r = 0,98), se descartó la última para el análisis. En relación a la frecuencia de rociado, el análisis univariado no mostró asociación, pero a modo descriptivo, es importante mencionar que todos los parajes recibieron al menos un evento de rociado durante el período estudiado (2005-2015) y solo Colonia Castelli tuvo el valor máximo observado, con ocho eventos de rociado. Este predictor, que podría considerarse como un indicador de la presión de selección ejercida sobre el paraje, presentó un valor medio de 4 y una moda de 5.

Los modelos basados sólo en indicadores de temperatura, extensión, infestación o rociado no fueron estadísticamente significativos (Tabla 12). Por otro lado, un modelo basado únicamente en variables de precipitación fue significativo, pero explicó solo el 43,5% de la devianza. Los modelos que incluyeron variables de temperatura y precipitación a la vez mostraron una gran explicación (alrededor del 65%). Al agregar las variables de extensión C y CE<sub>r</sub>, la potencia explicativa aumentó a alrededor del 70%, mostrando una diferencia significativa con los modelos reducidos (p -valor del LRT < 0,05).

Categoría	Variables significativas	g.l.	Devianza explicada	AIC	P-valor LRT
Modelo nulo		20	0%	245,91	
Sólo precipitación	Bio15, Bio18	18	43,50%	234,29	0,0006***
Temperatura y precipitación	Bio7, Bio15, Bio18	17	63%	225,46	0,001**
	Bio7, Bio18	18	62,20% <sup>a</sup>	224,24	1,49e <sup>-6</sup> ***
	Bio7, Bio11, Bio18	17	65,74% <sup>b</sup>	223,9	8e <sup>-6</sup> ***
Sólo temperatura, extensión, infestación o rociado	Sin modelos significativos				
Temperatura, precipitación y extensión del paraje	Bio7, Bio11,				
	Bio18, C	16	70,97%	222,04	0,049*
	Bio7, Bio18, CE <sub>r</sub>	17	69,39%	221,26	0,026*

**Tabla 12.** GLM con distribución binomial negativa para GR<sub>50</sub> con diferentes predictores. g.l.= grados de libertad, AIC= criterios de información de Akaike, LRT= prueba de razón de verosimilitud. Las variables explicativas (H, Bio11, Bio7, Bio18, CE<sub>r</sub>) están en escala del predictor lineal. Códigos de significancia: \* = 0,05, \*\* = 0,01, \*\*\* = 0,001.

El primer GLM completo para GR<sub>50</sub> (es decir, que integró predictores de temperatura, disponibilidad de agua con información provista por el PNC) explicó 70,97% de la devianza con un AIC de 222,04 (Tabla 12). Incluyó dos indicadores de temperatura asociados negativamente (Bio7 y Bio11), un indicador negativo de precipitación (Bio18) y un indicador positivo de extensión del paraje (C) como variables explicativas (Tabla 13). Un segundo modelo que incluyó Bio7 y Bio18 (asociadas negativamente) y CE<sub>r</sub> asociada negativamente también fue significativo (Tabla 13) y explicó 69,39% de la devianza con un AIC de 221,26 (Tabla 12). Las variables de extensión explicaron una pequeña porción de la varianza, como mostraron sus coeficientes (relación 1:3 con indicadores de temperatura y precipitación) y esto podría explicar el cambio de los signos de las correlaciones en relación con la prueba univariada.

Primer modelo				Segundo modelo			
	Parámetro	g.l.	Valor de z		Parámetro	g.l.	Valor de z
Intercepción	3,96	1	14,53***	Intercept	4,00	1	14,43***
C	0,90	1	2,32**	CE <sub>r</sub>	-1,14	1	-2,43**
Bio11	-0,54	1	-1,44*	Bio18	-3,43	1	-6,70***
Bio7	-3,37	1	-7,89***	Bio7	-4,31	1	-7,23***
Bio18	-3,77	1	-8,03***				
Devianza residual	23,18	16		Devianza residual	23,52	17	
Devianza nula	79,83	20		Devianza nula	76,83	20	

**Tabla 13.** GLM para el GR<sub>50</sub>. g.l.= grados de libertad. Las variables explicatorias (C, Bio11, Bio7, Bio18, CE<sub>r</sub>) están en escala del predictor lineal. Valores de significancia= \* = 0,05, \*\* = 0,01, \*\*\* = 0,001.

Aunque por los diagramas X-Y se pudo inferir la ausencia de términos cuadráticos, se confirmó más tarde al incorporarlos en los GLM reportados y corroborar

que éstos no mejoraron (p-valores de los coeficientes cuadráticos  $> 0,05$ , p-valores de los LRTs  $> 0,05$ , valores altos de AIC).

Finalmente, los LRTs comparando modelos con y sin coordenadas geográficas no fueron significativos. Estos modelos, que incluyeron la latitud y la longitud como predictores, presentaron altos valores de vif, descartando una tendencia espacial en la zona caracterizada (resultados no mostrados en tablas).

## Discusión del capítulo 4

Este capítulo presenta el primer estudio de la asociación de la resistencia a piretroides en *T. infestans* con variables de temperatura y disponibilidad de agua junto con las acciones del Programa Nacional de Chagas (PNC). Se llevó a cabo sobre el foco resistente estudiado a lo largo de la presente tesis, ubicado en la ecorregión argentina del Gran Chaco, el área principal donde el control vectorial no ha sido totalmente exitoso. Se vio que las acciones del PNC se distribuyeron a lo largo del período analizado, excepto en el año 2015 cuando no fueron efectuadas. El porcentaje de casas rociadas fue variable y se mantuvo siempre por debajo del 36% durante el período de 11 años. La frecuencia promedio de rociado en toda la zona a lo largo del período fue 3,62, presentando el paraje Colonia Castelli el mayor número de eventos (ocho en total), mientras que La Rinconada y Pozo Colorado tuvieron sólo uno. Considerando la totalidad del tiempo estudiado, se obtuvieron modelos que explicaron el 65% de la heterogeneidad toxicológica en el Departamento de Güemes (provincia del Chaco, Argentina) y que estuvieron relacionados con los indicadores de temperatura y disponibilidad de agua. Al agregar los indicadores significativos del tamaño del paraje a los modelos seleccionados de temperatura y precipitación, el poder explicativo aumentó al 70% de la devianza. Aunque las variables de tamaño explicarían una pequeña parte de la varianza total en comparación con las variables de temperatura y disponibilidad de agua, este aumento fue significativo, destacando su relevancia y peso dentro de la caracterización del foco resistente.

Si bien este abordaje es asociativo, con una variable respuesta cuantificada experimentalmente y predictores extraídos de estadísticos y bases de datos bioclimáticos, permite proponer tres indicadores de temperatura y disponibilidad de agua como buenos descriptores del fenómeno de resistencia a piretroides del Departamento de Güemes. Estas variables, que presentaron una asociación negativa con los GR<sub>50</sub>, fueron Bio7, Bio11 y Bio18. Similarmente, Bustamante Gómez et al. (2016) encontraron una relación

entre la dosis letal de piretroides que mataba al 50% de la población evaluada (DL<sub>50</sub>) y las variables ambientales Bio2, Bio3, Bio9, Bio15 y Bio18 (la última con una relación positiva, a diferencia del coeficiente negativo del modelo informado en este capítulo). Sin embargo, la escala espacial fue diferente y los datos de susceptibilidad y resistencia a piretroides (resultado de una búsqueda bibliográfica en trabajos publicados a lo largo de 25 años), fueron obtenidos por diferentes laboratorios e incluso en algún caso con otro piretroide como la  $\beta$ -ciflutrina. Sus predictores explicaron la distribución geográfica de las DL<sub>50</sub> altas y bajas en toda la zona endémica de Argentina y Bolivia, con una concentración de las poblaciones con DL<sub>50</sub> más altas en la frontera de los dos países. El objetivo del modelo fue predecir la distribución potencial de las poblaciones con los valores más altos de DL<sub>50</sub>, pero no fue capaz de detectar la ocurrencia de 5 de las 13 poblaciones en la parte sur del Departamento de Güemes, sitio donde se ubica el foco resistente estudiado en el presente trabajo de tesis. Posteriormente, la relevancia de este foco en la comprensión de la distribución y evolución de la resistencia a los piretroides en *T. infestans* se puso de manifiesto en el relevamiento toxicológico presentado en el capítulo 1, donde se informó la presencia de 17 poblaciones resistentes, 6 de ellas con niveles que superan el 1000.

Los valores altos del rango de temperatura anual (Bio7) podrían resultar en un ambiente más heterogéneo y llevar a los insectos a niveles elevados de estrés fisiológico. Recientemente, Rolandi y Schilman (2018) informaron que las variaciones térmicas diarias afectaban rasgos ecológicamente relevantes asociados a la historia de vida en el triatmino *Rhodnius prolixus* y propusieron como hipótesis que un entorno térmico variable tiene costos energéticos más altos que un entorno estable. Aunque el estudio citado manipuló experimentalmente las fluctuaciones de temperatura y usó una escala temporal diferente, se podría proponer el mismo principio (es decir, mayor costo energético debido a un ambiente térmico variable) para explicar cómo la variación térmica a lo largo de un período determinado podría promover una variación en los GR<sub>50</sub> de las poblaciones de *T. infestans*. Además, Brito et al. (2017) examinaron la hipótesis de que la temperatura ambiental podría imponer restricciones fisiológicas en la supervivencia y el crecimiento poblacional de triatminos, o afectar el rendimiento del vuelo dispersivo. Aunque encontraron evidencia para respaldar esta hipótesis, sugirieron que los resultados deberían considerarse como indicios de hipótesis específicas acerca de los efectos de la temperatura sobre el fitness (valor adaptativo) y la dispersión de los

insectos que se puedan probar luego con diseños experimentales específicos. Teniendo en cuenta que la dispersión promueve recolonización de vinchucas en las viviendas, las hipótesis que la vinculan con la temperatura se vuelven más que relevantes para el control vectorial.

Además, dado que la temperatura corporal del insecto cambia con su entorno, la temperatura ambiental puede afectar el control del vector de la enfermedad al influir en la efectividad o toxicidad del insecticida (Glunt et al. 2013). Los valores bajos de temperatura media del trimestre más frío (Bio11) podrían llevar a un ambiente más frío que promueva la mayor eficacia de los piretroides, lo que conduciría a una fuerte presión selectiva para los insectos resistentes preexistentes y, por lo tanto, a niveles de resistencia elevados. La relación entre la temperatura y la toxicidad del insecticida en insectos se ha estudiado ampliamente y se ha examinado de manera exhaustiva en muchas especies (Scott 1995, Boina et al. 2009, Muturi et al. 2011, Glunt et al. 2014). En particular, es bien sabido que los insecticidas piretroides tienen una alta efectividad a bajas temperaturas en condiciones experimentales (Alzogaray y Zerba 1993, Khan y Akram 2014). A bajas temperaturas, las neuronas expuestas a piretroides reciben una alta concentración del insecticida debido a la reducción de la biotransformación, y son más sensibles al estímulo resultante debido a una duración prolongada del potencial de reposo en estado estable (Harwood et al. 2009). En esta tesis, la humedad y temperatura se controlaron durante la determinación experimental de los GR<sub>50</sub>, pero las condiciones ambientales que se deben considerar al momento de proponer las hipótesis son aquellas presentes en el momento en que fueron rociados los insecticidas. Si bien esta tesis estudió un período de 11 años, las condiciones ambientales en las que ocurrió el proceso selectivo en el campo, siguen siendo una incógnita. Es decir, este estudio asociativo utilizó variables bioclimáticas como indicadores de temperatura del supuesto momento de selección de la resistencia con insecticidas piretroides, aunque no se debe descartar la posibilidad de que esta selección podría haber ocurrido antes. Este sesgo debería ser considerado en investigaciones futuras para tener una comprensión más profunda de cómo la temperatura a la que se aplican los piretroides a campo afecta la promoción de la resistencia y, por lo tanto, utilizar este conocimiento para mejorar el control vectorial.

Con respecto a los indicadores de disponibilidad de agua, la asociación negativa entre los GR<sub>50</sub> y la precipitación del trimestre más cálido (Bio18) podría explicarse por el efecto residual diferencial del insecticida. Se podría pensar que los altos valores de



precipitación llevarían a un bajo efecto residual del insecticida, promoviendo un efecto sub-letal a nivel poblacional, es decir una dosis que no mata la totalidad de los insectos susceptibles presentes, y que ejercería una presión de selección baja. Por otro lado, los valores bajos de precipitación podrían conducir a un alto efecto residual del insecticida, manteniendo la efectividad durante un período extenso que podría matar a la totalidad de insectos susceptibles y ejercer una presión selectiva más intensa sobre los individuos “verdaderamente” resistentes, si es que están presentes en la población rociada. Cada uno de estos tipos de selección (esto es, selección con dosis baja y alta) promovería la evolución de poblaciones resistentes con diferentes características tanto a nivel genético como a nivel toxicológico. La dosis baja o sub-letal seleccionaría individuos dentro de la distribución “natural” de susceptibilidades individuales por lo que se espera que la resistencia esté determinada por muchos genes (i.e. resistencia poligénica) y que genere bajos niveles de resistencia. Por otro lado, las dosis altas seleccionarían individuos por fuera de la distribución “natural” de susceptibilidades individuales (es decir, seleccionaría insectos con una extraordinaria baja susceptibilidad o “verdaderamente” resistentes) por lo que se espera que la resistencia esté determinada por un gen (resistencia monogénica) o unos pocos genes y que genere alto niveles de resistencia (McKenzie 1996).

En una escala espacial más detallada, se ha propuesto que la actividad residual de la deltametrina es más alta en el intradomicilio que en el peridomicilio, éste último muy expuesto a la degradación bajo condiciones ambientales tales como temperaturas extremas, la lluvia o el sol (Vázquez Prokopec et al. 2002). Sin embargo, en este estudio, esta diferencia no se consideró porque el nivel de resistencia se calculó a partir de un grupo de insectos recolectados en el intra y peridomicilio. Este lineamiento está respaldado por el estudio de Germano et al. (2013), el cual informó que la condición toxicológica de susceptibles o resistentes en el paraje La Esperanza no estaba asociada con la ubicación de los insectos dentro de las casas. Por otro lado, la resolución espacial de las variables ambientales ( $1 \text{ km}^2$ ) no permitió explicar las condiciones microambientales. Por lo tanto, sería necesario aumentar la resolución espacial si se quisiera estudiar las diferencias entre intradomicilio y peridomicilio (además de obtener determinaciones separadas de los  $\text{GR}_{50\text{S}}$ ).

Ninguna de las dos variables de rociado fueron significativas por sí solas ni tampoco al ser agregadas a los modelos seleccionados de temperatura y disponibilidad de agua. Esto podría explicarse por una presión selectiva homogénea a través del área de

estudio. La frecuencia de rociado presentó un valor promedio de cuatro durante el período de 11 años analizado y Colonia Castelli tuvo el valor más alto observado, con ocho eventos de rociado, probablemente por su proximidad a la ciudad cabecera de J.J Castelli, la capital de la zona estudiada. Este predictor cuantifica la cantidad de veces que el paraje recibió eventos de rociado con piretroides durante el período 2005-2015. Los parajes que recibieron acciones de PNC durante el período analizado tuvieron solo un evento de rociado por año (nunca más de uno por año) lo que permite proponer que la presión selectiva fue relativamente baja.

Las variables de infestación no predijeron la heterogeneidad toxicológica. Con respecto a los promedios de infestación durante el período de 11 años estudiado, el porcentaje de casas positivas en el intradomicilio durante 2005-2015 fue de 16.83%. Si se adicionan las casas positivas tanto en intra como peridomicilio, el porcentaje aumentó a 24,09%. Este resultado contrasta con lo reportado en Bolivia (Espinoza Echeverría et al. 2017). Los autores estimaron una infestación doméstica promedio de 2,9% entre 2009 y 2014 en 73 comunidades en el municipio de Toro Toro (Bolivia). Del mismo modo, Espinoza et al. (2014) encontraron que el índice de infestación doméstica entre 2004 y 2011 fue de 2 a 3% en el Departamento de Cochabamba (Bolivia) después de la intervención química. En un estudio que buscó evaluar la efectividad de una nueva herramienta aspersora en Mendoza, Carbajal de la Fuente et al. (2017) describió una infestación intradomiciliaria del 3,9%, peridomiciliaria del 40,7% y total del 53,9%. Estos valores se redujeron sustancialmente luego de las intervenciones, tanto con la tecnología tradicional de spray de compresión manual como con el equipamiento aspersor montado en vehículos. De manera similar, Gaspe et al. (2018) detectó una reducción de infestación domiciliaria del 31.9 al 0.7% a los 10 meses del rociado en Pampa del Indio (Chaco). Todos estos estudios refuerzan la idea que las acciones de los programas de control mantienen tasas bajas de infestación en diferentes áreas de la zona endémica. Los valores mostrados en el presente capítulo se acercan a los reportados por Gaspe et al. (2015), quienes determinaron una infestación doméstica del 31,9% en un área de Gran Chaco caracterizada por la ausencia de campañas recientes de control con insecticidas. Por lo tanto, el informe epidemiológico aquí presentado, realizado a partir de información de 11 años en una zona endémica de incidencia y transmisión de la enfermedad de Chagas, refuerza la importancia de un manejo vectorial adecuado.

En el presente capítulo, también se evaluó la asociación entre los  $GR_{50}$  y el tamaño del paraje. Aquellos con un bajo número de casas tendrían un número menor de insectos que los parajes más grandes. De esta manera, la fuerte relación negativa podría explicarse por la variación en la diversidad genética que presentan parajes grandes y chicos y por el hecho de que, ante el mismo evento de surgimiento del alelo resistente en la población (i.e. mutación o migración), en parajes chicos la frecuencia del alelo resistentes será mayor que en parajes grandes. En algunos parajes pequeños, el alelo resistente podría perderse, mientras que, en otros, el alelo resistente aumentará su frecuencia más rápidamente o en menor número de generaciones y es más probable que se fije comparado con parajes grandes. Todo esto conduciría a  $GR_{50}$ s altos en algunas poblaciones pequeñas. En los parajes con muchas casas, por el contrario, se espera que la diversidad genética sea mayor. El alelo resistente podría estar presente (nuevamente por mutación o migración), pero va a ser necesario un número mayor de generaciones para ser fijado comparado a poblaciones pequeñas, por lo que se esperaría que los  $GR_{50}$  sean mas bajos. Por otro lado, teniendo en cuenta la reducción en el tamaño efectivo de la población que provoca el rociado con insecticidas, las poblaciones se aislarían más y se subdividirían en demos más pequeños, haciendo que el impacto de los efectos estocásticos sea más fuerte (Van Dongen et al. 1998). Dado que la presión selectiva parece haber sido homogénea en todos los parajes, las poblaciones pequeñas podrían verse más afectadas por estos eventos estocásticos que las poblaciones grandes, generando (como se mencionó anteriormente) mayores niveles de resistencia.

Recientemente, un estudio en dos parajes rurales de Pampa del Indio (Chaco, Argentina), evaluó la hipótesis sobre los orígenes probables de los triatominos recolectados a los 4, 8 y 12 meses después del rociado con insecticidas por medio de 10 microsatélites (Piccinali et al. 2018). Varios alelos que presentaban baja frecuencia antes del rociado no fueron detectados en la muestra luego del mismo, lo que sugiere una pérdida de variabilidad genética en el área de estudio. Esto proporciona evidencia de que los rociados disminuyen las poblaciones de insectos generando un cuello de botella que elimina alelos poco frecuentes y estructura aún más las poblaciones. Este hallazgo es compatible con la hipótesis de que la reinfestación de los domicilios en el Chaco argentino se relaciona principalmente con focos residuales, y está apoyado por las observaciones a campo, el análisis espacial y los estudios morfométricos (Gürtler et al. 2004, Cecere et al. 2004, 2006, Porcasi et al. 2006, Arrom et al. 2013, Gurevitz et al. 2013, Hernandez et al.

2013). Por lo tanto, la estructuración genética podría ser mayor en los parajes pequeños y, teniendo en cuenta que el número de casas positivas en el peridomicilo (+P) fue en promedio 9,24%, es importante aumentar la vigilancia peridomiciliar para prevenir eventos de reinfestación desde estas zonas y retrasar así el desarrollo de la resistencia a piretroides.

Otra explicación posible de la asociación negativa entre los GR<sub>50</sub>s y el número de casas podría deberse a la eficiencia de las acciones de rociado. Es posible que en los pueblos pequeños ( $C < 30$ ) sea más fácil cubrir toda el área, lo que llevaría a una presión selectiva más fuerte y efectiva. Esta hipótesis podría apoyarse en la correlación negativa que se vio entre el número de casas de los parajes y el número de casas evaluadas (CE). En parajes pequeños, el número de casas evaluadas es mayor. Por otro lado, CE mostró una alta correlación positiva con el predictor de rociado relativizado número de casas rociadas (CR). Aunque se eliminó CR para el análisis debido a sus altos valores de vif, se plantea como posibilidad que una pequeña parte de la varianza de los GR<sub>50</sub>s sea explicada por esta variable, lo que sugiere que cuando el número de casas rociadas en el paraje es mayor, la resistencia también es mayor.

El presente capítulo presenta modelos que explicaron el 70% de la heterogeneidad toxicológica. Este podría considerarse un buen resultado para un estudio asociativo sin un diseño experimental pensado previamente. Con respecto al 30% de la varianza restante, podría explicarse por algunas variables ambientales que no fueron consideradas, como predictores sociales o demográficos o tal vez alguna otra variable a nivel micro geográfico. La resistencia a los insecticidas es un fenómeno genético definido por la supervivencia de los insectos a concentraciones de insecticidas que son letales para los insectos susceptibles (McKenzie 1996). Teniendo en cuenta esta definición tradicional, no se debe descartar la posibilidad de que el insecticida no actúe de la manera esperada y, como se describió con anterioridad, ejerza un efecto sub letal en lugar del esperado y deseado efecto letal.

Para concluir, la presión selectiva de los insecticidas parecería haber sido relativamente homogénea y con baja frecuencia. Por lo tanto, las acciones de control químico por sí solas no parecen ser la causa principal de la heterogeneidad toxicológica descrita en el capítulo 1 de esta tesis. Además, este capítulo lleva a proponer que las variables vinculadas con la disponibilidad de agua, la temperatura y los indicadores de tamaño del paraje podrían afectar o modular la presión ejercida por el insecticida. Para

avanzar en la demostración de la relación causal, se necesitaría un modelo mecanístico que integre la dinámica y la genética poblacional, la acción tóxica del insecticida y las variables ambientales. Además, se podrían llevar a cabo experimentos con insectos del área resistente criados en diferentes condiciones ambientales para obtener información más detallada sobre el papel que desempeñan estas condiciones. Una tercera pregunta que se desprende de los resultados de este capítulo es: ¿la variabilidad genética es lo suficientemente alta como para generar heterogeneidad toxicológica entre parajes?

Nuestra investigación futura se centrará en profundizar el conocimiento del rol de las mutaciones *Kdr* y la estructura genética de las poblaciones para comprender mejor algunos parámetros de la dinámica y la genética poblacional. De esta manera, seguir avanzando en un enfoque integral podría ayudar a comprender y generar herramientas adecuadas para disminuir la incidencia de esta enfermedad desatendida en el área endémica del Gran Chaco.



## **CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES**

# CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

---

*“Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas,  
de pronto, cambiaron todas las preguntas”*

*Mario Benedetti*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis, se resumen las principales conclusiones:

- 1) Este es el primer estudio donde se aborda de manera multidisciplinaria (toxicología, bioquímica, biología molecular y ecología) el problema de la resistencia a insecticidas piretroides en poblaciones de *T. infestans*.
- 2) El relevamiento toxicológico permitió comprobar que la susceptibilidad a deltametrina se encuentra extendida a lo largo del área endémica de la enfermedad de Chagas. La resistencia, por el contrario, sigue estando confinada al corazón del Gran Chaco argentino. En el Departamento de General Güemes, se encontraron los niveles de resistencia más altos hasta el momento, con  $GR_{50S} > 1000$ . Por otra parte, los parajes con insectos más resistentes fueron susceptibles a fenitrotión, remarcando su importancia para el control a campo de estas poblaciones. Se destaca la necesidad de continuar el monitoreo de resistencia para poder detectar tempranamente, en caso que existan, otros focos resistentes. Con ese objetivo, las próximas investigaciones estarán orientadas a generar mapas de riesgo de la resistencia que puedan detectar su evolución temprana.
- 3) El foco resistente de General Güemes presentó alta heterogeneidad toxicológica, con poblaciones susceptibles, de resistencia baja y de resistencia alta, todas ellas muy cercanas espacialmente.
- 4) Se detectó, en el foco estudiado, la detoxificación enzimática incrementada por parte de las oxidasas (citocromo P450) y esterases como mecanismo contributivo a la resistencia.
- 5) La resistencia sería explicada en gran parte por la mutación puntual L925I que afecta el sitio de acción de los piretroides en el canal de sodio dependiente de

voltaje. Se encontró una asociación positiva entre la frecuencia de este alelo en homocigosis y el nivel de resistencia.

- 6) El análisis de la información de las acciones de control del Programa Nacional de Chagas demostró que, en el área geográfica donde se ubica el foco de alta resistencia estudiado en esta tesis, los rociados estuvieron distribuidos a lo largo del período comprendido entre el 2005 y el 2015. Las variables que se usaron como indicadores de la presión de selección por parte del insecticida, no aportaron explicación a la heterogeneidad toxicológica descripta. Sin embargo, las variables de temperatura y de precipitación parecerían afectar la presión selectiva del insecticida. Finalmente, el tamaño de paraje contribuiría a la variación de los GR<sub>50</sub>.
- 7) La asociación que indica que a un menor número de casas por paraje se observen mayores niveles de resistencia, llevó a proponer diferentes hipótesis sobre la evolución de la resistencia en la zona. Dado que ellas implican que las distintas poblaciones partirían de diferentes acervos genéticos, los próximos estudios se orientan a caracterizar su variabilidad genética por medio de microsatélites.
- 8) Debido a los resultados hallados en el presente trabajo, se pudo generar información que fue puesta a disposición del Programa Nacional de Chagas para usarse de base en el manejo de la resistencia aplicado en el paraje Pampa Argentina. En este lugar, se está llevando a cabo un estudio microgeográfico de resistencia casa por casa, combinado con un abordaje comunitario y un rociado selectivo piloto con un insecticida con un principio activo diferente al de los piretroides.

**Lic. Georgina Fronza**  
(Tesisista)

**Dr. Gastón Mougabure Cueto**  
(Director)

**Dr. Ariel Toloza**  
(Director asistente)





## **BIBLIOGRAFÍA**

# BIBLIOGRAFÍA

---

**Abad Franch, F. 2009.** Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles Prioritarias en el Ecuador. Proyecto OPS/CIDA/MSP.

**Abad Franch, F. 2016.** A simple, biologically sound, and potentially useful working classification of Chagas disease vectors. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 111(10), 649–651.

**Abbott, W.S. 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.

**Achaleke, T., M. Thibaud, R. T. Ghogomu, M. Vaissayreband, y T. Brévault. 2009.** Esterase-mediated resistance to pyrethroids in field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Central Africa. Pest Manag Sci: 65: 1147- 1154.

**Alzogaray, R. A., y E. N. Zerba. 1993.** Temperature effect on the insecticidal activity of pyrethroids on *Triatoma infestans*. Comp Biochem Physiol C- Toxicol Pharmacol. 104: 485-488.

**Amelotti, I., N. Romero, S.S. Catala, y D.E. Gorla. 2011.** Variability of the susceptibility to deltamethrin in *Triatoma infestans*: the female factor. J. Med. Entomol. 48 (6): 1167-73.

**Armstrong, J., y J. Andress, J. 1970.** Exploratory Analysis of Marketing Data: trees vs. Regression. Journal of Marketing Research 7(4): 487-492.

**Arrom, C., M. A. Arrom, C. M. Arrom, M. Rolón, M. C. Vega, y A. Rojas de Arias. 2013.** Behaviors that favor reinfestation by *Triatoma infestans* in the Paraguayan Chaco. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud 11: 7–15.

**Barrozo, R. B., S. A. Minoli, y C. R. Lazzari. 2004.** Circadian rhythm of behavioural responsiveness to carbon dioxide in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). Journal of Insect Physiology 50: 249- 254.

**Bates, D., M. Maechler, B. Bolker, y S. Walker S. 2013.** lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.0-5.

**Berge, J. B., R. Feyereisen, y M. Amichot. 1998.** Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 353: 1701–1705. Scott, J. G. 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. Insect Biochem. Mol. Biol. 29: 757–777.

**Bern, C., S. P. P. Montgomery, B. L. Herwaldt, A. Jr. Rassi J. A. Marin Neto, R. O. Dantas, J. H. Maguire, H. Acquatella, C. Morillo, L. V. Kirchhoff, R. H.**

**Gilman, P. A. Reyes, R. Salvatella, y A. C. Moore. 2007.** Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. JAMA. 298(18): 2171- 2181.

**Biancardi, M. A., M. Conca Moreno, N. Torres, C. Pepe, J. Altcheh, y H. Freilij. 2003.** Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en 17 parajes del “Monte Impenetrable” de la Provincia del Chaco. Medicina (Buenos Aires) 63: 125- 129.

**Bloomquist, L.R. 1996.** Ion channels as target for insecticides. Ann. Rev. Entomol. 41: 63- 190.

**Bonnet, J., C. Pennetier, S. Cédric, S. Duchon, B. Stéphane y V. Corbel. 2009.** Multi-function oxidases are responsible for the synergistic interactions occurring between repellents and insecticides in mosquitoes. Parasites & Vectors, 2 (17).

**Briceño-León, R. y J. M. Galván. 2007.** The social determinants of Chagas disease and the transformation of Latin America. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol. 102 (Suppl. 1), pp. 109-112.

**Boina, D. R., E.O. Onagbola, M. Salyani, y L. L. Stelinski. 2009.** Influence of posttreatment temperature on the toxicity of insecticides against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). J. Econ. Entomol. 102: 685–691.

**Brito, R. N., D. E. Gorla, L. Diotaiuti, A. C. F. Gomes, R. C. M. Souza, y F. Abad-Franch. 2017.** Drivers of house invasion by sylvatic Chagas disease vectors in the Amazon-Cerrado transition: a multi-year, state-wide assessment of municipality-aggregated surveillance data. PLoS Negl. Trop. Dis. 11: 1–25.

**Brown, A.W.A., and R. Pal. 1973.** Resistance des Arthropodes aux Insecticides. 2nd edn, Serie de Monographies n 38. Organisation Mondiale de la Sante, Geneve, 541 p.

**Bouvier, J. C., A. Cuany, C. Monier, V. Brosse, y B. Sauphanor. 1998.** Enzymatic diagnosis of resistance to deltamethrin in diapausing larvae of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). Arch. Insect Biochem. Physiol. 39: 55-64

**Bustamante Gomez, M., G.C Pessoa D´Avila; A.L. Garcia Orellana, M. Rojas Cortez, A.C. Luiz Rosa, F. Noireau, y L. Gonçalves Diotaiuti. 2014.** Susceptibility to deltamethrin of wild and domestic Populations of *T. infestans* of the Gran Chaco and the Inter-Andean Valleys of Bolivia. Parasites & Vectors 7: 497.

**Bustamante Gomez, M., L. Gonçalves Diotaiuti, y D. E. Gorla. 2016.** Distribution of pyrethroid resistant populations of *Triatoma infestans* in the Southern Cone of South America. PLoS Negl. Trop. Dis. 10: 1–15.

**Busvine, J.R. 1971.** A Critical Review of the Techniques for Testing Insecticides. Commonwealth Agricultural Bureaux, London, UK.

**Capriotti, N., G.A. Mougabure-Cueto, R. Rivera-Pomar, y S. Ons. 2014.** L925I mutation in the para-type sodium channel is associated with pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* from the Gran Chaco region. PLoS Negl. Trop. Dis. 8, e2659.

**Carbajal de la Fuente, A. L., P. Lencina, C. Spillmann, y R. Gürtler. 2017.** Mechanical versus motorized vehicle-mounted sprayers: performance evaluation of a new method for Chagas disease vector control. Cadernos de Saúde Pública 33 (1): e00099115.

**Cardozo, R. M., F. Panzera, A. G. Gentile, M. A. Segura, R. Pérez, R.A. Díaz, y M.A. Basombrío. 2010.** Inheritance of resistance to pyrethroids in *Triatoma infestans*, the main Chagas disease vector in South America. Infection, Genetics and Evolution 10: 1174–1178.

**Carvajal, G., G.A. Mougabure-Cueto, and A.C. Toloza. 2012.** Toxicity of non-pyrethroid insecticides against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 107: 675- 79.

**Casida, J. E. 1970.** Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. J Agric Food Chem; 18(5): 753- 772.

**Casida, J.E. y G. Quistad. 1995.** En Pyrethrum flowers, production, Chemistry, toxicology, and uses, Casida, J.E. and Quistad, G.B. (eds). Oxford university press, Inc. Oxford.

**Cecere, M. C., G. M. Vazquez-Prokopec, R. E. Gürtler, y U. Kitron. 2004.** Spatio-temporal analysis of reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) following insecticide spraying in a rural community in northwestern Argentina. Am. j. Trop. Med. Hyg. 71: 803- 810.

**Cecere, M. C., G. M. Vasquez-Prokopec, R. E. Gürtler, y U. Kitron. 2006.** Reinfestation sources for Chagas disease vector, *Triatoma infestans*, Argentina. Emerg. Infect. Dis. 12: 1096- 1102.

**Chevillon, C., N. Pasteur, M. Marquine, D. Heyse y M. Raymond. 1995.** Population structure and dynamics of selected genes in the mosquito *Culex pipiens*. Evolution 49: 997– 1007.

**Cockburn, J.M. 1976.** Toxicology and genetics of insecticide resistance in *Rhodnius prolixus*. Thesis, University of London, 190 pp.

**Corbel, V. y R. N'Guessan. 2013.** Distribution, mechanisms, impact and management of insecticide resistance in malaria vectors: a pragmatic review. In: Manguin S, editor. *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. Rijeka: InTech; 2013.

**Collins, P.J., 1990.** A new resistance to pyrethroid in *Tribolium castaneum* (Herbst). *Pesticide Science* 28: 101- 105.

**David, J. P., H. M. Ismail, A. Chandor-Proust, y M.J.I. Paine. 2013.** Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 368: 20120429.

**Depickère, S., R. Buitrago, E. Siñani, M. Baune, M. Monje, R. Lopez, E. Waleckx, T. Chavez, y S.F. Brenière. 2012.** Susceptibility and resistance to deltamethrin of wild and domestic populations of *T. infestans* (Reduviidae: Triatominae) in Bolivia: new discoveries. *Mem Inst. Oswaldo Cruz.* 107 (8): 1042-1047.

**Djouaka, R. F., A. A. Bakare, O. N. Coulibaly, M. C. Akogbeto, H. Ranson, J. Hemingway y C. Strode. 2008.** Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics* 9: 538.

**Dias, J. C. P., A. C. Silveira, y C. J. Schofield. 2002.** The impact of Chagas disease control in Latin America, a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97: 603- 12.

**Dujardin, J. P., C. J., Schofield, y F. Panzera. 2002.** Los vectores de la enfermedad de Chagas. Brussels, Belgium: Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer.

**Edi. C. V., L. Djogbénou, A. M. Jenkins, K. Regna, M. A. T. Muskavitch, R. Poupardin, C. M. Jones, J. Essandoh, G. K. Kétoh, M. J. I. Paine, B. G. Koudou, M. J. Donnelly, H. Ranson y D. Weetman. 2014.** CYP6 P450 enzymes and ACE-1 duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Genet* 10(3): e1004236.

**Ellard, S., R. Charlton, S. Yau, D. Gokhale, G. R. Taylor, A. Wallace, S. C. Ramsden, y I. R. Berry. 2016.** Practice guidelines for Sanger Sequencing Analysis and Interpretation. Association for clinical Genetic Science.

**Elliot, M. 1995.** Chemicals in insect control. pp 3-31. En *Pyrethrum flowers, production, Chemistry, toxicology, and uses*, Casida, J.E. and Quistad, G.B. (eds). Oxford university press, Inc. Oxford.

**Espinoza, N., R. Borrás, y F. Abad Franch. 2014.** Chagas Disease Vector Control in a hyperendemic setting: the First 11 years of intervention in Cochabamba, Bolivia. PLoS Negl Trop Dis 8(4): e2782.

**Espinoza Echeverria, J., A. N. Rodriguez, M. R. Cortez, L. G. Diotaiuti, y D. E. Gorla. 2017.** Spatial and temporal distribution of house infestation by *Triatoma infestans* in the Toro Toro municipality, Potosi, Bolivia. Parasites and Vectors. 10: 1- 8.

**Fabro, J., M. Sterkel, M., N. Capriotti, G.A. Mougabure Cueto, M.D. Germano, R. Rivera Pomar, y S. Ons. 2012.** Identification of a point mutation associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of *Triatoma infestans*, a vector of Chagas disease. Infect. Genet. Evol. 12: 487- 491.

**Feyereisen, R. 2005.** Insect Cytochrome P450. In: Gilbert L, Iatrou K, Gill S, editors. Comprehensive Molecular Insect Science Biochemistry and Molecular Biology: Elsevier. pp. 1–77.

**Ffrench Constant, R. H., P. J. Daborn y G. Le Goff G. 2004.** The genetics and genomics of insecticide resistance. Trends in Genetics 20: 165- 170.

**Glynn Jones, D. 1998.** Piperonyl butoxide- the insecticide synergist. Academic, San Diego, CA.

**Flores Ferrer, A., O. Marcou. E. Waleckx, E. Dumonteil, y S. Gourbière. 2017.** Evolutionary ecology of Chagas disease; what do we know and what do we need? Evol Appl. 00: 1- 18.

**Foster, S. P., S. Young, M. S. Williamson, I. Duce, I. Denholm, y G. J. Devine. 2003.** Analogous pleiotropic effects of insecticide resistance genotypes in peach-potato aphids and houseflies. Heredity 91: 98–106.

**Fronza, G., A. C. Toloza, M. I. Picollo, C. Spillmann, y G. A. Mougabure Cueto. 2016.** Geographical variation of deltamethrin susceptibility of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Argentina with emphasis on a resistant focus in the Gran Chaco. J. Med. Entomol. 53: 880- 887.

**Gaspe, M. S., Y. M. Provecho, M. V. Cardinal, M. P. Fernández, y R. E. Gürtler. 2015.** Ecological and sociodemographic determinants of house infestation by *Triatoma infestans* in indigenous communities of the Argentine Chaco. PLoS Negl. Trop. Dis. 9: 1- 26.

**Gaspe, M. S., Y. M. Provecho, M. P. Fernández, C. V. Vassena, P. L. Santo Orihuela, R. E. Gürtler. 2018.** Beating the odds: Sustained Chagas disease vector

control in remote indigenous communities of the Argentine Chaco over a seven-year period. PLoS Negl Trop Dis 12(10): e0006804.

**Germano, M.D., G. Roca Acevedo, G.A. Mougabure Cueto, A.C Toloza, C.V. Vassena, y M.I. Picollo. 2010.** New findings of insecticide resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from the Gran Chaco. J. Med. Entomol. 47: 1077-1081.

**Germano, M.D., P. Santo Orihuela, G. Roca Acevedo, A.C. Toloza, C.V. Vassena, M.I. Picollo, y G.A. Mougabure Cueto. 2012.** Scientific evidence of three different insecticide-resistant profiles in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina and Bolivia. J. Med. Entomol. 49: 1355- 1360.

**Germano, M.D., M.I. Picollo, y G.A. Mougabure-Cueto. 2013.** Microgeographical study of insecticide resistance in *Triatoma infestans* from Argentina. Acta Trop. 128: 561- 565.

**Germano, M.D., M.I. Picollo, C. Spillmann, y G.A. Mougabure Cueto. 2014.** Fenitrothion: an alternative insecticide for the control of deltamethrin-resistant populations of *Triatoma infestans* in Northern Argentina. Med. Vet. Entomol. 28: 21- 25.

**Glunt, K. D., J. I. Blanford, y K. P. Paaijmans. 2013.** Chemicals, climate, and control: increasing the effectiveness of malaria vector control tools by considering relevant temperatures. PLOS Pathog 9(10): e1003602.

**Glunt, K. D., K. P. Paaijmans, A. F. Read, y M. B. Thomas. 2014.** Environmental temperatures significantly change the impact of insecticides measured using WHOPES protocols. 1- 11. Malaria Journal 13:350

**González Audino, P., C. Vassena, S. Barrios, E. Zerba, y M. I. Picollo. 2004.** Role of enhanced detoxication in a deltamethrin-resistant population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99:335-339.

**Gorla, D. E. 2002.** Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). Ecol. Austral. 12: 117–127.

**Gorla, D.E., y F. Noireau. 2010.** Geographic distribution of triatominae vectors in America, pp. 209- 231. In M. Tybairenc and J. Telleria (eds.), American Trypanosomiasis Chagas Disease. Elsevier, España.

**Gressel, J. 2011.** Low pesticide rates may hasten the evolution of resistance by increasing mutation frequencies. *Pest Manag. Sci.* 67: 253-257.

**Grosso, C. G., M. J. Blariza, G. Mougabure Cueto, M. I. Picollo MI, y B. A. García. 2016.** Identification of three cytochrome P450 genes in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans*: Expression analysis in deltamethrin susceptible and resistant populations. *Infect Genet Evol.* 44: 459- 470.

**Gurevitz, J.M., L. A. Ceballos, M. S. Gaspe, J. A. Alvarado Otegui, G. F. Enriquez, U. Kitron, R. E. Gürtler. 2011.** Factors affecting infestation by *Triatoma infestans* in a rural area of the humid Chaco in Argentina. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1365.

**Gurevitz, J. M., M. S. Gaspe, G. F. Enríquez, C. V. Vassena, J. A. Alvarado-Otegui, Y. M. Provecho, G. A. Mougabure- Cueto, M. I. Picollo, U. Kitron, y R. E. Gürtler 2012.** Unexpected failures to control Chagas disease vectors with pyrethroid spraying in Northern Argentina. *J Med Entomol.* 49: 1379- 1386

**Gurevitz, J. M., M. S. Gaspe, G. F. Enriquez, Y. M. Provecho, U. Kitron, y R. E. Gürtler. 2013.** Intensified surveillance and insecticide-based control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in the Argentinean Chaco. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: e2158.

**Gürtler, R. E., J. E. Cohen, M. C. Cecere, y R. Chuit. 1997.** Shifting host choices of the vector of Chagas disease, *Triatoma infestans*, in relation to the availability of host in houses in North- West Argentina. *Journal of Applied Ecology* 34: 699- 715.

**Gürtler, R. E, D. M. Canale, C. Spillmann, R. Stariolo, O. D. Salomón, S. Blanco, y E. L. Segura. 2004.** Effectiveness of residual spraying with deltamethrin and permethrin on peridomestic populations of *Triatoma infestans* in rural western Argentina: a district-wide randomized trial. *Bull World Health Organ.* 82:196-205.

**Gürtler, R. E., U. Kitron, M. C. Cecere, E. L. Segura, and J. E. Cohen. 2007.** Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 16194-16199.

**Gürtler, R. E. 2007.** Eco- epidemiología regional de la transmisión vectorial: enfermedad de Chagas en el Gran Chaco. En: La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. Organización Panamericana de la Salud y Mundo Sano, Publicación Monográfica 7, OPS/CF/426-06.



**Gürtler, R. E. 2009.** Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: current challenges and possible approaches. Mem. Inst Oswaldo Cruz. 104 (Supl. I): 52-59.

**Harwood, A. D., J. You, y M. J. Lydy. 2009.** Temperature as a toxicity identification evaluation tool for pyrethroid insecticides: toxicokinetic confirmation. Environ Toxicol Chem 28: 1051–1058.

**Hernández, M. L., J. P. Dujardin, D. E. Gorla, y S. S. Catalá. 2013.** Potential sources of *Triatoma infestans* reinfesting peridomiciles identified by morphological characterization in Los Llanos, La Rioja, Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 108: 91–97.

**Hewlett, P.S. y R. L. Plackett. 1979.** The Interpretation of quantal responses in Biology, University Park Press, Baltimore, 82pp.

**Hijmans, R., S. Cameron, J. Parra, P. Jones, y A. Jarvis A. 2005.** Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. Int. J. Climatol. 25: 1965–1978.

**Hodgson, E. y P. E. Levi. 1998.** Interactions of piperonyl butoxide with cytochrome P450. In: Jones DG. Piperonyl butoxide the insecticide synergist. London: Academic Press p. 41-53.

**Hung, C., y H. Sun. 1989.** Microsomal monooxygenase in diamond-back moth larvae resistant to fenvalerate and piperonyl butoxide. Pestic. Biochem. Physiol. 33: 168-175.

**Huang, J., M. Kristensen, C. L. Qiao, y J. B. Jespersen. 2004.** Frequency of *kdr* gene in house fly field populations: correlation of pyrethroid resistance and *kdr* frequency. Journal of Economic Entomology. 97(3): 1036–41.

**Ibrahim, S. S., J. Riveron, R. Stott, H. Irving, y C. Wondji. 2015.** The cytochrome P450 CYP6P4 is responsible for the high pyrethroid resistance in knockdown resistance-free *Anopheles arabiensis*. Insect. Biochem. Mol. Biol. 68: 23–32.

**Jackson, Y., A. Pinto, A., y S. Pett. 2014.** Chagas disease in Australia and New Zealand: Risks and needs for public health interventions. Tropical Medicine & International Health. 19(2): 212–218.

**Karatolos, N., K. Gorman, M. S. Williamson, y I. Denholm. 2012.** Mutations in the sodium channel associated with pyrethroid resistance in the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. Pest Manag Sci 68: 834–838.

**Kasai, S., I. S. Weerasinghe y T. Shono. 1998.** P450 monooxygenases are an important mechanism of permethrin resistance in *Culex quinquefasciatus* Say larvae. Arch. Insect Biochem. Physiol. 37: 47- 56.

**Kasai, S., I. S. Weerasinghe, T. Shono y M. Yamakawa. 2000.** Molecular cloning, nucleotide sequence and gene expression of a cytochrome P450 (CYP6F1) from the pyrethroid- resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. Insect Biochem. Mol. Biol. 30: 163- 171.

**Khan, H. A. A., y W. Akram. 2014.** The effect of temperature on the toxicity of insecticides against *Musca domestica* L.: implications for the effective management of Diarrhea. PLoS ONE 9(4): e95636.

**Lardeux, F., S. Depickère, S. Duchon, y T. Chavez. 2010.** Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. Trop. Med. Int. Health 15: 1037–1048.

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

**Lazzari, C. R., M. H. Pereira y M. G. Lorenzo. 2013.** Behavioural biology of Chagas disease vectors. Mem Inst Oswaldo Cruz. 108 (Supl. I): 34-47.

**Legendre, P. 1993.** Spatial autocorrelation: trouble or a new paradigm? Ecology. 74: 1659- 1673.

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

**Li, X., M. A. Schuler, y M. R. Berenbaum. 2007.** Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. Annual review of entomology. 52: 231-253.

**Lichfield, J.T., y F.J. Wilcoxon. 1949.** A simplified method of evaluating dose–effect experiments. J. Exp. Ther. 96: 99–100.

**Mamidala, P., S. C. Jones, y O. Mittapalli. 2011.** Metabolic resistance in bed bugs. Insects 2: 36–48.

**Maza, Y., G. Fronza, S. Wasilewski, P. Lobbia, D. Weinberg, M. Fabiani, C. Remón, M. Abril, G.A Mougabure Cueto, y P. Sartor. 2018.** Identification and characterization of resistance to Deltamethrin in triatomine bugs from rural houses of Pampa Argentina, Chaco Province, Argentina. American Society of Tropical Medicine

and Hygiene Annual Meeting. Octubre 2018. New Orleans, Louisiana, USA. Comunicación formato póster.

**Liu, N., y J. G. Scott. 1998.** Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in house fly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 531-535.

**McKenzie, J.A., 1996.** Ecological and Evolutionary Aspects of Insecticide Resistance. R.G. Landes Company, Academic Press, Austin, Texas.

**Morin, S., M. S. Williamson, S. J. Goodson, J. K. Brown, B. E. Tabashnik, y T. J. Dennehy. 2002.** Mutations in the *Bemisia tabaci* para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochem Mol Biol.* 32: 1781–1791.

**Mougabure Cueto, G.A., y M.I. Picollo. 2015.** Insecticide resistance in vector Chagas disease: Evolution, mechanisms and management. *Acta Tropica* 149: 70–85.

**Mougabure Cueto, G.A., y V. Sfara. 2016.** The analysis of dose-response curve from bioassays with quantal response: Deterministic or statistical approaches? *Toxicology Letters* 248: 46–51.

**Müller, P., E. Warr, B. J. Stevenson, P. M. Pignatelli, J. C. Morgan JC, A. Steven, A. E. Yawson, S. N. Mitchell, H. Ranson, J. Hemingway, M. J. I. Paine, y M. J. Donnelly. 2008.** Field caught permethrin- resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genet* 4: e1000286.

**Muturi. E. J., R. Lampman, K. Costanzo, y B. W. Alto. 2011.** Effect of temperature and insecticide stress on life-history traits of *Culex restuans* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 48: 243–250.

**Naumann, K. 1990.** Synthetic pyrethroid insecticide. In: W. S. Bowers, W. Ebing, D.Martin and R Wegler (Eds.); Chemistry of plant protection, Val. 4. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

**Noireau, F., R. Flores R, T. Gutiérrez, F. Abad Franch, E. Flores E, y F. Vargas. 2000.** Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 23–27.

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

[OMS] **Organización Mundial de la Salud. 1994.** Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre triatominos. Acta Toxicológica Argentina 2: 29- 32.

[OMS] **Organización Mundial de la Salud. 2000.** Control of Chagas Disease. Brasilia, Brazil: World Health Organization, WHO technical report series number 905 WHO technical report series number 905. pp 1–109.

[OMS] **Organización Mundial de la Salud. 2002.** WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease (2000: Brasilia, Brazil) Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. WHO technical report series; 905, Geneva. Pp: 99.

[OMS] **Organización Mundial de la Salud. 2006.** Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance, 6th ed., WHO, Geneva. Pp: 64-66.

[OMS] **Organización Mundial de la Salud. 2007.** Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico. OMS-TDR/GTC/09. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.

[OMS] **Organización Mundial de la Salud. 2018.** Chagas disease (American trypanosomiasis). World Health Organization Fact sheets, 2018.

**Oppenoorth, F. J. 1985.** Biochemistry and genetics of insecticide resistance. pp 731-773. En Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. G.A. Kerkut and C.I. Gilbert (eds), vol 12: Insect control. Pergamon Press.

**Ortiz Hernández, M. L., E. Sánchez Salinas, E. Dantán González, y M. L. Castrejón Godínez. 2013.** Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process. En Biodegradation - Life of Science (pp. 251-287).

**Pedrini, N., R. Crespo, y M. P. Juárez. 2007.** Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 146:124-137.

**Pedrini, N., S. J. Mijailovsky, J. R. Girotti, R. Stariolo, R. M. Cardozo, A. Gentile, y M. P. Juárez. 2009.** Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. PLoS Neglected Tropical Diseases 3:e434.

**Pérez de Rosas, A., E. Segura, y B. García. 2007.** Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas disease vector control programmes. Mol. Ecol. 16: 1401–1412.

**Perez- Molina, J., A. Perez- Ayala, P. Parola, Y. Jackson, S. Odolini, y R. Lopez- Velez. 2011.** EuroTravNet: imported Chagas disease in nine European countries, 2008 to 2009. Chagas Disease in Europe, 52.

**Perry, S. A., I. Yamamoto, I. Ishaaya, y R. Y. Perry. 1998.** Insecticides in Agriculture and environment: retrospect and prospects. Springer Berlin Heidelberg. Pp: 261.

**Piccinali, R.V., P.L. Marcet, F. Noireau, U. Kitron, y R.E. Gürtler. 2009.** Molecular population genetics and phylogeography of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in South America. J. Med. Entomol. 46: 796–809.

**Piccinali, R. V, M. W. Gaunt, y R. E. Gürtler. 2018.** A microsatellite-based analysis of house infestation with *Triatoma Infestans* (Hemiptera: Reduviidae) after insecticide spraying in the Argentine Chaco. J. Med. Entomol. 55(3):609-619.

**Piccolo de Villar, M.I., E.N. Zerba, E. Wood, y S.A. Licastro. 1979.** Neurogenesis and occurrence of cholinesterase in eggs of *Triatoma infestans*. Comp. Biochem. Physiol. 65: 65- 70.

**Piccolo, M.I., E.J. Wood, E.N. Zerba, S.A. Licastro, y M.A. Rúveda. 1976.** Métodos de laboratorio para medir la toxicidad de insecticidas en *Triatoma infestans*, Klug. Acta Bioquim. Latinoam., Buenos Aires, Argentina 10: 67–70.

**Piccolo, M.I., C.V. Vassena, P. Santo Orihuela, S. Barrios, M. Zaidemberg, y E.N. Zerba. 2005.** High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective fieldtreatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. J. Med. Entomol. 42: 637–642.

**Pinto Dias, J. C. 2007.** Enfermedad de Chagas: Las etapas recorridas y las perspectivas futuras. En: La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. Organización Panamericana de la Salud y Mundo Sano, Publicación Monográfica 7, OPS/CF/426-06.

**Pizarro, J.C., L.M. Gilligan, y L. Stevens. 2008.** Microsatellites reveal a high population structure in *Triatoma infestans* from Chuquisaca, Bolivia. PLoS Negl. Trop. Dis. 2, e202.

**Porcasi, X., S.S. Catalá, H. Hrellac, M.C. Scavuzzo, y D.E. Gorla. 2006.** Infestation of rural houses by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in southern area of Gran Chaco in Argentina. J Med. Entomol. 43: 1060-1067.

**Pridgeon, J. W., L. Zhang y N. Liu. 2003.** Overexpression of CYP4G19 associated with a pyrethroid-resistant strain of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Gene* 314: 157- 163.

**Reimer, L., E. Fondjo, S. Patchoké, B. Diallo, Y. Lee, A. Ng, H.M. Ndjemai, J. Atangana, S.F. Traore, G. Lanzaro, y A.J. Cornel. 2008.** Relationship between *kdr* mutation and resistance to pyrethroid and DDT insecticides in natural populations of *Anopheles gambiae*. *J. Med. Entomol.* 45(2): 260- 266.

**Riveron, J. M., H. Irving, M. Ndula, K. G. Barnes, S. S. Ibrahim, M. J. Paine y C. S. Wondji. 2013.** Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 252–257.

**Robertson, J. L., y H. K. Preisler. 1992.** Pesticide bioassays with arthropods, CRC Press, Boca Ratón, FL, Estados Unidos de Norteamérica.

**Robertson J.L., R.M. Russell, H.K. Preisler, y N.E. Savin. 2007a.** Bioassays with arthropods, 2nd ed. CRC, Boca Raton, FL.

**Robertson, J. L., H. K. Preisler, y R. M. Russell 2007b.** Polo Plus, probit and logit analysis: user's guide, version 2.0. LeOra Software.

**Roca Acevedo, G., G. A. M. Cueto, M. Germano, P. S. Orihuela, M. R. Cortez, F. Noireau, M. I. Picollo, y C. Vassena. 2011.** Susceptibility of sylvatic *Triatoma infestans* from Andean valleys of Bolivia to deltamethrin and fipronil. *J. Med. Entomol.* 48:828- 835.

**Roca Acevedo, G., M. I. Picollo, y P. Santo Orihuela 2013.** Evolution of insecticide resistance during the embryonic development of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 50(4):816-818.

**Roca Acevedo, G., M.I. Picollo, N. Capriotti, I. Sierra, y P.L. Santo Orihuela. 2015.** Examining mechanism of pyrethroid resistance in eggs of two populations of the Chaga's disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* 52(5): 987- 1002.

**Rodríguez, M., T. Marques, D. Bosch, y J. Avilla. 2011.** Assessment of insecticide resistance in eggs and neonate larvae of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 100(2): 151-159.

**Rojas Cortez, M., P. Azambuja, E. S. Garcia, C. Brasilero, y M. Salabert. 2007.** Fisiología de triatomíneos y su relación con el desarrollo de *Tripanosoma cruzi*, en:

“Triatominos de Bolivia y la enfermedad de Chagas”. Ministerio de Salud y Deportes, Programa Nacional de Chagas, Bolivia, pp: 25- 43.

**Rolandi, C., y P. E. Schilman. 2018.** The costs of living in a thermal fluctuating environment for the tropical haematophagous bug, *Rhodnius prolixus*. J. Therm. Biol. 74: 92–99.

**Romero, A., M. F. Potter, y K. F. Haynes. 2009.** Evaluation of piperonyl butoxide as a deltamethrin synergist for pyrethroid- resistant bed bugs. J. Econ. Entomol. 102: 2310–2315.

**Roush, R. T., y J. C. Daly. 1990.** The role of population genetics in resistance research and management, pp. 97-152. En R. T. Roush and B. E. Tabashnik (eds.), Pesticide resistance in arthropods. Chapman and Hall, New York.

**Ru, L., C. Wei, J. Z. Zhao y A. Liu 1998.** Differences in resistance to fenvalerate and cyhalothrin and inheritance of knockdown resistance to fenvalerate in *Helicoverpa armigera*. Pesticide Biochemistry and Physiology 61:79-85.

**Ruigt, G. S. F. 1985.** Pyrethroids. In Kerkut GA, Gilbert LI (eds): Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol.12, Oxford: Pergamon, pp 183–262.

**Sanmartino, M. 2006.** Faire face à la maladie de Chagas en partant des conceptions des populations concernées. [Thèse doctorale]. Genève: Université de Genève, Faculté de Psychologie et Sciences de l'Éducation. [disponible en: <http://archive-ouverte.unige.ch/vital/access/manager/Repository/unige:381>]

**Santo Orihuela, P. L., C. V. Vassena, E. N. Zerba, y M. I. Picollo. 2008.** Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. J. Med. Entomol. 45:298-306.

**Santo Orihuela, P. L., G. Carvajal, M. I. Picollo, M. I. y C. V. Vassena. 2013.** Toxicological and biochemical analysis of the susceptibility of sylvatic *Triatoma infestans* from the Andean Valley of Bolivia to organophosphate insecticide. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 108(6): 790-5.

**Santo Orihuela, P., C. V. Vassena, G. Guillermo Carvajal, E. Clark, S. Menacho, R. Bozo, R. H. Gilman, C. B. Bern, y P. L. Marcet. 2017.** Toxicological, enzymatic, and molecular assessment of the insecticide susceptibility profile of *Triatoma*

*infestans* (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae) populations from rural communities of Santa Cruz, Bolivia. J Med Entomol. 54(1): 187–195.

**Schama, R., N. Pedrini, M. P. Juárez, D. R. Nelson, A. Q. Torres, D. Valle, y R. D. Mesquita. 2016.** *Rhodnius prolixus* supergene families of enzymes potentially associated with insecticide resistance. Insect Biochem. Mol. Biol. 69: 91–104.

**Schipper, H., B. M. McClarty, K. E. McRuer, R. A. Nash, y C. J. Penney. 1980.** Tropical diseases encountered in Canada: 1. Chagas' disease. Canadian Medical Association Journal. 122(2): 165–172.

**Schofield, C. J. 1988.** The biosystematics of the Triatominae. In: Service, M.V. (Ed.), Biosystematics of Haematophagous Insects. Clarendon Press, Oxford, pp. 284–312.

**Schofield, C. J. 1994.** Triatominae: Biología y control”, Euro-Communications Publications, West Sussex. pp. 20-29.

**Scott, J. G. 1995.** Effects of temperature on insecticides toxicity, 111–135. In R. M. Roe and R. J. Kuhr (eds), Reviews in pesticide toxicology, vol. 3. Toxicology Communications Inc., Raleigh, NC.

**Segura, E. L., E. N. Cura, S. Sosa Estani, J. Andrade; J. C. Lansetti, A. M. de Rissio. 2000.** Long-term effects of a nationwide control program on the seropositivity for *Trypanosoma cruzi* infection in young men from Argentina. Am J Trop Med Hyg. 62: 353–36

**Segura, E. L. 2002.** El control de la enfermedad de Chagas en la República Argentina. En: Silveira AC et al., editores. El control de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América. Historia de una iniciativa internacional. 1991/2001. Uberaba: Facultad de Medicina do Triangulo Mineiro. P. 45-108

**Segura, E. L., A. G. Torres, O. Fusco, y A. García. 2009.** Mitochondrial 16S DNA variation in populations of *Triatoma infestans* from Argentina. Med. and Vet. Entomol. 23: 34- 40.

**Sierra, I., N. Capriotti, G. Fronza, G. Mougabure Cueto, y S. Ons. 2016.** Kdr mutations in *Triatoma infestans* from the Gran Chaco are distributed in two differentiated foci: implications for pyrethroid resistance management. Acta Trop. 158: 208–213.

**Silveira, A. C. 2002.** O controle da doença de Chagas no Brasil. En: El control de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América, historia de una iniciativa



internacional. 1991/2001. Uberaba, MG: OPAS/OMS, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. Pp: 146-250.

**Soderlund, D.M y J. R. Bloomquist. 1990.** Molecular Mechanisms of insecticide resistance. pp 58-97. En Pesticide resistance in arthropods, Roush R.T. and Tabashnik B.E (eds). Chapman and Hall. New York and London.

**Soderlund, D. 1995.** Mode of action of pyrethrins and pyrethroids. pp 217-232. En Pyrethrum flowers, production, Chemistry, toxicology, and uses, Casida, JI). and Quistad, G.B. (eds). Oxford university press, Inc. Oxford.

**Soderlund, D. M. y D. C. Knipple. 2003.** The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 33(6): 563–577.

**Soderlund, D. M., y D. C. Knipple. 2008.** The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect Biochem. Mol. Biol. 33: 563- 577.

**Soderlund, D. M. 2008.** Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. Pest Manag Sci. 64: 610-616.

**Sotelo, N. S., A. R. Fabre, M. Galván, y J. M. Alonso. 2004.** Enfermedad de Chagas: Situación actual en comunidades aborígenes de Chaco y Formosa. Com Cient y Tecnol Universidad Nacional del Nordeste. pp 45-7.

**Stenersen, J. 2004.** Chemical pesticides. Mode of action and toxicology. CRC Press, Boca Raton, EEUU.

**Stevenson, B. J., J. Bibby, P. Pignatelli, S. Muangnoicharoen, P. M. O'Neill, L.Y. Lian, P. Müller, D. Nikou, A. Steven, J. Hemingway. M. J. Sutcliffe y M. J. Paine. 2011.** Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: sequential metabolism of deltamethrin revealed. Insect Biochem Mol Biol. 41: 492–502.

**Tabashnik, B.E. 1989.** Managing resistance with multiple pesticide tactics: theory, evidence and recommendations. J. Econ. Entomol. 82: 1263- 1269.

**Tatebayashi, H. y T. Narahashi. 1994.** Differential mechanism of action of the pyrethroid tetramethrin on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxinresistant sodium channels. J Pharmacol Exp Ther 270: 595– 603.

**The Nature Conservancy. 2005.** Evaluación ecorregional del Gran Chaco Americano. Reporte técnico. [www.vidasilvestre.org.ar/bosques/resultados.asp](http://www.vidasilvestre.org.ar/bosques/resultados.asp)

**Toloz, A. C., M. D. Germano, G. A. Mougabure Cueto, C. V. Vassena, E. N. Zerba, y M. I. Picollo. 2008.** Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. J. Med. Entomol. 45: 421–426.

**Toloz, A.C., M. Asuncion, D. Reed, y M.I. Picollo. 2014.** Geographical distribution of pyrethroid resistance allele frequency in head lice (*Pediculus humanus capitis*) from Argentina. J. Med. Entomol. 51: 139-144.

**Traverso, L., A. Lavore, I. Sierra, V. Palacio, J. Martinez Barnetche, J. M. Latorre Estivalis, G. Mougabure Cueto, F. Francini, M. G. Lorenzo, M. H. Rodríguez, S. Ons, y R. V. Rivera Pomar. 2017.** Comparative and functional triatomine genomics reveals reductions and expansions in insecticide resistance-related gene families. PLoS Neglected Tropical Diseases. 11(2): 1–25.

**Tyler, K. M., y D. M. Engman. 2001.** The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int. J. Parasitol. 31: 472- 481.

**Usherwood, P. N., T. G. Davies, I. R. Mellor, A. O. O'reilly, F. Peng, H. Vais, B. P. Khambay, L. M. Field, y M. S. Williamson. 2007.** Mutations in DIIS5 and the DIIS4-S5 linker of *Drosophila melanogaster* sodium channel define binding domains for pyrethroids and DDT. FEBS lett. 581: 5485– 5492.

**van Dongen, S., T. Backeljau, E. Matthysen, y A. A. Dhondt. 1998.** Genetic population structure of the winter moth (*Operophtera brumata* L.) (Lepidoptera, Geometridae) in a fragmented landscape. Heredity (Edinb). 80: 92–100.

**Vassena, C. V., M. I. Picollo, y E. N. Zerba. 2000.** Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. Med. Vet. Entomol. 14: 51–55.

**Vassena, C. y M. I. Picollo. 2003.** Monitoreo de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, insectos vectores de la Enfermedad de Chagas. RETEL : Revista de Toxicología en Línea. 3.

**Vassena, C., M. I. Picollo, P. Santo Orihuela, y E. Zerba. 2007.** Desarrollo y manejo de la resistencia a insecticidas piretroides en *Triatoma infestans*: situación en Bolivia, Triatomíneos de Bolivia y la enfermedad de Chagas p. 229 - 255

**Vazquez Prokopec, G. M., L. A. Ceballos, M. C. Cecere, y R. E. Gürtler. 2002.** Seasonal variations of microclimatic conditions in domestic and peridomestic habitats of *Triatoma infestans* in rural northwest Argentina. Acta Trop. 84: 229–238.

**Vazquez Prokopec, G. M., L. Ceballos, U. Kitron, y R. E. Gürtler 2004.** Active dispersal of natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in rural northwestern Argentina. J. Med. Entomol. 41:614-621.

**Vazquez Prokopec, G.M., C. Spillmann, M. Zaidenberg, M. Kitron, y R.E. Gürtler. 2009.** Cost-effectiveness of vector control strategies against *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. PLoS Negl Trop Dis. 3:e363.

**Venables, W. N., y B. D. Ripley. 2002.** Modern Applied Statistics with S, 4th ed. Springer, NY.

**Waleckx, E., S. Gourbière, y E. Dumonteil. 2015.** Intrusive versus domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against Chagas disease. Mem. Oswaldo Cruz. 110(3): 324–338. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140409>

**Wisnivesky Colli, C., R. E. Gürtler, N. Solarz, D. Salomón, y A. Ruiz 1982.** Feeding patterns of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in relation to transmission of American Trypanosomiasis in Argentina. J. Med. Entomol. 19: 645-654.

**Wondji, C. S., H. Irving, J. Morgan, N. F. Lobo, F. H. Collins, R. H. Hunt, M. Coetzee, J. Hemingway, y H. Ranson. 2009.** Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. Genome research. 19(3): 452-9.

**Wu, D., M. E. Scharf, J. J. Neal, D. R. Suiter, y G. W. Bennett. 1998.** Mechanisms of fenvalerate resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). Pestic. Biochem. Physiol. 61: 53- 62.

**Yoon, K. S., D. H. Kwon, J. P. Strycharz, C. S. Hollingsworth, S. H. Lee Sh, y J. M. Clark 2008.** Biochemical and molecular analysis of deltamethrin resistance in the common bed bug (Hemiptera: Cimicidae). J. Med. Entomol. 45: 1092–1101.

**Zaidenberg, M. 2012.** Evolución de la infestación en un área de triatomíneos resistentes a piretroides, Salvador Mazza, Salta, Argentina. Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes I Volumen VII, N° 3.

**Zerba, E., E. Wood, F. Melgar, D. Balzán, S. A. De Licastro, M. I. P. Villar, N. C. De Malkenson, A. Fontán, S. Segovia, N. V. De Arguello, L. Madohery, L. Chary, y G. Lopez. 1989.** Ensayo de campo para la evaluación del pote fumígeno CIPEIN-PF3 en el control del *Triatoma infestans*. Chagas 5: 19-28.

**Zerba, E.N. 1999.** Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. Medicina 59: 41- 46.

**Zhang, L. X. Gao y Xiwu, y P. Liang. 2007.** Beta-cypermethrin resistance associated with high carboxylesterase activities in a strain of house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 89(1): 65-72.

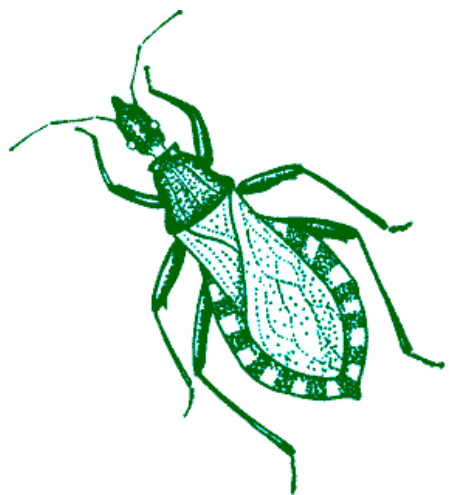
**Zhu, Y. C. y G. L. Snodgrass. 2003.** Cytochrome P450 CYP6X1 cDNAs and mRNA expression levels in three strains of the tarnished plant bug *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae) having different susceptibilities to pyrethroid insecticide. *Insect Mol. Biol.* 12: 39- 49.

**Zhu, F., J. Wigginton, A. Romero, A. Moore, K. Ferguson, R. Palli, M.F. Potter, K.F. Haynes, y S.R. Palli. 2010.** Widespread distribution of knockdown resistance mutations in the bed bug, *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae), populations in the United States. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 73: 245–257.

**Zlotkin, E. 1999.** The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Ann. Rev. Entomol.* 44: 429-455.

**Zuur, A. F., E. N. Ieno, N. J. Walker, A. A. Saveliev, y G. M. Smith. 2009.** Mixed effects models and extensions in Ecology with R. Springer, New York.

**Zuur, A. F., E. N. Ieno, y C. S. Elphick. 2010.** A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods Ecol. Evol.* 1: 3–14.



## **PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO DE TESIS**

# PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

---

**Fronza, G., A. C. Toloza, M. I. Picollo, C. Spillmann y G. A. Mougabure-Cueto. 2016.** Geographical variation of deltamethrin susceptibility of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Argentina with emphasis on a resistant focus in the Gran Chaco. J. Med. Entomol. 53: 880–887.

**Sierra, I., N. Capriotti, G. Fronza, G. Mougabure-Cueto, y S. Ons. 2016.** *Kdr* mutations in *Triatoma infestans* from the Gran Chaco are distributed in two differentiated foci: implications for pyrethroid resistance management. Acta Trop. 158: 208–213.

**Fronza, G., A. C. Toloza, M. I. Picollo, A. Carbajo y G. A. Mougabure-Cueto.** Modelling the association between deltamethrin resistance in *Triatoma infestans* populations of the Argentinian Gran Chaco region with environmental factors. ACTROP\_2018\_1361. Aceptado con correcciones menores.