



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**TRABAJO DE TESIS DOCTORAL**

**Búsqueda de nuevos fármacos anti *Triatoma infestans*  
para controlar la enfermedad de Chagas**

**Autor: Lic. Martín Miguel Dadé**

**Dirección de Tesis: Prof. Dra. Olga Nora Mestorino  
Co-dirección de Tesis: Prof. Dr. Flavio Francini**

Lugar de trabajo: Laboratorio de Estudios Farmacológicos y  
Toxicológicos –LEFyT- Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad  
Nacional de La Plata

**Jurado de la Tesis: Prof. Dra. Silvia González Ayala  
Prof. Dr. Jorge Ronderos  
Prof. Dr. Ricardo Gelpi**

*A mi hija, Antonia*

# Nova tripanozomíaze humana.

Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp.,  
agente etiológico de nova entidade morbida do homem

pelo

**Dr. Carlos Chagas,**

Assistente.

(Estampas 9 a 13 e 10 figuras no texto)

*“El futuro es nuestro, por prepotencia de trabajo. Crearemos nuestra literatura, no conversando continuamente de literatura, sino escribiendo en orgullosa soledad libros que encierran la violencia de un «cross» a la mandíbula. Sí, un libro tras otro, y «que los eunucos bufen»”.*

(Prólogo a *Los lanzallamas*)

**Roberto Arlt**

*Ahí está:*

*No demasiadas resacas  
No demasiadas peleas con mujeres  
No demasiados neumáticos desinflados  
Nunca pensó en el suicidio  
No más de tres dolores de muelas  
Nunca se saltó una comida  
Nunca estuvo encarcelado  
Nunca estuvo enamorado  
7 pares de zapatos  
un hijo en la universidad  
un coche que no tiene más que un año  
pólizas de seguros  
un césped muy verde  
cubos de basura con tapa hermética*

*seguro que lo eligen.*

(El rostro de un candidato político en una valla  
publicitaria) **Charles Bukowski**

# Índice

<b>Índice</b> .....	<b>4</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>11</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>14</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>18</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>22</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>24</b>
<b>Indice de tablas</b> .....	<b>29</b>
<b>Capítulo I</b> .....	<b>34</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>35</b>
1.1 La enfermedad de Chagas y su problemática .....	35
1.2 Historia y estado actual de la problemática de la enfermedad de Chagas en la región .....	36
1.3 Ciclo biológico de la enfermedad de Chagas .....	40
1.3.1 Un parásito, un vector y un hospedador .....	40
1.3.1.1 Mecanismo de transmisión.....	41
1.3.1.2 Etapas clínicas de la enfermedad.....	44
1.3.1.3 Diagnóstico.....	45
1.3.1.4 Tratamiento antiparasitario .....	46
1.4 Triatomíneos .....	47
1.4.1 Taxonomía.....	47
1.4.2 Características generales .....	48
1.4.3 <i>Triatoma infestans</i> .....	50
1.5 Control vectorial .....	51
1.5.1 Proceso de control vectorial .....	51
1.5.2 Limitaciones al uso de piretroides como único medio para controlar a los principales vectores de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	52
1.6 Estrategias alternativas al rociado con piretroides para el control de triatomíneos .	53

1.6.1 Xenointoxicación .....	53
1.6.2 Pinturas con insecticidas .....	54
1.6.3 Bioinsecticidas .....	55
1.6.4 Virus .....	55
1.7 Insecticidas .....	56
1.7.1 Definición y características generales .....	56
1.7.2 Fundamento de la elección de los principios químicos evaluados en esta Tesis .....	57
1.7.2.1 Piretroides .....	58
1.7.2.2 Lactonas macrocíclicas .....	61
1.7.2.3 Imidacloprid .....	65
1.7.2.4 Fipronil .....	66
<b>Hipótesis .....</b>	<b>68</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>70</b>
Objetivo principal .....	71
Objetivos específicos .....	71
<b>Capítulo II .....</b>	<b>73</b>
<b>Estudio de la actividad, en condiciones de laboratorio, de ivermectina, doramectina, eprinomectina, imidacloprid y fipronil sobre ninfas de <i>T. infestans</i> .....</b>	<b>74</b>
<b>2.1 Introducción .....</b>	<b>74</b>
<b>2.2 Materiales y métodos .....</b>	<b>75</b>
2.2.1 Principios activos .....	75
2.2.2 Animales experimentales .....	75
2.2.3 Determinación de la DL <sub>50</sub> en ninfas de I y V estadio de <i>T. infestans</i> en estado de ayuno .....	76
2.2.4 Determinación de la DL <sub>50</sub> en ninfas de I y V estadio de <i>T. infestans</i> en estado de alimentación a repleción .....	77
2.2.5 Determinación de la CL <sub>50</sub> en ninfas de I y V estadio de <i>T. infestans</i> en estado de ayuno y alimentadas a repleción .....	79
2.2.6 Determinación de la CL <sub>50</sub> de IVM, DRM, EPR, fipronil e imidacloprid administrados por vía oral en ninfas de V estadio de <i>T. infestans</i> .....	82

2.2.6.1 Técnica de alimentación .....	83
2.2.7 Estudio de la actividad repelente de IVM, DRM, EPR, fipronil e imidacloprid sobre ninfas de I y V estadio de <i>T. infestans</i> .....	84
2.2.8 Análisis estadístico .....	86
<b>2.3 Resultados .....</b>	<b>88</b>
2.3.1 DL <sub>50</sub> .....	88
2.3.2 CL <sub>50</sub> en superficies tratadas .....	102
2.3.3 CL <sub>50</sub> por vía oral .....	123
2.3.4 Actividad repelente .....	127
<b>2.4 Discusión.....</b>	<b>130</b>
<b>2.5 Conclusiones del Capítulo .....</b>	<b>147</b>
<b>Capítulo III.....</b>	<b>149</b>
<b>Ensayos de xenointoxicación utilizando distintos modelos animales .....</b>	<b>150</b>
<b>Sección I .....</b>	<b>150</b>
<b>Estudio de la actividad de ivermectina, doramectina y aprinomectina sobre ninfas de V estadio de <i>T. infestans</i>, postadministración a ratas Wistar .....</b>	<b>150</b>
3.1.1 Introducción .....	150
3.1.2 Materiales y Métodos .....	152
3.1.2.1 Principios activos .....	152
3.1.2.2 Animales experimentales .....	152
3.1.2.2.1 Insectos .....	152
3.1.2.2.2 Ratas Wistar .....	152
3.1.2.2.3 Gallinas.....	153
3.1.2.3 Soluciones endectocidas .....	153
3.1.2.4 Determinación de la actividad letal de IVM, DRM y EPR administrada en ratas Wistar sobre ninfas de V estadio de <i>T. infestans</i> .....	153
3.1.2.5 Determinación del consumo de sangre y volumen de excreciones emitidas por parte de las ninfas de V estadio alimentadas sobre ratas Wistar con diferentes tratamientos (DMSO, IVM, EPR o DRM) .....	155
3.1.2.6 Estudio del estado general de las ninfas sobrevivientes a la alimentación sobre ratas Wistar .....	155

3.1.2.7 Método estadístico .....	156
3.1.2.8 Consideraciones éticas.....	156
<b>3.1.3 Resultados.....</b>	<b>157</b>
<b>3.1.4 Discusión.....</b>	<b>161</b>
<b>3.1.5 Conclusión.....</b>	<b>165</b>
<b>Sección II .....</b>	<b>166</b>
<b>Ensayo de campo utilizando un modelo de perros para medir la actividad sobre <i>T. infestans</i> de productos comerciales conteniendo imidacloprid o fipronil en su formulación .....</b>	<b>166</b>
<b>3.2.1 Introducción .....</b>	<b>166</b>
<b>3.2.2 Materiales y métodos .....</b>	<b>169</b>
3.2.2.1 Principios activos.....	169
3.2.2.2 Animales experimentales.....	169
3.2.2.3 Ensayo de xenointoxicación utilizando perros en condiciones de campo ...	170
3.2.2.4 Estudio de la actividad de dosis subletales de los tres productos comerciales sobre la alimentación y capacidad de producir ecdisis en ninfas de V estadio de <i>T. infestans</i> .....	172
3.2.2.5 Método estadístico .....	173
3.2.2.6 Consideraciones éticas.....	174
<b>3.2.3 Resultados.....</b>	<b>174</b>
3.2.3.1 Consumo de sangre a distintos tiempos postratamiento de los perros con los productos comerciales .....	174
3.2.3.2 Mortalidad en ninfas de V estadio de <i>T. infestans</i> alimentadas sobre perros tratados .....	176
3.2.3.3 Consumo de sangre sobre perros efectuado por ninfas de V estadio de <i>T. infestans</i> muertas postalimentación.....	179
3.2.3.4 Influencia de dosis subletales de PU, AD o FR en el consumo de sangre sobre ratas Wistar y el proceso de ecdisis en ninfas de V estadio de <i>T. infestans</i> .	183
<b>3.2.4 Discusión.....</b>	<b>185</b>
<b>3.2.5 Conclusiones sobre esta sección .....</b>	<b>192</b>
<b>Sección III .....</b>	<b>193</b>

<b>Estudio de la actividad de ivermectina, doramectina y eprinomectina sobre ninfas de V estadio de <i>Triatoma infestans</i>, cuando son administrados a gallinas .....</b>	<b>194</b>
<b>3.3.1 Introducción .....</b>	<b>194</b>
<b>3.3.2 Materiales y métodos .....</b>	<b>196</b>
3.3.2.1 Principios activos .....	196
3.3.2.2 Animales experimentales .....	196
3.3.2.3 Ensayo de xenointoxicación en gallinas.....	197
3.3.2.4 Estudio de la actividad de dosis subletales de IVM, DRM y EPR sobre la alimentación y capacidad de producir ecdisis en ninfas de V estadio de <i>T. infestans</i> .....	198
3.3.2.5 Estudio farmacocinético de IVM, DRM y EPR tras ser administrados a gallinas .....	198
3.3.2.5.1 Procedimiento analítico .....	199
3.3.2.5.2 Análisis farmacocinético .....	200
3.3.2.6 Ensayo de xenointoxicación en condiciones de semicampo .....	201
3.3.2.7 Método estadístico .....	202
3.3.2.8 Consideraciones éticas.....	203
<b>3.3.3 Resultados.....</b>	<b>203</b>
3.3.3.1 Consumo de sangre realizado por las vinchucas alimentadas sobre gallinas tratadas con DRM, EPR e IVM .....	203
3.3.3.2 Mortalidad en ninfas de V estadio de <i>T. infestans</i> alimentadas sobre gallinas tratadas con DRM, EPR, IVM o DMSO.....	205
3.3.3.3 Consumo de sangre sobre gallinas efectuado por ninfas de V estadio de <i>T. infestans</i> muertas postalimentación.....	207
3.3.3.4 Influencia de dosis subletales de IVM, DRM o EPR en el consumo de sangre sobre ratas Wistar y en el proceso de ecdisis en ninfas de V estadio de <i>T. infestans</i> .....	211
3.3.3.5 Comparación triatomicida de IVM, DRM y EPR en condiciones de semicampo .....	214
3.3.3.6 Curvas del perfil cinético seguido por DRM, IVM y EPR tras ser administradas por vía tópica a gallinas.....	216



3.3.3.7 Integración de la información farmacocinética (PK) generada por la curva concentración plasmática vs tiempo, con la información farmacodinámica (PD) generada a partir de la curva de mortalidad de las ninfas de V estadio .....	218
<b>3.3.4 Discusión.....</b>	<b>220</b>
<b>3.3.5 Conclusiones de esta sección .....</b>	<b>230</b>
<b>Capítulo 4.....</b>	<b>231</b>
<b>Estudio del mecanismo de tolerancia al imidacloprid de ninfas de I y V estadio de <i>Triatoma infestans</i>.....</b>	<b>232</b>
<b>4.1 Introducción.....</b>	<b>232</b>
<b>4.2 Materiales y métodos.....</b>	<b>234</b>
4.2.1 Principios activos.....	234
4.2.2 Animales experimentales.....	234
4.2.3 Evaluación del efecto sinergista del PBO y TPP sobre ninfas de I y V estadio de <i>T. infestans</i> susceptibles y resistentes a piretroides en estado de ayuno y alimentadas a repleción .....	234
4.2.4 Calculo de la DE <sub>50</sub> en ninfas de I y V estadio de <i>T. infestans</i> susceptibles y resistentes a piretroides en estado de ayuno y alimentadas a repleción ....	236
4.2.5 Evaluación del efecto sinergista del PBO y TPP sobre las DE <sub>50</sub> del imidacloprid en ninfas de I y V estadio de <i>T. infestans</i> susceptibles y resistentes a piretroides en estado de ayuno y alimentadas a repleción.....	237
4.2.6 Análisis estadístico .....	238
<b>4.3 Resultados .....</b>	<b>238</b>
4.3.1 Evaluación del efecto sinergista del PBO y TPP en ninfas de <i>T. infestans</i> susceptibles y resistentes a piretroides en estado de ayuno y alimentadas a repleción.....	238
4.3.2 Evaluación del efecto sinergista del PBO y TPP en la recuperación de ninfas expuestas a dosis subletales de imidacloprid .....	242
<b>4.4 Discusión.....</b>	<b>248</b>
<b>4.5 Conclusión.....</b>	<b>257</b>
<b>Conclusiones finales .....</b>	<b>260</b>
<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>263</b>

<b>Anexo .....</b>	<b>277</b>
<b>Producción científica a partir de los resultados obtenidos en esta Tesis .....</b>	<b>277</b>
Presentación de resúmenes en congresos nacionales e internacionales .....	278
Publicaciones en revistas internacionales con referato .....	280
<b>Aportes originales presentados en esta Tesis.....</b>	<b>281</b>
<b>Proyectos de investigación sugeridos .....</b>	<b>283</b>

# **Agradecimientos**

*A mis viejos, que se rompieron el lomo para que yo haya podido hacer lo que ellos no pudieron: estudiar una carrera universitaria*

*A mis abuelos, Dora y Antonio, que aunque ya no estén, sin dudas son parte de esto y estarían orgullosos*

*A mi hermano del alma, Carlitos, gracias por estar en todas y siempre creer en mí*

*A German, José, Enrique, Federico y Carlos... por ser también parte de esto, aunque siempre me hayan hecho la misma pregunta: ¿y...cómo te va con las cucarachas?*

*A Guillermo y Horacio, que son los que me recibieron por primera vez en un laboratorio, y me hicieron entender que es importante llegar, pero mucho más importante es disfrutar del camino*

*A La Dra. Nora Mestorino por la dirección de la tesis*

*A Jorge Errecalde y a Flavio Francini, que también son parte importante de esta tesis*

*A Alejandro y a Martín, por hacer más llevadero el trabajo y reírnos de lo bueno y también de lo malo*

*A Ruben y a Juan Carlos Juncal, por esas horas de tranquilidad y reflexión*

*A Pía, que me dio una mano estadísticamente significativa y que también hizo un poquito de psicóloga*

*A Facundo, un genio en el arte de criar vinchucas, y también, agradecido por las largas charlas sobre la vida que hemos tenido*

*Y finalmente, pero no menos importante, a Dany, por haber traído un poco de Paz a tanta Guerra*

# Resumen

## **Búsqueda de nuevos fármacos anti *Triatoma infestans* para controlar la enfermedad de Chagas**

En América del Sur, *Triatoma infestans* es el principal insecto vector del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana). En la actualidad, el control de *Triatoma infestans* se realiza principalmente mediante el rociado con insecticidas piretroides de las viviendas y las distintas estructuras que conforman el peridomicilio. Pese al marcado éxito que se obtuvo mediante esta estrategia, a finales de la década de 1990 se registraron las primeras limitaciones a su uso masivo: en distintas localidades de Argentina y Bolivia se informó sobre la presencia de poblaciones de *Triatoma infestans* resistentes/tolerantes a los insecticidas piretroides. Ante este panorama, el uso de insecticidas con mecanismos de acción distintos al de los piretroides y el tratamiento de los animales, fuente de alimentación para *Triatoma infestans*, que habitan el domicilio-peridomicilio con sustancias triatomicidas (xenointoxicación), son dos alternativas para el control de las poblaciones resistentes/tolerantes a los insecticidas piretroides.

En esta Tesis se estudió la actividad sobre ninfas de I y V estadio de *T. infestans* de cinco insecticidas de amplio espectro: ivermectina (IVM), doramectina (DRM), eprinomectina (EPR), fipronil e imidacloprid. En condiciones de laboratorio, se determinó la influencia de la vía de administración sobre la actividad letal de las cinco moléculas. Las ninfas utilizadas para estos ensayos procedieron de una población susceptible a piretroides (Santiago del Estero) y de otra compuesta por individuos resistentes (Salta). De los cinco insecticidas en estudio, el fipronil y el imidacloprid fueron las únicas moléculas que demostraron actividad letal cuando fueron topicados sobre la zona dorsal del abdomen de las ninfas. En general, dicha actividad letal varió de acuerdo al estado de alimentación (mayor toxicidad entre las ninfas alimentadas que en las que estaban en ayuno) y al estadio de las ninfas (mayor entre las de I estadio que entre las de V). En cuanto al estado de susceptibilidad a los piretroides se registró

una toxicidad similar del fipronil entre las ninfas susceptibles y resistentes a piretroides, mientras que en el caso del imidacloprid se describió un fenómeno de tolerancia hacia el insecticida en las ninfas resistentes a piretroides. Mediante el uso de los sinergistas butóxido de piperonilo (PBO) y trifenil fosfato (TPP) se determinó la actividad de las monooxigenasas P450 y esterasas en el fenómeno de tolerancia al imidacloprid. El pretratamiento con PBO aumentó la toxicidad del imidacloprid en las vinchucas, independientemente de su estadio, susceptibilidad hacia los piretroides y estado de alimentación. En el caso del TPP solo demostró actividad sinérgica en ninfas ayunadas de I estadio resistentes a piretroides y en ninfas resistentes de V estadio alimentadas a repleción. En cuanto a la recuperación de las ninfas por la administración de dosis subletales de imidacloprid, el pretratamiento con PBO demostró una actividad de las monooxigenasas Citocromo P450, en todas las categorías de ninfas estudiadas. En el caso del TPP se demostró su actividad sinérgica con el imidacloprid en ninfas de I estadio ayunadas y alimentadas resistentes a piretroides. En otro ensayo de laboratorio se evaluó la actividad tóxica de los cinco insecticidas expuestos en distintas superficies de contacto (vidrio y papel de filtro). El imidacloprid y el fipronil demostraron letalidad sobre las ninfas cuando fueron impregnados sobre papel de filtro, mientras que el fipronil fue la única de las cinco moléculas que demostró ser tóxica cuando fue impregnada en vidrio. Mediante el uso de un alimentador artificial se pudo constatar la actividad letal por vía oral de IVM, DRM y EPR sobre ninfas de V estadio de *T. infestans*. Los tres endectocidas demostraron una toxicidad similar entre las ninfas susceptibles y resistentes a piretroides. En ambas poblaciones de vinchucas, DRM fue la molécula de mayor eficacia tóxica, seguida por EPR e IVM. Esta actividad letal por vía oral no fue registrada en el caso del fipronil y el imidacloprid. También, utilizando la técnica del área de preferencia se determinó que el fipronil, fue el único de los insecticidas en estudio que presentó actividad repelente, y que ésta solo fue verificada entre las ninfas de I estadio.

En los ensayos de xenointoxicación se determinó la actividad triatómica de IVM, DRM y EPR administradas en ratas Wistar y en gallinas. En el caso de



las ratas se evaluaron dos vías de aplicación de los endectocidas, registrándose una mayor mortalidad entre las vinchucas que se alimentaron sobre ratas que recibieron la dosis de los endectocidas por vía tópica en comparación con las que los recibieron por vía oral. Ninguno de los tres endectocidas tuvo efectos sobre el consumo de sangre y el volumen de las excreciones emitidas por las ninfas. En gallinas, la aplicación tópica de los endectocidas demostró, al igual que lo observado en ratas, una mayor eficacia triatomicida de DRM seguida de IVM y EPR. De los tres endectocidas ninguno logró modificar la ingesta y el proceso normal de ecdisis de las ninfas de V estadio de *T. infestans*. Mientras que, en perros se estudió la actividad del fipronil y el imidacloprid presentes en distintos productos comerciales. Se demostró que la combinación del imidacloprid con un piretroide y el sinergista PBO tuvo una mayor eficacia triatomicida que cuando se les administró a los perros un producto comercial con fipronil o imidacloprid como único principio activo. Ninguno de los tres productos comerciales demostró efectos sobre la cantidad de alimento ingerido y la capacidad de mudar de las ninfas.

Los resultados obtenidos en esta Tesis refuerzan el rol que podrían ejercer en el control de *T. infestans* ciertos insecticidas con mecanismos de acción distintos al de los piretroides. La actividad demostrada sobre ninfas resistentes a piretroides por algunos de los insecticidas evaluados es un dato alentador considerando alternativas para el control de estas poblaciones. El hallazgo de tolerancia hacia el imidacloprid en ninfas resistentes a piretroides descrito por primera vez en esta Tesis, demuestra la importancia de evaluar los perfiles toxicológicos de las poblaciones de vinchucas resistentes a piretroides provenientes de diferentes zonas geográficas.

# **Abstract**

## **Search for new anti-*Triatoma infestans* drugs to control Chagas disease**

In South America, *Triatoma infestans* is the main insect vector of parasite *Trypanosoma cruzi*, etiological agent of Chagas disease (American Trypanosomiasis). Currently *Triatoma infestans* is mainly controlled by means of spraying pyrethroid insecticides on dwellings and facilities which comprise the house and peridomestic area. Despite the considerable success of this strategy, at the end of the 1990s the first limitations to its massive use were registered: in different cities of Argentina and Bolivia the presence of *Triatoma infestans* populations resistant/tolerant to pyrethroid insecticides were reported. Thus, two alternatives to the control of populations resistant/ tolerant to such insecticides are: the use of insecticides with a different mechanism of action to the pyrethroid ones and the treatment of the animals –food source of *Triatoma infestans*– inhabiting the dwelling-peridomestic area with triatomicidal action substances (xenointoxication).

In this thesis it was studied the action of five, broad-spectrum insecticides on first and fifth-stage *T. infestans* nymphs. Such insecticides are: ivermectin, doramectin, eprinomectin, fipronil and imidacloprid. Under laboratory conditions, it was determined the influence of the routes of administration on the lethal action of the five molecules. The nymphs used for these tests came from a population susceptible to pyrethroids (Santiago del Estero, Province, Argentina) and from another population composed of resistant individuals (Salta, Province, Argentina). Fipronil and imidacloprid were, of the five insecticides under study, the only molecules which proved to have lethal action when topically applied on the dorsal region of the nymphs' abdomen. In general, such lethal action varied according to the feeding status of the nymphs (higher degree of toxicity among the well-fed ones than those fasting), and to their stage (higher among first-stage nymphs than among the fifth-stage ones). As regards the susceptibility status to pyrethroids, it was registered similar toxicity of fipronil among nymphs susceptible and resistant to pyrethroids, whereas tolerance to imidacloprid was observed on nymphs

resistant to pyrethroids. By means of the use of synergists piperonyl butoxide (PBO) and triphenyl phosphate (TPP), it was determined the activity of P450 monooxygenase and esterases related to tolerance to imidacloprid. Pre-treatment with PBO increased imidacloprid toxicity in vinchucas (kissing bugs), regardless of their stage, susceptibility to pyrethroids and feeding status. In the case of TPP, it only demonstrated synergic action on first-stage, fasting nymphs resistant to pyrethroids, and on fifth-stage, resistant, well-fed nymphs. As for nymph recovery by administering sublethal imidacloprid doses, pre-treatment with PBO demonstrated action of Cytochrome P450 monooxygenase enzymes on all the categories of nymphs studied. In the TPP case, its synergic action with imidacloprid was shown on first-stage nymphs, well-fed and fasting, resistant to pyrethroids.

In another assay it was evaluated the toxic action of the five insecticides exposing them to different contact surfaces (glass and filter paper). When filter paper was impregnated with imidacloprid and fipronil, both insecticides proved to be lethal on nymphs, whereas fipronil was, of the five molecules, the only one which demonstrated to be toxic when impregnated on glass. By means of artificial feeding, lethal action was observed on fifth-stage *T. infestans* nymphs when taking IVM, DRM and EPR orally. The three endectocides indicated similar toxicity among susceptible and resistant nymphs to pyrethroids. In both populations of vinchucas, DRM proved to be the molecule with the highest toxic efficacy, followed by EPR and IVM. This, however, was not the case of fipronil and imidacloprid when taken orally. Also, by making use of the preference area method, it was determined that fipronil was the only insecticide of the five under study that had repellent action, verified only among first-stage nymphs.

In the xenointoxication tests, it was determined the triatotoxic action of IVM, DRM and EPR administered to Wistar rats and hens. In the case of rats, two ways of endectocide applications were evaluated. There was a higher mortality rate among the vinchucas fed on the rats that were given topical endectocide doses in comparison with those which were given oral doses. None of the three endectocides affected the nymph's blood intake and excretion amount. As

observed in rats, topical applications of endectocides in hens demonstrated higher triatomicidal efficacy of DRM, followed by IVM and EPR. It was also noticed that none of the three endectocides managed to modify intake and normal ecdysis process of *T. infestans* fifth-stage nymphs. It was studied the action on dogs of fipronil and imidacloprid in different commercial products and it was proved that combination of imidacloprid with a pyrethroid and synergist PBO had a higher triatomicidal efficacy than when the dogs were given a commercial product containing fipronil or imidacloprid as the only active principle. None of the three commercial products produced an effect on the nymph's food intake and moulting.

The results obtained in this thesis strengthen the role that some insecticides with a mechanism of action different to pyrethroids could have in the control of *T. infestans*. The demonstrated action of some of the insecticides tested on nymphs resistant to pyrethroids is encouraging data when seeking alternatives to control those populations. The finding that tolerance to imidacloprid by nymphs resistant to pyrethroids described in this thesis for the first time, demonstrates the importance of evaluating toxicological profiles of populations of vinchucas resistant to pyrethroids coming from different geographical areas.

## Lista de abreviaturas

- **AD:** pipeta Advantage®, Bayer
- **AUC<sub>0-t</sub>:** Área bajo la curva de concentración en función del tiempo desde tiempo cero (0) hasta la última determinación efectuada (t)
- **AUC<sub>0-∞</sub>:** Área bajo la curva de concentración en función del tiempo extrapolada al infinito
- **CeReVe:** Centro de Referencia de Vectores
- **CIPEIN:** Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas
- **CL/F:** Aclaramiento
- **CL<sub>50</sub>:** concentración letal 50%
- **C<sub>max</sub>:** Concentración máxima
- **λ:** Constante de eliminación
- **DE:** desvío estándar
- **DL<sub>50</sub>:** dosis letal 50%
- **DRM:** doramectina
- **DMSO:** dimetil-sulfóxido
- **EPR:** eprinomectina
- **FR:** pipeta Frontline®, Merial
- **h:** hora
- **HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Presión
- **HR:** humedad relativa
- **IVM:** ivermectina
- **LEFyT:** Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP
- **Min:** minutos
- **ng/i:** nanogramos por insecto
- **OR:** oportunidad relativa
- **PU:** pipeta Power Ultra®, Brouwer
- **T<sub>max</sub>:** Tiempo máximo

- $T_{1/2\lambda}$ : Semivida de eliminación
- **UT**: Unidades de trabajo
- **Vd/F**: Volumen de distribución

# Índice de figuras

## Capítulo I

<b>Figura 1</b> Ciclo de vida del parásito <i>Trypanosoma cruzi</i> , descripción de los distintos estadios tanto en el hombre como en el triatomino hospedador .....	<b>41</b>
<b>Figura 2</b> Principales estructuras anatómicas de la cabeza, tórax y abdomen presentes en <i>Triatoma infestans</i> (vinchuca) .....	<b>48</b>
<b>Figura 3</b> Ciclo de vida de <i>Triatoma infestans</i> .....	<b>49</b>
<b>Figura 4</b> Permetrina, ejemplo de la estructura química de un insecticida piretroide .....	<b>60</b>
<b>Figura 5</b> Molécula de ivermectina .....	<b>64</b>
<b>Figura 6</b> Molécula de doramectina .....	<b>64</b>
<b>Figura 7</b> Molécula de eprinomectina .....	<b>64</b>
<b>Figura 8</b> Molécula de imidacloprid .....	<b>66</b>
<b>Figura 9</b> Molécula de fipronil .....	<b>67</b>

## Capítulo II

<b>Figura 10</b> Ejemplar de V estadio de <i>T. infestans</i> antes y después de alimentarse durante 30 minutos sobre gallina .....	<b>79</b>
<b>Figura 11</b> Ninfas de I estadio en contacto con papel de filtro tratado con imidacloprid ....	<b>82</b>
<b>Figura 12</b> Alimentación artificial de <i>T. infestans</i> .....	<b>84</b>
<b>Figura 13</b> ensayo de repelencia con ninfas de V estadio de <i>T. infestans</i> .....	<b>86</b>
<b>Figura 14</b> Toxicidad diferencial de imidacloprid con respecto al estado nutricional en ninfas de I y V estadio de <i>T. infestans</i> susceptibles y resistentes a piretroides.....	<b>92</b>



<b>Figura 15</b> Comparación de la toxicidad del fipronil sobre ninfas de I y V estadio de <i>T. infestans</i> ayunadas y alimentadas a repleción.....	<b>93</b>
<b>Figura 16</b> Comparación de la toxicidad del imidacloprid sobre ninfas de <i>T. infestans</i> de I y V estadio susceptibles y resistentes a piretroides.....	<b>95</b>
<b>Figura 17</b> Comparación de la eficacia del fipronil en ninfas de <i>T. infestans</i> de I y V estadio susceptibles y resistentes a piretroides .....	<b>97</b>
<b>Figura 18</b> Comparación de la toxicidad del imidacloprid entre ninfas de I y V estadio de <i>T. infestans</i> .....	<b>98</b>
<b>Figura 19</b> Comparación de la eficacia del fipronil entre ninfas de I y V estadio de <i>T. infestans</i> .....	<b>100</b>
<b>Figura 20</b> Comparación de las DL <sub>50</sub> del fipronil e imidacloprid obtenidas sobre las 8 categorías de ninfas de <i>T. infestans</i> estudiadas en los ensayos de topicación.....	<b>102</b>
<b>Figura 21</b> Comparación de las CL <sub>50</sub> del imidacloprid impregnado en papel de filtro teniendo en cuenta la variable del estado nutricional de las ninfas.....	<b>107</b>
<b>Figura 22</b> Influencia del estado de alimentación sobre la eficacia del fipronil impregnado en papel de filtro en ninfas de I y V estadio .....	<b>108</b>
<b>Figura 23</b> Eficacia del fipronil en ninfas de I y V estadio en distintos estados de alimentación .....	<b>110</b>
<b>Figura 24</b> Actividad diferencial del imidacloprid impregnado en papel de filtro sobre ninfas resistentes y susceptibles a piretroides .....	<b>111</b>
<b>Figura 25</b> Estudio de la toxicidad en ninfas susceptibles y resistentes a los piretroides del fipronil impregnado sobre papel de filtro .....	<b>113</b>
<b>Figura 26</b> Estudio de la toxicidad del fipronil en vinchucas susceptibles y resistentes a piretroides .....	<b>114</b>
<b>Figura 27</b> Comparación de las CL <sub>50</sub> obtenidas para imidacloprid entre ninfas de <i>T. infestans</i> de I y V estadio .....	<b>116</b>
<b>Figura 28</b> Eficacia comparativa del insecticida fipronil expuesto en papel de filtro en ninfas de <i>T. infestans</i> de I y V estadio .....	<b>117</b>

<b>Figura 29</b> Toxicidad diferencial del fipronil de acuerdo al estadio de desarrollo de ninfas de <i>T. infestans</i> .....	<b>119</b>
<b>Figura 30</b> Comparación de la eficacia triatomicida del fipronil versus el neonicotinoide imidacloprid en ninfas de <i>T. infestans</i> de I y V estadio .....	<b>121</b>
<b>Figura 31</b> Comparación de la mortalidad ocurrida en ninfas de <i>T. infestans</i> expuestas al contacto con fipronil sobre una superficie de papel de filtro y de vidrio .....	<b>123</b>
<b>Figura 32</b> Comparación en la respuesta tóxica a IVM, DRM y EPR por parte de ninfas de V estadio, susceptibles y resistentes a piretroides.....	<b>125</b>
<b>Figura 33</b> Comparación en la respuesta tóxica a IVM, DRM y EPR por parte de ninfas de <i>T. infestans</i> de V estadio .....	<b>126</b>

### Capítulo III

#### Sección I

<b>Figura 34</b> A) Administración de endectocidas en rata Wistar por vía oral mediante el uso de sonda buco-esofágica. B) Ejemplar de V estadio de <i>Triatoma infestans</i> contenido en un tubo Eppendorf.....	<b>156</b>
---	------------

#### Sección II

<b>Figura 35</b> A y B Ejemplares de ninfas de V estadio alimentándose sobre perros.....	<b>171</b>
<b>Figura 36</b> Rata Wistar colocada sobre recipientes de plástico .....	<b>173</b>
<b>Figura 37</b> A, B y C comparación a diferentes tiempos postratamiento del consumo de sangre por parte de ninfas de V estadio de <i>T. infestans</i> alimentadas sobre perros tratados con AD, PU o FR versus el consumo registrado en los perros control .....	<b>175</b>
<b>Figura 38</b> Comparación del porcentaje de mortalidad en función del tiempo de alimentación, en perros tratados con AD , PU o FR .....	<b>178</b>

**Figura 39** A, B y C consumo de sangre de ninfas de V estadio de *T. infestans* muertas después de alimentarse a distintos tiempos sobre perros tratados con AD (A), PU (B) o FR (C)..... **180**

**Figura 40** A y B Consumo individual de sangre de ninfas de V estadio de *T. infestans* muertas después de alimentarse a distintos tiempos sobre perros tratados con PU, AD o FR ..... **182**

**Figura 41** A, B y C Comparación del consumo de sangre sobre ratas Wistar de ninfas previamente alimentadas sobre perros tratados con AD (A), PU (B) o FR (C) versus el consumo registrado en los insectos control..... **183**

### **Sección III**

**Figura 42** A) Construcción de las UT con ladrillos alrededor de una jaula. B) Gallina alojada en el interior de la UT ..... **202**

**Figura 43** A, B y C Comparación a diferentes tiempos postratamiento del consumo de sangre por parte de ninfas de V estadio de *T. infestans* alimentadas sobre gallinas tratadas con DRM (A), EPR (B), IVM (C) o DMSO (control)..... **204**

**Figura 44** A, B, C y D Porcentajes de mortalidad de ninfas de V estadio de *T. infestans* registrados a distintos tiempos postadministración de DRM (A), EPR (B) o IVM (C)..... **207**

**Figura 45** A, B y C Comparación de la cantidad de alimento consumido por ninfas que murieron luego de alimentarse a distintos tiempos sobre gallinas tratadas con DRM (A), EPR (B) o IVM (C) ..... **208**

**Figura 46** A, B y C. Distribución por categorías del consumo individual de sangre de ninfas de V estadio de *T. infestans* muertas después de alimentarse a distintos tiempos sobre gallinas tratadas con DRM, EPR o IVM ..... **210**

**Figura 47** A, B y C Comparación del consumo de sangre sobre ratas Wistar de ninfas previamente alimentadas sobre gallinas tratadas con IVM (A), DRM (B) o EPR (C) versus el consumo registrado en los insectos control..... **212**

<b>Figura 48</b> Comparación del número de vinchucas vivas en las UTs que alojaron gallinas con distintos tratamientos .....	<b>214</b>
<b>Figura 49</b> Comparación, en diferentes tiempos (días), de la cantidad de vinchucas vivas alimentadas sobre gallinas tratadas con DRM, IVM, EPR o DMSO (control) .....	<b>215</b>
<b>Figura 50</b> Comparación del porcentaje de vinchucas adultas al finalizar el ensayo (45 días) .....	<b>216</b>
<b>Figura 51</b> Curvas concentración plasmática promedio $\pm$ DE en función del tiempo de DRM, IVM y EPR en las gallinas .....	<b>218</b>
<b>Figura 52</b> Comparación entre la curvas plasmáticas vs tiempo con los porcentajes de mortalidad de ninfas generados por DRM (A), IVM (B) o EPR (C).....	<b>219</b>
<b>Figura 53</b> Comparación entre la relación dosis-efecto (A) y el modelado PK/PD (B) (Basado en el diagrama presentado en el trabajo de Toutain y Lees (2004)) .....	<b>227</b>
<b>Figura 54</b> A) Perfil cinético obtenido en esta Tesis tras administrar 600 $\mu$ g/Kg de IVM formulada al 0,5% en DMSO. B) Perfil cinético ideal .....	<b>229</b>

## Capítulo IV

<b>Figura 55</b> A, B, C, D, E, F, G y H Evolución en el tiempo del proceso de incoordinación generado por dosis subletales de imidacloprid administrado en distintas categorías de ninfas de <i>T. infestans</i> .....	<b>245</b>
---	------------

# Indice de tablas

## Capítulo I

<b>Tabla 1.</b> Comparación del grupo químico, modo de acción y diana farmacológica entre los piretroides y los cinco insecticidas evaluados.....	<b>58</b>
---	-----------

## Capítulo II

<b>Tabla 2.</b> Estudio de la toxicidad del insecticida imidacloprid sobre ninfas de I y V estadio de <i>T. infestans</i> en el tiempo de estudio .....	<b>89</b>
---	-----------

<b>Tabla 3.</b> Estudio de la evolución en el tiempo de la toxicidad del fipronil sobre ninfas de <i>T. infestans</i> de I y V estadio .....	<b>90</b>
--	-----------

<b>Tabla 4.</b> Relación entre el estado nutricional y la toxicidad del imidacloprid sobre ninfas de <i>T. infestans</i> de I y V estadio después de 168 h de haber sido topicado.....	<b>91</b>
--	-----------

<b>Tabla 5.</b> Estudio de la influencia de la condición alimenticia sobre la toxicidad del fipronil en ninfas de <i>T. infestans</i> de I y V estadio .....	<b>93</b>
--	-----------

<b>Tabla 6.</b> Diferencia de la susceptibilidad al neonicotinoide imidacloprid en relación al estado de susceptibilidad o resistencia a los piretroides en ninfas de I y V estadio de <i>T. infestans</i> .....	<b>95</b>
--	-----------

<b>Tabla 7.</b> Comparación de la actividad tóxica del fipronil sobre ninfas de <i>T. infestans</i> de I y V estadio susceptibles y resistentes a piretroides.....	<b>96</b>
--	-----------

<b>Tabla 8.</b> Comparación de las DL <sub>50</sub> entre los dos estadios de ninfas de <i>T. infestans</i> evaluados durante el ensayo de topicación con imidacloprid.....	<b>98</b>
---	-----------

<b>Tabla 9.</b> Influencia del estadio del ciclo vital de <i>T. infestans</i> sobre la eficacia tóxica del fipronil .....	<b>99</b>
---	-----------

<b>Tabla 10.</b> Comparación de la eficacia del imidacloprid y el fipronil en ninfas de <i>T. infestans</i> de acuerdo al estadio, la condición alimenticia y el estado de susceptibilidad a los piretroides .....	<b>101</b>
<b>Tabla 11.</b> Toxicidad en ninfas de <i>T. infestans</i> postcontacto con papel de filtro impregnados con imidacloprid .....	<b>103</b>
<b>Tabla 12.</b> Evolución en el tiempo de la toxicidad del fipronil en ninfas de <i>T. infestans</i> en las 168 h postcontacto en papel de filtro.....	<b>104</b>
<b>Tabla 13.</b> Estudio de la cinética de toxicidad del fipronil expuesto en vidrio sobre ninfas de I y V estadio de <i>T. infestans</i> .....	<b>105</b>
<b>Tabla 14.</b> Comparación de la toxicidad del neonicotinoide imidacloprid en ninfas de <i>T. infestans</i> de acuerdo a su estado nutricional.....	<b>106</b>
<b>Tabla 15.</b> Efecto del estado nutricional de ninfas de <i>T. infestans</i> sobre la capacidad tóxica del fipronil expuesto en papel de filtro .....	<b>108</b>
<b>Tabla 16.</b> Influencia del estado de alimentación de ninfas de <i>T. infestans</i> en la toxicidad del fipronil expuesto en vidrio.....	<b>109</b>
<b>Tabla 17.</b> Comparación de la toxicidad del imidacloprid impregnado en papel de filtro entre ninfas resistentes y susceptibles a piretroides .....	<b>111</b>
<b>Tabla 18.</b> Relación entre el estatus de susceptibilidad a los piretroides y la eficacia tóxica del fipronil impregnado en papel de filtro .....	<b>112</b>
<b>Tabla 19.</b> Toxicidad del fipronil expuesto en vidrio sobre ninfas de <i>T. infestans</i> susceptibles y resistentes a piretroides .....	<b>114</b>
<b>Tabla 20.</b> Comparación de la toxicidad del imidacloprid impregnado en papel de filtro sobre ninfas de <i>T. infestans</i> de I y V estadio .....	<b>115</b>
<b>Tabla 21.</b> Comparación de la toxicidad del fipronil entre ninfas de <i>T. infestans</i> de I y V estadio en ninfas .....	<b>117</b>
<b>Tabla 22.</b> Influencia del estadio de desarrollo de ninfas de <i>T. infestans</i> sobre la toxicidad del fipronil expuesto en vidrio.....	<b>118</b>
<b>Tabla 23.</b> Comparación de la eficacia del fipronil y del imidacloprid impregnados en papel de filtro sobre ninfas de <i>T. infestans</i> de I y V estadio .....	<b>120</b>

<b>Tabla 24.</b> Comparación de la toxicidad del fipronil expuesto en papel de filtro y vidrio sobre ninfas de <i>T. infestans</i> de I y V estadio .....	<b>122</b>
<b>Tabla 25.</b> Estudio de la toxicidad sobre ninfas de <i>T. infestans</i> de DRM, EPR e IVM en las 168 h post-ingestión .....	<b>124</b>
<b>Tabla 26.</b> Comparación de la eficacia de DRM, EPR e IVM sobre dos poblaciones de ninfas de <i>T. infestans</i> V estadio.....	<b>125</b>
<b>Tabla 27.</b> Comparación de la eficacia de DRM, IVM y EPR sobre ninfas de <i>T. infestans</i> de V estadio .....	<b>126</b>
<b>Tabla 28.</b> Promedio de sangre consumida por ninfas de V estadio susceptibles y resistentes a piretroides.....	<b>127</b>
<b>Tabla 29.</b> Promedio de la actividad repelente de IVM, DRM y EPR en ninfas de <i>T. infestans</i> de V estadio .....	<b>128</b>
<b>Tabla 30.</b> Promedio de la actividad repelente del fipronil y del imidacloprid en ninfas de <i>T. infestans</i> de V estadio .....	<b>129</b>

### Capítulo III

#### Sección I

<b>Tabla 31.</b> Distribución del material biológico utilizado ninfas de V estadio de <i>Triatoma infestans</i> y ratas Wistar según los diferentes tratamientos evaluados .....	<b>154</b>
<b>Tabla 32.</b> Efecto de IVM, DRM y EPR en la cantidad de sangre ingerida por ninfas de V estadio de <i>Triatoma infestans</i> después de 45 minutos de contacto con ratas Wistar.....	<b>157</b>
<b>Tabla 33.</b> Efecto de IVM, DRM y EPR en el volumen de excreciones de ninfas de V estadio de <i>T. infestans</i> .....	<b>157</b>
<b>Tabla 34.</b> Porcentaje de mortalidad a distintos tiempos postratamiento de IVM, DRM y EPR administrados por vía tópica en ratas Wistar .....	<b>159</b>
<b>Tabla 35.</b> Porcentaje de mortalidad a distintos tiempos postratamiento de IVM, DRM administrados por vía oral en ratas Wistar .....	<b>160</b>
<b>Tabla 36.</b> Estudio del proceso de ecdisis de ninfas de V estadio de <i>T. infestans</i> que recibieron dosis subletales de IVM, DRM o EPR .....	<b>161</b>

## Sección II

<b>Tabla 37.</b> Ejemplos de productos comerciales administrados en perros para estudiar su actividad sobre <i>T. infestans</i> .....	<b>168</b>
<b>Tabla 38.</b> Distribución del material biológico utilizado: ninfas de V estadio de <i>Triatoma infestans</i> y perros según los diferentes tratamientos evaluados .....	<b>171</b>
<b>Tabla 39.</b> Porcentajes de mortalidad acumuladas en ninfas de V estadio provocados por los distintos tratamientos en los perros.....	<b>177</b>
<b>Tabla 40.</b> Estudio de la presencia o ausencia del proceso normal de ecdisis en ninfas de V estadio que recibieron concentraciones subletales de PU, FR o AD.....	<b>185</b>

## Sección III

<b>Tabla 41.</b> Distribución del material biológico utilizado durante esta sección .....	<b>197</b>
<b>Tabla 42.</b> Porcentajes de mortalidad en ninfas de V estadio ocasionada por la presencia de DRM, EPR o IVM en gallinas .....	<b>206</b>
<b>Tabla 43.</b> Estudio de la presencia o ausencia del proceso normal de ecdisis en ninfas de V estadio que recibieron concentraciones subletales de DRM, IVM o EPR .....	<b>214</b>
<b>Tabla 44.</b> Determinación de las oportunidades relativas de ninfas de V estadio de mudar al estado adulto.....	<b>216</b>
<b>Tabla 45.</b> Parámetros farmacocinéticos obtenidos por metodología no compartimental para DRM, IVM y EPR tras su administración tópica en gallinas.....	<b>217</b>

## Capítulo IV

<b>Tabla 46.</b> Comparación de los valores de DL <sub>50</sub> obtenidos a distintos tiempos postadministración del insecticida entre ninfas de I y V estadio en estado de ayuno .....	<b>239</b>
---	------------



<b>Tabla 47.</b> Comparación de los valores de $DL_{50}$ obtenidos a distintos tiempos postadministración del insecticida entre ninfas de I y V estadio en estado de alimentación a repleción .....	<b>240</b>
<b>Tabla 48.</b> Cálculo de las relaciones obtenidas en ninfas ayunadas a partir de la comparación de las $DL_{50}$ generadas por el imidacloprid en presencia o ausencia de TPP o PBO .....	<b>241</b>
<b>Tabla 49.</b> Cálculo de las relaciones obtenidas en ninfas alimentadas a repleción entre las $DL_{50}$ generadas por el imidacloprid en presencia o ausencia de TPP o PBO.....	<b>242</b>
<b>Tabla 50.</b> Estudio de la influencia del PBO o TPP en la recuperación de ninfas que recibieron dosis subletales de imidacloprid .....	<b>244</b>

# Capítulo I

# Introducción

## 1.1 La enfermedad de Chagas y su problemática

La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana), llamada así en homenaje al médico brasileño Carlos Chagas, quien fue el primero en describirla hace más de cien años, es una zoonosis producida por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Es transmitido a través de un vector (insectos pertenecientes a la subfamilia *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae)) y posee como huésped a más de 100 especies de mamíferos, incluyendo al hombre. Endémica en gran parte del continente americano (21 países), según la Organización Mundial de la Salud (OMS), existen 8 millones de personas infectadas, de las que anualmente mueren 14.000, y 25 millones de personas en riesgo (OMS, 2017). La Tripanosomiasis Americana es la principal enfermedad parasitaria de nuestro continente y uno de los problemas de salud pública más importantes de América Latina. Se calcula un costo total anual de la enfermedad a nivel mundial de 24-73 billones de dólares, principalmente a causa de la discapacidad para trabajar en los enfermos chagásicos crónicos y los gastos en tratamiento médico (Lee y col., 2013).

La enfermedad de Chagas está estrechamente relacionada al desarrollo socio-económico de una población, por lo que esta zoonosis es parte de una problemática que excede el carácter puramente biomédico. Abarca la biología, pero también la educación, la economía y la política. Está directamente relacionada con la falta de información y educación que sufren los sectores de la población con necesidades básicas insatisfechas, con las carencias de alimentación y de vivienda, con la escasez de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad, y principalmente, con el ocultamiento sistematizado que realizan los distintos gobiernos por el solo hecho que la enfermedad de Chagas está íntimamente ligada a la pobreza.

Si bien la mayor cantidad de pacientes chagásicos se encuentran en países en donde la enfermedad es endémica, la enfermedad de Chagas ha

avanzado hacia países en los que, hasta hace unas décadas no era detectada, convirtiéndose también en un asunto prioritario. Los cambios debido a los flujos migratorios de la población desde zonas endémicas a países centrales, a consecuencia de la globalización mundial, han sido determinantes. Así podemos mencionar a España con 50.000-70.000 infectados (Gascón y col., 2010) y Estados Unidos (EEUU) con más de 300.000 infectados, resultando casos emblemáticos (Bern y col, 2011). Por lo tanto, la enfermedad, que afectaba principalmente a los pobres de Latinoamérica, se ha transformado en un asunto de emergencia a nivel mundial y un problema globalizado.

## **1.2 Historia y estado actual de la problemática de la enfermedad de Chagas en la región**

El filósofo francés Henri Bergson afirmó "El presente sólo se forma del pasado, y lo que se encuentra en el efecto estaba ya en la causa". En este sentido, no está demás, para comprender el estado actual de la problemática de la enfermedad de Chagas, realizar un resumen de su historia, abordándola desde su aspecto político-económico y desde el avance químico que se produjo en el control de sus principales vectores.

Si bien está fehacientemente documentada la presencia de la enfermedad en momias halladas en Chile y Perú de más de 9.000 años de antigüedad (Sanmartino, 2009), el punto de inflexión en la historia natural de la misma se produjo en el año 1909 cuando Carlos Chagas publicó el trabajo "Nova tripanozomiasis humana". Ante la novedosa comunicación de una nueva enfermedad en Brasil, las primeras investigaciones en Argentina se direccionaron a confirmar la presencia de enfermos en el territorio nacional. Entre los años 1912 y 1916, un grupo de investigación liderado por el bacteriólogo Rudolf Kraus perteneciente al Instituto Bacteriológico Argentino (hoy Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Dr. Carlos G. Malbrán), comenzó la búsqueda de *T. cruzi* entre enfermos de bocio y cretinismo. Esta elección se sustentó en la errónea observación en la que Chagas incurrió cuando asoció al bocio y al

cretinismo como señales clínicas de la Tripanosomiasis en su etapa crónica. Ante los infructuosos intentos en hallar rastros de *T. cruzi* en estos enfermos, se desestimó la presencia de la enfermedad en el país. En su informe final los investigadores adjudicaron al clima la causa de una posible atenuación del parásito y, por lo tanto, una incapacidad del mismo por desarrollar la enfermedad en humanos.

En la década de 1920 se produjo el informe de los primeros casos de enfermos crónicos de enfermedad de Chagas en la Argentina. Dicho descubrimiento fue realizado por los investigadores extranjeros, Peter Mühlens y Charles Nicolle (Zabala, 2009). La reacción política ante este hallazgo fue la creación de la Misión de Estudios de Patología Regional Argentina (MEPRA) en el año 1926, dirigida en sus comienzos por el médico argentino Salvador Mazza. En el año 1933 se identificaron los primeros casos agudos de la enfermedad de Chagas en el país. Mazza dedicó los siguientes años a estudiar los síntomas y signos que presentaba la enfermedad en su etapa aguda. Para el año 1940, Mazza había logrado certificar más de 1.200 casos agudos de la enfermedad y de esta manera poner en el tapete de la comunidad académico-científica la importancia de esta problemática en Argentina. Durante esa misma década, la enfermedad se constituyó en un tema prioritario en la agenda de los gobiernos. Debido a las profundas reformas en salud introducidas durante el gobierno de Juan Domingo Perón, principalmente a través de su ministro de Salud, Ramón Carrillo, el control de la Enfermedad de Chagas, la fiebre amarilla y el paludismo se constituyeron en objetivos primordiales de diferentes iniciativas sanitarias. La Ley Nacional 13.266/1948 otorgó amplias facultades al ministerio de salud para el control de las enfermedades endémicas. En el ámbito científico, el accionar del médico Cecilio Romaña fue fundamental para que en el año 1950 se creara el Comité Directivo de Investigaciones y Profilaxis de la enfermedad de Chagas (Zabala, 2009). Una de las herramientas elegidas para el control vectorial de la misma fue el rociado de las casas de zonas endémicas con insecticidas. Con el fin de comprender el objetivo que se perseguía durante estos años y debido a la importancia que para esta Tesis posee el uso de insecticidas, vale reproducir una

frase expresada por Romaña en el año 1951: "La era de los insecticidas de acción residual y de la nueva conciencia despertada por la medicina preventiva" (Zabala, 2009). Los primeros intentos de control organizado contra *Triatoma infestans* (comúnmente llamado vinchuca o chinche) comenzaron en algunas provincias de nuestro país con un plan de rociado con hexaclorociclohexano (Gammexane<sup>MR</sup>). Si bien no fueron campañas de rociado masivo, sirvieron para demostrar la utilidad de esta estrategia en el control vectorial (Dias y col, 1948; Romaña y col, 1948, 1950). Como consecuencia de los serios cuestionamientos toxicológicos y ecotoxicológicos originados principalmente en EEUU y Europa, el uso de los insecticidas organoclorados fue prohibido hacia fines de los años 60, utilizándose en su lugar insecticidas anticolinesterásicos (malatión, fenitrotión, propoxur). Durante estos años la enfermedad dejó de ser una problemática exclusiva de las zonas rurales pobres. La creciente migración hacia las grandes ciudades en busca de oportunidades laborales produjo un proceso de urbanización de la enfermedad, lo que derivó en un aumento en la percepción de la problemática en el sistema de salud. La presencia de enfermos chagásicos en los conglomerados urbanos tuvo como respuesta la creación de instituciones para su diagnóstico (Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chaben) y el desarrollo del Programa Nacional de Chagas que incluía el control del vector. También el ámbito científico contó con más recursos para consolidar a los distintos grupos de investigación para el estudio de la enfermedad (Zabala, 2009).

El doctor Carlos Alberto Alvarado, sanitarista jujeño, en 1966 frente a la presencia endémica de la enfermedad de Chagas, diseñó una estrategia, operación y metodología a la que denominó Programa de Salud Rural, que suponía la construcción de áreas programáticas, teniendo en cuenta la accesibilidad, la población, características geográficas, demográficas y pautas culturales, e incluía el rociado periódico de las viviendas entre otras cuestiones. Significó el nacimiento de la Atención Primaria de la Salud, estrategia de trabajo recomendada en 1978 por la Organización Mundial de la Salud, durante la Conferencia Mundial de Alma-Ata, y la denominó Atención Primaria de la Salud.

A finales de la década del 70, la historia del control químico de los vectores de la enfermedad tuvo un nuevo capítulo cuando se reemplazó a los insecticidas anticolinesterásicos por los piretroides. Los principales motivos de este cambio fueron la elevada toxicidad comunicada en mamíferos y el olor desagradable que persistía en los hogares después de ser rociados con insecticidas anticolinesterásicos. Por otro lado, el uso de deltametrina permitió disminuir las concentraciones de los insecticidas entre 10 y 20 veces (Zerba,1989). La aceptación por parte de los moradores de las casas tratadas también fue un factor determinante en la utilización masiva de estas moléculas. Durante esta etapa la problemática de la enfermedad de Chagas llegó a afianzarse como un tema de interés a nivel nacional y regional. Un ejemplo es el caso de Brasil, donde en el año 1983 comenzó una campaña para erradicar a *T. infestans* de su territorio, alcanzando en el año 1987 el 70% de los objetivos operativos; la molécula utilizada en la fumigación fue deltametrina. La reemergencia del dengue en el territorio brasileño en el año 1986 eliminó recursos pecuniarios y de disponibilidad de personal afectado al plan de erradicación de *T. infestans*. Dichos recursos fueron redirigidos al control de *Aedes aegypti*, generando una paralización del programa nacional de lucha contra el vector de la enfermedad de Chagas. Si bien la experiencia en Brasil se podría encuadrar como un fracaso en el control del vector, en realidad marcó un importante precedente: los datos sobre la reducción de la transmisión de la enfermedad evidenciada en la disminución de casos agudos y en internaciones por enfermedad de Chagas, permitieron establecer la importancia de realizar acciones sostenidas contra los principales vectores en cada una de las regiones endémicas (Días y col., 2008).

La experiencia brasilera sobre el control de *T. infestans* fue la base para concretar en el año 1991 la **Iniciativa del Cono Sur** (INCOSUR). Argentina, Brasil, Bolivia, Uruguay, Chile y Paraguay decidieron cooperar en la erradicación definitiva de los principales vectores de la enfermedad de Chagas de las regiones endémicas. Los resultados de estas políticas de estado no tardaron en llegar: en los años 1997 y 1999 Uruguay y Chile, respectivamente, fueron declarados libres

de transmisión vectorial; y, en agosto de 2018, Paraguay (OMS, 2018). Brasil en el año 2000 presentaba la mayor parte de su territorio libre de transmisión de *T. cruzi* por *T. infestans* (Zabala, 2012). En el caso de Argentina, las provincias que lograron certificar la interrupción de la transmisión (es decir que no se hallaron nuevos casos de la enfermedad y que se logró la ausencia del insecto en los hogares) fueron: Jujuy, La Pampa, Neuquén, Río Negro, Entre Ríos, Santa Fe, Misiones, 6 departamentos del sur de Santiago del Estero y recientemente San Luis (Mougabure Cueto y Picollo, 2015).

### **1.3 Ciclo biológico de la enfermedad de Chagas**

#### **1.3.1 Un parásito, un vector y un hospedador**

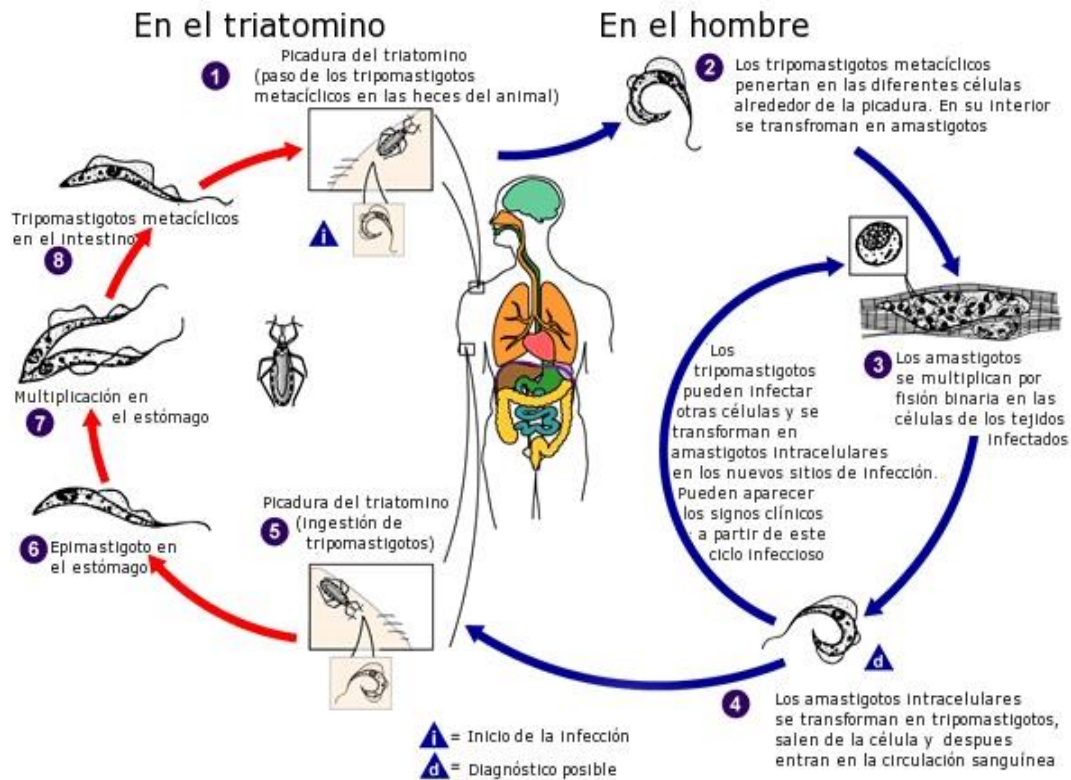
Durante su ciclo vital *Trypanosoma cruzi* presenta cuatro estadios morfológicos: tripomastigote metacíclico, promastigote o tripomastigote sanguíneo, epimastigote y amastigote. El ciclo de vida de *T. cruzi* se desarrolla en organismos diferentes: una fase en un insecto (Triatomino) que sirve como vector y otra parte del ciclo en un mamífero que actúa como hospedador.

Tanto en el insecto como en el mamífero se desarrolla una fase con dos estadios. En el vector se encuentran los epimastigotes y los tripomastigotes metacíclicos y en el hospedador mamífero se encuentran los amastigotes y los tripomastigotes sanguíneos (Figura 1). Cada uno de estos estadios presenta características particulares: el promastigote o tripomastigote sanguíneo es flagelado, de forma alargada, permanece en el sistema circulatorio del mamífero por algunos días, distribuyéndose por distintos órganos (bazo, hígado, corazón, etc.). Cuando el vector se alimenta de un mamífero infectado, los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos, transformándose rápidamente en formas cortas en el intestino medio anterior del insecto. El ciclo continúa cuando estas formas migran hacia el intestino posterior del vector en donde encuentran las condiciones adecuadas para transformarse en epimastigotes. En la porción posterior del intestino del insecto, los epimastigotes evolucionan a tripomastigotes



metacíclicos, estadio que es eliminado con la orina y las heces del insecto. Esta forma posee un flagelo que le permite desplazarse, por lo que, en contacto con la piel o mucosas del hospedador las atraviesan en gran número, transformándose en amastigote en el interior de la célula parasitada. El amastigote, de forma redondeada, se conoce como leishmanoide; carece de flagelo y por lo tanto de movimiento; y tiene capacidad de replicación por división binaria simple. Después de multiplicarse, evolucionan a tripomastigotes, los cuales se liberan al torrente sanguíneo periférico para reiniciar el ciclo (Brener, 2000).

**Figura 1. Ciclo de vida del parásito *Trypanosoma cruzi*, descripción de los distintos estadios tanto en el hombre como en el triatomino hospedador (Noireauy col., 2009)**



Se han identificado seis linajes genéticos de *T. cruzi* que están relacionados con los ecosistemas dispares, los ciclos de transmisión y la distribución geográfica. Conocer la estructura poblacional del agente permitirá comprender la epidemiología, desarrollar estrategias de control y resolver la relación entre el genotipo y el pronóstico clínico (Messenger y col., 2014).

### **1.3.1.1 Mecanismo de transmisión**

Desde el punto de vista sanitario, en las regiones en donde la enfermedad es endémica, la transmisión vectorial sigue siendo la vía de mayor importancia. Cuando una vinchuca se alimenta de sangre de un organismo infestado con los parásitos se inicia el ciclo de la enfermedad de Chagas. El ciclo continúa cuando los parásitos comienzan a multiplicarse en el intestino del insecto y cuando éste pique a un individuo susceptible, podrá eliminar orina y materia fecal contaminada con tripanosomas, los que ingresarán a la sangre del nuevo hospedador a través de las heridas producidas por el rascado y aún a través de la piel sana.

En las zonas no endémicas la vía de transmisión madre-hijo (vertical o congénita) constituye la forma más frecuente de infección. La transmisión por sangre y hemoderivados sólo es posible si no se realiza de rutina el tamizaje serológico para la enfermedad. En nuestro país, distintas medidas se han puesto en práctica para eliminar la transmisión por estas vías:

- La Ley Nacional de Sangre 22.990/1983 estableció la obligatoriedad del tamizaje serológico de enfermedades endémicas (entre ellas enfermedad de Chagas) en todos los hemodonantes. En este marco legal por Resolución 70/2002 entró en vigencia el Plan Nacional de Sangre y la nueva reglamentación de la Ley por Decreto del Poder Ejecutivo Nacional 1.338/2004.

- En el año 2007, en Argentina se sancionó la Ley 26.281, aún sin reglamentar, que en su artículo cuarto expresa la obligatoriedad de realizar pruebas diagnósticas en toda mujer embarazada, en los recién nacidos, hijos de madres infectadas hasta el primer año de vida y en el resto de los hijos, menores de catorce (14) años de las mismas madres y, en general, en niños y niñas al cumplir los seis (6) y doce (12) años de edad. Por otro lado, también establece el carácter obligatorio de los controles serológicos en donantes y receptores de órganos, tejidos y de sangre a transfundir (Congreso de la Nación Argentina, 2007).

- La Ley 13.005/2002 de la Provincia de Buenos Aires está dirigida al manejo de la embarazada y del recién nacido con similares especificaciones a las de la Ley nacional 26.281/07 a la cual no adhiere la provincia.

La eliminación del vector en gran parte del territorio endémico a causa de las campañas de rociado periódico, sumado al control en los bancos de sangre y la posibilidad de tratamiento para los infectados, provocó un descenso considerable en la cantidad de afectados. En el país hay 1.600.000 personas infectadas por *T. cruzi*, de los cuales 255.558 son menores de 14 años. Todos los años nacen 1.300 chicos infectados por transmisión de madre a hijo (Informe Auditoría General de la Nación, 2018). En Argentina se calcula que aproximadamente el 1,5% de niños menores de catorce (14) años están infectados con *T. cruzi* (Zabala, 2012).

Además de las formas de transmisión mencionadas existen otras menos relevantes: transmisión por accidentes al manipular diferentes tipos de materiales contaminados, como por ejemplo excretas de triatominos, cultivos de parásitos y sangre infectada de seres humanos y animales, en distintos ámbitos como laboratorios, hospitales (Guhl y Nicholls, 2001) y medio ambiente rural (cazadores). Un nuevo escenario epidemiológico surgió a partir de la notificación de casos de transmisión de *T. cruzi* por vía oral, a través de la ingesta de alimentos contaminados con excretas de triatominos (Guhl y Nicholls, 2001) y habitualmente como brotes o epidemias focalizadas familiar/comunitaria. La transmisión oral de *T. cruzi* ha sido ampliamente documentada en la Amazonía brasileña, en donde los habitantes locales consumen jugo de frutos (caña, por ejemplo) que al cosecharlos, accidentalmente, se procesan también con triatominos silvestres infectados (Dias y col., 2008; Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012). También se han comunicado epidemias en Venezuela y Colombia (Alarcón de Noya y col., 2017).

### 1.3.1.2 Etapas clínicas de la enfermedad

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

i) FASE AGUDA, comienza cuando el parásito ingresa al hospedador. Tiene un período de incubación de 10-12 días. La duración es de 15 a 90 días, registrándose una mayor incidencia de casos agudos en los meses estivales. Una explicación sería que durante estos meses los triatominos presentan su mayor actividad biológica (Dias y Coura, 1997). Se pueden desarrollar síntomas o signos únicos y característicos, en la puerta de entrada como el complejo oftalmoganglionar, denominado también Signo de Romaña o del ojo en compota, compuesto por manifestaciones patognomónicas: edema de párpados unilateral, eritema malar, conjuntivitis y dacrioadenitis, acompañados por una adenopatía satélite; y, las manifestaciones sistémicas (fiebre de cualquier tipo, chagomas metastáticos o lipochagomas, edema, exantema, visceromegalias).

ii) FASE INTERMEDIA O PERÍODO CRÓNICO INDETERMINADO, durante el cual se registra en la mayoría de los casos una disminución en la parasitemia, seguida de la atenuación e incluso de la involución de los síntomas observados durante la fase aguda. Debido a la disminución en la parasitemia, durante esta etapa es difícil el hallazgo directo de *T. cruzi*. También, se evidencia un incremento notable en la actividad del sistema inmune. En aproximadamente el 75% de los enfermos, la fase crónica indeterminada se puede extender durante toda la vida.

iii) FASE CRÓNICA DETERMINADA, en el 25% restante se desarrolla la fase crónica determinada. Durante ésta última se manifiestan las lesiones definitivas cardíacas: miocardiopatía chagásica crónica, que puede presentarse con arritmias, bloqueos, insuficiencia cardíaca o ser oligosintomática. Las megaformaciones digestivas (esofagopatía chagásica y la colonopatía chagásica) (Storino, 2010) y urinarias (megauréteres) no se observan en nuestro país.

### 1.3.1.3 Diagnóstico

El método utilizado para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas dependerá de la fase que el paciente esté cursando. Durante la fase aguda, debido a la alta parasitemia observada, la primera elección es la detección directa del parásito. Existen distintas técnicas: gota fresca, micrométodo con capilares (microhematocrito), micrométodo con microtubo y Strout. Las pruebas serológicas también se pueden utilizar más tardíamente durante esta fase: las inmunoglobulinas (IgGs) contra el parásito pueden ser detectadas alrededor de los 30 días post infección. Los métodos serológicos utilizados para el diagnóstico de la infección chagásica son: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y aglutinación con partículas de gelatina. Para determinar que una persona es chagásica deben ser positivos al menos dos ensayos serológicos diferentes, uno de los cuales debe ser ELISA o IFI: (ELISA + HAI, ELISA + IFI o HAI + IFI). La fase crónica de la enfermedad se caracteriza por un descenso notorio de la parasitemia, por lo tanto, los ensayos serológicos antes mencionados (ELISA, IFI y HAI) son las pruebas de diagnóstico más utilizadas. Por otro lado, si una de las pruebas es positiva y la otra negativa, se deberá realizar una tercera prueba o derivar la muestra a un centro de referencia. En los pacientes inmunocomprometidos los resultados pueden ser falsos negativos. Después del tratamiento contra el parásito con los fármacos convencionales la producción de anticuerpos específicos puede persistir por años, aún sin la presencia del parásito en el organismo (Ministerio de Salud de la Nación, 2012). Otros métodos de diagnóstico directo (hemocultivo, xenodiagnóstico de Brumpt, reacción de la polimerasa en cadena, PCR, inoculación intraperitoneal al ratón) sólo están disponibles en el Instituto Nacional de Parasitología.

Un caso particular es el de la enfermedad de Chagas congénita. La presencia del parásito en la madre es un elemento indispensable para la transmisión por esta vía, y, por lo tanto, los análisis deben comenzar en la embarazada. La Ley nacional 26.281/07 antes mencionada, establece que toda

gestante debe ser analizada para descartar una infección por *T. cruzi*. En caso de ser reactiva a las pruebas, será evaluada para conocer el grado de la enfermedad, aunque no se recomienda realizar el tratamiento tripanocida durante el embarazo. Todo recién nacido de madres chagásicas debe ser evaluado para descartar la transmisión congénita de *T. cruzi*, y sometido a estudios y seguimiento hasta el primer año de vida. El diagnóstico positivo de la transmisión congénita se lleva a cabo mediante la detección directa del parásito en la sangre del recién nacido y hasta los 9 meses de vida; y, por pruebas serológicas a partir de esa edad (Ministerio de Salud de la Nación, 2012).

#### **1.3.1.4 Tratamiento antiparasitario**

El tratamiento de la enfermedad de Chagas se realiza principalmente con dos fármacos: benznidazol y nifurtimox. Ambos presentan efectos adversos que se acentúan en los adultos, habiéndose demostrado que los recién nacidos y los niños toleran mejor el tratamiento específico (Viotti y col., 2009).

El benznidazol inhibe la síntesis proteica en el parásito originando una degradación de macromoléculas (proteínas, ADN, etc.). Es la droga utilizada de rutina para el tratamiento, de producción nacional.

El mecanismo de acción del nifurtimox se basa en la generación de especies reactivas de oxígeno (aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, etc) contra las cuales *T. cruzi* no posee mecanismos de detoxificación. Es una droga alternativa y se indica ante la presentación de efectos adversos a benznidazol. La duración del tratamiento es de 60 días y las dosis indicadas dependen de la edad del paciente.

Los casos agudos deben ser tratados de rutina; estos pacientes pueden presentar ciertos signos que son propios del contacto con el vector como puede ser el chagoma de inoculación, o ser detectados mediante alguna de las técnicas de diagnóstico mencionadas. Se los trata con benznidazol a razón de 5 mg/kg/día por 60 días en adultos y de 5-10 mg/kg/día en niños durante 60 días. Ante efectos adversos al benznidazol el tratamiento se realiza con nifurtimox a la dosis de 8

mg/kg/día durante 30-60 días en el caso de los adultos y 10 mg/kg/día durante 30-60 días si se trata de niños. Si la transmisión es congénita, una vez que se haya confirmado el diagnóstico, el tratamiento consiste en la administración de 5-10 mg/kg/día de benznidazol durante 60 días. Cuando la vía de transmisión es por trasplante de órganos con un dador o un receptor con diagnóstico positivo para *T. cruzi*, el tratamiento se realiza con benznidazol a razón de 5 mg/kg/día en adultos y 5-10 mg/kg/día en niños por 60 días (Pinto Dias, 2006).

## 1.4 Triatominos

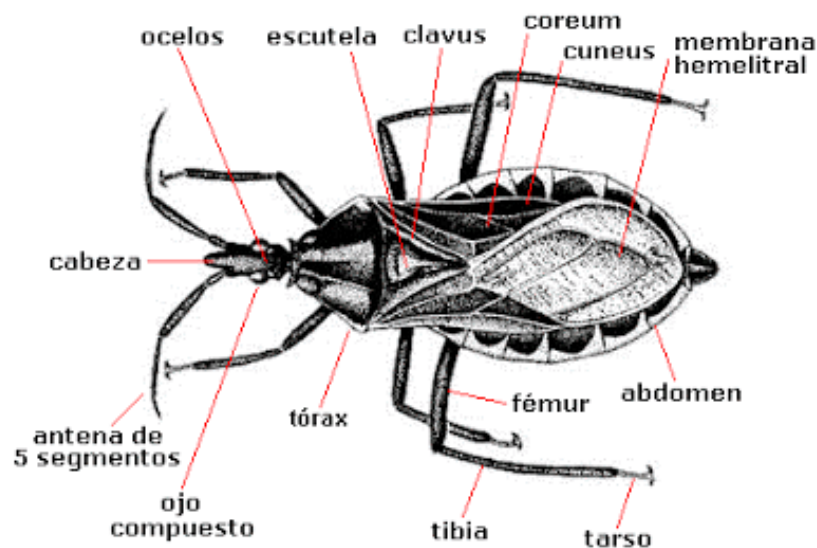
### 1.4.1 Taxonomía

- Reino: Metazoa
- Subreino: Eumetazoa
- Phylum: Arthropoda
- Subphylum: Mandibulata
- Clase: Insecta
- Subclase: Hemimetabola
- Orden: Hemiptera
- Superfamilia: Reduvidae
- Familia: *Reduviidae*
- Subfamilia: *Triatominae*
  - Género: *Triatoma*
  - Dipetalogaster*
  - Rhodnius*
  - Panstrongylus*
  - Eratyrus*
  - Belminus*
  - Paratriatoma*

### 1.4.2 Características generales

La subfamilia *Triatominae* pertenece a la familia *Reduviidae*. Las características que distinguen a esta subfamilia del resto son: comportamiento estrictamente hematófago, antenas con cuatro segmentos insertadas lateralmente, rostro recto (que en reposo queda ubicado debajo de la cabeza), y cabeza alargada en forma de cono (Figura 2).

**Figura 2. Principales estructuras anatómicas de la cabeza, tórax y abdomen presentes en individuo adulto de *Triatoma infestans* (vinchuca)**



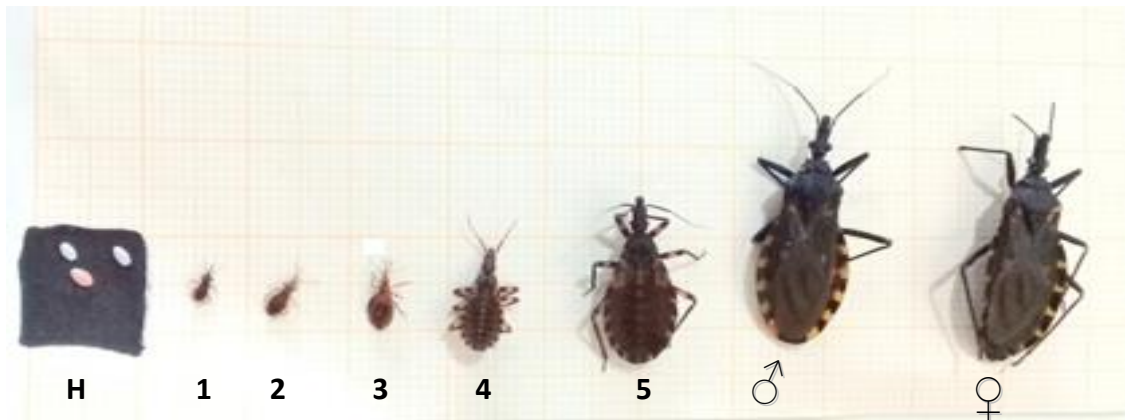
(<http://entomologiab1.blogspot.com.ar/2007/04/triatoma-infestans-hemiptera.html>, 2017)

Los triatominos son hemimetábolos, es decir, desarrollan una metamorfosis incompleta (huevo, ninfa y adulto). Dependiendo de la especie y de la cantidad de alimento ingerido, una hembra puede poner aproximadamente 10 huevos por semana, y entre 100 - 600 en su vida adulta. Durante su ciclo vital los triatominos deben atravesar cinco estadios ninfales antes de transformarse en un individuo adulto (Figura 3). Las ninfas carecen de placas genitales desarrolladas y de alas, al igual que los adultos son hematófagos estrictos y suelen alimentarse por la noche. Con una alimentación completa, que demora entre 15 y 30 minutos, los primeros estadios ninfales (I, II y III) pueden aumentar entre 8 y 10 veces su peso corporal y de 2 a 4 veces en el caso del resto de los estadios ninfales y los



adultos (Button, 1930). Cuando las condiciones alimenticias no son las ideales, ya sea por escasez de alimento o por una sobrepoblación de individuos, los adultos con alimentación deficiente realizan una dispersión activa que puede ser mediante vuelo o caminando (Abraham y col., 2011).

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



**H: huevos, nótese la diferencia de coloración: los blancos son huevos con escasos días de desarrollo, mientras que el huevo de color rosa se corresponde con un estado de desarrollo embrionario tardío. Los números identifican a individuos de cada uno de los 5 estadios ninfales por lo que atraviesa la especie. ♂: macho y ♀: hembra.**

Según el ámbito donde realicen su ciclo biológico, los triatominos se pueden clasificar en silvestres, peridomiciliarios y domiciliarios. En el caso de los silvestres se los suele encontrar en nidos de aves, madrigueras de pequeños roedores e inclusive en cuevas, alimentándose de murciélagos. En algunas especies, los triatominos peridomiciliarios lograron colonizar las estructuras construidas en el peridomicilio; corrales, gallineros, cocinas o depósitos de leña. En el ciclo peridoméstico los insectos encuentran distintas y variadas fuentes de alimentación: perros, gatos, gallinas, cabras, roedores, etc. *Triatoma infestans* y *Triatoma dimidiata* son ejemplos de este tipo de especies (López y col., 1999).

Los triatominos que se han adaptado mejor a las condiciones de las viviendas humanas son los vectores de mayor importancia sanitaria. Los triatominos domiciliarios encuentran las condiciones ideales de desarrollo cuando estas viviendas son de baja calidad con paredes de adobe y techos de material

vegetal, características ideales para que este grupo pueda desarrollar su ciclo de vida. En este ciclo epidemiológico el hombre tiene un rol preponderante desde dos aspectos: es una de las principales fuentes de alimento para los insectos y es también el reservorio de *T. cruzi*, necesario para que el proceso de transmisión se desarrolle de manera adecuada (Crocco y Catalá, 1996). *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus* son las dos especies principalmente domiciliarias.

### 1.4.3 *Triatoma infestans*

La importancia sanitaria que reviste *T. infestans* es la de ser el principal vector de *T. cruzi* en América del Sur (Gorla, 2002). Esta condición está sustentada fundamentalmente por su adaptación al ambiente humano. Como ya se mencionó con antelación, si las condiciones de la vivienda o estructuras del peridomicilio son rudimentarias es cuando se favorece el desarrollo del ciclo biológico de *T. infestans*. La capacidad vectorial de *T. infestans* también está relacionada con el hábito de alimentarse durante la noche de una gran variedad de animales que habitan en el domicilio y el peridomicilio, sumado al hecho que bajo ciertas condiciones existe una alta probabilidad que el insecto defecue sobre el huésped durante la alimentación.

La intervención directa del hombre ha modificado la extensa distribución geográfica de esta especie. En la actualidad, se distribuye principalmente en Argentina, Bolivia, Paraguay y Perú (Panzera y col., 2014). El éxito en el retroceso territorial de *T. infestans* está sustentado por los dos aspectos biológicos de la especie: una baja tasa de crecimiento poblacional y una alta susceptibilidad hacia los piretroides utilizados en las campañas de rociado.

En Argentina *T. infestans* era considerada una especie exclusiva del domicilio y peridomicilio (Cecere y col., 1997). La falta de focos silvestres hacía suponer que la recolonización por parte de *T. infestans* de los domicilios estaba relacionada únicamente con ejemplares de vinchucas que provenían del peridomicilio y no habían sido eliminados durante el tratamiento con piretroides (Cecere y col., 1997). En el año 2009 se describió el hallazgo de un foco silvestre

de *T. infestans* en la zona del Chaco Argentino (Ceballos y col., 2009). Este descubrimiento se sumó a la comunicación de focos silvestres en otros países del Cono Sur (Barretto y col., 1963; Dujardin y col., 1987). La relación que estos focos poseen con las poblaciones domiciliarias y peridomiciliarias de vinchucas es un tema aún no dilucidado (Noireau y col., 2005).

## **1.5 Control vectorial**

### **1.5.1 Proceso de control vectorial**

El control vectorial incluye una serie de acciones que sobrepasan al rociado de viviendas con insecticidas. La vigilancia vectorial, el asesoramiento y la transferencia de conocimientos a las comunidades en las zonas endémicas, el mejoramiento de las viviendas y del peridomicilio, son ejemplos de acciones específicas que también están incluidas. La vigilancia vectorial incluye al personal capacitado que será el encargado de la búsqueda activa del vector. En el caso de una provincia de alto o mediano riesgo, la búsqueda se debe realizar cada 6 meses. Mientras que en las provincias con riesgo bajo la misma se realizará cada 12 meses. La búsqueda pasiva del vector es la que lleva a cabo la comunidad cuando encuentra un ejemplar vivo e informa a las autoridades pertinentes. Cabe destacar que el ideal de este sistema de vigilancia cuenta con la participación activa de la población en general, personal de hospitales y agentes de Atención Primaria, docentes y voluntarios. Los datos obtenidos a partir del proceso de vigilancia son utilizados para confeccionar una estratificación de riesgo y de esta manera asignar la mayor cantidad de los recursos disponibles a las áreas de mayor infestación (Organización Panamericana de la Salud, 2002).

### **1.5.2 Limitaciones al uso de piretroides como único medio para controlar a los principales vectores de *Trypanosoma cruzi***

Desde finales de la década del 70, los piretroides se erigieron como la principal herramienta para el control de los vectores de *T. cruzi* en el Cono Sur. Basta mencionar el dato del retroceso en la distribución geográfica de *T. infestans* en las últimas décadas, de un área de 6,3 millones de km<sup>2</sup> en el año 1960 a menos de 1 millón de km<sup>2</sup> en la actualidad, para entender el alcance y la magnitud del control ejercido sobre el vector (Bustamante Gomez y col., 2016). Sin embargo, en este contexto, en los últimos años han surgido algunos inconvenientes que ponen en riesgo el éxito final en la concreción del principal objetivo planteado por la Iniciativa del Cono Sur.

La presencia de poblaciones de vinchucas persistentes después de un proceso de rociado, fue la primera limitación comunicada al uso masivo de piretroides. Dilucidar el origen y la naturaleza de esas poblaciones persistentes fue el objetivo de distintos y numerosos trabajos de investigación. Después de un correcto rociado, es decir, con la molécula indicada a la concentración debida, pueden ser varias las causas que determinen la presencia de poblaciones persistentes: (i) la presencia de focos de insectos externos al lugar de rociado y que pueden servir de fuente para nuevas reinfestaciones de los hogares, ya sea debido al transporte pasivo de objetos, por ejemplo, madera, o por un fenómeno de dispersión activa de los insectos. Estos focos pueden hallarse tanto en domicilios y/o peridomicilios de zonas linderas; (ii) focos de insectos provenientes de la zona rociada en donde por cuestiones estructurales no se pudo realizar el rociado de manera adecuada y por lo tanto, el insecticida no logró tomar contacto con los triatomíneos (depósitos de comestibles, por ejemplo); (iii) poblaciones de triatomíneos que tomaron contacto con el insecticida de manera correcta pero que fueron resistentes a la molécula utilizada (Cecere y col., 1997).

También se ha detectado que las poblaciones de insectos persistentes suelen hallarse en el peridomicilio, es decir, existe una alta probabilidad que

después de un tratamiento tradicional con insecticidas, el proceso de reinfestación de los triatominos tenga su origen en el peridomicilio. La exposición a la luz solar y al agua en el peridomicilio determina un menor poder residual de los piretroides en comparación con lo que ocurre en el domicilio, la complejidad de estructuras y la extensión del área que suele ocupar el peridomicilio como el hecho que en este ámbito se encuentren varias de las especies de animales que sirven de fuente de alimento a los triatominos, son las principales causas del rol preponderante que posee el peridomicilio en el proceso de reinfestación (Cecere y col., 1997; Audino y col., 2004).

## **1.6 Estrategias alternativas al rociado con piretroides para el control de triatominos**

### **1.6.1 Xenointoxicación**

El término xenointoxicación hace referencia a la intoxicación sufrida por un parásito después de alimentarse de un hospedador previamente tratado con un antiparasitario. El primer antecedente de esta estrategia en triatominos es el trabajo realizado por Lent y Olivera en el año 1944. En dicho estudio se utilizaron palomas previamente tratadas con DDT y el triatomo evaluado fue *Rhodnius prolixus* (Lent y Oliveira, 1944). En los trabajos posteriores se evaluaron distintos modelos animales (perros, gatos, cabras, etc.), que además de representar una fuente de alimento para los triatominos, en su mayoría se comportan también como reservorios de *T. cruzi* (Amelotti y col., 2009a, 2012a; Gürtler y col., 2009a; Juan y col., 2013).

Si bien el objetivo principal de esta estrategia está centrado en el hallazgo de moléculas que provoquen la muerte de los insectos, otras moléculas con capacidad de interferir en los patrones de alimentación y defecación también podrían ser candidatos a fin de encontrar alternativas para paliar la transmisión vectorial. Debido a que los animales a los que se les suelen administrar los antiparasitarios habitan el peridomicilio, la xenointoxicación suele estar más

relacionada con el control de vectores a este nivel. Una alternativa para el control de vectores a nivel domiciliario sería administrar al propio ser humano el antiparasitario en cuestión.

### **1.6.2 Pinturas con insecticidas**

Las pinturas conteniendo insecticidas han sido utilizadas, con distinto grado de éxito, desde el año 1940. Si bien es una alternativa al rociado con insecticidas, el modo de actuar es similar: presencia de una molécula activa en una determinada superficie que es capaz de eliminar a un insecto. El avance en las tecnologías de elaboración de las pinturas permitió el desarrollo de productos de liberación lenta y sostenida de los principios químicos incorporados. Malatión al 8,3% fue la primera formulación evaluada durante la década del 90. Pese a los resultados obtenidos, tanto en pruebas de campo como de laboratorio, la pintura no pudo ser comercializada por problemas de estabilidad y viscosidad. Formulaciones posteriores permitieron utilizar más de un insecticida y ampliar la eficacia de las pinturas, por ejemplo, los productos biocidas formulados bajo la tecnología Inesfly que permite la incorporación de ingredientes activos de diversa naturaleza en una microcápsula polimérica. Inesfly 5A IGR™ es una combinación de diazinón (1,5%) y clorpirifos (1,5%) con el inhibidor del desarrollo de insectos, piriproxifen (0,063%) mientras que Inesfly 5A IGR NG™, es una novedosa combinación de piretroides y de piriproxifen (alfa-cipermetrina (0,7%), D-aletrina (1%) y piriproxifen (0,063%)), productos comercializados por Bayer CropScienceS.L. (Mosqueira y col., 2015).

Si bien estas pinturas fueron eficaces frente a *T. infestans* (Amelotti y col., 2009b), las comisiones de expertos creadas en el año 2001 y 2008 por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) denegaron su uso en Argentina. En ambas oportunidades los principales argumentos para la negativa estuvieron asociados con la contaminación y exposición permanente a los insecticidas que los moradores de los hogares tratados con estas pinturas deberían soportar.

### 1.6.3 Bioinsecticidas

Los bioinsecticidas surgen como una alternativa menos agresiva al medioambiente que los insecticidas químicos tradicionales. Se considera como bioinsecticida a cualquier organismo o sustancia producida naturalmente que posea actividad sobre insectos, la que no sólo está circunscripta a la mortalidad. Podría también poseer actividad repelente o interferir en el ciclo natural del insecto (DeBach y Rosen, 1991). En el caso del control biológico de triatominos tiene un rol preponderante el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*; la habilidad del mismo para degradar la cutícula de distintos triatominos fue puesta de manifiesto en varios trabajos (Luz y col., 1998, 1999; Pedrini y col., 2009). Lo novedoso del trabajo de Pedrini y col, es que combinan en una trampa al hongo con moléculas quimioattractantes. Los resultados de eficacia sobre vinchucas resistentes obtenidos demuestran que podría surgir como una alternativa eficaz al uso masivo de piretroides.

### 1.6.4 Virus

El Triatoma virus (Trv) es un virus entomopatógeno encontrado en triatominos. En ninfas de *T. infestans* infectadas con TrV bajo condiciones de laboratorio, se han observado porcentajes de mortalidad superiores al 97%. También se comunicó una capacidad de muda disminuida entre las ninfas infectadas (Muscio y col., 1997). En un estudio posterior llevado a cabo por los mismos autores, se demostró una transmisión del virus a través de la vía fecal-oral en *T. infestans* (Muscio y col., 2000). También se observó un descenso en la fecundidad y longevidad de hembras de *T. infestans* y parálisis acompañada de complicaciones en el proceso de muda en ninfas (Rozas-Dennis y Cazzaniga, 2000). En distintos países de Latinoamérica con centros de España, Portugal y Francia se trabajan en distintas líneas de investigación con TrV. El objetivo principal es comprobar si el virus podría ser, en un futuro cercano, utilizado como agente biológico para el control de algunos triatominos.

## 1.7 Insecticidas

### 1.7.1 Definición y características generales

La palabra insecticida se utiliza para definir a cualquier sustancia u organismo que mata los insectos a través de acciones químicas, físicas o biológicas (Metcalf y Flint, 1979). Esta definición se ajusta a la etimología de la palabra (del latín *insectus*: insecto, *cida*: el que mata), pero deja de lado a un grupo vasto de moléculas que sin matar insectos, son utilizadas para su control: atractantes, reguladores de crecimiento, sinergistas, repelentes, etc. Teniendo en cuenta que los insecticidas están entre los plaguicidas, sería más acorde definirlos con el mismo espíritu abarcativo con que fueron definidos los plaguicidas: cualquier sustancia utilizada para controlar, prevenir, destruir, repeler o mitigar plagas (en este caso, insectos) (Perry y col., 1988).

Del mismo modo que ocurre en mamíferos, en insectos, una interacción efectiva entre una molécula y su diana farmacológica depende de distintas variables. Entre las de mayor importancia están: la formulación en que se presenta el insecticida, el tiempo de exposición del insecticida sobre el insecto, y que la concentración efectiva sea alcanzada en el lugar específico de acción.

Los insecticidas pueden ingresar a los insectos por tres vías: ingestión y absorción en el aparato digestivo, contacto a través de la cutícula o a través de las vías aéreas. No es posible generalizar sobre la mayor eficacia de estas vías. Para algunas especies de insectos la vía oral es la más tóxica, mientras que para otras el contacto a través de la cutícula o la vía aérea son las más efectivas. También puede darse el caso que una misma molécula presente toxicidad sobre una misma especie de insectos por dos vías de ingreso distintas (Suchail y col., 2000). Sea cual fuese la vía, los insecticidas deben ser absorbidos y distribuidos hacia la ubicación específica de su blanco farmacológico. Cuantas más barreras deba atravesar el insecticida para tomar contacto con su diana farmacológica, más complejos serán los procesos de absorción y de distribución. Así por ejemplo, el hongo *Beauveria bassiana*, posee la capacidad de degradar



directamente la cutícula de ciertos triatominos. En este caso el insecticida establece contacto directamente con su blanco farmacológico. Los piretroides, en cambio, deben penetrar a través de la cutícula y distribuirse por la hemolinfa al tejido nervioso del insecto, en donde interactúan con los canales de sodio. Este proceso requiere de fenómenos de transporte y distribución extras a los que ocurre en el caso del hongo. La tasa de penetración y distribución que posee un insecticida en particular, está en relación directa con las propiedades físico-químicas de la molécula: su tamaño, forma, carga, liposolubilidad, etc.

Durante la penetración y el proceso de distribución, las moléculas pueden sufrir modificaciones no enzimáticas o enzimáticas, que generan diversos metabolitos. Este proceso de biotransformación, denominado metabolización, les confiere a los insectos la capacidad de eliminar numerosas moléculas con las que toman contacto continuamente. Si el metabolito generado es activo, es decir, tiene la capacidad de provocar en el insecto un efecto determinado, al proceso se lo denomina bioactivación, mientras que aquél que genera metabolitos inactivos es el de detoxificación (Perry y col., 1988). Esta biotransformación está vinculada a la estructura química del insecticida y varía con cada especie. En la degradación de xenobióticos, en general, participan tres sistemas enzimáticos: esterasas (hidrolasas), transferasas y el sistema de oxidasas de función mixta (MFO), ligado al citocromo P<sub>450</sub>, presente en todas las formas de vida, con el propósito de oxidar sustancias fuertemente lipofílicas, transformándolas en compuestos más polares y así facilitando su eliminación.

### **1.7.2 Fundamento de la elección de los principios químicos evaluados en esta Tesis**

En esta Tesis se evalúa la actividad de cinco insecticidas sobre ninfas de *T. infestans*: ivermectina (IVM), doramectina (DRM), eprinomectina (EPR), fipronil e imidacloprid. Los mismos fueron seleccionados en base a cuatro aspectos fundamentales que comparten las moléculas mencionadas:

- Amplio espectro de actividad sobre distintas clases de artrópodos

- Presencia en distintas formulaciones de uso veterinario y de fácil acceso para el público en general
- Baja toxicidad en mamíferos
- No comparten el mecanismo de acción con los piretroides (Tabla 1).

Por otra parte, si bien los piretroides no fueron evaluados en los ensayos llevados a cabo durante esta Tesis, es importante destacar sus características, ya que son la principal herramienta para el control de los triatominos.

**Tabla 1. Comparación del grupo químico, modo de acción y diana farmacológica entre los piretroides y los cinco insecticidas evaluados**

<b>Insecticida</b>	<b>Grupo químico</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Diana farmacológica</b>
<b>Deltametrina, permetrina, etc.</b>	Piretroides	Modulador de canales de sodio dependientes de carga	Canales de sodio dependientes de carga
<b>Ivermectina, doramectina y eprinomectina</b>	Avermectinas (lactonas macrocíclicas)	Modulador de canales de cloro dependientes de GABA o Glutamato	Canales de cloro asociados a ácido $\gamma$ -amino-butírico (GABA) o glutamato
<b>Imidacloprid</b>	Neonicotinoides	Agonista del receptor nicotínico de acetilcolina	Receptor nicotínico de acetilcolina
<b>Fipronil</b>	Fenilpirazoles	Antagonistas de los canales de cloro GABA y Glutamato dependientes	Canales de cloro GABA dependientes Canales de cloro Glutamato dependientes

### 1.7.2.1 Piretroides

El piretro es un concentrado que se obtiene a partir de la extracción con solventes orgánicos de flores secas de crisantemo (*Chrysanthemum cinerarifolium*). Contiene seis moléculas que en conjunto se conocen como piretrinas. Estas moléculas son ésteres que surgen como producto de la

combinación de los ácidos crisantémico y pirétrico con tres alcoholes: piretrolona, jasmolona y cinerolona. Las piretrinas se clasifican en dos grupos:

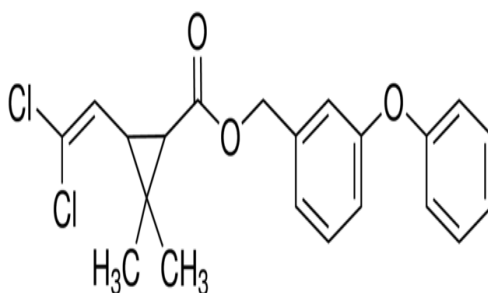
- Grupo I: piretrina I, cinerina I y jasmolina I
- Grupo II: piretrina II, cinerina II y jasmolina II

Ambos grupos difieren en los efectos principales que desencadenan en los insectos. Las piretrinas del grupo I actúan con rapidez provocando la muerte a los insectos susceptibles, mientras que las del grupo II son más efectivas en provocar el efecto de volteo o "knockdown" (principalmente en insectos voladores) (Elliott, 1989). Pese a que su acción es rápida y su toxicidad muy alta para los insectos, las piretrinas son moléculas altamente biodegradables y escasamente fotoestables, situación que determina una persistencia muy acotada en el ambiente. Por lo tanto, el objetivo primordial sobre estas moléculas, durante décadas, fue el de introducir cambios en su estructura química para eliminar sus principales limitaciones sin afectar sus cualidades.

Estos cambios propiciaron el desarrollo de los piretroides, derivados sintéticos de las piretrinas. El primer piretroide se sintetizó en EEUU en el año 1948 y se lo denominó alletrina (Elliott, 1989). Debido al espectro acotado de las especies de insectos sobre los que fueron realmente efectivas, recién en la década del 70 se produjo el verdadero auge de estas moléculas en el mercado de los insecticidas, cuando se sintetizaron los piretroides fotoestables de amplio espectro (permetrina, cipermetrina, deltametrina y fenvalerato) (Figura 4). Un gran avance en cuanto a la potencia y actividad de este grupo de insecticidas, se logró con la incorporación de un grupo  $\alpha$ -ciano en su estructura química. En la actualidad los piretroides se clasifican en dos grupos:

- Tipo I (piretrinas naturales, alletrina, tetrametrina, permetrina, etc.)
- Tipo II (cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, etc.)

Figura 4. Permetrina, ejemplo de la estructura química de un insecticida piretroide



<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/45614?lang=es&region=AR>

La diferencia entre estos dos tipos de moléculas es la presencia (tipo II) o ausencia (tipo I) del grupo  $\alpha$ -ciano en su estructura química (Casida y Quistad, 1998).

El blanco principal de los piretroides en los insectos está centrado en los canales de sodio dependientes de carga. Cuando la interacción se produce entre un canal de sodio y un piretroide Tipo I, se registra un aumento del flujo de sodio al interior de la neurona como producto de la prolongación del tiempo de apertura del canal. El resultado de este mayor flujo de iones sodio es una despolarización de la membrana neuronal, si alcanza el umbral de descarga de la neurona, provocará potenciales de acción repetitivos que favorecerán como efecto final un estado de hiperexcitación en los insectos (Errecalde y Mestorino, 2013). El signo de hiperexcitación es observado en primer lugar, después puede devenir en parálisis y muerte del insecto. Los piretroides Tipo II también actúan sobre los canales de sodio dependientes de carga, sin embargo, provocan un efecto distinto al observado en los de tipo I. Los piretroides de tipo II provocan una despolarización por apertura de canales de sodio más intensa que la que se observa para los de tipo I. Esta gran despolarización de la membrana impide la generación de nuevos impulsos nerviosos. En los insectos intoxicados con este tipo de piretroides los signos que se observan son incoordinación, postración y parálisis (Errecalde y Mestorino, 2013).

Los piretroides Tipo II también ejercen su mecanismo de acción sobre los receptores del neurotransmisor inhibitorio ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA),

inhibiendo el flujo de iones cloruro hacia el interior de la neurona. Sin embargo, esta actividad se observa sólo en altas concentraciones (Errecalde y Mestorino, 2013).

Por último, también se ha comunicado la actividad de ambos tipos de piretroides sobre los receptores colinérgicos nicotínicos, provocando una parálisis periférica del insecto por la alteración del flujo de iones a través de estos receptores (Errecalde y Mestorino, 2013).

El espectro de actividad de estas moléculas abarca desde plagas de distintos cultivos (soja, maíz, trigo, sorgo, arroz) como por ejemplo las orugas defoliadoras *Spodoptera exigua* y *Autographa gamma*; las chinches fitófagas *Nezaraviridula* y *Piezodorus guildinii*; incluyendo también a parásitos externos del ganado, como garrapatas (*Dermacentor*, *Ixodes*, etc.), moscas (*Haematobia irritans*, *Musca autumnalis*, etc.), piojos (*Bovicolaovis*, *Haematopinus eurysternus*, etc.) y ácaros (*Psoroptesovis*, *Sarcoptes scabiei*, etc.). Otro mercado en el que los piretroides evidenciaron un elevado crecimiento es el de los productos veterinarios desarrollados para el control de los parásitos externos en los animales de compañía. Siendo nuevamente el espectro de acción sobre este tipo de parásitos muy amplio: *Ctenocephalides felis* y *Ctenocephalides canis* (pulgas), *Rhipicephalus sanguineus* y *Rhipicephalus bursa* (garrapatas), etc.

### **1.7.2.2 Lactonas macrocíclicas**

Las lactonas macrocíclicas son clasificadas de acuerdo a su estructura química en dos familias: avermectinas y milbemicinas. Las avermectinas son producidas por el hongo *Streptomyces avermectilis*, mientras que las milbemicinas son sintetizadas por *Streptomyces hygrosopicus*. Ambas son moléculas de uso ampliamente difundido en medicina veterinaria. Ivermectina, doramectina y eprinomectina para el caso de las avermectinas y moxidectina como representante de las milbemicinas, son alternativas de primera elección para tratar distintos tipos de parasitosis (Díaz Carrasco y col., 2000).

Ambas familias comparten características:

- Elevada liposolubilidad que les permite en general atravesar membranas liposolubles y de esta manera ser absorbidas y distribuidas con facilidad
- Amplio espectro de acción que abarca nematodos y artrópodos (insectos y arácnidos),
- Eliminación que depende del metabolismo a nivel hepático y de la excreción a través de las heces
- Margen de seguridad amplio y
- Extraordinaria potencia que permite su dosificación en el orden de los  $\mu\text{g}$  por Kg de peso (Lankas y Gordon, 1989).

La disminución de la motilidad, parálisis y muerte, son los principales efectos que las lactonas macrocíclicas causan en los organismos susceptibles. Son ocasionados por un mayor flujo de iones cloruro al interior de las neuronas, lo que provoca una hiperpolarización de la membrana celular seguido de una depresión generalizada de la actividad del sistema nervioso del organismo. Hasta la década del 90 la principal teoría para explicar el aumento del flujo de iones de cloro registrado, tenía que ver con una modulación alostérica del receptor del neurotransmisor GABA (Bennett, 1986). En la actualidad, se considera que en nematodos y artrópodos, los principales efectos de las lactonas macrocíclicas están mediados por su actividad sobre canales de cloro afines al glutamato.

El hecho que estos canales no se hayan comunicado hasta la fecha en mamíferos, es la principal explicación del elevado margen de seguridad (Arena y col., 1995). En los mamíferos las intoxicaciones con lactonas macrocíclicas, en la mayoría de los casos, están relacionadas con la edad, especie e inclusive la raza del animal: mayor toxicidad en animales jóvenes y en ciertas razas susceptibles tales como Collie, en perros y Murray Grey, en vacunos. Los signos de intoxicación con estas moléculas se relacionan con efectos exacerbados de la actividad GABAérgica en el sistema nervioso central de los animales: midriasis, ataxia, temblor, depresión, letargia, postración e inclusive la muerte.

El espectro de las lactonas macrocíclicas es vasto. Entre los parásitos internos a los que afectan se pueden mencionar a nematodos: gastrointestinales (*Toxocara vitulorum*), pulmonares (*Dictyocaulus viviparus*), filarias (*Parafilaria bovicola*), etc. Mientras que en el campo de los artrópodos, son efectivas contra la mosca barrenadora (*Cochliomyia hominivorax*), piojos chupadores (*Haematopinus eurysternus*), ácaros (*Psoroptes ovis* y *Sarcoptes scabiei*), garrapatas (*Boophilus microplus*), etc.

La **ivermectina** (IVM) (Figura 5) se lanzó al mercado mundial en el año 1981. Se convirtió en una de las moléculas más vendida en el campo de la medicina veterinaria. Si bien es en este ámbito en el que se registró su mayor desarrollo, también en medicina humana contribuyó al control de parásitos de interés sanitario; como por ejemplo, *Onchocerca volvulus* causante de la oncocercosis. Aunque las lactonas macrocíclicas comparten entre sí gran parte del espectro de acción, no ocurre lo mismo con el comportamiento farmacocinético de cada una de las moléculas de este grupo. La ivermectina se caracteriza por su prolongada persistencia una vez administrada en el animal, una alta biodisponibilidad y un elevado volumen de distribución. La lactona macrocíclica **doramectina** (DRM) (Figura 6) posee un tiempo mayor de persistencia en el organismo que el registrado para ivermectina. Tanto el volumen de distribución como la tasa de aclaramiento de doramectina son menores que las observadas para ivermectina (Wicks y col., 1993). Esta diferencia entre los principales parámetros farmacocinéticos de ambos endectocidas determina un régimen de dosificación diferente. El desarrollo de **eprinomectina** (EPR) (Figura 7) fue un importante avance para el tratamiento de los parásitos en animales de producción lechera, debido a que esta molécula posee una escasa eliminación por leche, lo que determina concentraciones por debajo del límite máximo de residuos permitidos (LMR) y por lo tanto no se debe descartar la leche (Errecalde y Mestorino, 2013).



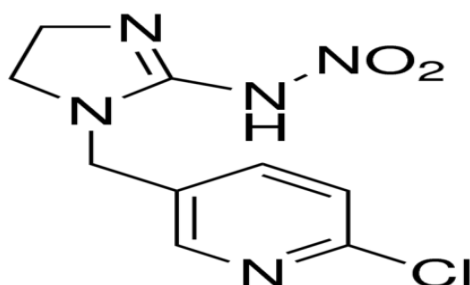


### 1.7.2.3 Imidacloprid

El imidacloprid (Figura 8) es una molécula representante del grupo de insecticidas denominado neonicotinoides. Su lanzamiento al mercado se produjo en el año 1991 y se lo utiliza como plaguicida y ectoparasiticida. En insectos, los neonicotinoides actúan como agonistas de los receptores nicotínicos de la acetilcolina y, si bien todos los neonicotinoides son agonistas, no poseen la misma eficacia. Tan y col., (2007) mediante la técnica de fijación de membranas en neuronas individuales de *Periplaneta americana*, determinaron que existen dos grupos de neonicotinoides: agonistas parciales (imidacloprid y tiacloprid) y totales (acetamiprid, dinotefurano, clotianidina y nitempiran). Esta clasificación está determinada por la eficacia de cada molécula: los agonistas parciales logran entre un 20 y 25% del total de corriente generada por la acetilcolina, mientras que los agonistas totales pueden generar corrientes entre 60 y 100%. Los principales signos de intoxicación que se observan en los insectos a causa de los neonicotinoides dependen de la estructura química de cada molécula en particular. Cuando, ya sea por ingestión o contacto, imidacloprid o tiacloprid penetran en el interior del insecto los signos evidentes de intoxicación en orden de presentación son: temblor en la zona abdominal, flexión de las alas, acicalamiento excesivo, temblores y pérdida de fuerza en las patas, tambaleo, postración y muerte. Mientras que, cuando las moléculas que ingresan al insecto son neonicotinoides que actúan como agonistas totales, los signos de intoxicación ya no están asociados con una excitación generalizada. Por el contrario, lo que se observa es una parálisis previa a la muerte del insecto (Matsuda y col., 2001). A pesar que la nicotina es una molécula muy tóxica en los mamíferos, los neonicotinoides no lo son (Matsuda y col, 2005). Existen dos teorías para explicar la diferencia de toxicidades que provocan los neonicotinoides entre los mamíferos y los insectos: la primera está sustentada por el hecho que la distribución de los receptores nicotínicos no es la misma en los mamíferos que en insectos. En los primeros estos receptores están muy distribuidos tanto en el sistema nervioso central como en el periférico, mientras que en los insectos se hallan

principalmente confinados al sistema nervioso central. La segunda teoría, que no es excluyente de la primera, se basa en lo comunicado en diferentes trabajos sobre la existencia en la naturaleza de distintos subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina. Los subtipos de estos receptores con mayores afinidades por los insecticidas neonicotinoides son los que, principalmente, se hallan presentes en insectos (Matsuda y col, 2005).

**Figura 8. Molécula de imidacloprid**



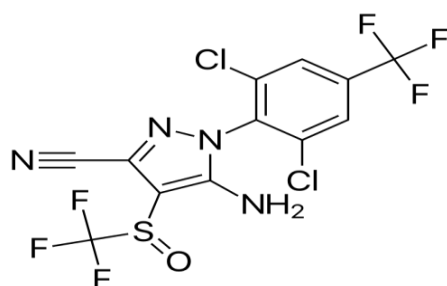
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/imidacloprid2556613826141311?lang=es&region=AR>

#### **1.7.2.4 Fipronil**

El fipronil (Figura 9) es un miembro de la familia de moléculas agrupadas bajo el nombre de fenilpirazoles. Estas moléculas son antagonistas del neurotransmisor inhibitorio GABA. Se unen al receptor del GABA en su estado de conformación tridimensional cerrado, provocando el bloqueo del influjo de iones cloruro al interior de las neuronas. El antagonismo de la actividad del GABA determina un estado de hiperexcitación en los insectos que puede desencadenar su muerte (Zhao y col., 2004). Aunque el sistema gabaérgico también esté presente en los mamíferos, el fipronil posee una mayor afinidad por las isoformas del receptor que son más habituales en los insectos. Otro mecanismo de acción propuesto para el fipronil es antagonizar los canales de cloro dependientes de glutamato (Zhao y col., 2004).

El espectro de actividad del fipronil es muy variado e incluye plagas que afectan a una gran variedad de cultivos: *Tropinotus laevipes* (pasturas), *Anurogrillus muticus* (soja), *Astylus atromaculatus* (sorgo), etc. Debido a su extendida actividad sobre garrapatas (*Boophilus microplus*, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus*, etc.) y pulgas (*Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis*, etc.), también se encuentra en formulaciones en pipetas y en aerosoles para el tratamiento de perros y gatos.

Figura 9. Molécula de fipronil



<https://es.wikipedia.org/wiki/Fipronil>

## **Hipótesis**

## Hipótesis

- 1) El avance en los últimos años en el control de artrópodos a través de agentes cada vez más selectivos y potentes, permite formular la hipótesis que de un menú que incluye avermectinas, nicotinoides y fenilpirazoles surgirán una o más alternativas para controlar el vector en uno o más de los animales a partir de los cuales se alimentan, en principio las aves y mamíferos que ocupan el espacio peridoméstico y eventualmente el hombre.
- 2) Diferentes compuestos ectoparasiticidas tendrían la capacidad de modificar ciertos patrones de conducta en *T. infestans* (tiempo y volumen de deyecciones, cantidad de sangre ingerida, tiempo de alimentación, etc.).
- 3) El uso de determinados antiparasitarios externos en forma racional y en un marco sostenible, podría representar un avance de impacto ante la carga de enfermedades (costos directos e indirectos) tan importante para nuestra región.
- 4) La modelización farmacocinética/farmacodinámica de diferentes compuestos ectoparasiticidas permitirá diseñar esquemas terapéuticos sumamente eficaces para combatir los triatominos que ocupan el espacio peridoméstico.
- 5) Los distintos grados de susceptibilidad hacia alguno de los compuestos utilizados en esta Tesis, se debe al origen geográfico diferente de las poblaciones de *T. infestans* utilizadas.

# Objetivos

## Objetivo principal

Contribuir, mediante estudios en laboratorio y en campo, al hallazgo de agentes seguros con capacidad de eliminar ejemplares de *T. infestans* del peridomicilio y domicilio en zonas endémicas de la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas.

## Objetivos específicos

1. Determinar la eficacia de moléculas antiparasitarias y pesticidas utilizadas en medicina veterinaria y humana (avermectinas, fipronil y nicotinoides) en un modelo de alimentación en laboratorio, en la letalidad de ninfas de I y V estadio de *T. infestans* provenientes de poblaciones de Santiago del Estero y Salta.

2. Estudiar la eficacia sobre ninfas de I y V estadio de *T. infestans* provenientes de poblaciones de Santiago del Estero y Salta de moléculas antiparasitarias y pesticidas utilizadas en medicina veterinaria y humana (avermectinas, fipronil y nicotinoides) aplicadas por vía tópica y por contacto con superficies tratadas.

3. Cuantificar la actividad repelente sobre ninfas de I y V estadio de *T. infestans* provenientes de poblaciones de Santiago del Estero y Salta provocada por la acción de avermectinas (doramectina, eprinomectina e ivermectina), fipronil e imidacloprid.

4. Determinar la eficacia en la letalidad de *T. infestans*, de moléculas antiparasitarias y pesticidas utilizadas en medicina veterinaria y humana (avermectinas, fipronil y nicotinoides) en un modelo de alimentación con distintas especies de animales (aves, perros y roedores).

5. Cuantificar por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), las concentraciones plasmáticas alcanzadas en los distintos animales utilizados como fuente de alimentación, de cada uno de los compuestos evaluados en el objetivo anterior.

6. Determinar el comportamiento farmacocinético de las diferentes moléculas ensayadas en los distintos animales y en *T. infestans*.

7. Diseñar un modelo farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) que permita determinar los parámetros para una terapia eficaz y racional en el hombre, mascotas y otros animales domésticos que conviven en el hábitat humano a efectos de controlar la vinchuca.

8. Estudiar los posibles mecanismos de tolerancia que se pudieran presentar hacia alguno/s de los insecticidas evaluados durante el desarrollo de esta Tesis, tanto en las ninfas susceptibles a piretroides (Santiago del Estero) como entre las resistentes a piretroides (Salta).



## Capítulo II

# **Estudio de la actividad, en condiciones de laboratorio, de ivermectina, doramectina, eprinomectina, imidacloprid y fipronil sobre ninfas de *T. infestans***

## **2.1 Introducción**

Este Capítulo aborda los bioensayos que se llevaron a cabo utilizando ninfas de *T. infestans* como único animal experimental. El principal objetivo de los mismos fue determinar la existencia de actividad triatómica del fipronil, imidacloprid, DRM, EPR e IVM sobre ninfas de *T. infestans*. Como regla general, el éxito de la interacción entre un insecticida y una especie de insecto en particular depende de diversas variables, clasificadas, según Busvine (1971), en intrínsecas y extrínsecas. Las del primer tipo están relacionadas con la especificidad del compuesto, que puede abarcar desde un grupo (ej. insectos, ácaros, etc.), una especie en particular (ej. *T. infestans*), o ser exclusivamente eficaces sobre algún estadio del desarrollo (ej. adulticidas). La edad, sexo, y tamaño del organismo también son variables intrínsecas.

Los factores extrínsecos incluyen: temperatura, humedad, tipo de alimentación, iluminación y densidad poblacional. Para una estandarización de los resultados, lo ideal es mantener la mayor cantidad de variables constantes, e ir estudiando la influencia de cada una de manera individual.

En los experimentos de esta sección se estudió la influencia de tres variables fisiológicas de las ninfas sobre la respuesta a los insecticidas: estadio de desarrollo, estado de alimentación y susceptibilidad frente a los piretroides. La elección de estas variables, tiene como sustento un número importante de antecedentes de investigación en los que se constató su influencia en la actividad de ciertos insecticidas (Busvine, 1971).

El estudio de la actividad de los insecticidas se realizó mediante la exposición de los insectos a dosis/concentraciones crecientes de las moléculas ensayadas. Un método para conocer la actividad insecticida de un compuesto es determinar la dosis/concentración necesaria para matar al 50% de la población en

estudio (DL<sub>50</sub>/CL<sub>50</sub>). Para el cálculo de la DL<sub>50</sub>, se topicaron en la zona dorsal de los insectos dosis crecientes de los insecticidas. Las CL<sub>50</sub> se calcularon utilizando dos vías de ingreso en las ninfas: mediante el contacto directo de los insectos con superficies tratadas con los insecticidas, o mediante el uso de un alimentador artificial para conocer la CL<sub>50</sub> ocasionada por la ingesta de las moléculas. La capacidad repelente de cada insecticida fue determinada mediante la técnica de preferencia de área.

En estos ensayos las variables extrínsecas fueron mantenidas constantes (sección de Materiales y métodos).

## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Principios activos**

Acetona: (≥99,9%, Sigma Aldrich)

Imidacloprid: (97,5%, Romikin, S. A.)

Fipronil: (95,4%, Romikin, S. A.)

Ivermectina: (90%, Romikin, S.A.)

Doramectina: (94,8%, Romikin S.A.)

Eprinomectina: (90,7%, Romikin S.A.)

### **2.2.2 Animales experimentales**

Se utilizaron ninfas de I y V estadio de *T. infestans* susceptibles a piretroides provenientes de la colonia de nuestro insectario existente en el Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos –LEFYT-, de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Esta colonia se constituyó con individuos enviados desde el Centro de Referencia de Vectores (CeReVe), Santa María de Punilla, Córdoba, Argentina. El origen de los insectos de la colonia del CeReVe fue a partir de localidades de la provincia de Santiago del Estero (Argentina),

ubicadas en aéreas en donde las vinchucas son controladas exitosamente mediante el rociado con piretroides.

Se utilizaron, también, ninfas de I y V estadio de *T. infestans* resistentes a piretroides. En este caso, los insectos iniciadores de la colonia fueron capturados en la localidad de Salvador Mazza, Salta, Argentina. En esta zona, las campañas de rociado con piretroides para el control de *T. infestans* son consideradas ineficaces debido a la rápida reinfestación con vinchucas que se registra en los hogares.

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

### **2.2.3 Determinación de la DL<sub>50</sub> en ninfas de I y V estadio de *T. infestans* en estado de ayuno**

Para la determinación de la DL<sub>50</sub> de los cinco insecticidas sobre ninfas de I y V estadio de *T. infestans* se siguió el protocolo de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1994). Para ello se utilizaron ninfas con 12-15 días de ayuno post-ecdisis. El bioensayo en el que se determinó la respuesta binaria (muerto o vivo) con una variable independiente (dosis), consistió en la aplicación tópica de 0,2 o 1  $\mu\text{L}$  del principio activo disuelto en acetona sobre la zona dorsal del abdomen de ninfas de I o V estadio, respectivamente.

Para la confección de las curvas dosis-respuesta se evaluaron dosis crecientes del insecticida teniendo en cuenta que al menos cuatro de estas dosis causaran entre 10 y 90% de mortalidad entre las ninfas. Para el control se realizó el mismo procedimiento salvo que a las ninfas se les aplicó, de acuerdo al estadio, 0,2 o 1  $\mu\text{L}$  de acetona sin insecticida. Durante el ensayo de topicación se evaluó la incidencia de tres variables fisiológicas distintas sobre la toxicidad de los insecticidas en ninfas de *T. infestans*: estadio (I y V), estado nutricional (ayuno y alimentación a repleción) y susceptibilidad a los piretroides (susceptibles y resistentes). Por lo tanto, se conformaron cuatro categorías de ninfas por cada

estadio: ayunadas susceptibles, alimentadas susceptibles, ayunadas resistentes y alimentadas resistentes.

En las distintas categorías de ninfas ayunadas, el rango de dosis evaluado de IVM, DRM y EPR fue de 100-600 nanogramos/insecto (ng/i).

El rango de dosis de imidacloprid para cada categoría de ninfas ayunadas fue de: 1-10 (ng/i) y 5-40 ng/i para ninfas de I y V estadio susceptibles a piretroides. Los rangos de dosis de imidacloprid ensayados en las ninfas resistentes fueron de 1-80 ng/i y 5-120 ng/i para las ninfas de I y V estadio, respectivamente.

En el caso del fipronil, los rangos de dosis evaluados entre las ninfas susceptibles y resistentes a piretroides de I y V estadio fueron de 1-20 ng/i y de 1-100 ng/i, respectivamente.

El ensayo se replicó tres veces en días distintos bajo las mismas condiciones y con soluciones frescas preparadas el día del estudio. Se utilizaron 10 ninfas por dosis y por repetición (30 insectos por cada dosis evaluada) y 10 vinchucas como control. Después de la aplicación tópica, los distintos grupos de insectos fueron alojados en recipientes rotulados registrando los cambios producidos a las 24, 48, 72 y 168 h. Se consideró como muerto al insecto que no pudo desplazarse desde el centro hasta el borde de un papel de filtro de 9 cm de diámetro por sus propios medios en forma espontánea o después de ser estimulado mecánicamente mediante una pinza. Los insectos identificados como muertos se retiraron del recipiente en donde estaban alojados y se colocaron en contenedores rotulados, y al siguiente tiempo de evaluación se los volvió a observar para constatar su estado. Este criterio de muerte de las ninfas fue el mismo en todos los ensayos llevados a cabo durante esta Tesis.

#### **2.2.4 Determinación de la DL<sub>50</sub> en ninfas de I y V estadio de *T. infestans* en estado de alimentación a repleción**

En este ensayo, se utilizaron ninfas alimentadas a repleción sobre gallinas. Para lo cual, se emplearon recipientes conteniendo 10 ninfas con 12-15

días de ayuno post-ecdisis. Cada vinchuca fue individualizada mediante una marca de pintura acrílica de diferente color (AD acrílico, Argentina). Los insectos fueron pesados individualmente antes y después de la alimentación (la que duró 30 minutos) utilizando una balanza de precisión Denver Instrument (USA).

Posteriormente se calculó el cociente peso post/prealimentación. Solamente se utilizaron para los ensayos aquellos insectos que reflejaron una relación de 4 o más en este cociente (Figura 10). Para determinar la  $DL_{50}$  se siguió exactamente el mismo procedimiento que con las ninfas ayunadas. Para descartar una posible mortalidad debido a la manipulación extra que sufrieron las ninfas alimentadas en comparación con las ayunadas, se realizó un control, para el cual 40 ninfas de cada estadio fueron divididas en dos grupos al azar de 20 individuos (A y B). A las vinchucas del grupo A, después de ser alimentadas sobre gallinas, se les topicó el volumen correspondiente de acetona de acuerdo a su estadio y a las del grupo B, se las marcó con pintura y se las alimentó y pesó tal como previamente fue descrito, por último, recibieron el mismo volumen de acetona que las del grupo A. Durante 2 semanas postopicación se registró la mortalidad de ambos grupos sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas.

En el caso del imidacloprid, las dosis evaluadas para cada categoría de ninfas alimentadas a repleción fueron los siguientes: para las ninfas susceptibles a piretroides, los rangos de dosis fueron de 1-10 ng/i y de 2-12 ng/i para las ninfas de I y V estadio, respectivamente. En el caso de las vinchucas resistentes a piretroides los rangos de dosis fueron de 1-30 ng/i y de 5-120 ng/i para las ninfas de I y V estadio, respectivamente.

Para el fipronil, en el caso de las ninfas susceptibles a piretroides los rangos de dosis evaluados fueron de 0,5-2 ng/i y de 10-100 ng/i para los individuos de I y V estadio, respectivamente. Mientras que fueron evaluados rangos de dosis de 0,25-2 ng/i y de 1-100 ng/i en vinchucas resistentes a piretroides de I y V estadio, respectivamente.

**Figura 10. Ejemplar de V estadio de *T. infestans* antes y después de alimentarse durante 30 min sobre gallina**



En este ejemplar la relación entre el peso post y prealimentación fue de 4,55."Antes de que comience a chupar, ese insecto es completamente plano, pero a medida que absorbe sangre se redondea, y en este estado se aplasta fácilmente." (Charles Darwin, Viaje de un naturalista alrededor del mundo, 1845)

#### **2.2.5 Determinación de la CL<sub>50</sub> en ninfas de I y V estadio de *T. infestans* en estado de ayuno y alimentadas a repleción**

Se determinó la CE<sub>50</sub> de los cinco insecticidas evaluados en la presente Tesis sobre ninfas de I y V estadio de *T. infestans* en dos superficies de contacto distintas: papel de filtro y vidrio.

Para los ensayos con papel de filtro se utilizaron discos de 9 cm de diámetro (Schleicher & Schül, Alemania), mientras que el contacto sobre vidrio se determinó utilizando placas de Petri del mismo diámetro. Para ambas superficies se siguieron las pautas establecidas en el protocolo de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1994). Los cinco insecticidas se disolvieron a distintas concentraciones en acetona. Se impregnó la superficie completa del papel o el vidrio (64 cm<sup>2</sup>) utilizando micropipeta con un volumen total de 1 mL de las distintas diluciones. De esta manera se logró impregnar cada cm<sup>2</sup> con un volumen de 16 µL de la dilución. Las superficies impregnadas fueron evaporadas durante 24 h. Tras la evaporación, los papeles de filtro fueron colocados en el fondo de recipientes plásticos en donde se alojaron 10 ninfas de I o V estadio (Figura 11). En el caso de las placas de Petri, se colocó el mismo número de insectos que en el papel de filtro y cada placa fue cubierta con tela tul sujeta por bandas elásticas

para evitar la fuga de las ninfas. Después de permanecer durante 1 h en contacto con las superficies tratadas (vidrio o papel), las ninfas fueron re-ubicadas en contenedores plásticos limpios. El ensayo fue replicado en tres oportunidades independientes con soluciones nuevas preparadas para cada réplica. Se evaluaron 10 ninfas por cada concentración y por cada réplica (30 ninfas por cada concentración). El estado de los insectos fue observado a las 24, 48, 72 y 168 h de haber estado en contacto con las superficies. Como control se realizó el mismo procedimiento pero las superficies fueron impregnadas solamente con acetona. Se utilizaron 10 individuos como control en cada una de las réplicas.

Ante la falta de datos y antecedentes en *T. infestans* sobre la actividad en ensayos de contacto de los insecticidas evaluados, se decidió comenzar el estudio utilizando altas concentraciones de las moléculas, después de realizar diluciones del orden de 1/10, para finalmente ajustar las concentraciones de manera que al menos 4 puntos registren mortalidades entre 10 y 90%. Los rangos de dosis variaron según la categoría de ninfas evaluadas.

En el caso de las ninfas alimentadas a repleción se siguió el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior. Al igual que lo especificado para el ensayo de topicación, se utilizaron insectos con una relación entre el peso post y prealimentación de 4 o más.

Durante el ensayo de contacto con distintas superficies se probó nuevamente la incidencia de tres variables fisiológicas sobre la toxicidad de los cinco insecticidas: estadio (I y V), estado nutricional (ayuno y alimentación a repleción) y susceptibilidad a los piretroides (susceptibles y resistentes). Por lo tanto, se conformaron cuatro categorías de ninfas por cada estadio: ayunadas susceptibles, alimentadas susceptibles, ayunadas resistentes y alimentadas resistentes.

Tanto en papel de filtro como en vidrio, el rango de concentraciones de los tres endectocidas evaluado fue de 100-600 µg/mL.

Los rangos de concentraciones del imidacloprid evaluado sobre papel de filtro fueron 10-75 mg/mL y 25-375 mg/mL para las ninfas ayunadas susceptibles a piretroides de I y V estadio respectivamente. En el caso de las vinchucas



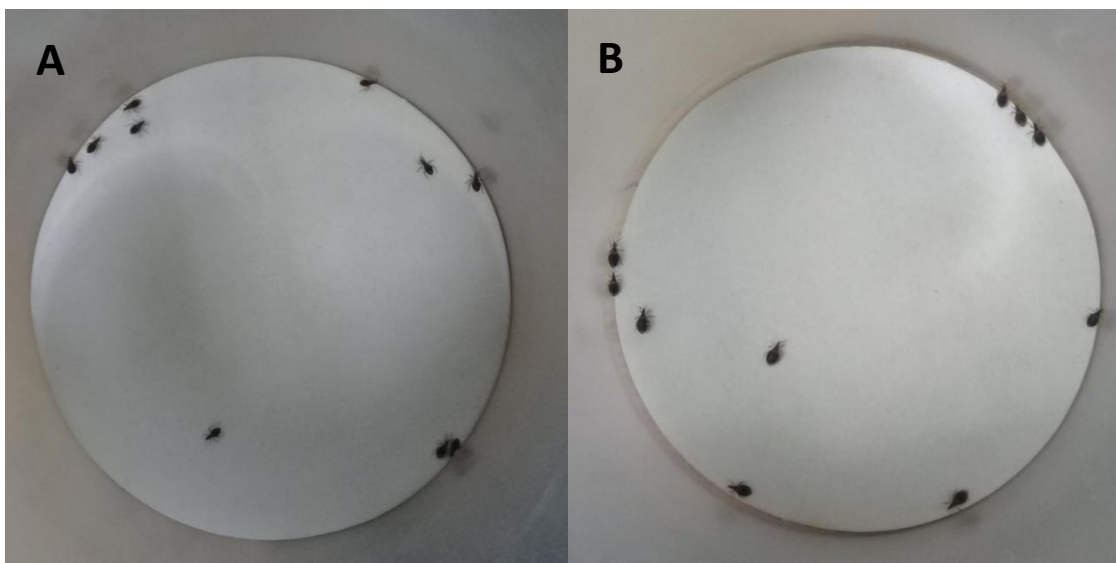
resistentes en estado de ayuno los valores fueron de 10-200 mg/mL y de 25-500 mg/mL en ninfas de I y V estadio, respectivamente. Para las ninfas alimentadas a repleción, los valores de las concentraciones oscilaron de 10-50 mg/mL y de 25-500 mg/mL en las ninfas de I y V estadio susceptibles a piretroides. En cuanto a las vinchucas alimentadas a repleción resistentes a piretroides, las concentraciones utilizadas fueron de 10-150 mg/mL y de 25-500 mg/mL para ambos estadios respectivamente.

Para el fipronil impregnado en papel de filtro, las concentraciones fueron 1-10 mg/mL y de 3-40 mg/mL para las ninfas ayunadas susceptibles a los piretroides de I y V estadio, respectivamente. Para las vinchucas resistentes en estado de ayuno los rangos de concentraciones fueron de 2-10mg/mL y de 5-40mg/mL en ninfas de I y V estadio, respectivamente. Entre las categorías de vinchucas alimentadas a repleción los valores de las concentraciones impregnadas fueron de 0,5-3 mg/mL y de 2,5-20 mg/mL para ninfas susceptibles a piretroides de I y V estadio. Entre las ninfas resistentes a piretroides en estado de alimentación a repleción los valores fueron de 0,5-4 y de 2,5-25 mg/mL para las de I y V estadio, respectivamente.

En la superficie de vidrio el rango de concentraciones de imidacloprid que fue evaluado sobre todas las categorías de ninfas fue de 10-400 mg/mL.

En el caso del fipronil, los valores para las ninfas susceptibles y resistentes a piretroides en estado de ayuno fueron de 0,5-4 mg/mL y 2-16 mg/mL para los individuos de I y V estadio, respectivamente. Entre los insectos alimentados a repleción los valores de las concentraciones fueron 0,5-3 mg/mL y de 2-8 mg/mL para las ninfas susceptibles de I y V estadio. Mientras que entre las ninfas resistentes los valores de las concentraciones evaluadas fueron de 0,5-3,5 mg/mL y de 4-8 mg/mL para el I y V estadio, respectivamente.

**Figura 11. Ninfas de I estadio en contacto con papel de filtro tratado con imidacloprid. A) Ninfas de I estadio en estado de ayuno, B) Ninfas de I estadio en estado de alimentación a repleción**



### **2.2.6 Determinación de la CL<sub>50</sub> de IVM, DRM, EPR, fipronil e imidacloprid administrados por vía oral en ninfas de V estadio de *T. infestans***

Se preparó una solución stock estándar primaria, conteniendo 1.000 µg/mL, con cada uno de los principios químicos a ensayar. Para lo cual se pesaron 10 mg de cada insecticida (cabe destacar, que se realizó una corrección de acuerdo a la potencia de cada uno de los insecticidas) en un matraz aforado de 10 mL, se lo disolvió y se llevó a volumen con metanol calidad cromatográfica (Baker Mallinckrodt Inc.). A partir de las soluciones primarias se prepararon diariamente las diversas soluciones de trabajo (secundarias) a ensayar. De estas soluciones secundarias se obtuvo una alícuota necesaria para lograr las distintas concentraciones que se ensayaron durante el experimento. Posteriormente el solvente de las alícuotas se evaporó en tubos cónicos de vidrio borosiliconado a 50 °C bajo corriente de nitrógeno. El residuo seco fue disuelto mediante agitación constante durante 30 minutos en 50 mL de sangre heparinizada proveniente de bovinos, raza Holando Argentino, en perfectas condiciones de salud y que no

hubiesen recibido tratamiento antiparasitario alguno durante los 6 meses previos al comienzo del estudio. La sangre con cada una de las distintas concentraciones a evaluar fue colocada en una cámara de alimentación para continuar con el ensayo.

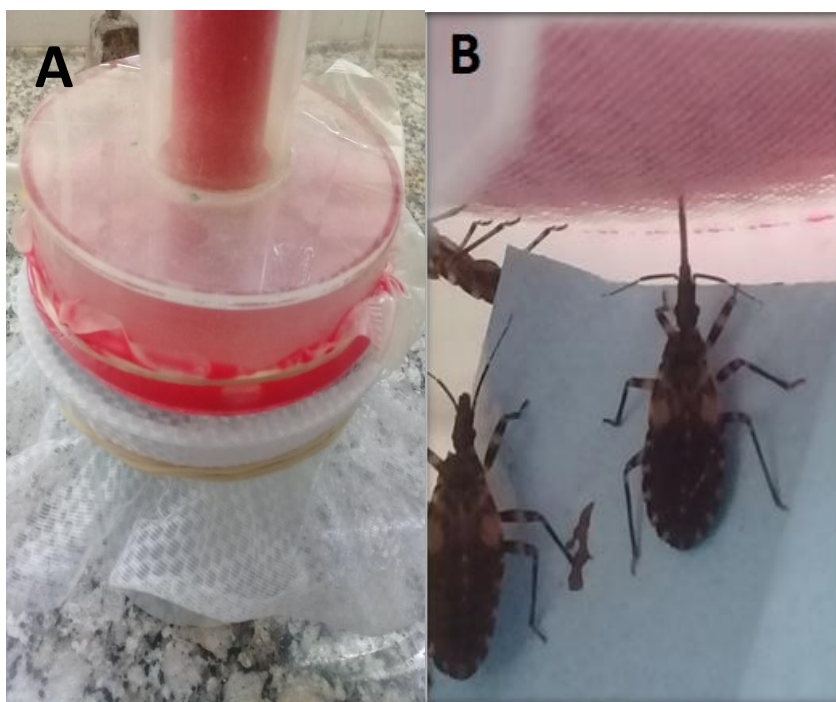
### **2.2.6.1 Técnica de alimentación**

Para este ensayo utilizamos ninfas de V estadio, susceptibles y resistentes a piretroides. La alimentación de los ejemplares de *T. infestans* se realizó mediante una cámara de alimentación similar a la empleada por Núñez y Lazzari (1990). El alimentador artificial fue construido utilizando una cápsula de vidrio por donde se permitió circular, a través de una serpentina de vidrio, agua termostaticada; la base de la cápsula fue cerrada con una cubierta de látex. La sangre bovina, heparinizada y termostaticada (35-37 °C), fue colocada dentro de la cápsula en contacto con el látex (Figura 12). A las vinchucas contenidas en potes de plástico (10 ninfas por cada pote) se les permitió alimentarse durante una hora, a través del látex, de la sangre bovina fortificada a diferentes concentraciones con cada una de las moléculas en estudio. IVM, DRM y EPR fueron evaluadas en un rango de concentraciones de 0,4-100 ng/mL. Mientras que el firponil y el imidacloprid se ensayaron con concentraciones incluidas en el rango de 10-400 mg/mL.

Durante este ensayo se estudiaron las siguientes variables de respuesta: muerte y cantidad de alimento ingerido. Para determinar la  $CL_{50}$  cada concentración evaluada de los distintos insecticidas se replicó tres veces, después de finalizado el tiempo de alimentación los insectos fueron observados cada 24 h durante una semana. El criterio de muerte fue el explicado en la sección anterior. Se utilizó sangre heparinizada sin fortificar con las moléculas en estudio en el caso del control negativo.

Se determinó el consumo promedio de sangre por insecto mediante la diferencia de peso pre y postalimentación, tal lo mencionado previamente.

**Figura 12. Alimentación artificial de *T. infestans*. A) Alimentador artificial con sangre bovina. B) Ejemplar de V estadio de *T. infestans* atravesando con su rostro extendido la membrana del alimentador artificial para procurarse el alimento**



### **2.2.7 Estudio de la actividad repelente de IVM, DRM, EPR, fipronil e imidacloprid sobre ninfas de I y V estadio de *T. infestans***

El método elegido para la evaluación fue la técnica de área de preferencia en ninfas de *T. infestans*. El fundamento de ésta consiste en ofrecer al insecto una mitad del área total de superficie de contacto tratada con distintas concentraciones del insecticida y la otra mitad sin tratamiento. En caso de existir repelencia por parte del insecticida, el insecto se ubicará en la zona libre de la molécula. En el control una de las mitades se trató con acetona y la otra mitad no recibió tratamiento. Para el ensayo con ninfas de V estadio se utilizaron papeles de filtro de 9 cm de diámetro (Schleisher & Schüll), que fueron colocados en cajas de Petri del mismo diámetro. Para evaluar a los insectos de I estadio se utilizaron papeles de filtro de 3,5 cm de diámetro que fueron colocados en policubetas de 6

pocillos. En ambos estadios de ninfas se evaluaron tres concentraciones de cada uno de los insecticidas, cada concentración fue expuesta a 10 vinchucas que fueron colocadas en papeles de filtro individuales (Figura 13). A su vez, el ensayo fue replicado en tres oportunidades, en cada una se utilizaron diluciones frescas preparadas en el día. En cada réplica se utilizaron 10 ninfas como control. El volumen de las distintas concentraciones sembrado en la mitad del papel tratado fue de 500  $\mu$ L para evaluar a las ninfas de V estadio y de 77  $\mu$ L para las de I estadio. Las mitades tratadas se dejaron evaporar durante 24 h antes de tomar contacto con los insectos. Cada área tratada fue unida con la otra no tratada por medio de cinta transparente. Los tiempos de observación en los cuales se constató la ubicación de los insectos fueron a 1, 24 y 48 h desde el tiempo 0 (colocación del insecto sobre el centro del papel). La actividad repelente (PR) de cada insecticida fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$PR = \frac{N_s - N_t}{N_s + N_t} \times 100$$

En la cual:

Ns: número de insectos en el área sin tratar.

Nt: número de insectos en el área tratada.

En el caso que la mayoría de los insectos se encuentren en el área sin tratar ( $N_s > N_t$ ), el signo de PR será positivo e interpretado como actividad repelente. El signo negativo de PR ( $N_t > N_s$ ) significa que la mayoría de los insectos se ubicó en la mitad tratada y se interpreta como actividad atrayente.

Al igual que lo estudiado con las ninfas en los ensayos de topicación y de exposición de los insecticidas en papel de filtro y vidrio, en el presente ensayo se evaluó la influencia de tres variables fisiológicas, en dos condiciones distintas, sobre la actividad repelente de los insecticidas:

- Estadio de las ninfas (I y V))
- Estado de susceptibilidad frente a los piretroides (susceptibles y resistentes)
- Estado nutricional (ayunadas y alimentadas a repleción).

Las concentraciones evaluadas de IVM, DRM y EPR fueron de 10-200 ng/mL, mientras que las concentraciones para el fipronil y el imidacloprid estuvieron en el rango de 100-200 mg/mL.

**Figura 13. Ensayo de repelencia con ninfas de V estadio de *T. infestans***



### 2.2.8 Análisis estadístico

Para constatar la relación entre las distintas dosis o concentraciones de los insecticidas con la mortalidad de las ninfas se utilizó el modelo probit (Litchfield, 1949). El probit es un modelo de regresión en el que la variable dependiente es binaria, en este caso: vivo o muerto. Se basa en la distribución normal acumulada de la respuesta de las unidades experimentales a una variable explicativa, por ejemplo: dosis. La transformación probit permite relacionar una mortalidad determinada con la dosis necesaria para provocarla. Los datos de mortalidad obtenidos entre las ninfas tratadas fueron corregidos teniendo en cuenta la mortalidad de las ninfas control utilizando la fórmula de Abbott (Abbott W., 1925):

$$\text{Mortalidad corregida} = \frac{(\% \text{ de mortalidad NT} - \% \text{ de mortalidad NC})}{(100 \% - \% \text{ de mortalidad NC})} \times 100$$

En la que:

NT: ninfas tratadas con distintas dosis o concentraciones del insecticida disuelto en un solvente determinado.

NC: ninfas control, solo recibieron el solvente sin insecticida disuelto.

A partir de los datos de las mortalidades corregidas, utilizando el software POLO-PLUS (LeOra Software, 1987), se obtuvieron las diferentes curvas dosis-respuesta o concentración-respuesta de los insecticidas evaluados y también, se calcularon los valores de DL<sub>50</sub> o CL<sub>50</sub> con sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC 95%). Para conocer las diferencias de susceptibilidades entre los distintos estadios y poblaciones de ninfas de *T. infestans* se realizó el cálculo de la relación entre las DL<sub>50</sub> (RDL<sub>50</sub>) o CL<sub>50</sub> (RCL<sub>50</sub>), estos valores fueron acompañados de sus respectivos intervalos de confianza del 95%, por ejemplo, para conocer la RDL<sub>50</sub> entre una población de ninfas A con respecto a una población B, se debe realizar el cálculo DL<sub>50(A)</sub> / DL<sub>50(B)</sub> y a continuación determinar el IC 95% de la relación. Las DL<sub>50</sub> o CL<sub>50</sub> se consideran significativamente distintas cuando el IC 95% de la RDL<sub>50</sub> o de la RCL<sub>50</sub> no incluye al número 1,0 ( $p < 0,05$ ) (Robertson, 2007). Cada DL<sub>50</sub> o CL<sub>50</sub> es acompañado por el valor de la pendiente de la regresión probit, la pendiente estima el cambio de actividad por unidad de incremento de dosis o concentración (Robertson, 2007).

En el ensayo del alimentador artificial se utilizó análisis de varianza para determinar la posible existencia de diferencias en el volumen de sangre consumida por los distintos grupos de ninfas. Para el procesamiento de datos se utilizó el programa estadístico STATA 11SE (Stata Corporation, College Station, TX). Los resultados del ensayo de repelencia se analizaron utilizando ANOVA de una vía con un nivel de significancia de 0,05.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 DL<sub>50</sub>

Bajo nuestras condiciones experimentales ninguno de los tres endectocidas estudiados (EPR, DRM e IVM) demostró efectos tóxicos sobre las ninfas de *T. infestans*. La falta de toxicidad de estas moléculas se pudo constatar en todas las categorías de las ninfas evaluadas. El rango de dosis evaluado para estos tres insecticidas fue de 100-600 ng/insecto.

En el caso del fipronil y del imidacloprid se pudo calcular su DL<sub>50</sub> para cada una de las ocho categorías de ninfas evaluadas. En las Tablas 2 y 3, se puede observar la evolución de la cinética de toxicidad del imidacloprid y fipronil, respectivamente. Entre las ninfas alimentadas a repleción ambas moléculas demostraron un comportamiento similar: tanto entre las ninfas de I estadio como en las de V, se constató, independientemente del estado de susceptibilidad a los piretroides, una mortalidad máxima a las 24 h postopicación, que se mantuvo constante durante el tiempo de observación (168 h).

En el caso de los individuos ayunados, la cinética de la respuesta tóxica no fue tan homogénea como en el caso de las ninfas alimentadas a repleción. En las Tablas 2 y 3 se puede observar que en todas las categorías de ninfas ayunadas ambas moléculas aumentaron su toxicidad después de las 24 h de haber sido tratadas en forma tópica. En el caso del imidacloprid, en tres categorías de ninfas la molécula exhibió su máxima eficacia 48 h después del tratamiento tópico (ninfas de I estadio susceptibles y resistentes y V estadio resistentes), mientras que entre las ninfas de V estadio susceptibles la máxima mortalidad se registró después de las 72 h de la topicación (Tabla 2). Es interesante observar que en algunos casos el aumento de la toxicidad registrado en el tiempo fue mínimo, por ejemplo, entre las ninfas de I estadio la DL<sub>50</sub> varió de 43,4 a 40,8 ng/i entre las 24 y las 48 h, mientras que en otros casos, la diferencia fue sustancial, así lo reflejan, por ejemplo, las DL<sub>50</sub> obtenidas entre las vinchucas



de V estadio resistentes a piretroides (197,1 vs 78,8 ng/i, a las 24 y 48 h, respectivamente).

**Tabla 2. Estudio de la toxicidad del insecticida imidacloprid sobre ninfas de I y V estadio de *T. infestans* en el tiempo de estudio**

DL <sub>50</sub> (ng/i) <sup>a</sup> (IC 95%) <sup>b</sup>				
Tiempo postadministración del imidacloprid				
	24 h	48 h	72 h	168 h
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	10,3 (7,0-24,0)	4,6 (3,6-5,8)	4,6 (3,6-5,8)	4,6 (3,6-5,8)
Alimentadas	2,6 (1,8-3,3)	2,6 (1,8-3,3)	2,6 (1,8-3,3)	2,6 (1,8-3,3)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	43,4 (24,4-157,3)	40,8 (29,2-60,5)	40,8 (29,2-60,5)	40,8 (29,2-60,5)
Alimentadas	10,3 (8,1-13,4)	10,3 (8,1-13,4)	10,3 (8,1-13,4)	10,3 (8,1-13,4)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	66,7 (51,5-99,7)	66,7 (51,5-99,7)	23,5 (19,3-30,8)	23,5 (19,3-30,8)
Alimentadas	8,5 (7,2-10,3)	8,5 (7,2-10,3)	8,5 (7,2-10,3)	8,5 (7,2-10,3)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	197,1 (144,2-320,3)	78,8 (62,0-110,2)	78,8 (62,0-110,2)	78,8 (62,0-110)
Alimentadas	46,2 (38,6-56,5)	46,2 (38,6-56,5)	46,2 (38,6-56,5)	46,2 (38,6-56,5)

<sup>a</sup> Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>b</sup> Intervalos de confianza del 95%

En el caso del fenilpirasol en dos categorías de vinchucas ayunadas aumentó su efecto entre las 24 y 48 h de haber sido topicado (susceptibles de I estadio y resistentes de V estadio), mientras que en las restantes categorías la molécula aumentó su eficacia entre las 48 y 72 h (Tabla 2.2).

**Tabla 3. Estudio de la evolución en el tiempo de la toxicidad del fipronil sobre ninfas de *T. infestans* de I y V estadio**

<b>DL<sub>50</sub> (ng/i)<sup>a</sup> (IC 95%)<sup>b</sup></b>				
<b>Tiempo postadministración del fipronil</b>				
	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>168 h</b>
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	5,9 (4,6-7,5)	4,0 (3,1-5,0)	4,0 (3,1-5,0)	4,0 (3,1-5,0)
Alimentadas	0,9 (0,7-1,1)	0,9 (0,7-1,1)	0,9 (0,7-1,1)	0,9 (0,7-1,1)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	9,7 (3,6-12,3)	9,7 (3,6-12,3)	5,7 (3,6-9,3)	5,7 (3,6-9,3)
Alimentadas	1,1 (0,9-1,3)	1,1 (0,9-1,3)	1,1 (0,9-1,3)	1,1 (0,9-1,3)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	17,7 (5,2-62,3)	17,7 (5,2-62,3)	8,3 (1,8-24,5)	8,3 (1,8-24,5)
Alimentadas	3,8 (2,3-5,8)	3,8 (2,3-5,8)	3,8 (2,3-5,8)	3,8 (2,3-5,8)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	29,4(17,5-56,7)	13,1 (8,3-20,1)	13,1 (8,3-20,1)	13,1 (8,3-20,1)
Alimentadas	6,5 (3,9-9,9)	6,5 (3,9-9,9)	6,5 (3,9-9,9)	6,5 (3,9-9,9)

<sup>a</sup> Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>b</sup>Intervalos de confianza del 95%

Los resultados de las Tablas 4 - 5 y las Figuras 14 - 15 detallan la toxicidad del imidacloprid y fipronil a las 168 h de haber sido topicados sobre ninfas de *T. infestans* de I y V estadio. En las Tablas se pueden observar las relaciones entre las DL<sub>50</sub> de los insectos ayunados versus los alimentados a repleción. Para conocer la influencia del estado nutricional sobre la eficacia de los insecticidas se compararon ninfas del mismo estadio y el mismo estado frente a los piretroides. En las cuatro comparaciones que surgieron de las DL<sub>50</sub> obtenidas para el imidacloprid se observó una mayor susceptibilidad al insecticida en las ninfas alimentadas con respecto a las que permanecieron en ayuno durante el ensayo. Los cuatro valores de las RDL<sub>50</sub> fueron superiores a 1 y la ausencia del número 1,0 dentro del IC 95% significa una diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones alimenticias ( $p < 0,05$ ) (Tabla 4).

**Tabla 4. Relación entre el estado nutricional y la toxicidad del imidacloprid sobre ninfas de *T. infestans* de I y V estadio después de 168 h de haber sido topicado**

	n <sup>a</sup>	DL <sub>50</sub> (ng/i) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RDL <sub>50</sub> <sup>e</sup> (IC 95%)
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	150	4,6 (3,6-5,8)	2,2 ± 0,4	
Alimentadas	150	2,6 (1,8-3,3)	2,5 ± 0,5	1,7 (1,2-2,5)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	150	40,8 (29,2-60,5)	1,4 ± 0,3	
Alimentadas	150	10,3 (8,1-13,4)	1,9 ± 0,3	3,9 (2,5-6,0)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	150	23,5 (19,3-30,8)	2,7 ± 0,4	
Alimentadas	150	8,5 (7,2-10,3)	3,5 ± 0,6	2,7 (2,1-3,6)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	150	78,8 (62,0-110,2)	2,0 ± 0,3	
Alimentadas	150	46,2 (38,6-56,5)	2,5 ± 0,2	1,7 (1,2-2,4)

<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación      <sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

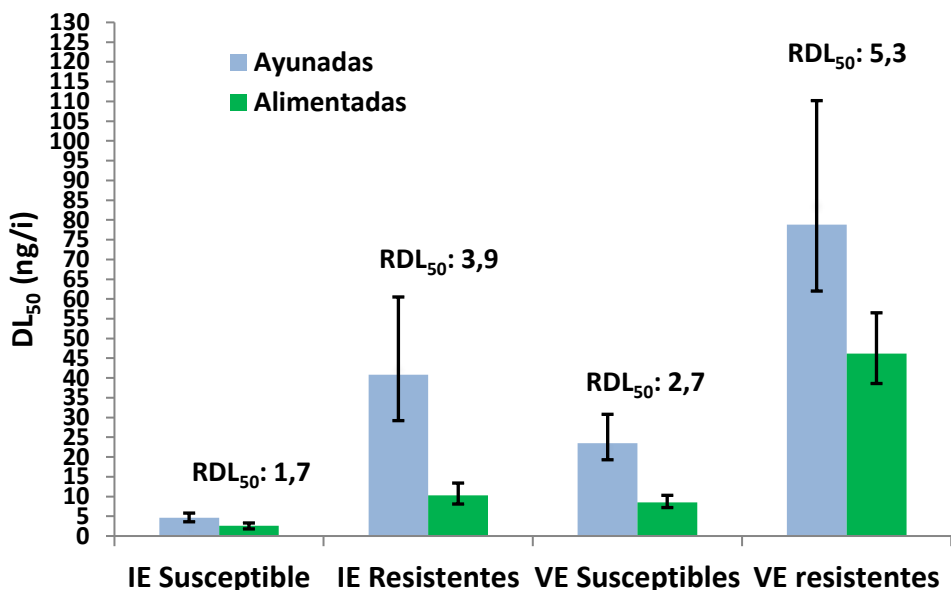
<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las DL<sub>50</sub>: DL<sub>50</sub> (ninfas ayunadas) / DL<sub>50</sub> (ninfas alimentadas)

El promedio de las cuatro RDL<sub>50</sub> fue de 2,5 ± 0,9. La mayor diferencia de susceptibilidad al imidacloprid de acuerdo al estado nutricional se halló entre las ninfas del I estadio resistentes a piretroides (RDL<sub>50</sub>: 3,9 (2,5-6,0)), disminuyendo la diferencia de toxicidad en el V estadio de ninfas resistentes a los piretroides (RDL<sub>50</sub>:1,7 (1,2-2,4)). En el caso de las ninfas susceptibles a los piretroides las diferencias de toxicidades según el estado nutricional del insecto fueron similares con una RDL<sub>50</sub> de 1,7 (1,2-2,5) y 2,7 (2,1-3,6) para el I y V estadio, respectivamente (Figura 14).

Figura 14. Toxicidad diferencial de imidacloprid con respecto al estado nutricional en ninfas de I y V estadio de *T. infestans* susceptibles y resistentes a piretroides



IE: ninfas de I estadio  
 Sus: ninfas susceptibles a piretroides  
 Ayu: ninfas ayunadas  
 RDL<sub>50</sub>: relación entre la DL<sub>50</sub> (ninfas ayunadas) / DL<sub>50</sub> (ninfas alimentadas)

VE: ninfas de V estadio  
 Res: ninfas resistentes a piretroides  
 Ali: ninfas alimentadas

En cuanto al fipronil, al igual que lo ocurrido con imidacloprid, se constató una mayor susceptibilidad a la molécula en las vinchucas alimentadas a repleción. En la Tabla 5 se observa que los valores obtenidos a partir de comparar las DL<sub>50</sub> de las ninfas en ambos estados de alimentación fueron significativamente distintos, es decir, fueron mayores al número 1 y el IC del 95% no incluyó al 1,0. El promedio de las cuatro RDL<sub>50</sub> fue de  $3,4 \pm 1,3$ , levemente superior al registrado para el imidacloprid ( $2,5 \pm 0,9$ ).

**Tabla 5. Estudio de la influencia de la condición alimenticia sobre la toxicidad del fipronil en ninfas de *T. infestans* de I y V estadio**

	n <sup>a</sup>	DL <sub>50</sub> (ng/i) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RDL <sub>50</sub> <sup>e</sup> (IC 95%)
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	150	4,0 (3,1-5,0)	1,4 ± 0,3	
Alimentadas	150	0,9 (0,7-1,1)	3,1 ± 0,6	4,3 (3,2-5,7)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	150	5,7 (3,6-9,3)	1,9 ± 0,3	
Alimentadas	150	1,1 (0,9-1,3)	3,4 ± 0,2	5,2 (3,8-7,0)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	150	8,3 (1,8-24,5)	1,2 ± 0,2	
Alimentadas	150	3,8 (2,3-5,8)	1,5 ± 0,2	2,2 (1,2-4,0)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	150	13,1 (8,3-20,1)	1,2 ± 0,2	
Alimentadas	150	6,5 (3,9-9,9)	1,2 ± 0,3	2,0 (1,2-3,8)

<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación      <sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

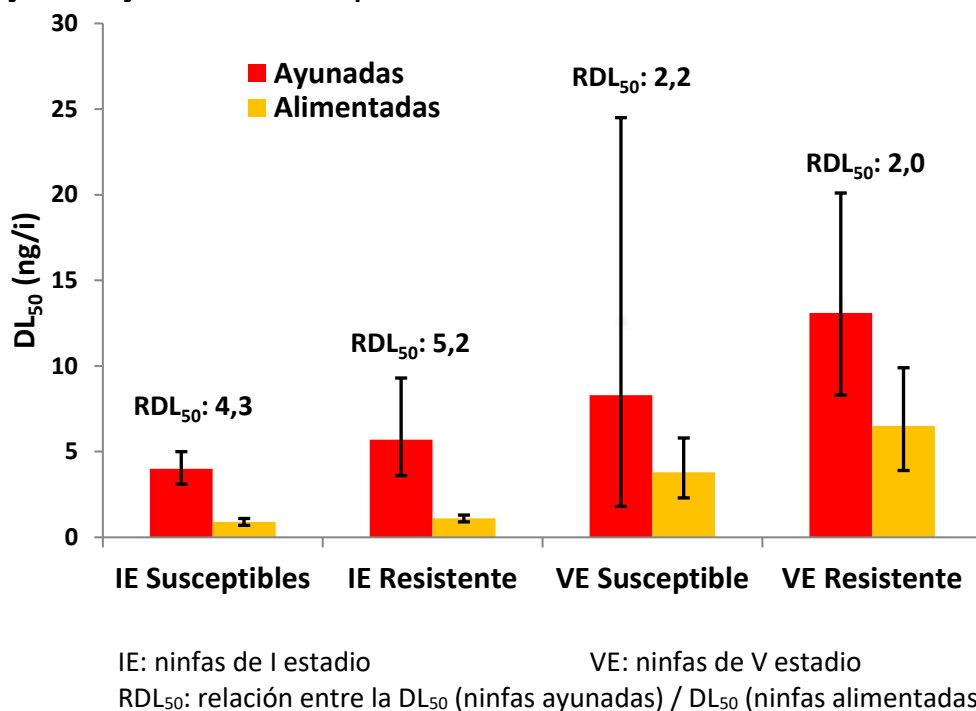
<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las DL<sub>50</sub>: DL<sub>50</sub> (ninfas ayunadas) / DL<sub>50</sub> (ninfas alimentadas)

Con el fipronil se constató una mayor diferencia de susceptibilidad entre las ninfas de I estadio, registrándose una RDL<sub>50</sub> de 4,3 (3,2-5,7) en el caso de las ninfas susceptibles y de 5,2 (3,8-7,0) para las resistentes, ambos valores estuvieron por encima del promedio obtenido con las cuatro RDL<sub>50</sub>. Las RDL<sub>50</sub> de las ninfas de V estadio estuvieron por debajo del promedio y fueron de 2,2 (1,2-4,0) para las ninfas susceptibles y de 2,0 (1,2-3,8) para las resistentes (Figura 15).

**Figura 15. Comparación de la toxicidad del fipronil sobre ninfas de I y V estadio de *T. infestans* ayunadas y alimentadas a repleción**



En las Tablas 6 y 7, y en las Figuras 16 y 17 se indica la relación entre el estado de susceptibilidad a los piretroides y la eficacia del imidacloprid y fipronil, en ninfas ayunadas y alimentadas de I y V estadio de *T. infestans*. Las RDL<sub>50</sub> se obtuvieron de comparar ninfas con idéntica condición alimenticia, y pertenecientes al mismo estadio. En la Tabla 6 se observa que bajo las condiciones experimentales impuestas, en los ensayos se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta tóxica al imidacloprid en la población de vinchucas resistente a piretroides con respecto a la susceptible. Las cuatro RDL<sub>50</sub> (DL<sub>50</sub> (ninfas resistentes) / DL<sub>50</sub> (ninfas susceptibles)) estuvieron por encima del número 1, demostrándose una mayor susceptibilidad al imidacloprid de las ninfas susceptibles a piretroides. El promedio de las 4 RDL<sub>50</sub> fue de 5,3 ± 2,2 (Figura 16).

Tabla 6. Diferencia de la susceptibilidad al neonicotinoide imidacloprid en relación al estado de susceptibilidad o resistencia a los piretroides en ninfas de I y V estadio de *T. infestans*

	n <sup>a</sup>	DL <sub>50</sub> (ng/i) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RDL <sub>50</sub> <sup>e</sup> (IC 95%)
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas ayunadas</b>				
Susceptible	150	4,6 (3,6-5,8)	2,2 ± 0,4	
Resistente	150	40,8 (29,2-60,5)	1,4 ± 0,3	8,9 (5,8-13,6)
<b>Ninfas alimentadas</b>				
Susceptible	150	2,6 (1,8-3,3)	2,5 ± 0,5	
Resistente	150	10,3 (8,1-13,4)	1,9 ± 0,3	4,0 (2,7-5,8)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas ayunadas</b>				
Susceptible	150	23,5 (19,3-30,8)	2,7 ± 0,4	
Resistente	150	78,8 (62,0-110,2)	2,0 ± 0,3	3,3 (2,3-4,7)
<b>Ninfas alimentadas</b>				
Susceptible	150	8,5 (7,2-10,3)	3,5 ± 0,6	
Resistente	150	46,2 (38,6-56,5)	2,5 ± 0,3	5,3 (4,1-6,9)

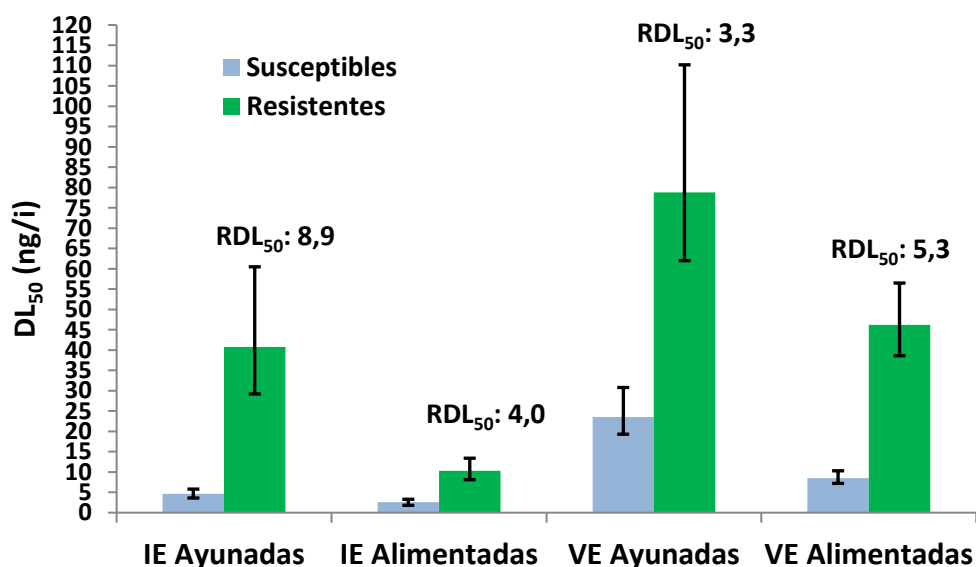
<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación      <sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las DL<sub>50</sub>: DL<sub>50</sub> (ninfas ayunadas) / DL<sub>50</sub> (ninfas alimentadas)

Figura 16. Comparación de la toxicidad del imidacloprid sobre ninfas de *T. infestans* de I y V estadio susceptibles y resistentes a piretroides



IE: I estadio

VE: V estadio

RDL<sub>50</sub>: DL<sub>50</sub> (ninfas resistentes)/DL<sub>50</sub> (ninfas susceptibles)

En la Tabla 7 se observa la influencia de la susceptibilidad a los piretroides en ninfas de I y V estadio, ayunadas y alimentadas a repleción. Pese a que los 4 valores de las RDL<sub>50</sub> fueron superiores al número 1, los respectivos IC del 95% de las 4 RDL<sub>50</sub> incluyeron al número 1, lo que significa que el fipronil demostró una capacidad toxica similar en ambos tipos de ninfas (susceptibles y resistentes a piretroides) (Figura 17).

**Tabla 7. Comparación de la actividad tóxica del fipronil sobre ninfas de *T. infestans* de I y V estadio susceptibles y resistentes a piretroides**

	n <sup>a</sup>	DL <sub>50</sub> (ng/i) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RDL <sub>50</sub> <sup>e</sup> (IC 95%)
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas ayunadas</b>				
Susceptible	150	4,0 (3,1-5,0)	1,4 ± 0,3	
Resistente	150	5,7 (3,6-9,3)	1,9 ± 0,3	1,4 (0,9-2,0)
<b>Ninfas alimentadas</b>				
Susceptible	150	0,9 (0,7-1,1)	3,1 ± 0,6	
Resistente	150	1,1 (0,9-1,3)	3,4 ± 0,2	1,2 (0,9-1,5)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas ayunadas</b>				
Susceptible	150	8,3 (1,8-24,5)	1,2 ± 0,2	
Resistente	150	13,1 (8,3-20,1)	1,2 ± 0,2	1,6 (0,8-2,9)
<b>Ninfas alimentadas</b>				
Susceptible	150	3,8 (2,3-5,8)	1,5 ± 0,2	
Resistente	150	6,5 (3,9-9,9)	1,2 ± 0,3	1,7 (0,9-3,1)

<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación      <sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las DL<sub>50</sub>: DL<sub>50</sub> (ninfas resistentes) / DL<sub>50</sub> (ninfas susceptibles)





Tabla 8. Comparación de las DL<sub>50</sub> entre los dos estadios de ninfas de *T. infestans* evaluados durante el ensayo de topicación con imidacloprid

	n <sup>a</sup>	DL <sub>50</sub> (ng/i) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RDL <sub>50</sub> (IC 95%)
<b>Ninfas susceptibles</b>				
VE Ayunadas	150	23,5 (19,3-30,8)	2,7 ± 0,4	
IE Ayunadas	150	4,6 (3,6-5,8)	2,2 ± 0,4	5,1 (3,7-7,1)
VE Alimentadas	150	8,5 (7,2-10,3)	3,5 ± 0,6	
IE Alimentadas	150	2,6 (1,8-3,3)	2,5 ± 0,5	3,3 (2,3-4,5)
<b>Ninfas resistentes</b>				
VE Ayunadas	150	78,8 (62,0-110,2)	2,0 ± 0,3	
IE Ayunadas	150	40,8 (29,2-60,5)	1,4 ± 0,3	1,9 (1,2-3,0)
VE Alimentadas	150	46,2 (38,6-56,5)	2,5 ± 0,2	
IE Alimentadas	150	10,3 (8,1-13,4)	1,9 ± 0,3	4,4 (3,2-6,1)

VE: V estadio

IE: I estadio

<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación

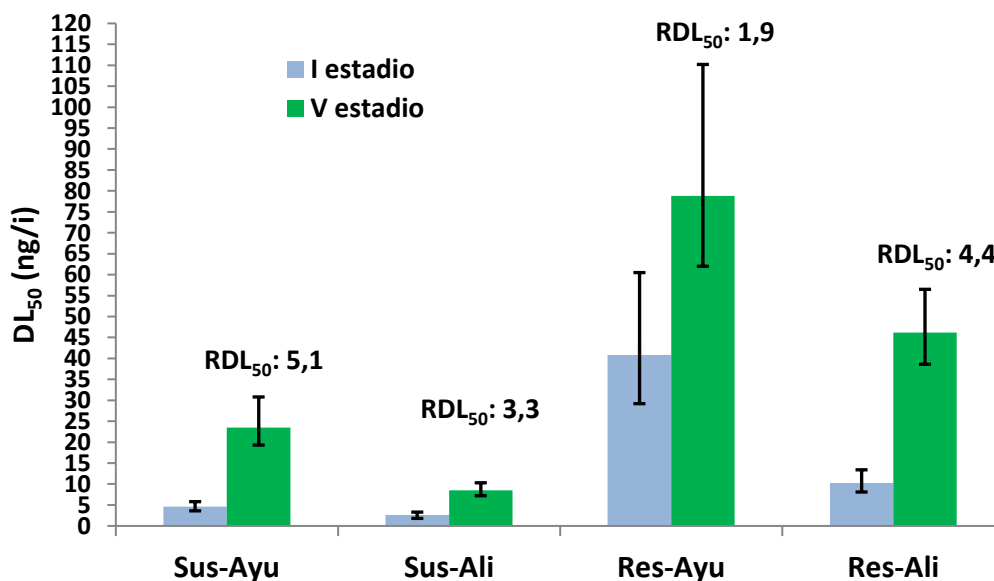
<sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las DL<sub>50</sub>: DL<sub>50</sub> (ninfas V estadio) / DL<sub>50</sub> (ninfas I estadio)

Figura 18. Comparación de la toxicidad del imidacloprid entre ninfas de I y V estadio de *T. infestans*



IE: I estadio

VE: V estadio

Sus: susceptibles

Res: resistentes

Ayu: ayunadas

Ali: alimentadas

RDL<sub>50</sub>: DL<sub>50</sub> (ninfas quinto estadio)/DL<sub>50</sub> (ninfas primer estadio)

En la Tabla 9 se presentan las comparaciones obtenidas de la susceptibilidad al fipronil entre los dos estadios de ninfas estudiados. Al igual que lo observado para el imidacloprid, el fipronil tuvo una mayor eficacia entre las ninfas de I estadio comparado con las de V estadio. El promedio de las cuatro  $RDL_{50}$  fue de  $3,5 \pm 1,6$ , un valor muy similar al observado para el imidacloprid. La mayor diferencia de susceptibilidad por la influencia del estadio se registró entre las ninfas alimentadas. En el caso de las resistentes la relación fue de 5,9 (3,6-9,6), mientras que entre los insectos susceptibles la  $RDL_{50}$  fue de 4,1 (2,6-6,4). Con las ninfas ayunadas se observó una diferencia de susceptibilidades entre los estadios menos acentuada, ambos valores de las  $RDL_{50}$  estuvieron por debajo del promedio (2,0 (1,2-3,4) y 2,3 (1,4-3,8), para las vinchucas susceptibles y resistentes, respectivamente (Figura 19).

**Tabla 9. Influencia del estadio del ciclo vital de *T. infestans* sobre la eficacia tóxica del fipronil**

	$n^a$	$DL_{50}$ (ng/i) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente $\pm$ EE <sup>d</sup>	$RDL_{50}$ (IC 95%)
<b>Ninfas susceptibles</b>				
VE Ayunadas	150	8,3 (1,8-24,5)	1,2 $\pm$ 0,2	
IE Ayunadas	150	4,0 (3,1-5,0)	1,2 $\pm$ 0,4	2,0 (1,2-3,4)
VE Alimentadas	150	3,8 (2,3-5,8)	1,5 $\pm$ 0,2	
IE Alimentadas	150	0,9 (0,7-1,1)	3,1 $\pm$ 0,6	4,1 (2,6-6,4)
<b>Ninfas resistentes</b>				
VE Ayunadas	150	13,1 (8,3-20,1)	1,2 $\pm$ 0,2	
IE Ayunadas	150	5,7 (3,6-9,3)	1,9 $\pm$ 0,3	2,3 (1,4-3,8)
VE Alimentadas	150	6,5 (3,9-9,9)	1,2 $\pm$ 0,3	
IE Alimentadas	150	1,1 (0,9-1,3)	3,4 $\pm$ 0,2	5,9 (3,6-9,6)

IE: I estadio

VE: V estadio

<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación

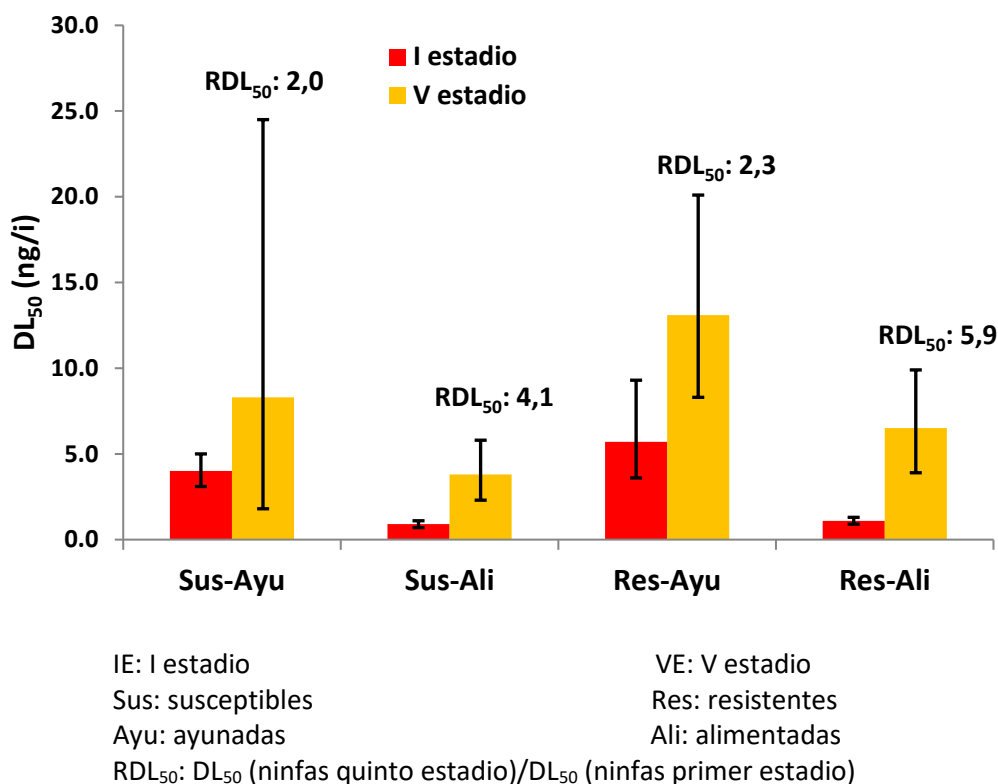
<sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las  $DL_{50}$ :  $DL_{50}$  (ninfas V estadio) /  $DL_{50}$  (ninfas I estadio)

Figura 19. Comparación de la eficacia del fipronil entre ninfas de I y V estadio de *T. infestans*



En la Tabla 10 y en la Figura 20 se indican las relaciones que se obtuvieron cuando se compararon las DL<sub>50</sub> obtenidas con imidacloprid y fipronil. La comparación se realizó entre ninfas del mismo estadio y condición alimenticia e igual susceptibilidad hacia los piretroides. Cabe destacar que en siete de las ocho categorías comparadas se obtuvo una diferencia significativa de susceptibilidad entre los insectos en favor del fipronil. El promedio general de las RDL<sub>50</sub> ( $DL_{50}(\text{imidacloprid}) / DL_{50}(\text{fipronil})$ ) obtenido de las ocho categorías de insectos comparadas fue de  $4,8 \pm 2,8$ . En el caso de las cuatro categorías del I estadio el promedio fue de  $5,1 \pm 3,3$  y levemente menor ( $4,5 \pm 2,1$ ) para el V estadio. La única categoría de ninfas que mostró una respuesta similar de toxicidad frente a los dos insecticidas fueron las ninfas de I estadio en estado de ayuno y susceptibles a los piretroides (RDL<sub>50</sub>: 1,1 (0,8-1,6)). La evaluación de las DL<sub>50</sub> en todas las categorías de ninfas mostró una mayor diferencia de eficacia entre los dos principios activos cuando fueron topicados sobre ninfas resistentes. El

promedio de las cuatro  $RDL_{50}$  entre las ninfas resistentes fue de  $7,4 \pm 1,2$ , mientras que para las susceptibles el promedio fue de tan solo  $2,2 \pm 0,7$ .

**Tabla 10. Comparación de la eficacia del imidacloprid y el fipronil en ninfas de *T. infestans* de acuerdo al estadio, la condición alimenticia y el estado de susceptibilidad a los piretroides**

	$n^a$	$DL_{50}$ (ng/i) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente $\pm$ EE <sup>d</sup>	$RDL_{50}$ (IC 95%)
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Im Ayunadas	150	4,6 (3,6-5,8)	$2,2 \pm 0,4$	
Fip Ayunadas	150	4,0 (3,1-5,0)	$1,2 \pm 0,4$	1,1 (0,8-1,6)
Im Alimentadas	150	2,6 (1,8-3,3)	$2,5 \pm 0,5$	
Fip Alimentadas	150	0,9 (0,7-1,1)	$3,1 \pm 0,6$	2,8 (2,0-3,8)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Im Ayunadas	150	40,8 (29,2-60,5)	$1,4 \pm 0,3$	
Fip Ayunadas	150	5,7 (3,6-9,3)	$1,9 \pm 0,3$	7,1 (4,6-11,1)
Im Alimentadas	150	10,3 (8,1-13,4)	$1,9 \pm 0,3$	
Fip Alimentadas	150	1,1 (0,9-1,3)	$3,4 \pm 0,2$	9,4 (7,0-12,6)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Im Ayunadas	150	23,5 (19,3-30,8)	$2,7 \pm 0,4$	
Fip Ayunadas	150	8,3 (1,8-24,5)	$1,2 \pm 0,2$	2,8 (1,7-4,7)
Im Alimentadas	150	8,5 (7,2-10,3)	$3,5 \pm 0,6$	
Fip Alimentadas	150	3,8 (2,3-5,8)	$1,5 \pm 0,2$	2,2 (1,4-3,5)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Im Ayunadas	150	78,8 (62,0-110,2)	$2,0 \pm 0,3$	
Fip Ayunadas	150	13,1 (8,3-20,1)	$1,2 \pm 0,2$	6,0 (3,6-10,1)
Im Alimentadas	150	46,2 (38,6-56,5)	$2,5 \pm 0,2$	
Fip Alimentadas	150	6,5 (3,9-9,9)	$1,2 \pm 0,3$	7,1 (4,3-11,6)

Im: imidacloprid

Fip: fipronil

<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación

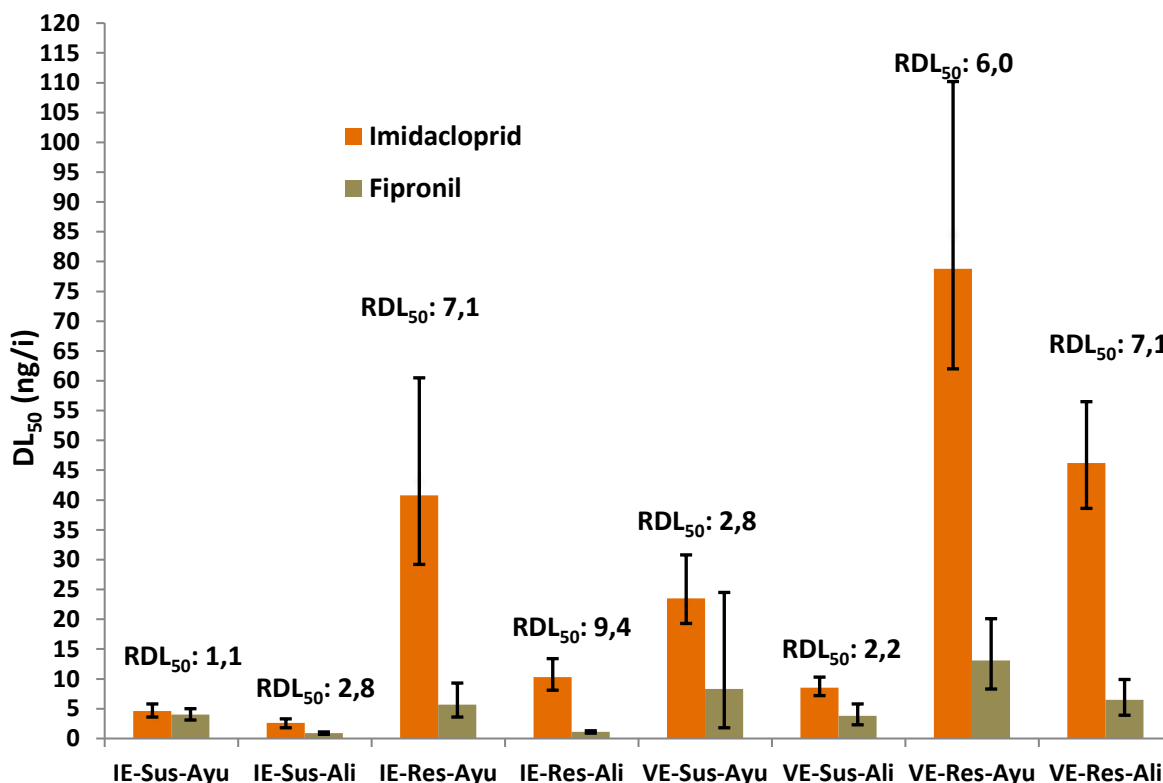
<sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las  $DL_{50}$ :  $DL_{50}$  (imidacloprid) /  $DL_{50}$  (fipronil)

Figura 20. Comparación de las DL<sub>50</sub> del fipronil e imidacloprid obtenidas sobre las ocho categorías de ninfas de *T. infestans* estudiadas en los ensayos de topicación



IE: I estadio  
 Sus: susceptibles  
 Ayu: ayunadas  
 RDL<sub>50</sub>: DL<sub>50</sub> (imidacloprid)/DL<sub>50</sub> (fipronil)

VE: V estadio  
 Res: resistentes  
 Ali: alimentadas

### 2.3.2 CL<sub>50</sub> en superficies tratadas

De los cinco insecticidas evaluados en las superficies de contacto, solamente el fipronil y el imidacloprid presentaron actividad cuando fueron impregnados sobre papel de filtro. El fipronil fue el único que demostró actividad tóxica cuando fue impregnado sobre vidrio.

En las Tablas 11 y 12 se presenta la evolución en el tiempo de la toxicidad del imidacloprid y fipronil impregnados sobre papel de filtro y en la Tabla 13, la cinética de toxicidad del fipronil en vidrio.

Al igual que lo ocurrido en los ensayos de topicación, se halló un comportamiento diferencial en la actividad tóxica del imidacloprid entre las ninfas ayunadas y las alimentadas a repleción. Cuando las ninfas alimentadas a repleción entraron en contacto con el papel de filtro tratado con imidacloprid la respuesta tóxica en el tiempo de observación fue similar, independientemente del estadio y del estado de susceptibilidad frente a los piretroides. Siguiendo el mismo patrón que cuando fue topicado, el insecticida obtuvo su respuesta máxima a las 24 h, la que se mantuvo constante durante las 168 h postcontacto en que fueron observados los insectos. En cambio, para las ninfas de ambos estadios con un ayuno de 15 días postecdicis, la evolución de las DL<sub>50</sub> en el tiempo fue variable. Salvo en el caso de las ninfas de I estadio susceptibles a piretroides en que el aumento de la toxicidad se registró entre las 48 y 72 h, en las otras tres categorías de insectos ayunados se observó una disminución de las DL<sub>50</sub> entre las 24 y 48 h, para mantenerse constante hasta el final del tiempo de observación.

**Tabla 11. Toxicidad en ninfas de *T. infestans* postcontacto con papel de filtro impregnados con imidacloprid**

<b>CL<sub>50</sub> (mg/mL)<sup>a</sup> (IC 95%)<sup>b</sup></b>				
<b>Tiempo postadministración del imidacloprid</b>				
	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>168 h</b>
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	24,6 (15,3-34,9)	24,6 (15,3-34,9)	13,2 (7,8-18,0)	13,2 (7,8-18,0)
Alimentadas	9,6 (5,2-12,9)	9,6 (5,2-12,9)	9,6 (5,2-12,9)	9,6 (5,2-12,9)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	45,6 (22,8-55,3)	33,7 (22,8-46,2)	33,7 (22,8-46,2)	33,7 (22,8-46,2)
Alimentadas	24,9 (16,1-34,1)	24,9 (16,1-34,1)	24,9 (16,1-34,1)	24,9 (16,1-34,1)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	89,8 (54,5-138,1)	25,2 (5,5-46,2)	25,2 (5,5-46,2)	25,2 (5,5-46,2)
Alimentadas	12,4 (1,0-26,6)	12,4 (1,0-26,6)	12,4 (1,0-26,6)	12,4 (1,0-26,6)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	228,3 (154,9-381,5)	68,5 (37,7-102,4)	68,5 (37,7-102,4)	68,5 (37,7-102,4)
Alimentadas	50,3 (6,2-108,8)	50,3 (6,2-108,8)	50,3 (6,2-108,8)	50,3 (6,2-108,8)

<sup>a</sup> Concentración letal 50%

<sup>b</sup> Intervalos de confianza del 95%

En la Tabla 12 se detalla la actividad del fipronil en las 168 h postcontacto en papel de filtro. En los insectos que se alimentaron a repleción, tal cual lo descrito con antelación para el fipronil cuando fue topicado, independientemente de su estadio y su estado frente a los piretroides, la respuesta tóxica máxima de la molécula se alcanzó a las 24 h para mantenerse constante durante el resto del tiempo de observación. Entre los ejemplares ayunados el comportamiento de la CL<sub>50</sub> no fue tan homogéneo. En las ninfas de I estadio (susceptibles y resistentes) se registró una disminución de la CL<sub>50</sub> entre las 24 y las 48 h. Esta misma cinética de toxicidad también se observó con las vinchucas de V estadio resistentes, mientras que en el caso de los insectos susceptibles de V estadio, el aumento de la toxicidad se observó entre las 48 y 72 h (Tabla 12).

**Tabla 12. Evolución en el tiempo de la toxicidad del fipronil en ninfas de *T. infestans* en las 168 h postcontacto en papel de filtro**

<b>CL<sub>50</sub> (mg/mL)<sup>a</sup> (IC 95%)<sup>b</sup></b>				
<b>Tiempo postadministración del imidacloprid</b>				
	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>168 h</b>
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	6,3 (3,8-19,7)	2,3 (1,4-3,2)	2,3 (1,4-3,2)	2,3 (1,4-3,2)
Alimentadas	0,6 (0,4-0,9)	0,6 (0,4-0,9)	0,6 (0,4-0,9)	0,6 (0,4-0,9)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	3,8 (2,2-7,8)	2,4 (1,1-4,0)	2,4 (1,1-4,0)	2,4 (1,1-4,0)
Alimentadas	0,8 (0,5-1,1)	0,8 (0,5-1,1)	0,8 (0,5-1,1)	0,8 (0,5-1,1)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	13,8 (10,3-19,2)	13,8 (10,3-19,2)	8,8 (3,9-18,2)	8,8 (3,9-18,2)
Alimentadas	3,7 (2,8-4,6)	3,7 (2,8-4,6)	3,7 (2,8-4,6)	3,7 (2,8-4,6)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	10,9 (6,2-20,7)	7,8 (5,0-11,4)	7,8 (5,0-11,4)	7,8 (5,0-11,4)
Alimentadas	4,5 (3,4-5,7)	4,5 (3,4-5,7)	4,5 (3,4-5,7)	4,5 (3,4-5,7)

<sup>a</sup> Concentración letal 50%

<sup>b</sup> Intervalos de confianza del 95%

Los datos de la cinética de toxicidad del fipronil impregnado sobre vidrio se exponen en la Tabla 13. En vidrio, al igual que lo observado cuando el insecticida fue topicado y expuesto en una superficie de papel de filtro, la toxicidad de la molécula en ninfas alimentadas a repleción, independientemente



del estadio y estado frente a los piretroides, se mantuvo constante en las 168 h que duró el tiempo de observación de las ninfas. En el caso de las ninfas ayunadas por 15 días postecdicis, nuevamente la respuesta fue heterogénea. Las ninfas de I estadio resistentes y los insectos susceptibles de V estadio mostraron una respuesta máxima tóxica a las 48 h de haber estado en contacto con el vidrio tratado, mientras que entre las ninfas susceptibles de I estadio y las resistentes de V estadio la respuesta tóxica máxima fue más lenta (72 h).

**Tabla 13. Estudio de la cinética de toxicidad del fipronil expuesto en vidrio sobre ninfas de I y V estadio de *T. infestans***

<b>CL<sub>50</sub> (mg/mL)<sup>a</sup> (IC 95%)<sup>b</sup></b>				
<b>Tiempo postadministración del imidacloprid</b>				
	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>168 h</b>
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	1,2 (0,8-1,6)	1,2 (0,8-1,6)	0,9 (0,6-1,3)	0,9 (0,6-1,3)
Alimentadas	0,6 (0,2-0,9)	0,6 (0,2-0,9)	0,6 (0,2-0,9)	0,6 (0,2-0,9)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	1,4 (1,0-1,8)	1,0 (0,6-1,4)	1,0 (0,6-1,4)	1,0 (0,6-1,4)
Alimentadas	0,5 (0,2-0,7)	0,5 (0,2-0,7)	0,5 (0,2-0,7)	0,5 (0,2-0,7)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	5,0 (3,7-6,5)	3,4 (2,0-4,7)	3,4 (2,0-4,7)	3,4 (2,0-4,7)
Alimentadas	1,7 (0,7-2,3)	1,7 (0,7-2,3)	1,7 (0,7-2,3)	1,7 (0,7-2,3)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	4,6 (3,6-5,8)	4,6 (3,6-5,8)	2,6 (1,8-3,4)	2,6 (1,8-3,4)
Alimentadas	1,4 (0,4-2,1)	1,4 (0,4-2,1)	1,4 (0,4-2,1)	1,4 (0,4-2,1)

<sup>a</sup> Concentración letal 50%

<sup>b</sup> Intervalos de confianza del 95%

En la Tabla 14 se observan las comparaciones de las CL<sub>50</sub> que se llevaron a cabo teniendo en cuenta la variable del estado nutricional de las ninfas. Las cuatro RCL<sub>50</sub> que se obtuvieron a partir de comparar insectos de idéntico estadio y la misma condición de susceptibilidad frente a los piretroides tuvieron un promedio de  $1,5 \pm 0,3$ . Si bien los cuatro valores de las RCL<sub>50</sub> fueron superiores a 1, las CL<sub>50</sub> obtenidas entre las ninfas ayunadas no fueron significativamente distintas a las halladas entre las alimentadas a repleción, esto se debe a que los

IC 95% de cada una de las cuatro comparaciones incluyeron al número 1 ( $p > 0,05$ ) (Tabla 14 y Figura 21).

**Tabla 14. Comparación de la toxicidad del neonicotinoide imidacloprid en ninfas de *T. infestans* de acuerdo a su estado nutricional**

	$n^a$	$CL_{50}$ (mg/mL) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente $\pm$ EE <sup>d</sup>	$RCL_{50}^e$ (IC 95%)
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas ayunadas</b>				
Susceptible	150	13,2 (7,8-18,0)	2,1 $\pm$ 0,4	
Resistente	150	9,6 (5,2-12,9)	2,7 $\pm$ 0,7	1,3 (0,8-2,3)
<b>Ninfas alimentadas</b>				
Susceptible	150	33,7 (22,8-46,2)	1,9 $\pm$ 0,3	
Resistente	150	24,9 (16,1-34,1)	1,9 $\pm$ 0,2	1,2 (0,7-2,1)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas ayunadas</b>				
Susceptible	150	25,2 (5,5-46,2)	1,0 $\pm$ 0,3	
Resistente	150	12,4 (1,0-26,6)	1,1 $\pm$ 0,3	2,1 (0,5-8,9)
<b>Ninfas alimentadas</b>				
Susceptible	150	68,5 (37,7-102,4)	1,1 $\pm$ 0,2	
Resistente	150	50,3 (6,2-108,8)	1,1 $\pm$ 0,4	1,4 (0,6-2,7)

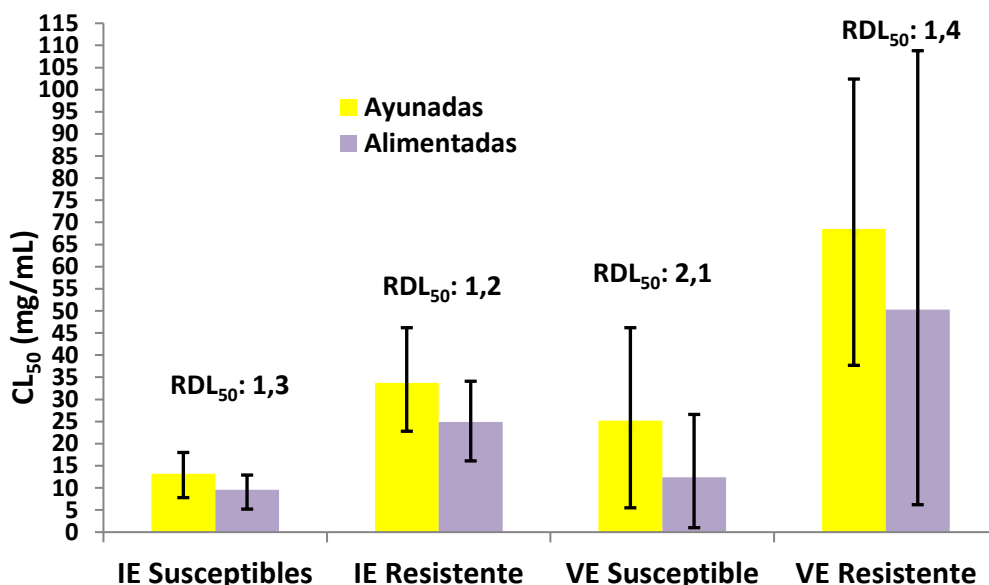
<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación      <sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las  $CL_{50}$ :  $CL_{50}$  (ninfas ayunadas) /  $CL_{50}$  (ninfas alimentadas)

**Figura 21. Comparación de las CL<sub>50</sub> del imidacloprid impregnado en papel de filtro teniendo en cuenta la variable del estado nutricional de las ninfas**



IE: I estadio  
 Sus: susceptibles  
 Ayu: ayunadas  
 RCL<sub>50</sub>: CL<sub>50</sub> (ninfas ayunadas)/CL<sub>50</sub> (ninfas alimentadas)

VE: Vestadio  
 Res: resistentes  
 Ali: alimentadas

En la Tabla 15 se presentan las comparaciones de la toxicidad hallada para el fipronil impregnado sobre papel de filtro en ninfas ayunadas durante 15 días con ninfas alimentadas a repleción. Los insectos comparados tuvieron el mismo estado frente a los piretroides y estadio. Las cuatro RCL<sub>50</sub> (CL<sub>50</sub> (ninfas ayunadas)/CL<sub>50</sub> (ninfas alimentadas)) fueron mayores a 1 y ninguno de los IC 95% incluyó al número 1, demostrándose una mayor susceptibilidad hacia el fenilpirasol en las ninfas alimentadas. El promedio de la diferencia fue de 2,5 ± 0,7. La mayor diferencia entre las CL<sub>50</sub> se halló en las vinchucas de I estadio. Con una CL<sub>50</sub> de 0,6 (mg/mL) la mayor eficacia de la molécula se observó en las ninfas susceptibles alimentadas, resultando una RCL<sub>50</sub> de 3,5 (2,1-5,8) cuando fueron comparadas con ninfas ayunadas de su misma condición frente a los piretroides. También, entre las ninfas resistentes de I estadio se encontró una RCL<sub>50</sub> de 2,8 (1,5-5,2) que estuvo por encima de la media. Las RCL<sub>50</sub> de las ninfas de V estadio estuvieron por debajo de la media (Figura 22).

Tabla 15. Efecto del estado nutricional de ninfas de *T. infestans* sobre la capacidad tóxica del fipronil expuesto en papel de filtro

	n <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> (mg/mL) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RCL <sub>50</sub> <sup>e</sup> (IC 95%)
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	150	2,3 (1,4-3,2)	1,6 ± 0,3	
Alimentadas	150	0,6 (0,4-0,9)	2,1 ± 0,5	3,5 (2,1-5,8)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	150	2,4 (1,1-4,0)	1,1 ± 0,3	
Alimentadas	150	0,8 (0,5-1,1)	2,0 ± 0,5	2,8 (1,5-5,2)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	150	8,8 (3,9-18,2)	1,6 ± 0,3	
Alimentadas	150	3,7 (2,8-4,6)	3,0 ± 0,5	2,3 (1,6-3,4)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	150	7,8 (5,0-11,4)	1,3 ± 0,2	
Alimentadas	150	4,5 (3,4-5,7)	2,7 ± 0,5	1,7 (1,1-2,7)

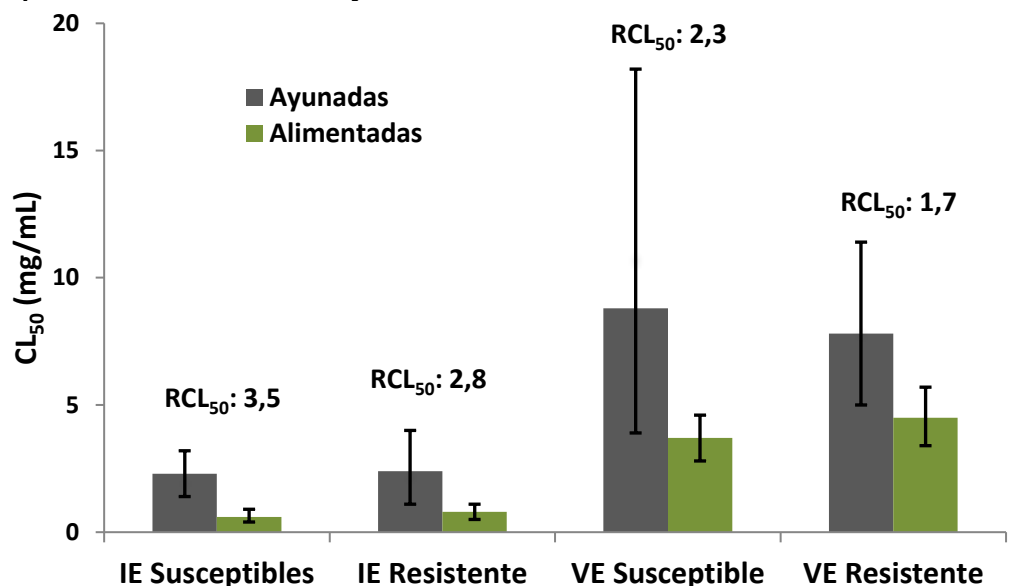
<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación      <sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las CL<sub>50</sub>: CL<sub>50</sub> (ninfas ayunadas) / CL<sub>50</sub> (ninfas alimentadas)

Figura 22. Influencia del estado de alimentación sobre la eficacia del fipronil impregnado en papel de filtro en ninfas de I y V estadio



IE: I estadio      VE: V estadio      Sus: susceptibles      Res: resistentes

Ayu: ayunadas      Ali: alimentadas

RCL<sub>50</sub>: CL<sub>50</sub> (ninfas ayunadas)/CL<sub>50</sub> (ninfas alimentadas)

La influencia del estado de alimentación de las ninfas sobre la toxicidad del fipronil impregnado en vidrio se presenta en la Tabla 16. Se compararon insectos de idéntico estadio y estado de susceptibilidad frente a los piretroides. El promedio de las cuatro RCL<sub>50</sub> ((CL<sub>50</sub> (ninfas ayunadas)/CL<sub>50</sub> (ninfas alimentadas)) fue de  $1,7 \pm 0,2$ . En la Tabla se puede observar que para las ninfas de I estadio susceptibles a piretroides no se registró una diferencia significativa (el IC 95% incluye al número 1). Si bien en las otras comparaciones se observó una diferencia significativa, hay que destacar lo cercano de los límites inferiores de los tres IC del 95% al número 1, por lo tanto, se puede afirmar que el estado de alimentación provocó una diferencia leve de susceptibilidad al fipronil impregnado en vidrio entre las ninfas (Figura 23).

**Tabla 16. Influencia del estado de alimentación de ninfas de *T. infestans* en la toxicidad del fipronil expuesto en vidrio**

	n <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> (mg/mL) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RCL <sub>50</sub> <sup>e</sup> (IC 95%)
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	150	0,9 (0,6-1,3)	1,8 ± 0,4	
Alimentadas	150	0,6 (0,2-0,9)	1,5 ± 0,5	1,4 (0,8-2,5)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	150	1,0 (0,6-1,4)	1,5 ± 0,3	
Alimentadas	150	0,5 (0,2-0,7)	1,9 ± 0,5	1,9 (1,1-3,6)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Ayunadas	150	3,4 (2,0-4,7)	1,7 ± 0,3	
Alimentadas	150	1,7 (0,7-2,3)	2,7 ± 0,7	1,9 (1,1-3,4)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Ayunadas	150	2,6 (1,8-3,4)	1,9 ± 0,4	
Alimentadas	150	1,4 (0,4-2,1)	2,6 ± 0,8	1,8 (1,1-4,1)

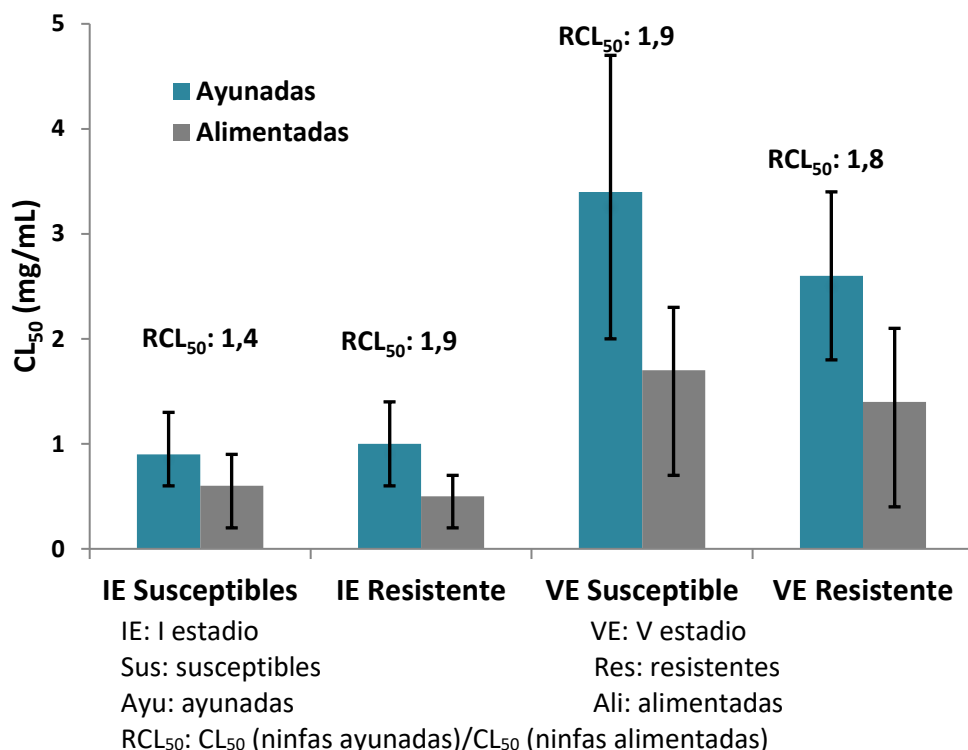
<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación      <sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las CL<sub>50</sub>: CL<sub>50</sub> (ninfas ayunadas) / CL<sub>50</sub> (ninfas alimentadas)

Figura 23. Eficacia del fipronil en ninfas de I y V estadio en distintos estados de alimentación



En la Tabla 17 se muestra la influencia del estado de susceptibilidad a piretroides en ninfas de I y V estadio sobre la toxicidad del imidacloprid impregnado en papel de filtro. El promedio de las comparaciones entre las distintas categorías de insectos fue de  $3 \pm 0,7$ ; esto significa que para matar al 50% de la muestra de vinchucas resistentes se necesitó en promedio tres veces más insecticida que el utilizado entre las susceptibles. Si bien en las cuatro  $RCL_{50}(CL_{50} \text{ (ninfas resistentes)}/CL_{50} \text{ (ninfas susceptibles)})$  estuvieron por encima del 1 y que ninguno de los cuatro IC al 95% incluyó a este número, también hay que observar la cercanía del límite inferior de los cuatro intervalos al número 1, esto quiere decir que existió una diferencia significativa entre las CL<sub>50</sub> de las ninfas resistentes en comparación de las susceptibles, pero que esa diferencia fue exigua. El único valor que estuvo por encima de la media de las RCL<sub>50</sub> fue el obtenido entre las vinchucas de V estadio alimentadas (4,2 (1,1-15,2)). Los demás valores quedaron por debajo del promedio y fueron muy parejos entre sí (Figura 24).

Tabla 17. Comparación de la toxicidad del imidacloprid impregnado en papel de filtro entre ninfas resistentes y susceptibles a piretroides

	n <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> (mg/mL) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RCL <sub>50</sub> <sup>e</sup> (IC 95%)
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas ayunadas</b>				
Susceptible	150	13,2 (7,8-18,0)	2,1 ± 0,4	
Resistente	150	33,7 (22,8-46,2)	1,9 ± 0,3	2,6 (1,5-4,2)
<b>Ninfas alimentadas</b>				
Susceptible	150	9,6 (5,2-12,9)	1,9 ± 0,2	
Resistente	150	24,9 (16,1-34,1)	2,7 ± 0,7	2,5 (1,3-4,7)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas ayunadas</b>				
Susceptible	150	25,2 (5,5-46,2)	2,1 ± 0,4	
Resistente	150	68,5 (37,7-102,4)	1,1 ± 0,2	2,7 (1,1-7,1)
<b>Ninfas alimentadas</b>				
Susceptible	150	12,4 (1,0-26,6)	1,1 ± 0,3	
Resistente	150	50,3 (6,2-108,8)	1,1 ± 0,4	4,2 (1,1-15,2)

<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación

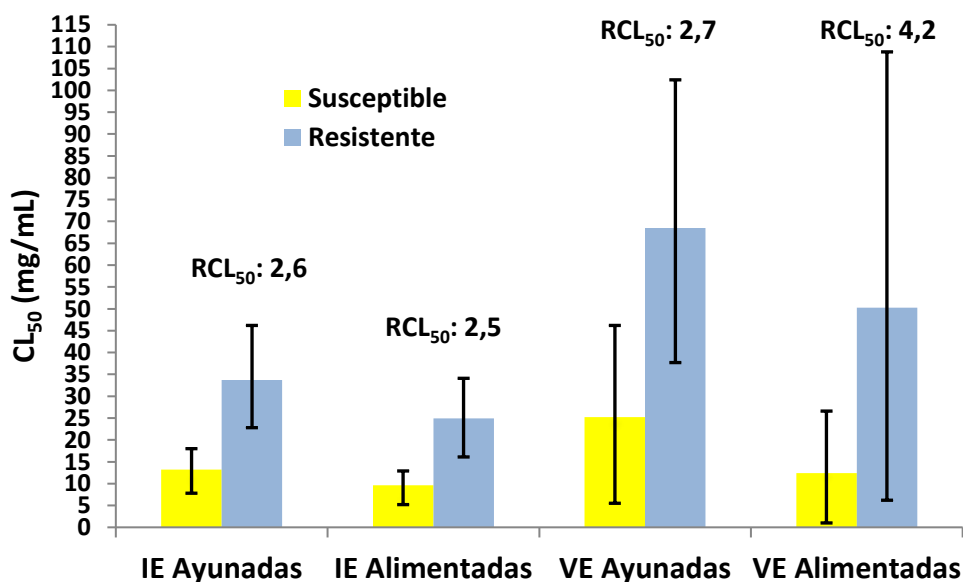
<sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las CL<sub>50</sub>: CL<sub>50</sub> (ninfas resistentes) / CL<sub>50</sub> (ninfas susceptibles)

Figura 24. Actividad diferencial del imidacloprid impregnado en papel de filtro sobre ninfas resistentes y susceptibles a piretroides



IE: I estadio

VE: V estadio

Sus: susceptibles

Res: resistentes

Ayu: ayunadas

Ali: alimentadas

RCL<sub>50</sub>: CL<sub>50</sub> (ninfas resistentes) / CL<sub>50</sub> (ninfas susceptibles)

En la Tabla 18 se comparó la CL<sub>50</sub> calculada para la población de ninfas resistentes con la hallada para las ninfas susceptibles a piretroides. La comparación se llevó a cabo entre ninfas del mismo estadio en igualdad de condiciones de alimentación. El promedio de las relaciones entre las CL<sub>50</sub>(CL<sub>50</sub> (ninfas resistentes)/CL<sub>50</sub> (ninfas susceptibles)) fue de 1,1 ± 0,1. En ninguno de los cuatro pares de categorías de ninfas que se compararon se identificó una diferencia significativa en las CL<sub>50</sub> de las vinchucas resistentes con respecto a las susceptibles a piretroides. Al igual que lo observado cuando el insecticida fue topicado, el fipronil demostró una eficacia similar para ambas poblaciones de ninfas (susceptibles y resistentes a piretroides) (Figura 25).

**Tabla 18. Relación entre el estatus de susceptibilidad a los piretroides y la eficacia tóxica del fipronil impregnado en papel de filtro**

	n <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> (mg/mL) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RCL <sub>50</sub> <sup>e</sup> (IC 95%)
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas ayunadas</b>				
Susceptible	150	2,3 (1,4-3,2)	1,6 ± 0,3	
Resistente	150	2,4 (1,1-4,0)	1,1 ± 0,3	1,0 (0,5-1,9)
<b>Ninfas alimentadas</b>				
Susceptible	150	0,6 (0,4-0,9)	2,1 ± 0,5	
Resistente	150	0,8 (0,5-1,1)	2,0 ± 0,5	1,2 (0,8-2,1)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas ayunadas</b>				
Susceptible	150	8,8 (3,9-18,2)	1,6 ± 0,3	
Resistente	150	7,8 (5,0-11,4)	1,3 ± 0,2	0,9 (0,5-1,4)
<b>Ninfas alimentadas</b>				
Susceptible	150	3,7 (2,8-4,6)	3,0 ± 0,5	
Resistente	150	4,5 (3,4-5,7)	2,7 ± 0,5	1,2 (0,8-1,7)

<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación      <sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

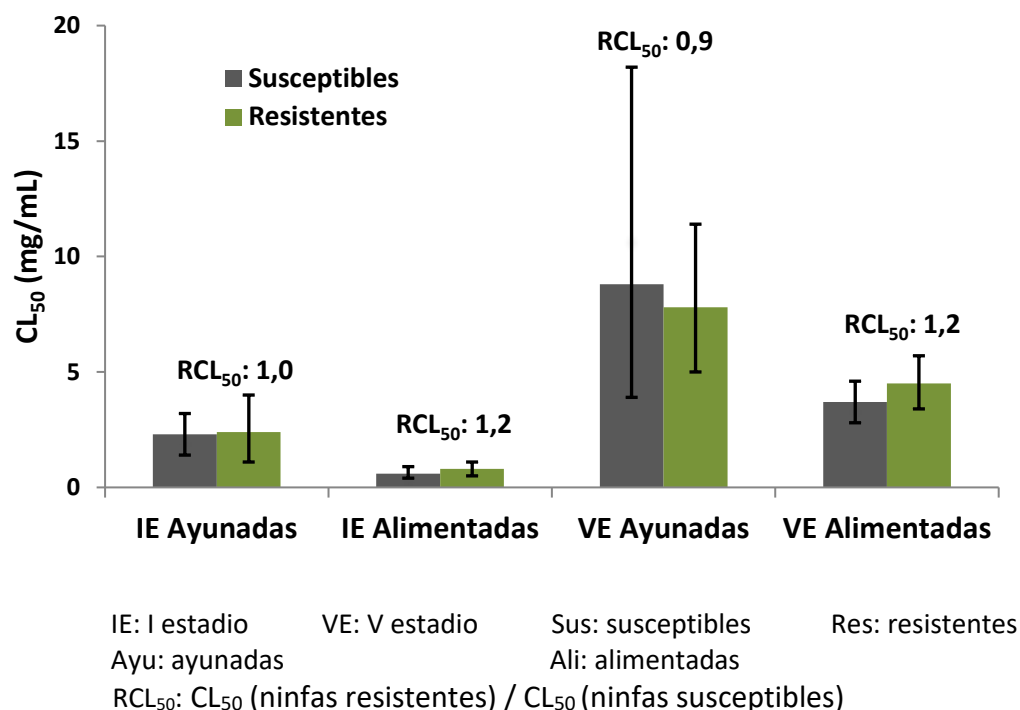
<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las CL<sub>50</sub>: CL<sub>50</sub> (ninfas resistentes) / CL<sub>50</sub> (ninfas susceptibles)



Figura 25. Estudio de la toxicidad en ninfas susceptibles y resistentes a los piretroides del fipronil impregnado sobre papel de filtro



En La Tabla 19 y Figura 26 se detallan los resultados de las comparaciones de las CL<sub>50</sub> del fipronil expuesto en vidrio sobre ninfas de *T. infestans* resistentes y susceptibles a piretroides. Las comparaciones se llevaron a cabo entre insectos con idéntica condición de alimentación y estadio. No se registraron diferencias significativas en la eficacia del fipronil según la población a la que fue expuesto. El promedio de las diferencias entre ambas poblaciones fue de  $0,8 \pm 0,1$ . Si bien las cuatro RCL<sub>50</sub> fueron menores a 1, los cuatro IC 95% incluyeron entre sus valores al número 1, lo que indica que no se registraron diferencias significativas entre las dos poblaciones de vinchucas ( $p > 0,05$ ).

Tabla 19. Toxicidad del fipronil expuesto en vidrio sobre ninfas de *T. infestans* susceptibles y resistentes a piretroides

	n <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> (mg/mL) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RCL <sub>50</sub> <sup>e</sup> (IC 95%)
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas ayunadas</b>				
Susceptible	150	0,9 (0,6-1,3)	1,8 ± 0,4	
Resistente	150	1,0 (0,6-1,4)	1,5 ± 0,3	0,9 (0,6-1,4)
<b>Ninfas alimentadas</b>				
Susceptible	150	0,6 (0,2-0,9)	1,5 ± 0,5	
Resistente	150	0,5 (0,2-0,7)	1,9 ± 0,5	0,7 (0,3-1,4)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas ayunadas</b>				
Susceptible	150	3,4 (2,0-4,7)	1,7 ± 0,3	
Resistente	150	2,6 (1,8-3,4)	1,9 ± 0,4	0,7 (0,4-1,2)
<b>Ninfas alimentadas</b>				
Susceptible	150	1,7 (0,7-2,3)	2,7 ± 0,7	
Resistente	150	1,4 (0,4-2,1)	2,6 ± 0,8	0,8 (0,4-1,6)

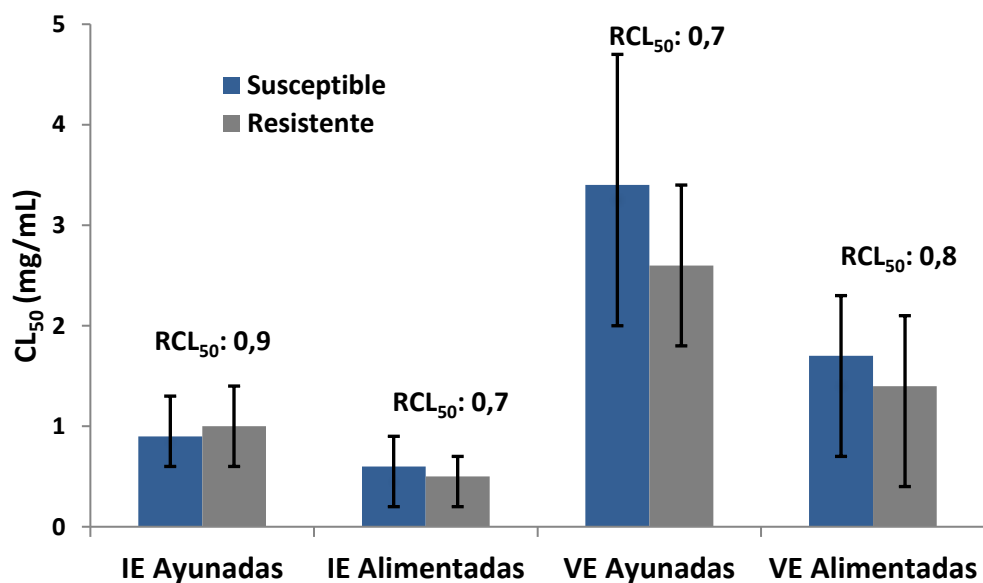
<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación      <sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las CL<sub>50</sub>: CL<sub>50</sub> (ninfas resistentes) / CL<sub>50</sub> (ninfas susceptibles)

Figura 26. Estudio de la toxicidad del fipronil en vinchucas susceptibles y resistentes a piretroides



IE: I estadio

VE: V estadio

Sus: susceptibles

Res: resistentes

Ayu: ayunadas

Ali: alimentadas

RCL<sub>50</sub>: CL<sub>50</sub> (ninfas resistentes) / CL<sub>50</sub> (ninfas susceptibles)

La Tabla 20 muestra las comparaciones de las  $CL_{50}$  obtenidas para el imidacloprid impregnado sobre papel de filtro entre las ninfas de I y V estadio. Las ninfas comparadas tuvieron el mismo estado frente a los piretroides y la condición alimentaria. El promedio de las cuatro  $RCL_{50}$  fue de  $1,8 \pm 0,4$ ; solamente se pudo apreciar entre las ninfas resistentes una respuesta tóxica diferencial entre ambos estadios estudiados:  $RCL_{50}$  de 2,0 (1,1-3,6) para las ninfas resistentes ayunadas y de 2,2 (1,2-3,8) fue la  $RCL_{50}$  arrojada entre las ninfas alimentadas. Nuevamente, hay que destacar que el IC 95% tiene un límite inferior cercano al número 1, por lo tanto, si bien existió una diferencia significativa, ésta fue exigua. Entre las vinchucas susceptibles ambos IC incluyeron al número 1, o sea que no se registró una diferencia significativa entre los estadios ninfales (Figura 27).

**Tabla 20. Comparación de la toxicidad del imidacloprid impregnado en papel de filtro sobre ninfas de *T. infestans* de I y V estadio**

	$n^a$	$CL_{50}$ (mg/mL) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente $\pm$ EE <sup>d</sup>	$RCL_{50}$ (IC 95%)
<b>Ninfas susceptibles</b>				
VE Ayunadas	150	25,1 (5,5-46,2)	$1,0 \pm 0,3$	
IE Ayunadas	150	13,2 (7,8-18,0)	$2,1 \pm 0,4$	1,9 (0,8-4,8)
VE Alimentadas	150	12,4 (1,0-26,6)	$1,1 \pm 0,3$	
IE Alimentadas	150	9,6 (5,2-12,9)	$2,7 \pm 0,7$	1,2 (0,3-4,3)
<b>Ninfas resistentes</b>				
VE Ayunadas	150	68,5 (37,7-102,4)	$1,1 \pm 0,2$	
IE Ayunadas	150	33,7 (22,8-46,2)	$1,9 \pm 0,3$	2,0 (1,1-3,6)
VE Alimentadas	150	50,3 (6,2-108,8)	$1,1 \pm 0,4$	
IE Alimentadas	150	24,9 (16,1-34,1)	$1,9 \pm 0,2$	2,2 (1,2-3,8)

VE: Vestadio

IE: I estadio

<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación

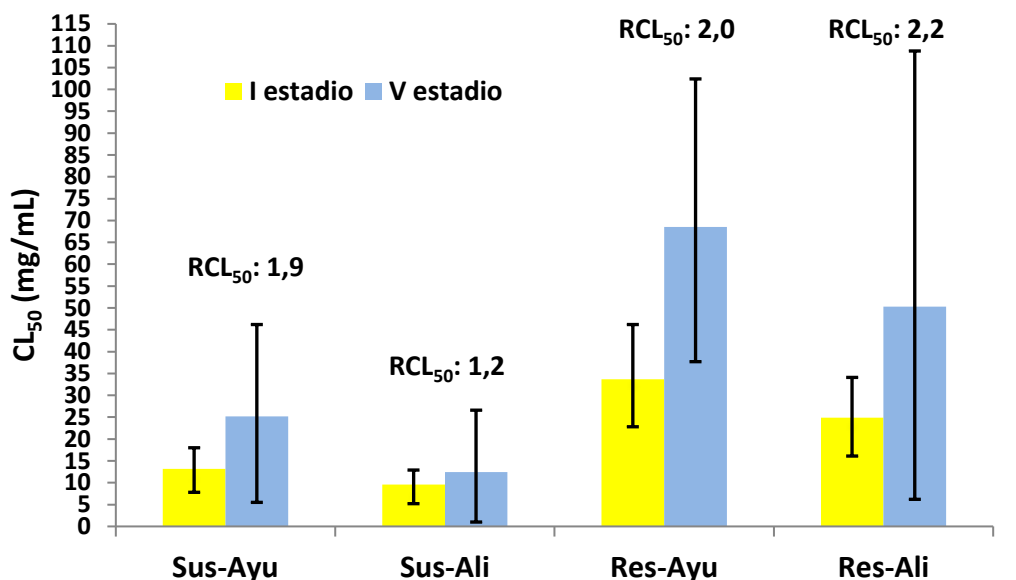
<sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las  $CL_{50}$ :  $CL_{50}$  (ninfas V estadio) /  $CL_{50}$  (ninfas I estadio)

Figura 27. Comparación de las CL<sub>50</sub> obtenidas para imidacloprid entre ninfas de *T. infestans* de I y V estadio



IE: I estadio      VE: V estadio      Sus: susceptibles      Res: resistentes  
 Ayu: ayunadas      Ali: alimentadas  
 Relación entre las CL<sub>50</sub>: CL<sub>50</sub> (ninfas V estadio) / CL<sub>50</sub> (ninfas I estadio)

En la Tabla 21 se observa la diferencia de susceptibilidad que se halló entre las ninfas de I y V estadio frente al fipronil. Las cuatro RCL<sub>50</sub> que se obtuvieron muestran una mayor susceptibilidad al fipronil entre las ninfas de I estadio con respecto a las de V. El promedio de las RCL<sub>50</sub> fue de  $4,5 \pm 1,1$ . La mayor diferencia de eficacia entre los estadios se registró con los insectos alimentados: para las ninfas susceptibles de V estadio se necesitó 5,7 veces más insecticida que para las de I estadio, similar a lo observado entre las ninfas resistentes alimentadas con una RCL<sub>50</sub> de 5.4 (3.7-8.0). Entre los individuos en estado de ayuno se encontró una menor diferencia de susceptibilidad: 3,8 (2,4-6,2) y 3,3 (1,7-6,3); para las ninfas susceptibles y resistentes, respectivamente, ambos valores por debajo de la media obtenida para todas las RCL<sub>50</sub> (Figura 28).

**Tabla 21. Comparación de la toxicidad del fipronil entre ninfas de *T. infestans* de I y V estadio en ninfas**

	n <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> (mg/mL) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RCL <sub>50</sub> (IC 95%)
<b>Ninfas susceptibles</b>				
VE Ayunadas	150	8,8 (3,9-18,2)	1,6 ± 0,3	
IE Ayunadas	150	2,3 (1,4-3,2)	1,6 ± 0,3	3,8 (2,4-6,2)
VE Alimentadas	150	3,7 (2,8-4,6)	3,0 ± 0,5	
IE Alimentadas	150	0,6 (0,4-0,9)	2,1 ± 0,5	5,7 (3,7-8,7)
<b>Ninfas resistentes</b>				
VE Ayunadas	150	7,8 (5,0-11,4)	1,3 ± 0,2	
IE Ayunadas	150	2,4 (1,1-4,0)	1,1 ± 0,3	3,3 (1,7-6,3)
VE Alimentadas	150	4,5 (3,4-5,7)	2,7 ± 0,5	
IE Alimentadas	150	0,8 (0,5-1,1)	2,0 ± 0,5	5,4 (3,7-8,0)

VE: V estadio

IE: I estadio

<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación

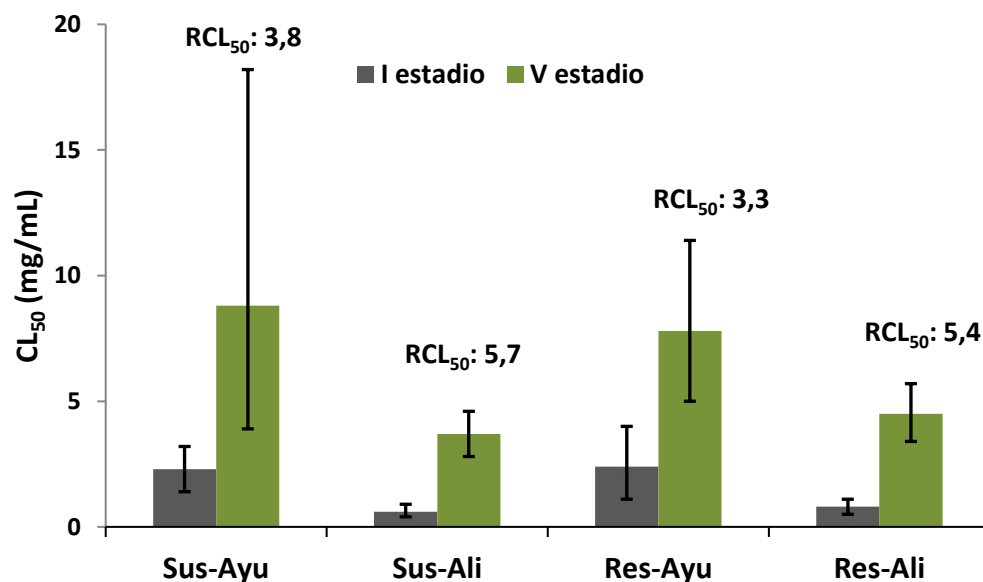
<sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las CL<sub>50</sub>: CL<sub>50</sub> (ninfas V estadio) / CL<sub>50</sub> (ninfas I estadio)

**Figura 28. Eficacia comparativa del insecticida fipronil expuesto en papel de filtro en ninfas de *T. infestans* de I y V estadio**



IE: I estadio

VE: V estadio

Sus: susceptibles

Res: resistentes

Ayu: ayunadas

Ali: alimentadas

Relación entre las CL<sub>50</sub>: CL<sub>50</sub> (ninfas V estadio) / CL<sub>50</sub> (ninfas I estadio)

En la Tabla 22 se presenta la toxicidad comparativa del fipronil de acuerdo al estadio de ninfas de *T. infestans* estudiado, considerando insectos con idéntica situación alimenticia y estado frente a piretroides. En las comparaciones que se realizaron se observaron diferencias significativas, siendo las vinchucas de I estadio, más susceptibles al insecticida que las de V estadio. El promedio de las RCL<sub>50</sub> fue de  $2,9 \pm 0,3$ . La mayor diferencia de susceptibilidad se registró entre las ninfas susceptibles en estado de ayuno (RCL<sub>50</sub>: 3,5 (2,1-5,8)). Las otras comparaciones arrojaron resultados similares para las restantes categorías de vinchucas (Figura 29).

**Tabla 22. Influencia del estadio de desarrollo de ninfas de *T. infestans* sobre la toxicidad del fipronil expuesto en vidrio**

	n <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> (mg/mL) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RCL <sub>50</sub> (IC 95%)
<b>Ninfas susceptibles</b>				
VE Ayunadas	150	3,4 (2,0-4,7)	1,7 ± 0,3	
IE Ayunadas	150	0,9 (0,6-1,3)	1,8 ± 0,4	3,5 (2,1-5,8)
VE Alimentadas	150	1,7 (0,7-2,3)	2,7 ± 0,7	
IE Alimentadas	150	0,6 (0,2-0,9)	1,5 ± 0,5	2,6 (1,4-4,9)
<b>Ninfas resistentes</b>				
VE Ayunadas	150	2,6 (1,8-3,4)	1,9 ± 0,4	
IE Ayunadas	150	1,0 (0,6-1,4)	1,5 ± 0,3	2,7 (1,7-4,4)
VE Alimentadas	150	1,4 (0,4-2,1)	2,6 ± 0,8	
IE Alimentadas	150	0,5 (0,2-0,7)	1,9 ± 0,5	2,8 (1,4-5,8)

VE: V estadio

IE: I estadio

<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación

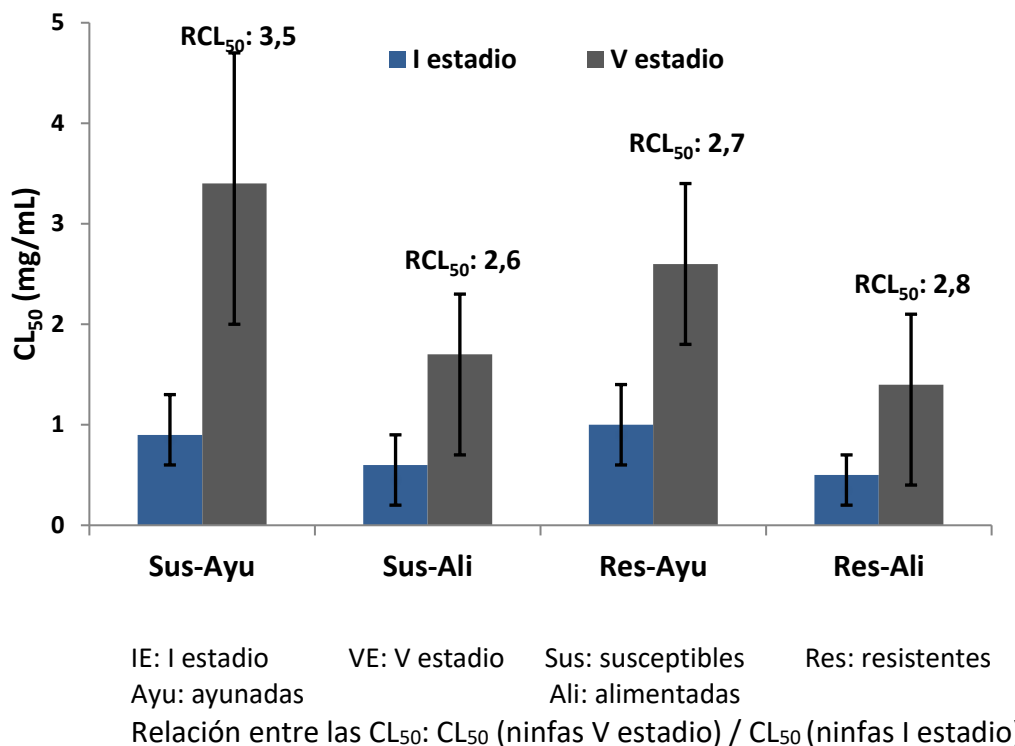
<sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto).

<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las CL<sub>50</sub>: CL<sub>50</sub> (ninfas V estadio) / CL<sub>50</sub> (ninfas I estadio)

**Figura 29. Toxicidad diferencial del fipronil de acuerdo al estadio de desarrollo de ninfas de *T. infestans***



En la Tabla 23 y Figura 30 se comparan las CL<sub>50</sub> obtenidas en ninfas expuestas al imidacloprid y al fipronil impregnados en papel de filtro. El promedio de las ocho categorías comparadas fue de  $11,3 \pm 8,2$ . En siete categorías de insectos se alcanzó una mayor eficacia triatómica del fipronil con respecto al imidacloprid. La excepción se registró con las ninfas de V estadio alimentadas susceptibles a piretroides en las que el IC 95% incluyó al número 1 (RCL<sub>50</sub>: 3,2 (0,9-10,7)). Contrastando a este resultado, se puede apreciar en la Tabla y en la Figura, que la mayor diferencia de actividad tóxica a favor del fipronil se registró en las ninfas resistentes de I estadio alimentadas, con una relación de concentración en el orden de 30 veces para el 50% de mortalidad entre las ninfas. En general, se observó una mayor diferencia de eficacia entre ambos insecticidas cuando fueron enfrentados a ninfas de I estadio con un promedio de las cuatro RCL<sub>50</sub> de  $16,2 \pm 8,8$  versus uno de  $6,5 \pm 3,5$  registrado para las ninfas de V estadio.

**Tabla 23. Comparación de la eficacia del fipronil y del imidacloprid impregnados en papel de filtro sobre ninfas de *T. infestans* de I y V estadio**

	n <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> (mg/mL) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RCL <sub>50</sub> (IC 95%)
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Im Ayunadas	150	13,2 (7,8-18,0)	2,1 ± 0,4	
Fip Ayunadas	150	2,3 (1,4-3,2)	1,6 ± 0,3	5,8 (3,4-9,8)
Im Alimentadas	150	9,6 (5,2-12,9)	2,7 ± 0,7	
Fip Alimentadas	150	0,6 (0,4-0,9)	2,1 ± 0,5	14,9 (8,9-24,8)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Im Ayunadas	150	33,7 (22,8-46,2)	1,9 ± 0,3	
Fip Ayunadas	150	2,4 (1,1-4,0)	1,1 ± 0,3	14,2 (7,6-26,7)
Im Alimentadas	150	24,9 (16,1-34,1)	1,9 ± 0,2	
Fip Alimentadas	150	0,8 (0,5-1,1)	2,0 ± 0,5	30,1 (18,8-48,2)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Im Ayunadas	150	25,2 (5,5-46,2)	1,0 ± 0,3	
Fip Ayunadas	150	8,8 (3,9-18,2)	1,6 ± 0,3	2,8 (1,2-6,9)
Im Alimentadas	150	12,4 (1,0-26,6)	1,1 ± 0,3	
Fip Alimentadas	150	3,7 (2,8-4,6)	3,0 ± 0,5	3,2 (0,9-10,7)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Im Ayunadas	150	68,5 (37,7-102,4)	1,1 ± 0,2	
Fip Ayunadas	150	7,8 (5,0-11,4)	1,3 ± 0,2	8,7 (4,8-16,0)
Im Alimentadas	150	50,3 (6,2-108,8)	1,1 ± 0,4	
Fip Alimentadas	150	4,5 (3,4-5,7)	2,7 ± 0,5	11,1 (6,2-19,7)

Im: imidacloprid

Fip: fipronil

<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación

<sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

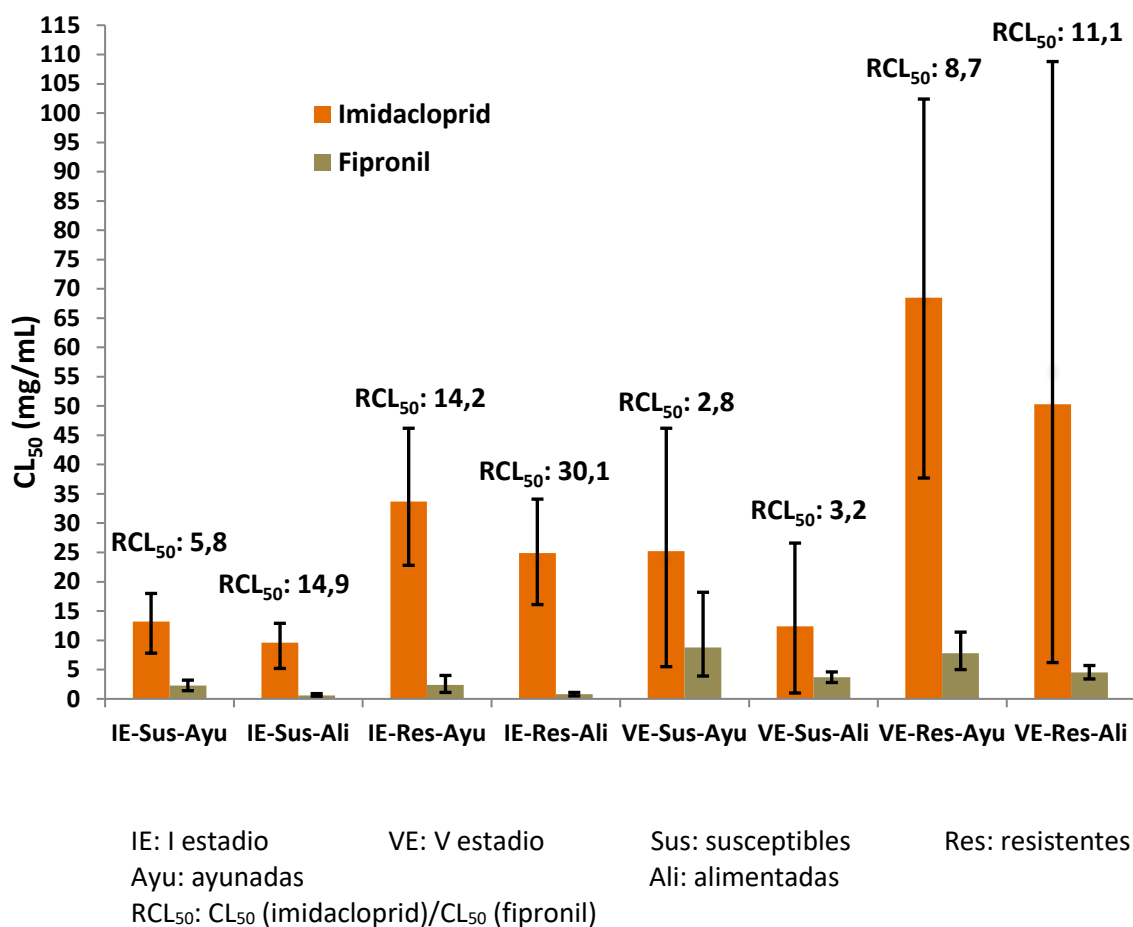
<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las DL<sub>50</sub>: DL<sub>50</sub> (imidacloprid) / DL<sub>50</sub> (fipronil)



Figura 30. Comparación de la eficacia triatómica del fipronil versus el neonicotinoide imidacloprid en ninfas de *T. infestans* de I y V estadio



Los datos consignados en la Tabla 24 y Figura 31 comparan la eficacia del insecticida fipronil sobre dos superficies de contacto distintas: papel de filtro y vidrio. En seis de las ocho categorías de ninfas estudiadas se registró una mayor eficacia tóxica cuando la molécula fue expuesta sobre vidrio al contacto con las ninfas. El promedio total de las RCL<sub>50</sub> fue de  $2,2 \pm 0,7$ . Las dos categorías de insectos en los que no se registró una diferencia significativa en la actividad tóxica de la molécula de acuerdo a la superficie de contacto fueron las ninfas susceptibles de I estadio alimentadas (RCL<sub>50</sub>: 0,9 (0,5-1,8)) y las vinchucas resistentes de I estadio alimentadas (RCL<sub>50</sub>: 1,6 (0,9-2,8)). En ambos casos el IC incluyó entre sus valores al número 1.

**Tabla 24. Comparación de la toxicidad del fipronil expuesto en papel de filtro y vidrio sobre ninfas de *T. infestans* de I y V estadio**

	n <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> (mg/mL) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RCL <sub>50</sub> (IC 95%)
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
PF Ayunadas	150	2,3 (1,4-3,2)	1,6 ± 0,3	
Vid Ayunadas	150	0,9 (0,6-1,3)	1,8 ± 0,4	2,3 (1,4-3,8)
PF Alimentadas	150	0,6 (0,4-0,9)	2,1 ± 0,5	
Vid Alimentadas	150	0,6 (0,2-0,9)	1,5 ± 0,5	0,9 (0,5-1,8)
<b>Ninfas resistentes</b>				
PF Ayunadas	150	2,4 (1,1-4,0)	1,1 ± 0,3	
Vid Ayunadas	150	1,0 (0,6-1,4)	1,5 ± 0,3	2,4 (1,2-4,6)
PF Alimentadas	150	0,8 (0,5-1,1)	2,0 ± 0,5	
Vid Alimentadas	150	0,5 (0,2-0,7)	1,9 ± 0,5	1,6 (0,9-2,8)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
PF Ayunadas	150	8,8 (3,9-18,2)	1,6 ± 0,3	
Vid Ayunadas	150	3,4 (2,0-4,7)	1,7 ± 0,3	2,5 (2,6-4,1)
PF Alimentadas	150	3,7 (2,8-4,6)	3,0 ± 0,5	
Vid Alimentadas	150	1,7 (0,7-2,3)	2,7 ± 0,7	2,1 (1,3-3,4)
<b>Ninfas resistentes</b>				
PF Ayunadas	150	7,8 (5,0-11,4)	1,3 ± 0,2	
Vid Ayunadas	150	2,6 (1,8-3,4)	1,9 ± 0,4	2,9 (1,8-4,6)
PF Alimentadas	150	4,5 (3,4-5,7)	2,7 ± 0,5	
Vid Alimentadas	150	1,4 (0,4-2,1)	2,6 ± 0,8	3,1 (1,7-5,1)

PF: papel de filtro

Vid: vidrio

<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación

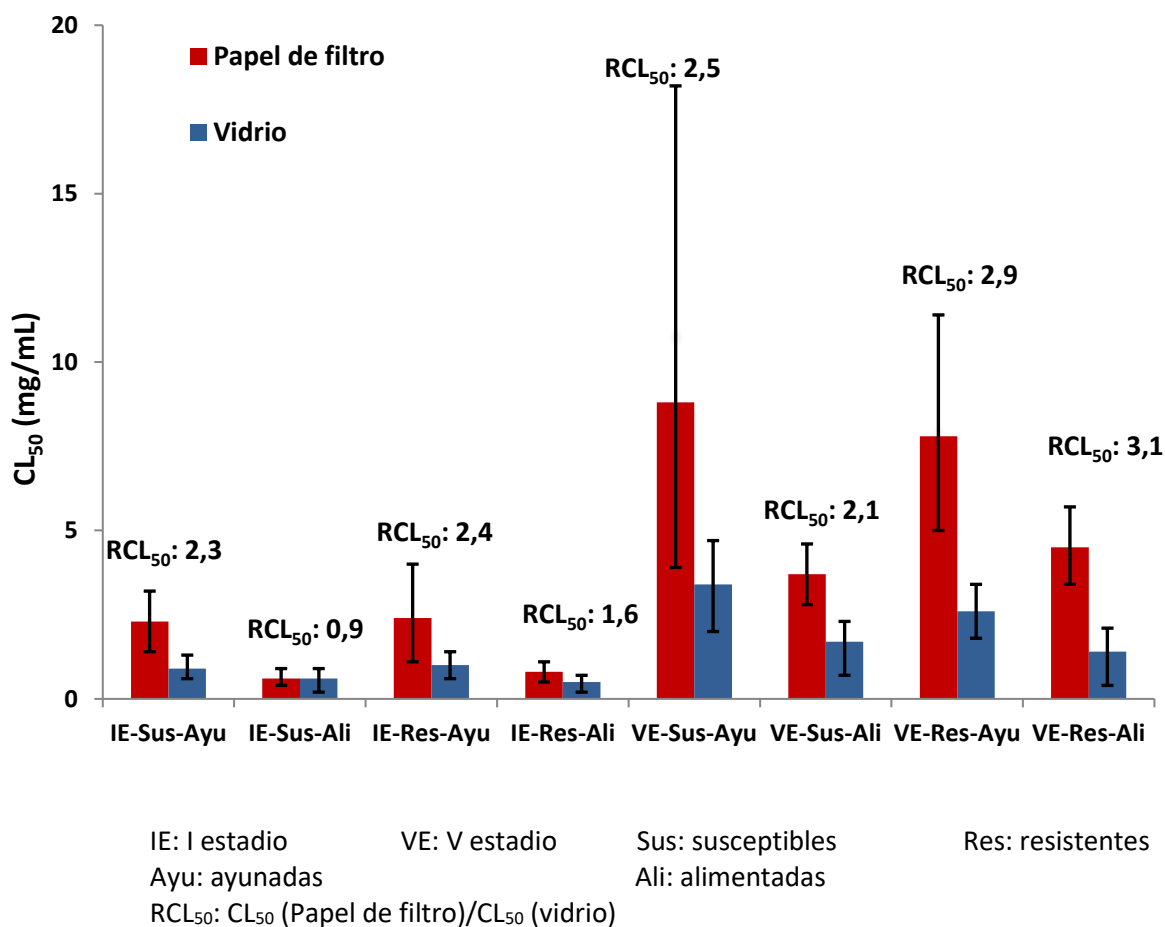
<sup>b</sup>Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las DL<sub>50</sub>: DL<sub>50</sub> (Papel de filtro) / DL<sub>50</sub> (Vidrio)

Figura 31. Comparación de la mortalidad ocurrida en ninfas de *T. infestans* expuestas al contacto con fipronil sobre una superficie de papel de filtro y de vidrio



### 2.3.3 CL<sub>50</sub> por vía oral

En la Tabla 25 se presentan las distintas CL<sub>50</sub> obtenidas cada 24 h de observación entre las ninfas que ingirieron alguno de los tres endectocidas evaluados. El efecto tóxico de los insecticidas aumentó en función del tiempo transcurrido desde que fueron ingeridos por las ninfas (disminución de las CL<sub>50</sub>). En el caso de la DRM se observó una disminución de la CL<sub>50</sub> en el orden de 100 veces entre las 24 y las 168 h de observación, tanto para las ninfas susceptibles como para las resistentes. Con la EPR se describió algo similar, ya que la CL<sub>50</sub> en ambas poblaciones de vinchucas disminuyó entre 80 y 100 veces desde las 24 a

las 168 h postingestión. La IVM fue el endectocida que mostró menor variación de su toxicidad durante el tiempo de observación, en el caso de las ninfas susceptibles, la disminución de la CL<sub>50</sub> fue de unas 17 veces, mientras que en la población de insectos resistentes la reducción de la concentración fue de 38 veces. Estos resultados son los primeros en demostrar una actividad triatómica de IVM, DRM y EPR cuando son ingeridos por ninfas de *T. infestans* de V estadio.

**Tabla 25. Estudio de la toxicidad sobre ninfas de *T. infestans* de DRM, EPR e IVM en las 168 h post-ingestión**

	CL <sub>50</sub> (ng/mL) <sup>a</sup> (IC 95%) <sup>b</sup>						
	Tiempo en horas postingestión del endectocida						
	24	48	72	96	120	144	168
<b>DS</b>	74,2 (62,5-88,5)	21,7 (17,1-28,2)	5,9 (4,7-7,5)	2,2 (1,8-2,7)	1,2 (1,0-1,4)	0,7 (0,5-1,1)	0,7 (0,3-1,2)
<b>DR</b>	64,5 (54,1-75,8)	19,1 (15,0-24,5)	4,7 (3,4-6,5)	2,6 (2,1-3,3)	1,1 (0,7-1,4)	0,7 (0,2-1,2)	0,6 (0,4-0,9)
<b>ES</b>	91,0 (63,1-125,2)	26,4 (20,2-35,7)	6,2 (4,7-8,2)	2,5 (2,1-3,2)	1,4 (0,8-2,7)	1,1 (0,9-1,3)	0,9 (0,8-1,2)
<b>ER</b>	85,1 (71,4-100,2)	18,6 (10,2-44,8)	5,0 (3,9-6,3)	2,4 (1,3-4,7)	1,2 (0,7-2,2)	1,1 (0,8-1,4)	1,0 (0,9-1,3)
<b>IS</b>	<b>ND</b>	37,3 (26,7-46,2)	26,2 (9,3-46,3)	6,2 (3,9-10,1)	3,7 (2,6-5,2)	3,0 (1,8-4,9)	2,2 (1,6-3,0)
<b>IR</b>	<b>ND</b>	45,8 (35,0-58,5)	23,4 (16,8-30,1)	3,9 (2,5-5,6)	2,2 (1,6-2,7)	1,5 (0,9-2,1)	1,2 (0,8-1,6)

<sup>a</sup> Concentración letal 50%

DS: CL<sub>50</sub> de DRM en ninfas susceptibles

ES: CL<sub>50</sub> de EPR en ninfas susceptibles

IS: CL<sub>50</sub> de IVM en ninfas susceptibles

<sup>b</sup> Intervalos de confianza del 95%

DR: CL<sub>50</sub> de DRM en ninfas resistentes

ER: CL<sub>50</sub> de EPR en ninfas resistentes

IR: CL<sub>50</sub> de IVM en ninfas resistentes

En la Tabla 26 y en la Figura 32 se presentan las relaciones que se obtuvieron al comparar las CL<sub>50</sub> de IVM, DRM y EPR entre la población de ninfas de V estadio susceptibles y la colonia de insectos resistentes a piretroides. Cabe destacar que en ninguno de los tres casos se registraron diferencias significativas entre las CL<sub>50</sub> de esas poblaciones. El promedio fue de  $0,8 \pm 0,2$  y los IC del 95% incluyeron al número 1 ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 26. Comparación de la eficacia de DRM, EPR e IVM sobre dos poblaciones de ninfas de *T. infestans* V estadio**

	n <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> ( ng/mL) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RCL <sub>50</sub> <sup>e</sup> (IC 95%)
<b>DRM</b>				
Resistentes	120	0,6 (0,4-0,9)	2,9 ± 0,3	
Susceptibles	120	0,7 (0,3-1,2)	3,3 ± 0,4	0,9 (0,7-1,2)
<b>EPR</b>				
Resistentes	120	1,0 (0,9-1,3)	3,3 ± 0,5	
Susceptibles	120	0,9 (0,8-1,2)	3,9 ± 0,6	1,1 (0,8-1,4)
<b>IVM</b>				
Resistentes	120	1,2 (0,8-1,6)	2,4 ± 0,4	
Susceptibles	120	2,2 (1,6-3,0)	2,2 ± 0,3	0,5 (0,4-1,0)

<sup>a</sup>Número de ninfas utilizadas en la determinación

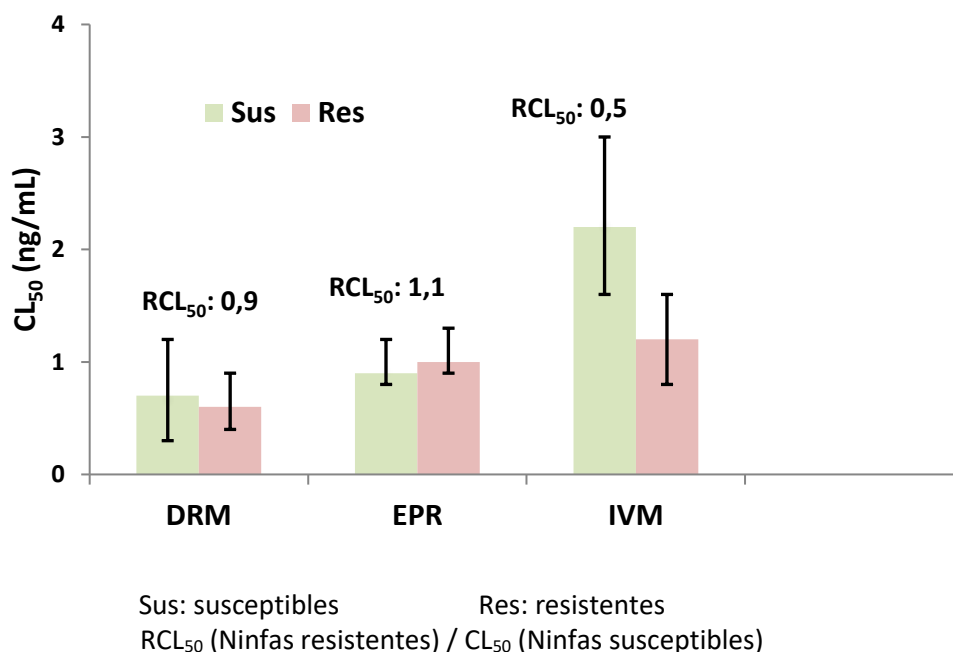
<sup>b</sup>Concentración letal 50%

<sup>c</sup>Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup>Error Estándar

<sup>e</sup>Relación entre las CL<sub>50</sub>: CL<sub>50</sub> (Ninfas resistentes) / CL<sub>50</sub> (Ninfas susceptibles)

**Figura 32. Comparación en la respuesta tóxica a IVM, DRM y EPR por parte de ninfas de V estadio, susceptibles y resistentes a piretroides**



Los resultados de las comparaciones de las CL<sub>50</sub> de los tres endectocidas se exponen en la Tabla 27 y Figura 33. Las RCL<sub>50</sub> muestran la mayor eficacia de DRM sobre IVM y EPR en ambas colonias de insectos (susceptibles y resistentes a piretroides). Para obtener el mismo efecto de la DRM, en el caso de las ninfas

susceptibles, se necesitaron concentraciones 1,4 mayores de EPR y 3,2 veces de IVM. En el caso de las vinchucas resistentes, las diferencias fueron de 1,6 veces con respecto a EPR y de 1,7 con IVM. La relación entre EPR e IVM en las ninfas susceptibles arrojó tanto una  $RCL_{50}$  como un IC 95% por debajo del número 1. Existió una diferencia de toxicidad de unas 2,5 veces a favor de EPR sobre IVM.

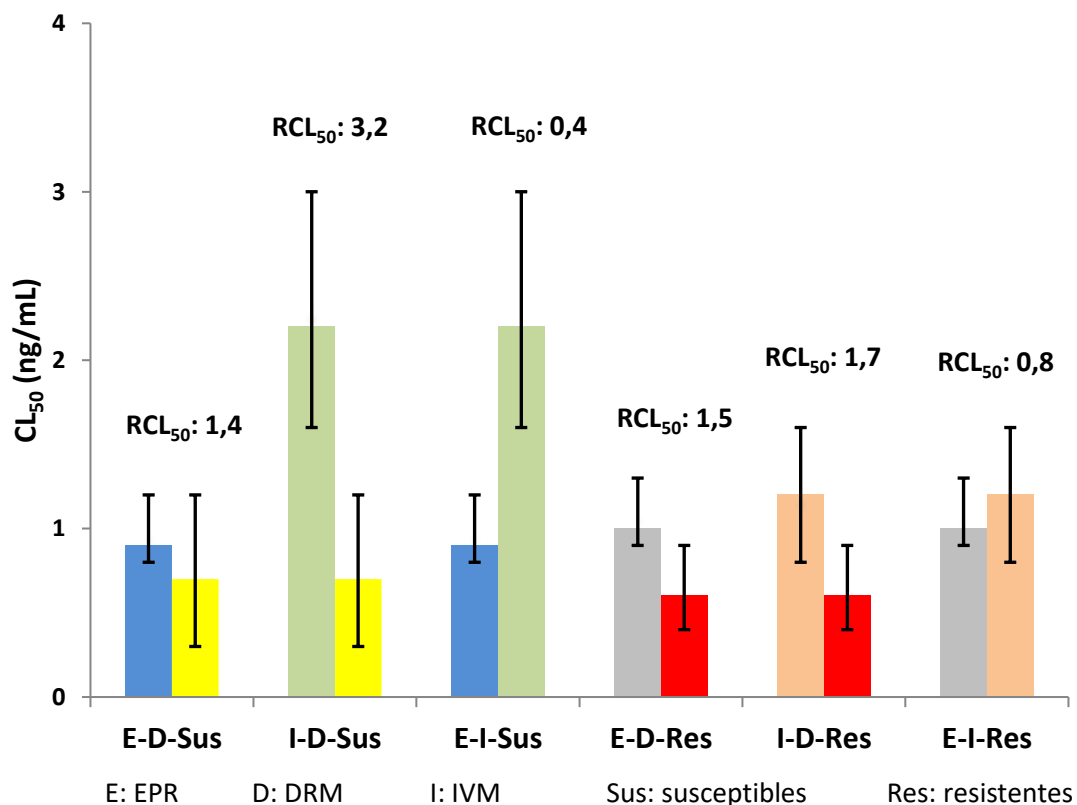
**Tabla 27. Comparación de la eficacia de DRM, IVM y EPR sobre ninfas de *T. infestans* de V estadio**

$RCL_{50}$ <sup>a</sup> (IC 95%) <sup>b</sup>		
Ninfas susceptibles		
	DRM	IVM
EPR	1,4 (1,1-1,8)	0,4 (0,3-0,6)
IVM	3,2 (2,3-4,5)	
Ninfas resistentes		
	DRM	IVM
EPR	1,5 (1,2-1,9)	0,8 (0,6-1,3)
IVM	1,7 (1,2-2,3)	

<sup>a</sup>Relación Concentración letal 50%:  $CL_{50}$  (endectocida fila) /  $CL_{50}$  (endectocida columna)

<sup>b</sup>Intervalos de confianza 95%

**Figura 33. Comparación en la respuesta tóxica a IVM, DRM y EPR de ninfas de *T. infestans* de V estadio**



En la Tabla 28 se presentan los consumos promedio realizados por ninfas susceptibles y resistentes, alimentadas con sangre enriquecida con los endectocidas bajo estudio, como así también el consumo promedio en las vinchucas alimentadas con sangre libre de endectocidas (control). El análisis de varianza realizado, no encontró diferencias significativas entre las diferentes situaciones de alimentación ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 28. Promedio de sangre consumida por ninfas de V estadio susceptibles y resistentes a piretroides**

Promedio de consumo de sangre (mg) $\pm$ DE <sup>a</sup>				
	DRM	EPR	IVM	Control
Ninfa V susceptible	137,6 $\pm$ 12,6	135,0 $\pm$ 11,7	142,5 $\pm$ 15,7	135,2 $\pm$ 14,5
Ninfa V resistente	139,7 $\pm$ 10,1	142,1 $\pm$ 12,9	136,1 $\pm$ 7,5	137,9 $\pm$ 9,5

<sup>a</sup>Desvío estándar

### 2.3.4 Actividad repelente

Mediante el ensayo de repelencia utilizando la técnica de preferencia de área, en las ninfas de I estadio no se encontraron diferencias significativas entre los PRs de los cinco insecticidas y los obtenidos con los insectos control ( $p > 0,05$ ). Esta similitud entre los PRs fue independiente del estado de alimentación y frente a los piretroides que presentaron las vinchucas de este estadio. En el caso de las ninfas de V estadio, el fipronil fue el único de los cinco insecticidas que demostró una actividad repelente estadísticamente significativa con respecto a la distribución observada en las vinchucas control ( $p < 0,05$ ) (Tablas 29 y 30). Esta actividad se presentó a las 24 h y se mantuvo constante hasta las 48 h desde que comenzó el ensayo (Tabla 30). La respuesta al insecticida de las vinchucas fue estadísticamente similar, independientemente de su estado de alimentación y frente a los piretroides ( $p > 0,05$ ). Este resultado determina por primera vez un

efecto de repelencia del fipronil sobre ninfas de *T. infestans* susceptibles y resistentes a piretroides.

**Tabla 29. Promedio de la actividad repelente de IVM, DRM y EPR en ninfas de *T. infestans* de V estadio**

Ninfas de V estadio ayunadas susceptibles				
Insecticida	Concentración(ng/mL)	Porcentaje de repelencia Tiempo de exposición (h)		
		1	24	48
IVM	200	0 ± 16	0 ± 0	6,7 ± 19
	100	6,7 ± 19	-13,3 ± 9	0 ± 16
	10	13,3 ± 18	0 ± 0	6,7 ± 19
EPR	200	-6,7 ± 9	0 ± 28	0 ± 0
	100	6,7 ± 34	-13,3 ± 9	13,3 ± 9
	10	0 ± 0	6,7 ± 19	0 ± 16
DRM	200	0 ± 28	0 ± 16	6,7 ± 19
	100	0 ± 16	0 ± 0	13,3 ± 9
	10	6,7 ± 19	6,7 ± 19	0 ± 16
Control	----	0 ± 16	0 ± 28	6,7 ± 9
Ninfas de V estadio ayunadas resistentes				
Insecticida	Concentración(ng/mL)	Porcentaje de repelencia Tiempo de exposición (h)		
		1	24	48
IVM	200	0 ± 0	6,7 ± 19	6,7 ± 19
	100	0 ± 28	-13,3 ± 9	0 ± 16
	10	13,3 ± 18	0 ± 0	6,7 ± 19
EPR	200	0 ± 0	-6,7 ± 9	0 ± 28
	100	20 ± 16	6,7 ± 19	0 ± 16
	10	0 ± 16	0 ± 0	-6,7 ± 9
DRM	200	0 ± 0	0 ± 16	0 ± 28
	100	6,7 ± 9	13,3 ± 9	20 ± 16
	10	0 ± 16	0 ± 28	0 ± 0
Control	----	6,7 ± 9	6,7 ± 9	0 ± 28
Ninfas de V estadio alimentadas susceptibles				
Insecticida	Concentración(ng/mL)	Porcentaje de repelencia Tiempo de exposición (h)		
		1	24	48
IVM	200	13,3 ± 24	6,7 ± 19	0 ± 0
	100	6,7 ± 19	13,3 ± 18	6,7 ± 34
	10	0 ± 28	0 ± 16	-6,7 ± 9
EPR	200	-13,3 ± 18	6,7 ± 34	0 ± 0



Ninfas de V estadio alimentadas susceptibles				
Insecticida	Concentración(ng/mL)	Porcentaje de repelencia Tiempo de exposición (h)		
		1	24	48
EPR	100	0 ± 28	-6,7 ± 19	-6,7 ± 19
	10	-13,3 ± 9	0 ± 16	6,7 ± 9
DRM	200	0 ± 28	13,3 ± 9	0 ± 16
	100	0 ± 16	0 ± 0	0 ± 28
	10	13,3 ± 9	0 ± 16	-13,3 ± 18
Control	---	-13,3 ± 18	0 ± 0	6,7 ± 9

Ninfas de V estadio alimentadas resistentes				
Insecticida	Concentración(ng/mL)	Porcentaje de repelencia Tiempo de exposición (h)		
		1	24	48
IVM	200	0 ± 16	0 ± 0	0 ± 28
	100	-6,7 ± 9	-20 ± 16	6,7 ± 9
	10	6,7 ± 34	6,7 ± 9	13,3 ± 24
EPR	200	13,3 ± 18	0 ± 0	0 ± 16
	100	0 ± 16	0 ± 16	6,7 ± 9
	10	20 ± 16	-6,7 ± 9	0 ± 28
DRM	200	0 ± 0	13,3 ± 24	13,3 ± 18
	100	6,7 ± 34	6,7 ± 9	-6,7 ± 9
	10	6,7 ± 9	-6,7 ± 34	0 ± 0
Control	----	6,7 ± 9	-6,7 ± 9	6,7 ± 9

**Tabla 30. Promedio de la actividad repelente del fipronil y del imidacloprid en ninfas de *T. infestans* de V estadio**

Ninfas de V estadio ayunadas susceptibles				
Insecticida	Concentración(mg/mL)	Porcentaje de repelencia Tiempo de exposición (h)		
		1	24	48
Fipronil	200	-6,7 ± 9	86,7 ± 9*	86,7 ± 9*
	150	0 ± 0	93,3 ± 9*	86,7 ± 9*
	100	6,7 ± 9	86,7 ± 9*	93,3 ± 9*
Imidacloprid	200	13,3 ± 18	0 ± 16	-6,7 ± 9
	150	0 ± 0	13,3 ± 18	13,3 ± 24
	100	0 ± 16	6,7 ± 9	6,7 ± 9
Control	----	0 ± 0	13,3 ± 18	6,7 ± 9

Ninfas de V estadio ayunadas resistentes				
Insecticida	Concentración(mg/mL)	Porcentaje de repelencia Tiempo de exposición (h)		
		1	24	48
Fipronil	200	-6,7 ± 9	93,3 ± 9*	100 ± 0*
	150	13,3 ± 24	93,3 ± 9*	86,7 ± 9*
	100	-20 ± 16	86,7 ± 9*	93,3 ± 9*
Imidacloprid	200	6,7 ± 9	0 ± 16	-13,3 ± 9
	150	0 ± 0	13,3 ± 9	0 ± 0
	100	0 ± 16	0 ± 0	0 ± 28
Control	----	13,3 ± 24	13,3 ± 9	6,7 ± 9
Ninfas de V estadio alimentadas susceptibles				
Insecticida	Concentración(mg/mL)	Porcentaje de repelencia Tiempo de exposición (h)		
		1	24	48
Fipronil	400	6,7 ± 9	100 ± 0*	93,3 ± 9*
	200	0 ± 0	93,3 ± 9*	86,7 ± 9*
	100	0 ± 16	86,7 ± 9*	100 ± 0*
Imidacloprid	200	13,3 ± 9	6,7 ± 9	0 ± 0
	150	6,7 ± 34	0 ± 28	-13,3 ± 9
	100	0 ± 28	-6,7 ± 9	6,7 ± 9
Control	----	0 ± 28	0 ± 28	6,7 ± 9
Ninfas de V estadio alimentadas resistentes				
Insecticida	Concentración(mg/mL)	Porcentaje de repelencia Tiempo de exposición (h)		
		1	24	48
Fipronil	400	6,7 ± 9	100 ± 0*	100 ± 0*
	200	0 ± 28	93,3 ± 9*	93,3 ± 9*
	100	0 ± 16	86,7 ± 9*	100 ± 0*
Imidacloprid	200	6,7 ± 34	0 ± 28	-6,7 ± 9
	150	0 ± 0	-13,3 ± 9	0 ± 0
	100	13,3 ± 9	6,7 ± 9	0 ± 28
Control	----	6,7 ± 34	0 ± 16	-6,7 ± 9

\*Valor con diferencia significativa con respecto al control (p < 0,05)

## 2.4 Discusión

**Ensayos de topicación.** La primera variable fisiológica que demostró tener influencia sobre la toxicidad del imidacloprid y del fipronil fue el estado nutricional de las vinchucas. En la presente Tesis se halló un comportamiento

similar de ambas moléculas cuando fueron topicadas sobre vinchucas recientemente alimentadas, se observó una eficacia máxima a las 24 h que se mantuvo constante durante el tiempo total de observación (168 h). Este comportamiento fue observado en las cuatro categorías de ninfas alimentadas, es decir, fue independiente del estadio de desarrollo y de la condición frente a los piretroides. Sin embargo, en las vinchucas que tomaron contacto con los insecticidas después de 15 días de ayuno postecdicis, se observó un incremento de la toxicidad en el tiempo de observación. Hay que señalar que este perfil de acción letal lenta del fipronil y del imidacloprid fue previamente descrito en otras especies de insectos.

En *Blatella germanica* (cucaracha) se describió un accionar lento del fipronil en machos adultos topicados, las  $DL_{50}$  de 10 poblaciones distintas de cucarachas disminuyeron desde las 24 hasta las 72 h postopicación, tiempo a partir del cual la toxicidad del insecticida se mantuvo constante (Nasirian y col., 2006).

En el caso del imidacloprid se comunicaron datos similares, en *Apis mellifera* (abeja) se demostró un aumento de la toxicidad de la molécula entre las 48 y 72 h postadministración, y se mantuvo constante su actividad letal (Suchail y col., 2000). Además, observaron que los signos de intoxicación en los insectos se iniciaron a partir de los 10 minutos de haber sido administrado el imidacloprid, mientras que la mortalidad comenzó recién a las 4 h y se prolongó hasta las 72 h de haber entrado en contacto con el insecticida. Un resultado similar se registró en *Rhagoletis pomonella* (mosca de la manzana) en la que el neonicotinoide alcanzó su actividad tóxica máxima después de cuatro días de ser administrado (Yu, 2015). Una posible explicación al incremento de la toxicidad de algunos insecticidas en el tiempo podría relacionarse con las distintas vías de metabolización que poseen los insectos. Un estudio llevado a cabo en *A. mellifera* demostró que el imidacloprid es biotransformado por oxidasas de función mixta produciendo cinco metabolitos distintos, dos de estas moléculas (olefin y 5-hidroxi-imidacloprid) se generan en las primeras 6 h postadministración del imidacloprid, coincidiendo con el tiempo en que comienzan los efectos mortales

del neonicotinoide en estos insectos. Además, la semivida de eliminación de ambos metabolitos es mayor a la del imidacloprid, lo que también explica la acción tóxica extendida hasta las 72 h desde que fue administrado el neonicotinoide en *A. mellifera* (Suchail y col., 2004). A las pocas horas de haber sido topicados el fipronil y el imidacloprid, se observó en las ninfas de I y V estadio signos claros de intoxicación (temblores generalizados, incoordinación en las patas durante el desplazamiento, etc.). Si bien la respuesta que se estudió fue la muerte del insecto, y el criterio de muerte fue que el insecto no pudiese trasladarse desde el centro del papel de filtro hasta el borde, en ocasiones fueron observados insectos que llegaron hasta el borde del papel, pero lo hicieron con dificultad. Esta secuencia de una pronta presentación de signos de intoxicación y una muerte retardada de las vinchucas fue coincidente con lo descrito en las abejas. Hay varios antecedentes sobre el accionar del fipronil topicado sobre *T. infestans* (Germano y col., 2010; Roca-Acevedo y col., 2011), pero, en ninguno de estos trabajos se realizó un estudio de la evolución de la toxicidad en el tiempo. La mortalidad en cada uno de estos trabajos fue evaluada a las 24 h del contacto con las ninfas, por lo tanto, es en este trabajo de Tesis, en el que se determinó por primera vez el efecto temporal del insecticida en ninfas de I y V estadio de *T. infestans*. Teniendo en cuenta estos resultados se podría inferir que, en los trabajos de estos autores, existió una subestimación de la toxicidad de la molécula sobre las ninfas de *T. infestans*. En el caso del imidacloprid su actividad tóxica en el tiempo fue estudiada en ninfas de I estadio de *T. infestans* (Carvajal y col., 2014). Los autores estudiaron la cinética de mortalidad del insecticida durante 72 h en vinchucas susceptibles (Santiago del Estero) y en una colonia de ninfas resistentes a piretroides (El Malá, Provincia del Chaco). Las  $DL_{50}$  obtenidas a las 24 h de haber sido topicado el imidacloprid se mantuvieron constantes hasta transcurridas las 72 h, resultado que se contrapone a lo observado en este estudio. Por otra parte, en el trabajo de Carvajal, los autores no encontraron diferencias significativas cuando compararon las  $DL_{50}$  del imidacloprid topicado en ninfas ayunadas y alimentadas a repleción. Este resultado también se contrapone a los datos aportados en esta Tesis, ya que en

nuestros ensayos de topicación se estableció una mayor susceptibilidad a ambos insecticidas en las ninfas alimentadas a repleción. Esta diferencia de susceptibilidad fue independiente del estadio de la ninfa y de su estado frente a los piretroides.

La incidencia del estado nutricional en la susceptibilidad a insecticidas fue comunicada en distintas especies de insectos (Busvine, 1971). En *T. infestans*, Fontán y Zerba (1992) compararon la eficacia tóxica del DDT entre ninfas de II estadio con 15 días de ayuno y alimentadas a repleción, los resultados demostraron una influencia directa del estado nutricional sobre la toxicidad del organoclorado. En las ninfas ayunadas la concentración máxima de DDT evaluada (150 µg/insecto) no demostró efectos tóxicos, mientras que en los insectos alimentados a repleción, la DL<sub>50</sub> fue de tan solo 1,1 µg/insecto, es decir, una dosis 140 veces menor. Una posible explicación para la mayor eficacia del imidacloprid y el fipronil en las ninfas alimentadas a repleción podría estar asociada a la capacidad que poseen determinadas especies de insectos en modificar las propiedades mecánicas de su cutícula. Este proceso al que se lo denominó plasticización (Reynolds, 1974), involucra modificaciones en las propiedades mecánicas de la cutícula a partir de cambios en el pH de su fase acuosa, lo que determina la ruptura de uniones débiles entre las proteínas y las microfibrillas de quitina. Estas modificaciones reversibles, le permiten a la procutícula una mayor capacidad de estiramiento. La plasticización ha sido estudiada en *Rhodnius prolixus* por Nuñez (1963) y Reynolds (1975), quienes demostraron la importancia que posee la plasticización durante el proceso de muda y también durante la alimentación del insecto. Observaron que en ninfas de V estadio, la plasticización les permitió multiplicar varias veces su tamaño original. En ninfas de V estadio de *T. infestans* se demostró que la oferta de alimento durante 1 minuto en un alimentador artificial es suficiente para desencadenar el proceso de plasticización. La importancia de este proceso, en relación con los insecticidas, radica en que en una ninfa alimentada a repleción, los pliegues de su epicutícula se encuentran extendidos y la procutícula más flexible, permitiendo una mayor penetración de moléculas desde el exterior al interior del insecto

(Melcón, 2004). Este dato podría explicar la diferencia en la cinética y la intensidad de la respuesta tóxica del fipronil y del imidacloprid observada entre las ninfas ayunadas y las alimentadas a repleción. Como ya fuera mencionado, para que un insecticida provoque una determinada respuesta (en nuestro caso, la muerte del insecto) se debe acumular en una concentración efectiva en su sitio diana, teniendo en cuenta que la vía de administración de ambos insecticidas fue la tópica, es válido suponer que antes de entrar en contacto con su sitio diana (sistema nervioso de los insectos) existió un importante proceso de absorción a través de la cutícula, que fue seguido por un fenómeno de distribución de las moléculas desde la hemolinfa hacia el resto de los tejidos. Por lo tanto, y de acuerdo con lo observado en nuestros ensayos, podemos inferir que en las ninfas alimentadas a repleción, la plasticización permitió una mayor entrada a los insectos, tanto del imidacloprid como del fipronil, lo cual se tradujo, en una mayor respuesta tóxica ( $DL_{50}(\text{alimentadas}) < DL_{50}(\text{ayunadas})$ ), y a su vez más rápida (24 h). En el trabajo de Fontan y Zerba los autores además de comunicar la diferencia de susceptibilidad entre las ninfas ayunadas y las alimentadas, estudiaron, mediante el uso de  $^{14}\text{C}$ -DDT, la tasa de penetración del organoclorado en ninfas de II estadio de *T. infestans*, observando una mayor tasa de penetración en las vinchucas alimentadas a repleción. Este resultado concuerda con lo observado en los ensayos de topicación de esta Tesis.

Entre otros resultados se encontró una actividad letal atenuada del imidacloprid cuando fue topicado sobre ninfas de I y V estadio *T. infestans* resistentes a piretroides. Al fenómeno de falta de respuesta de un grupo de insectos para con un insecticida en particular se lo suele denominar resistencia o tolerancia. Estos dos términos no son sinónimos de un mismo proceso. La resistencia se define como la capacidad natural que poseen algunos individuos para soportar, debido a características preadaptativas, dosis de un compuesto que ocasiona la muerte a la mayoría de la población tratada. Estos individuos, seleccionados por el insecticida, se reproducirán con éxito transmitiendo a la descendencia sus ventajosas características. La resistencia comienza siendo de individuos, para después, debido a la presión de selección del insecticida,

transformarse en población resistente (Onstad y Guse, 2008). En cambio, el fenómeno de tolerancia se describe como una menor susceptibilidad al insecticida de una población, sin que haya existido un contacto previo entre dicha población y el insecticida en cuestión. En este caso las características del fenotipo tolerante son seleccionadas por el ambiente y no por el insecticida. Es por esto, que en numerosas ocasiones al término tolerancia se lo acompaña con la palabra *natural*. A las  $RDL_{50}$  obtenidas de la comparación de las  $DL_{50}$  para el imidacloprid entre las ninfas resistentes y susceptibles a piretroides se pueden denominar también como grados de tolerancia.

En los trabajos de Carvajal y col. (2012, 2014), los autores compararon la susceptibilidad al imidacloprid entre ninfas de I estadio susceptibles a piretroides (Santiago del Estero) y resistentes a piretroides (El Malá, Chaco). Al comparar las  $DL_{50}$  obtenidas en ambas poblaciones de vinchucas ayunadas con las registradas en esta Tesis ( $DL_{50}$  (Santiago del Estero) (5,2) vs  $DL_{50}$ (Santiago del Estero) (4,6) y  $DL_{50}$ (Chaco) (9,2) vs  $DL_{50}$  (Salta) (40,8)), se observa una leve diferencia entre los valores de las  $DL_{50}$  de las ninfas susceptibles (Santiago del Estero) y un contraste muy importante entre la susceptibilidad al imidacloprid por parte de las dos poblaciones de vinchucas resistentes a piretroides (Chaco y Salta). Los autores también calcularon las  $DL_{50}$  para las ninfas alimentadas a repleción, comparando estos valores con los de esta Tesis: ( $DL_{50}$  (Santiago del Estero) (4,0) vs  $DL_{50}$ (Santiago del Estero) (2,6) y  $DL_{50}$ (Chaco) (10,8) vs  $DL_{50}$  (Salta) (10,3)), se puede apreciar que entre las vinchucas resistentes alimentadas el valor fue muy similar, y que inclusive la  $DL_{50}$  del imidacloprid obtenida entre las ninfas procedentes de Salvador Mazza, fue menor a la calculada para las vinchucas provenientes del Chaco. Por lo tanto, la alimentación de las vinchucas procedentes de Salvador Mazza tuvo un efecto directo sobre la toxicidad del imidacloprid. Esta mayor respuesta tóxica no fue observada entre los insectos provenientes del Chaco. Para esgrimir una posible explicación a esta afirmación, se debe tener en cuenta que una respuesta diferencial a la eficacia de un insecticida por parte de dos poblaciones de una misma especie de insectos, puede estar asociada principalmente a fenómenos distintos: variaciones en la penetración de la molécula (cutícula), procesos de

metabolización exacerbados o reprimidos y finalmente, cambios a nivel molecular de la diana farmacológica del insecticida. Pedrini y col., (2009) estudiaron la estructura de la cutícula de ninfas de IV estadio de *T. infestans* resistentes a piretroides, provenientes de Salvador Mazza (Salta), y mediante el empleo de un microscopio electrónico de barrido detectaron la presencia de una cutícula de mayor grosor entre las vinchucas resistentes en comparación con las susceptibles (32  $\mu\text{m}$  vs 17  $\mu\text{m}$ , para las ninfas resistentes y susceptibles, respectivamente). Además, establecieron la presencia de un porcentaje mayor de hidrocarburos (56%) en la epicutícula de las ninfas resistentes en comparación con los observados entre los insectos susceptibles. Estos datos determinan que parte de la resistencia a los piretroides exhibida por las vinchucas procedentes de Salvador Mazza, está sustentada en una menor penetración del insecticida a través de la cutícula. Teniendo en cuenta que las ninfas utilizadas en esta Tesis provinieron de Salvador Mazza y por lo tanto tienen las características antes mencionadas, podemos suponer que la tasa menor de penetración del imidacloprid a través de la cutícula engrosada fue revertida en los insectos alimentados a ración por el proceso de plasticización. Así se determina por primera vez una diferencia entre los perfiles toxicológicos de dos poblaciones de vinchucas resistentes a piretroides de acuerdo a la susceptibilidad al imidacloprid: ninfas resistentes a piretroides y susceptibles al imidacloprid (El Malá, Chaco), y ninfas resistentes a piretroides y tolerantes al imidacloprid (Salvador Mazza, Salta). Este resultado será ampliado y discutido con mayor profundidad en el Capítulo 4 de esta Tesis.

En cuanto a la actividad letal del fipronil los resultados obtenidos confirman lo publicado por Toloza y col., (2008). Quienes estudiaron la actividad sobre huevos y ninfas de I estadio provenientes de Salvador Mazza (resistentes a piretroides) y de una colonia de vinchucas susceptibles a piretroides propia de su laboratorio (CIPEIN). Tanto en los huevos como en las ninfas, el fipronil presentó una eficacia similar entre los insectos susceptibles y resistentes a piretroides. Los valores de las  $DL_{50}$  para las ninfas de I estadio presentados en esta Tesis fueron similares a los comunicados en el trabajo de Toloza. Los autores informaron una  $DL_{50}$  de 2,1 y 5,0 ng/insecto para las ninfas susceptibles y resistentes,



respectivamente, con una  $RDL_{50}$  de 1,9 (1,0-3,7), mientras que observamos  $DL_{50}$  de 4,0 y 5,7 ng/insecto para las ninfas susceptibles y resistentes, respectivamente, y una  $RDL_{50}$  de 1,4 (0,9-2,0). Hay que señalar que en trabajos posteriores a los de Toloza, se estableció, de acuerdo a la actividad letal de los piretroides y el fipronil, un perfil toxicológico diferencial sobre ninfas de I estadio de *T. infestans*, con poblaciones provenientes de la provincia de Salta resistentes a piretroides y susceptibles a fipronil y poblaciones de distintas zonas de Bolivia resistentes a piretroides y tolerantes al fipronil (Germano y col., 2010; Roca-Acevedo y col., 2011). En esta Tesis se confirmó este perfil toxicológico entre las ninfas de I estadio y a su vez, se aportó el dato novedoso que ese mismo perfil tóxico también se extendió entre las ninfas de V estadio de *T. infestans* resistentes a piretroides (Salvador Mazza).

Se han registrado diversos antecedentes sobre la actividad tóxica diferencial que poseen algunos insecticidas en relación directa con el estadio de desarrollo de los insectos. Nosotros observamos una mayor susceptibilidad al fipronil y al imidacloprid por parte de las ninfas de I estadio en comparación con las de V estadio de *T. infestans*. El promedio de las  $RDL_{50}$  para esos insecticidas fue similar, con una diferencia de dosis entre ambos estadios de 3,5 veces aproximadamente. No existe una regla en general en cuanto a la susceptibilidad y el estado de desarrollo, por ejemplo, las hembras adultas de la especie de garrapas (*Ornithodoros moubata*) son menos susceptibles a los piretroides que las ninfas de V estadio (Busvine S., 1971), mientras que, en *Trialeurodes vaporariorum* (mosca blanca), al evaluar la toxicidad de seis insecticidas se comunicó que los huevos fueron menos susceptibles que las ninfas de I estadio y la susceptibilidad a los insecticidas también fue diferente entre los estadios ninfales, observándose una disminución en la toxicidad con el aumento del estadio ninfal evaluado (Wang y col., 2003). En triatominos fue puesta de manifiesto esta diferencia de susceptibilidad entre los distintos estadios del ciclo vital. Zerba y col., (1997), estudiaron la susceptibilidad de ninfas de I y V estadio y de adultos de ambos sexos de *T. infestans* a la topicación con beta-cipermetrina y deltametrina. Las ninfas de V estadio fueron menos susceptibles a ambos

insecticidas, seguido por el estadio adulto y finalmente por las ninfas de I estadio. Como parte de su Tesis doctoral, Germano (2012), evaluó el efecto de la deltametrina en los distintos estadios de desarrollo de *T. infestans* para lo cual utilizó una colonia de vinchucas susceptibles (CeReVe) y otra de individuos resistentes a piretroides (Aguaray, Salta). Entre los resultados, constató que la toxicidad del piretroide, en las ninfas de ambas colonias, disminuyó proporcionalmente con el estadio de desarrollo, registrándose incluso, una DL<sub>50</sub> para las ninfas de V estadio mayor a las observadas entre los adultos.

Una diferencia muy notoria en *T. infestans*, es el aumento de tamaño que acompaña al desarrollo del insecto (Figura 3). Si bien, se considera como regla general, que cuanto más grande es el insecto más superficie expuesta al intercambio de moléculas posee y con esto, una mayor susceptibilidad a los insecticidas, la relación superficie/volumen es menor en insectos grandes comparados con los pequeños, por lo tanto, el insecticida en el interior de un insecto grande puede sufrir un efecto de dilución que conllevará a una disminución de su concentración en el sitio diana (Busvine, 1971). También, en los estadios más avanzados, se ha especulado con el rol amortiguador que pudiera ejercer el cuerpo graso debido a su capacidad de acumular a los insecticidas de naturaleza liposoluble (Busvine S, 1971). Otra variable que se diferencia entre estadios de desarrollo en los insectos es la tasa y forma de penetración de los insecticidas. En *T. infestans*, Fontan y Zerba (1987), demostraron una forma distinta de penetración del paratión en ninfas de V estadio (superficie general de la cutícula) y hembras adultas (membranas intersegmentales y la unión de la cutícula ventral y dorsal). También determinaron para el organofosforado, una tasa de penetración de aproximadamente el doble en las ninfas de V estadio en comparación con las hembras adultas. No menos importante, es la demostración en insectos de la importancia de la metabolización en la respuesta tóxica a los insecticidas entre los distintos estadios de desarrollo. Se ha observado una diferencia sustancial con respecto a la actividad catalítica y de expresión de enzimas detoxificantes en los distintos estadios de desarrollo. En *Bemisia tabaci* (Mosca blanca), se demostró que en adultos la menor

susceptibilidad al imidacloprid con respecto a ninfas de II estadio, estuvo relacionada con una mayor expresión de ciertas isoformas de las monooxigenasas del citocromo P450 (Jones y col., 2011).

Cuando se realizó la comparación de la eficacia entre el fipronil y el imidacloprid sobre las ocho categorías de ninfas evaluadas en esta Tesis, se pudo apreciar que, salvo las ninfas de I estadio en estado de ayuno y susceptibles a los piretroides, en las restantes categorías el fipronil tuvo una mayor eficacia tóxica que el imidacloprid. Entre los resultados de las comparaciones de la eficacia de ambos insecticidas, es interesante observar la influencia que tuvo cada una de las variables en estudio. En el caso del estadio de desarrollo se pudo observar una leve diferencia en el promedio de las cuatro  $RDL_{50}$  del I estadio sobre el V ( $5,1 \pm 3,3$  y  $4,5 \pm 2,1$ , respectivamente). En cuanto al estado de alimentación, los promedios de las  $RDL_{50}$  también son similares entre las ninfas ayunadas y las alimentadas a repleción ( $4,2 \pm 2,4$  y  $5,3 \pm 2,9$ , respectivamente). Pero, cuando se analizan los promedios de las  $RDL_{50}$  entre las vinchucas susceptibles y resistentes a piretroides ( $2,2 \pm 0,7$  y  $7,4 \pm 1,2$ , respectivamente) se observa una diferencia significativa entre ambos, mientras que entre las ninfas susceptibles la diferencia en la dosis fue del doble para conseguir la misma respuesta (50% de mortalidad), en las resistentes se necesitó siete veces más dosis de imidacloprid que de fipronil para alcanzar el mismo efecto. La explicación de esta diferencia entre las dosis para ambos insecticidas se asocia con el fenómeno de tolerancia que desarrollaron las vinchucas resistentes a piretroides con el imidacloprid. Este fenómeno trajo aparejado como resultado final, un aumento de la dosis necesaria para alcanzar la respuesta estudiada y por lo tanto, un valor mayor en la  $RDL_{50}$  ( $DL_{50}$  (imidacloprid) /  $DL_{50}$  (fipronil)). En conclusión, de las tres variables fisiológicas en estudio, se pudo constatar que el estado de susceptibilidad a piretroides fue el que más influencia tuvo en la diferente susceptibilidad a ambos insecticidas.

Hay que destacar que, si bien existen antecedentes en otros insectos en los que se corroboran los resultados de esta Tesis, también existen publicaciones que demuestran que en ciertas especies de insectos, el imidacloprid registró una

mayor eficacia que el fipronil; en áfidos se constató una eficacia letal del imidacloprid por encima del fipronil (Kumar y col., 2017).

**Ensayos de contacto con superficies tratadas.** La actividad del fipronil y del imidacloprid cuando son impregnados sobre superficies de contacto en ninfas de *T. infestans* halladas en esta Tesis confirman lo publicado en trabajos previos. Rojas de Arias y Fournet (2002) estudiaron la actividad tóxica del fipronil impregnado en distintas superficies. Los triatominos evaluados fueron ninfas de *Triatoma infestans* y *Rhodnius neglectus* de V estadio. En el papel de filtro, el fipronil arrojó una CL<sub>50</sub> de 106,7 mg/m<sup>2</sup>; pero, en la metodología llevada a cabo hay variaciones con respecto a la utilizada y descrita en esta Tesis. Los autores dejaron a las ninfas durante 24 h en contacto con la superficie tratada y la mortalidad se registró a las 72 h postcontacto. En cuanto al imidacloprid, en el trabajo de Carvajal y col., (2014), se estudió la actividad del insecticida presente en distintas formulaciones comerciales impregnadas en vidrio y en papel de filtro. Utilizaron ninfas de I y III estadio, de las cuatro formulaciones ensayadas (Mamboretá CONFÍ®, EC-Chemotécnica®, Confidor® y Advantage®) ninguna demostró actividad sobre las ninfas en vidrio, mientras que solo Advantage® tuvo actividad sobre papel de filtro con una CL<sub>50</sub> de 22,84 mg/mL en ninfas de I estadio. Este resultado coincide con la actividad demostrada por el insecticida en nuestros ensayos: eficaz en papel de filtro e ineficaz en vidrio.

En los ensayos de contacto con superficies tratadas llevados a cabo en esta Tesis, se pudo apreciar un patrón de respuesta en el tiempo similar a lo observado en los ensayos de topicación. En todos los casos en que se registró actividad de los insecticidas, independientemente de la superficie, se pudo apreciar una toxicidad constante en las 168 h de observación para las vinchucas alimentadas a repleción y una respuesta que varió en el tiempo para las ninfas ayunadas. Este patrón de respuesta similar de las ninfas a los insecticidas registrado en ambos métodos, no debe ser tomado en cuenta como una generalidad y suponer que los resultados obtenidos por ambos métodos serán similares y extrapolables. Por ejemplo, en nuestro estudio, en los ensayos de

topicación en las ninfas se pudo constatar la influencia de las tres variables fisiológicas en estudio sobre la actividad del imidacloprid. Sin embargo, el imidacloprid cuando fue impregnado sobre papel de filtro demostró una eficacia similar sobre las ninfas alimentadas y las ayunadas durante 15 días. Es decir, que la variable del estado de alimentación de las vinchucas tuvo un efecto en la respuesta del neonicotinoide cuando fue topicado que no pudo ser constatado cuando fue impregnado sobre papel de filtro. A su vez, si bien con el imidacloprid impregnado en papel de filtro, se corroboró una menor respuesta al insecticida de las ninfas resistentes a piretroides que la observada en el ensayo de topicación, el promedio de las  $RCL_{50}$  fue de  $3,0 \pm 0,7$ ; valor menor al observado entre las  $RCL_{50}$  del ensayo de topicación ( $5,3 \pm 1,2$ ). En el caso de la influencia del estadio de desarrollo, el imidacloprid impregnado sobre papel de filtro demostró una mayor actividad sobre ninfas de I estadio en dos de las cuatro  $RCL_{50}$  obtenidas, con un promedio de  $1,8 \pm 0,4$ . Mientras que cuando fue topicado, el insecticida tuvo una diferencia significativa de actividad sobre las ninfas de I estadio en las cuatro  $RCL_{50}$  con un promedio de  $3,7 \pm 1,2$ . En cuanto a la respuesta desarrollada en las ninfas por el contacto con el fipronil impregnado en papel de filtro y en vidrio, también se pudieron constatar diferencias con los valores obtenidos por la topicación del insecticida sobre las ninfas. Si bien tanto en el contacto con el papel de filtro (promedio  $RCL_{50}$ :  $2,5 \pm 0,7$ ) como con el vidrio ( $1,7 \pm 0,2$ ), el fipronil mostró una eficacia diferencial de acuerdo al estado de alimentación de los insectos, en ambos casos los promedios de las  $RCL_{50}$  fueron menores al estimado para la topicación ( $3,4 \pm 0,8$ ). Las diferencias entre las  $CL_{50}$  de acuerdo al estadio de desarrollo fueron más heterogéneas aún. El promedio de las  $RCL_{50}$  obtenidas en papel de filtro fue más alto que la alcanzada por topicación ( $4,5 \pm 1,1$  y  $3,5 \pm 1,6$ , respectivamente), mientras que la diferencia de susceptibilidades entre ambos estadios en vidrio fue la menor de todos ( $2,9 \pm 0,3$ ). Por último, la comparación de las  $CL_{50}$  para cada categoría de ninfa de ambos insecticidas impregnados en papel de filtro, confirmó la mayor eficacia letal sobre las ninfas del fipronil sobre el imidacloprid por el método de topicación, pero con un promedio significativamente mayor ( $11,3 \pm 8,2$  y  $4,8 \pm 2,8$ , papel de filtro y

topicación, respectivamente). En resumen, de la comparación de los resultados, así como hay patrones que se repiten en ambos métodos, otros resultados observados con el método de topicación no fueron constatados por el método de contacto con superficies tratadas. Ahora bien, ¿cuál de los dos métodos es el mejor?, es decir, ¿cuáles son los resultados que se deben tener en cuenta? Para intentar responder se debe analizar la pendiente de la regresión probit. La pendiente de cada  $DL_{50}$  o  $CL_{50}$  brinda una estimación del cambio de actividad por unidad de incremento de dosis o concentración (Robertson, 2007). Por lo tanto, cuanto mayor sea el valor de la pendiente, mayor será la respuesta (mortalidad) por unidad de incremento de la dosis o concentración del insecticida. Por el contrario, un valor bajo de la pendiente indica que la respuesta por unidad de incremento de la concentración fue baja. La pendiente indica el grado de homogeneidad de la respuesta de una determinada población ante un estímulo (Chilcutt y Tabashnik, 1995). Así, si se compara el promedio de las pendientes de las ocho  $DL_{50}$  del imidacloprid obtenidas por topicación versus las obtenidas por contacto impregnado en papel de filtro ( $2,4 \pm 0,5$  vs  $1,8 \pm 0,8$ ; respectivamente), se observa una respuesta más homogénea en el caso de la topicación. Si se tiene en cuenta que en ambos métodos se utilizaron insectos provenientes de las mismas colonias y que el insecticida fue el mismo, queda por determinar el origen de la mayor heterogeneidad en la respuesta cuando el insecticida fue colocado sobre papel de filtro. La explicación a esta diferencia radica en la metodología de cada una de las dos técnicas comparadas. Si bien la vía por la cual el insecticida toma contacto con el insecto es la misma (la cutícula), las zonas de esta estructura por donde lo hace son distintas: las gotas se topican en la zona dorsal del abdomen; mientras que en el contacto con la superficie, el insecto lo lleva a cabo principalmente con la cutícula de las patas y la zona ventral del abdomen. Teniendo en cuenta que la cutícula presenta diferente composición y grosor en las distintas estructuras de los insectos se comprende la importancia de esta diferencia entre ambas técnicas. Otra es la cantidad de insecticida que reciben los insectos. En el caso de la topicación, cada insecto recibe un volumen determinado con una cantidad conocida de moléculas (dosis), en cambio, en el

método de contacto, la cantidad de insecticida que entra en contacto con las insectos depende de la actividad locomotora que tenga cada individuo en particular, cuanto más se desplace durante la hora que permanece sobre la superficie tratada, mayor será la cantidad de insecticida con la que el insecto establezca contacto. Busvine (1971) afirmó que son los insectos los que se autodosifican de acuerdo a la actividad que lleven a cabo durante el tiempo de exposición al insecticida, por lo tanto, la cantidad de insecticida que toma contacto con cada insecto en el método con superficies tratadas es una incógnita. De esta manera, es razonable obtener resultados más heterogéneos a partir de este método. Diferencias similares entre ambas técnicas se verificaron con otros insectos, por ejemplo, en una colonia de cucarachas (*Blattella germanica*) resistente a DDT se registró por topicación resistencia cruzada a varios piretroides, mientras que, estas mismas moléculas cuando fueron expuestas en distintas superficies de contacto provocaron la muerte de las cucarachas resistentes al DDT (Scott y col., 1990). En *Rachiplusia nu* (oruga medidora), una de las principales plagas de la soja en Argentina, también se pudo constatar diferencias importantes entre ambos métodos. Estudiando la actividad de cinco piretroides sobre ninfas de III estadio de poblaciones de laboratorio y de campo, compararon la actividad de los piretroides topicándolos y por impregnación en papel de filtro. Entre los resultados está el caso de la permetrina, uno de los piretroides en estudio, el cual fue bien demostrativo de las diferencias antes discutidas entre los dos métodos. Administrada por topicación, la permetrina fue de los cinco piretroides ensayados, el más tóxico. Pero, fue la molécula menos tóxica cuando fue impregnada sobre papel de filtro. Cuando se compararon en poblaciones de laboratorio y de campo los niveles de resistencia en el ensayo de topicación, no pudieron ser constatados mediante el método de contacto sobre papel de filtro (Russo y col., 2012). *T. infestans* no está exenta de la discrepancia de resultados entre ambos métodos. Cuando se estudió la respuesta de las vinchucas a la deltametrina impregnada en papeles de filtro (Remón y col., 2017), se determinó que el estadio menos susceptible al insecticida fue el IV, mientras que por topicación del insecticida, Germano (2012), observó al V estadio como el

menos susceptible. Pese a sus pros y contras, ambos métodos son muy utilizados en la actualidad para el estudio de la actividad de insecticidas en distintas poblaciones de una misma especie de insectos.

**Ensayos con alimentador artificial.** La vía oral fue otra de las vías de ingreso de los insecticidas evaluada en esta Tesis. Los endectocidas ( IVM, DRM y EPR) fueron las tres moléculas en las que se pudo constatar actividad letal cuando fueron ingeridas por ninfas de *T. infestans* de V estadio. La ausencia de actividad letal del fipronil e imidacloprid demuestra que solo fueron efectivos cuando tuvieron contacto directo con la cutícula de las vinchucas. Los tres endectocidas, que no habían demostrado ninguna actividad por topicación ni por exposición en superficies, demostraron ser activos por vía oral sobre ninfas de V estadio de *T. infestans*. Este hecho demuestra la importancia de evaluar la actividad de los insecticidas por las distintas vías de ingreso en los insectos. Las causas que pueden ocasionar la ausencia de actividad de un insecticida cuando es ingerido, pueden estar relacionadas con procesos degradativos, por ejemplo cuando son disueltos en la sangre bovina, como se efectuó en nuestros ensayos. También se podría observar un proceso de biotransformación del insecticida en el sistema digestivo del insecto. Otra posible causa es que el insecticida en estudio tenga una actividad repelente cuando es ingerido, que se puede constatar ya que el insecto deja de alimentarse y se aleja de la fuente de alimentación (Busvine J., 1971). De acuerdo a los resultados de los ensayos realizados con el alimentador artificial, se descarta esta última causa, ya que los volúmenes de sangre ingeridos por las ninfas que se alimentaron con sangre enriquecida con imidacloprid o fipronil fueron similares al del resto de los tratamientos (endectocidas y control). Con el alcance de nuestros ensayos es imposible indicar la verdadera causa de la ausencia de actividad letal de ambos insecticidas, una manera de dilucidar esta falta de actividad podría ser marcar a las moléculas con un trazador y postingestión, determinar su ubicación en los diferentes tejidos del insecto.

La actividad por vía oral de IVM, DRM y EPR podría ser en parte, causal de la toxicidad similar que estas moléculas exhibieron en las vinchucas



susceptibles y resistentes a piretroides. Como ya fuera discutido con antelación, en las vinchucas resistentes evaluadas, se describió el engrosamiento de su cutícula, fenómeno que sería en parte determinante de la resistencia al contacto con piretroides (Pedrini y col, 2009). Por lo tanto, en este caso en particular, la vía oral surge como una alternativa para evitar el proceso de absorción por una cutícula engrosada. Si además a esto, se le suma el hecho que una vez en el interior del insecto los endectocidas interactuarán con una diana farmacológica distinta a la de los piretroides, estaremos ante una posible explicación de la susceptibilidad similar entre ninfas resistentes y susceptibles a estas moléculas.

En cuanto a los resultados de la actividad letal de los endectocidas, se pudo observar un incremento desde que fueron consumidas por los insectos. Este mismo patrón de actividad letal concuerda con lo observado en el insecto hematófago *Cimex lectularius* (chinche de cama). Utilizando un alimentador artificial para ninfas de III y IV estadio con sangre de ratón enriquecida con distintas concentraciones de IVM y se constató un aumento del porcentaje de mortalidad desde un 38 a un 50% entre los 13 y 21 días postingestión del endectocida (Sheele y col., 2013).

En cuanto a la comparación de la potencia de las tres endectocidas, DRM resultó ser la más potente para el 50% de mortalidad de las ninfas de V estadio en ambas colonias (susceptibles y resistentes a piretroides). EPR fue el que siguió en actividad letal a DRM e IVM fue la menos potente de las moléculas emparentadas. El orden de potencias entre los endectocidas comunicado en este Capítulo para *T. infestans*, no debe tomarse como una generalización para el resto de las especies de insectos. Por ejemplo, en un trabajo realizado en hembras de *Anopheles arabiensis* (mosquito vector de la malaria), alimentadas mediante un alimentador artificial con sangre bovina enriquecida con distintas concentraciones de IVM, DRM, EPR y moxidectina, se encontró que IVM fue el endectocida de mayor potencia seguido por EPR y DRM (Fritz y col., 2012). El resultado es opuesto a lo hallado en esta Tesis para las ninfas *T. infestans*.

Debido a que no se observaron diferencias significativas entre el volumen de sangre ingerida por las vinchucas alimentadas con sangre tratada, y con

sangre sin tratar (control), podemos afirmar que ninguna de las tres moléculas interfirió con el proceso normal de alimentación y que tampoco presentaron actividad repelente cuando fueron ingeridos por las ninfas de V estadio de *T. infestans*.

**Ensayos de repelencia.** La actividad repelente de una sustancia hacia un insecto se define como una serie de movimientos del insecto que provocan su alejamiento del lugar en donde se encuentra el repelente (White y Moore, 2015). Es común el uso de repelentes para fines personales, un ejemplo de esto, son los productos comerciales con N,N-Dietil-meta-toluamida, conocida como DEET, sustancia principalmente repelente de mosquitos. En un trabajo realizado por Sfara y col., (2006), utilizando la técnica de preferencia de área, determinaron actividad repelente del DEET sobre ninfas de I estadio de *T. infestans* de colonias resistentes a piretroides. En los resultados de los ensayos de repelencia presentados en esta Tesis se pudo identificar la actividad repelente del fipronil en ninfas de V estadio. Esta actividad registrada en ninfas alimentadas y ayunadas de ambas colonias es el primer informe de la actividad repelente del fipronil sobre esta especie.

La actividad repelente de una sustancia se manifiesta en un estímulo sensorial en el insecto, y la intensidad en la respuesta a este estímulo es determinada por su sistema nervioso. Se identificaron mutaciones en los canales de sodio en poblaciones de vinchucas resistentes a piretroides (Fabro y col., 2012) que serían determinantes, en parte, de la baja susceptibilidad demostrada por estos insectos hacia los piretroides. A su vez, en el trabajo de Germano (2012), se comunicó una menor tasa de crecimiento, fecundidad e ingesta de sangre por las vinchucas resistentes en comparación con los insectos susceptibles a los piretroides. Las perturbaciones en dichos procesos fisiológicos podrían relacionarse con las mutaciones en los canales de sodio. En *Aedes aegypti* resistente a piretroides, también se demostró una merma en la ingesta de sangre, en el número de hembras reproductoras y una relación inversa entre el grado de resistencia a los piretroides y la fecundidad de las hembras (Martins y

col., 2012). Por lo tanto, no es un dato menor que la actividad repelente del fipronil, comunicada en esta Tesis, se haya registrado con la misma intensidad en ninfas susceptibles y resistentes a los piretroides. Las modificaciones que se pudieran haber desarrollado en el sistema nervioso de las vinchucas resistentes provenientes de Salvador Mazza no interfirieron con la actividad repelente del fipronil.

En áreas con vinchucas resistentes a piretroides, un uso potencial de una molécula con esta capacidad podría ser el rociado de hogares y peridomicilios con el fin de desalojar a los insectos de sus escondites. También hay que tener en cuenta que esta molécula fue la única, de las cinco estudiadas en el presente trabajo, que demostró actividad letal sobre ninfas resistentes cuando fue topicada y la única que provocó la muerte de las vinchucas (susceptibles y resistentes) cuando fue expuesta en las dos superficies de contacto evaluadas. Esto la posiciona como un buen candidato para un uso complementario a los piretroides en zonas con presencia de vinchucas resistentes.

## **2.5 Conclusiones del Capítulo**

El objetivo principal de este Capítulo fue estudiar la actividad de IVM, DRM, EPR, imidacloprid y fipronil sobre ninfas de I y V estadio de *T. infestans*. Uno de los resultados más destacado de esta sección es que se constató, bajo condiciones de laboratorio, una actividad letal sobre ninfas de I y V estadio de *T. infestans* de los cinco insecticidas en estudio. Otro resultado, no menos importante que el anterior, es que la determinación de la eficacia triatomicida de las cinco moléculas, estuvo influenciada por la vía de ingreso al insecto. Estos resultados son de interés en el destino de las moléculas durante el desarrollo de esta Tesis. Ello quiere decir, que si alguno de los insecticidas evaluados, no hubiese demostrado actividad triatomicida en al menos uno de los ensayos llevado a cabo en este Capítulo, esa molécula habría sido descartada. A su vez, el hecho de haber establecido para cada uno de los cinco insecticidas en estudio, la vía de ingreso eficaz en las vinchucas, determinó la metodología de los

ensayos de xenointoxicación llevados a cabo posteriormente y que son descriptos en el Capítulo tres.

Otro resultado de suma importancia, fue el hallazgo de una actividad triatómica similar entre las vinchucas susceptibles y resistentes a piretroides de IVM, DRM, EPR y fipronil. Este resultado, se podría considerar como el primer paso en posicionar a estos insecticidas como alternativas en el control de poblaciones de *T. infestans* resistentes a piretroides de distintas zonas geográficas. Por último, cabe destacar la importancia de haber descripto en esta Tesis, por primera vez, un fenómeno de tolerancia hacia el neonicotinoide imidacloprid de ninfas resistentes a piretroides provenientes de la localidad de Salvador Mazza, Provincia de Salta. Este hallazgo demuestra la importancia de realizar el estudio de los perfiles tóxicos de las distintas poblaciones de vinchucas resistentes a piretroides. Un error grave sería que, a partir de la actividad tóxica demostrada por el imidacloprid sobre ninfas resistentes a piretroides provenientes de la Provincia del Chaco, se utilizase a esta molécula como una alternativa para el control de vinchucas resistentes provenientes de distintas zonas geográficas. Si bien en la población proveniente del Chaco el imidacloprid sería una alternativa eficaz para el control de vinchucas resistentes, con la población de Salta el efecto sería perjudicial, ya que generaría una selección de los individuos que son tolerantes a la actividad de la molécula.

## Capítulo III

## **Ensayos de xenointoxicación utilizando distintos modelos animales**

En este Capítulo se desarrollarán los ensayos de xenointoxicación utilizando distintos modelos animales: ratas, perros y gallinas. Las variables evaluadas en cada prueba dependen de la especie animal empleada y se describen oportunamente en cada una de las tres secciones en que se dividió este Capítulo.

### **Sección I**

#### **Estudio de la actividad de ivermectina, doramectina y aprinomectina sobre ninfas de V estadio de *T. infestans*, postadministración a ratas Wistar**

##### **3.1.1 Introducción**

El objetivo de los ensayos fue evaluar si la actividad de IVM, DRM y EPR sobre *T. infestans* se mantiene al emplear un modelo de roedor. Dicha actividad se estudió considerando cuatro variables: mortalidad, cantidad de alimento ingerido, volumen de excreciones y capacidad de los insectos para realizar el proceso de ecdicis o muda. El modelo de roedor fue elegido debido a que este tipo de animales representa, con los seres humanos, gatos, conejos y perros, una de las principales fuentes de alimentación para los triatominos domiciliarios y peridomiciliarios (Canals y col., 2000). La relación entre los triatominos y los roedores se acrecienta en ciertas zonas endémicas de la enfermedad de Chagas, en donde estos animales son utilizados como fuente de alimentación o como animales de compañía. Por ejemplo, en ciertas zonas de Perú, en donde es frecuente la presencia de cobayos (*Cavia porcellus*) en los domicilios, se comunicó

a esta especie como la principal fuente de alimentación para *Panstrongylus herreri*, un triatomino con hábitos domiciliarios (Pinto y col., 2008). Para *T. infestans*, los roedores representan la tercera fuente de alimentación (Solís y col., 2003). La importancia de la relación entre los triatominos y los roedores, se evidencia en la hipótesis que en la actualidad considera a los valles andinos de Bolivia como el lugar de origen de *T. infestans* y especula que la transición del vector entre el ambiente silvestre y el domiciliario se debió, entre otros aspectos, a la cría del cobayo por las tribus preincaicas (Noireau F., 1999).

Además de ser una excelente fuente de alimentación para distintos triatominos, los roedores son parte del ciclo epidemiológico de *T. cruzi* en todos sus niveles (selvático, domiciliario y peridomiciliario), habiéndose registrado más de 50 especies de roedores infectadas con *T. cruzi* (Canals y col., 2000). En Perú y Bolivia los roedores son los principales reservorios de *T. cruzi*. Por ejemplo, en *Cavia porcellus* la presencia del parásito se evidencia en más del 60% de los individuos (Maekelt, 1983).

Si bien no tienen un uso generalizado en Medicina Veterinaria, ciertos endectocidas son utilizados para eliminar a ecto y endoparásitos presentes en roedores. Por ejemplo, la IVM administrada por vía oral al 0,0005% durante 6 días consecutivos demostró ser eficaz en eliminar el nematodo *Syphacia obvelata* de ratones infectados (Ostlind y col., 1985). Por otro lado, IVM administrada por vía subcutánea a razón de 200 µg/Kg es eficaz para eliminar el acaro *Trixacarus caviae* en cobayos (Nath J., 2016).

Estas indicaciones de los endectocidas para eliminar endo y ectoparásitos en roedores, sumadas a la importancia que estos animales poseen en el ciclo de la enfermedad de Chagas, nos llevó a plantearnos el desarrollo de un modelo, utilizando ratas Wistar para evaluar la actividad tóxica de IVM, DRM y EPR sobre *T. infestans*.

### **3.1.2 Materiales y Métodos**

#### **3.1.2.1 Principios activos**

Ivermectina:(90%, Romikin, S.A.)

Doramectina: (94,8%, Romikin S.A.)

Eprinomectina: (90,7%, Romikin S.A.)

Dimetil sulfóxido: (99%, Sigma – Aldrich)

Ketamina: (Richmond, S.A.)

Acepromacina: (Holliday Scott, S.A.)

#### **3.1.2.2 Animales experimentales**

##### **3.1.2.2.1 Insectos**

Los insectos utilizados en este ensayo fueron ninfas de V estadio de *T. infestans* susceptibles a piretroides, provenientes de una colonia de nuestro insectario, cuyo origen se describió en el Capítulo 2, sección 2.2.1. La colonia de insectos fue alimentada sobre gallinas, una vez a la semana. Las vinchucas se mantuvieron a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura, 60-70% de humedad relativa (HR) y un ciclo de 12:12 luz: oscuridad.

##### **3.1.2.2.2 Ratas Wistar**

Se utilizaron 32 ratas Wistar de ambos sexos y de dos meses de edad, con un peso promedio de  $205 \pm 15$  g. Los animales recibieron agua y alimento *ad libitum* y se mantuvieron en condiciones ambientales controladas y constantes ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 70 a 80 % de HR).



### **3.1.2.2.3 Gallinas**

Se utilizaron 6 gallinas Rhode Island de entre 2,5-2,8 kg de peso. Las aves fueron mantenidas en condiciones controladas y constantes ( $22 \pm 2$  °C, HR de 50 a 70% y fotoperíodo de 12 h). Se les suministró agua y alimento *ad libitum*.

### **3.1.2.3 Soluciones endectocidas**

Se prepararon soluciones de IVM, DRM y EPR al 0,5 % en dimetilsulfóxido (DMSO), todas a partir de los ingredientes activos de grado técnico: ivermectina (90 %), eprinomectina (90,7 %) y doramectina (94,8 %). Para el cálculo de la concentración se consideró la pureza de cada sustancia, con el fin de ajustar la masa del ingrediente activo que debía pesarse e igualar así las concentraciones de los tres endectocidas.

### **3.1.2.4 Determinación de la actividad letal de IVM, DRM y EPR administrada en ratas Wistar sobre ninfas de V estadio de *T. infestans***

La metodología utilizada para conocer la actividad letal de todos los endectocidas administrados en ratas fue la siguiente: los roedores ( $n = 32$ ) se dividieron al azar en 2 grupos según la vía de administración de los endectocidas, y cada uno de estos grupos a su vez se subdividió en cuatro grupos de cuatro individuos (dos machos y dos hembras) (Tabla 31). Cada uno de los grupos de roedores se alojó en una jaula debidamente identificada. Cada grupo de roedores recibió IVM, DRM, EPR o DMSO por vía oral mediante sonda buco-esofágica (Figura 34 A), o por vía tópica mediante su aplicación puntual a nivel dorsal. Los endectocidas se administraron a razón de 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso vivo. Se administró DMSO (excipiente control) en igual volumen conjuntamente con el resto de los tratamientos. La administración de las moléculas se consideró como el tiempo 0. Para la alimentación de los insectos, éstos se depositaron individualmente en

tubos Eppendorf de 1,5 mL (Figura 34 B). Se colocó tela adhesiva en la mitad superior de la pared interior de cada tubo para permitir a los insectos trepar y llegar a tomar contacto con la piel de los roedores. Para mantener los tubos Eppendorf en contacto con las ratas, se utilizaron planchuelas de poliestireno de 20 x 20 cm, en las que se incrustaron cinco tubos Eppendorf (un insecto por recipiente), de manera que la parte superior del tubo, cubierta por un tul, quedase al ras de la planchuela. Así, sobre cada planchuela se ubicó una rata en posición de decúbito ventral, previamente anestesiada con ketamina (75 mg/kg de peso vivo) y acepromacina (2,5 mg/kg de peso vivo) por vía intraperitoneal, para garantizar su inmovilidad. Se alimentaron cinco vinchucas por cada rata durante 45 min (el promedio obtenido de las variables estudiadas para cada tiempo y tratamiento fue de 20 insectos). Los tiempos en los que se alimentaron los insectos fueron los siguientes: 24 h antes de la administración de las moléculas en las ratas (-24, control basal) y 24, 72, 168, 240 y 336 h post-administración. El tiempo -24 es un control que se realizó para descartar cualquier origen de mortalidad ocurrida entre las ninfas, que no fuese debida a la presencia de los endectocidas en las ratas. La mortalidad de los insectos se registró cada 24 h durante 14 días. Se consideró como muerto a aquel insecto que no pudo desplazarse desde el centro hasta el borde de un papel de filtro de 9 cm de diámetro por sus propios medios en forma espontánea o mediante la estimulación mecánica con una pinza.

**Tabla 31. Distribución del material biológico utilizado ninfas de V estadio de *Triatoma infestans* y ratas Wistar según los diferentes tratamientos evaluados**

VA	NT	TA	Número de ratas		Número de ninfas		
			Por tratamiento	Total	Por rata	Por tratamiento	Total
Tópica	4	6	4	16	5	20	480
Oral	4	6	4	16	5	20	480

VA: vía de administración

NT: número de tratamiento

TA: tiempos de alimentación

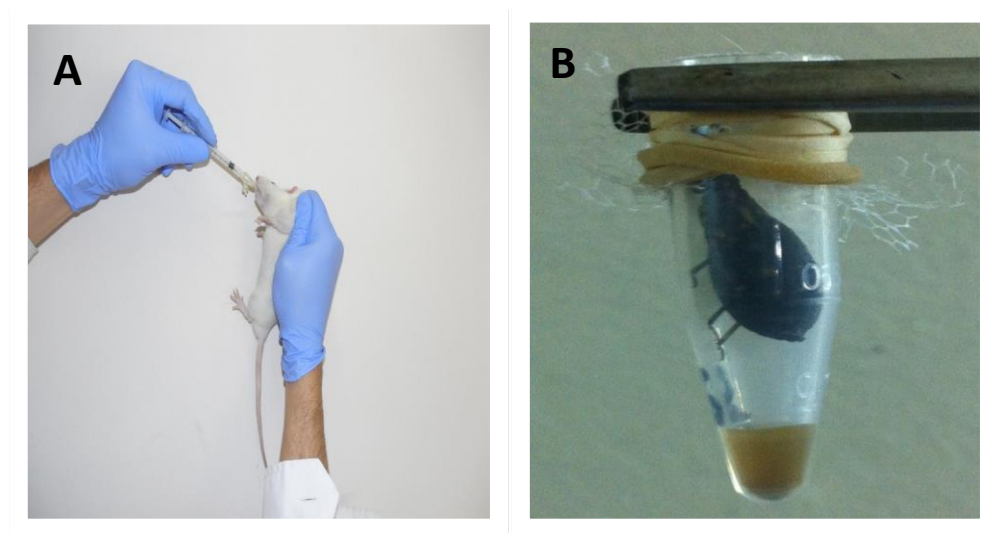
### **3.1.2.5 Determinación del consumo de sangre y volumen de excreciones emitidas por parte de las ninfas de V estadio alimentadas sobre ratas Wistar con diferentes tratamientos (DMSO, IVM, EPR o DRM)**

Se utilizaron micropipetas para medir el volumen de las excreciones emitidas por los insectos durante las primeras 2 h a partir del ofrecimiento del alimento. Para conocer la cantidad de sangre ingerida por los insectos se utilizó una balanza de precisión Denver instrument, se realizó la resta del peso de los tubos Eppendorf con su respectiva vinchuca en el interior, antes y después de la alimentación sobre los roedores.

### **3.1.2.6 Estudio del estado general de las ninfas sobrevivientes a la alimentación sobre ratas Wistar**

Para evaluar el estado general de los insectos sobrevivientes a la alimentación sobre ratas, transcurridos 14 días desde la alimentación se realizó el siguiente procedimiento: diez insectos que fueron alimentados sobre ratas tratadas con alguno de los endectocidas o sobre los controles fueron situados en la base de un recipiente plástico de 9 cm de diámetro, en cada contenedor también se colocó un cartón de tal manera que permitiese a los insectos desplazarse hasta la parte superior y tomar contacto para alimentarse durante 30 min con la sangre de una gallina inmovilizada. Cada recipiente fue pesado antes y después de la alimentación. Se comparó el promedio de consumo de sangre de gallina entre los grupos de ninfas previamente alimentados sobre ratas tratadas con alguno de los endectocidas con las que lo hicieron sobre ratas control (sin tratamiento alguno). Este mismo procedimiento se llevó a cabo una vez por semana durante 2 meses. Transcurrido ese lapso se constató la cantidad de ninfas de V estadio y adultos presentes en cada recipiente.

Figura 34. A) Administración de endectocidas en rata Wistar por vía oral mediante el uso de sonda buco-esofágica. B) Ejemplar de V estadio de *Triatoma infestans* contenido en un tubo Eppendorf



### 3.1.2.7 Método estadístico

Las variables cantidad de sangre ingerida y volumen de las deyecciones de los insectos tras su alimentación sobre los roedores tratados con los diferentes endectocidas o con DMSO, se compararon mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA). Las diferencias iguales o menores a 0,05 se consideraron significativas. Cuando se encontró significación en el ANOVA, se utilizó la prueba de Tukey de comparaciones múltiples de medias. En los casos necesarios, se usó la prueba de Chi-cuadrado con corrección de Yates, para determinar la diferencia en los porcentajes de mortalidad de las ninfas de *T. infestans*.

### 3.1.2.8 Consideraciones éticas

El protocolo para el manejo de los animales en los distintos ensayos se basó en la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Investigación en Animales (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals del Institute for Laboratory Animal Research, 2011) y fue aprobado por el Comité de

Ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina (Resolución T05-01-2014).

### 3.1.3 Resultados

La cantidad de sangre ingerida por los insectos durante la alimentación se mantuvo constante durante el ensayo y no se afectó por los tiempos posteriores a la administración del fármaco con el que los triatominos entraron en contacto, como tampoco sufrió variación alguna relacionada con el tratamiento previo recibido por el roedor ( $p=0,061$ ) (Tabla 32). El promedio total de consumo de sangre fue de  $0,268 \pm 0,115$  g por insecto.

**Tabla 32. Efecto de IVM, DRM y EPR en la cantidad de sangre ingerida por ninfas de V estadio de *Triatoma infestans* después de 45 minutos de contacto con ratas Wistar**

Vía de administración	DMSO	IVM	DRM	EPR
Oral	$0,269 \pm 0,121$	$0,278 \pm 0,132$	$0,262 \pm 0,115$	$0,255 \pm 0,255$
Tópica	$0,276 \pm 0,112$	$0,279 \pm 0,101$	$0,268 \pm 0,115$	$0,259 \pm 0,117$

Promedio (g)  $\pm$  desviación estándar

Otra variable que se mantuvo sin modificaciones durante el ensayo fue el volumen de excreciones que los insectos liberaron durante las primeras 2 h desde que comenzó la alimentación ( $p=0,63$ ) (Tabla 33). El volumen total de excreciones emitidas por los insectos fue de  $51,7 \pm 5,7$   $\mu$ L.

**Tabla 33. Efecto de IVM, DRM y EPR en el volumen de excreciones de ninfas de V estadio de *Triatoma infestans* durante las 2 primeras horas después de la alimentación**

Vía de administración	DMSO	IVM	DRM	EPR
Oral	$50,7 \pm 4,7$	$52,8 \pm 6,2$	$51,1 \pm 4,8$	$52,3 \pm 5,1$
Tópica	$53,1 \pm 6,9$	$51,6 \pm 6,1$	$51,4 \pm 4,4$	$50,8 \pm 7,0$

Promedio ( $\mu$ L)  $\pm$  desviación estándar

Los porcentajes de mortalidad de las ninfas variaron según la vía de administración, el tipo de endectocida administrado y la oportunidad de

alimentación de las ninfas después de la administración de cada molécula a los roedores. Los porcentajes de mortalidad total entre los insectos del control basal (-24 h) y los insectos de control con excipiente (DMSO) fueron idénticos (2,5 %).

En cuanto a la vía de administración, se encontró que la mortalidad de los triatominos fue significativamente más alta (23 %; 69/300 insectos) cuando los endectocidas se administraron de forma tópica a las ratas en las cinco oportunidades de alimentación después del tratamiento, que cuando se administraron por vía oral (9,3 %; 28/300 insectos) ( $p < 0,001$ ).

El endectocida más eficaz por la vía tópica fue DRM (28 %), seguido por IVM (21 %) y EPR (20 %), diferencias que fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ). Con respecto a las oportunidades de alimentación después de la administración de las sustancias por vía tópica, la actividad de los endectocidas estudiados sobre las ninfas comenzó a las 24 h post-administración. En ese tiempo la mayor mortalidad se presentó con IVM, seguida de DRM y finalmente EPR. A las 72 h, todos los endectocidas presentaron su máxima actividad: 80 % para DRM, 70 % para EPR y 65 % para IVM. Ninguna de las vinchucas control murió durante el tiempo de observación (0 %) ( $p < 0,001$ ). Solamente DRM mantuvo su actividad hasta las 168 horas post-administración. A las 240 y a las 336 h de la alimentación, no se presentó mortalidad con ninguno de los compuestos ensayados (Tabla 34).

En cuanto a la administración oral, solo demostraron actividad triatomicida IVM (11 %) y DRM (15 %), con diferencias estadísticamente significativas respecto al control (3 %) ( $p=0,014$ ). Ambos endectocidas comenzaron a ejercer actividad letal sobre las vinchucas a las 24 h de haber sido administrados en las ratas. Tanto DRM como IVM demostraron su mayor eficacia en las ninfas a las 72 h después de la administración, con diferencias estadísticamente significativas con respecto al porcentaje de las ninfas control ( $p=0,011$ ). A partir de las 168 h de alimentación, no provocaron mortalidad (Tabla 35).

Se registró un aumento en la letalidad en las ninfas según el tiempo transcurrido desde la ingestión de los endectocidas. En todos los casos, independientemente de la vía y del endectocida, la actividad letal de las moléculas

en las ninfas comenzó a las 24 h de haber sido incorporadas y se extendió hasta los 7 días. A partir de este tiempo los porcentajes de mortalidad de los insectos se mantuvieron constantes hasta los 14 días post-alimentación (Tablas 34 y 35).

**Tabla 34. Porcentaje de mortalidad a distintos tiempos postratamiento de IVM, DRM y EPR administrados por vía tópica en ratas Wistar**

Tiempo de alimentación (horas)	Mortalidad acumulada (%)									
	Días transcurridos desde la alimentación en ratas tratadas con IVM									
	1	2	3	4	5	6	7	10	14	
24	15	20	20	30	30	30	40	40	40	
72	20	25	25	40	50	50	65	65	65	
168	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
336	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tiempo de alimentación (horas)	Mortalidad acumulada (%)									
	Días transcurridos desde la alimentación en ratas tratadas con DRM									
	1	2	3	4	5	6	7	10	14	
24	10	15	15	20	20	25	35	35	35	
72	15	25	40	40	60	60	80	80	80	
168	10	10	15	15	20	20	25	25	25	
240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
336	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tiempo de alimentación (horas)	Mortalidad acumulada (%)									
	Días transcurridos desde la alimentación en ratas tratadas con EPR									
	1	2	3	4	5	6	7	10	14	
24	10	10	15	15	20	20	25	25	25	
72	15	25	25	35	35	50	70	70	70	
168	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
336	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

**Tabla 35. Porcentaje de mortalidad a distintos tiempos postratamiento de IVM, DRM administrados por vía oral en ratas Wistar**

Tiempo de alimentación (horas)	Mortalidad acumulada (%)									
	Días transcurridos desde la alimentación en ratas tratadas con IVM									
	1	2	3	4	5	6	7	10	14	
24	5	5	10	10	10	10	15	15	15	
72	5	10	10	15	20	20	35	35	35	
168	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
336	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tiempo de alimentación (horas)	Mortalidad acumulada (%)									
	Días transcurrido desde la alimentación en ratas tratadas con DRM									
	1	2	3	4	5	6	7	10	14	
24	5	5	10	10	15	15	20	20	20	
72	5	10	10	15	25	35	55	55	55	
168	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
336	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

El alojamiento de las ninfas en recipientes individuales nos permitió conocer la cantidad de sangre consumida por los triatominos que después murieron, con promedios de  $0,294 \pm 0,063$  g,  $0,341 \pm 0,048$  g y  $0,332 \pm 0,056$  g para DRM, IVM y EPR, respectivamente; arrojando entre ellas, diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,002$ ). El análisis realizado con la prueba de Tukey demostró que las ninfas alimentadas de ratas tratadas con DRM consumieron una cantidad de sangre significativamente menor, comparando con los tratamientos realizados con IVM y EPR. La diferencia mínima significativa entre medias (DMS) fue de 0,035 g, valor menor que la diferencia observada entre DRM e IVM (0,047 g;  $p < 0,05$ ) y la de DRM y EPR (0,038 g;  $p < 0,05$ ). Por otra parte, la diferencia observada entre la IVM y EPR (0,009 g) no fue estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Cuando se compararon los promedios de sangre consumida sobre gallinas, no se registraron diferencias significativas entre los grupos conformados con diez vinchucas sobrevivientes de cada tratamiento. El promedio de consumo



de las vinchucas, que previamente se habían alimentado sobre ratas control, fue de  $0,167 \pm 0,059$ ; en el caso de los grupos de diez ninfas sobrevivientes de los tratamientos con IVM, DRM y EPR, los promedios de consumo sobre gallinas fueron  $0,177 \pm 0,077$ ;  $0,160 \pm 0,088$ ;  $0,191 \pm 0,073$ ; respectivamente.

No se detectó ningún tipo de inhibición del proceso de ecdisis en las vinchucas que recibieron dosis subletales de alguno de los endectocidas estudiados. En la Tabla 36 se presenta el número de adultos y ninfas de V estadio contabilizado al finalizar el ensayo.

**Tabla 36. Estudio del proceso de ecdisis de ninfas de V estadio de *T. infestans* que recibieron dosis subletales de IVM, DRM o EPR**

Tratamiento	n	V	Ad
DMSO	10	0/0	9/1
IVM	10	0/1	9/0
DRM	10	0/1	8/1
EPR	10	0/0	10/0

n: número de ninfas de V estadio al comienzo del ensayo

V: cantidad de ninfas de V estadio al finalizar el ensayo

Ad: cantidad de adultos al finalizar el ensayo

x/y: cantidad de individuos vivos del estadio / cantidad de individuos muertos del estadio

### 3.1.4 Discusión

De las cuatro variables estudiadas en el ensayo de xenointoxicación en ratas, solo la mortalidad fue afectada por el endectocida administrado al roedor y la vía de administración empleada. Las tres moléculas demostraron una actividad letal entre las vinchucas, la que fue aumentando con el tiempo. Este efecto comenzó a las 24 h y se incrementó hasta los 7 días de haber sido alimentadas las ninfas en las ratas. Esta cinética lenta del efecto letal de estas moléculas coincide con lo descrito en el Capítulo anterior, cuando se estudió su actividad por vía oral sobre ninfas de V estadio. En ambos casos la letalidad provocada por los endectocidas aumentó hasta los 7 días postingestión. Un patrón similar fue descrito en ninfas y adultos del triatomino *Rhodnius prolixus* alimentados de ratones tratados con una dosis subcutánea de 0,2 mg/Kg de IVM al 1%. En este

caso se comunicó que la mortalidad entre los insectos aumentó hasta el quinto día postalimentación (Azambuja P., 1985).

Los tres endectocidas demostraron tener mayor eficacia sobre las ninfas cuando se administraron de forma tópica, lo cual podría explicarse por la gran liposolubilidad de las moléculas, característica que les permite atravesar la barrera epitelial fácilmente, posibilitando una mayor biodisponibilidad. Es decir, los insectos disponen de una mayor cantidad de moléculas al alimentarse. Por otra parte, el DMSO es un disolvente ideal, que se comporta como un transportador de moléculas y facilita la permeabilidad de las membranas. Si a estas características se añade la facilidad con que todas aquellas sustancias con propiedades anfipáticas, como las avermectinas, pasan a través de la piel, se explicaría por qué se logró un mayor efecto en *T. infestans* después de la administración tópica. También debe tenerse en cuenta que cuando se utiliza la vía tópica, se evitan las reacciones del primer paso metabólico en el hígado, fenómeno que sí ocurre cuando la administración es oral. La IVM, por ejemplo, tiene distintas reacciones químicas por acción del complejo enzimático citocromo P450, siendo las isoformas 1A1 y A3 las involucradas en el metabolismo del endectocida en ratas (Zeng y col., 1996). Por lo tanto, con esta formulación experimental la vía tópica sería la más apropiada para lograr concentraciones sanguíneas letales para *T. infestans*. En distintas especies de animales fue estudiada la influencia que poseen las vías de administración en los parámetros farmacocinéticos de los endectocidas. Por ejemplo, en cabras tratadas con IVM por vía oral se encontró una concentración plasmática máxima cuatro veces mayor a la alcanzada con la aplicación tópica. También se calculó una semivida de eliminación más corta del endectocida aplicado por vía oral que cuando fue administrado por la vía tópica (Carrasco Díaz y col., 2000).

En esta Tesis se observó que tanto en los estudios en condiciones de laboratorio utilizando el alimentador artificial como en este ensayo, la DRM fue el endectocida que produjo la mayor mortalidad en ninfas de V estadio de *T. infestans*. Pero, debido a las diferencias en las metodologías de ambos ensayos es muy difícil extrapolar estos resultados. La mayor diferencia entre los métodos

radica en que en el estudio realizado en condiciones de laboratorio los insectos consumieron sangre con los endectocidas diluidos, mientras que en la xenointoxicación, bajo nuestras condiciones experimentales, resulta una incógnita conocer lo que consumieron las vinchucas. Esto se debe a que en las ratas las moléculas pueden biotransformarse y por lo tanto, la actividad letal en las ninfas podría ser el resultado de algún metabolito generado a partir de los endectocidas administrados a los roedores.

Un dato para destacar es que los insectos muertos por acción de la DRM fueron los que, en promedio, ingirieron menor cantidad de sangre, hallándose una diferencia estadísticamente significativa con respecto al consumo de sangre de las ninfas muertas por el efecto de IVM y EPR. Este hecho podría ser provocado por dos fenómenos distintos: una mayor potencia o una mayor biodisponibilidad de DRM en comparación con las otras moléculas. Si fuese la potencia el parámetro diferencial entre DRM y los otros dos endectocidas, significaría que se necesitó una menor concentración de moléculas de éste para matar al insecto. Mientras que una mayor biodisponibilidad de DRM en comparación con IVM y EPR determinaría una mayor cantidad de moléculas de DRM disponibles en el plasma de las ratas para ser ingeridas por los triatominos durante la alimentación.

Cuando se utilizó la vía oral para administrar los endectocidas a las ratas, nuevamente se observó una mayor actividad de las moléculas a las 72 h de la administración, en tanto que EPR fue el único que no demostró actividad al ser administrado de manera oral, lo cual coincide con lo comunicado por Zeng y col., (1996b, 1999), quienes mediante estudios sobre el metabolismo de la EPR en ratas Sprague-Dawley determinaron que la mayor proporción de las moléculas del endectocida administradas por vía oral se eliminaban intactas en las heces, y solo un pequeño porcentaje de ellas presentaba una N-desacetilación como reacción metabólica, de manera que su biodisponibilidad oral resultaba muy baja.

Si bien los porcentajes de mortalidad total entre las ninfas no fueron elevados durante el ensayo, debe destacarse la actividad tóxica demostrada por los tres endectocidas en las ninfas alimentadas a las 72 h a partir de la administración tópica de las moléculas en los roedores, lo cual probablemente

coincidió con la concentración plasmática máxima alcanzada postadministración. La pérdida de actividad de las moléculas estudiadas después de las 168 h de la administración estaría relacionada con la caída de las concentraciones plasmáticas. Esta breve persistencia respondería a la formulación experimental ensayada (solución en DMSO).

En cuanto a las condiciones fisiológicas de los insectos sobrevivientes, teniendo en cuenta la ausencia de diferencias significativas entre los volúmenes de sangre consumidos sobre gallinas, a los 14 días de haber estado en contacto con concentraciones subletales de los tres endectocidas, las vinchucas no presentaron secuelas que afectaran a su normal traslado ni que interfirieran con el proceso normal de alimentación. Este hecho estaría relacionado con los procesos de detoxificación que poseen estos insectos. También en esta Tesis se demostró que transcurridos dos meses desde que ingirieron las concentraciones subletales de los endectocidas, el 100% de los insectos sobrevivientes tuvieron la capacidad de mudar hacia el estadio adulto. Este último dato se contrapone a lo observado en otros insectos hematófagos. Por ejemplo, en el 100% de las ninfas de III y IV estadio de *Cimex lectularius* (chinchas de cama) se registró un efecto inhibitorio de la muda con IVM administrada por vía intraperitoneal en ratones (Sheele y col., 2013). Este mismo resultado se observó en ninfas de III estadio de *Rhodnius prolixus* alimentadas de ratones tratados con 0,2 mg/kg de IVM administrada por vía subcutánea (Azambuja P., 1985). Una explicación para esta disparidad entre los resultados obtenidos por los mencionados autores y el nuestro, podría ser que se están comparando a especies distintas de insectos y vías diferentes de administración para las moléculas en los ratones. Un ensayo que se podría diagramar a futuro sería el de administrar los endectocidas a las ratas por alguna de las vías evaluadas en *Cimex lectularius* y *Rhodnius prolixus* y determinar si hay algún grado de inhibición de la muda por estos tres endectocidas.

En nuestras condiciones de trabajo, no se encontraron diferencias significativas entre los volúmenes de las excreciones emitidas por los insectos alimentados de ratas tratadas y ratas control (DMSO). Dos de los parámetros fisiológicos que hacen de *T. infestans* un vector de *T. cruzi* son el breve tiempo en

que emite la primera excreción mientras se está alimentando y el volumen total de esta excreción. Este proceso es crucial, ya que son las especies de triatomíneos con capacidad de excretar mientras se alimentan, las que poseen mayores posibilidades de transmitir el parásito *T. cruzi* al hospedador. El proceso de diuresis postprandial está regulado por mecanismos que involucran a la serotonina y a péptidos diuréticos y anti-diuréticos (Santini y Ronderos, 2007). Por lo tanto, una molécula con la capacidad de alterar o modular de manera negativa el proceso de diuresis sería un candidato para el control de la transmisión de *T. cruzi* por la vía vectorial. En esta Tesis demostramos que ninguno de los endectocidas evaluados interfirieron con el normal proceso de diuresis postprandial en ninfas de V estadio de *T. infestans*.

### **3.1.5 Conclusión**

De las cuatro variables estudiadas, la mortalidad fue la única que, bajo las condiciones experimentales, demostró una diferencia estadísticamente significativa entre triatomíneos alimentados a partir de ratas tratadas con los endectocidas bajo estudio y los que se alimentaron de ratas tratadas con DMSO (control). Los altos porcentajes de mortalidad obtenidos en las ninfas a las 72 h de la administración son un hallazgo alentador, sobre todo porque estas moléculas antiparasitarias podrían emplearse como complemento de los piretroides en el domicilio y en el peridomicilio. Debido a la breve persistencia obtenida con esta formulación experimental, uno de los objetivos de futuros trabajos sería ensayar distintas formulaciones de acción prolongada y constatar si, al prolongar su permanencia, se logra aumentar la eficacia frente a las ninfas.

## Sección II

### **Ensayo de campo utilizando un modelo de perros para medir la actividad sobre *T. infestans* de productos comerciales conteniendo imidacloprid o fipronil en su formulación**

#### **3.2.1 Introducción**

El libre tránsito que posee el perro entre el domicilio y el peridomicilio, la preferencia demostrada por esta especie animal como una de las principales fuentes de alimentación de *T. infestans* y la alta parasitemia comunicada durante la vida de los perros infectados con *T. cruzi*, son los principales aspectos que lo posicionan como un actor fundamental en el ciclo epidemiológico de la enfermedad de Chagas (Gürtler y col., 1986). En distintos estudios sobre las fuentes de alimentación de *T. infestans* en el domicilio, se comunicó una mayor tasa de alimentación sobre perros y gallinas que en seres humanos y gatos (Gürtler y col., 2009b). En insectos hematófagos la preferencia de una fuente de alimentación sobre el resto ha sido asociada a determinadas características del hospedador (edad, tamaño, especie, etc.) (Washino y Tempelis, 1983). En *Triatoma infestans*, sin embargo, se comunicó la proximidad del hospedador como una de las principales variables para la elección de la fuente de alimentación por este insecto (Minter D., 1976). El hecho que el perro habite tanto en el domicilio como en el peridomicilio lo pone al alcance de los insectos de ambos ámbitos y, por lo tanto, justifica el mayor porcentaje de vinchucas alimentadas de esta especie que sobre cualquier otra. Se ha comunicado una relación directa entre el número de perros que habitan en un hogar y el tamaño de la población de *T. infestans* presente en el domicilio (Gürtler y col., 1986). Otro aspecto muy importante ligado al proceso de alimentación de *T. infestans* de los perros y a la dinámica de transmisión del parásito, se relaciona con un trabajo realizado por

Gürtler y col., (2009b) en el que se constató una mayor ingesta de sangre de las vinchucas alimentadas sobre perros que aquellas que lo hicieron sobre gallinas o gatos. Este dato tiene importancia cuando se tiene en cuenta que la probabilidad que una vinchuca defeque sobre el hospedador está en relación directa con el volumen de sangre ingerido durante la alimentación y que, en caso de ser una vinchuca portadora de *T. cruzi* aumentará la probabilidad de transmitir el parásito al huésped mediante las excreciones emitidas (Crocco y Catalá, 1996).

En los estudios llevados a cabo en la región del Gran Chaco se constató una elevada prevalencia de perros infectados con *T. cruzi*. La parasitemia en los perros infectados disminuyó con la edad de una manera más gradual que lo observado en los seres humanos. Por lo tanto, se registró una mayor probabilidad que una vinchuca sea infectada con el parásito cuando se alimenta sobre un perro que cuando lo hace sobre un niño o un adulto portador de *T. cruzi* (Wisnivesky-Colli y col., 1985; Gürtler y col., 1998). Así, a la alta prevalencia se asocia un elevado número de parásitos en circulación durante toda la vida del animal. Es por esto que se considera al perro como el principal reservorio de *T. cruzi* a nivel domiciliario y peridomiciliario. Utilizando un modelo matemático basado en los resultados recolectados en varios trabajos realizados en comunidades rurales se concluyó que si se eliminaran los perros infectados de los hogares habitados por personas infectadas con *T. cruzi* sería suficiente para detener la transmisión del parásito (Cohen y Gürtler, 2001). Es decir que, si llegara un grupo familiar sano a una zona endémica y no mantuviera perros en su domicilio, el riesgo de infección sería prácticamente nulo (Cohen y Gürtler, 2001).

Debido al fácil acceso y bajo costo de productos comerciales con distintas formulaciones de insecticidas y acaricidas, en los últimos años se han realizado varias pruebas de xenointoxicación en perros estudiando su actividad sobre *T. infestans* (Tabla 37).

**Tabla 37. Ejemplos de productos comerciales administrados en perros para estudiar su actividad sobre *T. infestans***

Nombre comercial (Laboratorio)	Principio/s activo/s	Mecanismo de acción	Vía de administración evaluada	Referencia
<b>Comfortis® (Elanco)</b>	Espinosad	Agonista nicotínico	Oral	(Loza y col., 2017)
<b>Bravecto® (Merck)</b>	Fluralaner	Antagonista de receptores de GABA y glutamato asociados a canales de Cl	Oral	(Loza y col., 2017)
<b>NexGard® (Merial)</b>	Afoxolaner	Ídem al anterior	Oral	(Loza y col., 2017)
<b>Solución líquida</b>	Fipronil	Ídem al anterior	Cutánea (pour-on)	(Gentile y col., 2004)
<b>Frontline®</b>	Fipronil	Ídem al anterior	Cutánea (spot-on y spray)	(Amelotti y col., 2012b)
<b>Frontline Plus®</b>	Fipronil y Metopreno	Ídem al anterior y Análogo de la hormona juvenil	Cutánea (spot-on)	(Gürtler y col., 2009a)

Debido a su amplio espectro de acción sobre pulgas (*Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis*), piojos (*Trichodectes canis*), ácaros (*Otodectes cynotis*) y garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) tanto el imidacloprid como el fipronil han sido formulados en distintas presentaciones comerciales. En Sud América son varios los productos que contienen fipronil o imidacloprid como único



principio activo o como parte de su formulación (Advantage®, P.I. Gatos®, Power®, Frontline®, etc.).

El objetivo de esta sección fue estudiar la actividad sobre ninfas de V estadio de *T. infestans* de tres productos antiparasitarios administrados en perros. Los formulados comerciales evaluados fueron seleccionados por poseer como principio activo al fipronil o al imidacloprid. En el caso del imidacloprid se evaluó un formulado con el neonicotinoide como único principio activo y también se constató la actividad de este insecticida acompañado de un piretroide (permetrina) y el butóxido de piperonilo (PBO) que es un sinergista de amplio uso en medicina veterinaria. La actividad del fipronil fue evaluada utilizando un producto comercial con este insecticida como único principio activo.

### **3.2.2 Materiales y métodos**

#### **3.2.2.1 Principios activos**

- Advantage®, Bayer (AD) (imidacloprid 10% p/v)
- Power Ultra®, Brouwer (PU) (imidacloprid 5,15%, permetrina 40% y butóxido de piperonilo 3%)
- Frontline®, Merial (FR) (fipronil 10% p/v).

#### **3.2.2.2 Animales experimentales**

Los ejemplares de *T. infestans* utilizados durante el ensayo fueron ninfas de V estadio provenientes de la colonia de insectos susceptibles a piretroides (Santiago del Estero), utilizada en los ensayos anteriores de la Tesis. Al alimentarse sobre los perros las vinchucas contaban con 12-15 días de ayuno. Después de ser alimentados sobre los perros los insectos se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas:  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura, 60-70% de HR y un ciclo de luz 12:12 luz: oscuridad.

Se utilizaron perros adultos mestizos y con buenas condiciones de salud. No se incluyeron en la prueba a los ejemplares que hubiesen recibido algún tratamiento antiparasitario en los últimos 2 meses ni hembras preñadas.

Tanto a las gallinas como las ratas utilizadas para alimentar a las ninfas se las mantuvo en condiciones ambientales controladas y constantes ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , HR, del 70 - 80 % y fotoperiodo de 12:12 h). El agua y el alimento fueron suministrados *ad libitum*.

### **3.2.2.3 Ensayo de xenointoxicación utilizando perros en condiciones de campo**

En esta fase se evaluó la eficacia triatomicida sobre ninfas de V estadio de *T. infestans* de tres productos comerciales (AD, PU y FR) administrados a perros. Los ensayos se realizaron en la localidad de Rauch, provincia de Buenos Aires, Argentina. Debido al número limitado de perros disponibles, se decidió evaluar la eficacia de los productos comerciales en tres etapas distintas con intervalo de seis meses. Este lapso de tiempo es suficiente para que los perros eliminen de su organismo la totalidad del insecticida administrado en cada ensayo. En cada una de las etapas se evaluó la actividad de uno de los tres productos comerciales en estudio y la metodología desarrollada fue similar: se utilizaron 8 perros adultos mestizos ( $\geq 10$  kg) de ambos sexos, los que se distribuyeron al azar en dos grupos de cuatro animales cada uno, a un grupo le fue administrada la dosis estipulada por el fabricante de AD, PU o FR, mientras que el segundo grupo no recibió tratamiento y fue utilizado como control. La eficacia triatomicida de estos productos comerciales fue evaluada en distintos tiempos postadministración en los perros (24, 72, 168, 240 y 336 h). En cada tiempo, sobre cada perro, se alimentaron 15 vinchucas divididas en tres grupos de 5 individuos (Tabla 38). Los insectos permanecieron durante 20 min en contacto directo con la piel de la zona abdominal del perro. Para conocer la cantidad de alimento ingerido, cada ninfa fue individualizada con un color distinto de pintura acrílica (Figura 35 A y B). Los insectos fueron pesados antes e inmediatamente después de alimentarse con una

balanza de precisión (Sartorius 1207 MP2). Después de la alimentación, cada grupo de insectos fue alojado en contenedores plásticos por un período de dos semanas, durante ese tiempo el estado de las ninfas fue constatado cada 24 h. Durante el transcurso del ensayo los perros fueron manipulados por sus propios cuidadores y los animales continuaron con sus actividades normales, no fueron encerrados en caniles ni maniatados.

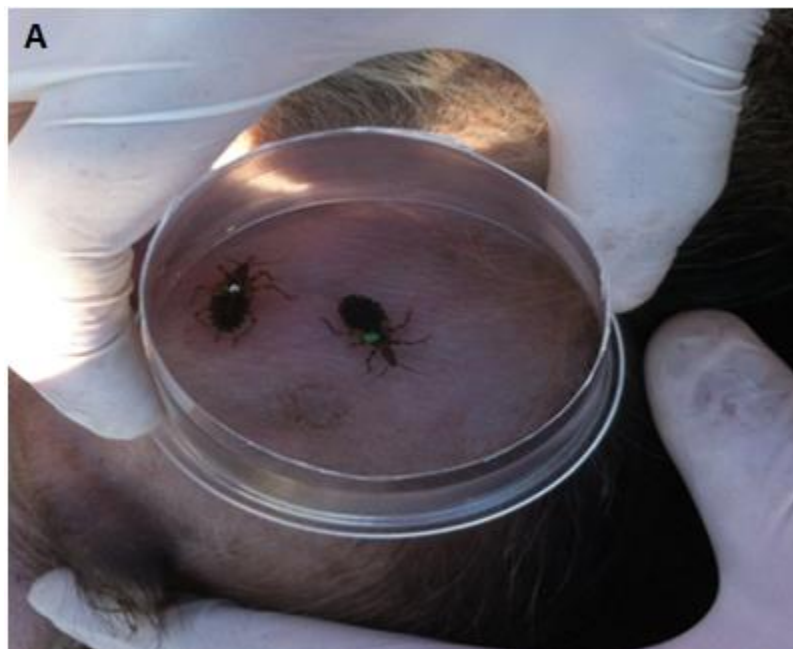
**Tabla 38. Distribución del material biológico utilizado: ninfas de V estadio de *Triatoma infestans* y perros según los diferentes tratamientos evaluados**

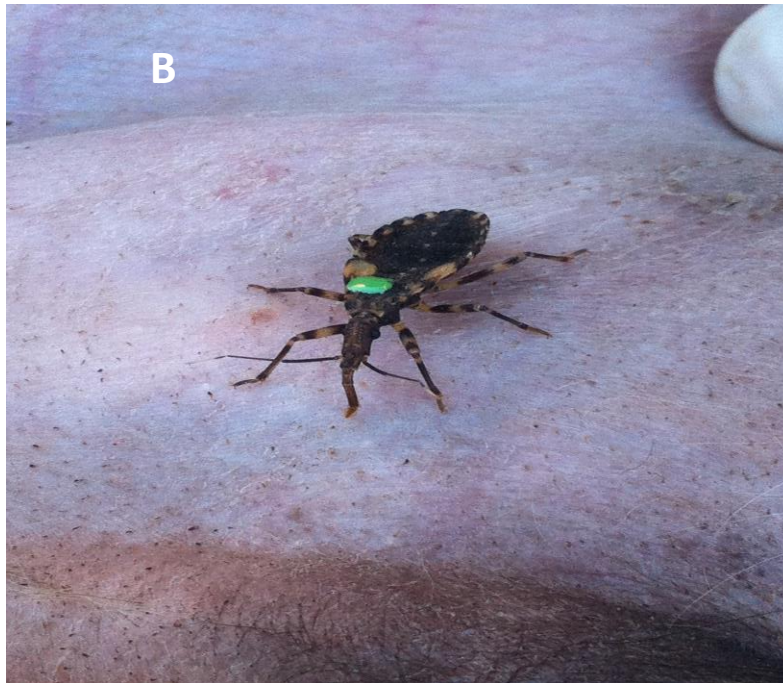
NT	TA	Número de perros		Número de ninfas		
		Por tratamiento	Total	Por perro	Por tratamiento	Total
4	7	4	16	15	60	1200

NT: número de tratamientos

TA: tiempos de alimentación

**Figura 35 A y B. Ejemplares de ninfas de V estadio alimentándose sobre perros**





#### **3.2.2.4 Estudio de la actividad de dosis subletales de los tres productos comerciales sobre la alimentación y capacidad de producir ecdisis en ninfas de V estadio de *T. infestans***

Para evaluar el estado general de las ninfas que ingirieron dosis subletales de los distintos productos se siguió el siguiente procedimiento: transcurridos 14 días desde el contacto con los perros, 20 ninfas sobreviviente de cada tiempo de alimentación de los 4 grupos de perros (AD, PU, FR o control) fueron colocadas en forma individual en un recipiente de plástico de 5 cm de diámetro, en cada contenedor también fue colocado un cartón de tal manera que permitiese al insecto desplazarse hasta la parte superior y tomar contacto para alimentarse durante 30 min de una rata Wistar anestesiada (sin tratamiento insecticida alguno) (Figura 36). Para conocer la cantidad de alimento ingerido por cada ninfa, cada recipiente fue pesado antes y después de la alimentación. Se comparó estadísticamente el promedio de consumo de sangre entre los distintos grupos de ninfas.

Después de ser alimentados sobre ratas Wistar, se seleccionaron al azar 20 individuos de cada uno de los grupos de insectos conformados (AD, PU, FR o control). A estas 80 ninfas se les permitió alimentarse sobre gallinas (sin tratamiento insecticida alguno) una vez por semana, durante un lapso de 2 meses. Transcurrido ese tiempo se constató la cantidad de adultos y ninfas de V estadio presentes en los distintos recipientes.

**Figura 36. Rata Wistar colocada sobre recipientes de plástico. En cada recipiente se colocó una ninfa de V estadio de *T. infestans***



### 3.2.2.5 Método estadístico

Las variables categóricas se resumieron mediante porcentajes, mientras que las variables continuas normalmente distribuidas se presentaron como medias  $\pm$  desviaciones estándares. En caso de no presentar distribución normal se utilizó mediana y recorrido intercuartil y

fueron analizadas con la prueba de análisis de Varianza o Kruskal-Wallis según corresponda. Para la mortalidad se utilizó el procedimiento de modelos lineales generalizados (MLG). Para el procesamiento de datos se utilizó el RStudio Version 0.99.467 – © 2009-2015 RStudio, Inc.

### **3.2.2.6 Consideraciones éticas**

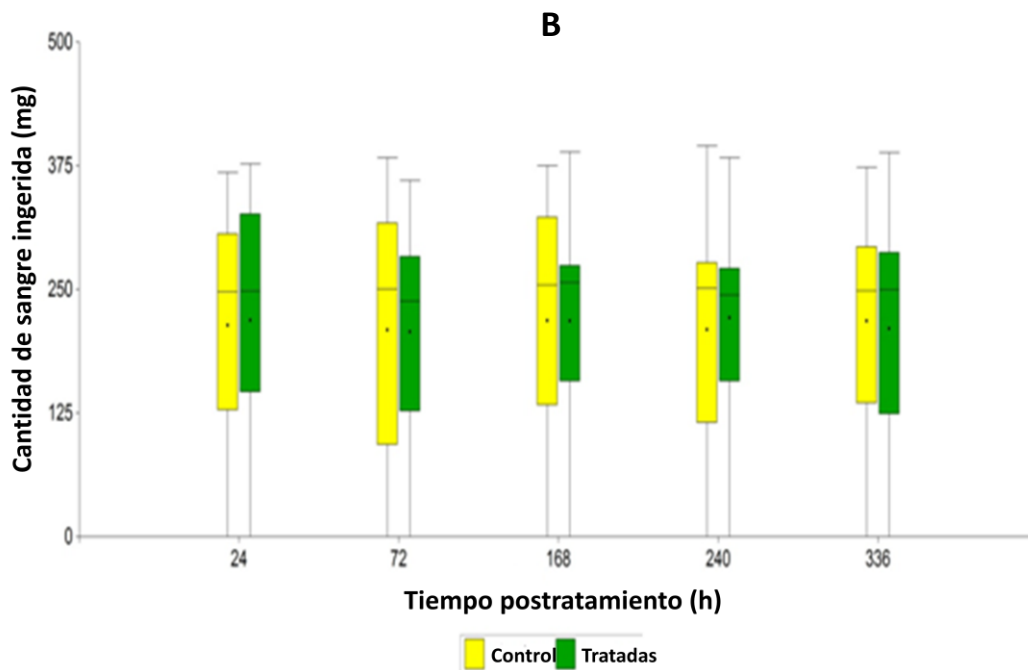
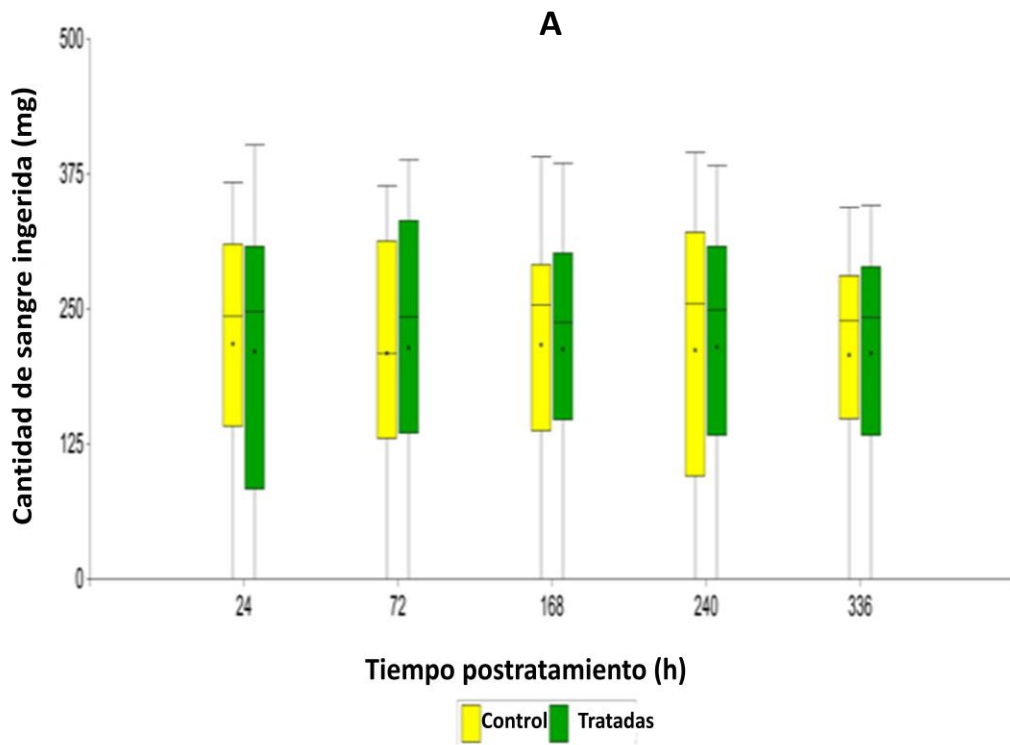
El protocolo para el manejo de los animales en los distintos ensayos se basó en la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Investigación en Animales (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals del Institute for Laboratory Animal Research, 2011) y fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina (Resolución T05-01-2014).

### **3.2.3 Resultados**

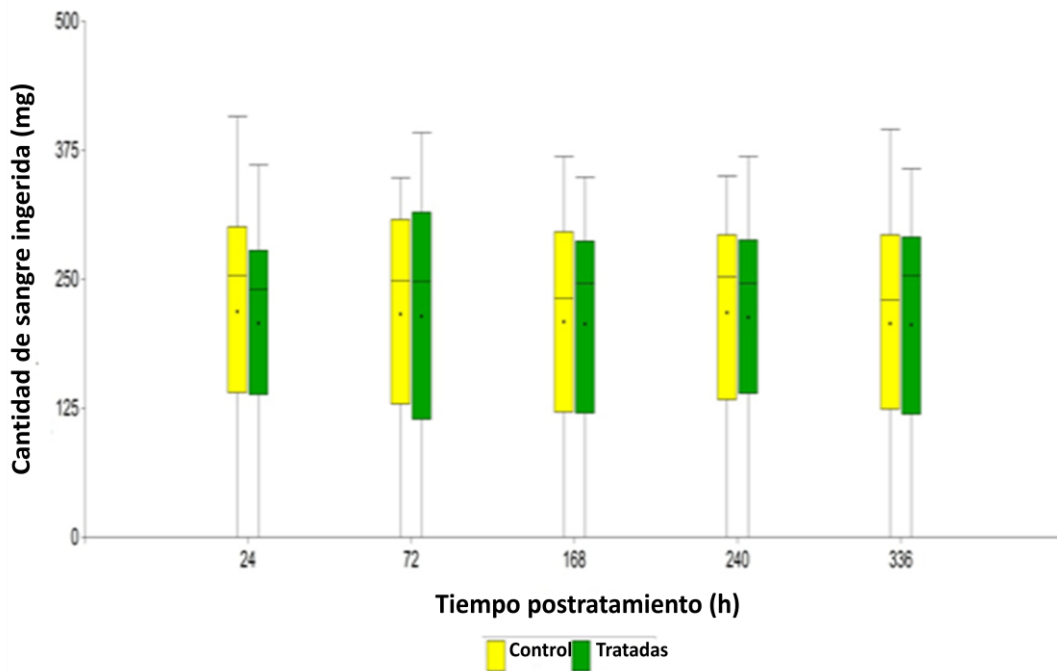
#### **3.2.3.1 Consumo de sangre a distintos tiempos postratamiento de los perros con los productos comerciales**

En la Figura 37, A, B y C se muestran las cantidades de sangre consumida por las ninfas después de haber estado en contacto con los perros durante 20 min. En ninguno de los tiempos de alimentación se encontraron diferencias significativas entre la mediana de ingesta de sangre de las ninfas alimentadas sobre perros tratados con alguno de los productos comerciales de las que lo hicieron sobre perros sin tratamiento (control) ( $p > 0,05$ ). El promedio del consumo de sangre entre los perros tratados con AD fue de  $212,1 \pm 2,1$  mg (Figura 37 A), mientras que para PU y FR el promedio fue de  $214,8 \pm 5,3$  y  $208,8 \pm 3,5$  mg, respectivamente (Figura 37 B y C). En cuanto al promedio de consumo de sangre de los insectos alimentados sobre los perros control fue de  $209 \pm 5,6$  mg.

Figura 37. A, B y C comparación a diferentes tiempos postratamiento del consumo de sangre de ninfas de V estadio de *T. infestans* alimentadas sobre perros tratados con AD, PU o FR versus el consumo registrado en los perros control



### C



#### 3.2.3.2 Mortalidad en ninfas de V estadio de *T. infestans* alimentadas sobre perros tratados

En la Tabla 39 y Figura 38, se pueden observar los porcentajes de mortalidad generado por AD, PU y FR en ninfas de V estadio de *T. infestans* a distintos tiempos postadministración en los perros. También fue registrada la evolución en el tiempo de la toxicidad causada por los insecticidas desde el ingreso en las vinchucas. La actividad letal ejercida por los tres productos comerciales fue aumentando hasta los 3 o 4 días posteriores de haber ingresado en los insectos. En cuanto a la actividad letal sobre las ninfas provocada por cada una de los productos comerciales se constató en el caso de AD un porcentaje de mortandad total en el grupo tratado de 20,7% (62/300) considerando el tiempo total del experimento, elevándose a 34% (62/180) cuando se consideró el tiempo efectivo del producto comercial. En el grupo control fue de 1% (3/300) y 1,7% (3/180) respectivamente. La oportunidad relativa (OR) de morir de las vinchucas fue 49 veces mayor en el grupo tratado con AD con respecto al grupo control OR = 49,4; (IC 95%:14,89-162,89;  $p < 0,001$ ). Las posibilidades de muerte para cada tiempo de alimentación fueron de: 24 h (OR = 24,60; IC95%: 3,15-193,06;  $p <$



0,01), 72 h OR = 119,00 (IC 95%:15,47-915,07; p < 0,01) y 168 h OR = 14,80 (IC 95%: 1,84-119,34; p < 0,01).

En el caso de PU el porcentaje de mortandad total en el grupo tratado fue de 36,33% (109/300) considerando el tiempo total del experimento, mientras que el porcentaje en el tiempo efectivo fue 45,4% (109/240); el porcentaje de mortandad en el grupo control fue de 1% (3/300) y 1,7% (3/180) respectivamente. El OR para el total del período fue de 36,33 (IC 95%: 11.70 – 112,82; p < 0,01). Los riesgos para cada tiempo fueron a las 24 h OR = 34,12 (IC 95%: 4,26-273,14; p < 0,01), a las 72 h OR = 213,36 (IC 95%: 205,36-221,36; p < 0,001), 168 h OR = 39,25 (IC 95%: 4,62-295,89; p < 0,01) mientras que el OR para las 336 h fue de 21,54 (IC 95%: 2,69-172,43; p < 0,001).

Para FR se observó que el porcentaje de mortalidad total fue de 13,0% (39/300) considerando el tiempo total del experimento, siendo en el grupo control del 1,33% (4/300). Durante el tiempo en el que el producto tuvo eficacia el porcentaje de mortalidad para el grupo tratado fue del 26,66% (32/120), mientras que fue de 1,66% (2/120) para el grupo control. Las posibilidades de morir de las vinchucas fueron 10 veces mayores en el grupo tratado con respecto al control OR = 9,75; IC 95%: 3,52–26,94; p < 0,001) en el tiempo total de tratamiento. Aumentando a 28 veces durante el tiempo efectivo OR = 28; IC 95%: 10,08 – 80,05; p < 0,001). Los OR para cada tiempo de tratamiento fueron de 23,36 (IC 95%: 2,91 – 186,79; p < 0,001) para las 24 h y de 29,37 (IC 95%: 3,67 –235,10; p < 0,001) a las 72 h.

**Tabla 39. Porcentajes de mortalidad acumuladas en ninfas de V estadio provocados por los distintos tratamientos en los perros**

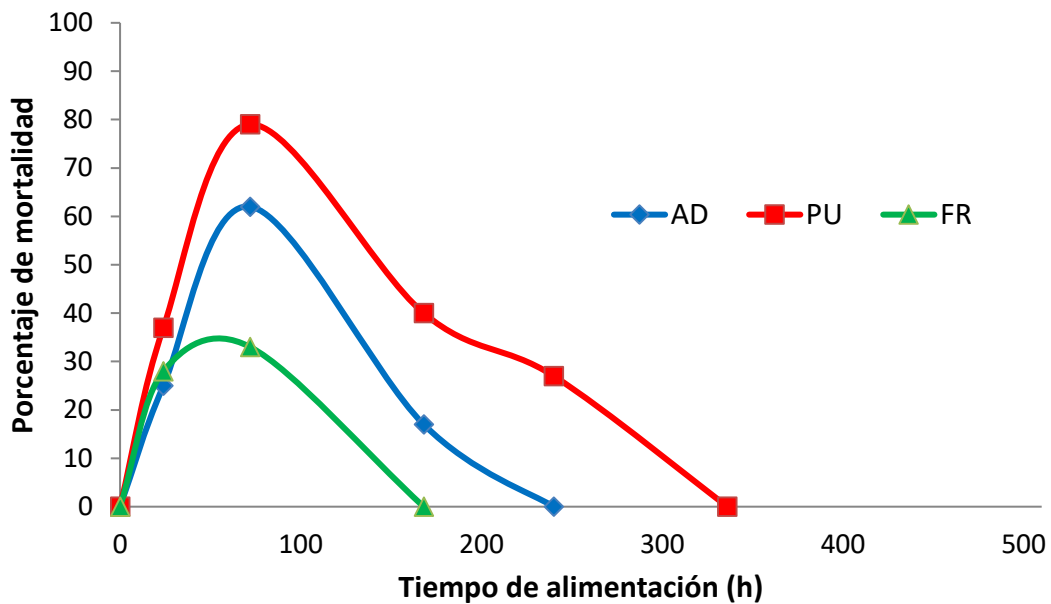
Tiempo de alimentación (horas)	Mortalidad acumulada (%)								
	Días transcurrido desde la alimentación sobre perros tratados con AD								
	1	2	3	4	5	6	7	10	14
24	10	10	15	25	25	25	25	25	25
72	30	50	62	62	62	62	62	62	62
168	10	10	17	17	17	17	17	17	17
240	0	0	0	0	0	0	0	0	0
336	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tiempo de alimentación (horas)	Mortalidad acumulada (%)									
	Días transcurrido desde la alimentación sobre perros tratados con PU									
	1	2	3	4	5	6	7	10	14	
24	15	25	37	37	37	37	37	37	37	37
72	25	25	45	79	79	79	79	79	79	79
168	20	20	25	30	40	40	40	40	40	40
240	10	15	20	27	27	27	27	27	27	27
336	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tiempo de alimentación (horas)	Mortalidad acumulada (%)									
	Días transcurrido desde la alimentación sobre perros tratados con FR									
	1	2	3	4	5	6	7	10	14	
24	10	15	25	28	28	28	28	28	28	28
72	12	15	33	33	33	33	33	33	33	33
168	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
336	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 38. Comparación del porcentaje de mortalidad en función del tiempo de alimentación, en perros tratados con AD , PU o FR



### **3.2.3.3 Consumo de sangre sobre perros efectuado por ninfas de V estadio de *T. infestans* muertas postalimentación**

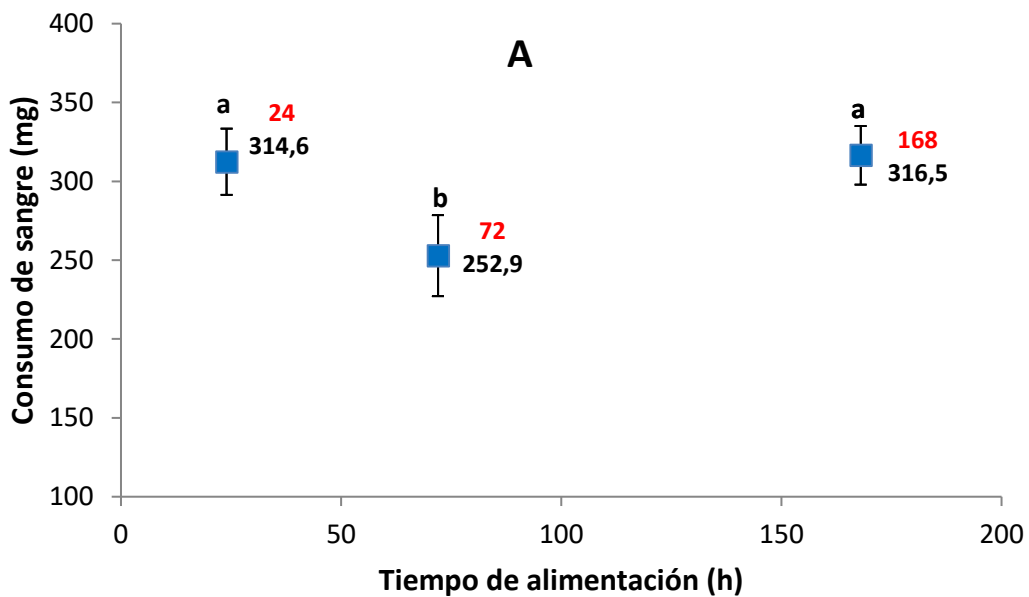
La posibilidad de tener a las vinchucas individualizadas y conocer el volumen de sangre ingerido por cada una de ellas, permitió determinar dos patrones que se repitieron independientemente del tratamiento recibido por el perro: I) presencia de insectos que no incorporaron alimento durante los 20 minutos que se les permitió permanecer sobre los perros y II) consumo de sangre en todas las vinchucas muertas después de alimentarse en perros tratados con AD, PU o FR. En la Figura 39 (A, B y C) se muestra el promedio de consumo de sangre de las ninfas muertas en los distintos tiempos postadministración de los insecticidas en los perros. Para el caso de la pipeta AD se constató un menor consumo de sangre de los insectos que murieron cuando se les permitió alimentarse a las 72 h de haber sido colocado el producto antiparasitario en los perros con respecto a las vinchucas muertas que lo hicieron a las 24 y 168 h ( $p=0,0039$ ) (Figura 39 A). Al observar el consumo individual de las ninfas, se observó que a las 72 h postratamiento, fue en el único de los tres tiempos evaluados en los cuales AD demostró poseer eficacia triatómica, en el que murieron insectos con un consumo de sangre menor a 200 mg (35%). También se observó que entre las ninfas muertas a las 24 y 168 h postalimentación el 66 y 70%, respectivamente, consumió más de 300 mg de sangre, mientras que entre las vinchucas alimentadas a las 72 h postratamiento, esa cantidad de sangre fue consumida por tan solo el 37% de los insectos muertos (Figura 40 A y B).

Con el producto PU se registró algo similar, ya que el menor porcentaje de consumo de sangre entre las vinchucas que después de alimentarse murieron se observó a las 72 h postadministración del producto en los perros ( $p=0,0027$ ) (Figura 39 B). La comparación entre los consumos individuales de sangre por las vinchucas muertas por PU durante los distintos tiempos de alimentación, resultó en que el 30% de las ninfas alimentadas a las 72 h postratamiento consumieron menos de 200 mg de sangre, mientras que el porcentaje de insectos muertos con un consumo menor a 200 mg de alimento fue del 0, 13 y 6% a las 24, 168 y 240 h,

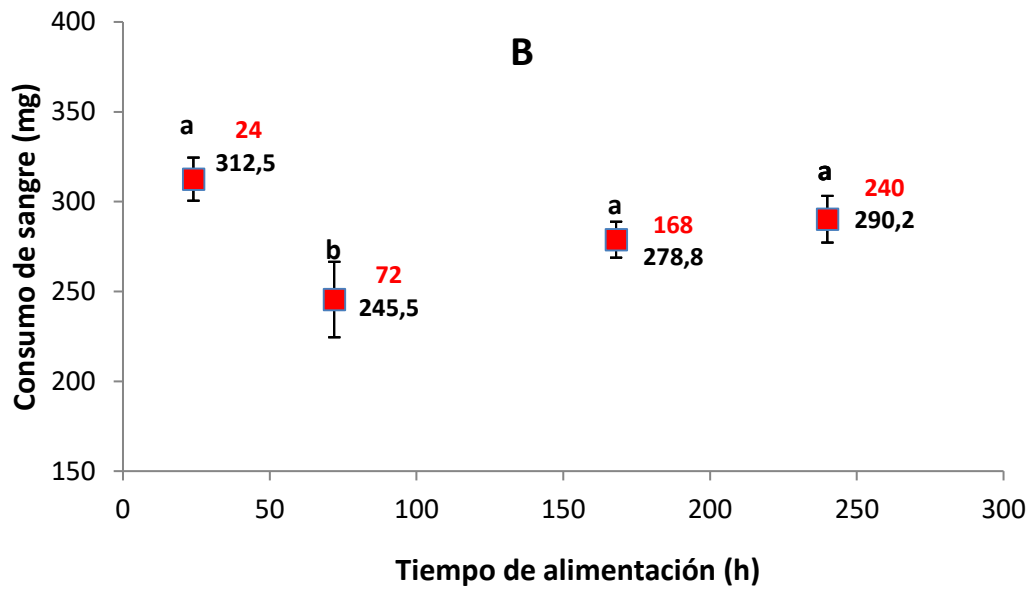
respectivamente. PU fue el único de los tres productos evaluados que logró matar vinchucas con un consumo de sangre menor a 100 mg (n=3) (Figura 40 A y B).

En el caso de FR se registró un consumo similar de sangre entre las vinchucas que murieron después de alimentarse durante alguno de los dos tiempos postratamiento en los cuales el insecticida fue eficaz ( $p=0,9517$ ) (Figura 39 C y 40 A y B).

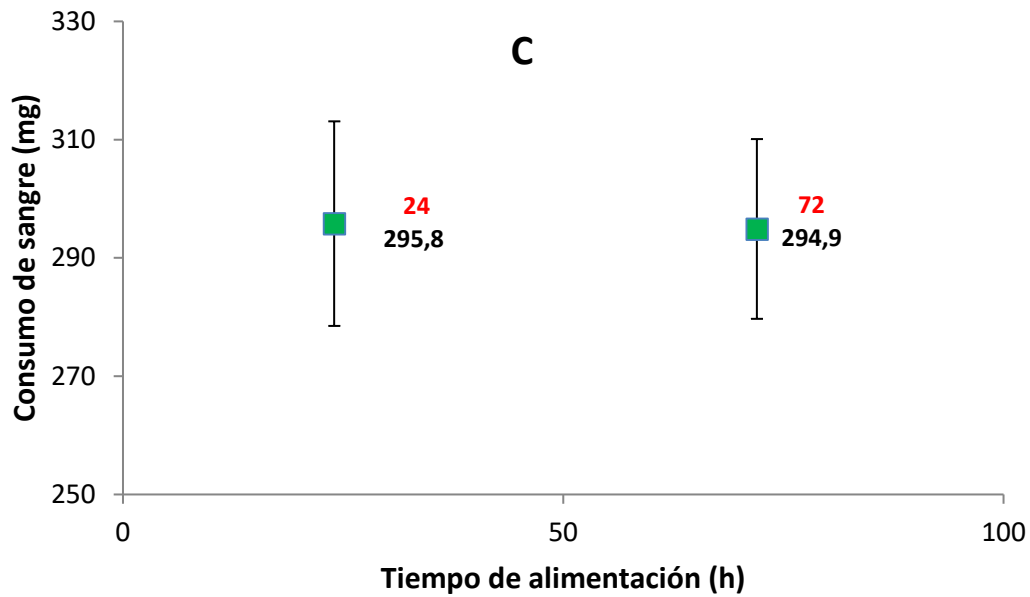
**Figura 39. A, B y C consumo de sangre de ninfas de V estadio de *T. infestans* muertas después de alimentarse a distintos tiempos sobre perros tratados con AD (A), PU (B) o FR (C)**



La numeración en rojo especifica el tiempo en que se llevó a cabo la alimentación de las ninfas, mientras que el valor en color negro equivale al promedio de sangre ingerida. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los valores ( $p < 0,05$ )

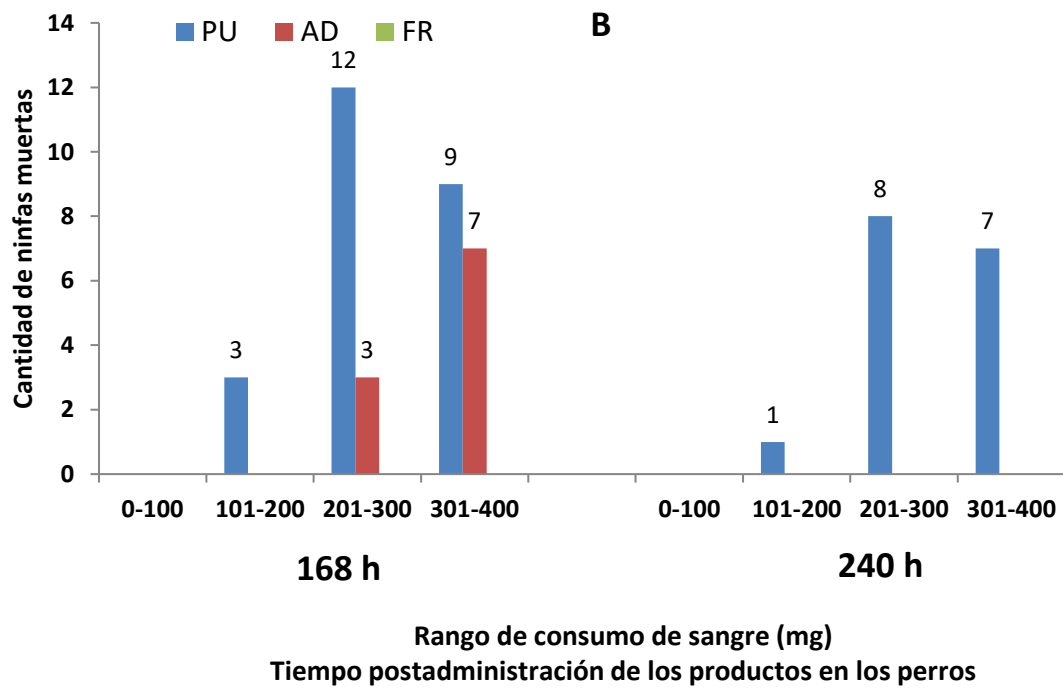
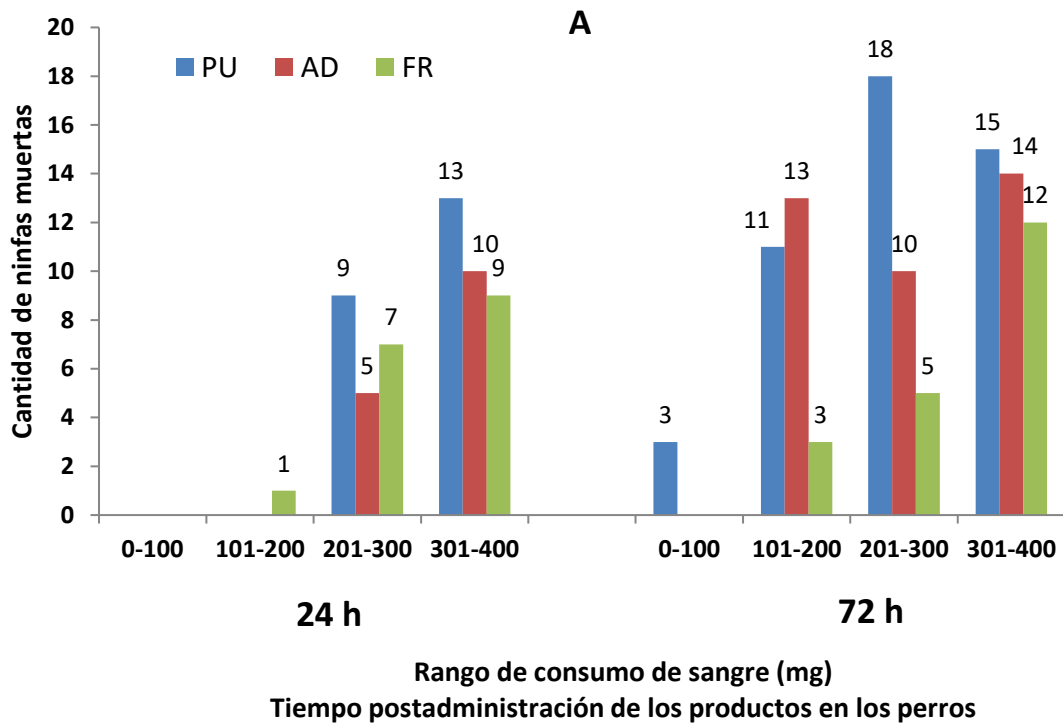


La numeración en rojo especifica el tiempo en que se llevó a cabo la alimentación de las ninfas, mientras que el valor en color negro equivale al promedio de sangre ingerida. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los valores ( $p < 0,05$ )



La numeración en rojo especifica el tiempo en que se llevó a cabo la alimentación de las ninfas, mientras que el valor en color negro equivale al promedio de sangre ingerida. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los valores ( $p < 0,05$ )

Figura 40. A y B Consumo individual de sangre de ninfas de V estadio de *T. infestans* muertas después de alimentarse a distintos tiempos sobre perros tratados con PU, AD o FR

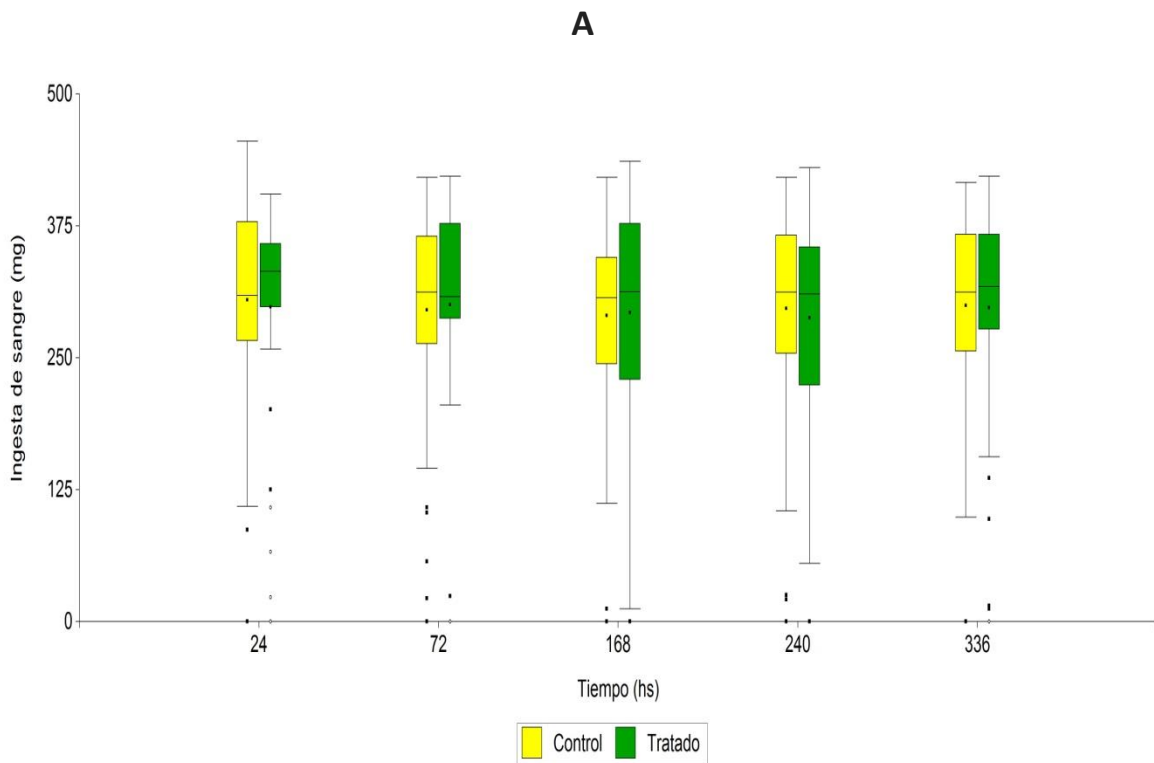


### 3.2.3.4 Influencia de dosis subletales de PU, AD o FR en el consumo de sangre sobre ratas Wistar y el proceso de ecdisis en ninfas de V estadio de *T. infestans*

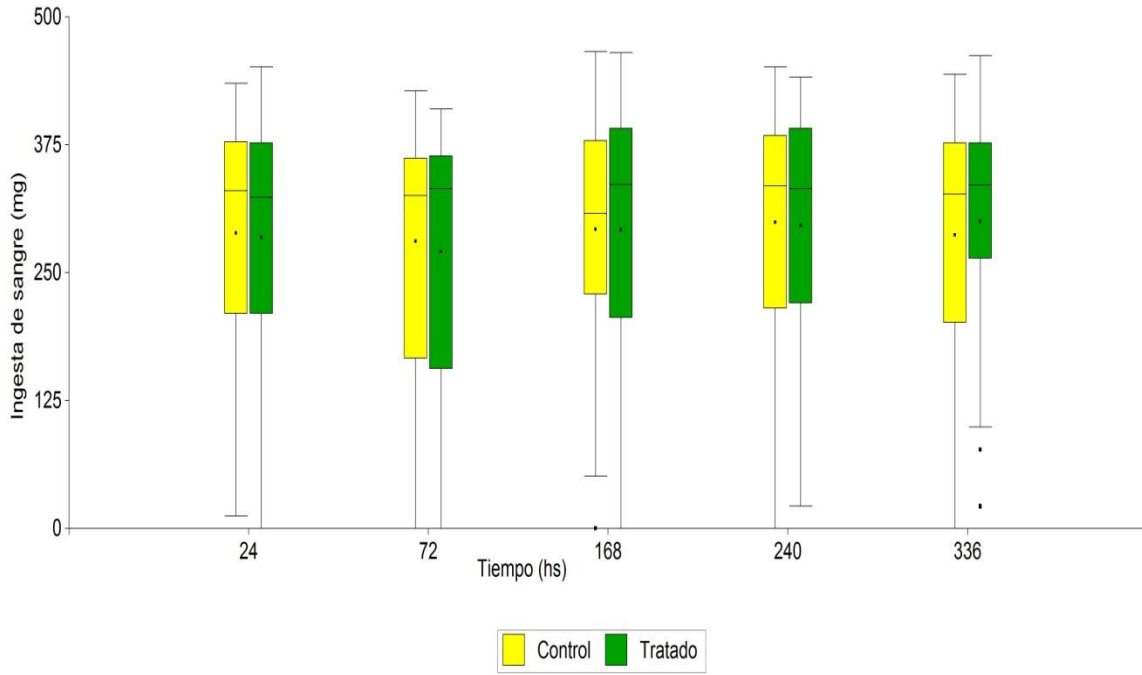
Transcurridos 14 días desde la alimentación sobre perros, no se encontraron diferencias significativas en la media de ingesta de sangre sobre ratas Wistar entre las ninfas sobrevivientes alimentadas sobre los perros controles de las que lo hicieron en perros tratados con alguno de los productos comerciales ( $p > 0,05$ ) (Figura 41 (A, B y D)).

Por otra parte, no se identificó ningún tipo de inhibición del proceso de ecdisis en las vinchucas que recibieron dosis subletales de alguno de los tres productos evaluados en esta Tesis. En la Tabla 40 se presenta la cantidad de adultos y de ninfas de V estadio, contabilizados al finalizar el ensayo.

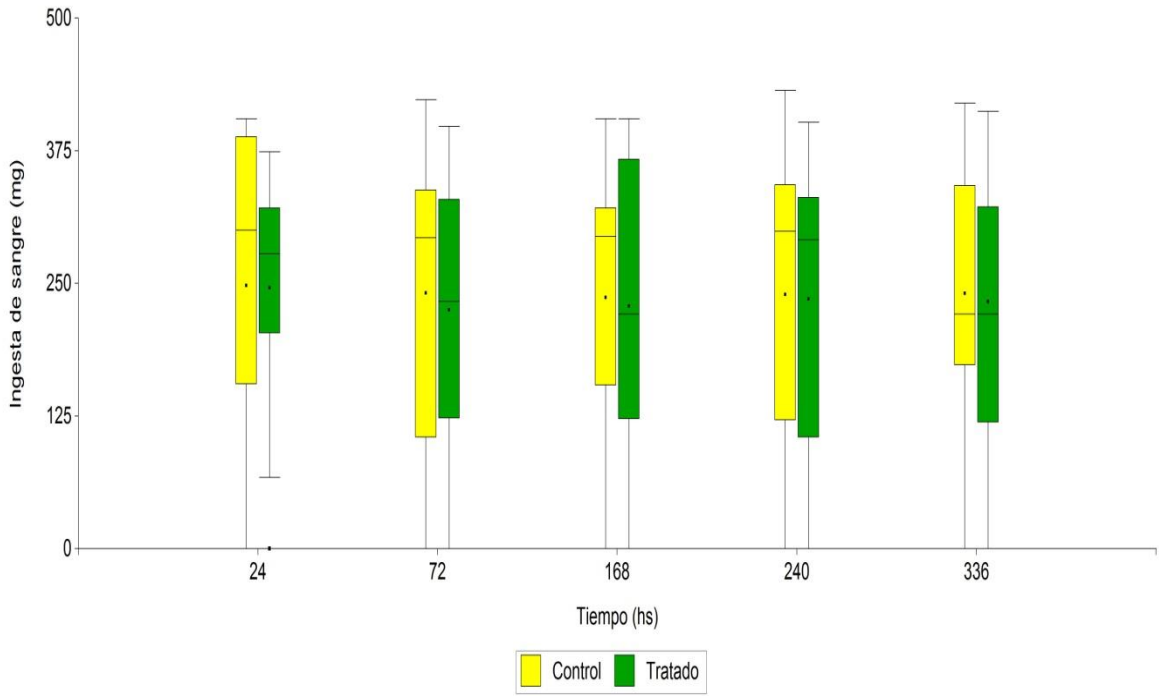
**Figura 41. A, B y C Comparación del consumo de sangre sobre ratas Wistar de ninfas previamente alimentadas sobre perros tratados con AD (A), PU (B) o FR (C) versus el consumo registrado en los insectos control**



**B**



**C**





**Tabla 40. Estudio de la presencia o ausencia del proceso normal de ecdisis en ninfas de V estadio que recibieron concentraciones subletales de PU, FR o AD**

Tratamiento	N	V	Ad
PU	20	1/0	17/2
AD	20	2/0	16/2
FR	20	1/1	16/2
Control	20	2/0	15/3

n: número de ninfas de V estadio al comienzo del ensayo

V: cantidad de ninfas de V estadio al finalizar el ensayo

Ad: cantidad de adultos al finalizar el ensayo

x/y: cantidad de individuos vivos del estadio / cantidad de individuos muertos del estadio

### 3.2.4 Discusión

Los dos ensayos en esta sección se complementan con lo descrito en el Capítulo 2 de esta Tesis sobre la actividad del imidacloprid y el fipronil en ninfas de V estadio de *T. infestans*. Los tres productos comerciales evaluados, mostraron alguna actividad letal sobre las ninfas.

En el caso del imidacloprid el único antecedente de xenointoxicación en triatominos es el trabajo de Carvajal y col., (2014) en el que se evaluó la actividad en distintas dosis del producto comercial AD. La xenointoxicación fue realizada en un modelo aviar (paloma) y se estudió la actividad del neonicotinoide sobre ninfas de I y III estadio ayunadas durante 15-20 días. Los resultados más importantes, son una tasa de mortalidad entre las ninfas de ambos estadios que fue proporcional a la dosis de AD utilizada. La actividad letal fue máxima a las 24 h postratamiento y solo se extendió hasta los 7 días en el caso de las concentraciones más altas. En consonancia con este resultado, en esta Tesis también se registró para AD y PU un comienzo de la actividad triatomicida a las 24 h postadministración en los perros; registrándose el punto máximo de actividad en ambos productos a las 72 h. La actividad triatomicida de AD y PU se extendió hasta los 7 y 10 días postratamiento, respectivamente. Las diferencias en el tiempo de máxima actividad del producto AD entre palomas y perros se debería a los distintos procesos farmacocinéticos (liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación) del imidacloprid en estas especies animales, pero también, la diferencia de actividad de AD entre ambas especies se podría atribuir

a la metodología utilizada en los ensayos. En el trabajo de Carvajal, las ninfas fueron alimentadas durante 30 min en la misma zona en la que aplicaron el producto comercial, mientras que en nuestro caso el producto fue administrado en la base del cuello y las ninfas se alimentaron en la zona abdominal de cada perro. Chopade y col., (2010) estudiaron la distribución del imidacloprid después de la administración en perros de raza Beagle. Se demostró que imidacloprid se distribuye hacia regiones de la piel distantes al sitio de administración y este proceso de distribución provoca un rápido descenso de las concentraciones del insecticida en el lugar en donde fue topicado. Este dato se condice con la alta toxicidad de AD entre las ninfas alimentadas a las 24 h de haber sido administrado en las palomas (mismo lugar de administración y de alimentación) y el posterior descenso de la actividad a los 7 días postadministración. En el caso del perro, se podría especular que a las 72 h el proceso de distribución del fármaco provocó una concentración lo suficientemente alta en la zona abdominal del animal que resultó en el pico más alto de actividad letal del producto comercial. Un nuevo objetivo para un futuro trabajo sería comprobar si existe una relación entre la toxicidad del imidacloprid y la zona del perro seleccionada para la alimentación de las ninfas de *T. infestans*.

Otro aspecto diferencial entre las metodologías utilizadas en el trabajo de Carvajal y la presente Tesis, fue que los autores comunicaron solo la mortalidad de las vinchucas a las 24 h de haber sido alimentadas las ninfas sobre las palomas, mientras que en esta Tesis se observó el estado de las vinchucas cada 24 h durante 14 días postalimentación. Tanto con AD como con PU se pudo constatar que la toxicidad del neonicotinoide aumentó hasta los 4-5 días de haber ingresado en los insectos. Confirmando de esta manera lo observado en el Capítulo 2 cuando imidacloprid fue topicado o impregnado sobre papel de filtro.

En cuanto a la intensidad de la respuesta letal de ambos productos se detectó una mayor y más prolongada actividad de PU con respecto a AD. Esta diferencia se fundamentaría en la composición de ambos productos. Mientras que el formulado AD contiene al imidacloprid como único principio activo, el producto PU combina al neonicotinoide con PBO y permetrina. El PBO es un sinergista de

ciertos insecticidas y especialmente eficaz cuando es combinado con algunos piretroides. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición del sistema de enzimas detoxificantes del Citocromo P-450 de los insectos. Mientras que la permetrina es un piretroide sintético integrante del Tipo I de esta familia de insecticidas. La eficacia de distintas combinaciones de las tres moléculas presentes en PU ha sido demostrada frente a *T. infestans* y otros insectos (Alzogaray y Zerba, 1997; Bingham y col., 2011). Por ejemplo, en *Triatoma infestans* se estudió la actividad del PBO en combinación con el isómero cis de la permetrina y se observó que en ausencia del sinergista, los signos de intoxicación generados por dosis subletales del isómero de la permetrina en ninfas de III estadio de *T. infestans* desaparecieron después de transcurrido un determinado tiempo desde que fue topicado. Este proceso de recuperación de los insectos fue inhibido cuando los autores trataron a las ninfas con una dosis fija de PBO antes que los insectos recibieran las dosis subletales del piretroide. A partir de estos resultados concluyeron que en el proceso de desintoxicación de la permetrina estarían involucradas enzimas del Citocromo P-450 que fueron inhibidas por el sinergista PBO (Alzogaray y Zerba, 1997). La combinación de PBO y piretroides también fue eficaz sobre hembras de *Aedes aegypti* resistentes a deltametrina, aumentando el porcentaje de mortalidad de los insectos resistentes desde 1% con deltametrina a 100% cuando tomaron contacto con superficies tratadas con deltametrina y PBO combinados (Bingham y col., 2011). En cuanto a la aplicación de permetrina por vía tópica en perros, se comunicó una distribución rápida del piretroide por el pelaje de los animales en el estrato córneo de la epidermis (Lüssenhop y col., 2012). El estudio de la actividad insecticida y acaracida de la permetrina permitió determinar una actividad máxima entre los 7 y 14 días postadministración (Pfister y Armstrong, 2016). Ello podría estar asociado con el resultado obtenido en esta Tesis en cuanto a la mayor duración de la actividad letal de PU con respecto a AD. Si bien ambos productos comenzaron con su actividad triatomicida a las 24 h, PU extendió su actividad hasta los 10 días postratamiento, mientras que AD solo mostró eficacia pasados 7 días desde que el producto fue topicado en los perros. Si se tiene en cuenta que el imidacloprid es el

único principio activo presente en AD y que en PU la combinación del imidacloprid con PBO y permetrina le permitió a este último formulado extender su actividad triatómica, se podría suponer que parte de esta actividad letal extra fue por la actividad del PBO y/o de la permetrina.

A partir de la diferencia significativa entre el promedio de sangre ingerida por las ninfas que murieron en el tiempo de mayor toxicidad de PU y de AD (72 h) versus los promedios de los restantes tiempos de alimentación hallados en esta Tesis, se generan una serie de interrogantes sobre la vía eficaz de ingreso del imidacloprid en las ninfas de *T. infestans*. En las especies de insectos que son susceptibles al imidacloprid la forma en que se establece el contacto con el insecticida es determinante del grado de toxicidad. Para algunas especies de insectos la vía oral es la más tóxica, mientras que en otras la vía por contacto a través de su cutícula es la más eficiente (De Cock y col., 1996; Lagadic y col., 1993). Por lo tanto, poder determinar este parámetro es fundamental. Si se establece que un insecticida es eficaz ingresando al insecto por contacto a través de su cutícula, esta molécula debería ser formulada para que, al ser administrada en un perro, se absorba la menor cantidad posible y por lo tanto, quede en su mayoría distribuida en la piel del animal. Por otra parte, si la vía oral fuese la de mayor eficacia, la molécula debería ser formulada de tal modo que se absorba lo más posible hacia la circulación sistémica, y de esta manera sea incorporado durante la alimentación de los insectos. Si se tiene en cuenta que la mayoría de la dosis del imidacloprid administrado en perros se concentra principalmente en la epidermis, folículos pilosos y glándulas sebáceas y solo una pequeña parte de la dosis es absorbida hacia la circulación sistémica (Mehlhorn H., 1999), se podría inferir que la vía principal de acceso del insecticida al insecto fue a través de su cutícula. En adultos de *Ctenocephalides felis* (pulga) se comunicaron signos de intoxicación a los 5 minutos de haber comenzado la alimentación sobre la piel de perros tratados con AD, lo que derivó en la muerte del 100% de los insectos evaluados a la hora de haber comenzado la alimentación. En otro ensayo, cuando la capa lipídica de la piel de los perros tratados con imidacloprid fue removida con alcohol, las pulgas se alimentaron en la misma proporción que lo hicieron las

pulgas alimentadas sobre los perros que no fueron tratados con imidacloprid (control) sin evidenciar signos de intoxicación. Concluyendo que, durante la alimentación de *Ctenocephalides felis* en perros, el imidacloprid no fue ingerido y que la toxicidad de la molécula fue producto de una penetración a través de las membranas intersegmentales de la cutícula de las pulgas (Mehlhorn H., 1999). Este resultado no concuerda en varios aspectos con los hallazgos en los ensayos presentados en esta sección de la Tesis. La comparación realizada sobre el promedio de sangre consumida por las vinchucas demostró que no existieron diferencias estadísticamente significativas según el tratamiento previo que recibió el perro desde el que se alimentaron (AD, PU o control). Esto significa que ninguno de los dos productos comerciales logró interferir con el proceso normal de alimentación y que tampoco demostraron tener actividad repelente sobre los insectos. Si se tiene en cuenta la relación directa que existe entre la probabilidad que una vinchuca defeque sobre el huésped y el volumen de sangre ingerido por el insecto, el hecho que ninguno de los dos productos comerciales haya interferido en el proceso normal de alimentación de las vinchucas es un resultado negativo. La ausencia de actividad repelente por parte de AD y PU podría ser analizada como un resultado positivo. Este se debe a que una molécula que al ser administrada en perros provoque actividad repelente sobre las vinchucas, lo único que lograría es que los insectos busquen nuevas fuentes de alimentación que no sean estos animales. Si se tiene en cuenta que para *T. infestans* la segunda fuente de alimentación en importancia es el ser humano, se comprende fácilmente el riesgo que implica en la carga de enfermedad humana, administrar moléculas en perros con actividad repelente sobre las vinchucas.

Otro aspecto que diferenció la respuesta entre las pulgas y las vinchucas fue el tiempo en que comenzó la actividad letal en los insectos. Mientras que en las pulgas la actividad letal de AD se inició a los 5 min y fue independiente del estado de alimentación de los insectos, entre las vinchucas la actividad letal se observó a partir de las 24 h y estuvo relacionada con la ingesta o no de alimento por parte de las ninfas. En el caso de las pulgas, que la mortalidad alcanzada haya sido independiente del estado de alimentación, significa que AD provocó tanto la

muerte de insectos alimentados como la de aquellos que permanecieron sobre el perro sin alimentarse. Por el contrario, en *T. infestans* todos los ejemplares que murieron durante el ensayo consumieron, en mayor o menor cantidad, sangre de los perros tratados. Debido a las diferencias con lo comunicado entre las pulgas, ¿se debería descartar la penetración del imidacloprid a través de la cutícula como la única forma eficaz de entrada del insecticida en *T. infestans*? El hecho que todas las ninfas muertas que estuvieron en contacto con perros tratados con AD o PU ingirieron sangre, permite presumir que la vía oral también podría ser una forma de entrada eficaz del imidacloprid en *T. infestans*. Esto se explicaría teniendo en cuenta que el aumento del imidacloprid en la circulación sistémica del perro acrecienta la disponibilidad de la molécula para ser ingeridas por los insectos por la vía oral, lo que se reflejaría en volúmenes menores necesarios para alcanzar la concentración letal en los insectos. Por lo tanto, podemos inferir que a las 72 h se haya registrado una mayor concentración de moléculas de imidacloprid en circulación sistémica de los perros y que con volúmenes menores de sangre se hayan incorporado en los insectos la cantidad de moléculas suficientes para matar a las ninfas. Esto determinaría que en ninfas de V estadio de *T. infestans*, al igual que lo que ocurre en *Apis mellifera* (Suchail y col., 2000; Iwasa T., 2004), el imidacloprid ejerció su efecto tóxico por contacto, a través de la cutícula, y también por ingestión de la molécula.

En el caso del fipronil son varios los trabajos en los que se realizó xenointoxicación en perros para estudiar la actividad del insecticida sobre *T. infestans*. El primer trabajo de xenointoxicación con fipronil en perros fue realizado por Gentile y col., (2004), quienes estudiaron la actividad triatómica sobre ninfas de III estadio de un formulado líquido de fipronil al 1%. La principal limitante de este trabajo fue que únicamente se utilizó un perro durante el ensayo de xenointoxicación. Después de 7 y 30 días del tratamiento del perro con el insecticida, se alimentaron 6 ninfas de III estadio de *T. infestans* resistentes a piretroides obtenidas de la zona de Salvador Mazza. Entre los resultados más importantes se destaca un porcentaje de mortalidad del 100% de las 6 ninfas utilizadas en cada uno de los tiempos de alimentación. Esta importante capacidad

triatomocida residual de un mes de duración comunicada, se contrapone con la actividad letal de corta duración (72 h) observada para el producto comercial FR bajo nuestras condiciones experimentales. En un trabajo posterior, Gurtler y col., (2009a) estudiaron la actividad del producto comercial Frontline Plus® formulado con fipronil al 10%, en combinación con el análogo de la hormona juvenil de insectos, s-metopreno, formulado al 9%. Fueron alimentadas grupos de 30 vinchucas (15 de III estadio y otras 15 de IV) durante 30 min sobre perros tratados con el producto comercial. Distintos grupos de ninfas fueron alimentadas cada 7 días durante 6 semanas. Se encontró una actividad letal reducida en intensidad y durabilidad de la pipeta sobre las ninfas evaluadas. La actividad letal máxima se observó a los 7 días postratamiento y fue de 19%. Este resultado guarda cierta similitud con lo observado por Amelotti y col., (2012b), en el que se estudió la actividad de FR en dos dosis distintas sobre ninfas de III estadio de *T. infestans*. Transcurridas 24 h desde la administración del producto se constató una mortalidad del 25% en las ninfas alimentadas sobre los perros tratados con la dosis utilizada habitualmente, mientras que cuando la dosis fue duplicada, el porcentaje de letalidad aumentó hasta el 48%. Los resultados presentados en esta sección de la Tesis con respecto a la actividad de FR están en consonancia con los últimos dos trabajos mencionados. Es decir, una actividad letal baja, acompañada de un tiempo de eficacia breve. En correspondencia con lo informado por Gurtler y Amelotti, el fipronil administrado en perros no interfirió con el proceso normal de alimentación de las ninfas.

Al igual que lo observado y previamente discutido con el imidacloprid, en el caso del FR también se constató la ingestión de alimento en todas las vinchucas muertas después del contacto con los perros tratados. Se podría inferir para el fipronil, una conducta similar a la descrita previamente para el imidacloprid, es decir, que la vía eficaz de entrada a *T. infestans* podría ser tanto la oral como la tópica.

Cuando se realizaron las observaciones para constatar el estado de los insectos, se registró la presencia de individuos que pese a lograr desplazarse desde el centro del papel de filtro hasta el borde (criterio de vida o muerte), lo

hicieron con dificultad. Estas ninfas fueron clasificadas como vivas pero presentaron signos claros de intoxicación: temblores generalizados en las patas y a veces en todo el cuerpo, incoordinación de las patas durante el desplazamiento, etc. La alimentación llevada a cabo sobre ratas Wistar transcurridos 14 días desde el contacto con los perros, tuvo como principal objetivo comprobar la existencia de posibles secuelas entre las ninfas que incorporaron concentraciones subletales de los insecticidas. El hecho que bajo nuestras condiciones experimentales no se hayan registrado diferencias significativas, cuando se compararon los volúmenes de sangre de rata incorporados por las ninfas alimentadas previamente sobre perros control, de los insectos que lo hicieron sobre perros tratados, puede estar relacionado con que *T. infestans*, al igual que ocurre en otros insectos, cuenta con un sistema de detoxificación que le permite eliminar tanto sustancias de naturaleza endógenas como exógenas (Santo-Orihuela, 2008). Por lo tanto, en las ninfas en las que las concentraciones del insecticida no fueron suficientes para provocar su muerte, no se observaron secuelas que pudieran interferir con la locomoción y el proceso de alimentación del insecto transcurridos 14 días desde el contacto con los tres productos comerciales. A estos mismos insectos, después de la alimentación sobre las ratas Wistar, se les permitió alimentarse una vez por semana sobre gallina por el lapso de 2 meses. El objetivo de este procedimiento fue estudiar si las dosis subletales de los insecticidas interferían con el proceso de ecdisis. Constatándose en esta Tesis por primera vez que ninguno de los dos productos con imidacloprid en su formulación lograron inhibir el proceso normal de muda de las ninfas de *T. infestans*. Mientras que en el caso de FR los resultados aquí expuestos confirman lo que fue comunicado por Gurtler y col., (2009a) y Amelotti y col., (2012b) quienes observaron un proceso de ecdisis normal en las ninfas que ingirieron dosis subletales de fipronil.

### **3.2.5 Conclusiones sobre esta sección**

Con los antecedentes y los datos aportados en esta Tesis, no es posible determinar si el imidacloprid y el fipronil presentes en distintas formulaciones



comerciales, podrían o no, ser utilizados para el control de *T. infestans* en las zonas de distribución de la especie. Para diseñar un ensayo de xenointoxicación son numerosas las variables a tener en cuenta y que pueden determinar diferencia de eficacia en la toxicidad sobre los individuos de *T. infestans*. Un ejemplo ilustrativo, es el caso previamente mencionado del fipronil, que al ser evaluado por tres grupos de investigación (Gentile A., 1994; Gürtler R., 2009a; Amelotti I., 2012b), se obtuvieron porcentajes de eficacia tan disimiles como un 100, 18 y 48% de mortalidad, respectivamente. Este hecho demuestra la importancia que poseen las distintas condiciones experimentales y lo difícil que es determinar mediante un único ensayo la factibilidad del uso de una molécula para el control de un vector. En esta sección de la Tesis demostramos, comparando la actividad letal de AD y PU, que la combinación de moléculas en una misma formulación puede ser una alternativa para acrecentar la eficacia y el tiempo de actividad letal. Nuevas pruebas con otros productos comerciales en los que el imidacloprid o el fipronil estén presentes, podrían ser llevadas a cabo para lograr, entre otros objetivos, extender el lapso de tiempo de eficacia letal de ambas moléculas sobre *T. infestans*.

## Sección III

### **Estudio de la actividad de ivermectina, doramectina y eprinomectina sobre ninfas de V estadio de *Triatoma infestans*, cuando son administrados a gallinas**

#### **3.3.1 Introducción**

En el ciclo epidemiológico de la enfermedad de Chagas, las gallinas, ocupan un lugar preferencial como fuente de alimentación para las poblaciones domiciliarias y peridomiciliarias de *T. infestans* (Cecere y col., 1997). En un estudio realizado a nivel rural en la provincia de Santiago del Estero, se determinó que en general, las gallinas constituyen la principal fuente de alimentación para *T. infestans* (Wisnivesky-Colli y col., 1982). Si bien a nivel domiciliario se demostró una relación directa entre el número de gallinas y la densidad poblacional de *T. infestans* (Cecere y col., 1997), también se determinó, una relación negativa entre la presencia de aves y los niveles de infección del insecto con *T. cruzi*. Esto se explicaría porque las gallinas son refractarias a la infección con *T. cruzi* y por lo tanto, su rol en el ciclo epidemiológico de la enfermedad de Chagas es solo servir como fuente de alimentación a los triatominos (Gürtler y col., 1998). En el peridomicilio, las gallinas son identificadas como el principal sustento alimenticio de poblaciones residuales de vinchucas después del rociado con piretroides (Cecere, 1997; Gürtler, 1998). Un dato importante es el hallazgo de poblaciones de *T. infestans* en establecimientos avícolas emplazados en la ciudad de Florencio Varela, equidistante (30 km) de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y La Plata. La presencia de estas poblaciones de *T. infestans* en una región en donde el 5% de los habitantes (400.000) está infectado con *T. cruzi* implica un riesgo sanitario (Gajate y col., 2001).

Por lo tanto, las gallinas se erigen como un importante candidato para la administración de insecticidas que puedan interferir con el normal desarrollo de *T. infestans*.

Existen antecedentes del uso de distintas moléculas en ensayos de xenointoxicación en gallinas. Amelotti y col., (2009a) estudiaron la actividad de la cipermetrina, aplicada en gallinas, sobre la mortalidad, consumo de sangre y capacidad de ecdisis en ninfas de estadio III de *T. infestans*. En un trabajo posterior, realizado por el mismo grupo, se estudió la eficacia triatómica de una combinación de cipermetrina /PBO aplicado en gallinas (Amelotti y col., 2010). En un ensayo con condiciones de semi-campo, utilizando nidos artificiales contruidos con ladrillos de adobe, Juan y col., (2013) evaluaron la actividad triatómica de una combinación de beta-cipermetrina y piriproxifeno (análogo de la hormona juvenil de los insectos), aplicada en gallinas.

El objetivo de la presente sección fue estudiar la actividad de IVM, DRM y EPR, cuando son administradas a gallinas, sobre ninfas de V estadio de *T. infestans*. Se evaluó la actividad letal y la influencia sobre el proceso de alimentación de las ninfas que estas moléculas endectocidas pudiesen tener. Simultáneamente, se obtuvieron muestras de sangre de las aves a distintos tiempos post-administración de cada endectocida, con el fin de evaluar el comportamiento cinético de cada una de las tres moléculas después de ser administradas en las aves. Así, relacionando las concentraciones obtenidas para cada endectocida en el tiempo con la intensidad de la respuesta letal observada en las ninfas en función de los mismos tiempos, se pudo realizar una integración farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD). La integración PK/PD tiene como principal objetivo determinar el inicio, la intensidad y la duración del efecto de un fármaco determinado y así conocer los parámetros que se deben obtener para conseguir una terapia eficaz y racional.

### 3.3.2 Materiales y métodos

#### 3.3.2.1 Principios activos

Ivermectina:(90%, Romikin, S.A.)

Doramectina: (94,8%, Romikin S.A.)

Eprinomectina: (90,7%, Romikin S.A.)

Dimetilsulfóxido: (99%, Sigma – Aldrich)

Ketamina: (Richmond, S.A.)

Acepromacina: (Holliday Scott, S.A.)

Acetonitrilo: Calidad HPLC, >= 99,9 % (J. T. Baker, S. A.)

Metanol: Calidad HPLC, >= 99,9 % (J. T. Baker, S. A.)

N-metilimidazol: (95%, Sigma-Aldrich)

Anhídrido trifluoracético: (99%, Sigma-Aldrich)

#### 3.3.2.2 Animales experimentales

Los ejemplares de *T. infestans* utilizados durante el ensayo fueron ninfas de V estadio provenientes de la colonia de insectos susceptibles a piretroides (Santiago del Estero). Al alimentarse sobre las gallinas, las vinchucas contaban con 12-15 días de ayuno. Después de ser alimentados, los insectos se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas:  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura, 60-70% HR y un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 h en el insectario del LEFyT.

Todas las gallinas utilizadas en los distintos ensayos fueron raza *Rhode island*, con un peso promedio de  $2,85 \pm 0,35$  Kg. Los ejemplares que hubiesen recibido algún tratamiento antiparasitario en los últimos 2 meses no se incluyeron en la prueba. Durante todo el ensayo las aves fueron mantenidas en condiciones ambientales controladas y constantes ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , HR, del 70 - 80 % y fotoperíodo de 12:12 h). El agua de bebida y el alimento fueron suministrados *ad libitum*.

### 3.3.2.3 Ensayo de xenointoxicación en gallinas

Se evaluó la eficacia triatómica de IVM, DRM y EPR sobre ninfas de V estadio de *T. infestans* susceptibles a piretroides. Las gallinas fueron divididas en cuatro grupos de cuatro individuos cada uno. Cada grupo fue alojado en jaulas separadas. Las gallinas de los grupos 1, 2, y 3 (GT1-GT2-GT3) recibieron, en forma tópica, IVM, DRM y EPR, respectivamente. Los endectocidas fueron formulados al 0,5% en dimetilsulfóxido (DMSO) y se administraron a razón de 600 µg/kg de peso vivo. A los animales del grupo 4 se les administró DMSO, considerándose como grupo control (GC). Para conocer la actividad triatómica de los insecticidas, se establecieron distintos tiempos de alimentación postadministración de las moléculas (24, 72, 120, 168, 240, 336 y 504 h). En cada tiempo de alimentación, sobre cada gallina, se alimentaron 15 vinchucas divididas en tres grupos de 5 individuos cada uno (Tabla 41). Cada grupo conformado (n=5) tomó contacto con la zona ventral de una determinada gallina durante 20 minutos. Para permitir la alimentación de los insectos, en cada recipiente con 5 vinchucas en su interior, se colocó un cartón de tal manera que permitiese al insecto desplazarse hasta la parte superior del contenedor. Para evitar el escape de los insectos, la abertura de los recipientes fue recubierta con un trozo de tela tipo tul. Los recipientes conteniendo los insectos fueron colocados debajo del cuerpo de las gallinas y de esta manera se permitió el contacto entre la probóscide del insecto y la piel de la gallina a través de la tela tul. Una vez alimentadas, las vinchucas fueron observadas cada 24 h durante un lapso de 14 días. Cada ninfa fue individualizada con pintura acrílica de diferente color. Para conocer la cantidad de alimento ingerido, Los insectos fueron pesados antes e inmediatamente después de alimentarse con una balanza de precisión (Sartorius 1207 MP2).

**Tabla 41. Distribución del material biológico utilizado durante esta sección**

NT	TA	Número de gallinas		Número de ninfas		
		Por tratamiento	Total	Por gallina	Por tratamiento	Total
4	7	4	16	15	60	1680

NT: número de tratamientos

TA: tiempos de alimentación

#### **3.3.2.4 Estudio de la actividad de dosis subletales de IVM, DRM y EPR sobre la alimentación y capacidad de producir ecdisis en ninfas de V estadio de *T. infestans***

Transcurridos 14 días desde el contacto con las gallinas, se estudió el estado general de las ninfas que ingirieron dosis subletales de IVM, DRM o EPR. En primera instancia se estudió la capacidad de alimentación de las ninfas sobrevivientes al contacto con las gallinas, para lo cual se seleccionaron al azar, 20 ninfas de cada grupo de vinchucas (GT1, GT2, GT3 y GC) de cada uno de los distintos tiempos de alimentación. Las ninfas fueron colocadas en forma individual en un recipiente de plástico de 5 cm de diámetro de base, en cada contenedor también fue colocado un cartón de tal manera que permitiese al insecto desplazarse hasta la parte superior y tomar contacto para alimentarse durante 30 min sobre una rata Wistar anestesiada (sin tratamiento insecticida alguno). En este caso, para conocer la cantidad de alimento ingerido por cada ninfa, cada recipiente fue pesado antes y después de la alimentación. Se comparó estadísticamente el promedio de consumo de sangre entre los distintos grupos de ninfas.

Después de ser alimentados sobre ratas Wistar, se seleccionaron al azar 20 individuos de cada uno de los grupos de insectos conformados (GT1, GT2, GT3 y GC). A estas 80 ninfas se les permitió alimentarse sobre gallinas (sin tratamiento insecticida alguno) una vez por semana, durante un lapso de 2 meses. Transcurrido ese tiempo se constató la cantidad de adultos y ninfas de V estadio presentes en los distintos recipientes.

#### **3.3.2.5 Estudio farmacocinético de IVM, DRM y EPR tras ser administrados a gallinas**

Para realizar el estudio farmacocinético de los endectocidas ensayados, se obtuvo sangre en jeringas heparinizadas a partir de la vena marginal del ala de las gallinas a diferentes tiempos post-administración de las moléculas (0, 0,5, 1, 2,

6, 12, 24, 48, 72, 96, 144, 240, 288, 360, 432, 504 y 672 h). Como este ensayo se realizó en simultáneo con el de eficacia descrito en la sección 3.3.2.2, se trató de no hacer coincidir los días en que las gallinas fueron utilizadas para alimentar a las vinchucas con las extracciones de sangre. El volumen de sangre extraído en cada ocasión fue de aproximadamente 1 mL. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3.500 rpm durante 10 min y el plasma obtenido se transfirió a tubos Eppendorf de 2,5 mL para ser almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis cromatográfico.

### **3.3.2.5.1 Procedimiento analítico**

La cuantificación de los endectocidas presentes en las distintas muestras de plasma de las gallinas tratadas fue realizada utilizando Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) con detección por fluorescencia. El procedimiento analítico fue el mismo para los tres endectocidas. Para la confección de las curvas de calibración con las que se cuantificaron las concentraciones plasmáticas de los endectocidas se siguió el siguiente procedimiento: se prepararon 10 mL de una solución primaria de 1000  $\mu\text{g/mL}$  de cada uno de los insecticidas. Para conseguir esta concentración se corrigió el peso por la pureza de cada una de las moléculas (IVM: 90%, DRM: 94,8% y EPR: 90,7%). A continuación, para obtener una solución secundaria con una concentración final de 100  $\mu\text{g/mL}$ , se realizó una dilución 1/10, para esto se tomó una alícuota de 1 mL de la solución primaria y se completó con acetonitrilo un volumen final de 10 mL. También se preparó una solución secundaria con una concentración final de los endectocidas de 1  $\mu\text{g/mL}$ , para conseguir dicha concentración se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución primaria que fueron diluidos en acetonitrilo hasta un volumen final de 10 mL. A partir de esta última solución secundaria se obtuvieron distintas concentraciones (0,5, 1, 2,5, 5, 10, 20 y 30  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) para la confección de la curva estándar.

El procedimiento de extracción seguido para cuantificar las concentraciones de los endectocidas en plasma de gallinas resumidamente fue según se detalla a continuación: a 0,5 mL de plasma de gallina se le agregó 0,5

mL de acetonitrilo calidad HPLC y 0,125 mL de agua tridestilada, después de agitar durante 20 minutos en vortex, se centrifugó a 2.000 x g durante 2 minutos. El sobrenadante obtenido fue transferido a columnas de extracción SPE Supelclean LC<sub>18</sub> (Supelco, Bellfonte, PA, USA), previamente acondicionadas con 5 mL de metanol y 5 mL de agua tridestilada. Se sembraron las muestras en las columnas de extracción en fase sólida y se lavó el cartucho SPE con 2 mL de agua tridestilada y 1 mL de una solución agua:metanol (75:25 v/v). Se dejó secar durante 20 segundos mediante vacío, para posteriormente eluir la muestra con 1,2 mL de metanol. El eluido obtenido fue evaporado a seco utilizando un concentrador/evaporador modelo RVC 2-25CD (Christ modelo RVC 2-25CD, Germany) seteado a 40°C. El residuo seco del endectocida fue disuelto en 50 µL de una solución de N-metilimidazol en acetonitrilo (1:1 v/v). La derivatización se inició con la adición de 75µL de una solución de anhídrido trifluoracético en acetonitrilo (1:2 v/v). Una vez finalizada la reacción (< 30 s), 100 µL de esta solución fue inyectado en el sistema cromatográfico.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: la fase móvil para los tres endectocidas estuvo compuesta por ácido acético (0,2% en agua):metanol:acetonitrilo (4:32:64) y fue bombeada a un flujo de 1,6 mL/min a través de una columna Luna (C18, 5 µm, 150 × 4.6 mm, Phenomenex). Se utilizó un detector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 365 nm y 475 nm de emisión.

### **3.3.2.5.2 Análisis farmacocinético**

Con los datos de concentración en función del tiempo obtenidos para cada endectocida ensayado por HPLC, se llevó a cabo el análisis farmacocinético por análisis no compartimental mediante el programa WinNonlin Professional 6.2 (Pharsight Corporation). A partir del tratamiento de los datos cinéticos mediante el análisis no compartimental se obtuvieron los siguientes parámetros: concentración máxima ( $C_{max}$ ), tiempo máximo ( $T_{max}$ ), constante de eliminación ( $\lambda$ ), semivida de eliminación ( $T_{1/2\lambda}$ ), área bajo la curva concentración en función del tiempo desde el



0 hasta la última determinación efectuada ( $AUC_{0-t}$ ), área bajo la curva concentración en función del tiempo extrapolada al infinito ( $AUC_{0-\infty}$ ), volumen de distribución ( $Vd/F$ ) y el aclaramiento ( $CL/F$ ).

### **3.3.2.6 Ensayo de xenointoxicación en condiciones de semicampo**

El objetivo de este ensayo fue realizar una xenointoxicación emulando algunas de las condiciones encontradas en el peridomicilio de las zonas endémicas de la enfermedad de Chagas. De manera que se construyeron 12 unidades de trabajo (UT) con las siguientes características: alrededor de una jaula de metal se apilaron ladrillos comunes de arcilla, dejando solamente la puerta de la jaula sin cubrir. Para permitir un fácil desarmado y rearmado de las UTs, los ladrillos fueron apilados sin utilizar ningún tipo de pegamento (Figura 42 A y B). A efectos de evitar la fuga de las ninfas, cada unidad fue aislada utilizando tela mosquitero de aluminio, también como medida de seguridad, se colocó una cinta doble faz en el piso alrededor de cada UT. Las gallinas fueron divididas en cuatro grupos de 3 individuos cada uno. Las aves de los grupos 1, 2, y 3 (GT1-GT2-GT3) recibieron, en forma tópica, IVM, DRM y EPR, respectivamente, mientras que el grupo 4 recibió DMSO. Los endectocidas fueron formulados al 0,5% en DMSO y administrados a razón de 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso vivo. Cada gallina fue asignada a una UT determinada y fue colocada en su interior durante 12 h por día (desde las 22.00 h hasta las 10.00 h del día siguiente) durante los 45 días que duró el ensayo. El tiempo en que las gallinas no estuvieron encerradas en las UT, permanecieron alojadas en una habitación con agua y alimento *ad libitum*. En cada UT se colocaron al principio del ensayo ( $T_0$ ) 30 ninfas de V estadio de *T. infestans* perteneciente a la colonia de vinchucas susceptibles a piretroides mencionada anteriormente. Cada 15 días se procedió al desarmado de las UTs y al recuento y observación de las vinchucas. En este ensayo, debido a las condiciones experimentales establecidas, se registró un estado de las ninfas al que se denominó predado. Este estado, no observado en ninguno de los ensayos

anteriormente desarrollados, se debió a la actividad de predación llevada a cabo por las gallinas sobre los insectos. Se consideró como predado a aquel insecto que no fue hallado durante alguno de los recuentos que se hicieron durante el ensayo.

**Figura 42. A) Construcción de las UT con ladrillos alrededor de una jaula. B) Gallina alojada en el interior de la UT**



### 3.3.2.7 Método estadístico

Las variables categóricas se resumieron mediante porcentajes, y las variables continuas normalmente distribuidas se presentaron como medias  $\pm$  desviaciones estándar (DE). En caso de no presentar distribución normal se utilizó mediana y recorrido intercuartil y fueron analizadas con la prueba de análisis de Varianza o Kruskal-Wallis según corresponda. Para la mortalidad se utilizó el procedimiento de modelos lineales generalizados (MLG). En el procesamiento de datos se utilizó el RStudio Version 0.99.467 – © 2009-2015 RStudio, Inc.

### **3.3.2.8 Consideraciones éticas**

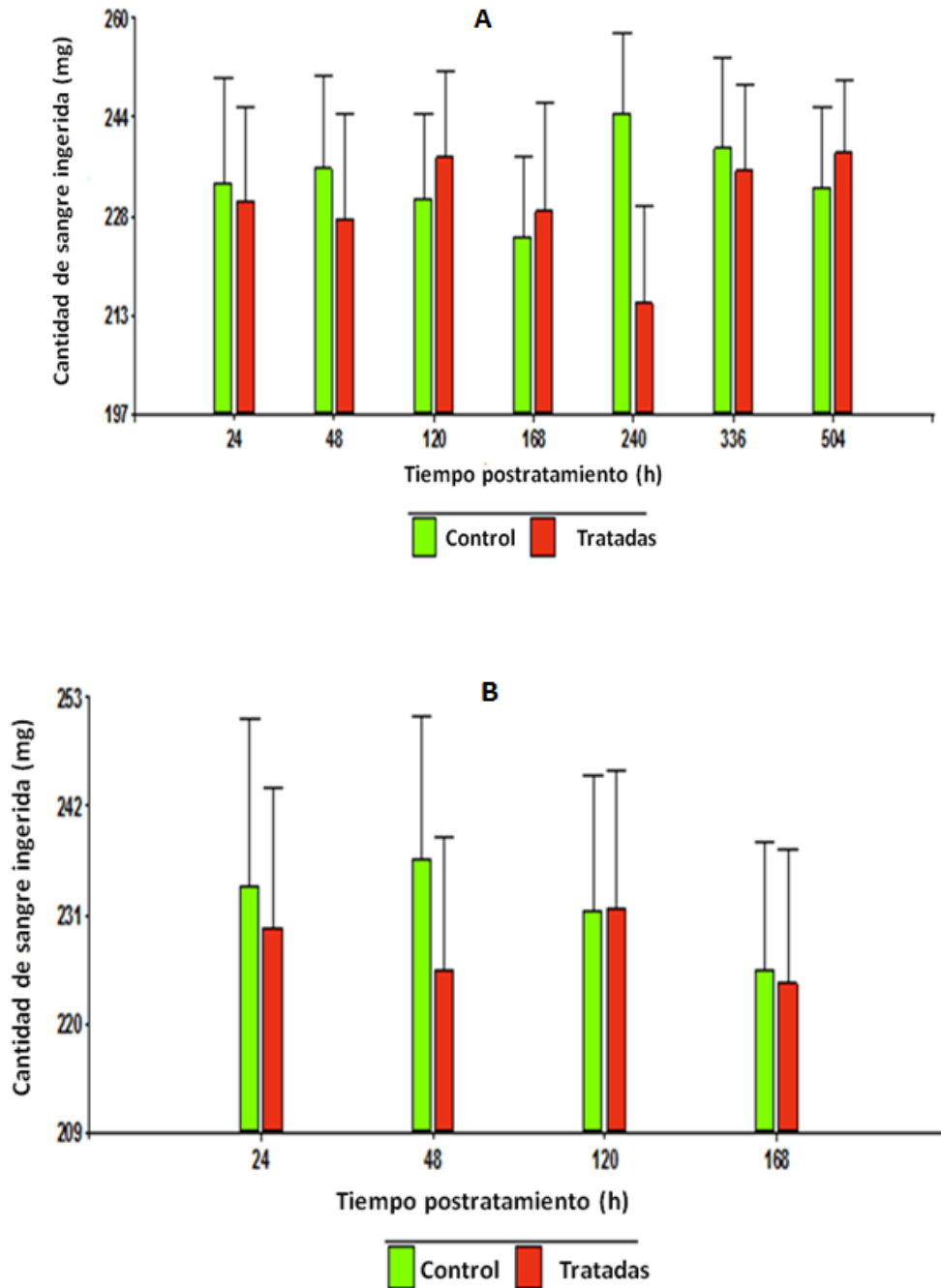
El protocolo para el manejo de los animales en los distintos ensayos se basó en la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto para Investigación en Animales de Laboratorio (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals del Institute for Laboratory Animal Research, 2011) y fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina (Resolución T05-01-2014).

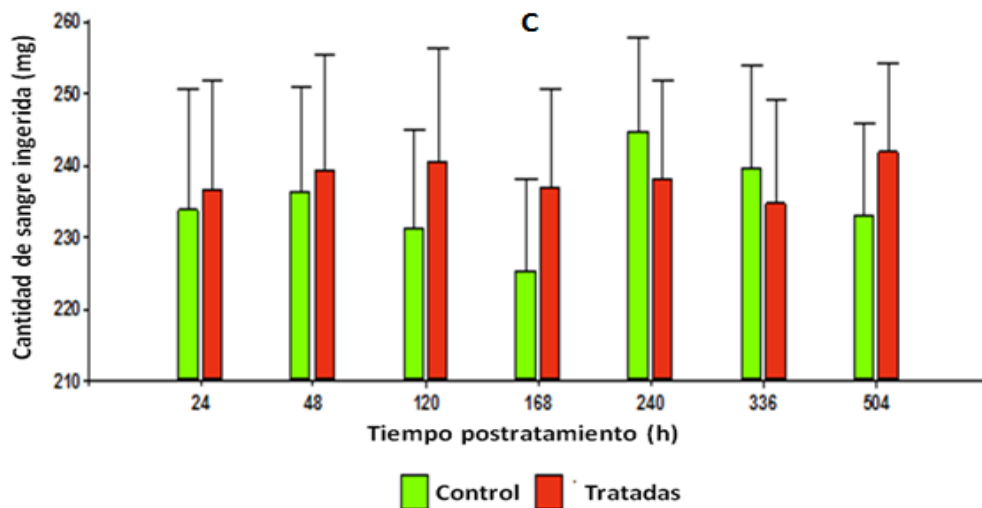
### **3.3.3 Resultados**

#### **3.3.3.1 Consumo de sangre realizado por las vinchucas alimentadas sobre gallinas tratadas con DRM, EPR e IVM**

En la Figura 43 (A, B y C) se observan los valores de los promedios del consumo de sangre efectuado por los distintos grupos de ninfas de V estadio de *T. infestans*. Ninguno de los tres endectocidas administrados en las gallinas demostró tener actividad sobre el consumo de sangre las vinchucas. En cada tiempo de alimentación postratamiento de las gallinas, no se encontraron diferencias significativas en la mediana de ingesta de sangre obtenida a partir de las ninfas alimentadas sobre los gallinas controles de las que fueron alimentadas sobre gallinas tratadas con alguno de los endectocidas ( $p > 0,05$ ). El promedio de consumo de alimento por las ninfas alimentadas sobre las gallinas control fue de  $234,8 \pm 5,7$  mg. El promedio de consumo para DRM, EPR e IVM fue de  $230,6 \pm 7,3$ ;  $227,4 \pm 2,8$  y  $238,1 \pm 1,2$ , respectivamente.

Figura 43. A, B y C Comparación a diferentes tiempos postratamiento del consumo de sangre por parte de ninfas de V estadio de *T. infestans* alimentadas sobre gallinas tratadas con DRM (A), EPR (B), IVM (C) o DMSO (control)





### 3.3.3.2 Mortalidad en ninfas de V estadio de *T. infestans* alimentadas sobre gallinas tratadas con DRM, EPR, IVM o DMSO

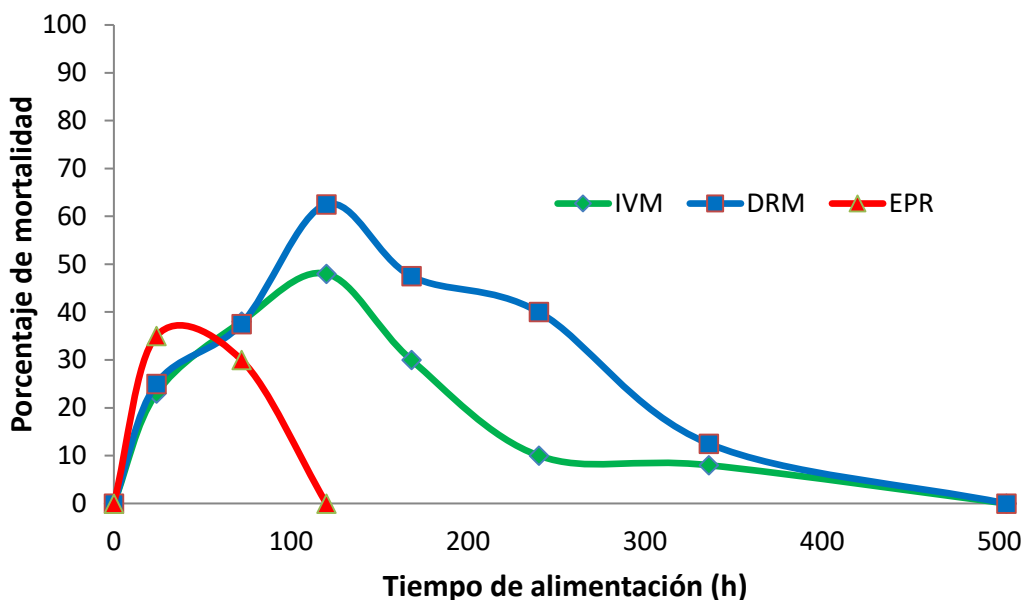
En la Tabla 42 se observa el porcentaje de mortalidad acumulada de las ninfas alimentadas sobre gallinas tratadas con DRM, EPR o IVM. La observación de los insectos a distintos tiempos postalimentación, permitió determinar la evolución en el tiempo del efecto letal de los endectocidas. La letalidad en las ninfas, comenzó en la mayoría de los tiempos de alimentación 24 h postingesta de las moléculas. También se estableció que en la mayoría de los casos la mortalidad de las vinchucas se incrementó hasta 7-10 días postingestión de los endectocidas. De las 420 vinchucas que fueron alimentadas en distintos tiempos sobre gallinas tratadas con DRM, se registró un porcentaje de mortalidad del 32,1%, elevándose a 37,5% durante el periodo en el que la molécula demostró eficacia letal sobre las ninfas. Para el endectocida EPR se registró el porcentaje total de mortalidad más bajo, 9,2%. El porcentaje de mortalidad teniendo en cuenta tan solo los dos tiempos en los que fue eficaz la molécula se elevó a 32,5%. En el caso de IVM el porcentaje global de mortalidad alcanzado fue de 22,6% y se elevó a 26,3% cuando se consideraron los seis tiempos en los que el endectocida demostró

actividad letal. La cantidad total de vinchucas muertas alimentadas sobre las gallinas tratadas con DMSO fue de 6 (1,4%).

**Tabla 42. Porcentajes de mortalidad en ninfas de V estadio ocasionada por la presencia de DRM, EPR o IVM en gallinas**

Tiempo de alimentación (horas)	Mortalidad acumulada (%)									
	Días transcurrido desde la alimentación sobre gallinas tratadas con DRM									
	1	2	3	4	5	6	7	10	14	
24	5	10	13	13	15	20	22	25	25	
72	3	8	13	20	27	30	34	37	37	
120	10	15	15	47	53	53	57	62	62	
168	0	5	12	20	23	23	40	48	48	
240	3	10	12	27	37	40	40	40	40	
336	5	7	7	10	10	13	13	13	13	
504	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tiempo de alimentación (horas)	Mortalidad acumulada (%)									
	Días transcurrido desde la alimentación sobre gallinas tratadas con EPR									
	1	2	3	4	5	6	7	10	14	
24	0	8	8	10	18	25	25	35	35	
72	2	8	13	20	20	22	25	30	30	
120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
168	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
336	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
504	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Tiempo de alimentación (horas)	Mortalidad acumulada (%)									
	Días transcurrido desde la alimentación sobre gallinas tratadas con IVM									
	1	2	3	4	5	6	7	10	14	
24	2	8	10	12	12	20	23	23	23	
72	10	10	12	15	17	20	25	38	38	
120	0	12	17	25	25	30	32	40	48	
168	7	7	10	12	23	25	30	30	30	
240	0	2	2	7	7	10	10	10	10	
336	0	0	2	7	7	8	8	8	8	
504	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Figura 44. A, B, C y D. Porcentajes de mortalidad de ninfas de V estadio de *T. infestans* registrados a distintos tiempos postadministración de DRM (A), EPR (B) o IVM (C)



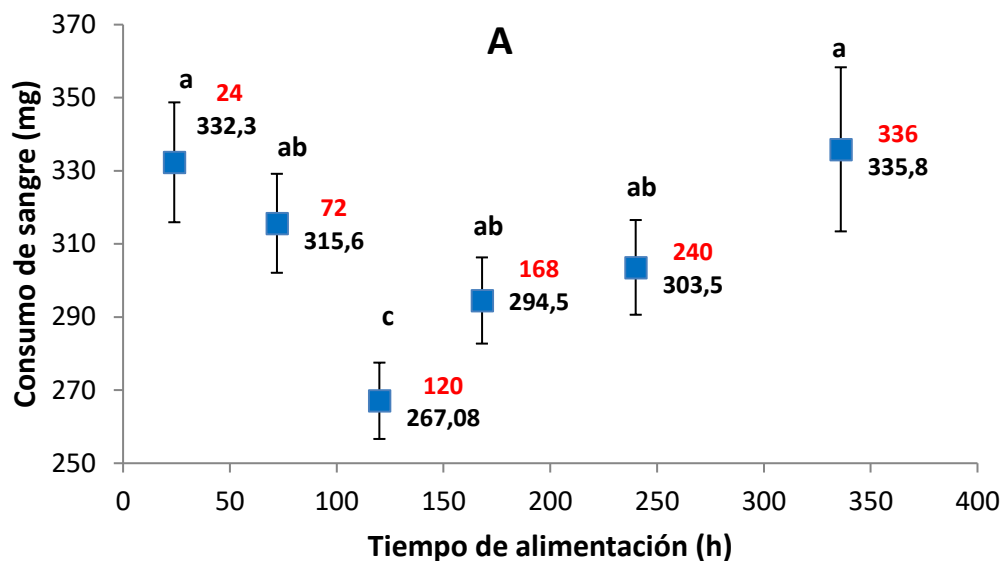
### 3.3.3.3 Consumo de sangre sobre gallinas efectuado por ninfas de V estadio de *T. infestans* muertas postalimentación

Al igual que lo descrito en el ensayo llevado a cabo con perros, el haber identificado individualmente a las vinchucas, permitió conocer la cantidad de alimento incorporado por cada ninfa. Nuevamente, se determinó un comportamiento de alimentación por las ninfas de manera similar al descrito en el ensayo de perros: I) se registró la presencia de insectos que no incorporaron alimento durante los 20 minutos en que permanecieron sobre las gallinas y II) se registró el consumo de sangre en todas las vinchucas que murieron después de alimentarse sobre las gallinas tratadas con IVM, DRM o EPR.

La individualización de las vinchucas permitió realizar la comparación del consumo de sangre realizado por las ninfas que murieron con cada uno de los tratamientos. El promedio del consumo de sangre postalimentación sobre gallinas tratadas con DRM fue de  $299 \pm 66,2$  mg de sangre, mientras que en el caso de EPR e IVM fue de  $305 \pm 41$  y  $325 \pm 53$  mg de sangre, respectivamente. El análisis

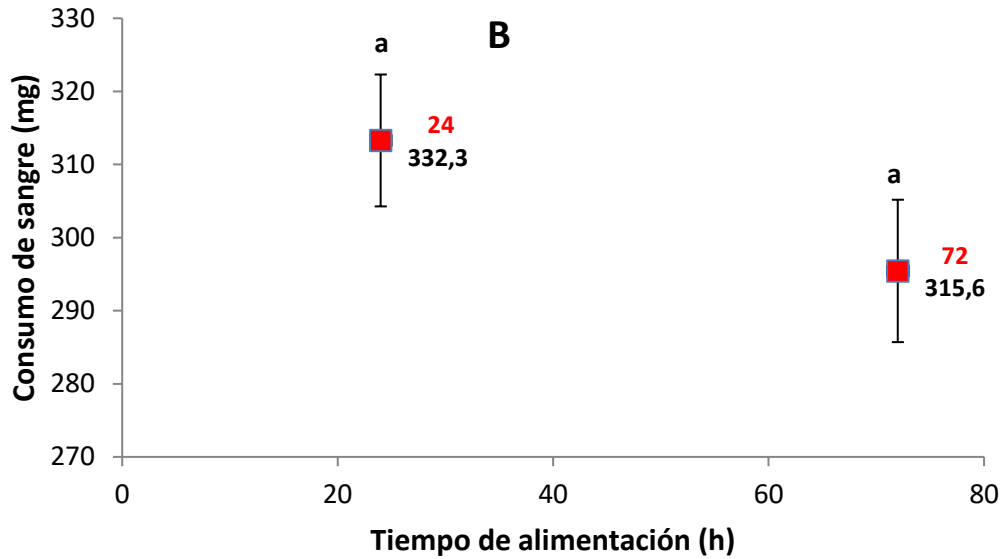
del consumo de sangre a los distintos tiempos postratamiento, arrojó una disminución en la incorporación de alimento entre las vinchucas alimentadas a las 120 h postaplicación del endectocida DRM ( $p= 0,0045$ ) (Figura 45 A). En el caso de las vinchucas que murieron después de alimentarse sobre gallinas tratadas con EPR, no se registraron diferencias significativas entre los dos tiempos en los que la molécula demostró actividad triatómica ( $p > 0,05$ ) (Figura 45 B). En cuanto al consumo de alimento de las ninfas que murieron postalimentación sobre gallinas tratadas con IVM, se constató un menor consumo de sangre cuando fueron alimentadas a las 120 h después de la administración del endectocida ( $p= 0,0077$ ) (Figura 45 C).

**Figura 45. A, B y C Comparación de la cantidad de alimento consumido por ninfas que murieron después de alimentarse a distintos tiempos sobre gallinas tratadas con DRM (A), EPR (B) o IVM (C)**

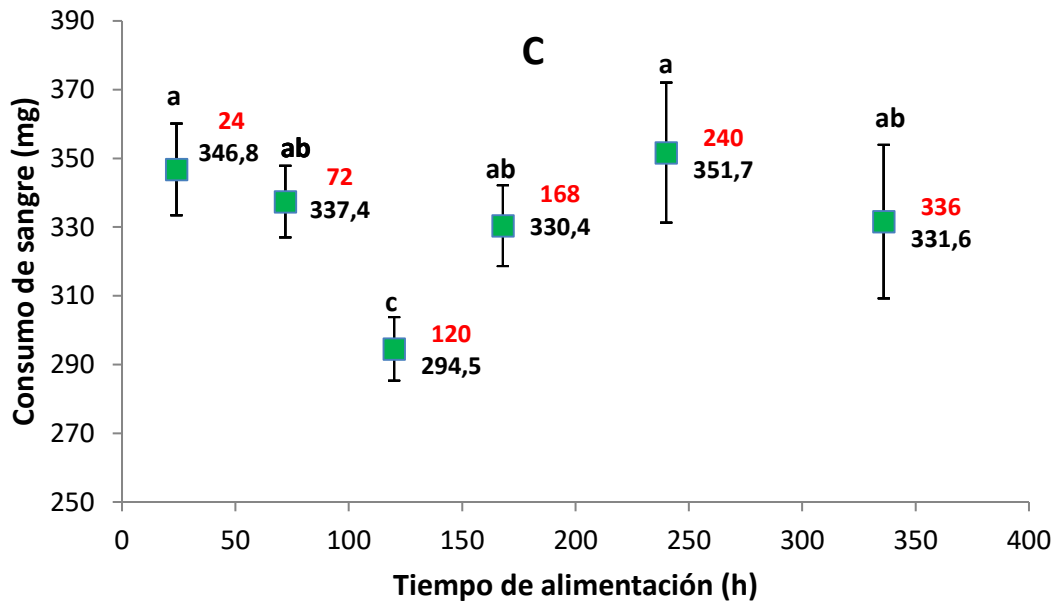


En rojo se especifica el tiempo en que se llevó a cabo la alimentación de las ninfas, mientras que el valor en color negro equivale al promedio de sangre ingerida. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los valores ( $p < 0,05$ )





En rojo se especifica el tiempo en que se llevó a cabo la alimentación de las ninfas, mientras que el valor en color negro equivale al promedio de sangre ingerida. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los valores ( $p < 0,05$ )

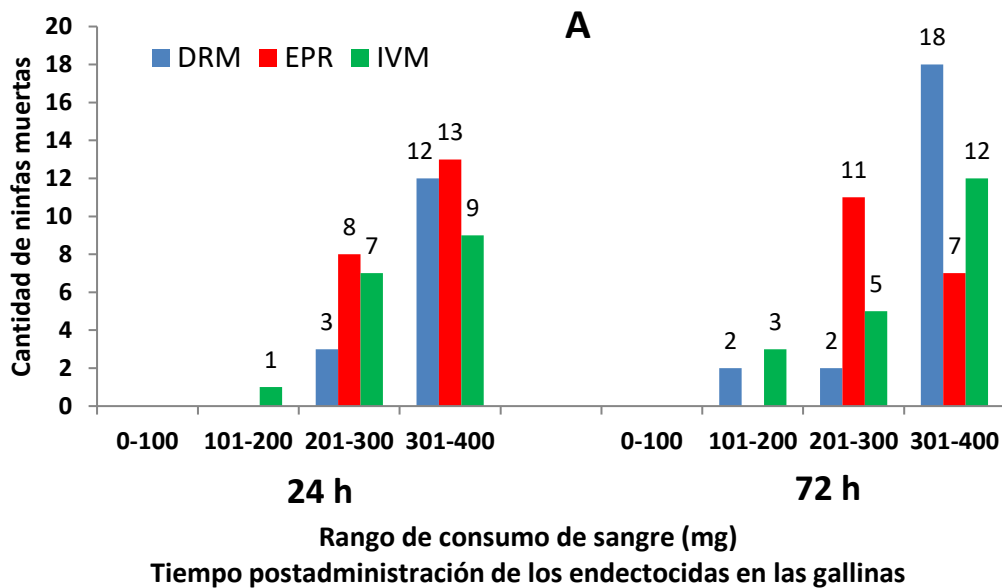


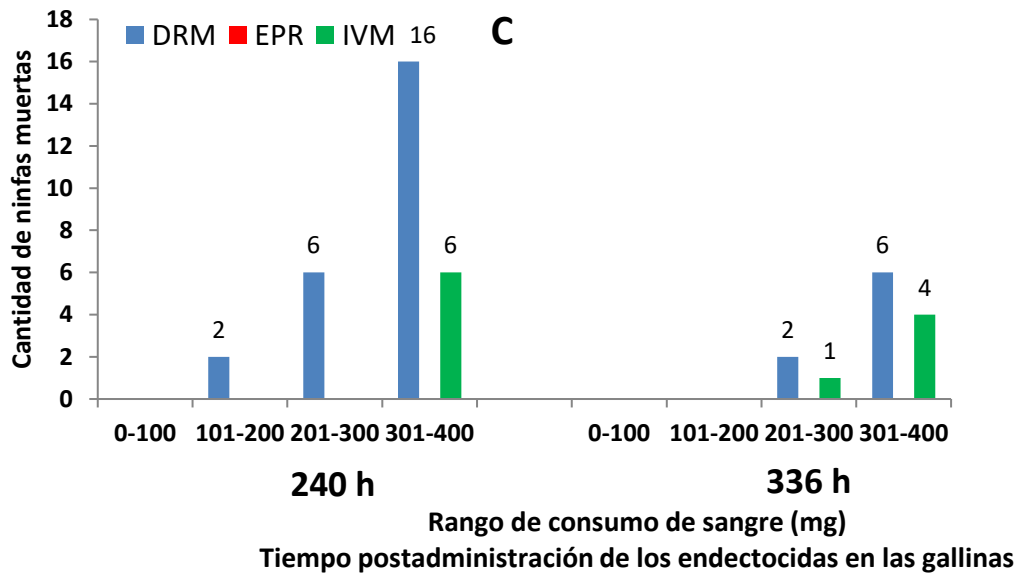
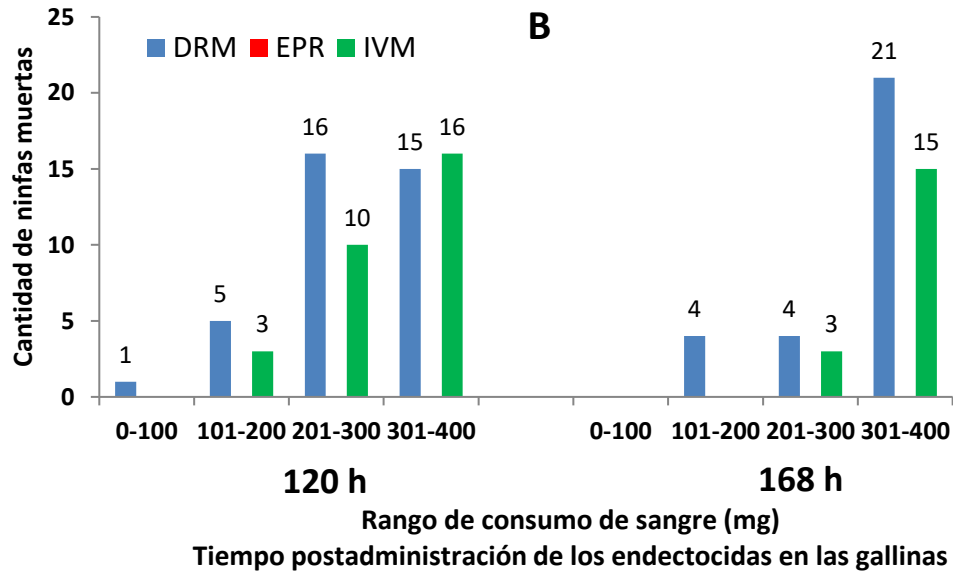
En rojo se especifica el tiempo en que se llevó a cabo la alimentación de las ninfas, mientras que el valor en color negro equivale al promedio de sangre ingerida. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los valores ( $p < 0,05$ )

La discriminación del consumo de alimento por rangos, demostró que la mayor parte de las vinchucas muertas después de alimentarse sobre gallinas

tratadas con alguno de los endectocidas, consumió más de 200 mg de sangre (90, 100 y 97%, para DRM, EPR e IVM, respectivamente). Del 10% de vinchucas muertas que consumieron menos de 200 mg de sangre de gallinas tratadas con DRM, solo un individuo consumió menos de 100 mg de alimento, mientras que el consumo en el resto varió entre 100 y 200 mg de sangre. Observando cada tiempo de alimentación, se determinó que a las 72 y 120 h postadministración, DRM e IVM provocaron la muerte de algunos insectos que consumieron menos de 200 mg de alimento. Mientras que a las 168 y 240 h, solo DRM logró matar a algunos insectos con un consumo menor de 200 mg de sangre. A las 336 h, la totalidad de los insectos que luego de alimentarse murieron por el efecto de IVM o DRM, consumieron alimento por encima de los 200 mg (Figura 46).

**Figura 46. A, B y C. Distribución por categorías del consumo individual de sangre de ninfas de V estadio de *T. infestans* muertas después de alimentarse a distintos tiempos sobre gallinas tratadas con DRM, EPR o IVM**



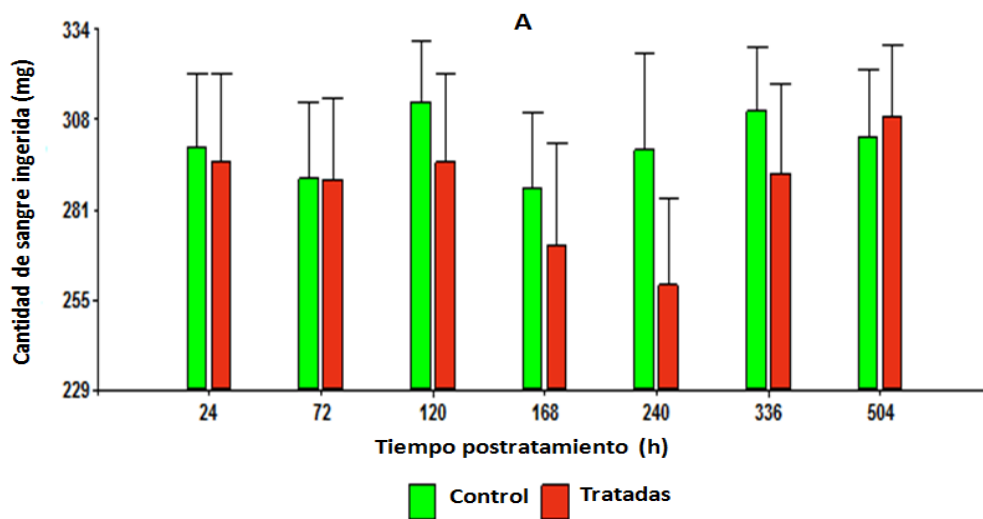


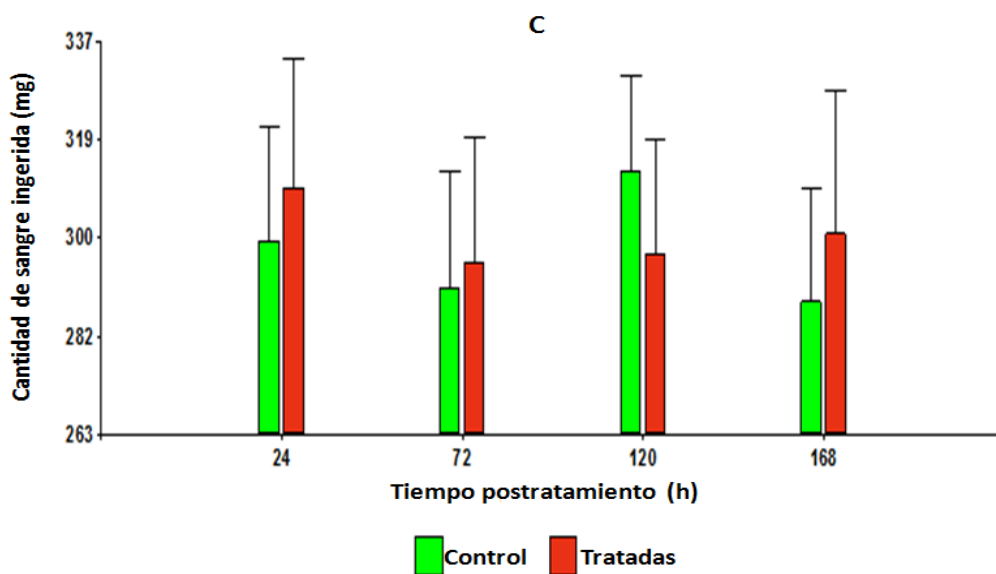
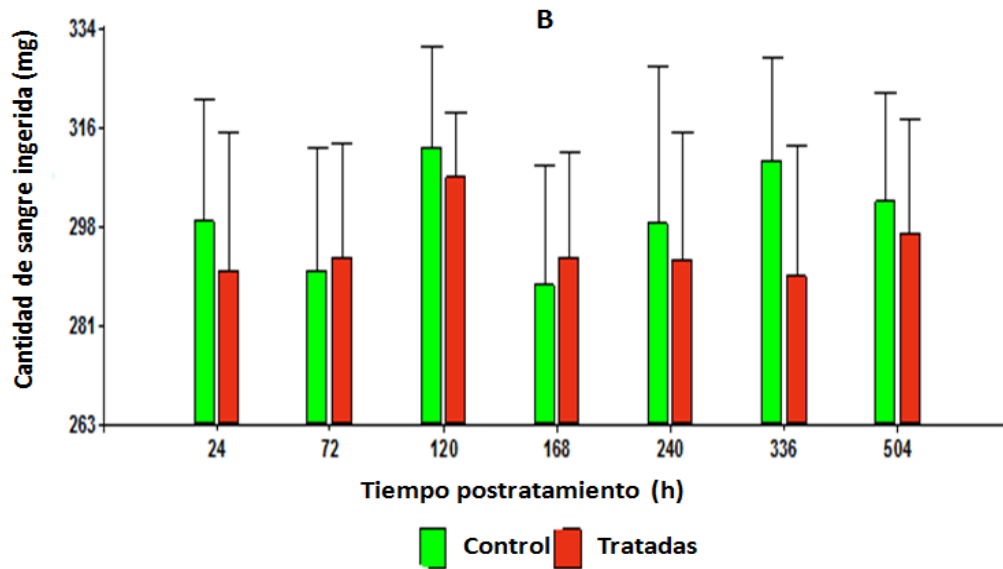
### 3.3.3.4 Influencia de dosis subletales de IVM, DRM o EPR en el consumo de sangre sobre ratas Wistar y en el proceso de ecdisis en ninfas de V estadio de *T. infestans*

En cuanto al consumo de sangre sobre ratas Wistar por las ninfas que recibieron dosis subletales de alguno de los endectocidas, no se encontraron

diferencias significativas en el promedio de ingesta con respecto a los insectos control ( $p > 0,05$ ) (Figura 47 A, B y C). El promedio del consumo de sangre de rata por las ninfas alimentadas sobre las gallinas tratadas con DMSO (control) fue de  $299,5 \pm 9,2$  mg. Mientras que el consumo de sangre de rata para las vinchucas que previamente fueron alimentadas sobre gallinas tratadas con IVM, DRM o EPR fue de  $283,6 \pm 13,5$  mg;  $294,8 \pm 6,1$  y  $300,5 \pm 5,3$  mg, respectivamente.

Figura 47. A, B y C Comparación del consumo de sangre sobre ratas Wistar de ninfas previamente alimentadas sobre gallinas tratadas con IVM (A), DRM (B) o EPR (C) versus el consumo registrado en los insectos control





No se identificó una interferencia en el proceso normal de ecdisis por parte de ninfas de V estadio de *T. infestans* que ingirieron dosis subletales de alguno de los endectocidas estudiados. En la Tabla 43 se observa que el número de adultos es similar, independientemente del tratamiento que recibió la gallina de la que se alimentaron las ninfas de V estadio.

**Tabla 43. Estudio de la presencia o ausencia del proceso normal de ecdisis en ninfas de V estadio que recibieron concentraciones subletales de DRM, IVM o EPR**

Tratamiento	N	V	Ad
DRM	20	2/0	17/1
IVM	20	1/0	18/1
EPR	20	0/2	16/2
Control	20	2/1	16/1

V: cantidad de ninfas de V estadio al finalizar el ensayo

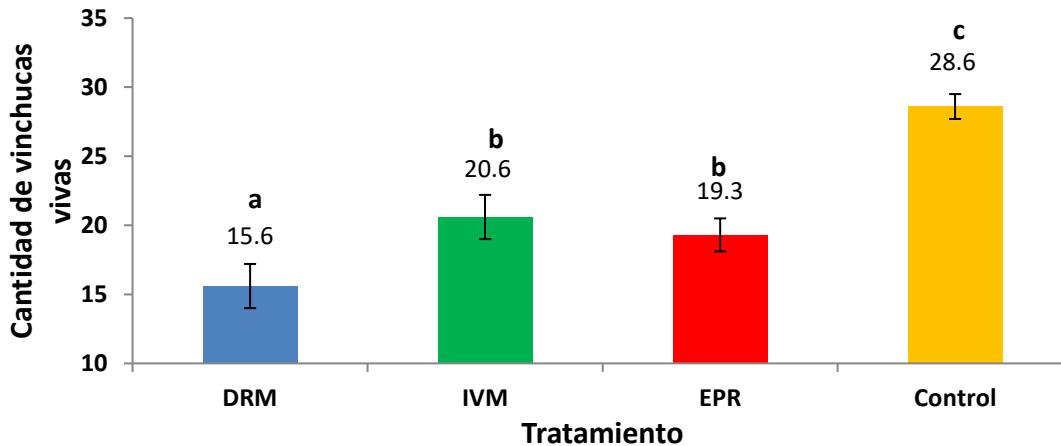
Ad: cantidad de adultos al finalizar el ensayo

x/y: cantidad de individuos vivos del estadio / cantidad de individuos muertos del estadio

### 3.3.3.5 Comparación triatómica de IVM, DRM y EPR en condiciones de semicampo

En la Figura 48 se observa el promedio de vinchucas vivas obtenido al finalizar el ensayo (45 días). Dicho promedio surge de la suma de ejemplares hallados vivos en los tres nidos de cada tratamiento (DRM, IVM, EPR o DMSO). Se constató una diferencia significativa entre el promedio mayor de insectos vivos alimentados sobre gallinas control y el resto de los grupos ( $p < 0,05$ ) así como también entre el promedio menor de vinchucas vivas en los tres nidos en donde fueron alojadas gallinas tratadas con DRM y el resto de los grupos de insectos ( $p < 0,05$ ). No se detectó diferencia significativa en el promedio de insectos vivos alimentados sobre gallinas tratadas con IVM o EPR ( $p > 0,05$ ).

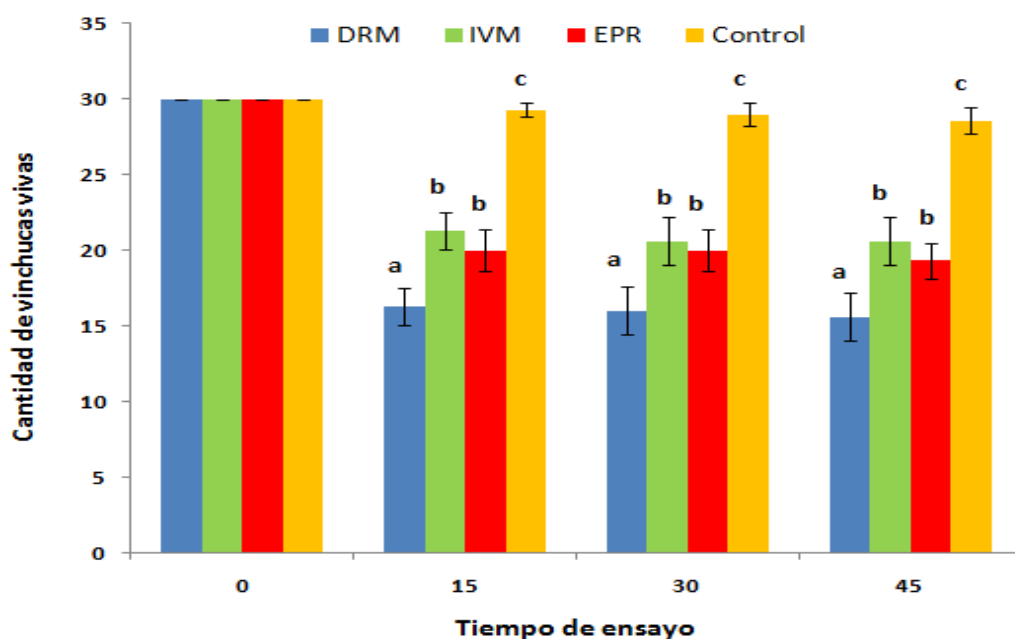
**Figura 48. Comparación del número de vinchucas vivas en las UTs que alojaron gallinas con distintos tratamientos**



Letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ )

En la Figura 49 se observa el número de ejemplares vivos de *T. infestans* en cada tiempo en los que las UTs fueron desarmadas. Salvo entre las vinchucas alimentadas sobre las gallinas tratadas con DMSO, en el resto de las UTs la mayor mortalidad se observó en los primeros 15 días del ensayo. En la Figura 49 se observa que entre los días 15, 30 y 45 no se registraron diferencias significativas en la cantidad de vinchucas vivas en las UTs.

**Figura 49.** Comparación, en diferentes tiempos (días), de la cantidad de vinchucas vivas alimentadas sobre gallinas tratadas con DRM, IVM, EPR o DMSO (control)



Letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ )

Otro de los objetivos planteado, fue conocer si la presencia de DRM, EPR o IVM podría interferir con el proceso normal de muda de las ninfas de V estadio al estado adulto. De manera que se llevó a cabo un análisis de la proporción de vinchucas de V estadio y adultas en cada tiempo. En el primero de los tiempos en los que desarmaron las UTs (15 días), todos los ejemplares que fueron hallados vivos fueron ninfas de V estadio, independientemente del tratamiento que hubiesen recibido las gallinas alojadas en su interior (Figura 50). En los siguientes dos tiempos en los que se desarmaron las UTs (30 y 45 días), se registró la

presencia de adultos y de ninfas de V estadio. Del análisis de regresión, el único tratamiento que resultó significativo fue DRM ( $p=0,0095$ ), con un valor de  $OR=0,48$  (Tabla 44, Figura 50). Por lo tanto, las vinchucas alimentadas de gallinas tratadas con DRM tienen dos veces más posibilidades de retrasar el pasaje de ninfa de V estadio a adulta respecto al grupo control (IC95% 1,02- 3,70).

Figura 50. Comparación del porcentaje de vinchucas adultas al finalizar el ensayo (45 días)

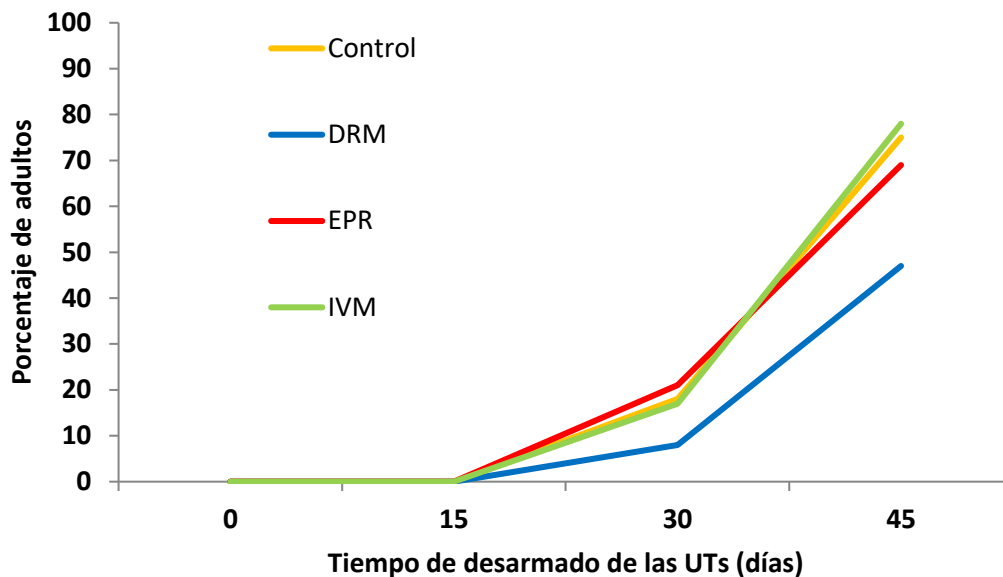


Tabla 44. Determinación de las oportunidades relativas de ninfas de V estadio de mudar al estado adulto

Tratamiento	OR	IC95%	p
DRM	0,48	0,27-0,83	0,0095
EPR	0,96	0,58-1,58	0,87
IVM	0,98	0,60-1,58	0,93

### 3.3.3.6 Curvas del perfil cinético seguido por DRM, IVM y EPR tras ser administradas por vía tópica a gallinas

En la Figura 51 se observan los perfiles comparativos de las curvas concentración plasmática para DRM, IVM y EPR en función del tiempo obtenidos, después de ser administradas en gallinas a razón de  $600 \mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso vivo. En

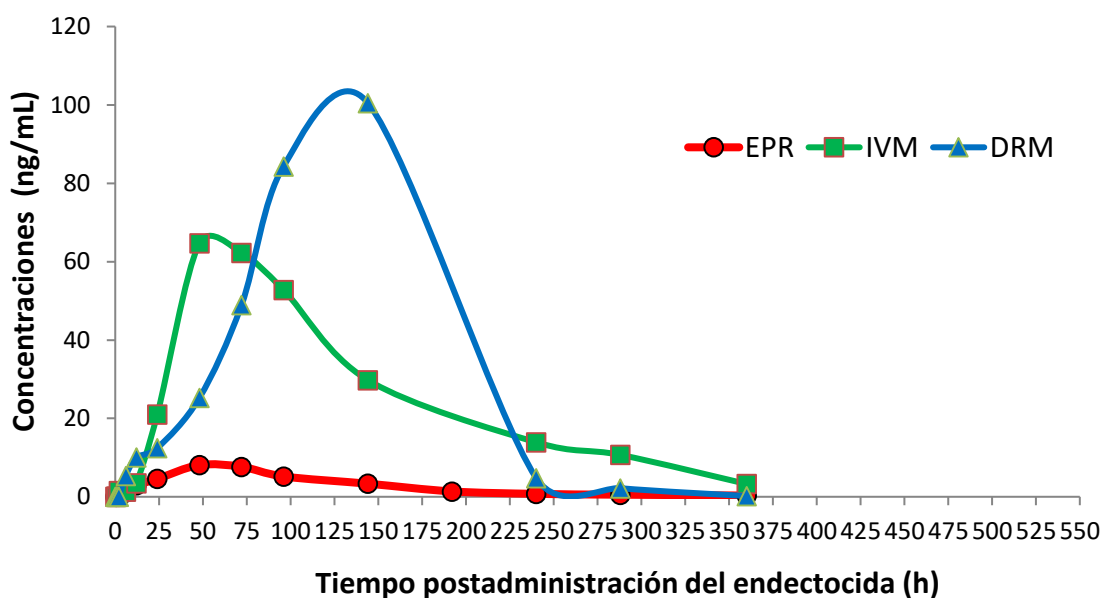


la Tabla 45 se puede observar que los tiempos ( $T_{max}$ ) en los que se alcanzaron las  $C_{max}$  para los endectocidas fueron relativamente cortos, entre 54 y 132 h ( $T_{max}$ ), demostrando un proceso de absorción rápido. De los tres endectocidas, IVM fue la que alcanzó su  $C_{max}$  en un tiempo más breve. En la Figura 51, en el primer tramo de la curva de IVM, se registra un incremento abrupto de las concentraciones plasmáticas, resultado de un evento de absorción muy importante. En cuanto a los valores de  $C_{max}$ , DRM registró el valor más alto, seguido de IVM y muy por debajo se ubicó la  $C_{max}$  de EPR (Tabla 45). La última concentración plasmática de DRM e IVM se detectó a los 15 días después de ser administradas en las gallinas. Mientras que para EPR el tiempo se extendió hasta los 21 días postadministración. Para las tres moléculas se registró una semivida de eliminación prolongada y por lo tanto, una constante de eliminación con valores bajos (Tabla 45). Este comportamiento es muy común en las moléculas de naturaleza altamente liposolubles. Tanto en la Tabla 45 como en la Figura 51 se puede observar la diferencia entre el área bajo la curva (AUC) de los endectocidas. En este caso, DRM fue la molécula que mostró un valor mayor con respecto a los otros compuestos, siendo notable la baja disponibilidad plasmática observada para EPR. El volumen de distribución de las moléculas estudiadas fue elevado, indicando una amplia llegada a los tejidos periféricos (Tabla 45).

**Tabla 45. Parámetros farmacocinéticos obtenidos por metodología no compartimental para DRM, IVM y EPR tras su administración tópica en gallinas**

Parámetro	Unidad	DRM	IVM	EPR
$C_{max}$	ng/mL	100,9 ± 47,7	72,1 ± 9,6	8,1 ± 2,7
$T_{max}$	h	132 ± 24	54,1 ± 10,3	69,3 ± 7,3
$\lambda$	$h^{-1}$	0,029 ± 0,003	0,022 ± 0,002	0,019 ± 0,005
$T_{1/2\lambda}$	h	23,6 ± 3,1	31,8 ± 2,17	35,5 ± 6,5
$AUC_{0-t}$	ng.h/mL	11912,1 ± 5278,1	8187,6 ± 2253,8	1984,5 ± 766,5
$AUC_{0-\infty}$	ng.h/mL	12005,2 ± 5342,1	8233,5 ± 2311,1	2055,2 ± 801,2
$Vd/F$	mL/Kg	2113,6 ± 1200,1	3766,5 ± 1654,2	10757,4 ± 3332,2
$Cl/F$	mL.h/kg	65,1 ± 25,1	81,1 ± 30,1	210 ± 75,4

Figura 51. Curvas concentración plasmática promedio  $\pm$  DE en función del tiempo de DRM, IVM y EPR en las gallinas

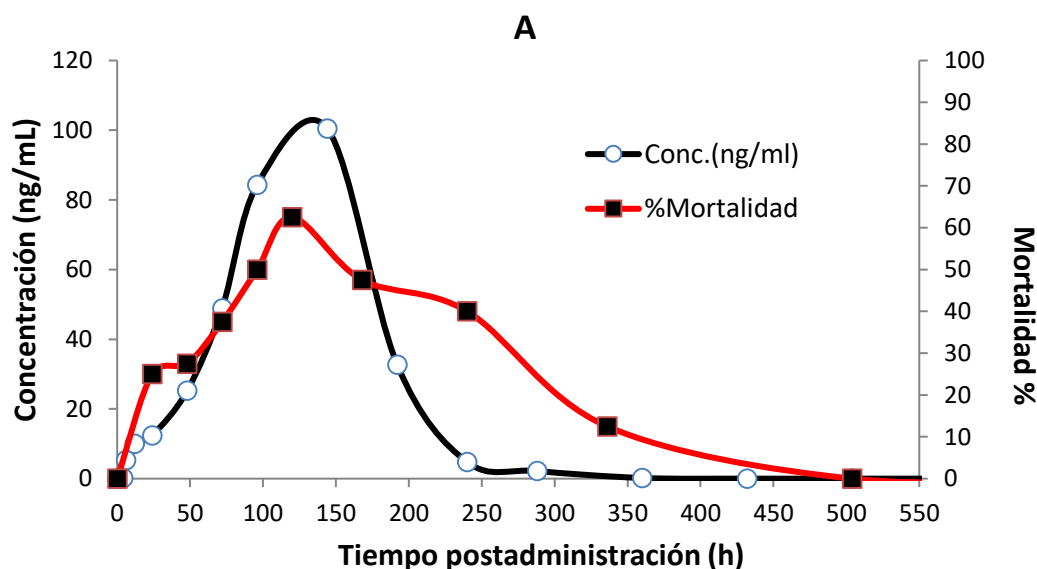


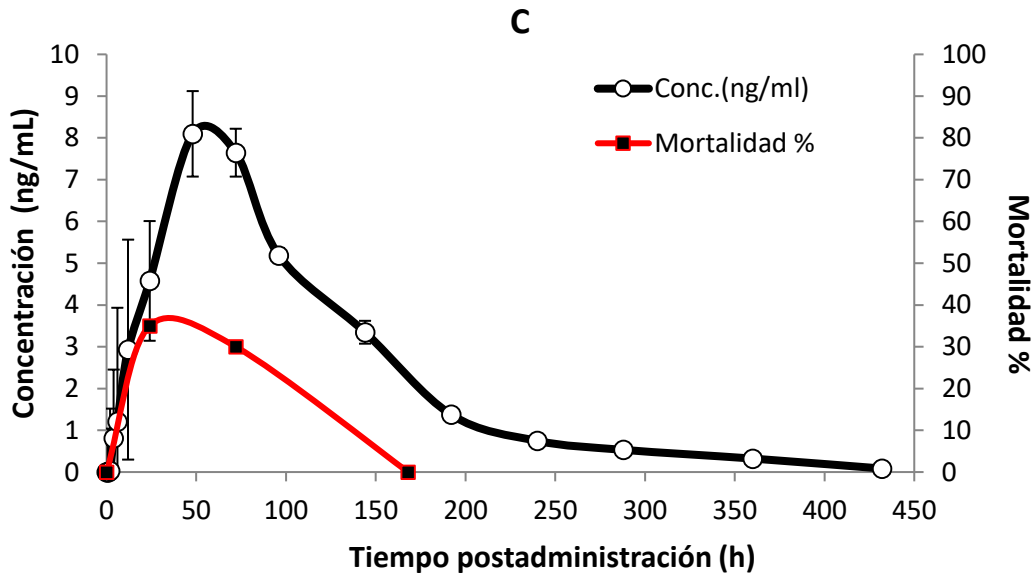
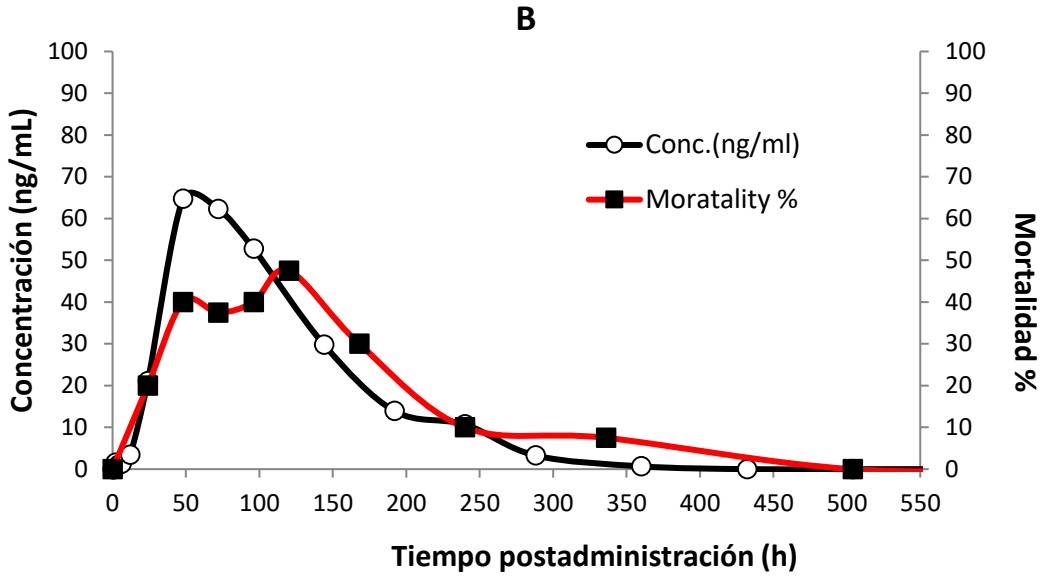
**3.3.3.7 Integración de la información farmacocinética (PK) generada por la curva concentración plasmática vs tiempo, con la información farmacodinámica (PD) generada a partir de la curva de mortalidad de las ninfas de V estadio**

La comparación de la curva de concentraciones plasmáticas vs tiempo con la curva de mortalidad vs tiempo de los tres endectocidas, demuestra una relación directa entre la concentración plasmática alcanzada en las gallinas y su efecto letal sobre las ninfas de V estadio. En el caso de DRM se aprecia en la Figura 52 una similitud entre el tiempo en que se registró la máxima concentración del endectocida (132 h), y el tiempo en que el endectocida provocó su mayor actividad letal sobre las ninfas (120 h). Después, la concentración plasmática de la molécula comienza a descender, evento que coincide con la disminución de la actividad letal del endectocida (Figura 52 A). La actividad letal de DRM se extendió hasta las 336 h, siendo este tiempo, el último en que se registraron concentraciones mensurables del endectocida en el plasma de las gallinas. Para IVM, el tiempo de

mayor actividad letal se registró en los insectos que se alimentaron a las 120 h postaplicación del insecticida, mientras que la  $C_{max}$  de la molécula se observó a las 54 h. En el perfil plasmático de esta molécula, el rápido incremento de su concentración desencadenó una mayor tasa de mortalidad entre las vinchucas alimentadas durante esos tiempos (Figura 52 B). En el caso de EPR, los dos tiempos en que demostró eficacia triatómica (24 y 72 h) coinciden con el cual las concentraciones plasmáticas aumentaron de manera abrupta, alcanzando su  $C_{max}$  a las 69 h postadministración. A su vez, Figura 52 C, una vez alcanzado el pico máximo, se registró una rápida caída de la concentración plasmática de EPR, que se reflejó en ausencia de la eficacia letal del endectocida sobre las vinchucas alimentadas durante ese tiempo.

Figura 52. Comparación entre las curvas plasmáticas vs tiempo con los porcentajes de mortalidad de ninfas generados por DRM (A), IVM (B) o EPR (C)





### 3.3.4 Discusión

Se demostró una actividad triatómica de IVM, DRM y EPR postadministración a gallinas. El estudio en el tiempo de la actividad letal, permitió determinar su aumento hasta los 5-10 días después del ingreso de los endectocidas a las vinchucas. Este resultado concuerda con lo observado en el

Capítulo 2, en el cual los endectocidas fueron ingeridos por las ninfas desde un alimentador artificial, y también coincide con lo descrito en la sección anterior, en la que las tres moléculas fueron administradas a ratas Wistar. La discusión de este resultado se enriquece notablemente debido al hecho de haber podido determinar el perfil cinético de los tres endectocidas administrados a las gallinas. Al observar estos perfiles cinéticos de las curvas obtenidas con las concentraciones plasmáticas en función del tiempo, se puede establecer una relación positiva entre la concentración plasmática alcanzada por los endectocidas y su efecto letal sobre las vinchucas. Siendo coincidente el tiempo de mayor presencia de las moléculas en plasma con el de mayor eficacia letal sobre ninfas de V estadio. También, como ya se mencionó, se constató que la mayor respuesta letal en cada uno de los tiempos en los que se registró mortalidad de ninfas, se verificó entre los 5 y 10 días postingestión los endectocidas. Esto significa que la magnitud de la respuesta letal en las ninfas es dependiente de la concentración plasmática de moléculas en las gallinas. Pero, la velocidad con que se desencadena dicha respuesta letal es independiente de la concentración alcanzada en el plasma. Una posible explicación para el primero de estos hechos, está asociada con otro resultado descrito en esta sección, está relacionado con el menor promedio de consumo de sangre por las ninfas muertas después de alimentarse en el tiempo en que IVM y DRM alcanzaron sus concentraciones máximas en el plasma de las gallinas. Este menor promedio de consumo de sangre se debe a la presencia de insectos que murieron a causa de consumos de sangre que en otros tiempos de alimentación no provocaron efectos letales. Por ejemplo, en el caso de DRM, a las 24 y 336 h después de ser administrada la molécula en las gallinas, el 100% de las vinchucas muertas consumió más de 200 mg de sangre, mientras que a las 120 h el 16% de las ninfas muertas consumieron menos de 200 mg de alimento. A las 24 y 336 h se registraron concentraciones bajas del endectocida en el plasma de las gallinas, mientras que a las 120 h la concentración de las moléculas fue alta y estuvo cercana a la  $C_{max}$  registrada a las 144 h postadministración de DRM en las gallinas. Por lo tanto, se podría afirmar que cuando las concentraciones de DRM fueron altas en el plasma de las gallinas, murieron insectos, que incluso, no

lograron alimentarse a repleción. Y este dato tiene importancia, los individuos de *T. infestans* pueden realizar varias ingestas parciales de alimento antes de lograr satisfacer las exigencias fisiológicas del proceso de muda (Melcon, 2004). Por lo tanto, si se hubiesen alimentado sobre gallinas tratadas con DRM, solo tendrían posibilidades de ser eliminados los insectos con ingestas parciales alimentados alrededor de las 144 h postadministración del endectocida. Esto significa, que uno de los objetivos para mejorar la eficacia de estas moléculas, sería el logro de mayores concentraciones plasmáticas durante un periodo de tiempo más prolongado.

En cuanto a lo que ocurre una vez ingresadas las moléculas en el interior de las vinchucas, solo se podrán hacer especulaciones al respecto. Esto se debe, principalmente, a que no se pudo realizar el estudio cinético de las moléculas en el insecto. Sin embargo, algunos datos pueden ayudar y direccionar la calidad de estas especulaciones. Debido a la determinación de las cantidades de sangre consumidas por cada insecto y al estudio cinético de los endectocidas en las gallinas, podemos conocer, aproximadamente lo que ingirieron las ninfas a cada tiempo en que fueron alimentadas. Así, por ejemplo, una ninfa alimentada a las 24 h de haber sido administrada DRM en las gallinas, consumió aproximadamente 12 ng del endectocida por cada mL de sangre, en cambio un insecto alimentado a las 72 h postratamiento ingirió 50 ng/mL, es decir, cuatro veces más que la ninfa anterior. Si suponemos que ambos consumieron el mismo volumen de alimento, la vinchuca alimentada a las 72 h, incorporó cuatro veces más moléculas que el insecto alimentado a las 24 h. Cuando se analiza la velocidad con que se alcanzaron los valores máximos de mortalidad en cada tiempo, se constata que en ambos casos fue entre los 7 y 10 días después de haber sido ingeridos los endectocidas por las ninfas. Si se tiene en cuenta que la mortalidad ocasionada por DRM en las vinchucas se produce cuando el endectocida alcanza una concentración determinada en su diana farmacológica, cabe preguntarse por que motivo les demanda el mismo tiempo en morir, a una ninfa que incorporo 12 ng del endectocida por cada mL de sangre, que la que incorporó cuatro veces más de moléculas en el mismo volumen de alimento. Una posible respuesta estaría

vinculada con los procesos de absorción, distribución y metabolismo de la molécula en el interior del insecto. Siguiendo con el ejemplo, DRM es incorporada a la vinchuca por la vía oral, por lo tanto sufrirá un proceso de absorción desde el sistema digestivo hasta la hemolinfa del insecto. Una vez en la hemolinfa, el insecticida será distribuido al resto de los tejidos (Busvine, 1971). Los distintos procesos de absorción y distribución desde el ingreso de la molécula hasta su arribo al sitio diana pueden ser procesos regidos por una cinética de orden I, 0 o ambas (cinética mixta). En el caso de la cinética de primer orden, la velocidad de absorción es directamente proporcional a la concentración del fármaco, mientras que en la cinética de orden 0, o de saturación, la velocidad es constante e independiente de la concentración del fármaco en el animal. Se podría suponer, que algunos de los procesos de absorción y distribución de los tres endectocidas en el interior de las vinchucas, es de naturaleza saturable, y que por lo tanto, el tiempo en que se alcance la concentración letal en el sitio diana, sea independiente de la cantidad de moléculas ingerida por el insecto. Otra posible explicación involucraría al proceso de metabolización que podrían sufrir los endectocidas estudiados en el interior de las ninfas de *T. infestans*. En este caso la letalidad observada en las ninfas, sería por el efecto producido por un metabolito, es decir, un producto de la biotransformación de los insecticidas. Por ejemplo, después de la aplicación de IVM en buey, oveja y rata los principales metabolitos hallados en plasma fueron el 24-hidroximetil H<sub>2</sub>B<sub>1a</sub> y el 24-hidroximetil H<sub>2</sub>B<sub>1b</sub> (Diaz Carrasco y col., 2000). La formación en vinchucas de estos metabolitos o similares, podría explicar el efecto letal tardío observado con los tres endectocidas

En cuanto a la duración de la eficacia, tanto DRM como EPR mostraron letalidad hasta los 14 días después de ser administradas en las aves. En el caso de EPR esa actividad letal solo se mantuvo por 72 h. Estos tiempos de actividad letal, relativamente cortos, de los endectocidas ensayados, concuerdan con los datos de Amelotti (2009a) quien estudió la actividad de cipermetrina administrada en gallinas sobre ninfas de III estadio de *T. infestans*. Se describió un tiempo de actividad letal del piretroide que duró hasta los 7 días postaplicación. En el ensayo

con gallinas de esta Tesis se siguió la misma metodología que Amelotti. Las moléculas fueron administradas en la base del cuello de la gallina, y la alimentación de las ninfas se llevó a cabo en la zona ventral del ave. En un trabajo posterior, los mismos autores demostraron que haciendo coincidir el lugar de administración del piretroide con el lugar del ave en el que se llevó a cabo la alimentación, la actividad letal de la molécula se extendió hasta los 45 días (Amelotti, 2013). Un objetivo a desarrollar en un futuro ensayo, sería el de constatar si con DRM, EPR e IVM, sucede algo similar a los descrito en cipermetrina.

En esta sección, también se estudió el efecto de los tres endectocidas aplicados en gallinas sobre ninfas de V estadio en condiciones de semicampo. El haber realizado el ensayo de xenointoxicación en condiciones de laboratorio y de semicampo permitió comparar sus resultados. Al igual que lo ocurrido en condiciones de laboratorio, los tres endectocidas demostraron actividad triatómica sobre las vinchucas. Fue DRM, la molécula que exhibió una mayor letalidad sobre las ninfas de *T. infestans*. La mortalidad ocasionada por los insecticidas se observó durante los primeros 15 días, tiempo en el que se desmantelaron por primera vez las UTs para realizar el censo de los insectos. Esto coincide con lo observado en condiciones de laboratorio, en donde la mortalidad originada por la presencia de DRM e IVM se extendió hasta los 14 días y la de EPR hasta 72 h postadministración. En los siguientes tiempos en los que se desarmaron las UTs, el promedio de insectos fue estadísticamente similar al hallado a los 15 días. Estos resultados, similares en ambas condiciones (laboratorio y semicampo), están acorde con las curvas plasmáticas de los insecticidas halladas en las gallinas, en las cuales se constató una concentración máxima de las moléculas en los primeros 14 días de haber sido administradas. Un resultado dispar entre ambos ensayos, fue lo ocurrido con la capacidad de producir el proceso de ecdisis de las ninfas de V estadio alimentadas a partir de gallinas tratadas con DRM. Bajo condiciones de laboratorio, ninguno de los tres endectocidas, a concentraciones subletales, ocasionó efectos sobre el proceso normal de las ninfas. En cambio, bajo condiciones de semicampo, al finalizar el



ensayo, se observó una proporción menor de adultos en los nidos que alojaron gallinas tratadas con DRM, indicando una posible actividad del endectocida en el proceso de muda. Este resultado es coincidente con lo observado con IVM en ninfas de III y IV estadio de *Cimex lectularius* (chinchas de cama), en las que se registró un efecto inhibitorio de la muda por el endectocida (Sheele y col., 2013). También, se observó un efecto similar de IVM sobre ninfas de III estadio de *Rhodnius prolixus* alimentadas sobre ratones tratados con 0,2 mg/kg del endectocida (Azambuja P., 1985).

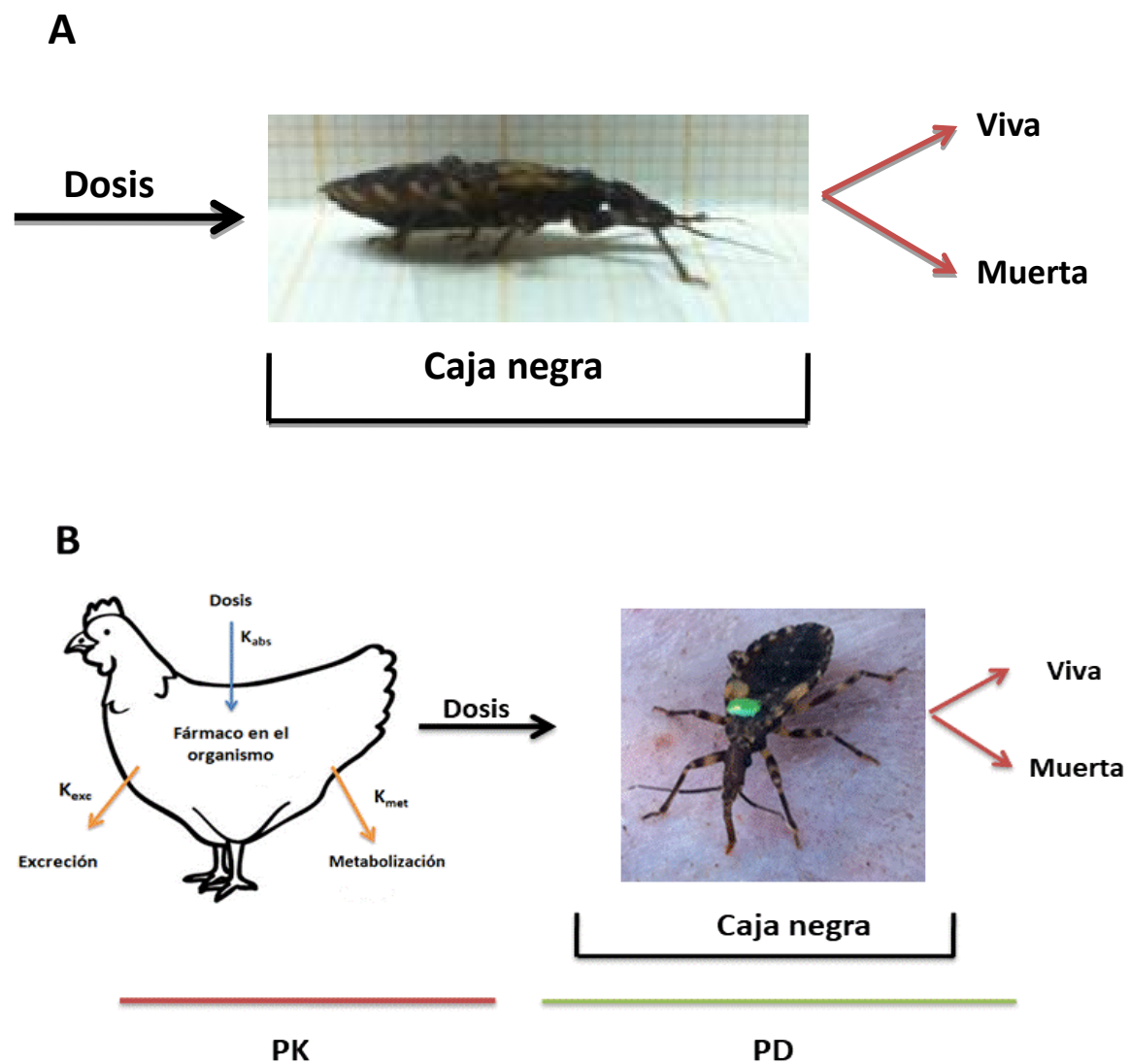
El estudio farmacocinético de una determinada molécula administrada en un animal, permite estimar la velocidad a la que se producen los fenómenos de absorción, distribución y eliminación (Toutain y Lees, 2004). En nuestro caso el hecho de haber topicado las moléculas determinó un proceso de absorción desde el sitio de administración hacia la circulación sistémica. Se debe tener en cuenta que una parte de la dosis administrada se puede degradar o simplemente no ser absorbida (Toutain y Lees, 2004). En las curvas concentración plasmática vs tiempo de los tres endectocidas disueltos en DMSO, se observa que la administración por vía tópica determinó un proceso de absorción rápido. En el caso de IVM y EPR alcanzaron su concentración máxima entre las 48 y 72 h. Este dato coincide con el  $T_{max}$  de 3 y 0,8 días, para IVM y EPR respectivamente, observado después de la administración por vía tópica de una dosis de 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  en cabras (Scott y col., 1990; Dupuy y Chartier, 2001). En el caso de DRM, fue de las tres moléculas, la que más tardo en alcanzar su  $T_{max}$  (132 h -5,5 d), siendo algo más prolongado que el  $T_{max}$  de 4,3 días observado en vacas a las que se les administró por vía tópica una dosis de 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de DRM (Gayrard y col., 1997). Un parámetro cinético importante es AUC, el área bajo la curva obtenida a partir de la curva concentración plasmática vs tiempo, está determinada por el CL (aclaramiento) de la molécula, la dosis que fue administrada y la biodisponibilidad alcanzada por molécula según la vía de administración. Bajo nuestras condiciones experimentales, DRM fue la que logró el mayor AUC, seguido de IVM y EPR. Este resultado concuerda con lo observado por Toutain y col., (1997), quienes administraron ambos endectocidas en vacas a razón de 200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  por vía

subcutánea, y encontraron una diferencia en el AUC de 510 vs 360  $\mu\text{g día/Lt}$ , para DRM e IVM, respectivamente. Como ya se explicó en la sección resultados, en el proceso de eliminación de un fármaco hay dos eventos distintos: la metabolización y la excreción. La sumatoria de estos fenómenos determinan una constante de eliminación ( $K_{el}$ ) global de la molécula. La constante de eliminación es directamente proporcional al aclaramiento de la molécula e inversamente proporcional a su volumen de distribución. Los valores del  $V_d$  para los tres endectocidas fueron de 2,1; 3,7 y 10,7 L/Kg para DRM, IVM y EPR, respectivamente. Estos valores elevados, son el resultado de las características liposolubles que caracterizan a los endectocidas. En vacas a las que se les aplicó una dosis de 200  $\mu\text{g/Kg}$  por vía intravenosa, se corroboró un  $V_d$  de 1,7 y 2,4 L/Kg para DRM e IVM, respectivamente (Goudie y col., 1993). En cuanto al CL, los valores correspondientes a DRM e IVM detectados en gallinas en esta sección fueron altos, si se los compara por ejemplo, con lo observado en vacas (Goudie y col., 1993), determinando una semivida de eliminación más corta en las gallinas que en las vacas.

La oportunidad de determinar las concentraciones plásmaticas en función del tiempo de los tres endectocidas, es para esta sección de la Tesis una ventaja que con los otros dos modelos (ratas y perros) no fue posible conseguir. La integración farmacocinética/farmacodinámica de una molécula permite conocer la concentración necesaria para ocasionar un determinado efecto en un organismo y de esta manera, instaurar el régimen de dosificación eficaz en el tiempo que sea necesario mantener dicho efecto (Lees, 2004). Cuando en la sección de resultados se compararon las concentraciones plasmáticas en función del tiempo con los porcentajes de mortalidad entre las ninfas, se corroboró una relación directa entre la concentración plasmática y la mortalidad generada por la molécula. Por lo tanto, en nuestro modelo, la variable explicativa es la concentración plasmática en las gallinas, que a su vez, determina una respuesta cuantitativa (vinchuca viva o muerta). La farmacocinética, en este modelo, está representada por la concentración que alcanzaron los tres endectocidas en el plasma de las gallinas en distintos tiempos, y es el resultado de los distintos fenómenos de

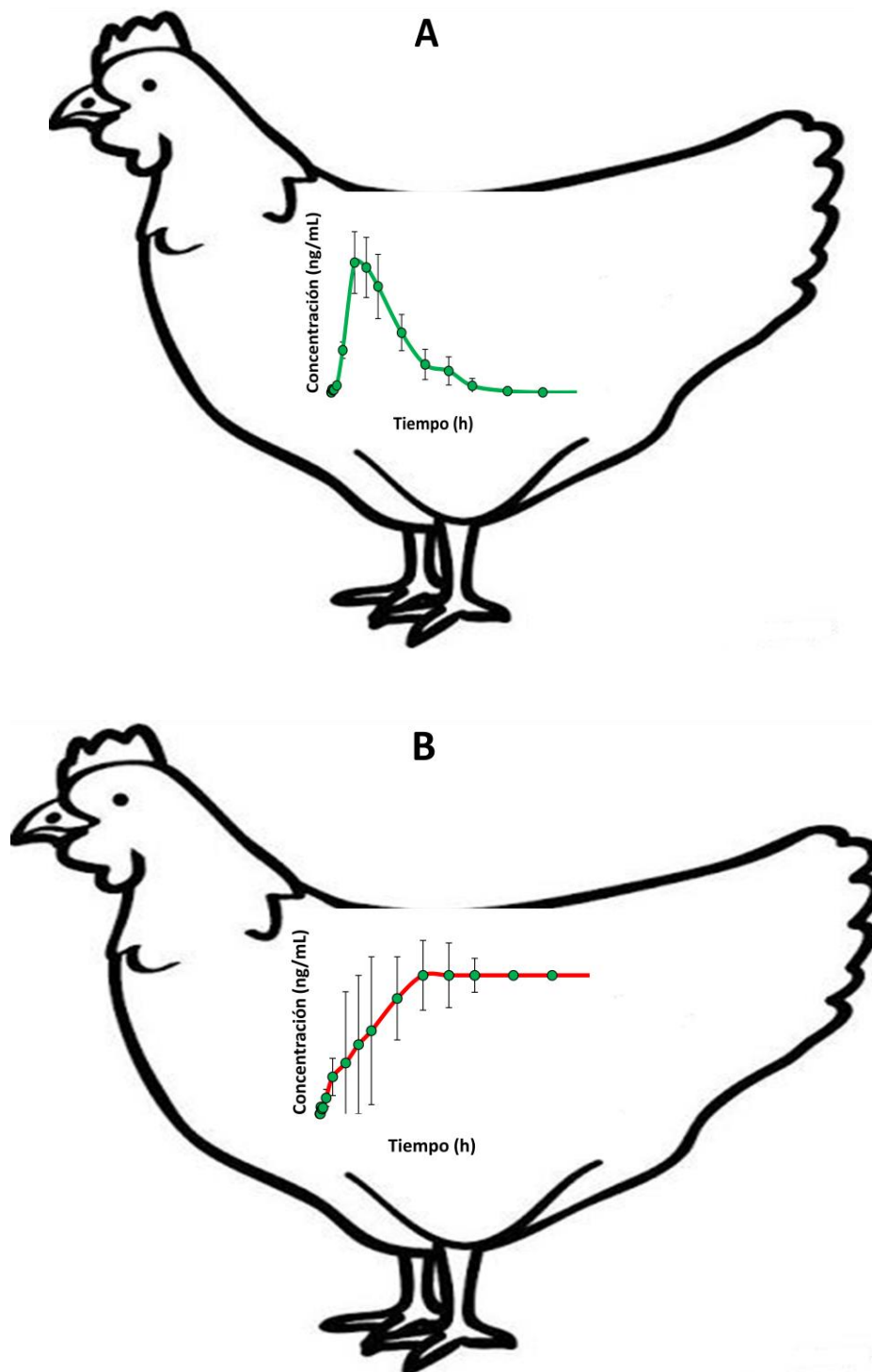
absorción, distribución y eliminación de cada endectocida en las aves. Mientras que la farmacodinamia, en nuestro modelo, es el efecto letal observado en las vinchucas. Si se compara el ensayo realizado en el Capítulo 2, en el que las moléculas fueron topicadas directamente sobre la cutícula de las vinchucas y se estableció una relación entre la dosis y el efecto, con el ensayo de xenointoxicación llevado a cabo en esta sección, que hay diferencias substanciales (Figura 53 A y B)

Figura 53. Comparación entre la relación dosis-efecto (A) y el modelado PK/PD (B) (Basado en el diagrama presentado en el trabajo de Toutain y Lees (2004))



En la relación dosis-respuesta lo que ocurre con las moléculas en el interior del organismo es una incógnita, solo se define una respuesta que es dosis específica. Si bien, en el modelado realizado en esta sección, es una incógnita lo que sucedió con los endectocidas en el interior de las vinchucas (caja negra), la determinación de las curvas de concentración plasmática en función del tiempo en las gallinas (PK), permitió corroborar una relación positiva entre esta concentración y el efecto letal de las moléculas en las ninfas (PD). A su vez, por el marcado individual llevado a cabo en las ninfas, se determinó en cada tiempo de alimentación los rangos de dosis necesarios para ocasionar la muerte de los insectos. La suma de estos datos, se transforma en la herramienta necesaria para conseguir una mayor eficacia triatocida de los tres endectocidas. El objetivo a lograr sería modificar el perfil cinético de las moléculas en las gallinas. Por ejemplo, se podría realizar un incremento en la dosis administrada en las gallinas, y de esta manera, la obtención de mayores concentraciones plasmáticas ( $C_{max}$ ), lo que estaría directamente relacionado con un aumento de la eficacia triatocida. Otra alternativa sería la utilización de productos comerciales que contengan formulaciones más concentradas de los insecticidas (por ejemplo, IVM al 3,15% p/v) lo que determinaría semividas de eliminación más largas y así, se podría extender el tiempo de eficacia de las moléculas sobre las vinchucas. También, se podrían realizar variantes del vehículo utilizado para administrar las moléculas, en esta sección, los tres endectocidas fueron disueltos en DMSO, que es un vehículo con la capacidad de atravesar con facilidad la piel sin ocasionar daño (Gaspara, 2012). Una alternativa, aprovechando la naturaleza lipofílica de los endectocidas, sería la de utilizar vehículos oleosos y de esta manera disminuir la velocidad con que se produce el proceso de absorción sin afectar su magnitud. La implementación de una o varias de estas alternativas determinaría un nuevo perfil en las gallinas que se correlacione con una mayor eficacia triatocida (Figura 54 A y B)

Figura 54. A) Perfil cinético obtenido en esta Tesis tras administrar 600  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de IVM formulada al 0,5% en DMSO. B) Perfilcinético ideal



### **3.3.5 Conclusiones de esta sección**

En esta sección se estudió la actividad triatómica de IVM, DRM y EPR administradas en gallinas. Se pudo comparar esta actividad bajo condiciones de laboratorio y de semicampo, determinándose para ambos casos, una actividad letal breve. La posibilidad de extraer sangre de las aves a distintos tiempos postadministración de los endectocidas permitió conocer el comportamiento cinético de estas moléculas y relacionarlo con la mortalidad en las vinchucas. La relación positiva entre las concentraciones plasmáticas de los endectocidas y su actividad letal sobre las ninfas, podría ser el comienzo de una serie de investigaciones que tengan como principal objetivo, modificar el perfil cinético de estas moléculas en las gallinas y establecer un régimen de dosificación adecuado y racional que logre mantener la intensidad de la eficacia triatómica por períodos más prolongados.

## Capítulo 4

## Estudio del mecanismo de tolerancia al imidacloprid de ninfas de I y V estadio de *Triatoma infestans*

### 4.1 Introducción

El objetivo de esta sección de la Tesis fue ampliar el resultado obtenido en la sección de resultados 2.3.1 del Capítulo 2, en el que se identificó un fenómeno de tolerancia al imidacloprid de ninfas de *T. infestans* resistentes a piretroides provenientes de la colonia de Salvador Mazza (Salta). Se denomina resistencia cruzada al proceso por el cual insectos seleccionados por un insecticida son resistentes/tolerantes a otra/s moléculas utilizadas para su control. La resistencia a dos o más insecticidas de una población de insectos puede deberse a un mismo mecanismo (por ejemplo, grosor de la cutícula) o ser el producto de mecanismos diferentes. La resistencia cruzada es más factible entre moléculas de una misma clase de insecticidas. Esto se observa principalmente si el mecanismo de resistencia es producto de una alteración del sitio diana con el que el insecticida interactúa. La resistencia cruzada entre moléculas de distinta naturaleza química debido al cambio de la conformación del sitio diana solo se observa si ambos tipos de moléculas comparten el mismo sitio de acción, por ejemplo *Aedes aegypti* demostró ser resistente a piretroides y DDT (organoclorado) por la mutación comunicada en el canal de sodio dependiente de carga (Bregues y col., 2003). Cuando los insecticidas no comparten el mismo sitio de acción el fenómeno de resistencia cruzada suele estar asociado a eventos de detoxificación exacerbados y/o una penetración reducida del insecticida a través de la cutícula del insecto (Bregues y col., 2003).

En *Triatoma infestans* se describieron fenómenos de resistencia cruzada a una misma familia de moléculas insecticidas como los piretroides (deltametrina, beta-cipermetrina, beta-ciflutrina y lambda-cialotrina) (Picollo y col., 2005). Y



también fueron descriptos fenómenos de resistencia/tolerancia cruzada entre insecticidas de diferente naturaleza química (Mougabure-Cueto y Picollo, 2015).

La determinación de los procesos que determinan la resistencia/tolerancia es fundamental para establecer las pautas necesarias para su control. Debido a que la detoxificación de insecticidas a través de las enzimas Citocromo P450 y esterasas es el mecanismo más frecuente de resistencia en insectos (Li y col., 2007), uno de los objetivos de este Capítulo fue estudiar la influencia de dos sinergistas de insecticidas en la actividad letal del imidacloprid sobre ninfas de I y V estadio resistentes a piretroides de la colonia originaria de la provincia de Salta. Los sinergistas utilizados fueron el butóxido de piperonilo (PBO) y el trifenil fosfato (TPP). El primero, que ya fuera mencionado en el Capítulo 3 por formar parte junto al imidacloprid y la permetrina de un formulado evaluado en perros contra ninfas de V estadio de *T. infestans*, es un inhibidor de las monooxigenasas Citocromo P450, mientras que el TPP es un inhibidor de las esterasas presentes en insectos. La actividad de las monooxigenasas y las esterasas en los proceso de detoxificación de insecticidas en triatominos ya fue estudiada (Hemingway y Ranson 2000; Picollo 2005; Santo Orihuela, 2008, 2013; Roca-Acevedo, 2011, 2015)

Cuando fueron determinadas en el Capítulo 2 las DL<sub>50</sub> de imidacloprid para cada una de las distintas categorías de ninfas, se constató la presencia de insectos con signos de intoxicación que después de 4-5 días de haber incorporado el insecticida comenzaron a demostrar características de recuperación del estado de intoxicación. Esto significa, que no todos los insectos intoxicados por el insecticida murieron al finalizar el ensayo. Por lo tanto, el otro objetivo de este Capítulo fue estudiar si la capacidad de recuperación de vinchucas en contacto con dosis subletales de imidacloprid es significativamente diferente entre las ninfas resistentes y las susceptibles a piretroides, y además, si ese proceso de recuperación en ambas poblaciones estuvo mediado por las monooxigenasas Citocromo P450 y/o las esterasas. Para constatar la actividad de las dos familias de enzimas se estudió la influencia de los sinergistas PBO y TPP en la evolución

en el tiempo de los signos de toxicidad ocasionados en los insectos por imidacloprid a dosis subletales ( $DE_{50}$ ).

## **4.2 Materiales y métodos**

### **4.2.1 Principios activos**

Butóxido de piperonilo: 95,6%, Romikin, S. A.

Trifenil fosfato:  $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich

Acetona:  $\geq 99,9\%$ , Sigma Aldrich

Imidacloprid: 97,5%, Romikin, S. A.

### **4.2.2 Animales experimentales**

Tanto los insectos susceptibles como los resistentes a piretroides provinieron de las mismas colonias mencionadas en el Capítulo 2, sección 2.2.1. Las colonias se mantuvieron en el insectario en condiciones de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura, 60-70% HR y un ciclo luz: oscuridad de 12:12 h.

### **4.2.3 Evaluación del efecto sinergista del PBO y TPP sobre ninfas de I y V estadio de *T. infestans* susceptibles y resistentes a piretroides en estado de ayuno y alimentadas a repleción**

Para cuantificar la actividad sinérgica del PBO y TPP en la actividad letal de imidacloprid se realizó el cálculo de la  $DL_{50}$  en presencia de una concentración fija de los sinergistas. El efecto de los sinergistas se evaluó por separado, es decir, se evaluó la  $DL_{50}$  de imidacloprid en presencia de PBO o TPP. Ambos sinergistas y el imidacloprid fueron disueltos en acetona. EL cálculo de la  $DL_{50}$  de imidacloprid

en presencia de los sinergistas fue similar a la descrita previamente en el Capítulo 2 con las siguientes modificaciones: en el caso de las ninfas ayunadas durante 15 días, una hora antes de recibir las distintas concentraciones de imidacloprid, cada insecto fue topicado con 1 µg de PBO o TPP en la zona dorsal del abdomen de ninfas. Las vinchucas alimentadas a repleción recibieron la topicación de alguno de los dos sinergistas después de ser pesadas al finalizar la alimentación sobre gallinas. Las ninfas utilizadas como control recibieron solamente PBO o TPP. Las concentraciones evaluadas para cada una de las categorías de ninfas fueron las mismas que se especificaron en el Capítulo 2, sección 2.2.2.

La actividad de los sinergistas se cuantificó utilizando la siguiente fórmula:

$$P = \frac{\text{RDL50 sin sinergista} - \text{RDL50 con sinergista}}{\text{RDL50 sin sinergista} - 1} \times 100$$

En la que,

RDL<sub>50</sub>: DE<sub>50resistente</sub>/ DE<sub>50susceptible</sub>

P: porcentaje de reducción de la resistencia/tolerancia debido a la presencia del sinergista.

Por lo tanto, si la resistencia/tolerancia se debe exclusivamente a un evento de detoxificación que es inhibido totalmente por el sinergista en estudio, el valor de P será de 100%. Un valor de P% mayor a 1 y menor a 100 significa que el sinergista logró revertir solo una parte de la diferencia en la letalidad del insecticida entre las ninfas resistentes y susceptibles. Mientras que un valor de P igual a 0 significa que el proceso inhibido por el sinergista no está involucrado en la diferencia de susceptibilidades al insecticida por las ninfas susceptibles y resistentes. Solo se considera al valor de P estadísticamente significativo, si el número 1 no está incluido en el IC del 95% del valor de la relación entre DL<sub>50</sub> sin sinergista / DL<sub>50</sub> en presencia del sinergista.

#### **4.2.4 Cálculo de la DE<sub>50</sub> en ninfas de I y V estadio de *T. infestans* susceptibles y resistentes a piretroides en estado de ayuno y alimentadas a repleción**

Para realizar el cálculo de las DE<sub>50</sub> de imidacloprid en presencia o ausencia de los sinergistas se utilizaron dosis subletales del insecticida. El uso de dosis subletales se relaciona con el objetivo primordial que es estudiar la evolución temporal de los signos de intoxicación, excluyendo la muerte del insecto. En este ensayo se denominó incoordinación al grupo de signos observados en los insectos a causa de dosis subletales de imidacloprid (incoordinación de las patas en el desplazamiento, desplazamiento hacia atrás y hacia los costados, temblores generalizados durante el desplazamiento, plegado de los 3 pares de patas por debajo del cuerpo, parálisis de alguno o de todos los pares de patas y pérdida de movimientos). Por lo tanto, se calculó la dosis necesaria de imidacloprid para ocasionar un determinado efecto de incoordinación en el 50% de las vinchucas evaluadas (DE<sub>50</sub>). Para el cálculo de las DE<sub>50</sub> se siguió la metodología del trabajo realizado por Alzogaray y Zerba (1997), que consistió en la aplicación tópica de 0,2 o 1 µL de imidacloprid disuelto en acetona sobre la zona dorsal del abdomen de ninfas de I o V estadio. Se consideró como incoordinado al insecto que demoró 10 veces o más el tiempo requerido por las ninfas control en trasladarse desde el centro al borde de un papel de filtro de 15 cm de diámetro. Las DE<sub>50</sub> se determinaron cada 24 h durante 14 días postadministración del insecticida. Las dosis aplicadas en las distintas categorías de vinchucas fueron desde: 0,2 a 1 ng/i para las ninfas de I estadio susceptibles a piretroides, y desde 0,2 a 8 ng/i para las ninfas de I estadio resistentes a piretroides en ambos estados de alimentación. En el caso de las ninfas de V estadio las concentraciones finales fueron desde: 0,5 a 8 ng/i para las ninfas susceptibles y desde 1 a 8 ng/i para las ninfas resistentes a piretroides en ambos estados de alimentación.

#### **4.2.5 Evaluación del efecto sinergista del PBO y TPP sobre las DE<sub>50</sub> del imidacloprid en ninfas de I y V estadio de *T. infestans* susceptibles y resistentes a piretroides en estado de ayuno y alimentadas a repleción**

Para evaluar la influencia del PBO o el TPP en la recuperación de los signos de intoxicación provocados por dosis subletales del imidacloprid (DE<sub>50</sub>) se siguió la misma metodología detallada en la sección 4.2.3 de este Capítulo. Para conocer la influencia del efecto de los sinergistas en el tiempo de recuperación de los signos de intoxicación provocados por dosis subletales de imidacloprid, se utilizó la metodología descrita por Sawicki (1962) y Alzogaray y Zerba (1997): durante 14 días se determinó la DE<sub>50</sub> obtenida a distintos tiempos postaplicación del insecticida en las ninfas. Con estos datos se realizó un gráfico de DE<sub>50</sub> vs logaritmo del tiempo posaplicación del neonicotinoide. Si la actividad del sinergista evaluado estuvo relacionada con la recuperación de la intoxicación producida por el insecticida, la gráfica obtenida a partir de la relación entre las DE<sub>50</sub> vs tiempo tendrá tres fases distintas. Una primera (descendente), seguida de una ascendente y finalmente una tercera fase en forma de meseta. A partir de éstas se pueden calcular los tres parámetros vinculados con la actividad del sinergista en el tiempo: el punto final del efecto de incoordinación (PFI), la tasa de recuperación de la incoordinación (TRV) y la proporción de efectividad (PE). El PFI equivale al menor valor obtenido para las distintas DE<sub>50</sub>, el TRV es el valor de la pendiente de la recta que representa a la fase 2 de la curva obtenida, mientras que el PE se obtiene del cociente entre la DE<sub>50</sub> de la fase 3 de meseta y el PFI. Este último parámetro indica la medida de recuperación de la intoxicación entre las ninfas debido a la presencia del sinergista, mientras que el TRV representa la velocidad a la que la recuperación se llevó a cabo, las unidades de este parámetro son ng/insecto/día.

#### **4.2.6 Análisis estadístico**

A partir de los datos de las mortalidades corregidas, utilizando el software POLO-PLUS (LeOra Software, 1987), se obtuvieron las diferentes curvas dosis-respuesta de imidacloprid. Se calcularon los valores de  $DL_{50}$   $DE_{50}$  con sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC 95%). Para conocer las diferencias de susceptibilidades entre los distintos estadios y poblaciones de ninfas de *T. infestans* se realizó el cálculo de la relación (ratio) entre las  $DL_{50}$  ( $RDL_{50}$ ), estos valores fueron acompañados de sus respectivos intervalos de confianza del 95%.

### **4.3 Resultados**

#### **4.3.1 Evaluación del efecto sinergista del PBO y TPP en ninfas de *T. infestans* susceptibles y resistentes a piretroides en estado de ayuno y alimentadas a repleción**

En las Tablas 46 y 47 se observa la evolución en el tiempo de la toxicidad de imidacloprid desde que fue topicado sobre las ninfas. En este ensayo se estudió la actividad del insecticida sobre las distintas categorías de ninfas en ausencia o presencia de alguno de los dos sinergistas (PBO y TPP). En la Tabla 46 se observa que entre las ninfas ayunadas, la respuesta letal del neonicotinoide se incrementó desde que fue puesto en contacto con los insectos, llegando a un máximo de letalidad entre las 48 y 168 h postopicación. Este patrón de respuesta fue similar independientemente del estadio, condición alimentaria, estado de susceptibilidad frente a los piretroides de las ninfas y también de la presencia o ausencia de alguno de los sinergistas.

**Tabla 46. Comparación de los valores de DL<sub>50</sub> obtenidos a distintos tiempos postadministración del insecticida entre ninfas de I y V estadio en estado de ayuno**

<b>DL<sub>50</sub> (ng/i)<sup>a</sup> (IC 95%)<sup>b</sup></b>				
<b>Tiempo postadministración del imidacloprid</b>				
	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>168 h</b>
<b>I estadio</b>				
Susceptibles	10,3 (7,0-24,0)	4,6 (3,6-5,8)	4,6 (3,6-5,8)	4,6 (3,6-5,8)
Susceptibles + PBO	7,4 (5,3-13,7)	2,7 (2,1-3,3)	2,7 (2,1-3,3)	2,7 (2,1-3,3)
Susceptibles + TPP	6,4 (4,2-14,1)	6,4 (4,2-14,1)	3,8 (2,6-5,7)	3,8 (2,6-5,7)
Resistentes	43,4 (24,4-157,3)	40,8 (29,2-60,5)	40,8 (29,2-60,5)	40,8 (2,2-60,5)
Resistente + PBO	16,7 (10,9-30,9)	8,9 (4,6-15,7)	8,9 (4,6-15,7)	8,9 (4,6-15,7)
Resistente + TPP	19,2 (12,1-41,4)	19,2 (12,1-41,4)	11,6 (6,3-22,6)	11,6 (6,3-22,6)
<b>V estadio</b>				
Susceptibles	66,7 (51,5-99,7)	66,7 (51,5-99,7)	23,5 (19,3-30,8)	23,5 (1,3-30,8)
Susceptibles + PBO	19,9 (15,8-25,1)	19,9 (15,8-25,1)	19,9 (15,8-25,1)	14,6 (1,5-18,2)
Susceptibles + TPP	59,2 (38,4-123,9)	25,2 (14,5-56,6)	25,2 (14,5-56,6)	21,1 (1,2-30,1)
Resistentes	197,1 (144,2-320)	78,8 (62,0-110)	78,8 (62,0-110,2)	78,8 (6,0-110)
Resistentes + PBO	76,1 (35,9-257,8)	39,7 (20,1-87,8)	26,8 (13,3-50,3)	26,8 (13,3-50)
Resistentes + TPP	142,1 (91,2-299)	93,1 (63,6-161)	60,6 (39,5-106,7)	60,6 (39-106)

<sup>a</sup> Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>b</sup> Intervalos de confianza del 95%

En el caso de las ninfas alimentadas a repleción el curso de la actividad letal ya no fue tan homogéneo como el observado en las ninfas ayunadas. En la Tabla 47 se observa que en el caso de las vinchucas que no fueron pretratadas con alguno de los sinergistas la actividad letal del insecticida fue constante durante el tiempo de observación. Este mismo comportamiento fue observado entre las ninfas resistentes de I estadio en presencia de ambos sinergistas. En el resto de las categorías de vinchucas el valor máximo de mortalidad por imidacloprid se observó entre las 24 y 168 h, independientemente de la presencia o ausencia de alguno de los sinergistas.

**Tabla 47. Comparación de los valores de DL<sub>50</sub> obtenidos a distintos tiempos postadministración del insecticida entre ninfas de I y V estadio en estado de alimentación a repleción**

<b>DL<sub>50</sub> (ng/i)<sup>a</sup> (IC 95%)<sup>b</sup></b>				
<b>Tiempo postadministración del imidacloprid</b>				
	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>	<b>168 h</b>
<b>I estadio</b>				
Susceptibles	2,6 (1,8-3,3)	2,6 (1,8-3,3)	2,6 (1,8-3,3)	2,6 (1,8-3,3)
Susceptibles + PBO	5,5 (4,1-8,2)	1,4 (1,7-3,0)	1,4 (1,7-3,0)	1,4 (1,7-3,0)
Susceptibles + TPP	5,1 (3,7-7,8)	5,1 (3,7-7,8)	3,4 (2,4-4,7)	3,4 (2,4-4,7)
Resistentes	10,3 (8,1-13,4)	10,3 (8,1-13,4)	10,3 (8,1-13,4)	10,3 (8,1-13)
Resistente + PBO	2,7 (1,7-3,8)	2,7 (1,7-3,8)	2,7 (1,7-3,8)	2,7 (1,7-3,8)
Resistente + TPP	7,0 (5,3-9,2)	7,0 (5,3-9,2)	7,0 (5,3-9,2)	7,0 (5,3-9,2)
<b>V estadio</b>				
Susceptibles	8,5 (7,2-10,3)	8,5 (7,2-10,3)	8,5 (7,2-10,3)	8,5 (7,2-10,3)
Susceptibles + PBO	7,3 (5,9-9,2)	5,1 (5,2-8,2)	5,1 (5,2-8,2)	5,1 (5,2-8,2)
Susceptibles + TPP	13,7 (10,1-30,9)	7,3 (6,0-8,9)	7,3 (6,0-8,9)	7,3 (6,0-8,9)
Resistentes	46,2 (38,6-56,5)	46,2 (38,6-56,5)	46,2 (38,6-56,5)	46,2 (38-56)
Resistentes + PBO	32,7 (25,4-44,5)	9,9 (7,8-11,9)	9,9 (7,8-11,9)	9,9 (7,8-11,9)
Resistentes + TPP	37,1 (30,3-46,4)	37,1 (30,3-46,4)	20,7 (17,2-24,8)	20,7 (17-24)

<sup>a</sup> Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>b</sup> Intervalos de confianza del 95%

En las Tablas 48 y 49 se compararon las DL<sub>50</sub> de las diferentes categorías de ninfas ayunadas en ausencia y presencia de PBO o TPP. Entre las ninfas susceptibles a piretroides de ambos estadios se observó una actividad sinérgica leve del PBO. No se registró una diferencia significativa entre las DL<sub>50</sub> de las ninfas pretratadas con el TPP y las que solo recibieron imidacloprid. En cuanto a las ninfas resistentes a piretroides, entre las vinchucas de I estadio se registró la mayor actividad sinérgica del PBO y del TPP, con una diferencia entre las DL<sub>50</sub> de entre 3,5 y 4,5 veces. En estas vinchucas la reversión de la tolerancia al imidacloprid por la presencia del PBO fue del 70%, mientras que cuando se inhibió la actividad de las esterasas el P obtenido fue de 74%. En las ninfas resistentes de V estadio el PBO hubo una diferencia significativa cuando fueron comparadas las DL<sub>50</sub> de imidacloprid con y sin la presencia del sinergista, logrando una reversión de la tolerancia del 66%. En estas vinchucas no se demostró una actividad estadísticamente significativa por parte del TPP.



**Tabla 48. Cálculo de las relaciones obtenidas en ninfas ayunadas a partir de la comparación de las DL<sub>50</sub> generadas por el imidacloprid en presencia o ausencia de TPP o PBO**

	n <sup>a</sup>	DL <sub>50</sub> (ng/i) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RDL <sub>50</sub> <sup>e</sup> (IC 95%)
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Sin sinergista	150	4,6 (3,6-5,8)	2,2 ± 0,4	
+ PBO	150	2,7 (2,1-3,3)	3,1 ± 0,4	1,7 (1,2-2,3)
+ TPP	150	3,8 (2,6-5,7)	1,5 ± 0,3	1,1 (0,7-1,8)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Sin sinergistas	150	40,8 (29,2-60,5)	1,4 ± 0,3	
+ PBO	150	8,9 (4,6-15,7)	1,0 ± 0,2	4,6 (2,3-8,9)
+ TPP	150	11,6 (6,3-22,6)	0,9 ± 0,2	3,5 (1,7-6,8)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Sin sinergistas	150	23,5 (19,3-30,8)	2,7 ± 0,4	
+ PBO	150	14,6 (11,5-18,2)	2,5 ± 0,3	1,6 (1,2-2,2)
+ TPP	150	21,1 (15,2-30,1)	1,5 ± 0,3	1,1 (0,7-1,6)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Sin sinergistas	150	78,8 (62,0-110,2)	2,0 ± 0,3	
+ PBO	150	26,8 (13,3-50,3)	1,6 ± 0,4	2,9 (1,9-4,5)
+ TPP	150	60,6 (39,5-106,7)	1,4 ± 0,2	1,3 (0,8-1,9)

<sup>a</sup> Número de ninfas utilizadas en la determinación      <sup>b</sup> Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>c</sup> Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup> Error Estándar

<sup>e</sup> Relación entre las DL<sub>50</sub>: DL<sub>50</sub> (ninfas tratadas con imidacloprid) / DL<sub>50</sub> (ninfas pretratadas con alguno de los sinergistas antes de ser tratadas con imidacloprid)

En la Tabla 49 se presenta la comparación entre las DL<sub>50</sub> de las distintas categorías de ninfas en estado de alimentación y repleción. Entre las vinchucas susceptibles de ambos estadios se encontró una actividad leve del PBO con valores cercanos a 1. En estas ninfas el TPP no demostró tener actividad sinérgica con imidacloprid. En las ninfas resistentes de I estadio solamente el PBO demostró un efecto sinérgico con el imidacloprid. El P logrado por el PBO en estas vinchucas fue el más alto registrado en todas las categorías de ninfas (93%). Entre las ninfas resistentes de V estadio, tanto el PBO como el TPP, demostraron actividad sinérgica cuando fueron combinados con el imidacloprid. El

PBO mostró una reversión de la resistencia del 90% mientras que para TPP fue del 60%.

**Tabla 49. Cálculo de las relaciones obtenidas en ninfas alimentadas a repleción entre las DL<sub>50</sub> generadas por el imidacloprid en presencia o ausencia de TPP o PBO**

	n <sup>a</sup>	DL <sub>50</sub> (ng/i) <sup>b</sup> (IC 95%) <sup>c</sup>	Pendiente ± EE <sup>d</sup>	RDL <sub>50</sub> <sup>e</sup> (IC 95%)
<b>I estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Sin sinergista	150	2,6 (1,8-3,3)	2,5 ± 0,5	
+ PBO	150	1,4 (1,7-3,0)	1,4 ± 0,4	1,8 (1,1-2,7)
+ TPP	150	3,4 (2,4-4,7)	1,7 ± 0,3	0,7 (0,4-1,1)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Sin sinergistas	150	10,3 (8,1-13,4)	1,9 ± 0,3	
+ PBO	150	2,7 (1,7-3,8)	1,5 ± 0,2	3,8 (2,4-5,9)
+ TPP	150	7,0 (5,3-9,2)	1,7 ± 0,2	1,4 (1,0-2,1)
<b>V estadio</b>				
<b>Ninfas susceptibles</b>				
Sin sinergistas	150	8,5 (7,2-10,3)	3,5 ± 0,6	
+ PBO	150	5,1 (5,2-8,2)	2,1 ± 0,2	1,7 (1,1-3,1)
+ TPP	150	7,3 (6,0-8,9)	3,1 ± 0,6	1,1 (0,9-1,4)
<b>Ninfas resistentes</b>				
Sin sinergistas	150	46,2 (38,6-56,5)	2,5 ± 0,3	
+ PBO	150	9,9 (7,8-11,9)	2,2 ± 0,4	4,6 (3,5-6,1)
+ TPP	150	20,7 (17,2-24,8)	2,1 ± 0,3	2,2 (1,7-2,9)

<sup>a</sup> Número de ninfas utilizadas en la determinación      <sup>b</sup> Dosis letal 50% (nanogramos por insecto)

<sup>c</sup> Intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup> Error Estándar

<sup>e</sup> Relación entre las DL<sub>50</sub>: DL<sub>50</sub> (ninfas tratadas con imidacloprid) / DL<sub>50</sub> (ninfas pretratadas con alguno de los sinergistas antes de ser tratadas con imidacloprid)

#### **4.3.2 Evaluación del efecto sinergista del PBO y TPP en la recuperación de ninfas expuestas a dosis subletales de imidacloprid**

Para conocer la incidencia de las monooxigenasas Citocromo P450 y esterasas en la recuperación del estado de intoxicación ocasionado por la administración de dosis subletales de imidacloprid, se determinó la DE<sub>50</sub> del

insecticida a distintos tiempos postaplicación (Tabla 50 y Figura 55). En insectos susceptibles a piretroides se halló un aumento de la capacidad de imidacloprid de provocar incoordinación cuando fue administrado conjuntamente con PBO. Esta actividad sinérgica del PBO fue independiente del estadio y del estado de alimentación que presentó la ninfa (Tabla 50 y Figura 55 A, C, E, G). En cuanto al TPP, no se observó diferencia entre los distintos parámetros calculados para las ninfas que solo recibieron imidacloprid de aquellas a las que se administró el insecticida en combinación con el sinergista (Tabla 50 y Figura 55 A, C, E, G). En cuanto a las observaciones del proceso de recuperación de la intoxicación por imidacloprid en los insectos provenientes de la colonia de Salta, se pudo constatar una actividad dispar de los sinergistas influida por el estadio de desarrollo de las vinchucas. En los insectos resistentes a piretroides de I estadio se identificó un efecto sinérgico tanto del PBO como del TPP (Tabla 50 y Figura 55 B y F). La actividad sinérgica de ambas moléculas se constató en una disminución de las dosis necesarias para conseguir el efecto en el 50% de la muestra de insectos, como también en la velocidad de recuperación que les demandó a los insectos revertir el cuadro de intoxicación (Tabla 50). Entre las ninfas de V estadio resistentes a piretroides el PBO fue el único de los dos sinergistas que interfirió con el proceso normal de detoxificación de imidacloprid llevado a cabo por este tipo de vinchucas (Tabla 50 y Figura 55 D y H). El estado de alimentación de las ninfas resistentes no tuvo influencia en la actividad de los sinergistas.

**Tabla 50. Estudio de la influencia del PBO o TPP en la recuperación de ninfas que recibieron dosis subletales de imidacloprid**

Categoría de ninfas	Tratamiento	PFI (ng/insecto)	TRV (ng/insecto/día)	PE
I Ayu Sus	Im	0,66	0,05	1,5
	Im + PBO	0,39	0,03	1,5
	Im + TPP	0,57	0,05	1,7
I Ayu Res	Im	3,94	0,12	1,2
	Im + PBO	1,66	0,05	1,1
	Im + TPP	1,77	0,06	1,3
V Ayu Sus	Im	4,77	0,21	1,3
	Im + PBO	4,43	0,09	1,1
	Im + TPP	4,77	0,13	1,2
V Ayu Res	Im	7,54	0,22	1,4
	Im + PBO	6,65	0,19	1,2
	Im + TPP	7,94	0,07	1,1
I Ali Sus	Im	0,41	0,03	1,6
	Im + PBO	0,22	0,01	1,6
	Im + TPP	0,36	0,03	1,9
I Ali Res	Im	0,64	0,07	1,8
	Im + PBO	0,41	0,03	1,6
	Im + TPP	0,49	0,03	1,5
V Ali Sus	Im	1,11	0,06	1,4
	Im + PBO	0,71	0,03	1,3
	Im + TPP	1,23	0,06	1,3
V Ali Res	Im	2,91	0,11	1,2
	Im + PBO	0,88	0,08	1,8
	Im + TPP	2,51	0,12	1,3

Im: imidacloprid

PFI: punto final del proceso de incoordinación

TRV: tasa de recuperación del fenómeno de incoordinación en las vinchucas

PE: proporción de efectividad

I: ninfas de I estadio

V: ninfas de V estadio

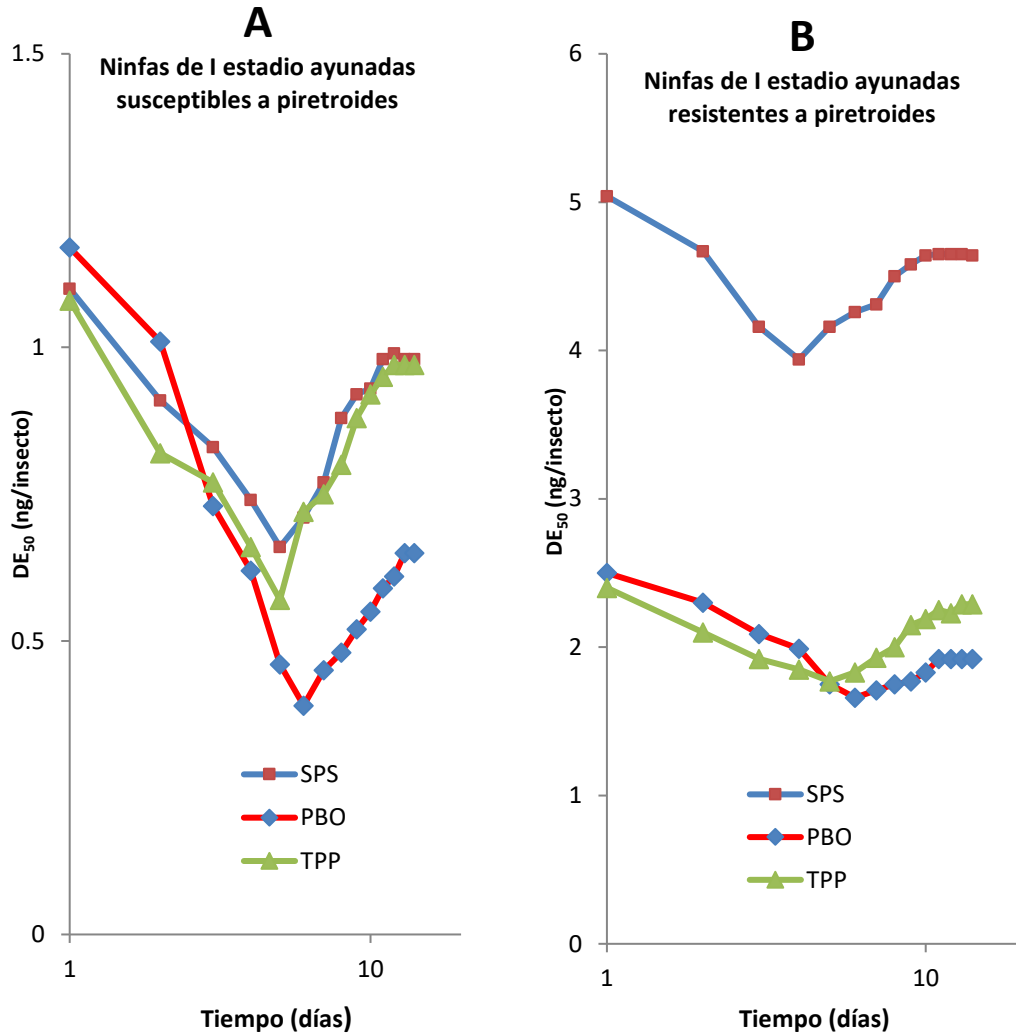
Ali: ninfas alimentadas a repleción

Ayu: ninfas ayunadas

Sus: ninfas susceptibles a piretroides

Res: ninfas resistentes a piretroides

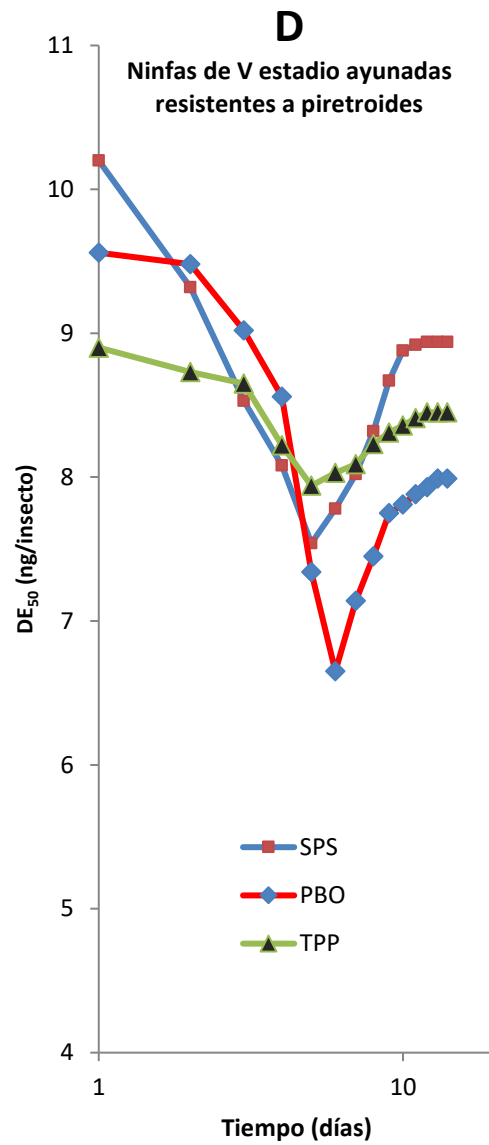
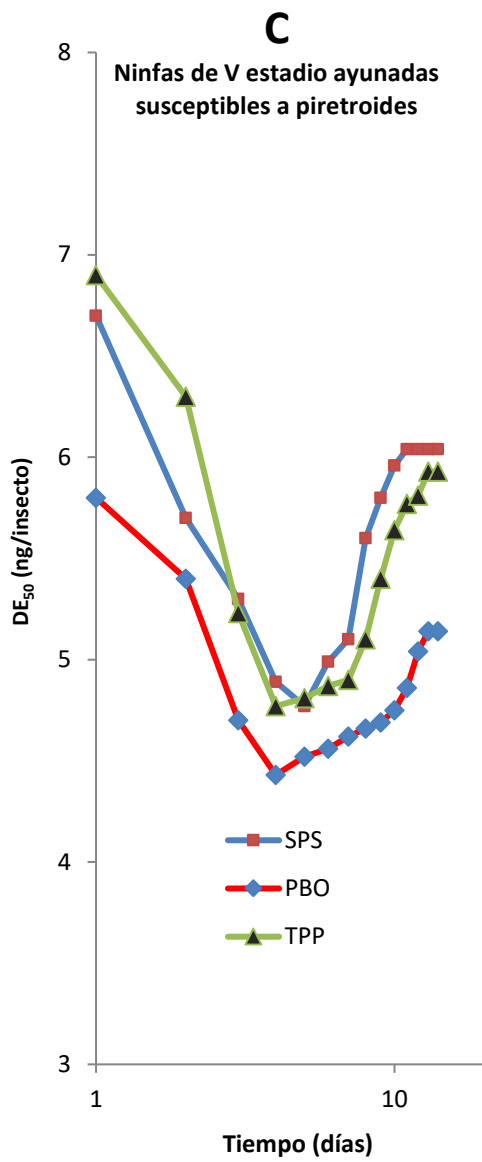
Figura 55. A - H Evolución en el tiempo del proceso de incoordinación generado por dosis subletales de imidacloprid administrado en distintas categorías de ninfas de *T. infestans*



SPS: imidacloprid

PBO: imidacloprid + PBO

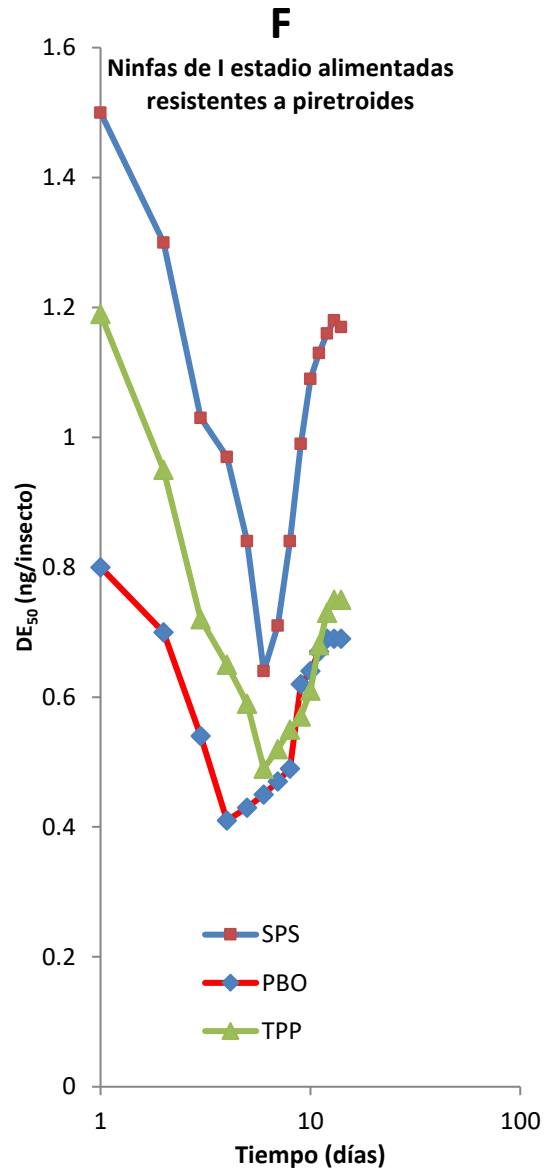
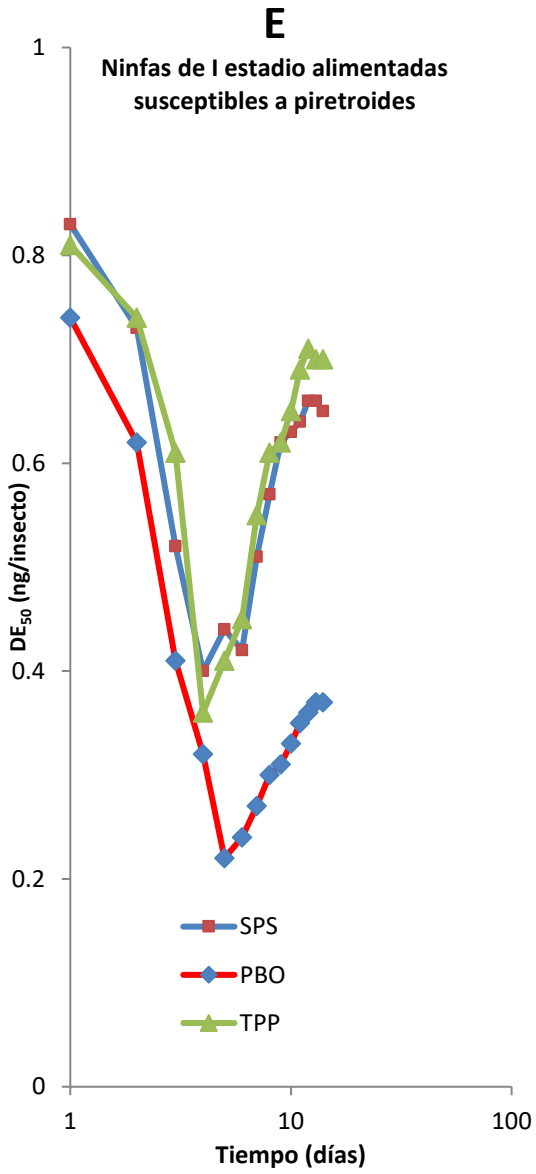
TPP: imidacloprid + TPP



SPS: imidacloprid

PBO: imidacloprid + PBO

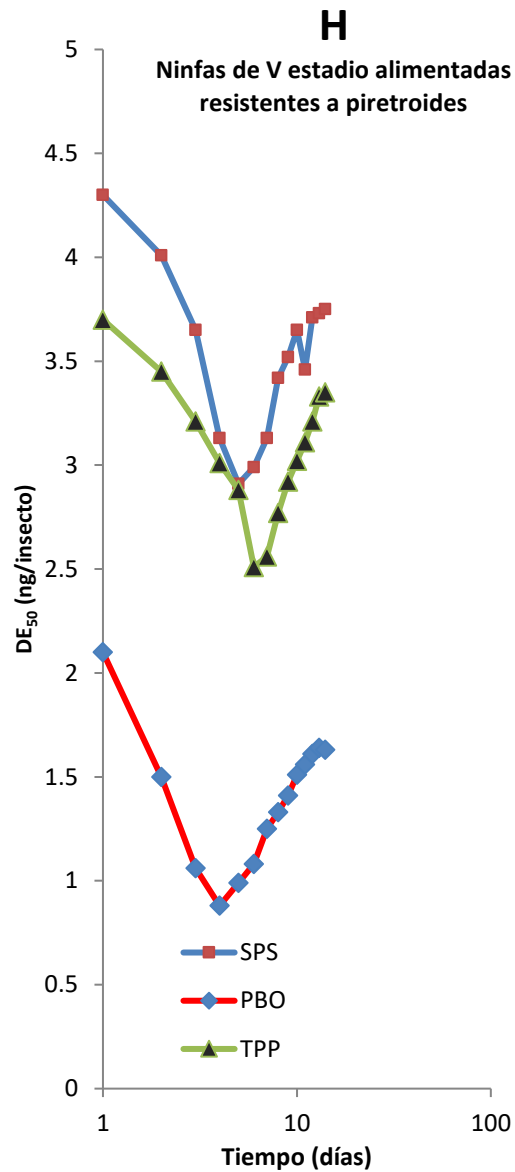
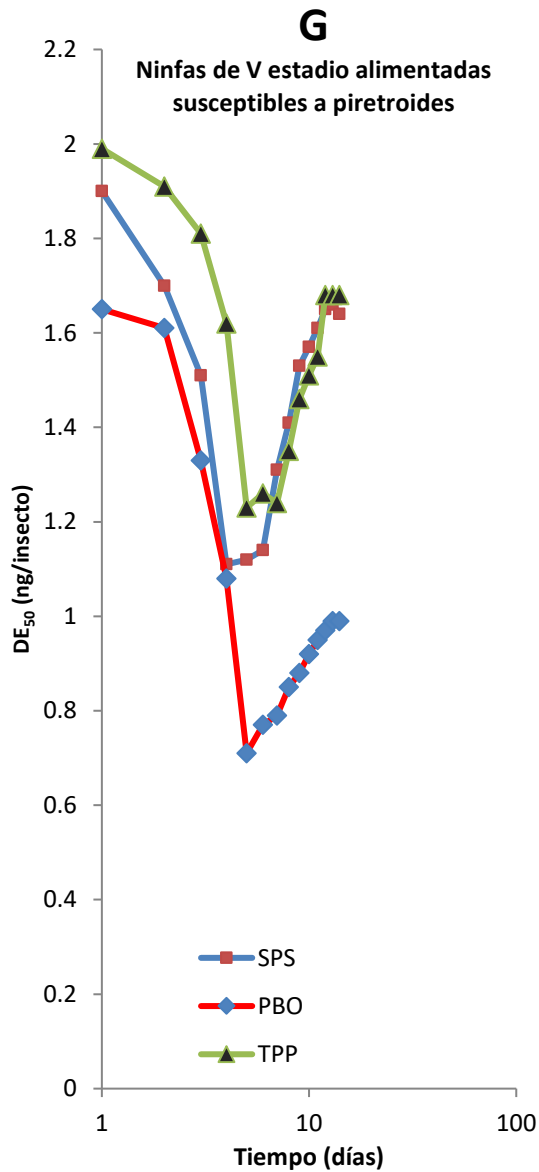
TPP: imidacloprid + TPP



SPS: imidacloprid

PBO: imidacloprid + PBO

TPP: imidacloprid + TPP



SPS: imidacloprid

PBO: imidacloprid + PBO

TPP: imidacloprid + TPP

#### 4.4 Discusión

La comunicación y el estudio de los fenómenos de resistencia/tolerancia en vectores de enfermedades es necesario para mantener la eficacia de los insecticidas utilizados para su control. La profundización de los conocimientos sobre el mecanismo y el alcance del evento de resistencia/tolerancia es



fundamental para evaluar sus consecuencias y definir las medidas a seguir. En este Capítulo se estudió la influencia de las monooxigenasas Citocromo P450 y esterasas en el fenómeno de tolerancia cruzada entre piretroides y neonicotinoides.

Si bien, la resistencia cruzada entre deltametrina e imidacloprid descrito en el Capítulo 2, es el primer informe en *T. infestans* que involucra a dos clases de insecticidas (piretroides y neonicotinoides), existen, distintos trabajos llevados a cabo en triatomíneos en los que se detallan fenómenos de resistencia cruzada entre piretroides y otras familias de insecticidas. Vassena y col., (2000) demostraron en ninfas de I estadio de *T. infestans* provenientes de Brasil, resistencia cruzada entre deltametrina y otros piretroides evaluados: beta-ciflutrina y cipermetrina. Estos resultados son coincidentes con lo comunicado en vinchucas de I estadio, provenientes de distintas localidades de la provincia de Salta (El Chorro, La Toma, El sauzal y Salvador Mazza). Las cuatro poblaciones, además de exhibir un rango de resistencia a deltametrina en el orden de 50 a 133 veces cuando fueron comparadas con las ninfas susceptibles, también demostraron poseer resistencia cruzada hacia otros tres piretroides evaluados (beta-cipermetrina, beta-ciflutrina y lambda- cialotrina) (Picollo y col., 2005). Además de la resistencia cruzada entre miembros de un mismo tipo de insecticidas, en *T. infestans* también fueron hallados fenómenos de resistencia cruzada entre piretroides e insecticidas no emparentados. En ninfas de I estadio resistentes a deltametrina provenientes de Bolivia (Mataral y Sucre) se comunicaron valores elevados de tolerancia cruzada a fipronil, que no fueron corroborados en ninfas de I estadio resistentes a deltametrina provenientes de Salta (Salvador Mazza), ya que en esta población el fipronil demostró una actividad letal similar entre las poblaciones de vinchucas susceptibles y resistentes a piretroides (Tolosa y col., 2008). Estos estudios fueron ampliados por Germano y col., (2010), en los que compararon los perfiles de susceptibilidad a insecticidas de poblaciones de I estadio de *T. infestans* provenientes de Argentina (Salta, Catamarca, Santiago del Estero, Santa Fe y Chaco), Bolivia (Tarija) y Paraguay (Boquerón), encontrando mayores tasas de resistencia en las

localidades cercanas a Salvador Mazza que en las ubicadas a distancias importantes de esta localidad. Entre las vinchucas provenientes de las demás provincias de Argentina se hallaron índices bajos de resistencia al piretroide. En el caso de las ninfas provenientes de Bolivia se obtuvieron los mayores índices de resistencia a deltametrina y también, niveles importantes de resistencia cruzada entre los piretroides y el fipronil. Este fenómeno de resistencia cruzada entre ambos insecticidas no fue constatado cuando las ninfas evaluadas fueron provenientes de Salta. En otro trabajo realizado por Germano y col., (2012b), se comunicaron resultados similares a los del trabajo previo. Determinaron el perfil de susceptibilidad a distintos insecticidas (deltametrina, fipronil y fenitrotion) de tres poblaciones de vinchucas de I estadio, resistentes a piretroides provenientes de la localidad de Acambuco (Salta, Argentina) y de dos localidades de Bolivia (Entre Ríos, Tarija y Mataral, Cochabamba). Determinando un perfil de toxicidad diferencial entre las ninfas provenientes de Salta (resistentes a la deltametrina y susceptibles a fipronil y fenitrotion) y las originarias de Bolivia (resistentes a piretroides y fipronil y susceptibles a fenitrotion).

En esta sección de la Tesis se estudió la actividad sinérgica del PBO y del TPP en combinación con el imidacloprid. Se constató una disparidad en los resultados que estuvo asociado con el estado de susceptibilidad a los piretroides, el estadio y el estado de alimentación de los insectos. El dato que en las vinchucas susceptibles la actividad sinérgica del PBO fue leve y la del TPP nula, podría estar indicando que en la detoxificación de imidacloprid estaría involucrada al menos una monooxigenasa Citocromo P450. Entre los insectos resistentes de ambos estadios en estado de ayuno, el PBO demostró una actividad sinérgica de alrededor del 70%. Esta actividad se incrementó notoriamente entre las vinchucas resistentes alimentadas a repleción. Una posible explicación de este fenómeno estaría vinculada con una mayor penetración del insecticida y del sinergista a través de la cutícula debido al proceso de plasticización desarrollado en las vinchucas alimentadas a repleción. Tanto el PBO como el TPP fueron utilizados para el estudio del mecanismo de resistencia de diferentes poblaciones de *T. infestans*. Vassena y col., (2000) comunicaron una influencia importante en la

reducción de las  $DL_{50}$  obtenidas en ninfas de *T. infestans* de poblaciones resistentes a piretroides pretratadas con el sinergista PBO. Así concluyeron que parte de la resistencia a la deltametrina para las ninfas en su estudio, podría estar relacionada con una actividad aumentada de las enzimas Citocromo P450. El antecedente más emparentado con lo presentado en esta Tesis es el trabajo de Picollo y col., (2005), mencionado en párrafos previos, en el que se estudió la actividad letal de la deltametrina en presencia de PBO o TPP en una población de ninfas resistentes a deltametrina de Salvador Mazza. Constataron una reducción de la  $DL_{50}$  de la deltametrina en presencia de PBO (31,1 vs 19,5 ng/insecto, sin y con PBO, respectivamente). Mientras que el sinergista TPP no demostró tener influencia en el mecanismo de resistencia a la deltametrina. Bajo nuestras condiciones experimentales el TPP demostró tener actividad sinérgica con el imidacloprid en ninfas resistentes de I estadio ayunadas y en ninfas de V estadio alimentadas a repleción. Este resultado concuerda con lo comunicado por Santo Orihuela y col., (2008), quienes mediante el uso de sustratos específicos cuantificaron la actividad general de las enzimas Citocromo P450 y esterasas en ninfas de I estadio de *T. infestans* resistentes a piretroides provenientes de distintas localidades cercanas a Salvador Mazza (El Chorro, La Toma y El Sauzal), La Rioja (San Antonio y Cuatro Esquinas) y Bolivia (Yacuiba). Hallaron una tasa de actividad aumentada en las esterasas de las poblaciones resistentes provenientes de Salta y La Rioja y también, una actividad similar de las monooxigenasas Citocromo P450 entre la población susceptible y el total de las poblaciones resistentes evaluadas. Este último resultado está en discordancia con lo comunicado por Picollo (2005) y con lo descrito en este Capítulo. Por lo tanto, hay disparidad de resultados en cuanto a la actividad de las enzimas Citocromo P450 y esterasas entre las distintas poblaciones de vinchucas cercanas geográficamente e inclusive, entre individuos provenientes de la misma localidad (Salvador Mazza). Una explicación a esta discrepancia de resultados estaría relacionada con lo comunicado por Germano y col., (2013), quienes hallaron distintos perfiles de susceptibilidad a deltametrina en casas pertenecientes a una misma localidad (La Esperanza, Chaco). De las 16 casas en donde se capturaron

ejemplares para el ensayo, en 9 habitaban insectos resistentes a deltametrina mientras que en las restantes eran susceptibles. Hallaron índices de resistencia que fueron de 1 a 1.400 veces con respecto a la población susceptible. Por lo tanto, existe una gran influencia en los índices de resistencia/tolerancia y en los mecanismos de resistencia/tolerancia según el origen de los insectos iniciadores de las colonias.

La resistencia cruzada entre piretroides y neonicotinoides fue previamente estudiada en otras especies de insectos. En un trabajo realizado por Ma y col., (2017) se demostró en hembras adultas de una población de moscas (*Musca domestica*) una RDL<sub>50</sub> de 18 veces para la beta-cipermetrina y de 201 veces para el imidacloprid. El uso de sinergistas (PBO y TPP) redujo las DL<sub>50</sub> en el orden de 4,5 veces en presencia de TPP y de 3,5 cuando las moscas fueron pretratadas con PBO. En otro trabajo realizado con *Laodelphax striatellus* se estudió la resistencia cruzada entre una población resistente al imidacloprid y otra a la deltametrina. En ésta última se demostró una resistencia cruzada del imidacloprid de 120 veces, mientras que en la población resistente a imidacloprid la permetrina demostró una resistencia cruzada del orden de 24 veces. Utilizando PCR en Tiempo Real estudiaron los niveles de expresión de distintos genes del complejo enzimático de las monooxigenasas Citocromo P450 y de las esterasas. Entre los resultados más importantes se constató una sobreexpresión de los genes CYP6AY3v2 y CYP353D1v2 en ambas poblaciones del insecto (resistentes a piretroides y resistentes a imidacloprid) (Elzaki y col., 2015). La mayor capacidad detoxificante de las enzimas Citocromo P450 puede deberse a un aumento en la tasa de transcripción del gen de una isoforma determinada, y/o una mayor actividad de la enzima. A su vez, el aumento de la expresión de una determinada isoforma puede ser constitutiva o por el contrario, ser inducida por la presencia de algún estímulo de origen endógeno o exógeno (Li y col., 2007). En un trabajo realizado con ninfas de V estadio y adultos de ambos sexos de *T. infestans* provenientes de dos poblaciones susceptibles a piretroides (Chuñá, Córdoba; Quirquinchos, Chaco) y de dos poblaciones resistentes a piretroides (La Esperanza, Chaco; Mataral, Bolivia), se determinó la tasa de transcripción en

tejido graso de tres genes de la familia de enzimas Citocromo P450 (CYP4EM7, CYP3085B1 y CYP3092A6). Se observó una mayor expresión constitutiva para el gen CYP4EM7 en la población de vinchucas resistentes a piretroides proveniente de la localidad de La Esperanza. También se observó una inducción en la tasa de expresión de los tres genes post-administración de deltametrina en los insectos. La actividad de inducción de los tres genes en estudio comunicada para la deltametrina varió de acuerdo al tiempo post-administración del insecticida, al estadio y a la población de origen de las vinchucas (Grosso y col., 2016). En un trabajo de Dulbecco y col., (2018), se estudiaron la expresión de genes de las monooxigenasas Citocromo P450 en distintos tejidos de ninfas de IV estadio de *T. infestans* susceptibles a piretroides (Formosa) y resistentes a piretroides (Salta). Fue constatada una mayor expresión de los genes CYP3093A11, CYP3093A12 y CYP4EM10 en el tegumento de las ninfas resistentes a piretroides en comparación con las susceptibles. También observaron una diferencia en la tasa de expresión de los genes CYP3093A12, CYP3093A13 y CYP3093A14 en el tejido graso de las ninfas resistentes. Este mismo comportamiento se observó con los genes CYP3093A12, CYP4EM7 y CYP4EM10 del intestino medio y con el gen CYP4EM7 de los tubulos de Malpighi. Se registró además un aumento en la transcripción de algunos de estos genes después de la topicación de los insectos con deltametrina. La suma de todos estos resultados, permite hipotetizar sobre un mecanismo de resistencia/tolerancia a la deltametrina y el imidacloprid que involucra la participación de enzimas detoxificantes de la familia de monooxigenasas y esterasas en las vinchucas provenientes de Salvador Mazza. La presión de selección ejercida por el uso constante de deltametrina en esta localidad, pudo causar la selección de vinchucas con una sobreexpresión de monooxigenasas o esterasas que estarían involucradas en la detoxificación de ambos insecticidas. El hecho que en ninguna de las categorías de ninfas evaluadas en presencia de alguno de los dos sinergistas se haya comunicado una remisión de la tolerancia hacia el imidacloprid del 100%, podría significar que en la tolerancia hacia el imidacloprid presente en las ninfas provenientes de Salvador Mazza, además de esterasas y monooxigenasas, estarían involucrados

otros mecanismos como podrían ser, por ejemplo, la actividad exacerbada de enzimas de la familia del Glutathion S-Transferasa e inclusive una mutación en el receptor nicotínico con el que interactúa el neonicotinoide en las vinchucas.

El estudio del mecanismo utilizado por los insectos para revertir la intoxicación generada por dosis subletales de un insecticida es fundamental para aumentar la capacidad letal de la molécula. En los resultados obtenidos de esta sección se constató, entre todas las categorías de ninfas evaluadas, un aumento en la capacidad de incoordinación del imidacloprid combinado con el sinergista PBO. La actividad negativa del PBO sobre el proceso de reversión de la intoxicación con deltametrina y cis-permetrina fue previamente descrita en ninfas de III estadio de *T. infestans* susceptibles a piretroides (Alzogaray y Zerba, 1997). En este Capítulo también se observó una actividad de las enzimas esterasas en el proceso de desintoxicación de las vinchucas resistentes de I estadio. Esta actividad no pudo ser constatada entre las ninfas de V estadio resistentes de *T. infestans*. Determinándose de esta manera, un mecanismo diferencial de detoxificación de dosis subletales de imidacloprid entre ninfas de I y V estadio de *T. infestans* provenientes de Salvador Mazza.

Cuando se comparan los mecanismos de detoxificación de dosis subletales y letales del imidacloprid constatamos similitudes y resultados discordantes. El PBO tuvo actividad sinérgica en todas las categorías de vinchucas, tanto a dosis subletales como a dosis letales. En cuanto a las esterasas su participación fue más heterogénea en las distintas categorías de ninfas. Por ejemplo, en vinchucas de I estadio las esterasas estuvieron involucradas tanto en el proceso de recuperación como en la tasa de letalidad de las ninfas. Sin embargo, el TPP solo tuvo actividad sinérgica a concentraciones letales del insecticida, sin observar su participación en el proceso de recuperación de los insectos que recibieron dosis subletales del neonicotinoide. A su vez, en ninfas de I estadio, resistentes a piretroides en estado de alimentación a repleción constatamos una disminución del valor de la  $DE_{50}$  en presencia del TPP que no fue corroborada a dosis letales del insecticida. Estos resultados generan interrogantes: ¿El efecto de incoordinación en *T. infestans*, es independiente del

proceso letal? ¿Tanto la incoordinación como la muerte son estados de un mismo proceso? En un trabajo realizado en tejido nervioso aislado de *Periplaneta americana* (cucarachas), determinaron el grado de agonismo de distintos neonicotinoides y establecieron una asociación entre la estructura química de los neonicotinoides, su nivel de eficacia y los signos de intoxicación que desencadenan en los insectos (Kiryama y Nishimura, 2002). En el caso de imidacloprid se determinó que su actividad se correspondía con la de un agonista parcial y que los principales signos de la toxicidad ejercida por el insecticida en las cucarachas fueron en orden cronológico de presentación: temblor en la zona abdominal, flexión de las alas, acicalamiento excesivo, temblores y pérdida de fuerza en las patas, tambaleo, postración y muerte. En el caso de los neonicotinoides que actúan como agonistas totales, los signos de intoxicación comienzan con una parálisis generalizada del insecto que culmina en su muerte. El imidacloprid logró generar una respuesta en los receptores nicotínicos que equivalió al 20-25% del total de la respuesta generada por la acetilcolina (su ligando endógeno), mientras que los neonicotinoides que actuaron como agonistas totales generaron respuestas entre 60 y 100% de la producida por la acetilcolina (Kiryama y Nishimura, 2002). Una explicación a la diferencia en la eficacia y efectos tóxicos generados en los insectos por las moléculas que conforman la familia de los insecticidas neonicotinoides estaría relacionada con que en los insectos existen numerosas variantes o isoformas del receptor nicotínico de acetilcolina, y que una mayor afinidad por alguna de estas isoformas de un neonicotinoide en particular, podría determinar la eficacia y el tipo de efectos tóxicos observados en el insecto. A su vez cada isoforma tiene una distribución en particular en el sistema nervioso del insecto (Trimmer, 2004). En ninfas de I y V estadio de *T. infestans* los principales signos de intoxicación fueron similares a los observados en *Periplaneta americana*: incoordinación de las patas en el desplazamiento, desplazamiento hacia atrás y hacia los costados, temblores generalizados durante el desplazamiento, plegado de los tres pares de patas por debajo del cuerpo, parálisis de alguno o de todos los pares de patas, pérdida de movimientos y muerte. Es decir, un comportamiento tóxico similar al producido por

el insecticida en las cucarachas. Una respuesta a los interrogantes planteados precedentemente podría relacionarse con la secuencia cronológica de presentación de los efectos tóxicos, incluyendo la muerte, generados por el imidacloprid en *T. infestans* y las distintas concentraciones efectivas del insecticida alcanzadas en el tiempo en su sitio de acción. Suponiendo que, al igual que en las cucarachas, el sitio de acción del neonicotinoide fuese el sistema nervioso central de *T. infestans*; y, teniendo en cuenta que, desde que se topica el insecticida en la cutícula del insecto comienzan procesos de absorción y distribución determinantes de distintas concentraciones de la molécula en los diferentes tejidos del insecto, se podría suponer que los primeros signos de incoordinación observados en las vinchucas debido a la intoxicación del imidacloprid, serían el resultado de las concentraciones bajas del insecticida en el sistema nervioso central, que después de un determinado período de tiempo se incrementarían hasta alcanzar niveles letales. Las concentraciones que logre la molécula en los distintos tejidos estarán directamente relacionadas con la dosis aplicada al insecto, es decir, las dosis subletales no lograrán generar concentraciones letales en el sitio de acción del insecticida. Si bien esta teoría podría explicar la presentación secuencial de los signos de toxicidad generados por el imidacloprid, no logra brindar una respuesta del porque en ciertos estadios, por ejemplo, las esterases estuvieron involucradas tan solo en el fenómeno de recuperación de la incoordinación sin tener incumbencia en la tasa de letalidad del insecticida. Es decir, si como se afirmó, el proceso de intoxicación fuese uno solo y culminara con la muerte del insecto, la actividad de una/s esterase/s que disminuyera/n la concentración efectiva del insecticida en el sistema nervioso central debería/n afectar, tanto a la intensidad con que se presentan los signos de incoordinación como la tasa de muerte del insecto. Una explicación a este hecho sería que los estados de incoordinación y muerte, en realidad, sean el producto de dos procesos que se desarrollan en zonas distintas del sistema nervioso, y que por lo tanto, puedan ser afectados por enzimas propias de cada ubicación. De acuerdo con esta hipótesis, la presentación secuencial de los signos de incoordinación serían el producto de la interacción del imidacloprid con receptores



nicotínicos ubicados en zonas del sistema nervioso del insecto de fácil acceso (por ejemplo, sistema nervioso periférico), mientras que la muerte del insecto se produciría solamente cuando el neonicotinoide alcanzara concentraciones efectivas en zonas del sistema nervioso que demanden procesos de absorción y distribución extras (por ejemplo, sistema nervioso central del insecto).

#### 4.5 Conclusión

En este Capítulo se estudió el mecanismo de tolerancia al imidacloprid desarrollado por ninfas de I y V estadio de *T. infestans* procedentes de la localidad de Salvador Mazza (Salta). Entre los resultados más importantes se constató una actividad exacerbada de detoxificación del insecticida por las enzimas monooxigenasas Citocromo P450 en las vinchucas resistentes en comparación con las susceptibles. En cuanto a las esterasas, su actividad detoxificante solo se pudo demostrar en ciertas categorías de vinchucas. Estos resultados aportan al conocimiento del perfil de susceptibilidad a insecticidas desarrollado por las vinchucas resistentes a piretroides provenientes de Salvador Mazza: resistentes a piretroides, susceptibles a fipronil y tolerantes al imidacloprid. El hecho que el perfil de susceptibilidad a insecticidas comunicado para estas vinchucas resistentes a piretroides sea distinto al de las ninfas resistentes a piretroides de la localidad chaqueña de El Malá (resistentes a deltametrina y susceptibles a imidacloprid) (Carvajal y col., 2014), demuestra la importancia de determinar la susceptibilidad a distintos insecticidas que poseen las diferentes poblaciones de *T. infestans* resistentes a piretroides. La susceptibilidad a el imidacloprid demostrada por las ninfas resistentes de El Malá posicionó a este insecticida como una alternativa plausible para el control de vector. Los resultados de esta Tesis no descartan su uso, pero sí, lo limitan. El fipronil es otra molécula que ha demostrado tener una actividad diferencial según la zona geográfica de donde provenga la población de vinchucas resistentes. Como ya fuera mencionado en párrafos anteriores, en Bolivia, a diferencia de lo comunicado en Argentina, se registraron distintas poblaciones de vinchucas con

resistencia cruzada entre piretroides y fipronil. Es decir, que así como en Argentina coexisten poblaciones de vinchucas resistentes a piretroides que además pueden ser susceptibles (El Malá) o tolerantes (Salvador Mazza) al imidacloprid, en Bolivia, según la zona geográfica, las vinchucas resistentes a piretroides pueden ser susceptibles o tolerantes al fipronil. Tampoco se podría realizar una generalización sobre los mecanismos de resistencia/tolerancia descritos para las distintas poblaciones de vinchucas resistentes. Mientras que en las ninfas de Salvador Mazza, las enzimas Citocromo P450 demostraron, en parte, ser causales de la resistencia a deltametrina y las esterasas, no estuvieron relacionadas con este fenómeno, las poblaciones de vinchucas resistentes a piretroides provenientes de algunas zonas cercanas a esta localidad que presentaron una actividad incrementada de las esterasas y un nivel de actividad de las enzimas Citocromo P450 similar al hallado en las ninfas susceptibles. Conocer el mecanismo de resistencia es un pilar fundamental para establecer las estrategias racionales para el control eficaz del vector. Por ejemplo, el uso del PBO combinado con insecticidas solo sería recomendable en las poblaciones de vinchucas resistentes a piretroides en las que se conozca previamente una actividad detoxificante importante por las enzimas Citocromo P450.

Por último, es interesante destacar la importancia del hallazgo de poblaciones de vinchucas que son tolerantes a insecticidas que no fueron utilizados previamente para el control del vector. La descripción de distintos perfiles de susceptibilidad a insecticidas entre poblaciones de vinchucas geográficamente cercanas, refuerza la teoría que las distintas poblaciones de *T. infestans* resistentes a insecticidas son el producto de eventos independientes y no la consecuencia de una dispersión realizada por un ancestro en común. En poblaciones de *T. infestans* de origen silvestre y domiciliarias provenientes de la zona de los valles Andinos de Bolivia (Cochabamba, Mataral), se encontraron niveles de tolerancia a deltametrina y fipronil por encima de lo comunicado para la población de ninfas utilizadas como control (susceptibles a piretroides) (Roca Acevedo y col., 2011). Este hallazgo de poblaciones silvestres de vinchucas tolerantes a insecticidas es muy interesante y está directamente relacionado con

el hallazgo realizado en esta Tesis de tolerancia a imidacloprid por parte de la población de vinchucas resistentes a piretroides de Salvador Mazza. Ambos resultados demuestran que, en ciertas ocasiones, la presencia de poblaciones que tienen una menor susceptibilidad a una determinada molécula, es un fenómeno que está emparentado con la dotación genética de los individuos que la componen y no con una selección previa resultado del uso del insecticida en cuestión. La presencia de poblaciones silvestres de *T. infestans* tolerantes a insecticidas con las cuales no tuvieron contacto previo brinda una perspectiva del abanico de perfiles de respuesta a insecticidas encontrados en *T. infestans*. Estos resultados demuestran lo complicado de hallar una molécula alternativa o complementaria a los piretroides utilizados en la actualidad para el control de *T. infestans*, y también, evidencian la importancia de realizar estudios de susceptibilidad en poblaciones de vinchucas resistentes a piretroides provenientes de distintas áreas geográficas.

## **Conclusiones finales**

La elección de las cinco moléculas evaluadas en esta Tesis, tuvo como principal sustento un mecanismo de acción distinto al de los piretroides y la accesibilidad para la población en general. Nuestro primer resultado esperado, fue que estos cinco insecticidas tuviesen actividad triatómica. En condiciones de laboratorio, se determinó que la actividad letal sobre las ninfas estuvo influida por la vía de ingreso al insecto. El imidacloprid y el fipronil fueron las únicas moléculas que demostraron actividad letal cuando entraron en contacto directamente con la cutícula de las vinchucas. A través de esta vía de administración, también se pudo comprobar otro resultado esperado, la influencia que tuvieron tanto el estado de alimentación como el estadio de desarrollo de la ninfa en la intensidad de la respuesta letal, observándose que en general, la actividad letal aumentó en vinchucas alimentadas a repleción y de I estadio.

Uno de los posibles mecanismos de resistencia a los piretroides, de las ninfas provenientes de Salvador Mazza, es la mutación del canal de sodio que constituye la diana farmacológica de esta familia de insecticidas. Por lo tanto, otro resultado esperado fue que de todos los insecticidas evaluados con un mecanismo de acción diferente al de los piretroides, demostrasen una actividad letal similar entre las ninfas provenientes de Salvador Mazza (resistentes a piretroides) y las originadas en la provincia de Santiago del Estero (susceptibles a piretroides). Este resultado se observó con cuatro de las moléculas estudiadas (DRM, IVM, EPR y fipronil). En el caso del imidacloprid, se describió un proceso de tolerancia hacia el neonicotinoide de las ninfas resistentes a piretroides provenientes de Salvador Mazza. Este último resultado no figura entre los esperados lo que se debe, principalmente, a que no existen registros del uso masivo de este tipo de moléculas para el control de *T. infestans*. Por lo tanto, nada hacía suponer que las vinchucas procedentes de Salvador Mazza pudiesen ser tolerantes al imidacloprid. Debido a la importancia de este hallazgo estudiamos parte de su mecanismo, mediante el empleo de los sinergistas PBO y TPP. Se determinó la importancia de la actividad de las monooxigenasas P450 en la metabolización del neonicotinoide que fue independiente del estadio de desarrollo de la ninfa, de su condición alimenticia y de su estado frente a los piretroides. Este último resultado corrobora,

algo previamente documentado, la importancia que suelen poseer las monooxigenas Citocromo P450 en los fenomenos de tolerancia y resistencia desarrollados por los insectos.

Otro hallazgo de esta Tesis fue la constatación de la actividad letal por vía oral de IVM, DRM y EPR sobre ninfas de V estadio de *T. infestans* que fue similar entre las ninfas susceptibles y resistentes a piretroides.

La determinación de la vía de ingreso eficaz para cada molécula, condicionó las variables metodológicas de los ensayos realizados en ratas, perros y gallinas. En ratas y gallinas, se llevaron a cabo las pruebas de xenointoxicación utilizando IVM, DRM y EPR. En este caso, se le permitió al insecto hacer contacto con la piel de los animales unicamente a través de su proboscide. Mientras que en perros, en los que se estudió la actividad de productos comerciales con imidacloprid o fipronil en su formulación, las vinchucas permanecieron alimentándose durante 20 minutos sobre la piel de los animales.

En los ensayos de xenointoxicación se demostró actividad triatocida de los tres endectocidas cuando fueron administrados en ratas y gallinas. También se corroboró la actividad letal sobre ninfas de V estadio del fipronil y del imidacloprid presentes en distintos productos comerciales. Ambos resultados demuestran un posible uso de estas moléculas en el control de ejemplares de vinchucas que hayan podido quedar después de un proceso de rociado con pieretroides. Las condiciones ambientales presentes en el peridomicilio suelen disminuir el poder residual de los piretroides, por lo tanto una alternativa ante esta limitación, sería complementar su actividad con moléculas como las que se estudiaron en esta Tesis.

## **Referencias bibliográficas**

**Abbott WS.** “A method of computing the effectiveness of an insecticide”. J Econ Entomol. 1925;18:265-267.

**Abrahan LB, Gorla DE, Catalá SS.** Dispersal of *Triatoma infestans* and other Triatomina species in the arid Chaco of Argentina - Flying, walking or passive carriage? The importance of walking females Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2011;106(2):232-39.

**Alzogaray RA, Zerba EM.** Incoordination, paralysis and recovery after pyrethroid treatment on nymphs III of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997;92:431-435.

**Amelotti I, Catalá SS, Gorla DE.** Response of *Triatoma infestans* to pour-on cypermethrin applied to chickens under laboratory conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009a;104:481–485.

**Amelotti I, Catalá SS, Gorla DE.** Experimental evaluation of insecticidal paints against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), under natural climatic conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009b;104(3):481-5.

**Amelotti I, Catalá SS, Gorla DE.** The effects of cypermethrin pour-on and piperonyl butoxide on *Triatoma infestans* under laboratory conditions. J Med Entomol. 2010;47(6):1135–40.

**Amelotti I, Catalá S, Gorla DE.** The residual efficacy of a cypermethrin pour-on formulation applied on goats on the mortality and blood intake of *Triatoma infestans*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012a;107:1011–1015.

**Amelotti I, Catalá SS, Gorla DE.** Effects of fipronil on dogs over *Triatoma infestans*, the main vector of *Trypanosoma cruzi*, causative agent of Chagas disease. Parasitol Res. 2012b;111(4):1457–62.

**Amelotti I, Catalá SS, Gorla DE.** Control of experimental *Triatoma infestans* populations: effect of pour-on cypermethrin applied to chickens under natural conditions in the Argentinean Chaco region. Med Vet Entomol. 2014;28(2):210-6.

**Arena JP, Liu KK, Pares PS.** The mechanism of action of avermectins in *Cuenorhabditis elegans*: Correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. J Parasitol. 1995;81:286-294.

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

**Azambuja P, Gomes JE, Lopes F, Garcia ES.** Efficacy of ivermectin against the bloodsucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1985;80:439-442.



**Barretto M, Siqueira A, Correa F.** Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. Encontro do *Triatoma infestans* em ecotopos silvestres. Inst Med Trop Sao Paulo. 1963;5:289–293.

**Bennett DG.** Clinical pharmacology of ivermectin. Am Vet Med Assoc. 1986;189:100-104.

**Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP** *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease in the United States. Clin Microbiol Ver. 2011;24: 655-681.

**Bingham G, Strode C, Tran L, Khoa PT, Jamet HP.** Can piperonyl butoxide enhance the efficacy of pyrethroids against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti*?. Trop Med Int Health. 2011;16: 494-500.

**Brener Z.** O Parasito: relações hospedeiro-parasito. En: Brener Z, Andrade ZA, orgs. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1979:1-41.

**Bregues C, Hawkes N, Chandre F, Mccarroll L, Duchon S, Guillet P, et al.** Pyrethroid and DDT cross - resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage - gated sodium channel gene. Med Vet Entomol. 2003;17:87-94.

**Busvine, J. R.** A critical review of the techniques for testing insecticides. Common wealth Agricultural Bureau x. 2nd ed. Londres: 1971:345.

**Bustamante Gomez M, Gonçalves Diotaiuti L, Gorla DE.** Distribution of Pyrethroid Resistant Populations of *Triatoma infestans* in the Southern Cone of South America. Neglect Trop Dis. 2016;10:1-15.

**Button, P. A.** The biology of a blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. Trans. R. Ent. Soc., Land. 1930;78:337-36.

**Canals M, Ehrenfeld M, Cattán, PE.** Situación de *Mepraia pinolai*, vector Silvestre de la enfermedad de Chagas en Chile, en relación con otros vectores desde la perspectiva de sus fuentes de alimentación. Rev. Med. Chile. 2000;128(10):1108-1112.

**Carvajal G, Mougabure-Cueto G, Toloza AC.** Toxicity of non-pyrethroid insecticides against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107:675–679.

**Carvajal G, Picollo MI, Toloza AC.** Is imidacloprid an effective alternative for controlling pyrethroid-resistant populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in the Gran Chaco ecoregion?. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109:761–766.

**Casida JE, Quistad GB.** Golden age of insecticide research: past, present, or future? Annu Rev Entomol. 1998;43:1-16.

**Ceballos L, Piccinalli R, Berkunsky I, Kitron U, Gürtler R.** First finding of melanic sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) colonies in the Argentine Chaco. J Med Entomol. 2009;46(5):1195-202.

**Cecere M, Gürtler R, Canale D, Chuit R, and Cohen J.** The role of the peridomiciliary area in the elimination of *Triatoma infestans* from rural Argentine communities. Rev Pan Salud Publica. 1997;1:273–279.

**Chilcutt C, Tabashnik BE.** Evolution of pesticide resistance and slope of the concentration-mortality line: are they related? J Econ Entomol. 1995;88:11-20.

**Chopade H, Eigenberg D, Solon E, Strzemienski P, Hostetler J, McNamara T.** Skin distribution of imidacloprid by microautoradiography after topical administration to beagle dogs. Vet Ther. 2010;11:1-10.

**Cohen JE, Gürtler RE.** Modeling household transmission of American Trypanosomiasis. Science. 2001;293:694-698.

**Congreso de la Nación Argentina.** Ley 26.281 [internet] infoLEG, información Legislativa 2007. Disponible en: <http://infoleg.mecon.gov.ar7infoleginternet/130000-134999/131904/norma.htm>.

**Crocco L, Catalá S.** Feeding and defecation patterns of *Triatoma sordida*. Mem Oswaldo Cruz. 1996;91(4):409-413.

**De Cock A, De Clercq P, Tirry L, Degheele D.** Toxicity of diafenthiuron and imidacloprid to the predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). Environ. Entomol. 1996;25:476-480.

**DeBach P, Rosen D.** Pest, pesticides and biological control. En: DeBach P, Rosen D, editores. Biological Control by Natural Enemies. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 1991:1-31.

**Dias J, Prata A, Correia D.** Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41:193-6.

**Dias J, Bastos C, Araújo E, Mascarenhas AV, MartinsNetto E, Grassi F, et al.** Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(3):296-300.

**Dias J, Coura J.** Epidemiologia. En: Dias J, Coura J, editores. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 1997:33-66.

**Díaz Carrasco MS, Espuny Miro A, Escudero Pastor E, Cárcelos Rodríguez CM.** Farmacología de los endectocidas: Aplicaciones terapéuticas (II). An Vet Murcia. 2000;16: 15-40.

**Dujardin JP, Tibayrenc M, Venegas E, Maldonado L, Desjeux P, Ayala F.** Isozyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera, Reduviidae) in Bolivia. J Med Entomol. 1987;24:40–45.

**Dulbecco A, Moriconi D, Calderón Fernandez G, Lynn S, McCarthy A, Roca Acevedo G, et al.** Integument CYP genes of the largest genome-wide cytochrome P450 expansions

in triatomines participate in detoxification in deltamethrin-resistant *Triatoma infestans*. Sci Rep. 2018;8:10177 – 10189.

**Dupuy J, Chartier C, Sutra JF, Alvinerie M.** Eprinomectin in dairy goats: dose influence on plasma levels and excretion in milk. Parasitol Res. 2001;87:294-298.

**Elliott M.** The Pyrethroids: Early Discovery, Recent Advances and the Future. Pestic Sci. 1989; 27:337-351.

**Elzaki M, Zhang W, Feng A, Qiou X, Zhao W, Han Z.** Constitutive overexpression of cytochrome P450 associated with imidacloprid resistance in *Laodelphax striatellus* (Fallen). Pest Manag Sci. 2015;72:1051–1058.

**Errecalde J, Mestorino N.** Terapéutica de las ectoparasitosis En: Fiel C. y Nari, A Enfermedades Parasitarias de Importancia Clínica y Productiva en Rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control. Capítulo 26. Montevideo; Editorial hemisferio Sur; 2013. p. 605-638.

**Fabro J, Sterkel M, Capriotti N, Mougabure-Cueto G, Germano M., Rivera-Pomar R, et al.** 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. 2012;12:487–491.

**Fontán A, Zerba EN.** Influence of the nutritional state of *Triatoma infestans* over the insecticidal activity of DDT. Comp Biochem Physiol. 1992;101:589-91.

**Fritz ML, Walker ED, Miller JR.** Lethal and sublethal effects of avermectin/milbemycin parasiticides on the African malaria vector, *Anopheles arabiensis*. J Med Entomol. 2012, 49: 326-331.

**Gajate P, Pietrokovsky S, Abramo Orrego L, Pérez O, Monte A, et al.** *Triatoma infestans* in Greater Buenos Aires, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96:473–477.

**Gascón J, Bern C, Pinazo MJ.** Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. Acta Trop. 2010;115(1-2) 22–27.

**Gaspar M , Bovaira M , Carrera-Huesoc F , Querol M, Jiménez A, Moreno L.** Efectividad de un protocolo de tratamiento tópico con dimetilsulfóxido al 50% en el síndrome de dolor regional complejo tipo 1. Farm Hosp. 2012;36(5):385-391.

**Gayrard V, Alvinerie M, Toutain PL.** Comparison of pharmacokinetic profiles of doramectin and ivermectin pour-on formulations in cattle Vet. Parasitol. 1999;81:47-55.

**Gentile AG, Sartini JL, Campo MC, Sánchez JF.** Eficacia del Fipronil en el control del ciclo peridomiciliario de *Triatoma infestans* en un área con resistencia a la deltametrina. Cad Saú de Pública. 2004;20:1240–1248.

**Germano, MD, Acevedo GR, Cueto G, Toloza AC, Vassena CV, Picollo M.** New findings of insecticide resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from the Gran Chaco. J Med Entomol. 2010;47:1077-1081.

**Germano M.** Herencia y efectos demográficos de la resistencia a deltametrina en *Triatoma infestans*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, 2012a. 157p. Disponible en: [https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n5316\\_Germano.pdf](https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n5316_Germano.pdf).

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

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

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

**Goudie AC, Evans NA, Gratton K, Bishop BF, Gibson SP, Holdom KS, et al.** Doramectin: a potent novel endectocide. *Vet. Parasitol.* 1993;49:5-15.

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

**Guhl F, Nicholls S.** Introducción. Universidad de los Andes. Manual de procedimientos para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, Bogotá D.C. Quebecor Impresores; 2001:3-14.

**Gürtler RE, Solard ND, Lauricela MA, Haedo AS, Pietrokovski SM, Alberti, AA, et al..** Dynamics of transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of Argentina. III. Persistence of *T. cruzi* parasitemia among canine reservoirs in a two-year follow-up. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1986 28(4):213-9.

**Gürtler RE, Cohen JE, Cecere MC, Lauricella MA, Chuit R, Segura EL.** Influence of humans and domestic animals on the household prevalence of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* populations in northwest Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58(6):748–758.

**Gürtler R, Ceballos L, Stariolo R, Kitron U, Reithinger R.** Effects of topical application of fipronil spot-on on dogs against the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009a;103(3):298-304.

**Gürtler RE, Ceballos LA, Ordóñez-Krasnowski P, Lanati LA, Stariolo R, Kitron U.** Strong host-feeding preferences of the vector *Triatoma infestans* modified by vector density: implications for the epidemiology of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009b; 3, e447.

**Hemingway J, Ranson H.** Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *An Rev Entomol.* 2000;45:371 - 391.

**Informe Auditoría General de la Nación**, 2018). Disponible en: [https://elauditor.info/informes-de-auditoria/a-diez-anos-de-la-sancion--siguen-sin-reglamtar-la-ley-para-combatir-al-chagas\\_a5b3bcd1ef531797ef8eef844](https://elauditor.info/informes-de-auditoria/a-diez-anos-de-la-sancion--siguen-sin-reglamtar-la-ley-para-combatir-al-chagas_a5b3bcd1ef531797ef8eef844).

**Institute for Laboratory Animal Research**. Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth edition. Washington, D.C: The National Academies Press; 2011:56-88.

**Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM**. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. Crop Prot. 2004;23:371–378.

**Jones CM, Daniels M, Andrews M, Slater M, Lind R, Gorman**. Age - specific expression of a P450 monooxygenase (CYP6CM1) correlates with neonicotinoid resistance in *Bemisia tabaci*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 2011;101:53-58.

**Juan LW, Seccacini EA, Zerba EN, Canale D, Alzogaray RA**. Triatomicidal effect of new spot-on formulations applied to poultry in semi-field conditions. Parasitol Res. 2013;112:155–161.

**Kiriyama K, Nishimura K**. Structural effects of dinotefuran and analogues in insecticidal and neural activities. Pest Manag Sci. 2002;58:669-76.

**Kumar A, Sachan SK, Kumar S, Kumar P**. Efficacy of some novel insecticides against white fly (*Bemisia tabaci* Gennadius) in brinjal. J. Ento. and Zoo.Stud. 2017;5(3):424-427.

**Lagadic L, Bernard L, Leicht W**. Topical and oral activities of imidacloprid and cyfluthrin against susceptible laboratory strains of *Heliothis virescens* and *Spodoptera littoralis*. Pestic Sci. 1993; 38: 323–328.

**Lankas G, Gordon L**. Toxicology. En: Campbell, William C. (Ed.) Ivermectin and Abamectin. New York:Springer-Verlag;1989:89-112.

**Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ**. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. Lancet Infect Dis. 2013;13,342-348.

**Lent H, Oliveira SJ**. Nota preliminar sobre a ação do DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) em insetos transmissores da doença de Chagas. Rev Bras Biol. 1944;4:329-339.

**Lees P, Cunningham FM, Elliott J**. Principles of pharmacodynamics and their applications in veterinary pharmacology. J Vet Pharmacol Ther. 2004;27:397–414.

**Ley n. 13.005**. Protección fetal antichagásica. Boletín Oficial 24.634; 20 enero 2003. 17p. Disponible en <http://www.gob.gba.gov.ar/legislacion/legislacion/l-13005.html>

**Li X, Schuler MA, Berenbaum MR**. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. Ann Rev Entomol. 2007;52: 231-253.

**Litchfield JT, Wilcoxon F**. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J Pharmacol Exp Ther. 1949;96:99–113.

**López A, Crocco L, Morales G, Catalá S.** Feeding frequency, infectivity and physiological status of peridomestic populations of *Triatoma infestans*. *Acta Trop.* 1999;73(3):275-281.

**Loza A, Talaga A, Herbas G, Canaviri R, Cahuasiri T, Luck L.** Systemic insecticide treatment of the canine reservoir of *Trypanosoma cruzi* induces high levels of lethality in *Triatoma infestans*, a principal vector of Chagas disease. *Parasites & Vectors.* 2017;10:344-356.

**Lüssenhop J, Stahl J, Wolken S, Schnieder T, Kietzmann M, Bäumer W.** Distribution of permethrin in hair and stratum corneum after topical administration of four different formulations in dogs. *J Vet Pharmacol Therapeut.* 2012;35:206–8.

**Luz C.** Infection of fed and starved *Rhodnius prolixus* (Triatominae) by *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93:335-339.

**Luz C, Silva I, Magalhães B, Cordeiro CT, Tigano M.** Control of *Triatoma infestans* (Klug) (Reduviidae: *Triatominae*) with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill: preliminary assays on formulation and application in the field. *An Soc Entomol Bras.* 1999;28:101–110.

**Ma Z, Li J, Zhang Y, Shan C, Gao X.** Inheritance mode and mechanisms of resistance to imidacloprid in the house fly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) from China. *PLoS One.* 2017;12(12): e0189343.

**Maekelt GA.** La epidemiología de la Enfermedad de Chagas en relación con el ecosistema domiciliario. *Interciencia.* 1983;6:353-36.

**Martins A, Ribeiro M, Bellinato D, Peixoto A, Valle D, Lima J.** Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLoS One.* 2012;7:123-131.

**Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB.** Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22:573–580.

**Matsuda K, Shimomura M, Ihara M, Akamatsu M, Sattelle DB.** Neonicotinoids show selective and diverse actions on their nicotinic receptor targets: electrophysiology, molecular biology, and receptor modeling studies. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005; 69:1442–1452.

**Mehlhorn H, Mencke N, Hansen O.** Effects of imidacloprid on adult and larval stages of the flea *Ctenocephalides felis* after in vivo and in vitro application: a light- and electron-microscopy study. *Parasitol Res.* 1999; 85(8-9): 625-637.

**Melcón ML.** Tesis de Licenciatura: Dinámica de la extensibilidad cuticular en el contexto de la alimentación de la vinchuca *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). 2004. Disponible en [https://www.researchgate.net/publication/281244543\\_Dinamica\\_de\\_la\\_Extensibilidad\\_cuticular\\_en\\_el\\_contexto\\_de\\_la\\_alimentacion\\_de\\_la\\_vinchuca\\_Triatoma\\_infestans\\_Heteroptera\\_Reduviidae](https://www.researchgate.net/publication/281244543_Dinamica_de_la_Extensibilidad_cuticular_en_el_contexto_de_la_alimentacion_de_la_vinchuca_Triatoma_infestans_Heteroptera_Reduviidae)

**Messenger L, Yeo M, Lewis M, Llewellyn M, Miles M.** Molecular Genotyping of *Trypanosoma cruzi* for Lineage Assignment and Population Genetics. *Methods in Molecular Biology* 2014, Parasite Genomics Protocol:297-337.

**Metcalf CL, Flint WP.** Introducción y definiciones. Metcalf CL, Flint WP, editors. *Insectos destructivos e insectos útiles, sus costumbres y su control*. Mexico:4<sup>a</sup> Ed. Continental S.A.;1979:21-77.

**Ministerio de Salud de la Nación.** Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Disponible en: [http://www.msal.gov.ar/Chagas/images/stories/Equipos/Guia\\_Nacional\\_Chagas\\_version\\_2709\\_2012.pdf](http://www.msal.gov.ar/Chagas/images/stories/Equipos/Guia_Nacional_Chagas_version_2709_2012.pdf).

**Minter DM.** Feeding patterns of some Triatominae vectors. *New Approaches in American Trypanosomiasis Research.. Pan American Health Organization Scientific Publication*. 1976;318:33–47.

**Mosqueira B, Soma DD, Namountougou M, Poda S, Diabaté A, Ali O, et al.** Pilot study on the combination of an organophosphate-based insecticide paint and pyrethroid-treated longlasting nets against pyrethroid resistant malaria vectors in Burkina Faso. *Acta Trop*. 2015;148:162-9.

**Mougabure-Cueto G, Picollo MI.** Insecticide resistance in vector Chagas disease: Evolution, mechanisms and management. *Acta Trop*. 2015;149:70-85.

**Muscio OA, Bonder MA, La Torre JL y Scodeller EA.** Horizontal transmisión de *Triatoma Virus* through the fecal-oral route in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Triatomidae). *J Med Entomol*. 2000;37(2):271-275.

**Muscio O, La Torre M, Bonder A, Scodeller E.** *Triatoma Virus* pathogenicity in laboratory colonies of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol*. 1997;34:253-256.

**Nasirian H, Ladonni H, Vatandoost H.** Duration of fipronil topical application toxicity in *Blattella germanica* field population strains. *Pak J Biol Sci* .2006;95:800-804.

**Nath AJ.** Treatment and control of *Trixacarus caviae* infestation in a conventional guinea pig (*Cavia porcellus*) breeding colony. *J Parasit Dis*. 2006;40:1213-1216.

**Noireau F.** La enfermedad de Chagas y sus particularidades epidemiológicas en Bolivia. In R Al Cassab, F Noireau F, G Guillén (eds.), *Chagas, la enfermedad en Bolivia: conocimientos científicos al inicio del programa de control (1998-2002)*, Primera, La Paz. 1999;17-47.

**Noireau F, Cortez MR, Monteiro FA, Jansen AM, Torrico F.** Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? *Trends Parasitol*. 2005;21:7–10.

**Noya B, Perez-Chacon G, Diaz-Bello Z.** Description of an oral Chagas disease outbreak in Venezuela, including a vertically transmitted case. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.2017:569–571.

**Núñez JA, Lazzari CR.** Rearing of *Triatoma infestans* Klug (Het., Reduviidae) in the absence of a live host. Some factors affecting the artificial feeding. *J Applied Entomol.* 1990;109:87-92.

**Núñez J.** Central nervous control of the mechanical properties of the cuticle in *Rhodnius prolixus*. *Nature.* 1963;199(4893):621-622.

**OMS.** Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponible en <https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>. Updated 2017.

**OMS.** [https://www.who.int/neglected\\_diseases/news/Chagas-transmission-interrupted-Paraguay/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/news/Chagas-transmission-interrupted-Paraguay/en/), 2018

**Onstad DW, Guse CA.** Concepts and complexities of population genetics. In: Onstad, D.W. (Ed.), *Insect Resistance Management*. Academic Press;2008. 320p.

**Organización Panamericana de la Salud.** Guía de Evaluación de los procesos de control de triatominos y del control de la transmisión transfusional de *T. cruzi*. Ed. OPS/HCP/HCT/196/02, Montevideo, Uruguay, 2002. 46p.

**Ostlind DA, Nartowicz MA, Mickle WG.** Efficacy of ivermectin against *Syphacia obvelata* (Nematoda) in mice. *J Helminthol.* 1985;59,257-61.

**Panzer F, Ferreira MJ, Pita S, Calleros L, Pérez R, Basmadján Y, et al.** Evolutionary and dispersal history of *Triatoma infestans*, main vector of Chagas disease, by chromosomal markers. *Infect Genet Evol.* 2014;27: 105-13.

**Pedrini N, Mijailovsky SJ, Girotti JR, Stariolo R, Cardozo RM, Gentile A, et al.** Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. *Plos Negl Trop Dis.* 2009;3,434-442.

**Perry AS, Yamamoto I, Ishaaya I, Perry R.** Introduction. En: Perry AS, editor. *Insecticides in Agriculture and Environment Retrospects and Prospects*. Berlin: Springer;1998:1-3.

**Pfister K, Armstrong R.** Systemically and cutaneously distributed ectoparasiticides: a review of the efficacy against ticks and fleas on dogs. *Parasit Vectors.* 2016;9:436.

**Picollo M, Vassena C, Orihuela P, Barrios S, Zaidemberg M, Zerba E.** High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J Med Entomol.* 2005;42:637 - 642.

**Pinto Dias J.** The treatment of Chagas disease (South American tripanosomiasis) *Ann Int Med.* 2006;144:772-4.

**Pinto J, Cáceres AG, Vega S, Martínez R, Náquira C.** Fuentes de alimentación de *Panstrongylus herreri*(Hemiptera: Triatominae) capturados en Utcubamba, Amazonas - Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2008;25: 179-184.



**Remón C, Lobbia P, Zerba E, Mougabure-Cueto G.** A methodology based on insecticide impregnated filter paper for monitoring resistance to deltamethrin in *Triatoma infestans* field populations. *Med Vet Entomol.* 2017;31(4):414-426.

**Reynolds SE.** A post-ecdysial plasticization of the abdominal cuticle in *Rhodnius*. *J. Insect Physiol.* 1974;20:1957-1962.

**Reynolds SE.** The mechanism of plasticization of the abdominal cuticle in *Rhodnius*. *J Exp Biol.* 1975;62: 81-98.

**Robertson J, Russell L, Preisler H, Savin N.** Binary quantal response with one explanatory variable. En Taylor & Francis group, editors. *Bioassays with arthropods*, 2nd ed. USA: CRC Press., 2007:21-32.

**Roca Acevedo G, Cueto G, Germano M, Orihuela P, Cortez, F. Noireau, et al..** Susceptibility of sylvatic *Triatoma infestans* from Andean valleys of Bolivia to deltamethrin and fipronil. *J Med Entomol.* 2011;48:828-835.

**Roca-Acevedo G, Picollo M, Capriotti N, Sierra I, Santo-Orihuela P.** Examining Mechanisms of Pyrethroid Resistance in Eggs of Two Populations of the Chagas' Disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol.* 2015;52:987-992.

**Rojas De Arias A, Fournet A.** Fipronil Insecticide: Novel Application against Triatomine Insect Vectors of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:535–539.

**Romaña C, Abalos JW.** Acción del "gammexane" sobre los triatomídeos: "control" domiciliario. *Inst Med Reg.* 1948;2(2):95-106.

**Romaña C, Alvarado CA, Tula A, Abalos JW.** Campaña de "Gammatización" antivinchuca. Primera Reunión Panamericana sobre Enfermedad de Chagas, Tucumán 1950;1:57-62.

**Rozas-Dennis S, Cazzaniga J.** Effect of *Triatoma Virus* (TrV) on fecundity and moulting in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Ann Trop Med Parasitol.* 2000;94: 633-641.

**Sanmartino M.** 100 años de Chagas (1909-2009): revisión, balance y perspectiva. *Rev Soc Entomol Argent.* 2009;68(3-4):243-252.

**Santini, M, Ronderos, J.** Allatotropin-like peptide released by Malpighian tubules induces hindgut activity associated with diuresis in the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Klug). *J. Exp. Biol.* 2007;210(11):1986–1991.

**Santo-Orihuela P, Vassena CV, Zerba EN, Picollo MI.** Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera : Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol.* 2008;45:298–306.

**Santo-Orihuela P, Carvajal G, Picollo M, Vassena, C..** Toxicological and biochemical analysis of the susceptibility of sylvatic *Triatoma infestans* from the Andean Valley of Bolivia to organophosphate insecticide. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108:790–795.

**Sawicki RM.** Insecticidal activity of pyrethrum extract and its four insecticidal constituents against house fly. III. Knock-down and recovery of flies treated with pyrethrum extract with and without piperonyl butoxide. *J Sci Food Agric.* 1962;13: 283-292.

**Scott JG, Cochram DG, Siegfried BD.** Insecticide toxicity, synergism and resistance in german cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J Econ Entomol.* 1990;83:1698-1703.

**Scott EW, Kinabo LD, McKellar QA.** Pharmacokinetics of ivermectin after oral or percutaneous administration to adult milking goats *J Vet Pharmacol.* 1990;13:432-435.

**Sfara V, Zerba E, Alzogaray RA.** Toxicity of pyrethroids and repellency of diethyltoluamide in two deltamethrin resistant colonies of *Triatoma infestans* Klug 1834 (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101:89–94.

**Sheele JM.** Ivermectin causes *Cimex lectularius* (Bedbug) morbidity and mortality. *J. Emerg. Med.* 2013;45, 433–440.

**Shikanai-Yasuda, M, Carvalho N.** Oral transmission of Chagas disease. *Clin. Infect. Dis.* 2012;54,845–852.

**Solís H, Carvalho E, Ferreria C, Casanova C, Huamán A, Mendoza V.** Contribución al estudio de la epidemiología de la Enfermedad de Chagas en tres localidades de la zona sur del Perú. *An Fac Med (Lima).* 2003; 64(4): 223-27.

**Storino R.** Etapas clínicas de la Enfermedad de Chagas. En: Librería Arcadia Editorial. Atención médica del paciente chagásico. Chagas en el siglo XXI, de la enfermedad a la problemática social. 1ª ed. Buenos Aires: Librería Arcadia Editorial;2010:127-137.

**Suchail S, Guez D, Belzunces LP.** Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Enviro Toxicol Chem.* 2000;7:1901-1905.

**Suchail S, De-sousa G, Rahmani R, Belzunces L.** In vivo distribution and metabolisation of 14C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera*. *L, Pest Management Science.* 2004;45(11):1056-1062.

**Tan J, Galligan JJ, Hollingworth RM.** Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons. *Neurotoxicology.* 2007;28:829–842.

**Tolozza AC, Germano M, Cueto GM, Vassena C, Zerba E, Picollo MI.** Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol.* 2008;45:421-426.

**Toutain PL, Upson DW, Terhune TN, McKenzie ME.** Comparative pharmacokinetics of doramectin and ivermectin in cattle. *Vet. Parasitol.* 1997;72:3-8.

**Toutain PL, Lees P.** Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther.* 2004;27:467–477.

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

**Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Alvarez M, Petti M, Bertochi G, et al.** Side effects of benznidazole as treatment of Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;7:157-63.

**Wang K, Kong X, Jiang X, Yi M, T. X. Liu.** Susceptibility of immature and adult stages of *Trialeurodes vaporariorum* (Hom., Aleyrodidae) to selected insecticides. *J Appl Entomol.* 2003;127:527-533.

**Washino RK, Tempelis CJ.** Mosquito host bloodmeal identification. Methodology and data analysis. *Annu Rev Entomol.* 1983;28: 179–201.

**White GB, Moore SJ.** Terminology of insect repellents. En: Debboun M, Frances SP, Strickman D. *Insect repellents handbook*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2014:3-30.

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

**Wisnivesky-Colli O, Gurtler RE, Solarz ND, Lauricella MA, Segura EL.** Epidemiological role of humans, dogs and cats in the transmission of *T. cruzi* in a central area of Argentina. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.*1985;27:346-352.

**WHO (World Health Organization).** Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre triatominos. *Acta Toxicológica Argentina.* 1994;2:29-32.

**Wicks SR, Kaye B, Weatherley AJ, Lewis D, Davison E, Gibson SP, et al.** Effect of formulation on the pharmacokinetics and efficacy of doramectin. *Vet Parasitol.* 1993;49:17-26.

**Yamaoka K, Nakagawa T.** Uno, Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinet Biopharm.*1978;6:165-175.

**Yu, SJ.** Evaluation of Toxicity. En: Taylor & Francis, editors. *The Toxicology and Biochemistry of Insecticides*, 2nd edition. Boca Raton: CRC Press; 2015:151-178.

**Zabala JP.** Historia de la enfermedad de Chagas en Argentina: evolución conceptual, institucional y política. *Hist. Cienc. Saude-Manguinhos.* 2009;16(1):57-74.

**Zabala JP.** La enfermedad en su laberinto: avances, desafíos y paradojas de cien años del Chagas en Argentina. *Salud Colectiva.* 2012;8(Supl 1):S9-S21.

**Zeng Z, Andrew NW, Woda JM, Halley BA, Crouch LS, Wang RW.** Role of cytochrome P450 isoforms in the metabolism of abamectin and ivermectin in rats. *J Agr Food Chem.*1996a;44:3374-8.

**Zeng Z, Andrew NW, Green-Erwin ML, Halley BA.** Fate of 40-epi-amino-40-deoxy ivermectin B1. *Drug Metab Disp.*1996b;24:572-8.

**Zeng Z, Andrew NW.** Characterization of eprinomectin N-deacetylase in rats. *Drug Metab Dispos.* 1999;27:269-73.

**Zhao X, Yeh JZ, Salgado VL, Narahashi T.** Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. *J Pharma Exp Ther.* 2004;310:192-201.

**Zerba E.** Chemical control of Chagas Disease vectors. *Biom Environ.* 1989;2:24-29.

**Zerba EN, Wallace G, Picollo MI, Casabé N, Licastro S, Wood E, et al.** Evaluación de la b - cipermetrina para el control de *Triatoma infestans*. *Rev Panam Salud Pública.* 1997;1:133 - 137.

## **Anexo**

## Producción científica a partir de los resultados obtenidos en esta Tesis

### Presentación de resúmenes en Congresos nacionales e internacionales

- **Dadé M, Daniele M, Valle C, Marin G, Mestorino N, Errecalde J.** Efficacy of ivermectin against *Triatoma infestans*. I Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), Córdoba, Argentina. 24 y 25 de Junio de 2010. Disponible en: libro de resúmenes de la I Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), p. 96.
- **Dadé M, Daniele M, Marin G, Mestorino N, Errecalde J.** Eficacia *in vitro* de ivermectina y doramectina frente a *Triatoma infestans*. I Congreso Internacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes y VII Congreso Argentino de Zoonosis. Buenos Aires, Argentina. 10 de Junio de 2011. Disponible en: libro de resúmenes del I Congreso Internacional de Zoonosis y Enfermedades Emergentes y VII Congreso Argentino de Zoonosis, p. 76.
- **Dadé M, Daniele M, Valle C, Marín G, Mestorino N, Errecalde J.** Uso de endectocidas contra *Triatoma infestans* en un modelo de alimentación *in vitro*. II Encuentro Nacional de Enfermedades Olvidadas y XIV Simposio Internacional Sobre Control Epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por Vectores. 20 y 21 de Octubre de 2011. Disponible en: libro de resúmenes del II Encuentro Nacional de Enfermedades Olvidadas y XIV Simposio Internacional Sobre Control Epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por Vectores, p.101.
- **Dadé M, Daniele M, Valle C, Mestorino N, Errecalde J.** Eficacia de imidacloprid sobre ninfas de quinto estadio de *Triatoma infestans*. XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental, Tucumán, Argentina. 2 al 4 de Noviembre de 2011. Disponible en: [http://www.safe-digital.org/archivos/Actas/ACTA\\_2011.pdf](http://www.safe-digital.org/archivos/Actas/ACTA_2011.pdf).
- **Dadé M, Daniele M, Mestorino N, Errecalde J.** Incidencia de los Endectocidas sobre la mortandad y conducta de *Triatoma infestans*. II International Workshop on Chagas Disease, triatomine vectors, *Trypanosoma cruzi* and Triatoma virus, Cochabamba, Bolivia. 17 al 20 de Septiembre de 2012. Disponible en: [http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/divers17-01/010059847.pdf](http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers17-01/010059847.pdf)

- **Dadé M, Mestorino N, Daniele M, Pérez E, Errecalde J.** Cuantificación de ivermectina en *Triatoma infestans* por HPLC con detección por fluorescencia. XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. Mendoza, Argentina. 31 de Octubre al 2 de Noviembre de 2012. Disponible en: [http://www.safe-digital.org/archivos/Actas/ACTA\\_2012.pdf](http://www.safe-digital.org/archivos/Actas/ACTA_2012.pdf).
- **Dadé M, Daniele M, Mestorino N, Errecalde J.** Efecto letal de las avermectinas y alteración de la conducta en *Triatoma infestans*. XXI Jornadas Nacionales y XVI Latinoamericanas de Fármaco-Toxicología Veterinaria, Corrientes, Argentina. 29 de Noviembre del 2012. Disponible en: libro de resúmenes de las XXI Jornadas Nacionales y XVI Latinoamericanas de Fármaco-Toxicología Veterinaria, p. 61.
- **Dadé M, Daniele M, Mestorino N.** Comparacion de la actividad triatomicida de Ivermectina administrada por diferentes vías en un modelo de ratas wistar. XXI Congreso Latinoamericano de Parasitología FLAP, Guayaquil, Ecuador. 6 al 9 de Octubre 2013. Disponible en: libro de resúmenes del XXI Congreso Latinoamericano de Parasitología FLAP, p.55.
- **Dadé M, Daniele M, Mestorino N, Marin G, Errecalde J.** Efectos de Ivermectina spot-on sobre *Triatoma infestans* bajo condiciones de semicampo. XXI Congreso Latinoamericano de Parasitología FLAP, Guayaquil, Ecuador. 6 al 9 de Octubre 2013. Disponible en: libro de resúmenes del XXI Congreso Latinoamericano de Parasitología FLAP, p.63.
- **Dadé M, Daniele M, Mestorino N.** Integración farmacocinética /farmacodinamica de Ivermectina como triatomicida en un modelo *in vivo* de gallina. 4° Encuentro Internacional sobre Enfermedades Olvidadas y XVI Simposio Internacional Sobre Control Epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por Vectores, Buenos Aires, Argentina. 17 y 18 de Octubre de 2013. Disponible en: libro de resúmenes del 4° Encuentro Internacional sobre Enfermedades Olvidadas y XVI Simposio Internacional Sobre Control Epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por Vectores, p. 134.
- **Dadé Martín, Daniele Martín, Silvestrini Pía, Mestorino Nora.** Disposición plasmática y eficacia comparativa de ivermectina y doramectina frente a *Triatoma infestans* en un modelo aviar. III Congreso Panamericano de Zoonosis y VIII Congreso Argentino de Zoonosis. 4, 5 y 6 de junio de 2014. La Plata, Buenos Aires, Argentina. Disponible en: libro de resúmenes del III Congreso Panamericano de Zoonosis y VIII Congreso Argentino de Zoonosis, p.121.
- **Dadé M, Daniele M, Mestorino N.** Uso de eprinomectina frente a *Triatoma infestans* en un modelo de alimentación *in vivo*. IX Congreso Argentino de

Entomología. Posadas, 19 al 22 de Mayo de 2015. Disponible en: libro de resúmenes del IX Congreso Argentino de Entomología, p. 45.

- **Dadé M, Daniele M, Mestorino, N.** Uso del endectocida ivermectina para el control de *Triatoma infestans* en el peridomicilio. VII Congreso Argentino de Parasitología. Bariloche, 1 al 5 de Noviembre de 2015. Disponible en: libro de resúmenes del VII Congreso Argentino de Parasitología, p. 122.
- **Dadé M, Bozzolo F, Daniele M, Silvestrini P, Francini F, Mestorino N.** Estudio de la toxicidad del insecticida imidacloprid, formulado en distintas combinaciones comerciales, sobre ninfas de quinto estadio de *Triatoma infestans*. FLAP XXIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Santiago de Chile, Diciembre 2017. Disponible en: libro de resúmenes del FLAP XXIV Congreso Latinoamericano de Parasitología, p. 67.
- **Dade M, Bozzolo F, Silvestrini P. Francini F. Mestorino N.** Tolerancia al neonicotinoide, imidacloprid, de ninfas de primer y quinto estadio de *Triatoma infestans* resistentes a deltametrina. FLAP XXIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Santiago de Chile, Diciembre 2017. Disponible en: libro de resúmenes del FLAP XXIV Congreso Latinoamericano de Parasitología, p. 91.

### Publicaciones en revistas internacionales con referato

- **Dadé M, Daniele M, Marín G, Silvestrini P, Mestorino N.** Ivermectin efficacy against *Triatoma infestans* in vivo using hen model. J. Pharm. Pharmacol.. 2014; 2(6):353-358. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Nora\\_Mestorino/publication/265686201\\_Ivermectin\\_efficacy\\_against\\_Triatoma\\_infestans\\_in\\_vivo\\_using\\_Hen\\_model/links/5445a5ff0cf2d62c304d8482/Ivermectin-efficacy-against-Triatoma-infestans-in-vivo-using-Hen-model.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Nora_Mestorino/publication/265686201_Ivermectin_efficacy_against_Triatoma_infestans_in_vivo_using_Hen_model/links/5445a5ff0cf2d62c304d8482/Ivermectin-efficacy-against-Triatoma-infestans-in-vivo-using-Hen-model.pdf)
- **Dadé M, Daniele M, Silvestrini P, Mestorino N.** *In vitro* efficacy of three endectocides against *Triatoma infestans*. Rev. Cubana Med. Trop. 2014;66(3):338-350. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revcu/bmedtro/cmt-2014/cmt143c.pdf>



- **Dadé M, Daniele M, Mestorino N.** Evaluación comparativa de la actividad triatómica de doramectina, ivermectina y eprinomectina administradas *spot-on* y oral en un modelo de rata. Revista Biomédica. 2017;37:324-32. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-41572017000300324&script=sci\\_abstract&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-41572017000300324&script=sci_abstract&lng=en).

## **Aportes originales presentados en esta Tesis**

A continuación, se enumeran, divididas por Capítulos, los aportes originales realizados en este trabajo de Tesis:

En el **Capítulo 2** se describen los ensayos realizados en condiciones de laboratorio, los principales aportes originales fueron las siguientes:

- Mediante ensayos de topicación y de contacto sobre superficies tratadas, se determinó que la actividad letal del fipronil e imidacloprid estuvo influenciada por el estado de desarrollo del insecto y la ingesta de alimento. En cuanto a la influencia del estado de susceptibilidad de los insectos con los piretroides, los resultados mostraron por primera vez una toxicidad similar del fipronil entre las ninfas susceptibles y resistentes a piretroides. En el caso del imidacloprid, en esta Tesis se describe el primer antecedente de un fenómeno de tolerancia por parte de una población de *T. infestans* hacia el insecticida.
- Para constatar la actividad letal por vía oral de los 5 insecticidas evaluados en esta Tesis, se diseñó un alimentador artificial que permitió determinar, de manera novedosa, una actividad tóxica similar de IVM, DRM y EPR en ninfas susceptibles y resistentes de *T. infestans*.

- Los resultados del estudio de la actividad repelente por parte de los insecticidas evaluados, determinaron, sin que exista un antecedente previo, un efecto de repelencia por parte del fipronil sobre ninfas de *T. infestans* susceptibles y resistentes a piretroides.

En el **Capítulo 3** se describen los ensayos de xenointoxicación llevados a cabo en distintos animales, los principales aportes fueron los siguientes:

- En el marco del ensayo de xenointoxicación en ratas Wistar, se describió por primera vez una metodología que permitió estudiar la capacidad letal, las alteraciones en los procesos de diuresis post-ingesta y las posibles modificaciones en el proceso de muda que podrían ocasionar DRM, IVM y EPR en ninfas de *T. infestans*.
- En cuanto a la xenointoxicación llevada a cabo en perros, en el marco de esta Tesis se estudió por primera vez la actividad sobre la letalidad, consumo de alimento y modificaciones en el proceso de muda de los productos comerciales AD, PU y FR en ninfas de *T. infestans*. Los resultados demostraron que la combinación de moléculas en una misma formulación puede ser una alternativa para acrecentar la eficacia y el tiempo de actividad letal en las ninfas de *T. infestans*.
- En este trabajo de Tesis se describe, por primera vez, un ensayo de xenointoxicación diseñado para medir la actividad letal, el consumo de alimento y las posibles modificaciones en el proceso de muda que podrían ocasionar DRM, IVM y EPR administrados en gallinas en ninfas de *T. infestans*. También, se diseñó una metodología para el estudio de la actividad triatómica de las tres lactonas en condiciones de campo. En ambos ensayos, se pudo corroborar actividad letal por parte de los tres endectocidas. En esta Tesis se presenta por primera vez un estudio farmacocinético de IVM, DRM y EPR tras ser administrados en gallinas. Este resultado permitió realizar una integración entre la concentración

plasmática de los endectocidas y la mortalidad observada en las ninfas de *T. infestans*.

En el **Capítulo 4** se estudió del mecanismo de tolerancia al imidacloprid por parte de ninfas de I y V estadio de *T. infestans*.

- Se establece el primer antecedente del uso de los sinergistas PBO y TPP para determinar la actividad de las enzimas Citocromo P450 y esterasas en la tolerancia al imidacloprid. Entre los resultados más importantes, se demostró la actividad de las monooxigenasas P450 en la metabolización del insecticida, esta actividad enzimática fue independiente del estadio de desarrollo de la ninfa, de su condición alimenticia y de su estatus frente a los piretroides.

## Proyectos de investigación sugeridos

Algunas líneas de investigación propuestas a partir de los resultados alcanzados en esta Tesis son:

- Estudiar la actividad letal del imidacloprid en poblaciones de *T. infestans* provenientes de distintas zonas geográficas. La importancia de conocer el perfil toxicológico hacia el imidacloprid presente en distintas poblaciones de vinchucas, permitirá decidir si el imidacloprid debería ser considerado como una molécula alternativa para el control de *T. infestans*.
- Caracterizar, mediante técnicas de biología molecular, las enzimas detoxificantes que pudieran estar involucradas en el fenómeno de tolerancia hacia el imidacloprid descrito en esta Tesis.

- Evaluar la actividad triatómica, tras ser administrados en gallinas, de productos comerciales con IVM, DRM o EPR presente en su formulación.
- Estudiar la mortalidad y cantidad de alimento ingerido por parte de vinchucas alimentadas en perros tratados con productos comerciales con distintas combinaciones de principios activos.