

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**MUTACIONES “kdr” y ENZIMAS ASOCIADAS A LA RESISTENCIA A  
PIRETROIDES EN TRIATOMINOS (HEMIPTERA: REDUVIIDAE), VECTORES  
DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO**

**POR**

**Q.B.P. JESÚS ANTONIO DÁVILA BARBOZA**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ACENTUACIÓN EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA**

**DICIEMBRE, 2017**

MUTACIONES “kdr” y ENZIMAS ASOCIADAS A LA RESISTENCIA A  
PIRETROIDES EN TRIATOMINOS (HEMIPTERA: REDUVIIDAE), VECTORES  
DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO.

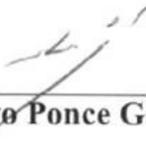
Comité de Tesis



---

**Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez**

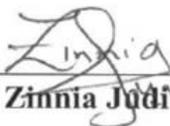
**Presidente**



---

**Dr. Gustavo Ponce García**

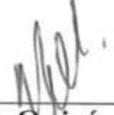
**Secretario**



---

**Dra. Zinnia Judith Molina Garza**

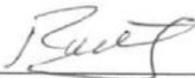
**Vocal**



---

**Dr. Humberto Quiróz Martínez**

**Vocal**



---

**Dr. Raúl Torres Zapata**

**Vocal**

MUTACIONES “kdr” y ENZIMAS ASOCIADAS A LA RESISTENCIA A  
PIRETROIDES EN TRIATOMINOS (HEMIPTERA: REDUVIIDAE), VECTORES  
DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO.

**Dirección de Tesis:**



---

Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez

**Directora**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mí asesora, la Dra. Adriana Elizabeth Flores Suarez, por ser una gran maestra y ejemplo, brindarme su confianza y apoyo, y por sus enseñanzas durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Gustavo Ponce, la Dra. Beatriz López y la Dra. Karina Villanueva por su apoyo y enseñanzas durante el desarrollo del proyecto.

A los Doctores Pablo Manrique y Azael Che y a los MC Alejandro Villegas y Felipe Dzul por su colaboración y apoyo en la recolección de triatominos.

A la Dra. Cristina Bobadilla por su atención y apoyo para obtener las cepas susceptibles.

A mis compañeras de laboratorio Biol. Yamili Contreras y MC Selene Rodríguez por su apoyo y amistad.

Al MC Iram Rodríguez y a la Dra. Gabriela González por su apoyo, enseñanzas y amistad.

A la Dra. Máyela Montes por su gran amistad, complicidad y apoyo.

A mis amigos Alejandra, Martin, Adrian, Luz y Tencho por su apoyo y creer en mí.

A la Dra, Zulema Chaidez, por su apoyo, comprensión e inspiración.

A todas las personas que durante el desarrollo de este trabajo se hicieron presentes, pasaron o se quedaron, pero sobre todo me dejaron alguna enseñanza.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios (clave 275624).

## **Dedicada**

*A mis padres, Antonio Dávila Sanchez y Maria de Jesús Barboza Castro, por su amor, apoyo y confianza.*

# ÍNDICE

CONTROL DE TEMAS	PAGINA
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	i
<b>DEDICATORIAS</b>	ii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	viii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	ix
<b>RESUMEN</b>	xii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	6
<b>HIPÓTESIS</b>	7
<b>OBJETIVOS DEL TRABAJO</b>	8
<b>CAPÍTULO 1. ASPECTOS DE CRIA DE TRIATOMINOS (HEMIPTERA: REDUVIIDAE) PARA PRUEBAS DE EFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE INSECTICIDAS.</b>	9
<b>1.1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1.1. La enfermedad de Chagas.	10
1.1.2. Triatominos en el laboratorio	10
<b>1.2. MÉTODOS</b>	
1.2.1. Sitios de colecta y cría de triatominos	12
1.2.2. Parámetros biológicos	15
<b>1.3. RESULTADOS</b>	
1.3.1. Obtención de material biológico.	17
<i>Triatoma dimidiata</i>	
<i>Triatoma pallidipennis</i>	
<i>Triatoma mazzottii</i>	
<i>Triatoma longipennis</i>	
<i>Triatoma picturata</i>	
1.3.2. Parámetros biológicos	18

<i>T. dimidiata</i>	
<i>T. pallidipennis</i>	
<i>T. longipennis</i>	
<i>T. mazzottii</i>	
<i>T. picturata</i>	
<b>1.4. DISCUSIÓN</b>	25
<b>1.5. BIBLIOGRAFÍA</b>	27
<b>CAPÍTULO 2. ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS EN TRIATOMINOS.</b>	30
<b>2.1. INTRODUCCIÓN</b>	31
<b>2.2. MÉTODOS</b>	
2.2.2. Insecticidas	32
2.2.2 Bioensayos	32
2.2.3.Criterio de mortalidad	32
<b>2.3. RESULTADOS</b>	
2.3.1. Estandarización de bioensayos.	33
<b>2.4. DISCUSIÓN</b>	36
<b>2.5. BIBLIOGRAFÍA</b>	38
<b>CAPÍTULO 3. RESISTENCIA A DELTAMETRINA Y PERMETRINA EN CINCO ESPECIES DE TRIATOMINOS VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS DE MEXICO.</b>	41
<b>3.1. INTRODUCCIÓN</b>	
3.1.1. Control de vectores	43
3.1.2. Control químico	44
3.1.3. Insecticidas	45
3.1.4. Insecticidas piretroides	46
3.1.5. Resistencia a insecticidas piretroides en triatominos	47
<b>3.2. MÉTODOS</b>	
3.2.1. Material biológico	48
3.2.2. Cepas susceptibles de Triatominos	48
3.2.3. Insecticidas	50

3.2.4. Bioensayos	50
3.2.5. Criterio de mortalidad	50
3.2.6. Análisis de resultados	51
3.2.7. Potencial insecticida de deltametrina y permetrina	51
<b>3.3. RESULTADOS</b>	
3.3.1. Resistencia a piretroides en triatominos	52
3.3.1.1. <i>Triatoma dimidiata</i>	52
3.3.1.2. <i>Triatoma pallidipennis</i>	53
3.3.1.3. <i>Triatoma longipennis</i>	53
3.3.1.4. <i>Triatoma mazzottii</i>	53
3.3.1.5. <i>Triatoma picturata</i>	54
3.3.2. Potencial insecticida	57
<b>3.4. DISCUSIÓN</b>	59
<b>3.5. BIBLIOGRAFÍA</b>	61
<b>CAPÍTULO 4. SISTEMAS ENZIMATICOS INVOLUCRADOS EN LA DESINTOXICACIÓN A PIRETROIDES EN CINCO ESPECIES DE TRIATOMINOS VECTORES DE CHAGAS EN MÉXICO.</b>	69
<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b>	
4.1.1. Resistencia a insecticidas	71
4.1.2. Resistencia metabólica	72
4.1.3. Carboxilesterasas	72
4.1.4. Monooxigenasas del Citocromo P <sub>450</sub>	73
4.1.5. Glutation S-tranferasas	74
4.1.6. Resistencia metabólica en triatominos vectores de la enfermedad de Chagas	75
<b>4.2. MÉTODOS</b>	
4.2.1. Determinación in vitro de enzimas de resistencia	76
4.2.2. Preparación del homogenizado	76
4.2.3. Estandarización de las pruebas enzimáticas	76
4.2.4. Determinación de proteínas	77
4.2.4.1. Curva de calibración	77

4.2.5. Determinación de esterasas $\alpha$ y $\beta$	78
4.2.5.1. $\alpha$ -esterasas	78
4.2.5.2. $\beta$ -esterasas	78
4.2.6. Determinación de OFM	78
4.2.7. Determinación de GST	79
4.2.8. Análisis de resultados	79
4.2.9. Clasificación de la resistencia	80
4.2.10. Correlación de la resistencia a los insecticidas piretroides y la actividad enzimática	80
<b>4.3. RESULTADOS</b>	
4.3.1. Estandarización de ensayos enzimáticos	81
4.3.2. Sistemas enzimáticos involucrados en la resistencia a piretroides	81
4.3.3. Correlación de la resistencia en función de la actividad enzimática	88
<b>4.4. DISCUSIÓN</b>	90
<b>4.5. BIBLIOGRAFÍA</b>	92
<b>CAPÍTULO 5. NUEVAS MUTACIONES DE TIPO <i>kdr</i> EN TRIATOMINOS VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MEXICO.</b>	100
<b>5.1. INTRODUCCIÓN</b>	101
<b>5.2. MÉTODOS</b>	
5.2.1. Análisis del dominio II del gen <i>para</i> de los canales de sodio en triatominos	103
5.2.2. Extracción de RNA	103
5.2.3. Síntesis de cDNA	104
5.2.4. Amplificación por PCR	104
5.2.5. Secuenciación del gen <i>para</i> de los canales de sodio	104
5.2.6. Análisis de resultados	105
<b>5.3. RESULTADOS</b>	
5.3.1. Análisis del dominio II del gen <i>para</i> de los canales de sodio en triatominos	106

<b>5.4. DISCUSIÓN</b>	
5.4.1. Diversidad de la mutación <i>kdr</i> , L1014F.	114
5.4.2. Nuevas mutaciones <i>kdr</i> en triatominos	114
<b>5.5. BIBLIOGRAFÍA</b>	117
<b>CAPÍTULO 6. RESISTENCIA A INSECTICIDAS PIRETROIDES Y ACTIVIDAD ENZIMATICA EN HIBRIDOS DE TRES ESPECIES DE TRIATOMINOS.</b>	120
<b>6.1. INTRODUCCIÓN</b>	122
<b>6.2. MÉTODOS</b>	
6.2.1 Obtención de híbridos de triatominos	124
6.2.2 Mantenimiento de la infección por <i>T. cruzi</i>	124
6.2.3 Bioensayos para la determinación de resistencia	125
6.2.4. Determinación de enzimas relacionadas con la resistencia a piretroides	126
<b>6.3. RESULTADOS</b>	
6.3.1 Bioensayos	128
6.3.2 Enzimas involucradas en la desintoxicación	128
<b>6.4. DISCUSIÓN</b>	132
<b>6.5. BIBLIOGRAFÍA</b>	133
<b>CONCLUSIONES</b>	136
<b>RESUMEN BIOGRÁFICO</b>	137

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla 1.1.- Parámetros biológicos de <i>T. dimidiata</i> , <i>T. pallidipennis</i> <i>T. longipennis</i> , <i>T. mazzottii</i> y <i>T. picturata</i> , bajo condiciones de laboratorio.	21
Tabla 3.1. Estadística de los bioensayos y razón de resistencia (RR) para deltametrina en cinco especies de triatominos de México.	55
Tabla 3.2. Estadística de los bioensayos y razón de resistencia (RR) para permetrina en cinco especies de triatominos de México.	56
Tabla 3.3. Potencial insecticida por aplicación tópica de deltametrina con respecto a permetrina en ninfas de primer estadio de cuatro especies de triatominos de México.	57
Tabla 4.1. Cuantificación de la actividad enzimática en Triatominos.	87
Tabla 5.1. Secuencias de los primers utilizados.	103
Tabla 6.1. Estadística de los bioensayos y razón de resistencia (RR) para deltametrina en las especies base y sus híbridos.	129
Tabla 6.2. Cuantificación de la actividad enzimática en híbridos y sus especies base.	131

## ÍNDICE DE FIGURA

<b>Figuras</b>	<b>Pagina</b>
Figura 1.1. Sitios de colecta de las especies de triatominos, <i>T. dimidiata</i> (Baca, Yucatán); <i>T. pallidipennis</i> (Jojutla de Juárez, Morelos); <i>T. longipennis</i> (San Martin de Hidalgo y Manual Doblado), <i>T. mazzottii</i> (Chilapa de Álvarez) y <i>T. picturata</i> (San Martin de Hidalgo), México.	14
Figura 1.2. Ciclo biológico de <i>Triatoma pallidipennis</i> , de ninfa de primer estadio (NI) al adulto.	16
Figura 1.3. Ninfas recién emergidas de <i>Triatoma dimidiata</i> , <i>T. pallidipennis</i> , <i>T. longipennis</i> , <i>T. picturata</i> y <i>T. mazzottii</i> .	19
Figura 1.4.- Adultos, hembras y machos de <i>Triatoma dimidiata</i> , <i>T. pallidipennis</i> , <i>T. longipennis</i> , <i>T. mazzottii</i> y <i>T. picturata</i> .	20
Figura 1.5. - Relación entre la ovoposición diaria y la ovoposición acumulada de <i>Triatoma dimidiata</i> .	22
Figura 1.6. - Relación entre la ovoposición diaria y la ovoposición acumulada de <i>Triatoma pallidipennis</i> .	22
Figura 1.7. - Relación entre la ovoposición diaria y la ovoposición acumulada de <i>Triatoma longipennis</i>	23
Figura 1.8. - Relación entre la ovoposición diaria y la ovoposición acumulada de <i>Triatoma mazzottii</i> .	23
Figura 1.9. - Relación entre la ovoposición diaria y la ovoposición acumulada de <i>Triatoma picturata</i> .	24
Figura 2.1. Mortalidad y recuperación de ninfas de primer estadio de 3, 5 y 7 días de edad, en respuesta a la DL <sub>50</sub> de deltametrina en la cepa susceptible de <i>T. pallidipennis</i> .	34

Figura 2.2. Registro de mortalidad y recuperación a las 24, 48, 72 y 96 horas en ninfas de primer estadio de <i>T. pallidipennis</i> sometidas a la DL <sub>50</sub> de su cepa susceptible.	34
Figura 2.3. Mortalidad y recuperación de ninfas de primer estadio de 3, 5 y 7 días de edad, en respuesta a la DL <sub>50</sub> de permetrina en la cepa susceptible de <i>T. pallidipennis</i> .	35
Figura 2.4. Registro de mortalidad y recuperación a las 24, 48, 72 y 96 horas en ninfas de primer estadio de <i>T. pallidipennis</i> sometidas a la DL <sub>50</sub> de su cepa susceptible.	35
Figura 3.1. Niveles de DL <sub>50</sub> de las poblaciones de campo para deltametrina y permetrina.	58
Figura 4. Cambios fisiológicos relacionados con la resistencia a insecticidas.	71
Figura 4.1. Curva de calibración de albumina de suero bovino para la cuantificación de actividad enzimática	77
Figura 4.2. Diferencia en la cantidad de proteínas totales (PNT) en ninfas de 3, 5 y 7 días de edad.	81
Figura 4.3. Perfiles de actividad enzimática de $\alpha$ -esterasas en triatomos de México.	83
Figura 4.4. Perfiles de actividad enzimática de b-esterasas en triatomos de México.	84
Figura 4.5. Perfiles de actividad enzimática de OFM (CitP <sub>450</sub> ) en triatomos de México.	85
Figura 4.6. Perfiles de actividad enzimática de glutatión s-transferasa en triatomos de México.	86
Figura 4.7. Correlación de actividad enzimática $\alpha$ -esterasas, $\beta$ -esterasas, GST y MFO y su correlación con la susceptibilidad a deltametrina.	88

Figura. 4.8. Expresión de la actividad enzimática de $\alpha$ -esterasas, $\beta$ -esterasas, GST y MFO y su correlación con la susceptibilidad a permetrina.	89
Figura. 5.1.- Representación gráfica del programa de PCR utilizado para la amplificación de los productos de DNA.	105
Figura 5.2. Amplificación por PCR del canal de sodio en gel de agarosa al 2% de las cepas de triatomos de referencia.	106
Figura 5.3. Amplificación por PCR del canal de sodio en gel de agarosa al 2% de las cepas de triatomos silvestres.	107
Figura 5.4. Alineamiento de las secuencias de <i>T. dimidiata</i> (TdY) en comparación con las secuencias de <i>T. infestans</i> .	109
Figura 5.5. Alineamiento de las secuencias de <i>T. pallidipennis</i> (M) en comparación con las secuencias de <i>T. infestans</i> .	110
Figura 5.6. Alineamiento de las secuencias de <i>T. mazzottii</i> de referencia (S) en comparación con las secuencias de <i>T. mazzottii</i> Guerrero (G).	111
Figura 5.7. Alineamiento de las secuencias de <i>T. longipennis</i> de referencia (S) en comparación con las secuencias de <i>T. longipennis</i> Jalisco (J) y <i>T. longipennis</i> Guanajuato (Gto).	112
Figura 5.8. Alineamiento de las secuencias de <i>T. picturata</i> (TpJ) en comparación con las secuencias de <i>T. infestans</i> .	113
Figura 5.9. Distribución en el canal de sodio de las mutaciones asociadas a la resistencia a piretroides en especies de de triatomos.	116
Figura 6.1. Perfiles de actividad enzimática de proteínas totales, $\alpha$ -esterasas, $\beta$ -esterasas, GST y MFO en híbridos de PaxPi y PaxMi y sus especies base.	130

## RESUMEN

La forma vectorial es la principal fuente de transmisión de la enfermedad de Chagas, en esta están involucrados insectos de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Diecinueve de las 31 especies que se encuentran en México están asociadas al humano y todas ellas son capaces de transmitir la enfermedad. Los insecticidas piretroides son recomendados para el control de estos vectores en México. En este trabajo se determinó la susceptibilidad a los insecticidas deltametrina y permetrina en poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Yucatán), *T. pallidipennis* (Morelos), *T. mazzottii* (Guerrero), dos poblaciones de *T. longipennis* (Jalisco y Guanajuato) y *T. picturata* (Jalisco) de México y en comparación con sus respectivas cepas de referencia así como en dos híbridos obtenidos en laboratorio.

Para realizar este trabajo fue necesaria la estandarización de estas especies bajo condiciones de laboratorio similares, permitiendo esto evaluar algunos parámetros biológicos. Además de realizar la estandarización de bioensayos de aplicación tópica, la cuantificación de actividad enzimática y las bases para el análisis molecular para la determinación de mutaciones *kdr*.

Los bioensayos se realizaron en ambas poblaciones –silvestres y de referencia– para determinar los valores de dosis letal media ( $DL_{50}$ ). Con base en ellos se obtuvieron los valores de razón de resistencia ( $RR_{50}$ ), de acuerdo a estos valores las poblaciones de *T. pallidipennis*, *T. mazzottii*, *T. longipennis* y *T. picturata* resultaron resistentes a ambos insecticidas y solo *T. dimidiata* (Yucatán) fue resistente únicamente a permetrina. Además de confirmar la efectividad de deltametrina sobre permetrina en estas especies y poblaciones. La correlación de la actividad enzimática elevada de  $\alpha$ -esterasas y las  $DL_{50}$  de deltametrina nos permite suponer que este mecanismo de desintoxicación se encuentra activo en estas poblaciones. La búsqueda de mutaciones tipo *kdr* dio como resultado la presencia de al menos una mutación en las poblaciones evaluadas. Las secuencias del canal de sodio dependiente de voltaje en *T. dimidiata*, *T. pallidipennis* y *T. picturata* mostró la mutación L1014, para *T. mazzottii* la mutación A943V y en ambas poblaciones de *T. longipennis* la presencia de la mutación K964R.

Este es el primer reporte del estado de susceptibilidad en especies de triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas en México, el hallazgo de diversos mecanismos de resistencia activos como la desintoxicación por  $\alpha$ -esterasas y la presencia de las mutaciones kdr nos da un posible panorama del estado actual de estos vectores en el país, estos resultados nos hacen suponer que es necesario la implementación de un programa de monitoreo de la resistencia a insecticidas en estos vectores de la enfermedad de Chagas.

## ABSTRACT

The vector form is the principal source of transmission of Chagas disease, which involves insects of the subfamily Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Nineteen of the 31 species that occur in Mexico are associated with humans, and all are capable of transmitting the disease. Pyrethroids are the insecticides recommended for the control of these vectors in Mexico. We determined the susceptibility to the pyrethroid deltamethrin of peridomestic populations of *Triatoma dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. mazzottii*, *T. longipennis* and *T. picturata* collected from different regions in Mexico in comparison with a reference strain for each species.

To perform this work, it was necessary to standardize these species under similar laboratory conditions, allowing this to evaluate some biological parameters. In addition to performing the standardization of bioassays for topical application, the quantification of enzymatic activity and the bases for molecular analysis for the determination of *kdr* mutations. Bioassays were performed for the determination of the LD<sub>50</sub> for both field populations and reference strains. According to the RR<sub>50</sub> values, all populations demonstrated altered susceptibility to deltamethrin, with the highest RR<sub>50</sub> for *T. mazzottii* of 27-fold. There was significantly increased activity of  $\alpha$ -esterases in field populations in comparison with its corresponding reference strain. The results of the search of *kdr* mutations related to the resistance to deltamethrin in the evaluated species show the presence of at least one mutation in the field populations, as is the case with individuals of *T. dimidiata*, *T. pallidipennis* and *T. picturata* whose sequence shows the mutation L1014. For *T. mazzottii*, for which the mutation was found, A943V, and for the two populations of *T. longipennis* included in this study, we report the presence of the *kdr* mutation K964R.

Evaluation of the various mechanisms involved in resistance to deltamethrin in triatomines from Mexico could guide us to the real justification for insecticide resistance monitoring. We expect that these findings will provide the basis for improvement of chemical control systems and will lead to the monitoring and management of resistance in triatomine vectors of Chagas disease in Mexico.

## INTRODUCCIÓN

Los triatominos son transmisores de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, y entre las principales especies vectoras en México se encuentran *Triatoma dimidiata* y *Triatoma barberi* con marcada actividad intradomiciliaria, y *T. longipennis*, *T. mazzoti*, *T. pallidipennis*, *T. phyllosomus*, *T. picturata*, *T. gerstaeckeri*, *T. mexicana*, *T. rubida*, *Dipetalogaster máxima*, *Panstrongylus rufotuberculatus* y *Rhodnius prolixus* como especies peridomiciliarias (Salazar-Schettino *et al.* 2010). La enfermedad de Chagas es una enfermedad infecciosa parasítica incurable causada por el parásito protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. La transmisión se lleva a cabo mediante las heces del vector (Silveira y Dias, 2011). Se estima que entre 7 y 8 millones de personas se encuentran infectadas en Latino América (OMS 2016). Durante los últimos años (2013-2016) los casos de la enfermedad de Chagas en México se han incrementado, manteniéndose en su mayoría en los estados de Yucatán, Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Jalisco (SUIVE/DGE, 2013, 2014, 2015, 2016). Para el 2016 en México se reportaron 985 casos de la enfermedad (SUIVE/DGE 2016).

Una amplia gama de métodos de control de vectores se ha probado con el fin de controlar las infestaciones domésticas de triatominos, incluyendo el control biológico de insectos y patógenos, así como una serie de métodos físicos y químicos (Gorla *et al.* 2010). El uso de métodos químicos con la aplicación de insecticidas no resultó como se esperaba, debido a dos principales vías de desintoxicación a los mismos reportadas para *Triatoma infestans*; DDT-dehidroclorinasa y DDT-hidroxilasa resultando ser efectivas en la conversión de DDT a DDE y Kelthane (Zerba 1999).

En México el control de la enfermedad de Chagas y su transmisión vectorial está regulado por la NOM-032-SSA2-2014 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector, en donde se establecen como medidas: el ordenamiento del medio y el uso de insecticidas piretroides. Sin embargo, el control no ha sido efectivo, tal como en otros países en los que la resistencia a insecticidas de tipo piretroide se ha registrado en los principales vectores de la enfermedad en el cono sur, como *T. infestans* (Gorla *et al.*, 2010; Picollo *et al.*, 2005;

Santo-Orihuela *et al*, 2008; Germano *et al*, 2012) y *R. prolixus* (Nelson, 1994; Vassena *et al*, 2000). Los mecanismos de resistencia a insecticidas piretroides más comunes en vectores de la enfermedad de Chagas son de tipo enzimático (Santo-Orihuela *et al*, 2008, Roca *et al*, 2015, Santo-Orihuela *et al*, 2013, Santo-Orihuela *et al*, 2011). No fue hasta el año 2015 cuando se registró por primera vez la presencia de mutaciones tipo *kdr* y su participación en la resistencia a insecticidas piretroides en *T. infestans*, más específicamente las mutaciones L925I y L1014F (Capriotii *et al*, 2014; Fabro *et al*, 2012). La presencia de otras mutaciones de tipo *kdr* no es descartada, dado que, existen más de 60 mutaciones reportadas en artrópodos e insectos de importancia médica y agrícola (Rinkevich *et al*, 2013, Dong *et al*, 2014).

En México, no se contaba con registros documentados sobre la resistencia a insecticidas en triatomíneos, razón por la cual se planteó determinar la presencia de resistencia bioquímica y genética a insecticidas piretroides como herramienta fundamental para el desarrollo de estrategias de control de triatomíneos en nuestro país.

## LITERATURA CITADA

- Capriotti N, Mougabure-Cueto G, Rivera-Pomar R, Ons S. 2014. L925I mutation in the *para*-type sodium channel is associated with pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* from the Gran Chaco Region. *PLoS Negl. Trop. Dis.*; 8:e2659.
- Dong K, Du Y, Rinkevich F, Nomura Y, Xu P, Wang L, Silver K, Zhorov BS. 2014. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem Mol Biol.* 50:1–17.
- Fabro J, Sterkel M, Capriotti N, Mougabure-Cueto G, Germano M, Rivera-Pomar R, Ons S. 2012. Identification of a point mutation associated with pyrethroid resistance in the *para*-type sodium channel of *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Infection, Genetics and Evolution.* 12: 487–491.
- Germano MD, Santo-Orihuela P, Roca-Acevedo G, Toloza AC, Vassena C, Picollo MI, Mougabure-Cueto G. 2012. Scientific Evidence of Three Different Insecticide-Resistant Profiles in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Populations from Argentina and Bolivia. *Source: Journal of Medical Entomology.* 49(6): 1355-1360.
- Gorla D, Ponce C, Dujardin JP, Schofield CJ. 2010. American Trypanosomiasis Chagas Disease. 10 Control Strategies Against Triatominae. Elsevier Inc. pp. 233-245.
- Nelson MJ 1994. Experiencias en el monitoreo de niveles de susceptibilidad de los triatominos a los insecticidas en las Americas. *Acta Toxicol Argentina* 2: 44-48.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector.

OMS. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 2016. [Online]. Disponible en:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> Ultimo acceso: 13/05/17.

Piccolo MI, Vassena C, Santo Orihuela P, Barrios S, Zaidemberg M, Zerba EN, 2005.  
High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field  
treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from northern  
Argentina. J. Med. Entomol. 42: 367-642.

Rinkevich FD, Du Y, Dong K. 2013. Diversity and convergence of sodium channel  
mutations involved in resistance to pyrethroids. Pesticide Biochemistry and  
Physiology. 106: 93–100.

Roca-Acevedo G, Picollo MI, Capriotti N, Sierra I, Santo-Orihuela PL. 2015. Examining  
mechanisms of pyrethroid resistance in eggs of two populations of the Chagas  
disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). J. Med. Entomol.  
52:987–992.

Salazar-Schettino PM, Rojas-Wastavino GE, Cabrera-Bravo M, Bucio-Torres MI,  
Martinez-Ibarra JS, Monroy-Escobar MC, Rodas-Retana A, Guevara-Gómez Y,  
Vences-Blanco MO, Ruiz-Hernandez AL, Torres-Gutiérrez E. 2010. Journal of  
the Selva Andina Research Society. 1 (1): 57–80.

Santo Orihuela PL, Vassena CV, Zerba EN, Picollo MI. 2008. Relative contribution of  
monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans*  
(Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. J. Med. Entomol. 45: 298-  
306.

Santo-Orihuela PL, Picollo MI. 2011. Contribution of general esterases to pyrethroid  
resistant *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and  
Bolivia. Acta Toxicol. Argent. 19:32–40.

Santo-Orihuela PL, Carvajal G, Picollo MI, Vassena CV. 2013. Analysing deltamethrin susceptibility and pyrethroid esterase activity variations in sylvatic and domestic *Triatoma infestans* at the embryonic stage. Mem Inst Oswaldo Cruz; 108:1031-1036.

Silveira AC, Dias JC. 2011. The control of vectorial transmission. Rev. Soc. Bras.-Med. Trop. 44 (2): 52–63.

SUIVE/DGE. 2013- 2015. Secretaría de Salud. Información Epidemiológica de Morbilidad. Disponible en:  
[http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad\\_enfermedad.html](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad_enfermedad.html) [Ultimo acceso: 20/06/2017].

SUIVE/DGE. 2016. Secretaría de Salud. Información Epidemiológica de Morbilidad. Disponible en: <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-90794>. [Ultimo acceso: 20/06/2017].

SUIVE/DGE. 2017. Secretaría de Salud. Información Epidemiológica de Morbilidad. Disponible en:  
<http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/232421/sem23.pdf> [Ultimo acceso: 20/06/2017].

Vassesa CV, Picollo MI. 2003. Monitoreo de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, insectos vectores de la Enfermedad de Chagas. Revista de toxicología en línea. 3: 1-21.

Zerba EN. 1999. Susceptibility and resistance to insecticides of chagas disease vectors. MEDICINA (Buenos Aires). 59 (2): 41-46.

## **JUSTIFICACIÓN**

El uso de insecticidas químicos, ha constituido la herramienta más poderosa y de uso más extendido para controlar las enfermedades transmitidas por vectores. La aplicación sistemática e indiscriminada de plaguicidas y el deterioro de los programas de control se debe en gran parte a la resistencia que los vectores exhiben a los insecticidas.

La resistencia a insecticidas ha sido objeto de múltiples estudios, no solo por ser ejemplo de adaptabilidad de los insectos, sino porque es el principal motivo que favorece la transmisión de muchas enfermedades.

A la fecha no existe un programa de monitoreo de la resistencia de los triatominos a los insecticidas usados para el control de vectores en México. Por lo tanto, el monitoreo de la resistencia a los insecticidas constituye un elemento esencial para el planteamiento de los programas de manejo integral de las enfermedades transmitidas por vectores.

La utilidad de los resultados contribuirá a la selección adecuada de los insecticidas como parte de las herramientas para lograr un control efectivo de las poblaciones de vectores de la enfermedad de Chagas en nuestro país.

## HIPÓTESIS

El uso de insecticidas piretroides para el control de vectores transmisores de enfermedades en México ha ejercido presión de selección/inducción de resistencia a los mismos en poblaciones de *Triatoma pallidipennis*, *T. mazzottii*, *T. longipennis*, *T. picturata* y *T. dimidiata* a través de mecanismos enzimáticos y moleculares.

## OBJETIVOS DEL TRABAJO

### Objetivo general

Determinar los mecanismos enzimáticos y moleculares asociados a la resistencia a piretroides en poblaciones silvestres de *Triatoma pallidipennis*, *T. mazzottii*, *T. longipennis*, *T. picturata* y *T. dimidiata* (Hemíptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas en México.

### Objetivos particulares

Estandarizar las condiciones de la cría bajo condiciones de laboratorio de las especies de triatomos vectores de la enfermedad de Chagas incluidas en el trabajo tales como: *Triatoma pallidipennis*, *T. mazzottii*, *T. longipennis*, *T. picturata* y *T. dimidiata*.

Estandarizar la técnica de bioensayo para la evaluación de la susceptibilidad a insecticidas piretroides para las especies de triatomos incluidas en el estudio.

Identificar el grado de resistencia de poblaciones silvestres de triatomos a los insecticidas piretroides deltametrina y permetrina.

Caracterizar los mecanismos enzimáticos implicados en la resistencia a los piretroides deltametrina y permetrina tales como: Oxidasas de Función Múltiple P<sub>450</sub>, Esterasas y Glutatión S-transferasas.

Determinar la presencia de mutaciones de tipo “kdr” en triatomos de diferentes regiones geográficas de México.

Analizar susceptibilidad a deltametrina en híbridos generados en laboratorio de las especies, *T. pallidipennis* x *T. mazzottii* y *T. pallidipennis* x *T. picturata*..

## CAPÍTULO 1

### ASPECTOS DE CRIA DE TRIATOMINOS (HEMIPTERA: REDUVIDAE) PARA PRUEBAS DE EFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE INSECTICIDAS

#### RESUMEN

El correcto manejo de los triatominos en el laboratorio, principalmente considerando el aspecto de seguridad, por ser estos los principales vectores de la enfermedad de Chagas, es clave para el mantenimiento de una cría continuada con fines de investigación. Factores como la alimentación, temperatura, humedad relativa y fotoperiodo son básicos para el adecuado desarrollo de cada una de las especies.

Las condiciones bajo las que se mantuvieron los ejemplares de *Triatoma dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. picturata* y *T. mazzottii* permitieron su adecuado desarrollo y la obtención del material biológico con las condiciones óptimas para ser usado en bioensayos de efectividad biológica de insecticidas. Se documentaron además algunos parámetros biológicos tales como: fecundidad media diaria y fecundidad total, tiempo promedio de pre-ovoposición, tiempo promedio de intervalo de ovoposición, el tiempo promedio de desarrollo embrionario y porcentaje de eclosión (fertilidad). Los parámetros solo se midieron durante 35 días para todas las especies.

La especie con mayor fecundidad promedio diaria fue *T. dimidiata* con 6 huevos  $\pm 2.55$ ; sin embargo, para esta especie se obtuvo el tiempo medio de pre-ovoposición más largo, de 12.0 días  $\pm 8.66$ . Las hembras de *T. pallidipennis* fueron las que mayor cantidad de huevos depositaron siendo un total de 779. En el caso de *T. longipennis* se registró el mayor porcentaje de eclosión siendo de 94% y el tiempo promedio de eclosión más corto de 20.3 días  $\pm 2.31$ . El menor tiempo promedio de ovoposición se obtuvo para *T. picturata* siendo de 1.94 días  $\pm 0.84$ . Aun así, *T. longipennis* destaca de las demás especies por mostrar una mejor adaptación bajo las condiciones de temperatura ( $26.94 \pm 1.39^{\circ}\text{C}$ ), humedad ( $66.3\% \pm 12.07$ ) y fotoperiodo (12:12, L: O) aquí ensayadas.

## 1.1. INTRODUCCIÓN

### 1.1.1. La enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas es considerada dentro de las enfermedades olvidadas, siendo endémica de América, extendiéndose desde el cono sur hasta el norte de México (Cruz-Reyes y Pickering-López. 2005). Se estima que entre 7 y 8 millones de personas se encuentran infectadas, principalmente en Latino América (OMS 2016), donde aproximadamente de 75-90 millones de personas están expuestas a la infección; se calcula que entre el 20 y el 30% de los humanos infectados con *Trypanosoma cruzi* desarrollan un estado crónico (Rodríguez *et al.* 2009, CDC 2016). En México se han reportado 32 vectores de *T. cruzi*, los géneros *Dipetalogaster* y *Meccus* y otras ocho especies del genero *Triatoma* son exclusivos del país. Trece de estos vectores se encontraron asociados a viviendas humanas de las cuales dos tienen hábitos intradomiciliarios *Triatoma dimidiata* y *Triatoma barberi* por su actividad. En cuanto a las especies peridomiciliarias se tienen registro de *T. longipennis*, *T. mazzottii*, *T. pallidipennis*, *T. phyllosomus*, *T. picturata*, *T. gerstaeckeri*, *T. mexicana*, *T. rubida*, *Dipetalogaster máxima*, *Panstrongylus rufotuberculatus* y *Rhodnius prolixus* (Salazar-Schettino *et al.* 2010).

### 1.1.2. Triatominos en el laboratorio

A pesar de que la biología de las especies de vectores más importantes de la enfermedad de Chagas ha sido estudiada con anterioridad, Zavala *et al.* (2008) registran la biología de *T. pallidipennis* en condiciones de laboratorio; Reyes y Angulo (2008) estudian el ciclo de vida y las condiciones del desarrollo de *T. dimidiata*; pocos trabajos han establecido la cría simultanea de varias especies de Triatominos como Martínez-Ibarra *et al.* (2012) con la cría de *T. protracta*, *T. recurva* y *T. rubida*. La biología y ciclos de vida se han evaluado en otras especies de triatominos vectores de la enfermedad de Chagas

como son *T. dimidiata* por Reyes y Angulo (2008), *T. longipennis* (Martínez-Ibarra *et al.* 2003) y *T. mazzottii* (Martínez-Ibarra *et al.* 2005).

La biología de los triatominos y su cría en laboratorio pueden variar significativamente incluso en poblaciones de la misma especie (Espinoza *et al.*, 2011), en aspectos como el tiempo de defecación, el número de ingestas entre mudas y su tiempo de alimentación; sin embargo, parámetros como el tiempo de eclosión, la fecundidad y el % de fertilidad pasan a ser de mayor importancia para la obtención del material biológico necesario para los protocolos estandarizados de pruebas de efectividad de insecticidas.

## 1.2. MÉTODOS

Las recolectas del material biológico se realizaron en diversos estados de la república, principalmente en el centro y sur del país, de diciembre del 2013 a agosto del 2014 y durante enero del 2015 (Figura 1.1).

### 1.2.1. Sitios de colecta y cría de Triatominos

Poblaciones silvestres de *T. dimidiata* fueron recolectadas un área endémica del municipio de Baca (21°08' N, 89°25' O) en la región Noroeste del estado de Yucatán al sur de México. El control de vectores en esta zona se basa principalmente en el uso de piretroides y a pesar de esto, los triatominos se encontraron dentro de las casas. Este es un municipio pequeño con ~5,357 habitantes; se encuentra ubicado a 28 km de la ciudad de Mérida, Yucatán. El porcentaje de casas infestadas durante la recolecta fue del 71.42%.

La población de *T. pallidipennis* fue recolectada en la localidad de Panchimalco municipio de Jojutla de Juárez, en el estado de Morelos al centro de México (18°36' N, 99°10' O), con asentamiento peridomiciliar. En esta localidad, el control de vectores se basa principalmente en el uso de insecticidas piretroides. Se tiene registro de que, en la capital del estado los índices de colonización llegan hasta un 50% (Ramsey *et al.* 2005). El municipio cuenta con ~35,000 habitantes. Se encuentra a 55.9 km de la ciudad de Cuernavaca, Morelos.

Las especies de *T. longipennis* y *T. picturata* fueron recolectadas en dos diferentes puntos situados en el municipio de San Martin Hidalgo, estado de Jalisco, Ipazoltic y Los Guerrero, respectivamente, en la costa Oeste de México (20°26' N, 103° 55' O). La localidad de Ipazoltic cuenta con ~510 habitantes mientras que los Guerrero con ~674 habitantes. Los registros en este municipio muestran una infestación de 42.3% (la proporción de casas con ninfas o huevos de triatominos) y un 73.7% de colonización doméstica (la proporción de casas con ninfas o huevos de triatominos) (Lozano-Kasten *et al.*, 2008).

Otra de las poblaciones de *T. longipennis* fue recolectada en el municipio de Manuel Doblado, en el estado de Guanajuato, en la región central de México (20°43' N, 101°56' O), este municipio cuenta con el registro de más de 26 localidades infestadas por especies de triatomos (López-Cárdenas, *et al.* 2005).

*T. mazzottii* fue recolectada en Santa Catarina, situado en el municipio de Chilapa de Álvarez, Guerrero, costa oeste de México (10° 32' N, 17° 32' O). Cuenta con ~1750 habitantes y se encuentra a 54.5 km de la ciudad de Chilpancingo, Guerrero. Los indicadores para esta especie muestran una dispersión de 33.3%, colonización de 69.2% e infección natural de 49.6%, así como un 78.2% de hábitat silvestre, 15.8% peridomicilio y 21.5% interdomicilio (Rodríguez-Bataz *et al.* 2011).

La recolección de triatomos silvestres fue realizada mediante la búsqueda activa en el área peridomiciliar y domiciliar de las localidades antes mencionadas. Los insectos capturados y su descendencia fueron criados bajo condiciones controladas de laboratorio.

Las ninfas se mantuvieron hasta llegar a adultos, con los cuales se formaron parejas para su reproducción bajo condiciones de temperatura ( $26.94 \pm 1.39^{\circ}\text{C}$ ), humedad ( $66.3 \pm 12.075\%$ ), fotoperiodo (12:12). La primera alimentación de los individuos silvestres consistió en sangre de conejo, las alimentaciones posteriores se realizaron con sangre de conejo, con una frecuencia de 7 a 15 días. Los individuos adultos, tanto hembras como machos, tuvieron al menos una alimentación con sangre de gallina (*Gallus gallus*) durante su vida en este estadio.



Figura 1.1. Sitios de colecta de las especies de triatominos, *T. dimidiata* (Baca, Yucatán); *T. pallidipennis* (Jojutla de Juárez, Morelos); *T. longipennis* (San Martín de Hidalgo y Manuel Doblado), *T. mazzottii* (Chilapa de Álvarez) y *T. picturata* (San Martín de Hidalgo), México. El mapa fue generado usando el programa ArcGIS 10.4, ESRI (Redlands CA, USA) <http://arcg.is/0G5arr>

### 1.2.2. Parámetros biológicos

Se evaluaron algunos parámetros biológicos como resultado de las observaciones durante el establecimiento de colonias en el laboratorio; la fecundidad media diaria, fecundidad total, fertilidad o tasa de eclosión, tiempo medio de pre-ovoposición, tiempo promedio de intervalo de ovoposición y tiempo de desarrollo embrionario. Estos parámetros se registraron durante un periodo de 5 semanas continuas (35 días).

La fecundidad se expresa como el promedio de huevos por hembra por día (huevos/hembra/día) y fecundidad total durante el período de observación. La fertilidad o tasa de eclosión de huevos como el porcentaje de huevos eclosionados. El tiempo de pre-ovoposición como el tiempo promedio en el que la hembra llega a etapa adulta e inicia el proceso de ovoposición. El tiempo promedio de intervalo de ovoposición como el tiempo entre 2 ovoposiciones subsecuentes. El tiempo promedio de desarrollo embrionario como el tiempo desde la ovipostura hasta la eclosión.

Como referencia, en la figura 1.2 se muestra el ciclo biológico de *T. pallidipennis*, al centro el huevo y en orden secuencial cinco estadios ninfales y el adulto.

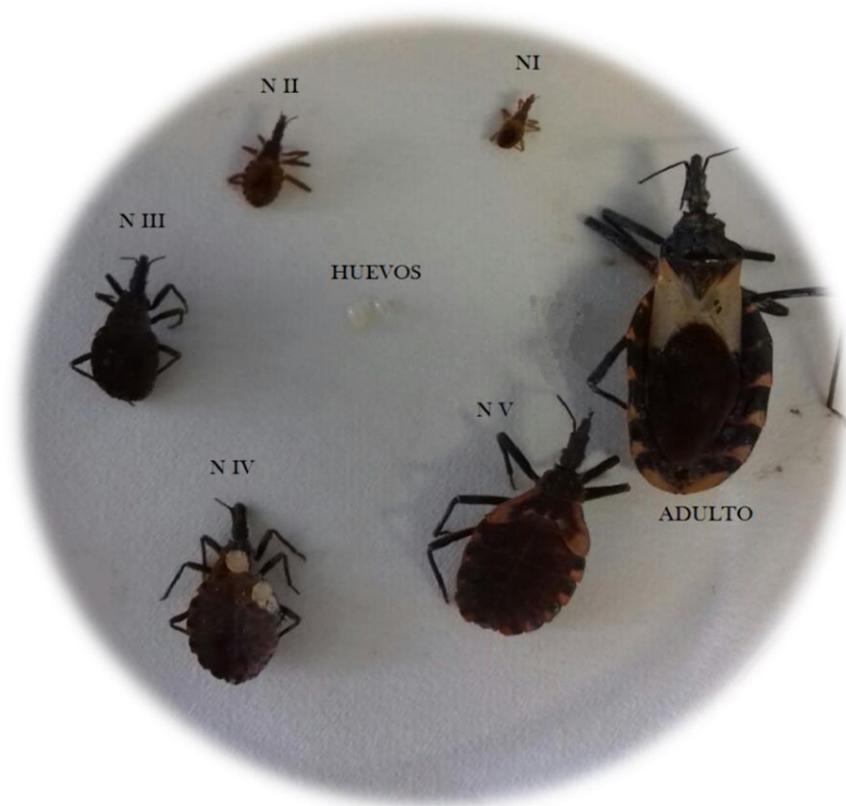


Figura 1.2. Ciclo biológico de *Triatoma pallidipennis*, de ninfa de primer estadio (NI) al adulto.

### 1.3. RESULTADOS

#### 1.3.1. Características de las áreas de obtención de material biológico.

*Triatoma dimidiata*. Se recolectaron ejemplares silvestres en casas de un área endémica del municipio de Baca en la región Noroeste del estado de Yucatán al sur de México. La recolección dio como resultado la obtención de 3 ninfas de primer estadio, 3 más de tercer estadio y dos más de cuarto estadio, así como 8 ejemplares adultos, 6 hembras y 2 machos. Todos los ejemplares fueron recolectados en el área peridomiciliar, en sitios como una madriguera de zarigüeya, en un corral abandonado, cercano a sitio de mascotas, pila de leños y en áreas dónde se almacenan artefactos domésticos y juguetes. El porcentaje de peridomicilios infestados durante la colecta fue de un 71.42%.

*Triatoma pallidipennis*. El resultado de esta colecta fue de 12 hembras y 18 machos, al igual que 46 ninfas de entre segundo y quinto estadio y 37 más de primero. Todos los ejemplares se encontraron en albarrada, considerando estas también como área peridomiciliar. El porcentaje de peridomicilios infestados durante la colecta fue del 100 %.

*Triatoma longipennis*. La recolección de *T. longipennis* en Jalisco, dio como resultado únicamente la obtención de cinco ninfas, éstas entre los estadios dos y cuarto. Los ejemplares recolectados se localizaron fuera del área peridomiciliar pero muy próximos a ésta. Mientras que, la recolección realizada en Guanajuato constó de 10 adultos, 6 hembras y 4 machos con hábitos silvestres, alejados de peridomicilio.

*Triatoma mazzottii*. Para esta especie se obtuvieron 29 ninfas de segundo a cuarto estadio y una pareja de adultos, se encontraron en lugares más alejados de las viviendas, pero aun cercanos al peridomicilio.

*Triatoma picturata*. Un total de 3 adultos, todas ellas hembras y 10 ninfas cuatro de tercer estadio y seis más de cuarto estadio, fueron recolectadas en hábitats silvestres en Jalisco.

### 1.3.2. Parámetros biológicos

Los resultados de los parámetros biológicos se concentran en la tabla 1.1. La figura 1.3 muestra las ninfas de primer estadio de las especies de triatomos. En la figura 1.4 se muestra los adultos de las especies estudiadas.

*T. dimidiata*. La fecundidad media diaria se expresó como el promedio de huevos por hembra por día, la cual fue de  $6 \pm 2.55$ , el valor de tiempo medio de preovoposición fue de  $12.0 \pm 8.66$  días y el intervalo de ovoposición fue de  $2.38 \pm 0.65$  días. La fecundidad total fue de 151 huevos durante los 35 días y el tiempo promedio de desarrollo embrionario fue de  $21.0 \pm 0.01$  días, mientras que, la fertilidad o tasa de eclosión dada por el porcentaje de huevos eclosionados fue del  $29.1\% \pm 1.4$  (Figura 1.5).

*T. pallidipennis*. Para esta especie la fecundidad media diaria fue de  $1.48 \pm 0.94$ , el tiempo de preovoposición fue de  $2.53 \pm 2.14$  días y el intervalo de ovoposición fue de  $2.24 \pm 0.93$  días. La fecundidad total fue de 779 huevos durante los 35 días y tiempo promedio de desarrollo embrionario fue de  $21.54 \pm 0.31$  días, la fertilidad o tasa de eclosión dada por el porcentaje de huevos eclosionados fue del  $84.4\% \pm 0.45$  (Figura 1.6).

*T. longipennis*. En *T. longipennis* se registró una fecundidad media diaria de  $3.12 \pm 2.86$ , el tiempo medio de pre-ovoposición fue de  $7.0 \pm 0.1$  días siendo el mismo valor para el intervalo entre ovoposición. La fecundidad total fue de 228 huevos durante los 35 días y el tiempo promedio del desarrollo embrionario fue de  $20.3 \pm 2.31$  días, la fertilidad o tasa de eclosión fue de  $94\% \pm 0.7$  (Figura 1.7).

*T. mazzottii*. La fecundidad media diaria para la especie fue de  $5.25 \pm 4.6$ , el tiempo promedio de pre-ovoposición fue de  $11.5 \pm 6$  días y el intervalo de ovoposición de  $2.86 \pm 1.7$  días. Con una fecundidad total de 246 durante los 35 días y con un tiempo de desarrollo embrionario promedio de  $23.9 \pm 1.63$ , mientras que, el porcentaje de huevos eclosionados fue de un  $28\% \pm 1.98$  (Figura 1.8).

*T. picturata*. La fecundidad media diaria fue de  $4.1 \pm 2.59$ , el valor de tiempo promedio de pre-ovoposición fue de  $7.5 \pm 0.71$  días y el intervalo de ovoposición de  $1.94 \pm 0.84$  días. La fecundidad total durante 35 días fue de 253 y el tiempo promedio de desarrollo embrionario fue de  $21.56 \pm 1.58$  días, el porcentaje de huevos eclosionados fue del  $41.5\% \pm 6.3$  (Figura 1.9).

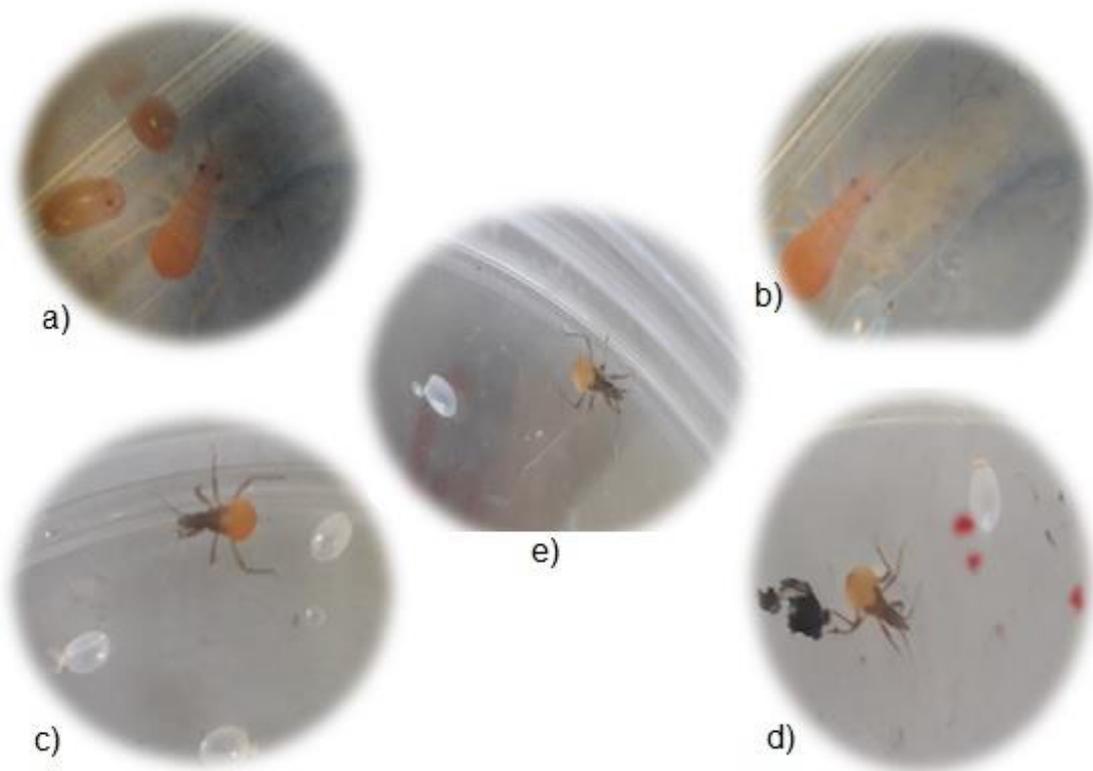


Figura 1.3. Ninfas recién emergidas de a) *Triatoma dimidiata*, b) *T. pallidipennis*, c) *T. longipennis*, d) *T. picturata* y e) *T. mazzottii*.



Figura 1.4.- Adultos, hembras y machos de a) *Triatoma dimidiata*, b) *T. pallidipennis*, c) *T. longipennis*, d) *T. mazzottii* y e) *T. picturata*.

Tabla 1.1.- Parámetros biológicos de *T. dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. mazzottii* y *T. picturata*, bajo condiciones de laboratorio.

Parámetro	<i>T. dimidiata</i>	<i>T. pallidipennis</i>	<i>T. longipennis</i>	<i>T. mazzottii</i>	<i>T. picturata</i>
	X ± DE	X ± DE	X ± DE	X ± DE	X ± DE
<b>Fecundidad media diaria</b>	6 ± 2.55	4 ± 2.9	3.12 ± 2.86	5.25 ± 4.6	4.1 ± 2.59
<b>Tiempo de preovposición (días)</b>	12 ± 8.66	9.38 ± 1.93	7 ± 0.1	11.5 ± 6	7.5 ± 0.71
<b>Intervalo de ovoposición (días)</b>	2.38 ± 0.65	2.24 ± 0.93	7 ± 0.1	2.86 ± 1.7	1.94 ± 0.84
<b>Fecundidad total</b>	151	779	228	246	253
<b>Tiempo de desarrollo embrionario (días)</b>	21.0 ± 0.01	21.54 ± 0.31	20.3 ± 2.31	23.9 ± 1.63	21.56 ± 1.58
<b>Porcentaje de eclosión</b>	29.1	84	94	28	41.5

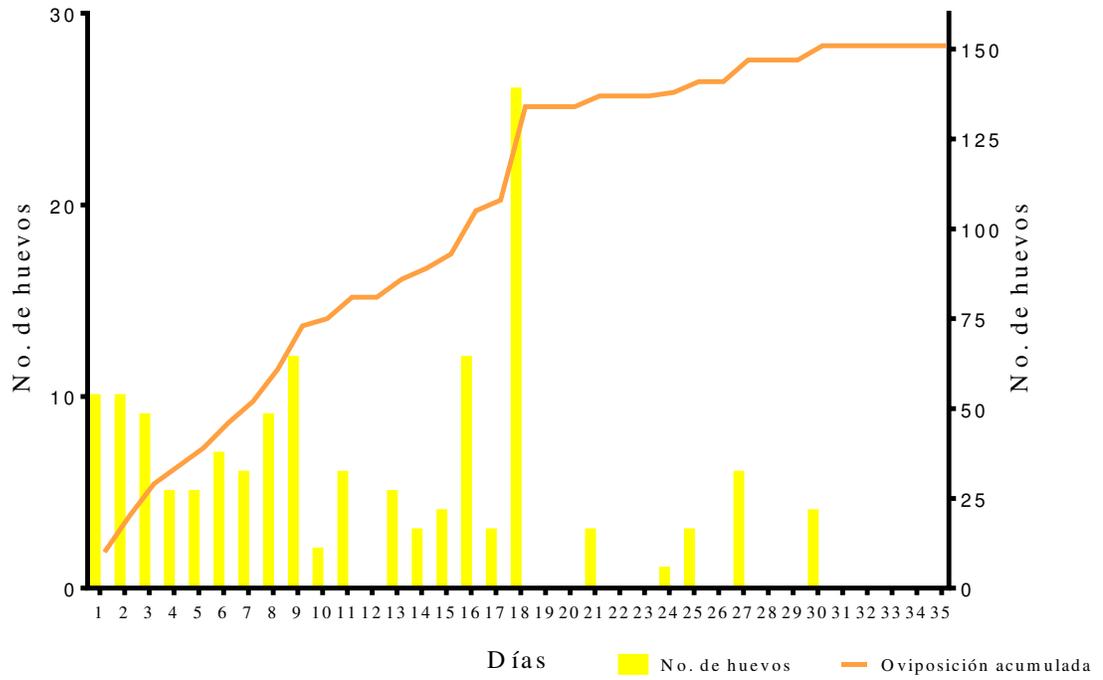


Figura 1.5. - Relación entre la oviposición diaria y la oviposición acumulada de *Triatoma dimidiata*.

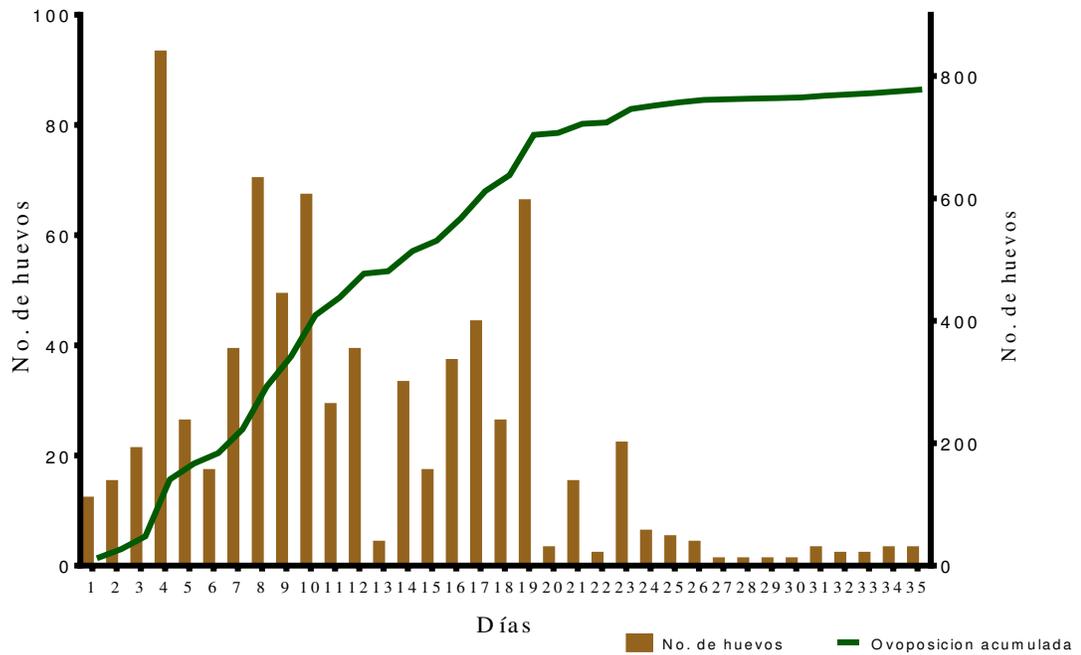


Figura 1.6. - Relación entre la oviposición diaria y la oviposición acumulada de *Triatoma pallidipennis*.

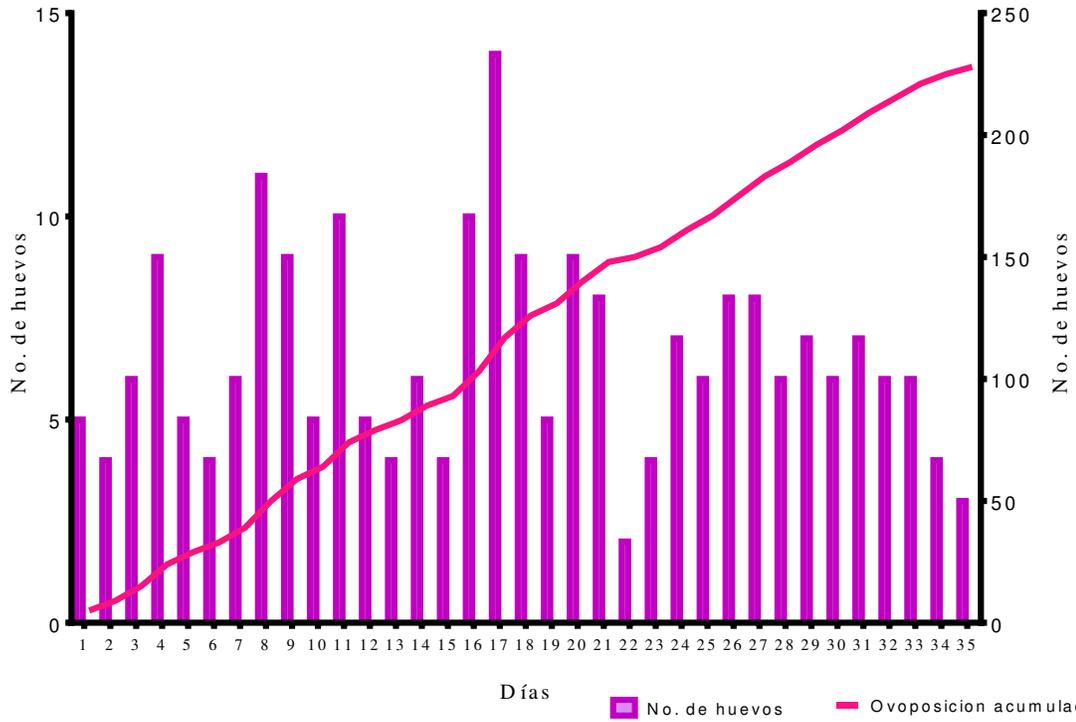


Figura 1.7. - Relación entre la ovoposición diaria y la ovoposición acumulada de *Triatoma longipennis*

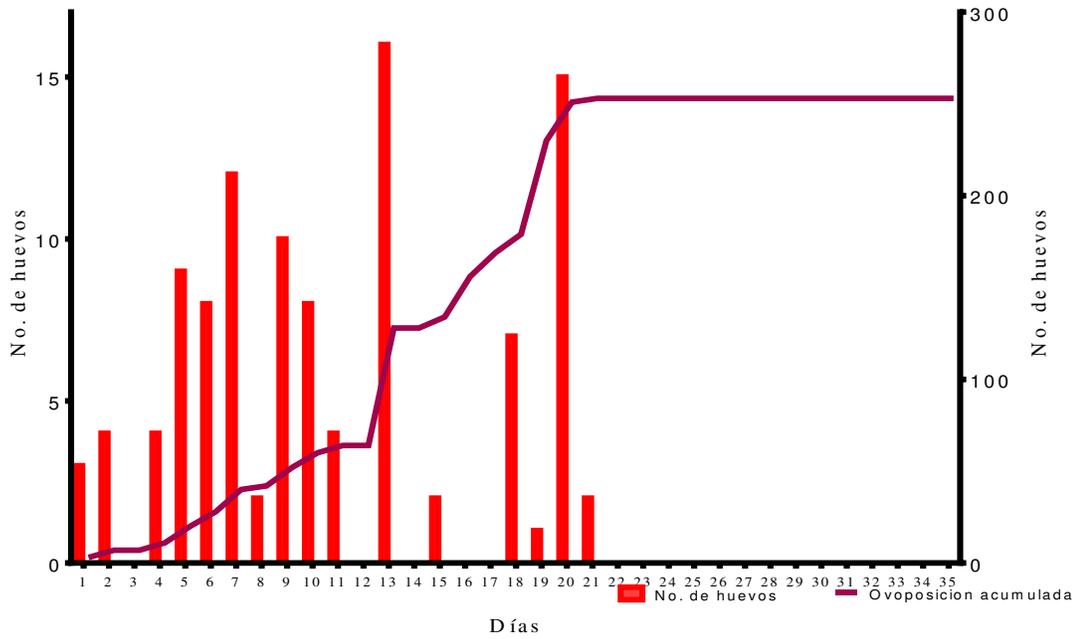


Figura 1.8. - Relación entre la ovoposición diaria y la ovoposición acumulada de *Triatoma mazzottii*.

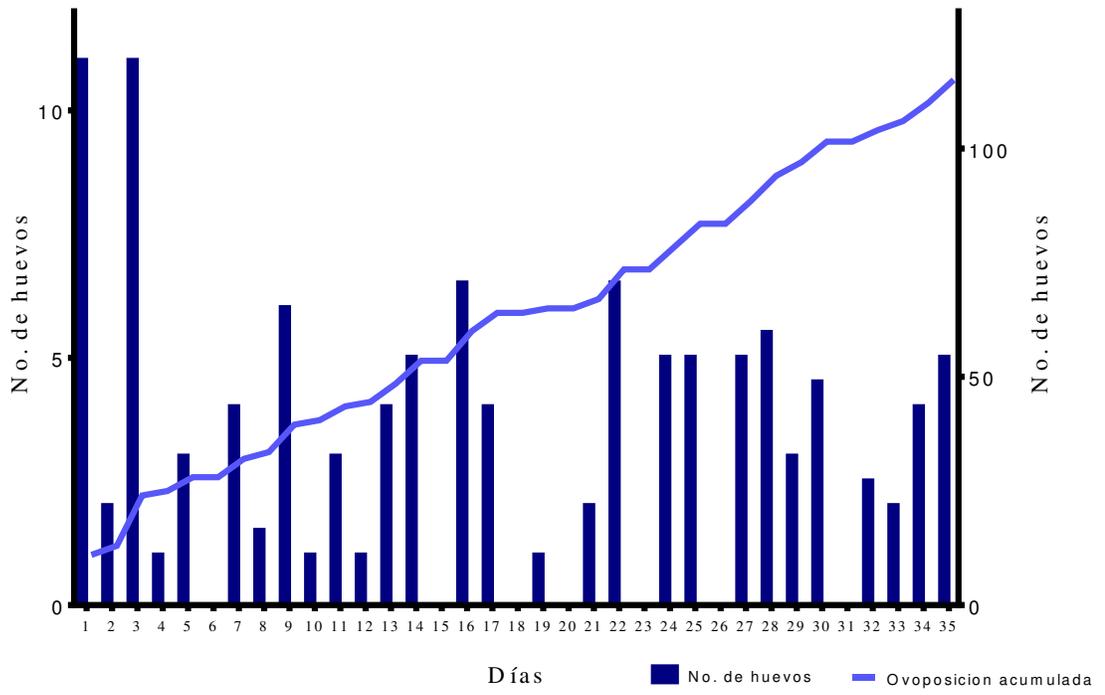


Figura 1.9. - Relación entre la ovoposición diaria y la ovoposición acumulada de *Triatoma picturata*.

## 1.4. DISCUSIÓN

El proceso de cría de cinco especies de triatominos recolectadas de diferentes regiones de México, cuatro de ellas pertenecientes al complejo *Phyllosoma* (Bargues *et al.*, 2008) se llevó a cabo en las siguientes condiciones de laboratorio: temperatura ( $26.94 \pm 1.39^{\circ}\text{C}$ ), humedad ( $66.3\% \pm 12.07$ ) y fotoperiodo (12:12, L:O). Esta consideración es esencial ya que los bioensayos deberán realizarse en poblaciones directas de campo o máximo en individuos de la generación  $F_1$  (Espinoza *et al.*, 2011).

*T. dimidiata* fue la especie que presentó una fecundidad media diaria mayor ( $6.0 \pm 2.55$  H/d/♀) pero una menor fecundidad total (151 huevos). La que registró un menor tiempo medio de preovoposición fue *T. longipennis* ( $7.0 \pm 0.1$  días), *T. picturata* mostro un intervalo de ovoposición menor al resto de las especies, de  $1.94 \pm 0.84$  días. El menor tiempo de desarrollo embrionario fue de  $20.3 \pm 2.31$  días para *T. longipennis*.

Otros ensayos como los realizados por Reyes y Angulo (2009) en *T. dimidiata* quienes mantienen condiciones de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$  y una HR de 70 – 80% obtienen tiempos de desarrollo embrionario más largos ( $28$  días  $\pm 2$ ) que los registrados en este trabajo, de  $21$  días  $\pm 0.01$ , sin embargo, registran un 0% de mortalidad en huevos. Nuestro parámetro de temperatura controlada fue similar a la evaluada por Tay *et al.* (2008) de  $25$  a  $28^{\circ}\text{C}$  para el mantenimiento de *T. pallidipennis*, pero con diferencia en el parámetro de humedad relativa, bajo estas condiciones registraron un tiempo de eclosión mucho mayor ( $35$  días) que el nuestro ( $21.52$  días), así como, el tiempo de preovoposición que reportan de  $50$  a  $60$  días en contraste al obtenido en nuestros resultados de  $9.38$  días, demostrando que nuestras condiciones de temperatura y HR son mejores para esta especie. Ejemplares de *T. longipennis* mantenidos en condiciones de  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$  y HR de  $80\% \pm 5$  mostraron un porcentaje de eclosión del  $76.7\%$  y un tiempo promedio de eclosión de  $19.8$  días (Martínez-Ibarra *et al.* 2003), este último parámetro similar al nuestro de  $20.3$  días, pero nuestro porcentaje de eclosión fue mucho mayor,  $94\%$ . Para *T. mazzottii* Martínez-Ibarra *et al.* (2005) registran una fecundidad media de  $2.9$  H/♀/d/ y un porcentaje de eclosión del  $76.9\%$  en condiciones de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2$  y una HR de  $70\% \pm 10$  muy similares a las nuestras, sin embargo, obtuvimos un porcentaje de eclosión de  $28\%$  pero una mayor

fecundidad media diaria de 5.25 H /♀/d. Las condiciones de fotoperiodo (12:12 L: O) fueron idénticas en todos los estudios mencionados.

Los patrones de fecundidad y fertilidad resultaron óptimos para la obtención del material biológico para llevar a cabo los bioensayos de susceptibilidad a insecticidas bajo condiciones de temperatura ( $26.94 \pm 1.39^{\circ}\text{C}$ ), humedad ( $66.3\% \pm 12.07$ ) y fotoperiodo (12:12, L: O). Aun así, *T. longipennis* destaca de las demás especies por mostrar una mejor adaptación bajo estas condiciones.

## 1.5. BIBLIOGRAFÍA

- Cruz-Reyes A, Pickering-López JM. 2005. “CHAGMEX 1928-2004” sobre la enfermedad de Chagas en México con un enfoque biológico geográfico y socioeconómico. pp. 1-14.
- Bargues D., Klisiowicz, Gonzalez-Candelas, Ramsey J., Monroy C., Ponce C., Salazar-Schettino P., Panzera F., Abad-Franch F., Sousa O., Schofield C., Dujardin J., Guhl F., Mas-Coma S. 2008. Phylogeography and Genetic Variation of *Triatoma dimidiata*, the Main Chagas Disease Vector in Central America, and Its Position within the Genus *Triatoma*. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2(5): e223.
- Espinoza J., Bustamante M., García A. Tenorio Q., Noireau F., Rivera D., Rojas Cortez M. 2011. Biología reproductiva de dos poblaciones de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) en condiciones de laboratorio. Gac Med Bol 2011; 34 (2): 66-70.
- OMS. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 2016. [Online]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> Ultimo acceso: 13/05/17.
- López-Cárdenas, J., Gonzalez, B., FE. Salazar, S. PM., Gallaga, S, JC, Ramírez, B. E., Martinez, M. J., Sanchez-Cordero, V., Townsend, P. A., Ramsey, JM. 2005. Fine-Scale Predictions of Distributions of Chagas Disease Vectors in the State of Guanajuato, Mexico. Journal of Medical Entomology. 42(6): 1068-1081.
- Lozano-Kasten, F., Magallón-Gastélum, E., Soto-Gutiérrez, M., Kasten- Monges, M., Bosseno, M.-F., & Brenière, S. F. 2008. Epidemiologic knowledge and current situation of Chagas disease in the state of Jalisco, Mexico. Salud Pública Mexico. 50(6), 508–515.

- Martínez-Ibarra, JA., Edgar Paredes-González, Ángel-Licón-Trillo, Oziel Dante Montañez-Valdez, Gonzalo Rocha-Chávez, Benjamín Noguera-Torres. 2012. The biology of three Mexican-American species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): *Triatoma recurva*, *Triatoma protracta* and *Triatoma rubida*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 107 (5): 659-663.
- Martínez-Ibarra J. A., Noguera-Torres B., Paredes González E., Alejandre-Aguilar R., Solorio-Cibrián M., Barreto S. P., Gómez-Estrada H. I., y Trujillo-García J. C. 2005. Development of *Triatoma rubida sonora*, *Triatoma barberi*, and *Meccus mazzottii* (heteroptera, reduviidae) under laboratory conditions. Journal of the American Mosquito Control Association, 21(3):310-315.
- Martínez-Ibarra, Grant-Guillén y Martínez-Grant. 2003. Feeding, Defecation, and Development Times of *Meccus longipennis* Usinger, 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under Laboratory Conditions. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 98 (7): 899-903,
- Ramsey, J. M., Alvear. A.L., Ordoñez, R., Muñoz, G., Garcia, A., Lopez, R. Leyva, R. 2005. Risk factors associated with house infestation by the Chagas disease vector *Triatoma pallidipennis* in Cuernavaca metropolitan area, Mexico. Medical and Veterinary Entomology. 19, 219-228.
- Reyes M., Angulo VM., 2008. Ciclo de vida de *Triatom dimidiata* Latreille, 1811 (Hemiptera, Reduviidae) en condiciones de laboratorio: producción de ninfas para ensayos biológicos. Biomedica. 29: 119 – 126.
- Rodrigues Coura J, Pinto Dias JC. 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 104 (1): 31-40.

Rodríguez-Bataz, E., Noguera-Torres, B., Rosario-Cruz, R., Martínez- Ibarra, J. a., & Rosas-Acevedo, J. L. 2011. Triatominos (Hemiptera: Reduviidae) vectores de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 en el estado de Guerrero, México. Rev. Biomed, 22, 21–27.

Salazar-Schettino PM, Rojas-Wastavino GE, Cabrera-Bravo M, Bucio-Torres MI, Martínez-Ibarra JA, Monroy-Escobar MC, Rodas-Retana A, Guevara-Gómez Y, Vences-Blanco MO, Ruiz-Hernandez AL, Torres-Gutiérrez E. 2010. Journal of the Selva Andina Research Society. 1 (1): 57–80.

Zavala J., Sanchez J., Calderon L., Romero R., Ruis D., Garcia J. 2008. Estudio del ciclo biológico de *Triatoma pallidipennis* (Stal 1872) y otros aspectos sobre su biología. Rev Fac Med UNAM. 52 (2): 56 – 59.

## CAPÍTULO 2

### ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS PARA PRUEBAS DE EFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE INSECTICIDAS EN TRIATOMINOS.

#### RESUMEN

En la última década y media, los reportes de la resistencia a insecticidas se han incrementado. El estudio de la susceptibilidad mediante bioensayos toxicológicos y la búsqueda de los mecanismos involucrados en la resistencia a insecticidas tales como enzimáticos y moleculares, son de gran importancia para su adecuado manejo. Sin embargo, la falta de una metodología adecuada para la determinación de la susceptibilidad y los mecanismos involucrados hace de gran dificultad su monitoreo y manejo adecuado. Diversas técnicas se han implementado, sin embargo, no se cuenta con un estándar general que pueda aplicarse para todas las especies de triatomos. Se logró la estandarización del bioensayo por aplicación tópica para la evaluación de la susceptibilidad en cinco especies de triatomos de México. Ninfas de primer estadio de 7 días de edad y en estado de inanición fueron óptimas para las especies de *Triatoma dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. mazzottii* y *T. picturata* en los bioensayos con los insecticidas piretroides permetrina y deltametrina. El registro de mortalidad se realizó a las 24 horas post-exposición, que resultó el tiempo adecuado. Las condiciones para realizar los bioensayos por aplicación tópica de los insecticidas evaluados en este trabajo son reproducibles y óptimos para otras especies de triatomos, tomando en cuenta la aplicación en la parte ventral de las ninfas I, llevar a cabo los bioensayos en la primera generación filial (F<sub>1</sub>) proveniente de los parentales recolectados en campo. El usar ninfas de primer estadio proporciona ventaja con respecto a reunir la cantidad de material biológico requerido para establecer susceptibilidad además de que se acortan los intervalos para llevar a cabo los bioensayos.

## 2.1. INTRODUCCIÓN

El bioensayo por aplicación tópica es un método ampliamente aceptado, principalmente en insectos cuyo tamaño es adecuado para la aplicación de una gota del insecticida. Las ventajas de este método incluyen bajo costo inicial, cantidades muy pequeñas de tóxico necesario, rapidez de tratamiento y resultados consistentes y reproducibles inter-laboratorios.

El lugar de aplicación sobre el cuerpo es importante, y el área elegida puede variar con cada especie. Muchas aplicaciones tópicas se hacen en el dorso del protórax, como por ejemplo en *Musca domestica* mientras que en otras especies se hace sobre el esternón, entre las patas. Los insectos con cutícula dura y cerosa que son difíciles de humedecer, por ejemplo, en cucarachas pueden tratarse sobre una membrana o bajo las alas. Por ejemplo, para el picudo del algodónero (*Anthonomus grandis*) se tratan en la superficie dorsal cerca de la sutura entre el abdomen y el tórax, una regla general es elegir un sitio cerca de la cabeza. Dado que las variaciones del lugar de aplicación pueden dar lugar a un cambio de eficacia, éste debe normalizarse con cada especie de la manera más precisa posible (Reynolds, 1962; Immaraju *et al.*, 1990). La dosis colocada en cualquier parte de un insecto debe adherirse adecuadamente para prevenir su remoción por limpieza u otros movimientos del insecto. Por lo tanto, los líquidos aplicados no deben ser excesivos (Busvine, 1957).

Otros factores clave para la evaluación de susceptibilidad por aplicación tópica son: el estadio del insecto, su peso, su estado de inanición y edad. Siguiendo las indicaciones de la OMS (2005) los criterios para la evaluación de la susceptibilidad en triatomos por aplicación tópica serán independientes para cada especie; sin embargo, teniendo en cuenta la importancia de esta enfermedad en México y la gran diversidad de vectores presentes en el país (Salazar-Schettino *et al.*, 2010) una técnica estandarizada para varias especies es clave para su correcto monitoreo.

El objetivo de esta estandarización fue determinar las condiciones óptimas para realizar los bioensayos con la técnica de aplicación tópica en cinco especies de *Triatoma dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. mazzottii*, *T. picturata* bajo las mismas condiciones de alimentación, estadio, edad y peso.

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. Insecticidas.

La evaluación se realizó utilizando los insecticidas deltametrina (99.5% pureza) (ChemService, West Chester, PA. 250 mg) y permetrina (99.5% pureza; mezcla de isómeros) (ChemService, West Chester, PA. 250 mg).

### 2.2.2. Bioensayos.

Siguiendo el protocolo de la OMS (2005), ninfas de primer estadio de *T. pallidipennis* sin alimentar de 3 a 7 días de edad, con un peso promedio de  $1.76 \pm 0.56$  mg fueron utilizadas para los bioensayos por aplicación tópica con un volumen de 0.2  $\mu$ l de solución acetónica del principio activo insecticida, en la parte dorsal del abdomen de cada insecto, con un microaplicador (Microliter Syringe Hamilton 0.5  $\mu$ l con Repeating Dispenser, Hamilton Co®). Se utilizaron 10 ninfas por dosis con un mínimo de dos repeticiones. Los insectos se colocaron en recipientes de boca ancha con papel plegado en su interior y cubierto con tela de gasa (OMS, 2005). Las condiciones ambientales post-tratamiento fueron: 25-30°C y 50-70% HR.

### 2.2.3. Criterio de mortalidad.

La evaluación de la mortalidad se realizó a las 24, 36, 72 y 96 h posteriores a la exposición a los insecticidas piretroides. Se consideraron muertas aquellas ninfas con la inhabilidad de caminar del centro de una caja petri (100x15mm) con un papel filtro en el interior (157 mm diámetro) hacia su borde. Solo aquellas ninfas que fueron capaces de caminar hasta el borde con o sin estimulación mecánica fueron consideradas como vivas. Los grupos control consistieron en 10 insectos con el mismo volumen de acetona utilizado en los tratamientos.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Estandarización de bioensayos.

Para evaluar el parámetro de edad de ninfa 1 y establecer el tiempo óptimo de edad de la ninfa para la evaluación de la susceptibilidad se usó como estándar los valores de  $DL_{50}$  (107.92 ng/insecto para deltametrina y 1573.38 ng/i para permetrina) en la cepa susceptible de *T. pallidipennis*. Los resultados de los bioensayos por aplicación tópica mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las edades a las que fueron evaluadas las ninfas (3, 5, 7 y 9 días), ninfas de 3 días de edad mostraron una mayor recuperación (hasta el 100% de los individuos recuperaron su actividad motriz), en aquellas con 5 días de edad el 50% de las ninfas se recuperaron, únicamente las ninfas de 7 días de edad no tuvieron recuperación (Figura 2.1 y 2.3). Respecto al tiempo de registro de la mortalidad se realizó a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la aplicación tópica, únicamente la lectura a las 24 horas no registró recuperación (Figura 2.2 y 2.4).

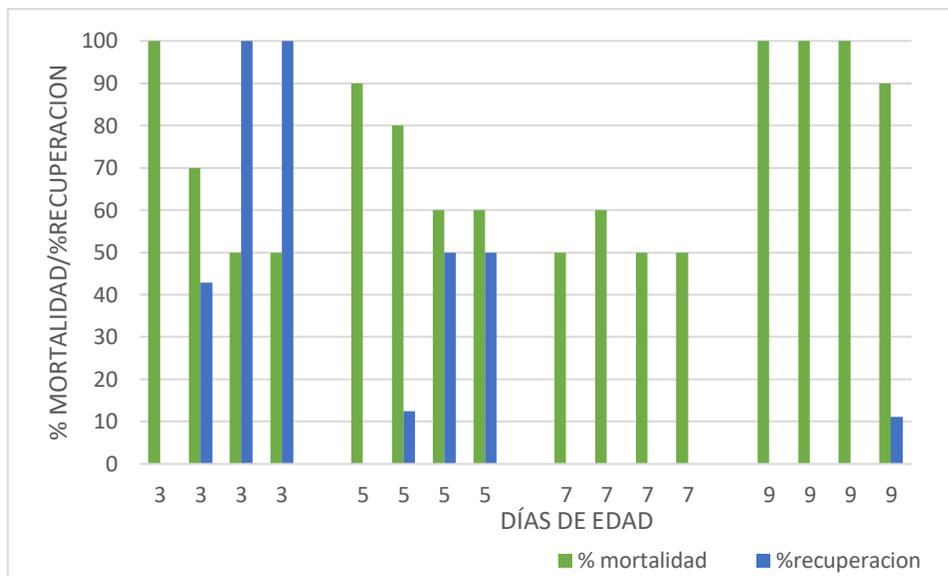


Figura 2.1. Mortalidad y recuperación de ninfas de primer estadio de 3, 5 y 7 días de edad, en respuesta a la  $DL_{50}$  de deltametrina en la cepa susceptible de *T. pallidipennis*.

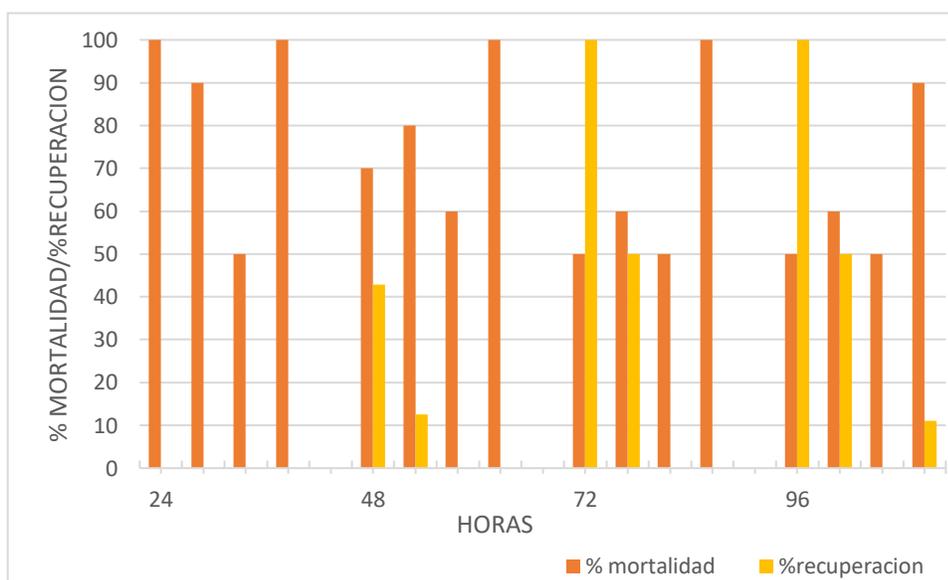


Figura 2.2. Registro de mortalidad y recuperación a las 24, 48, 72 y 96 horas en ninfas de primer estadio de *T. pallidipennis* sometidas a la  $DL_{50}$  de deltametrina de su cepa susceptible.

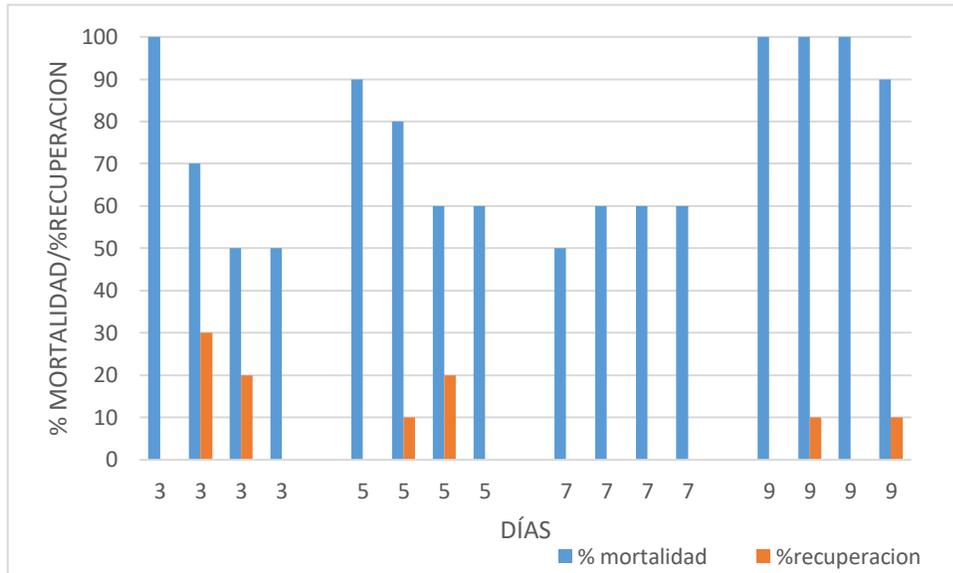


Figura 2.3. Mortalidad y recuperación de ninfas de primer estadio de 3, 5 y 7 días de edad, en respuesta a la  $DL_{50}$  de permetrina en la cepa susceptible de *T. pallidipennis*.

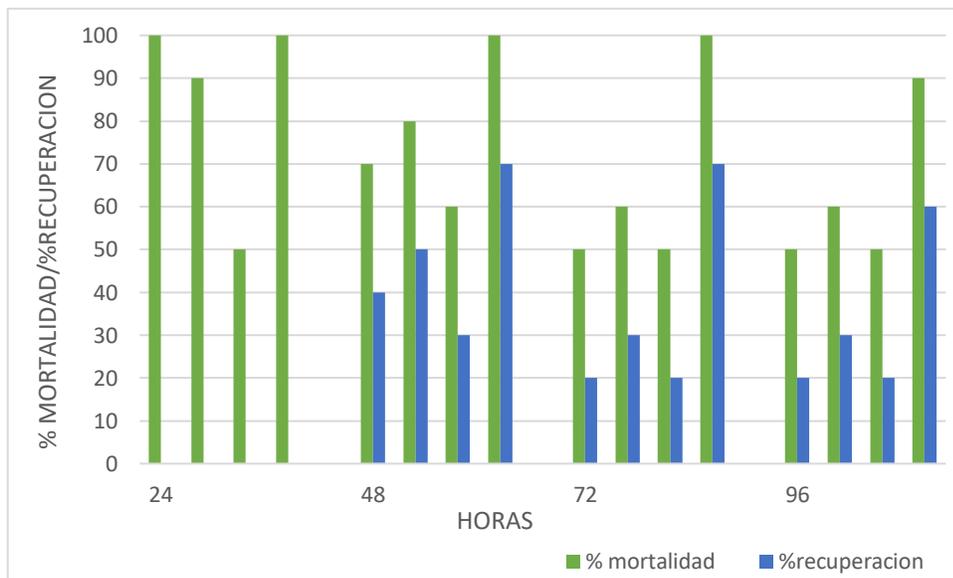


Figura 2.4. Registro de mortalidad y recuperación a las 24, 48, 72 y 96 horas en ninfas de primer estadio de *T. pallidipennis* sometidas a la  $DL_{50}$  de permetrina de su cepa susceptible.

## 2.4. DISCUSIÓN

Se evaluaron las condiciones de bioensayo para *T. pallidipennis*, como un estándar para establecer las condiciones de bioensayo en laboratorio para triatominos. Los resultados mostraron que las condiciones óptimas son, realizar bioensayos en ninfas de primer estadio y de 5 a 7 días de edad, contrario a lo reportado por D'Avila-Pessoa *et al.*, (2015) quién establece que los bioensayos deben realizarse en ninfas 1 de 3 días de edad para *T. sordida*. Sin embargo, si hay concordancia con respecto a la privación de alimento y la homogeneidad en el peso, dependiendo de la especie. Con respecto a la aplicación de la gota de insecticida en la parte ventral del abdomen, no existe algún reporte sobre la importancia de aplicar la gota sobre el abdomen o sobre el dorso, esto también señalado por Fontan y Zerba (1987). Por otra parte, el tiempo de registro de la mortalidad es otro punto controversial, aun y cuando se han realizado trabajos en especies como *T. infestans* (Santo-Orihuela *et al.* 2011; Roca-Acevedo *et al.* 2015); difiriendo entre ellos este parámetro. Incluso en esos mismos reportes existe variación en la edad de las ninfas.

Vassena *et al.* (2000) y Reyes *et al.* (2007) evalúan la mortalidad a las 72 hrs post-exposición en *T. infestans*, *Rhodnius prolixus*, *T. dimidiata* y *T. maculata* de primer estadio, basados en el protocolo de la OMS (2005), el cual sugiere realizar el registro de mortalidad a las 72 horas en ninfas de V estadio y adultos. Otros autores como Gonzalez-Audino *et al.* (2004), Picollo *et al.* (2005) y Santo-Orihuela *et al.* (2008) en ensayos con aplicación tópica en *T. infestans*, evalúan la mortalidad a las 24 horas en ninfas de 3 días de edad. D'Avila-Pessoa *et al.* (2015) realizan un trabajo similar al presente, en el que sugiere la evaluación de la susceptibilidad en ninfas de primer estadio de 3 días de edad, pero analizan la influencia de diversos factores como son, la diferencia entre las generaciones F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub>, la aplicación en la parte ventral o dorsal del abdomen de las ninfas, la determinación de dosis diagnóstico y la evaluación de la mortalidad a las 24 y 72 horas en ninfas de 5 días de edad. Teniendo en cuenta lo reportado por Fontan y Zerba (1987) quienes determinaron que en insectos más jóvenes

la penetración del insecticida por aplicación tópica es más rápida optamos por realizar los registros de mortalidad en ninfas 1 de 5 a 7 días de edad y el registro de la mortalidad a las 24 post-exposición, coincidiendo a la vez con estudios recientes como los de Germano *et al.* (2012) y Santo-Orihuela *et al.* (2017) quienes realizan bioensayos por aplicación tópica en ninfas de 5 a 7 días con registro de mortalidad a las 24 horas.

Considerando lo anterior la estandarización de los bioensayos en el presente estudio se resumen de la siguiente manera: ninfas 1, de 5 a 7 días de edad sin alimentación posterior a su eclosión. La aplicación de la gota de insecticida en la parte ventral del insecto y el registro de la mortalidad a las 24 horas post-exposición; no obstante, se recomienda la estandarización previa a la evaluación para otras especies.

## 2.5. BIBLIOGRAFÍA

- Busvine J. R. 1957. A CRITICAL REVIEW OF THE TECHNIQUES FOR TESTING INSECTICIDES. Chapter VIII. —Apparatus for injection or application of insecticide to individual insects. Entomological applied to Hygiene, London School of Hygiene and Tropical Medicine.
- D'Avila Pessoa G., Cavalari L., Leencine M., Vaz De Mello B., Diotaiuti L. 2015. Standarization of laboratory bioassays for the study of *Triatoma sordida* susceptibility to pyrethroid insecticide. Parasites & Vectors. 8:109.
- González Audino P., Vassena C., Barrios S., Berba E., Picollo M. 2004. Role of Enhanced Detoxification in a Deltamethrin-Resistant Population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) From Argentina. Mem. Inst Oswaldo Cruz. 99(3): 335 – 339.
- Immaraju J. A., Morse J. G. and Brawner O. L. 1990. Evaluation of three bioassay techniques for citrus thrips' resistance and correlation of the leaf dip method to field mortality. J. Agric. Entomol. 7(1); 17-27.
- Picollo, M. I., Vassena, C., Santo Orihuela, P., Barrios, S., Zaidemberg, M., & Zerba, E. 2005. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. J. Med. Entomol. 42, 637–642.
- Reyes, J. M., Angulo, V. M., & Sandoval, C. 2007. Efecto tóxico de  $\beta$  -cipermetrina, deltametrina y fenitrotión en cepas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae). Bioméd. 27, 75–82.

- Reynolds H. T. 1962. Standardized Laboratory Detection Methods for Resistance Determination. Agricultural Arthropod Pests, Chairman Committee on Establishment of Standard Test Methods. Entomological Society of America.
- Roca-Acevedo, G., Picollo, M. I., Capriotti, N., Sierra, I., Santo-Orihuela, P. L. 2015. Examining Mechanisms of Pyrethroid Resistance in Eggs of Two Populations of the Chagas' Disease Vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol. 52(5):987-992.
- Salazar-Schettino PM, Rojas-Wastavino GE, Cabrera-Bravo M, Bucio-Torres MI, Martinez-Ibarra JS, Monroy-Escobar MC, Rodas-Retana A, Guevara-Gómez Y, Vences-Blanco MO, Ruiz-Hernandez AL, Torres-Gutiérrez E. 2010. A revision of thirteen species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas disease in Mexico. Journal of the Selva Andina Research Society. 1 (1): 57–80.
- Santo-Orihuela, P. L., Vassena, C. V., Zerba, E. N., & Picollo, M. I. 2008. Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. J. Med. Entomol. 45, 298–306.
- Santo-Orihuela, P. L. & Picollo, M. I. 2011. Contribution of general esterases to pyrethroid resistant *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia.
- Vassena, C. V., Picollo, M.I., Zerba, E. N. 2000. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. Med. Vet. Entomol. 14: 51-55.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2005. Protocolo de evaluación de efecto insecticida en *Triatoma infestans*.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2016. [Online]. Disponible en:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> Ultimo acceso: 13/05/17.

## CAPÍTULO 3

### RESISTENCIA A DELTAMETRINA Y PERMETRINA EN CINCO ESPECIES DE TRIATOMINOS VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS DE MEXICO.

#### RESUMEN

La forma vectorial es la principal fuente de transmisión de la enfermedad de Chagas, en esta están involucrados insectos de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Diecinueve de las 31 especies que se encuentran en México están asociadas al humano y todas ellas son capaces de transmitir la enfermedad. Los insecticidas piretroides son recomendados para el control de estos vectores en México. En este trabajo determinamos la susceptibilidad a los insecticidas deltametrina y permetrina en poblaciones de *Triatoma dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. mazzottii*, *T. longipennis* y *T. picturata*.

Los bioensayos se realizaron en ambas poblaciones –silvestres y de referencia- para determinar los valores de dosis letal media (DL<sub>50</sub>). Con base en ellos se obtuvieron los valores de razón de resistencia (RR<sub>50</sub>), de acuerdo a estos valores todas las poblaciones resultaron resistentes a ambos insecticidas.

El menor valor de DL<sub>50</sub> se presentó en la población de *Triatoma dimidiata*, esta población mostro un valor de DL<sub>50</sub> (0.044 ng/i) mucho menor a la cepa de referencia para deltametrina. La población de *T. pallidipennis* tuvo la mayor DL<sub>50</sub> con 295.77 ng/i para deltametrina, y una DL<sub>90</sub> de 563.29 ng/i, ambas significativamente mayores (p<0.05) que la cepa susceptible, obteniendo un valor de RR<sub>DL50</sub> de 1.17X. Seguidos por *T. longipennis* de Guanajuato 1.47X y Jalisco con 1.61X. Por otra parte, los valores de DL<sub>50</sub> para permetrina fueron significativamente diferentes entre las dos poblaciones de campo y su correspondiente cepa susceptible (p<0.05) con RR<sub>DL50</sub> de 3.19X para *T. longipennis* de Jalisco y de 2.97X para *T. longipennis* de Guanajuato. La población de campo de *Triatoma mazzottii* mostró para deltametrina una DL<sub>50</sub> de 95.95 ng/i, y una

DL<sub>90</sub> de 126.37, con un valor mayor de RR<sub>50</sub> de 26.91X. Los resultados para el ensayo con permetrina muestran un valor de RR<sub>50</sub> de 1.17X. *Triatoma picturata* con el valor de RR<sub>DL50</sub> de 1.88X, mostrando para permetrina una RR<sub>50</sub> de 2.84X. La evaluación del potencial insecticida mostro que la deltametrina posee un mayor Pi que la deltametrina.

Este es el primer reporte del estado de susceptibilidad en especies de triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas en México. La presencia de la resistencia nos da un posible panorama del estado actual de estos vectores en el país, estos resultados nos hacen suponer que es necesario la implementación de un programa de monitoreo de la resistencia a insecticidas en estos vectores de la enfermedad de Chagas en México.

### 3.1. INTRODUCCIÓN

#### 3.1.1. Control de vectores

Al no existir vacuna o medicamento para prevenir la transmisión de *T. cruzi*, por lo tanto, el reducir los nuevos casos en áreas endémicas consiste en evitar el contacto con los insectos vectores y en la identificación serológica de donadores de sangre infectados (Gillespie y Pearson 2001).

Una amplia gama de métodos de control de vectores se ha probado con el fin de eliminar las infestaciones domésticas de triatominos, incluyendo el control biológico de insectos, así como una serie de métodos físicos y químicos (Gorla *et al.* 2010). Como estrategias la reducción del riesgo de infestación (control preventivo) y el control de la infestación doméstica por triatominos vectores de *Trypanosoma cruzi* (control por intervención) se lleva a cabo mediante el ordenamiento de la vivienda (control físico) y el uso de insecticidas de acción residual (control químico). En México este proceso se hace bajo la NOM-032-SSA2-2014 (DOF, 2015).

La mejor forma para eliminar a los vectores domiciliarios es el mejoramiento de las condiciones del hogar, la aplicación de insecticidas residuales y la educación de la población sobre el riesgo de la enfermedad de manera integrada (Schofield y Dias 1999).

El mejoramiento de vivienda no sólo beneficia a la salud de las personas y su calidad de vida, sino que también protege contra la enfermedad de Chagas. Las mejoras tales como la sustitución de los suelos o techos y enlucido de las paredes, son eficaces en el control de especies de vectores tales como *T. dimidiata* y *R. prolixus* (OMS 2002).

Una de las complicaciones para llevar a cabo el control físico, es que, no solo se debe eliminar todos los objetos que puedan brindar resguardo a los insectos, sino también destruir nidos de animales sinantrópicos para hacer más difícil la vida de los insectos en ellos, y así evitar que incluso pequeñas ninfas, de segundo o tercer estadio, o recién emergidas, sean bien detectadas por sus enemigos naturales en las arreas despejadas y los adultos que puedan arribar sean encontrados por depredadores y no encuentren fácilmente fuentes de sangre. La aplicación de los métodos de control físico

ha tenido un resultado favorable en algunos casos con la desventaja de su periodo de acción puesto a que muestran ser relevantes y sustentables después de un periodo de 4 a 5 años de operación (Zeledon *et al.* 2008).

Al llevar a cabo la comparación del control físico con el químico se ha mostrado una gran desventaja en los resultados tanto a corto plazo como en su efectividad; al efectuar una evaluación entre el mejoramiento de vivienda se demostró que los índices de infestación, colonización e infección natural no fueron reducidos efectivamente, mientras que con la aplicación de insecticida ciflutrina en los hogares se redujeron los índices en un 100% (Rojas *et al.* 2004).

### 3.1.2. Control químico

El control de vectores por medio de insecticidas es efectivo y se ha demostrado que favorece la interrupción de la transmisión debido a que las especies más antropofílicas y las que se adaptan mejor a las viviendas humanas o epidemiológicamente importantes, se presentan con frecuencia a través del transporte pasivo por los seres humanos y no están presentes fuera de las casas (Rojas *et al.* 2004). Especies de bajo potencial vectorial y mal adaptadas a las viviendas es poco probable que se introduzcan en zonas donde no son nativas (OMS 2002).

En el pasado hubo cierta objeción a la utilización a gran escala de las medidas de control químico, debido al riesgo de contaminación del ambiente. Además, se cree que el uso de productos químicos solo proporciona un control temporal, en lugar de medidas de control físico, tales como la mejora de la vivienda. Los insecticidas utilizados actualmente (piretroides sintéticos) tienen baja toxicidad al humano y animales, ya que el insecticida se aplica a las superficies con las que el contacto humano es mínimo.

Se ha demostrado que es posible eliminar los principales vectores triatomínicos. El uso de insecticidas residuales ya no se pone en duda cuando el vector domiciliario se sabe que está presente y la transmisión ocurre y debe ser controlado rápidamente. El control químico del vector es entonces imperativo en vista de la gravedad de la enfermedad.

El control químico se facilita si el vector:

- Toma un largo tiempo para repoblar áreas tratadas;

- carece de la movilidad y se extiende poco a poco;
- pasa a través de todas sus etapas de desarrollo en el mismo hábitat y todos ellos no exhiben resistencia a los productos químicos utilizados;
- tiene un repertorio genético bajo y una baja capacidad de desarrollar resistencia.

El mejoramiento físico de la vivienda, incluyendo el peridomicilio, es una alternativa cuando la infestación es limitada geográficamente y la infestación residual es persistente (OMS 2002).

En México el control vectorial está regulado por la NOM-032-SSA2-2014 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. Estableciendo en el punto 7.3.5.1. En el caso de comunidades con infestación recurrente, a pesar de las actividades de ordenamiento del medio, se debe recurrir al uso de insecticidas de tipo piretroide para reducir la infestación.

### 3.1.3. *Insecticidas*

Los insecticidas organoclorados (como el DDT) fueron utilizados intensivamente, debido a esto se les acreditaron muchos de los problemas señalados por Rachel Carson (1962) en su publicación de “La Primavera Silenciosa”. A causa de su acumulación en el medio ambiente y la toxicidad para la reproducción en las personas, su uso fue finalmente eliminado en la mayoría de los países industrializados a finales de 1970 y principios de 1980 (Moore *et al.* 2009). Los insecticidas organofosforados (ORF's) y carbamatos tomaron el lugar de los productos organoclorados y han sido ampliamente utilizado desde la década de 1970. Esta clase de insecticidas presentaban el problema de matar animales tanto vertebrados como invertebrados por la inhibición de la colinesterasa con una disrupción de la actividad nerviosa por la acumulación de acetilcolina en las terminaciones nerviosas (Zerba 1999).

La obtención de nuevos compuestos por modificación de la estructura química de piretrinas naturales dio lugar a una nueva familia de insecticidas: los piretroides. Se definen como ésteres de ácidos derivados del ciclopropano. Son poco tóxicos para los mamíferos, quienes los metabolizan y excretan con rapidez. Dejan residuos muy bajos o nulos en el suelo, son solubles en agua, se descomponen en la atmósfera (Isern 2002).

Los piretroides sintéticos son neurotóxicos que actúan sobre los axones en el sistema nervioso periférico y central mediante la interacción con los canales de sodio en mamíferos y/o insectos (Zerba 1999). El uso de insecticidas piretroides aumentó como respuesta a la eliminación gradual de las otras clases de insecticidas.

#### 3.1.4. INSECTICIDAS PIRETROIDES

Son compuestos sintéticos derivados del alcaloide “Piretro” presente en las flores de las plantas *Chrysanthemum cinerariifolium* y *Chrysanthemum coccineum*. Los compuestos biológicamente activos son el resultado de la combinación de dos ácidos (pirétrico y crisantémico) y tres alcoholes (piretrolona, jasmolona y cinerolona). En comparación con los organofosforados y carbamatos sus propiedades toxicológicas y ambientales son más favorables. Todos son lipofílicos y casi insolubles en agua. Estas moléculas han sido objeto de múltiples modificaciones químicas, en busca de mejorar su acción tóxica y estabilidad en el medio ambiente por lo que han sido clasificadas en cuatro categorías o generaciones.

La primera generación se compone de un solo piretroide, la aletrina, la cual se diferencia de la cinerina I porque contiene un lado en la cadena más estable y más persistente que el piretro. Es efectivo contra moscas y mosquitos, pero menos efectivo contra cucarachas y otros insectos.

La segunda generación incluye: a) tetrametrina, (1965) que poseía mayor fuerza de derribo que la aletrina y es fácilmente sinergizada, b) la resmetrina (1967) aproximadamente 20 veces más efectiva que el piretro en cuanto al derribo en mosca casera pero no sinergizada, c) la bioresmetrina (1967) 50 veces más efectiva contra moscas caseras susceptibles a insecticidas y tampoco sinergizada, d) la bioaletrina (1969) más potente que la aletrina y fácilmente sinergizada, pero menos efectiva que la resmetrina y e) la fenotrina (1973). La resmetrina fue el insecticida de segunda generación más utilizado en forma de aerosoles para el control de insectos voladores y rastreros en interiores de casas.

La tercera generación incluye fenvalerato y permetrina, los cuales aparecieron en 1972 y 1973 respectivamente, fueron los primeros piretroides agrícolas debido a su fotoestabilidad y residualidad sobre las hojas de los cultivos.

La cuarta generación comenzó en 1975, dando origen a una nueva generación de piretroides usados en salud pública como cipermetrina, flucitrina fluvalinato y letametrina, siendo estos los más potentes, y por lo tanto requieren una menor dosis que los de generaciones anteriores (Rogg 2000).

En general, los piretroides interfieren con las funciones del sistema nervioso y actúan sobre el axón a nivel central y periférico mediante interacción con los canales de sodio y/o desplazando al ácido kainico de sus uniones específicas en los mamíferos e insectos. A semejanza de las piretrinas, bloquean los impulsos nerviosos en el nivel de su transmisión final.

Los efectos de estos compuestos pueden ser de 4 tipos: 1) sobre-excitación nerviosa sin contracciones musculares, 2) afección en los nervios motores que causan contracciones musculares, 3) contracciones musculares de larga duración y 4) obstrucción total del impulso nervioso.

Los signos típicos de intoxicación por los piretroides Tipo I incluyen hiperexcitabilidad y convulsiones, mientras que los piretroides Tipo II causan principalmente ataxia y descoordinación. En insectos los efectos de los piretroides, especialmente los del Tipo I, pueden desarrollarse de 1 a 2 minutos después del tratamiento y pueden resultar en la caída, es decir, en la pérdida de la postura normal y de la locomoción.

### 3.1.5. Resistencia a insecticidas piretroides en triatominos.

Diferentes perfiles toxicológicos han sido observados en la exposición a deltametrina, la resistencia a este insecticida ha sido documentada en triatominos en las últimas décadas. Sin embargo, todos estos son registros de Suramérica, para especies como *T. infestans* en Argentina (Carvajal *et al.*, 2012; Fabro *et al.*, 2012; Germano *et al.*, 2010; Germano *et al.*, 2010; Germano *et al.*, 2012; Germano *et al.*, 2013; Germano *et al.*, 2014; Roca-Acevedo *et al.*, 2013; Santo-Orihuela *et al.*, 2008; Santo-Orihuela *et al.*,

2013; Vanessa *et al.*, 2003; Zerba *et al.*, 1997), Bolivia (Depickère *et al.*, 2012; Germano *et al.*, 2012; Gomez *et al.*, 2014; Lardeux *et al.*, 2010; Palmquist *et al.*, 2010; Roca-Acevedo *et al.*, 2011; Santo-Orihuela *et al.*, 2008; Santo-Orihuela *et al.*, 2013; Toloza *et al.*, 2008), Brasil (Pessoa *et al.*, 2015; Sonoda *et al.*, 2009; Vassena CV, *et al.*, 2000), Paraguay (Germano *et al.*, 2010) y Perú (Yon *et al.*, 2004); *T. sórdida* de Brasil (Pessoa *et al.*, 2008; Pessoa *et al.*, 2012; Pessoa *et al.*, 2014; Pessoa *et al.*, 2015; Obara *et al.*, 2011); *T. brasiliensis* en Brasil (Pessoa *et al.*, 2015; Obara *et al.*, 2010; Obara *et al.*, 2011); *Rhodnius prolixus* de Argentina (Vassena *et al.*, 2003), únicamente para *T. maculata* y *T. dimidiata* de Colombia (Reyes, *et al.*, 2007) esta última uno de los vectores más importante de la enfermedad de Chagas en México.

En este trabajo se optó por la evaluación de la permetrina perteneciente a los piretroides tipo I, por lo tanto, carente del grupo  $\alpha$ -ciano y la deltametrina de tipo II con presencia del grupo  $\alpha$ -ciano. En estudios como los de Hu *et al.* (2011) determinan la resistencia a piretroides del tipo I en oocitos de *Xenopus* susceptibles a piretroides del grupo II. La permetrina fue utilizada para el control de vectores en México desde antes de 1990 en aplicaciones Ultra Bajo Volúmen en exteriores (Flores *et al.* 2016) y actualmente está autorizada para el control de mosquitos en termonebulización. La deltametrina se autorizó a partir del 2010 a la fecha (CENAPRECE, 2010 – 2017).

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Material biológico.

La recolección de triatomos silvestres fue realizada mediante la búsqueda activa en el área peridomiciliar y domiciliar de Baca, Yucatán (*T. dimidiata*); Jojutla de Juárez, Morelos (*T. pallidipennis*); San Martín de Hidalgo y Manual Doblado (*T. longipennis*) Jalisco y Guanajuato respectivamente; Chilapa de Álvarez (*T. mazzottii*), Guerrero y San Martín de Hidalgo (*T. picturata*) Jalisco, México. Los insectos capturados y su descendencia fueron criados bajo condiciones controladas de laboratorio. Las ninfas se mantuvieron hasta llegar a individuos adultos, con los cuales se formaron parejas para su reproducción bajo condiciones de temperatura ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ), humedad ( $70 \pm 15\%$ ), fotoperiodo (12:12), la primera alimentación de los individuos silvestres consistió en sangre de conejo, las alimentaciones posteriores se realizaron con sangre de rata (*Rattus norvegicus*), con una frecuencia de 7 a 15 días; los individuos adultos, tanto hembras como machos, tuvieron al menos una alimentación con sangre de gallina durante toda su vida en este estadio.

### 3.2.2. Cepas susceptibles de Triatomos.

Las cepas de referencia para cada una de las especies mencionadas, consta de triatomos criados bajo condiciones de laboratorio con al menos 3 o 4 generaciones sin aporte de individuos silvestres o expuestos a insecticidas (OMS, 2005). Estas acepas fueron donadas por el Laboratorio Estatal de Veracruz.

### 3.2.3. Insecticidas.

Los insecticidas utilizados fueron deltametrina (99.5% pureza) (ChemService, West Chester, PA. 250 mg) y permetrina (99.5% pureza; mezcla de isómeros) (ChemService, West Chester, PA. 250 mg).

### 3.2.4. Bioensayos.

Se utilizó la técnica de aplicación tópica con un volumen de 0.2 µl de solución acetónica del principio activo insecticida, en la parte dorsal del abdomen de cada insecto, con un microaplicador (Microliter Syringe Hamilton 0.5 µl con Repeating Dispenser, Hamilton Co®). En un primer ensayo se evaluaron 3 diferentes dosis con un factor 1/10 entre cada dosis y en los ensayos finales se incluyeron 2 dosis intermedias para obtener rangos de mortalidad entre 10 y 90 %.

Se utilizaron 10 ninfas por dosis con un mínimo de dos repeticiones. Los insectos se colocaron en recipientes de boca ancha con papel plegado en su interior y cubierto con tela de gasa (OMS, 2005). Se registró la mortalidad a las 24 horas y los datos fueron utilizados para el cálculo de DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub> y sus respectivos intervalos de confianza. Todos los parámetros se expresan en ng/i. Las condiciones ambientales post-tratamiento fueron: 25-30°C y 50-70% HR.

### 3.2.5. Criterio de mortalidad.

Se consideraron muertas aquellas ninfas con la inhabilidad de caminar del centro de una caja petri (100x15mm) con un papel filtro en el interior (157 mm diámetro) hacia su borde. Solo aquellas ninfas que fueron capaces de caminar hasta el borde con o sin estimulación mecánica fueron consideradas como vivas. Los grupos control consistieron en 10 insectos con el mismo volumen de acetona utilizado en los tratamientos. En caso de mortalidad en los grupos control se utilizó la corrección de Abbott (1925).

### 3.2.63. Análisis de resultados.

Los resultados obtenidos en los bioensayos fueron sujetos a un análisis probit usando el programa POLO Plus (LeOra Software 2002-2017) para determinar la  $DL_{50}$  y  $DL_{90}$ . La diferencia significativa entre estos parámetros fue determinada por el solapamiento de sus intervalos de confianza. Para el cálculo de la razón de resistencia ( $RR_{50}$ ) el cual se obtuvo dividiendo los valores de las  $DL_{50}$  de las poblaciones bajo estudio entre los obtenidos en la cepa susceptible, así como el criterio de susceptibilidad donde un valor de  $RR > 1$  es considerado como indicativo de la alteración en la susceptibilidad fueron tomados de acuerdo a D'ávila Pessoa *et al.* (2014).

### 3.2.7. Potencial insecticida de deltametrina y permetrina

Se determinó la efectividad insecticida para cada especie de acuerdo al potencial insecticida ( $P_i$ ), tomando como referencia los valores  $DL_{50}$  de deltametrina sobre permetrina y se relacionaron como se indica en la siguiente ecuación.

$$\text{Potencial insecticida (Pi)} = \frac{\text{Potencial deltametrina (100\%)}}{\text{Potencial permetrina} \left( \frac{DL_{50} \text{ deltametrina}}{DL_{50} \text{ permetrina}} \right)}$$

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Resistencia a piretroides en triatominos.

En las tablas 3.1 y 3.2 se muestran los resultados de los bioensayos para deltametrina y permetrina, en las cinco especies de triatominos, así como las cepas susceptibles.

##### 3.3.1.1. *Triatoma dimidiata*.

El menor valor de  $DL_{50}$  se presentó en la población de *Triatoma dimidiata*, esta población mostro un valor de  $DL_{50}$  (0.044 ng/i) mucho menor a la cepa de referencia (Reyes *et al.*, 2000) para deltametrina. Al no contar con una cepa de referencia con las características que sugiere la OMS (2005), se optó por determina la  $RR_{50}$  comparando la cepa de campo (*T. dimidiata* Yucatán) contra la reportada por Reyes *et al.* (2000), basándonos en la metodología de Santo-Orihuela *et al.* 2017 y 2008; quienes utilizan los valores resultantes de estudios anteriores en cepas susceptibles como referencia a su cepa susceptible, es decir, no evalúan la susceptibilidad de la una cepa de referencia para los diferentes estudios.

La  $RR_{50}$  de *T. dimidiata* arrojada por esta comparación resulto de 0.097X, por lo tanto, se puede suponer que esta población, al ser más susceptible podría ser utilizada como cepa de referencia en posteriores trabajos sobre esta especie de triatomino.

Por otro lado, no se encontraron trabajos sobre la susceptibilidad de *T. dimidiata* a permetrina, los valores obtenidos de  $DL_{50}$  (49.92 ng/i) podrían ser también utilizados en evaluaciones posteriores para este insecticida sobre poblaciones de esta especie.

Cabe mencionar la importancia de una cepa susceptible o de referencia en cada evaluación, para poder establecer la relación de resistencia en función de la comparación de los valores de  $DL_{50}$  y además comprender los mecanismos que están involucrados en la resistencia a insecticidas.

### 3.3.1.2. *Triatoma pallidipennis*

Por otra parte, la población de *T. pallidipennis* tuvo el mayor valor de DL<sub>50</sub> con 295.77 ng/i para deltametrina, y una DL<sub>90</sub> de 563.29 ng/i, ambas significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) que los valores de DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub> de las cepas susceptibles 107.92 y 257.43 ng/i.

Contrario al resultado con deltametrina, en los ensayos para permetrina no se observó diferencia entre los valores de DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub> para la población de campo con respecto a la cepa susceptible, obteniendo un valor de RR<sub>DL50</sub> de 1.17X.

### 3.3.1.3. *Triatoma longipennis*

No se observó diferencia significativa en los valores de DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub> entre las poblaciones de campo de *T. longipennis* para deltametrina tanto de Jalisco como de Guanajuato con respecto a la cepa susceptible, para la cual se obtuvieron valores de DL<sub>50</sub> de 89.57, 144.38 y 131.82 ng/i, respectivamente. Los valores entonces de RR<sub>50</sub> fueron, para *T. longipennis* de Jalisco de 1.61X y para Guanajuato 1.47X.

Por otra parte, los valores de DL<sub>50</sub> para permetrina fueron significativamente diferentes entre las dos poblaciones de campo y su correspondiente cepa susceptible ( $p < 0.05$ ) pero no entre ellas; en ambas poblaciones se encontró una resistencia a permetrina con RR<sub>DL50</sub> de 3.19X para *T. longipennis* de Jalisco y de 2.97X para *T. longipennis* de Guanajuato.

### 3.3.1.4. *Triatoma mazzottii*

La población de campo de *Triatoma mazzottii* mostró el segundo valor más bajo de las cinco especies evaluadas para deltametrina, con una DL<sub>50</sub> de 95.95 ng/i, y una DL<sub>90</sub> de 126.37, siendo significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) a los valores de la cepa susceptible DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub> de 3.56 y 14.30 ng/i respectivamente, y a la vez fue la población con un valor mayor de RR<sub>50</sub> (26.91X), de acuerdo al criterio de Zerba &

Picollo (2002) la resistencia se encuentra fija en esta población al menos para este insecticida.

Los resultados para el ensayo con permetrina muestran valores de  $DL_{50}$  de la cepa susceptible (894.69 ng/i) y la cepa de campo (1044.21 ng/i). El valor de  $RR_{50}$  para este insecticida fue de 1.17X.

#### 3.3.1.5. *Triatoma picturata*

En esta especie la diferencia entre las  $DL_{50}$  para deltametrina de las cepas susceptibles y la población de campo fue significativa ( $p < 0.05$ ) con valores de 72.96 y 137.35 respectivamente, sin embargo, el valor de  $RR_{DL_{50}}$  fue menor a 2X (1.88X).

Contrario a las especies anteriores (indicado en los incisos 3.3.1.1 a 3.3.1.3) los valores de  $DL_{50}$  para permetrina en *Triatoma picturata* fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) entre las cepas susceptibles (1217.02 ng/i) y la población de campo (3452.83 ng/i), mostrando una  $RR_{50}$  de 2.84X.

Tabla 3.1. Estadística de los bioensayos y razón de resistencia (RR) para deltametrina en cinco especies de triatominos de México.

Especie/cepa	N	DL <sub>50</sub> (ng/i)	(IC 95%)	d ± DE	DL <sub>90</sub> (ng/i)	(IC 95%)	RR <sub>50</sub> <sup>1</sup>
<i>T. dimidiata Y</i>	161	0.043	(0.002-0.263)	0.752±0.247	9.14	(1.15-2117.16)	0.097 <sup>2</sup> (0.005-0.372)
<i>T. pallidipennis S</i>	113	107.92	(88.7-135.8)	3.39±0.78	257.43	(184.87-578.34)	-
<i>T. pallidipennis M</i>	329	295.77	(268.7-321.5)	4.57±0.48	563.29	(501.35-662.52)	2.74 (1.18-7.97)
<i>T. longipennis S</i>	162	89.57	(59.0-120.5)	3.48±0.88	208.87	(149.47-452.40)	-
<i>T. longipennis J</i>	209	144.38	(111.4-176.1)	4.92±0.86	262.79	(202.14-877.70)	1.61 (1-2.35)
<i>T. longipennis Gto</i>	157	131.82	(103.2-167.4)	3.94±1.22	278.68	(202.13-923.06)	1.47 (0.86-2.25)
<i>T. mazzottii S</i>	165	3.56	(2.5-5.4)	2.12±0.44	14.3	(8.23-47.86)	-
<i>T. mazzottii G</i>	98	95.95	(85.4-108.7)	8.03±2.35	126.37	(113.17-169.49)	26.91 (24.62- 51.25)
<i>T. picturata S</i>	132	72.96	(41.17-91.21)	4.54±1.07	99.23	(71.78-114.48)	-
<i>T. picturata J</i>	120	137.35	(118.78-151.20)	6.01±1.25	224.36	(195.96-298.22)	1.88 (1.31-2.81)

<sup>1</sup>La Razón de Resistencia fue significativa (p < 0.05) basada en la prueba de la razón de la dosis letal (Robertson and Preisler, 1992).

<sup>2</sup> Con base en base Reyes et al., 2007

S Cepa Susceptible	
DL: Dosis letal	G Guerrero, México
N Numero de ninfas	J Jalisco, México
ng/i, nanogramos/insecto	Gto Guanajuato, México
RR Resistance Ratio	M Morelos, México

Tabla 3.2. Estadísticos de los bioensayos y razón de resistencia (RR) para permetrina en cinco especies de triatominos de México.

Especie/cepa	N	DL <sub>50</sub> (ng/i)	(IC 95%)	d ± DE	DL <sub>90</sub> (ng/i)	(IC 95%)	RR <sub>50</sub> <sup>1</sup>
<i>T. dimidiata</i> Y	140	49.92	(10.50-92.56)	2.02±0.48	215.07	(129.91-324.67)	ND
<i>T. pallidipennis</i> S	200	1573.38	(1291.76-1975.57)	2.99±0.43	4214.95	(3007.56-8367.19)	-
<i>T. pallidipennis</i> M	158	1765.74	(958.19-3004.34)	2.22±0.36	6640.02	(3621.49-6688.05)	1.12 (0.77-1.34)
<i>T. longipennis</i> S	130	884.9	(780.78-1002.94)	3.44±0.61	1674.85	(1323.58-2119.42)	-
<i>T. longipennis</i> J	121	2819.96	(2553.63-3106.68)	6.14±1.16	4557.31	(3921.88-6155.21)	3.19 (0.93-5.29)
<i>T. longipennis</i> Gto	118	2632.01	(2474.69-2817.45)	18.44±3.03	3088.56	(2868.02-3794.53)	2.97 (2.16-5.63)
<i>T. mazzottii</i> S	112	894.69	(776.19-1031.22)	3.10±0.68	1815.4076	(1301.27-2532.5)	-
<i>T. mazzottii</i> G	141	1044.21	(854.73-1189.67)	6.46±1.09	1648.49	(1399.49-2512.91)	1.17 (1.07-2.08)
<i>T. picturata</i> S	104	1217.02	(1076.74-1375.53)	3.83±0.80	2156.97	(1689.68-2753.42)	-
<i>T. picturata</i> J	122	3452.83	(3079.32-3842.15)	8.87±2.04	4814.3	(4228.30-6443.25)	2.84 (2.50-3.60)

<sup>1</sup>La Razón de Resistencia fue significativa (p < 0.05) basada en la prueba de la razón de la dosis letal (Robertson and Preisler, 1992).

DL: Dosis letal

N Numero de ninfas

ng/i, nanogramos/insecto

RR Resistance Ratio

S Cepa Susceptible

G Guerrero, México

J Jalisco, México

Gto Guanajuato, México

M Morelos, México

### 3.3.2. Potencial insecticida

El potencial insecticida, dado por la toxicidad de un insecticida con respecto a otro se determinó para deltametrina con respecto a la permetrina en ninfas de primer estadio de las diferentes especies de triatomos bajo estudio, en todas las especies la toxicidad de la deltametrina fue mayor a la de permetrina (Figura 3.1). Para *T. pallidipennis* la deltametrina fue 4.94 veces más efectiva que la permetrina, seguida por *T. mazzottii* con 10.20 veces más efectiva y *T. longipennis* para la cual la deltametrina fue 20.62 veces más efectiva con respecto a la permetrina. Para *T. picturata* la deltametrina mostro una mayor efectividad de 25.12, sin embargo, para *T. dimidiata* la deltametrina fue hasta >1000 más efectiva que la permetrina (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Potencial insecticida por aplicación tópica de deltametrina con respecto a permetrina en ninfas de primer estadio de cuatro especies de triatomos de México.

Especie	Insecticida	DL <sub>50</sub> (ng/i)	%	Potencial Insecticida
<i>Triatoma dimidiata</i>	Deltametrina	0.0404	100	<b>&gt;1000</b>
	Permetrina	49.92	0.086	
<i>Triatoma pallidipennis</i>	Deltametrina	298.69	100	<b>4.94</b>
	Permetrina	1476.13	20.23	
<i>Triatoma longipennis</i>	Deltametrina	137.48	100	<b>20.61</b>
	Permetrina	2832.44	4.85	
			2819.96	4.87
<i>Triatoma mazzottii</i>	Deltametrina	95.95	100	<b>10.20</b>
	Permetrina	1044.21	9.18	
<i>Triatoma picturata</i>	Deltametrina	137.35	100	<b>25.12</b>
	Permetrina	3444.74	3.98	

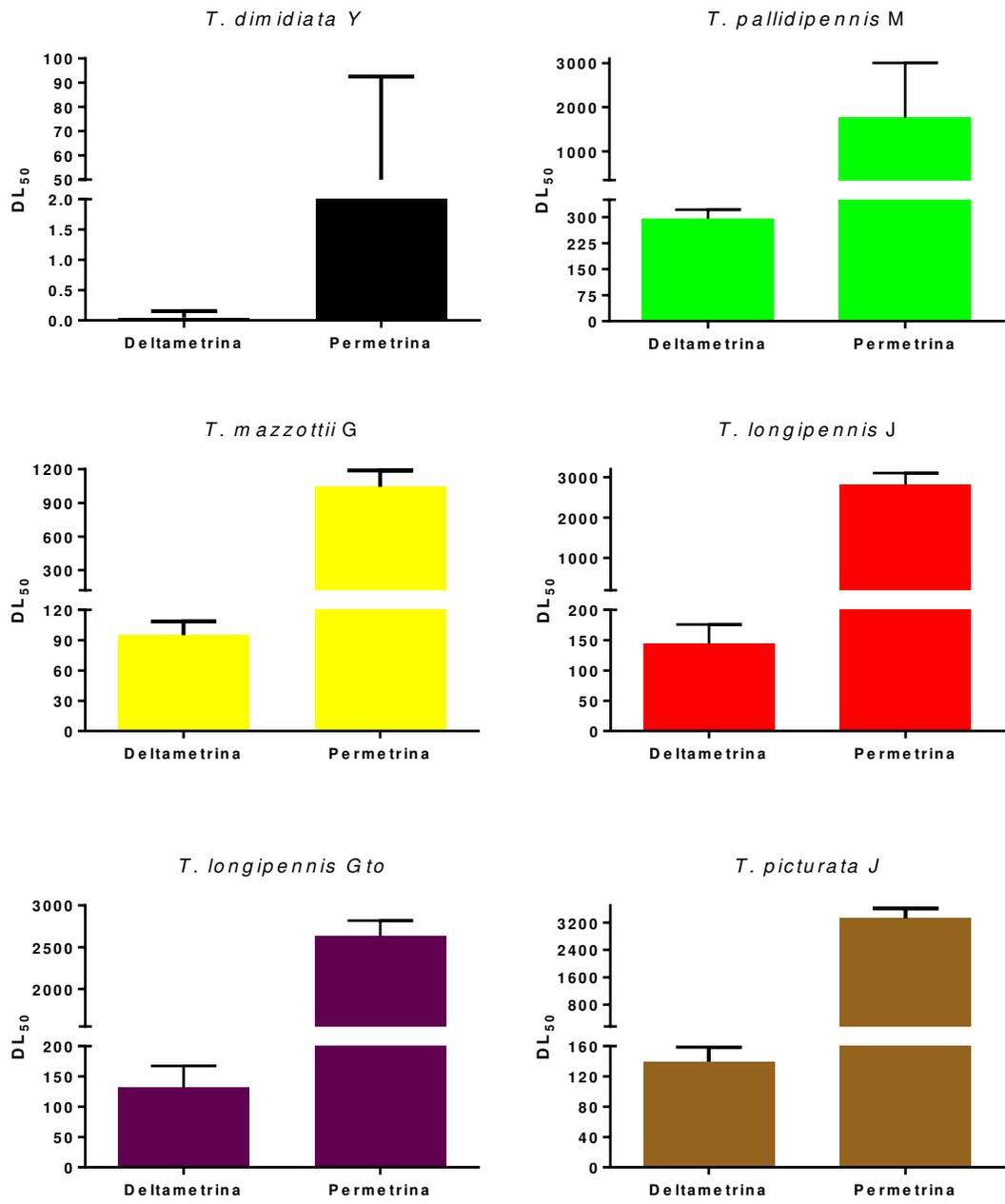


Figura 3.1. Niveles de DL<sub>50</sub> de las poblaciones triatominos de campo para deltametrina y permetrina.

### 3.4. DISCUSIÓN

Existen más de 30 especies de triatomíneos en México, incluyendo a *T. dimidiata*, *T. barberi*, *T. pallidipennis*, *T. mazzottii*, *T. picturata*, *T. mexicana*, *T. longipennis*, *T. gerstaeckeri* y *T. rubida*, los cuales son los principales vectores de la enfermedad de Chagas.

Modelados de nichos ecológicos han sido usados para determinar la distribución de los vectores, al estar distribuidos por todo México, por lo menos un 90% de la población se encuentra en riesgo (Ramsey *et al.* 2005).

Este trabajo es el primer reporte del estado de susceptibilidad a deltametrina y permetrina en vectores de la enfermedad de Chagas México, y el primero en realizarse en un número considerable de especies por aplicación tópica para la determinación de las DL<sub>50</sub> y las RR<sub>50</sub>. La técnica de aplicación tópica fue realizada de acuerdo al protocolo de OMS (2005), con algunas modificaciones: a) individuos de 6 a 7 días después de eclosionados, b) sin haber sido alimentada y c) evaluar la mortalidad a las 24 horas de exposición. Demostramos variaciones en la susceptibilidad a la deltametrina y permetrina en 4 especies de triatomíneos de 5 localidades diferentes a lo largo del sur y en el centro del país.

El potencial insecticida de la deltametrina resulto ser significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en todas las especies, Reyes *et al.* (2007) reportan una mejor efectividad de deltametrina ( $p < 0.05$ ) comparado con la de otro insecticida organofosforado, y muy similar con la toxicidad de otro piretroide del tipo II; la diferencia encontrada entre la permetrina, piretroide de tipo I, y la deltametrina, piretroide de tipo II, puede ser resultado de mutaciones de tipo *kdr*; Hu *et al.* (2012) reportan la baja susceptibilidad a los piretroides de tipo I (bioresmetrina y NRDC157 -un análogo de la deltametrina) pero no para la cipermetrina, cihalotrina y deltametrina, en poblaciones de cucarachas con la mutación F1515C en el canal de sodio.

Variaciones en la susceptibilidad a deltametrina ha sido reportadas en *Triatoma infestans* de Argentina DL<sub>50</sub> de 0.02 a 56.7 ng/i (Vieira-Sonoda *et al.*, 2009), Brazil con una LD<sub>50</sub> de 0.26 a 0.70 ng/i (Vassessa *et al.*, 2003; Fronza *et al.*, 2016), Paraguay con

valores de  $DL_{50}$  de 0.1 a 0.5 ng/i (PAHO, 2005), Bolivia con  $LD_{50}$  de 0.25 a 119.12 ng/i (Germano, *et al.*, 2010; Roca-Acevedo *et al.*, 2011).

De forma similar nuestros resultados coinciden con las variaciones en susceptibilidad a deltametrina exhibida por algunas especies como *Pastrongylus megistus* con  $LD_{50}$  de 2.01 ng/i (Henry-Halldin *et al.*, 2012); *T. brasilensis* con  $LD_{50}$  de 0.19 a 1.48 ng/i (Lardeux *et al.*, 2010; Obara *et al.*, 2010) y *T. sordida* con  $LD_{50}$  de 0.173 a 1.59 ng/i (Germano *et al.*, 2010; Vieira-Sonoda *et al.*, 2010).

La determinación del estado de resistencia basada en la razón de resistencia ( $RR_{50}$ ) dada por la  $DL_{50}$ , puede proveer una aproximación del grado de resistencia. Bustamante *et al.* (2016) toman en cuenta al menos dos criterios basados en los parámetros de la  $RR_{50}$  para proponer con fines operacionales la resistencia en triatomos, además de este, se consideraron los trabajos de Fronza *et al.* (2016) quienes consideran a poblaciones de *T. infestans* con baja resistencia con  $RR < 10$ , la Organización Panamericana de la Salud (2005) que define como resistentes a todas las poblaciones con  $RR_{50} > 5$  y el criterio de Zerba & Picollo (2002) quienes sugieren que pueden ser consideradas como resistentes aquellas poblaciones con  $RR_{50} > 2$ ; por otro lado Dávila Pessoa *et al.* (2014) mencionan que aquellas poblaciones con  $RR > 1$  pueden ser consideradas con una susceptibilidad alterada. Coincidiendo con nuestros resultados, podemos determinar que todas nuestras poblaciones presentan una susceptibilidad alterada o resistencia incipiente al resultar con  $RR > 1$ .

La determinación de los mecanismos que confieren la resistencia a estos insecticidas, ya sean enzimáticos o moleculares, es un importante tema de estudio que brindara datos importantes para la planeación correcta de proyectos para el control de triatomos vectores de la enfermedad de Chagas en México.

### 3.5. BIBLIOGRAFÍA

- Bustamante Gomez M, Gonçalves Diotaiuti L, Gorla DE. Distribution of Pyrethroid Resistant Populations of *Triatoma infestans* in the Southern Cone of South America. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(3):1–15.
- Carvajal G, Mougabure-Cueto G, Toloza AC. 2012. Toxicity of nonpyrethroid insecticides against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 107:675-679.
- Depickère S, Buitrago R, Siñani E, Baune M, Monje M, Lopez R. Susceptibility and resistance to deltamethrin of wild and domestic populations of *Triatoma infestans* (Reduviidae: Triatominae) in Bolivia: new discoveries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012; 107:1042-1047.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). NOM-032-SSA-2-2014 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores, México. 2015; 1–43.
- Fabro J, Sterkel M, Capriotti N, Mougabure-Cueto G, Germano M, Rivera-Pomar R. Identification of a point of 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.
- Flores-Suarez Adriana E, Gustavo Ponce-Garcia, Beatriz Lopez-Monroy, Olga Karina Villanueva-Segura, Iram Pablo Rodriguez-Sanchez, Juan Ignacio Arredondo-Jimenez y Pablo Manrique-Saide. Current Status of the Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico – Insecticide Resistance, Dr. Stanislav Trdan (Ed.), 2016; ISBN: 978-953-51-4591-2, InTech. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/61526>.

- Fronza.G., Toloza. A., Picollo. M., Spillmann. C., Mougabure-Cueto. G. Geographical Variation of Deltamethrin Susceptibility of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Argentina With Emphasis on a Resistant Focus in the Gran Chaco. *Journal of Medical Entomology*. 2016. 53:4, 880-887.
- Germano M, Picollo MI, Spillmann C, Mougabure-Cueto G. Fenithrothion: an alternative insecticide for the control of deltamethrin-resistant populations of *Triatoma infestans* in northern Argentina. *Med Vet Entomol*. 2014; 28:21-25.
- Germano MD, Picollo MI, Mougabure-Cueto GS. Microgeographical study of insecticide resistance in *Triatoma infestans* from Argentina. *Acta Tropica*. 2013; 128:561-565.
- Germano MD, Roca-Acevedo G, Mougabure-Cueto GA, Toloza AC, Vassena C V., Picollo MI. New Findings of Insecticide Resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) From the Gran Chaco. *J Med Entomol*. 2010;47(6):1077–81.
- Germano MD, Santo-Orihuela P, Roca-Acevedo G, Toloza AC, Vassena C, Picollo MI. Scientific evidence of three different insecticide-resistant profiles in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol*. 2012;49:1355-1360.
- Germano MD, Vassena CV, Picollo MI. Autosomal inheritance of deltamethrin resistance in field populations of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from Argentina. *Pest Manag Sci*. 2010; 66:705-708.
- Gillespie S, Pearson RD. *Principles and Practice of Clinical Parasitology*. John Wiley & Sons Ltd. 2001; pp. 670.

- Gomez MB, Pessoa GCD, Orellana ALG, Cortez MR, Rosa ACL, Noireau F. Susceptibility to deltamethrin of wild and domestic populations of *Triatoma infestans* of the Gran Chaco and the Inter Andean Valleys of Bolivia. *Parasit Vectors*. 2014; 7:497-503.
- Gorla D, Ponce C, Dujardin JP, Schofield CJ. American Trypanosomiasis Chagas Disease. 10. Control Strategies Against Triatominae. Elsevier Inc. 2010; pp. 233-245.
- Henry-Halldin CN, Nadesakumaran K, Bosco Keven J, Zimmerman AM, Siba P, Mueller I, *et al.* Multiplex assay for species identification and monitoring of insecticide resistance in *Anopheles punctulatus* group populations of Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86(1):140–51.
- Hu. Du. Nomura and Dong. A sodium channel mutation identified in *Aedes aegypti* selectively reduces cockroach sodium channel sensitivity to type I, but not type II pyrethroids. *Insect Biochem Mol Biol*. 2011. 4(1):9-13.
- Isern MD. 2002. La química de los pesticidas y su metodología analítica. Copyright by UCEL: Universidad del Centro Educativo Latinoamericano.
- Lardeux F, Depickère S, Duchon S, Chavez T. Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. *Trop Med Int Heal*. 2010;15(9):1037–48.
- Moore MT, Cooper CM, Smith S, Cullum RF, Knight SS, Locke MA, Bennett ER. Mitigation of two pyrethroid insecticides in a Mississippi Delta constructed wetland. *Environmental Pollution*. 2009; 157: 250-256.
- Obara MT, Otrera VCG, Gurgel RG, Santos JP, Santalucia M, Rosa JA. Monitoring the susceptibility of *Triatoma sordida* Stal, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) to

deltamethrin insecticide, in Central-Western Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44:206-212.

Obara TM. Caracterização da resistência a inseticidas em populações da subfamília Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vetores de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. 2010. 246 p. (Doctors Thesis). Centro Universidade de São Paulo. São Paulo.

OMS. Expert Committee on the Control of Chagas Disease. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. 2002; pp. 112.

OMS. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 2005. Protocolo de evaluación de efecto insecticida en *Triatoma infestans*.

PAHO. II Reunion técnica latinoamericana de monitoreo de resistência a inseticidas em triatomíneos vetores de Chagas. OPS Panamá PAHO. 2005.

Palmquist K, Salatas J, Fairbrother A. Pyrethroid Insecticides: Use, Environmental Fate, and Ecotoxicology, *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management* Publisher: InTech. Edit: Farzana Perveen. 2012; pp. 708.

Pessoa GCA. Perfil da suscetibilidade a deltametrina em populações de *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) do Estado de Minas Gerais procedentes de áreas com infestação persistente. 179 p. (Doctor's Thesis). Universidade Federal de Minas Gerais; 2012. Belo Horizonte.

Pessoa GCD, Dias LS, Diotaiuti L. Deltamethrin pyrethroid susceptibility characterization of *Triatoma sordida* Stal, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) populations in the Northern Region of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014; 47:426-429.

- Pessoa GCD, Pinheiro LC, Ferraz ML, Mello BV, Diotaiuti L. Standardization of laboratory bioassays for the study of *Triatoma sordida* susceptibility to pyrethroid insecticides. *Parasit Vectors*. 2015; 8:109.
- Pessoa GCD, Rosa ACL, Bedin C, Wilhelms T, Mello F, Coutinho HS. Susceptibility characterization of residual Brazilian populations of *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae) to deltamethrin pyrethroid. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015; 48:157-161.
- Pessoa GCD, Trevizani NAB, Dias LS, Melo BV, Diotaiuti L. Toxicological profile of deltamethrin in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in State of Ceará, Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015; 48:39-43.
- Pessoa GCD. Monitoramento da suscetibilidade ao piretróide deltametrina em populações de *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae). 95 p. (Master's Dissertation). Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz; 2008. Belo Horizonte.
- Ramsey, J., Peterson, A., Carmona, O., Moo-Llanes, D., Nakazawa, Y., Butrick, M., & Ibarra, C. Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2015; 110(3), 339-352.
- Reyes M, Angulo VM, Sandoval CM. Efecto tóxico de betacipermetrina, deltametrina y fenitrotión en cepas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae). *Biomédica*. 2007; 27 (suppl I):75-82.
- Roca-Acevedo G, Mougabure-Cueto G, Germano M, Santo-Orihuela P, Rojas-Cortez M, Noireau F, *et al*. Susceptibility of sylvatic *Triatoma infestans* from Andean valleys of Bolivia to deltamethrin and fipronil. *J Med Entomol*. 2011;48(4):828–35.

- Roca-Acevedo G, Piollo MI, Santo-Orihuela. Expression of insecticide resistance in immature life stages of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol. 2013; 50:816-818
- Rogg HW. Manejo Integrado y Control Biologico De Plagas Y Enfermedades. Corporacion Proexant. 2000; pp 47. ISBN: 9978-41-243-3.
- Rojas Wastavino G, Cabrera-Bravo M, García De La Torre G, Vences-Blanco M, Ruiz Hernández A, Bucio Torres M, Guevara Gómez Y, Escobar Mesa A, Salazar Schettino PM. Insecticide and Community Interventions to Control *Triatoma dimidiata* in Localities of the State of Veracruz, Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2004; 99(4): 433-437.
- Santo-Orihuela PL, Carvajal G, Picollo MI, Vassena CV. Analysing deltamethrin susceptibility and pyrethroid esterase activity variations in sylvatic and domestic *Triatoma infestans* at the embryonic stage. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108:1031-1036.
- Santo-Orihuela PL, 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.
- Schofield CJ, Dias JC. The Southern Cone Initiative against Chagas Disease. Advances in Parasitology. 1999; 43: 1-21.
- Sonoda IV, Pessoa GCD, Cortez MR, Dias JC, Romanha AJ, Diotaiuti L. Susceptibility of *Triatoma infestans* to deltamethrin in Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104:668-670.

- Tolozá AC, Germano M, Cueto GM, Vassena C, Zerba E, Picollo MI. Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instar of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol.* 2008; 45:421-426.
- Vassena CV, Picollo MI, Zerba EN. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med Vet Entomol.* 2000; 14:51-55.
- Vassena CV, Picollo MI. Monitoreo de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, insectos vectores de la Enfermedad de Chagas. *Revista de toxicología en línea.* 2003; 3: 1-21.
- Vieira-Sonoda I, Dávila-Pessoa G, Rojas-Cortez M, Pinto-Dias J, Romanha A, Diotaiuti L. Susceptibility of *Triatoma infestans* to deltamethrin in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(4):668–70.
- Vieira-Sonoda I, Sena-Dias L, Mendonça-Bezerra C, Pinto-Dias JC, Romanha AJ, Diotaiuti L. Susceptibility of *Triatoma brasiliensis* from state of Ceará, Northeastern Brazil, to the pyrethroid deltamethrin. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(3):348–52.
- Yon FC, Balta R, García N, Troyes A, Cumpa H, Valdivia A. Susceptibilidad y resistencia de *Triatoma infestans* y *Panstrongylus herreri* a los insecticidas piretroides, Perú 2001. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2004; 21:179-182.
- Zeledón R, Rojas JC, Urbina A, Cordero M, Gamboa SH, Lorosa ES, Alfaro S. Ecological control of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): five years after a Costa Rican pilot project. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2008; 103(6): 619-621.

Zerba E, Picollo M. Resistencia a insecticidas piretroides en *Triatoma infestans*. Buenos Aires, Argentina. In: Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN) CITEFA-CONICET. 2002.

Zerba EM, Wallace G, Picollo MI, Casabe N, Licastro S, Wood E, *et al.* Evaluación de la  $\beta$ -cipermetrina para el control de *Triatoma infestans*. Pan Am J Public Health. 1997; 1:133-137.

Zerba EN. Susceptibility and resistance to insecticides of chagas disease vectors. MEDICINA (Buenos Aires). 1999; 59 (2): 41-46.

## CAPÍTULO 4

### ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS PIRETROIDES EN POBLACIONES DE CINCO ESPECIES DE TRIATOMINOS VECTORES DE CHAGAS EN MÉXICO.

#### RESUMEN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Tripanosoma cruzi* y transmitida por insectos vectores de la subfamilia Triatominae, alrededor de 8 y 11 millones de personas en México se encuentran infectadas (CDC, 2017). Existen más de 30 especies de triatominos en México, incluyendo a *T. dimidiata*, *T. barberi*, *T. pallidipennis*, *T. mazzottii*, *T. picturata*, *T. mexicana*, *T. longipennis*, *T. gerstaeckeri* y *T. rubida*, los cuales son los principales vectores de la enfermedad de Chagas. La enfermedad no se limita a localidades rurales y la distribución por movimientos migratorios ha ocasionado un marcado aumento en los casos de esta, se ha determinado que, dado la distribución de los vectores por todo México, por lo menos un 90% de la población se encuentra en riesgo (Ramsey *et al.* 2005).

En México no se cuenta con un programa para el control de los vectores transmisores de la enfermedad de Chagas, no así, se cuenta con programas para el control de *Aedes aegypti*, a pesar de esto la utilización de insecticidas se ha realizado indiscriminadamente. Esta exposición a insecticidas en aplicaciones, dosis o modo de aplicación inadecuados puede ocasionar el desarrollo de resistencia.

Si bien las pruebas de efectividad biológicas permiten determinar el estado de resistencia a insecticidas, la determinación de la actividad enzimática nos brinda un panorama más amplio de la función de este mecanismo en la desintoxicación xenobiótica, dado que un incremento en esta sugiere la adaptación de los insectos a la presión de selección ambiental (Ranson *et al.* 2002).

En este estudio se realizó la estandarización para la determinación de actividad enzimática en Triatominos basados en el protocolo de la Valles *et al.* (2006), evaluando ninfas de primer estadio de 3, 5 y 7 días de edad, en base a la cuantificación de la cantidad de proteínas totales (PNT). Posterior a la estandarización se corrieron los ensayos para *Triatoma dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. mazzottii* y *T. picturata* de 5 a 7 días de edad en cepas silvestres y la respectiva cepa de referencia para cada especie.

## 4.1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una parasitosis transmitida por insectos vectores de la subfamilia triatominae, se calcula que en México entre 8 y 11 millones de personas se encuentran infectadas por el parásito *Tripanosoma cruzi*. La enfermedad no se limita a localidades rurales y la distribución por movimientos migratorios ha ocasionado un marcado aumento en los casos de esta (CDC, 2017).

En México no se cuenta con un programa para el control de los vectores transmisores de la enfermedad de Chagas, no así, se cuenta con programas para el control de *Aedes aegypti*, a pesar de esto la utilización de insecticidas se ha realizado indiscriminadamente. Esta exposición a insecticidas en aplicaciones, dosis o modo de aplicación inadecuados puede ocasionar el desarrollo de resistencia.

### 4.1.1. Resistencia a insecticidas

La resistencia a insecticidas en insectos es un factor principalmente genético, ya sea que este esté dado por una mutación o por un cambio en la producción de alguna proteína. Entre los diversos mecanismos de resistencia se encuentran: la resistencia metabólica, la resistencia en el sitio blanco, resistencia en la penetración de cuticular y la resistencia dada por el comportamiento del insecto (Figura 4) (IRAC, 2017).



Figura 4. Cambios fisiológicos relacionados con la resistencia a insecticidas.

#### 4.1.2. Resistencia metabólica

La resistencia metabólica es el resultado del incremento en la expresión de genes codificadores de enzimas que metabolizan a los xenobióticos. Este tipo de resistencia es el más común y ha sido bien documentado en diversos vectores de enfermedades. Principalmente se encuentran involucrados tres categorías de enzimas: esterasas, monooxigenasas y glutatión s-transferasas. Estos sistemas enzimáticos son desarrollados para metabolizar o degradar los insecticidas antes de que puedan ejercer un efecto tóxico. Además de ser más eficientes, estos sistemas enzimáticos también pueden tener un amplio espectro de actividad (degradando diversos grupos de insecticidas) (IRAC, 2017). Las carboxylesterasas, las monoxidasas del citocromo P<sub>450</sub> y las glutatión-s-transferasas (GST) cuya amplificación genética es inducida en los organismos por exposición a los insecticidas pueden generar resistencia a la mayoría ellos (Hemingway y Ranson, 2000). Estas enzimas catalizan un gran rango de reacciones de detoxificación y constituyen la primera línea de defensa enzimática contra los xenobióticos. Particularmente las esterasas están asociadas con la resistencia a organofosforados, carbamatos y a piretroides; las monooxigenasas en el metabolismo de piretroides y en la activación o detoxificación de organofosforados; y las glutatión-s-transferasas cuyo principal rol es el metabolismo del DDT a productos menos tóxicos y un rol secundario en la resistencia a organofosforados (Scott 1995).

#### 4.1.3. Carboxilesterasas

Las carboxylesterasas son enzimas que adicionan una molécula de agua a los grupos carboxiéster, fosforoéster y carboxilamida. Casi todos los piretroides, fosforados y carbamatos son sustratos potenciales de estas enzimas, pues contienen al menos uno de estos grupos. Se estima que en casi 90% de los casos de resistencia a insecticidas organofosforados, piretroides y carbamatos hay niveles elevados de estas enzimas (Hemingway y Ranson, 2000).

El papel de las esterasas como mecanismo de resistencia puede ser inferido mediante: 1) detección de niveles elevados de productos de la hidrólisis de insecticidas

en estudios de metabolismo en insectos resistentes, 2) sinergismo de la toxicidad del insecticida en insectos resistentes mediante el uso de inhibidores de esterasas no tóxicos (TPP: 0,0,0-trifenil fosfato, DEF: S,S,S-tributil fosforotritioato, IBP:0,0-bis(1-metil)s-fenilmetil fosforotioato) y 3) detección de altos niveles de actividad de esterasas generales usando substratos simples y ensayos espectrofotométricos de homogenizados o tejidos de insectos (Brogdon 1989), o bien por electroforesis y tinción de geles (Hemingway y Karunaratne, 1998).

La sobreproducción de esterasas es una respuesta evolutiva contra la presión de selección por insecticidas organofosforados y carbamatos, su presencia se ha documentado en numerosas especies de artrópodos, incluyendo mosquitos, garrapatas, áfidos, cucarachas y chinches.

El papel de las esterasas en la detoxificación de los piretroides ha sido ampliamente estudiado, existen varios reportes de la actividad intensificada de las esterasas en poblaciones de mosquitos resistentes, entre estas *Anopheles gambiae*, *An. albimanus*, *Culex quinquefasciatus* y *Ae. aegypti* (Rodríguez *et al*, 2001, Flores *et al*. 2003). Algunos estudios han demostrado que las esterasas tienen baja actividad catalítica sobre algunos piretroides, sugiriendo que los elevados niveles de esterasas presentes en cepas resistentes a piretroides, podría deberse a una preselección con organofosforados (Rodríguez *et al*, 2002).

#### 4.1.4. Monooxigenasas del Citocromo-P<sub>450</sub>

El citocromo P<sub>450</sub> es una enorme y diversa superfamilia de hemoproteínas que se encuentran en la mayoría de los organismos: bacterias, archaea y eucariotas. La gran diversidad de monooxidasas se debe a la existencia de múltiples isoformas de P<sub>450</sub>, diversos patrones de expresión y un amplio espectro de substratos (Scott 1995).

Las proteínas del citocromo P<sub>450</sub> usan un amplio rango de compuestos exógenos y endógenos como sustratos de sus reacciones enzimáticas. Por lo general forman parte de cadenas de transferencia de electrones con multicomponentes. La reacción más común catalizada por el citocromo P<sub>450</sub> es una reacción monooxigenasa, es decir, la inserción de un átomo de oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) en un sustrato orgánico (RH) a la vez

que el otro átomo de oxígeno es reducido a agua. Para que se complete la reacción se requieren electrones, que son provistos por la coenzima NADPH (Berge *et al*, 1998).

Las monooxidasas P<sub>450</sub> están envueltas en el metabolismo de todos los insecticidas, permitiendo la detoxificación a través de la hidroxilación alifática del DDT, deshidroxilación aromática del carbaryl y propoxur, y la epoxidación de ciclodienos o la activación de organofosforados mediante reacciones de oxidación.

Este mecanismo de resistencia metabólica puede identificarse a través de estudios bioquímicos *in vitro* comparando niveles de estas enzimas en cepas susceptibles y resistentes llevados a cabo en microplacas para evidenciar su sobreexpresión (Brogdon y McAllister, 1998a).

En la mayoría de los casos donde se ha asociado la actividad elevada de las monooxidasas P<sub>450</sub> con la resistencia a insecticidas se ha identificado el rol de los genes Cyp pertenecientes a la familia Cyp6. En *An. gambiae* y *Cx. quinquefasciatus* se ha identificado la sobre-expresión de uno o varios genes pertenecientes a esta familia asociados con la resistencia a piretroides (Nikou *et al*, 2003, Gong *et al*, 2005), así como los pertenecientes a la familia Cyp4, Cyp12 y Cyp9 en otras especies de insectos.

#### 4.1.5. Glutación S-transferasas

Glutación S-transferasas (GST) es una familia de enzimas que catalizan la conjugación del glutatión endógeno a una variedad de compuestos electrofílicos. Estas enzimas han sido implicadas en la detoxificación y biotransformación de muchos xenobióticos. La conjugación incrementa la solubilidad del compuesto electrofílico (insecticidas), facilitando la excreción de la molécula del organismo. De los tipos de GSTs (microsomales y citosólicas), solo las enzimas citosólicas han sido implicadas en el metabolismo de los insecticidas. Esta enzima es inducible por algunos compuestos químicos, tanto en mamíferos como en insectos.

El GST de insectos ha sido clasificado como clase theta. Se ha propuesto a esta clase como precursora de las clases  $\alpha$ ,  $\mu$  y  $\pi$ , basados en la distribución aparente de esta en un rango diverso de organismos que incluyen bacterias, levaduras, plantas e insectos (Wilce *et al*, 1995). Varios estudios han correlacionado la resistencia a insecticidas con

niveles incrementados de actividad GST y la producción de diferentes isoformas (Kuss *et al.*, 1994; Ranson *et al.*, 2002). Las diferentes actividades catalíticas de GST y el número de enzima individual presente en las cepas de insectos susceptibles y resistentes han demostrado ser el factor responsable de la resistencia a varios insecticidas.

El principal rol de las GSTs en la resistencia a insecticidas en mosquitos, es el metabolismo del DDT a productos no tóxicos (DDE), aunque también tienen un rol secundario en la resistencia a organofosforados. La resistencia al DDT basada en GSTs es muy común en varias especies de anofelinos, reflejando el fuerte uso de este insecticida para el control de la malaria durante varias décadas.

#### 4.1.6. Resistencia metabólica en triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas

Durante las últimas dos décadas, la resistencia a insecticidas ha sido reportada en al menos una especie de vector de la enfermedad de Chagas, principalmente a insecticidas de tipo piretroides, en al menos 6 de los países endémicos; también, en algunos países se ha reportado resistencia en más de uno de los vectores (Carvajal *et al.*, 2012; Depickère *et al.*, 2012; Germano *et al.*, 2010, 2012, 2013, 2014; Gómez *et al.*, 2014; Lardeux *et al.*, 2010; Obara *et al.*, 2010, 2011; Palmquist *et al.*, 2010; Pessoa *et al.*, 2008, 2012, 2014, 2015a, 2015b; Reyes, *et al.*, 2007; Roca-Acevedo *et al.*, 2011; Roca-Acevedo *et al.*, 2013; Santo-Orihuela *et al.*, 2008, 2013; Sonoda *et al.*, 2009; Toloza *et al.*, 2008, Vassena *et al.*, 2000, 2003; Yon *et al.*, 2004; Zerba *et al.*, 1997). El principal mecanismo de desintoxicación reportado en triatomíneos es el metabólico, principalmente por esterasas (Santo-Orihuela *et al.* 2011, 2013; Germano *et al.* 2012; Roca-Acevedo *et al.* 2015), oxidasas de función múltiple (Picollo *et al.* 2005) o ambas (Gonzalez Audino *et al.* 2004; Santo-Orihuela *et al.* 2017), sin descartar la posible actividad alterada de glutatión s-transferasa (Wood *et al.* 1986; Sivori *et al.* 1997; Lardeux *et al.* 2010).

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Determinación in vitro de enzimas de resistencia.

Considerando que los bioensayos proveen información limitada sobre los mecanismos de resistencia, se realizaron ensayos bioquímicos para determinar la actividad de las enzimas (actividad enzimática [AE]) involucradas en la desintoxicación a piretroides:  $\alpha$ - y  $\beta$ - esterasas, Oxigenasas de función múltiple (OFM) CitP<sub>450</sub> y Glutation s-transferasas (GST). Utilizando la técnica de Valle *et al.* (2006), con modificaciones para su estandarización para triatominos.

### 4.2.2. Preparación del homogenizado.

Ninfas de primer estadio de cada especie fueron inmovilizadas exponiéndolas a -20°C por 1 minuto para ser homogenizadas individualmente en agua grado MilliQ, después de tomar las alícuotas correspondientes para el ensayo de OFM el homogenato fue centrifugado a 12,000 rpm por 60's en una centrifuga fría a 4°C. El homogenizado fue colocado en pozos de una microplaca de fondo plano por duplicado. Para mediar la absorbancia se utilizó un lector de microplacas UVM-340 (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria).

### 4.2.3. Estandarización de las pruebas enzimáticas.

La evaluación enzimática se realizó en ninfas de 3, 5 y 7 días de edad, con un peso uniforme y sin alimentación previa al ensayo. Evaluando principalmente la cantidad de proteínas totales (PNT).

#### 4.2.4. Determinación de proteínas.

La determinación de proteínas totales fue realizada siguiendo la metodología de Bradford (1976), esta es utilizada para determinar los valores de actividad para todas las curvas de todas las enzimas evaluadas. A 10  $\mu$ l del homogenizado se le agregó el reactivo Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad) [1:5], la lectura de la absorbancia se realizó a 620 nm de 3 a 5 minutos.

##### 4.2.4.1. Curva de calibración.

Se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (ASB. Bio-Rad), preparando diferentes diluciones [0.01 a 1 mg/ml] las cuales fueron utilizadas para elaborar la curva estándar mediante su absorbancia a 620 nm utilizando el reactivo de Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad) (Figura 4.1).

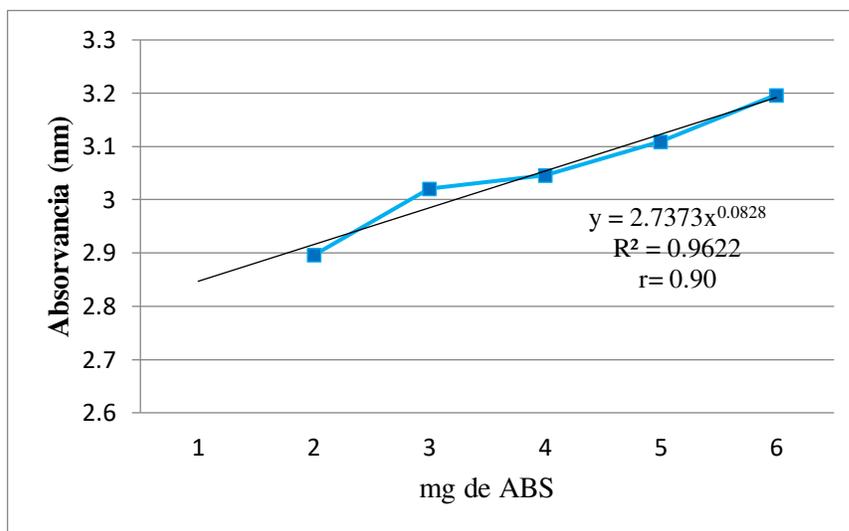


Figura 4.1. Curva de calibración de albúmina de suero bovino para la cuantificación de actividad enzimática

#### 4.2.5. Determinación de esterasas $\alpha$ y $\beta$ .

Se determinaron las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas utilizando  $\alpha$ - y  $\beta$ -naftil esterasa como sustratos, e iniciando la hidrólisis enzimática con la adición de o-dianisidina, formando el complejo diazol (Miller y Karn, 1980). La actividad fue determinada por la medición de la absorbancia a 570 nm.

##### 4.2.5.1. $\alpha$ -esterasas.

Se distribuyeron 10  $\mu$ l del homogenizado, por duplicado sobre la microplaca, en el pozo blanco (2 pozos: G11 a G12) fueron agregados 10  $\mu$ l de agua. Para los pozos del control positivo (2 pozos: H11 a H12) se agregaron 10  $\mu$ l de la solución alfa-naftol al 0.5  $\mu$ h/ $\mu$ l (~ 3.5 nmoles/ $\mu$ l) (SIGMA-ALDRICH Inc, México) en cada pozo. Colocar en cada pozo 200  $\mu$ l de alfa-naftil acetato/fosfato de sodio y se agregó en cada pozo 20  $\mu$ l de Fast blue (O-dianisidina) (SIGMA-ALDRICH Inc, México) e incubo a temperatura ambiente por 5 min y para posteriormente leer la absorbancia a 570 nm.

##### 4.2.5.2. $\beta$ -esterasas.

En los pozos correspondientes se depositó 10  $\mu$ l del homogenato. En el pozo blanco (2 pozos: G11 a G12) se agregaron 10  $\mu$ l de agua. El control positivo (2 pozos: H11 a H12) consistió en 10  $\mu$ l de la solución beta-naftol al 0.5  $\mu$ h/ $\mu$ l (~ 3.5 nmoles/ $\mu$ l) en cada pozo. Se agregaron en cada pozo 200  $\mu$ l de beta-naftil acetato/fosfato de sodio. Pasados 5 min a temperatura ambiente, fueron agregados 50  $\mu$ l de Fast blue (O-dianisidinal SIGMA-ALDRICH Inc, México), la placa se incubo a temperatura ambiente por 5min, y la absorbancia fue leída a 570 nm.

#### 4.2.6 Determinación de OFM.

La actividad de OFM fue determinada por la medición del grupo hemo en el insecto. En insectos no alimentados este grupo esta principalmente asociado con las

Mono-oxigenasas CitP<sub>450</sub>. P<sub>450</sub> acarrean moléculas de oxígeno y reciben electrones del NADPH para introducir oxígeno en el sustrato y formar agua con el otro átomo de oxígeno: sustrato (S)+(NADPH+H<sup>+</sup>)+O<sub>2</sub>→S(O)+NADP<sup>+</sup>H<sub>2</sub>O (Bergé *et al.*, 1998).

Esta prueba no mide la actividad enzimática. Solo cuantificara el grupo hemo de insectos no alimentados, y se asocia principalmente con el citocromo P<sub>450</sub>. La prueba se realizó distribuyendo 20µl de los homogenatos, previo a la centrifugación, en una microplaca. En los pozos blanco (2 pozos: G11 a G12), fueron añadidos 20µl de buffer de fosfatos. Para el control positivo (2 pozos: H11 a H12), se colocaron 20 µl de la solución de citocromo C (SIGMA-ALDRICH Inc, México). Posteriormente se añadieron a cada pozo 60 µl de buffer de fosfatos y 200 µl de la solución de trabajo: TMBZ/acetato de Sodio. Seguido de 25 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (volumen final de 305 µl) e incubo a temperatura ambiente protegido de la luz durante 90 minutos. La absorbancia se leyó a 650 nm.

#### 4.2.7. Determinación de GST.

Para Glutation s-transferasas (GSTs), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) es usado como sustrato, el cual es adecuado para una amplia gama de isoenzimas de GST (Brogdon y Barber 1990). Después de la conjugación del grupo tiol del Glutatión al sustrato CDNB, esto produce un incremento en la absorbancia a 340 nm. Se distribuyeron 15 µl del homogenizado en la microplaca, para los pozos blanco (2 pozos: H11 a H12) y agregaron 15 µl de agua. A cada pozo se le añadió 195 µl de la solución de trabajo: GSH/CDNB. La lectura de la absorbancia se realizó a 340 nm en intervalos de un minuto durante 20 min.

#### 4.2.8. Análisis de resultados.

Los datos de absorbancia obtenidos para cada enzima fueron utilizados para crear una base de datos y calcular los valores medios de absorbancia por insecto y transformados en actividad enzimática. Con base en esto, es necesario tomar en cuenta el volumen de la homogenización, el total de proteínas en cada insecto y la unidad de

actividad correspondiente para cada enzima; para cada valor se utilizó el valor de conversión obtenido de la curva estándar.

Los valores de actividad enzimática resultantes fueron analizados para verificar distribución normal (Kolmogorov & Smirnov, 1971) y posteriormente analizarlos por ANOVA ( $p < 0.05$ ) y comparación múltiple de medias (Tukey test,  $p < 0.05$ ) así como, por la prueba t de Student (GraphPad Prism programme v. 7) (SPSS Inc. Released 2007. SPSS for Windows, Version 16.0. Chicago, SPSS Inc.) para determinar la diferencia significativa de la actividad enzimática entre las poblaciones estudiadas, así como, con su respectiva cepa de referencia.

#### 4.2.9. Clasificación de la resistencia.

Se calculó el percentil 99 para cada enzima con referencia a la cepa susceptible para cada especie con la finalidad de calcular el número de individuos con actividad enzimática mayor a este valor en cada una de las poblaciones silvestres. La actividad enzimática fue clasificada como: no alterada, incipientemente alterada o alterada, si los valores calculados anteriormente fueron menores al 15%, entre el 15 y 50% o mayores al 50%, respectivamente (Montella *et al.*, 2007) (Tabla 4.1).

#### 4.2.10. Correlación de la resistencia a los insecticidas piretroides y la actividad enzimática.

Se determinó la correlación r de Pearson ( $p < 0.05$ ) entre la actividad enzimática asociada a la desintoxicación de permetrina y deltametrina con los resultados de los bioensayos por aplicación tópica.

### 4.3.RESULTADOS

#### 4.3.1. Estandarización de ensayos enzimáticos.

Las ninfas de tres días de edad mostraron la mayor cantidad de proteína total, dando una diferencia significativa entre los 3 y 5 días ( $p < 0.05$ ) y entre 3 y 7 días, sin embargo, pero no entre los 5 y 7 días (Figura 4.2).

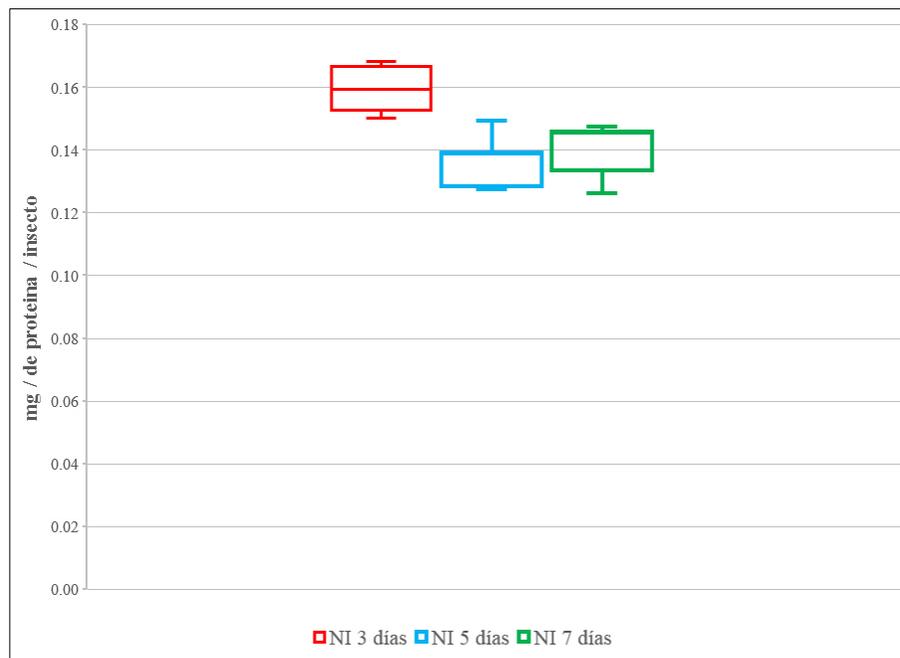


Figura 4.2. Diferencia en la cantidad de proteínas totales (PNT) en ninfas de 3, 5 y 7 días de edad.

#### 4.3.2. Sistemas enzimáticos involucrados en la resistencia a piretroides.

Para cada uno de los cuatro sistemas enzimáticos ensayados, se analizaron al menos 30 individuos por población y se compararon con individuos de las cepas susceptibles (Figuras 4.3 a 4.6), la actividad de  $\alpha$ -esterasas se encontró alterada ya que fue significativamente mayor ( $p < 0.01$ ), en *T. pallidipennis*, *T. mazzottii* y *T. longipennis* (J) el porcentaje de individuos fue de 90%, 78% y 88% respectivamente, *T. picturata* resulto con actividad enzimática insipientemente alterada (<50%). Se encontró una

actividad enzimática alterada de  $\beta$ -esterasas ( $p < 0.01$ ) en el 100% de los individuos de *T. mazzottii* y en *T. longipennis* (J) y en el 56% de *T. longipennis* (Gto) comparadas con su cepa de referencia mientras que para los individuos de *T. pallidipennis* y *T. picturata* se encontró una actividad enzimática insipientemente alterada (29% y 41% respectivamente). En OFM (CitP<sub>450</sub>) solamente *T. picturata* mostro actividad insipientemente alterada (34% de individuos) con respecto a su cepa de referencia ( $p < 0.01$ ). En el caso de GST solo *T. mazzottii* y *T. picturata* mostraron una actividad significativamente elevada con un 68% y 49% de individuos con respecto a su cepa de referencia ( $p < 0.01$ ) (Tabla 4.1).

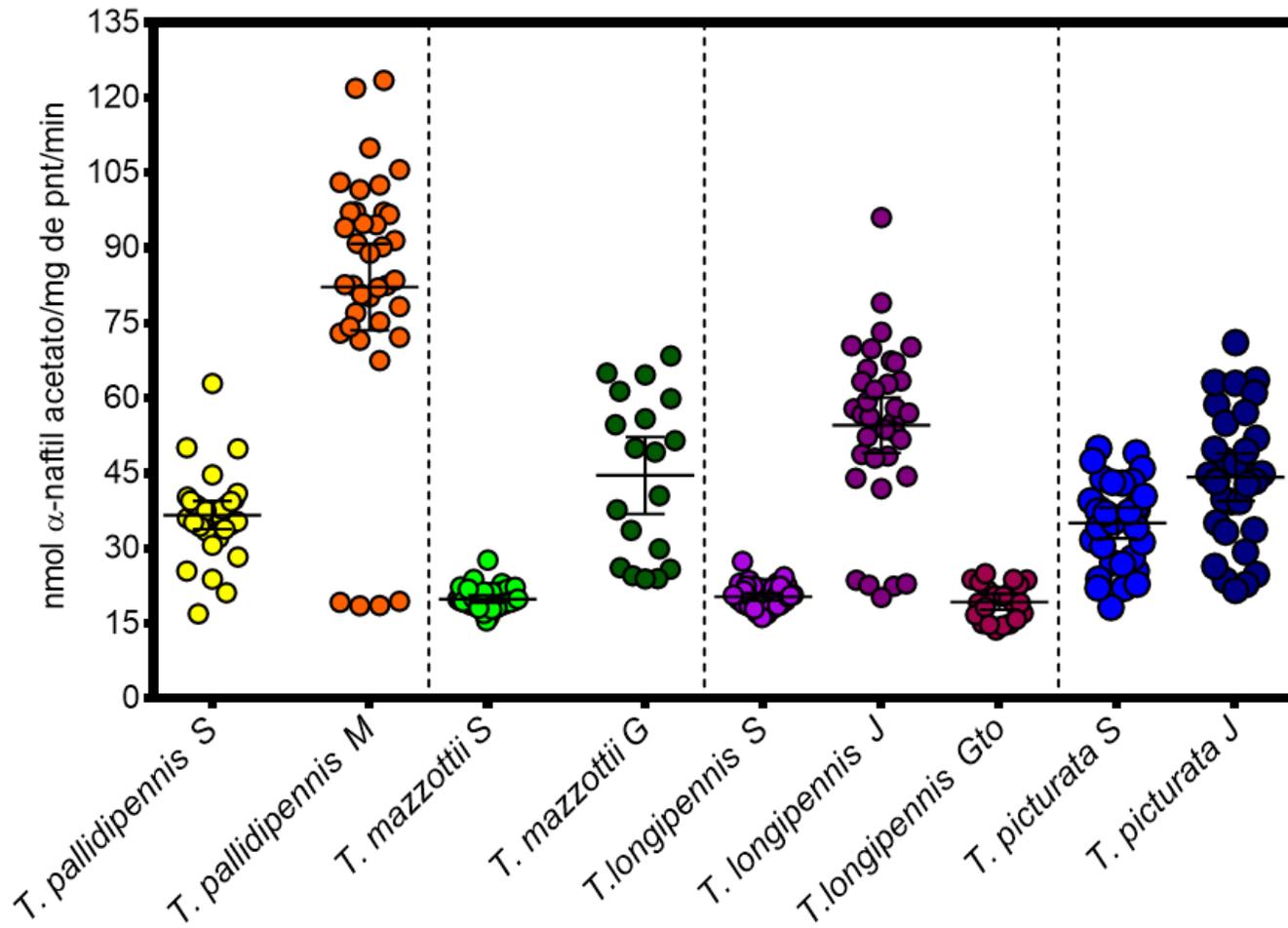


Figura 4.3. Perfiles de actividad enzimática de  $\alpha$ -esterasas en triatominos de México.

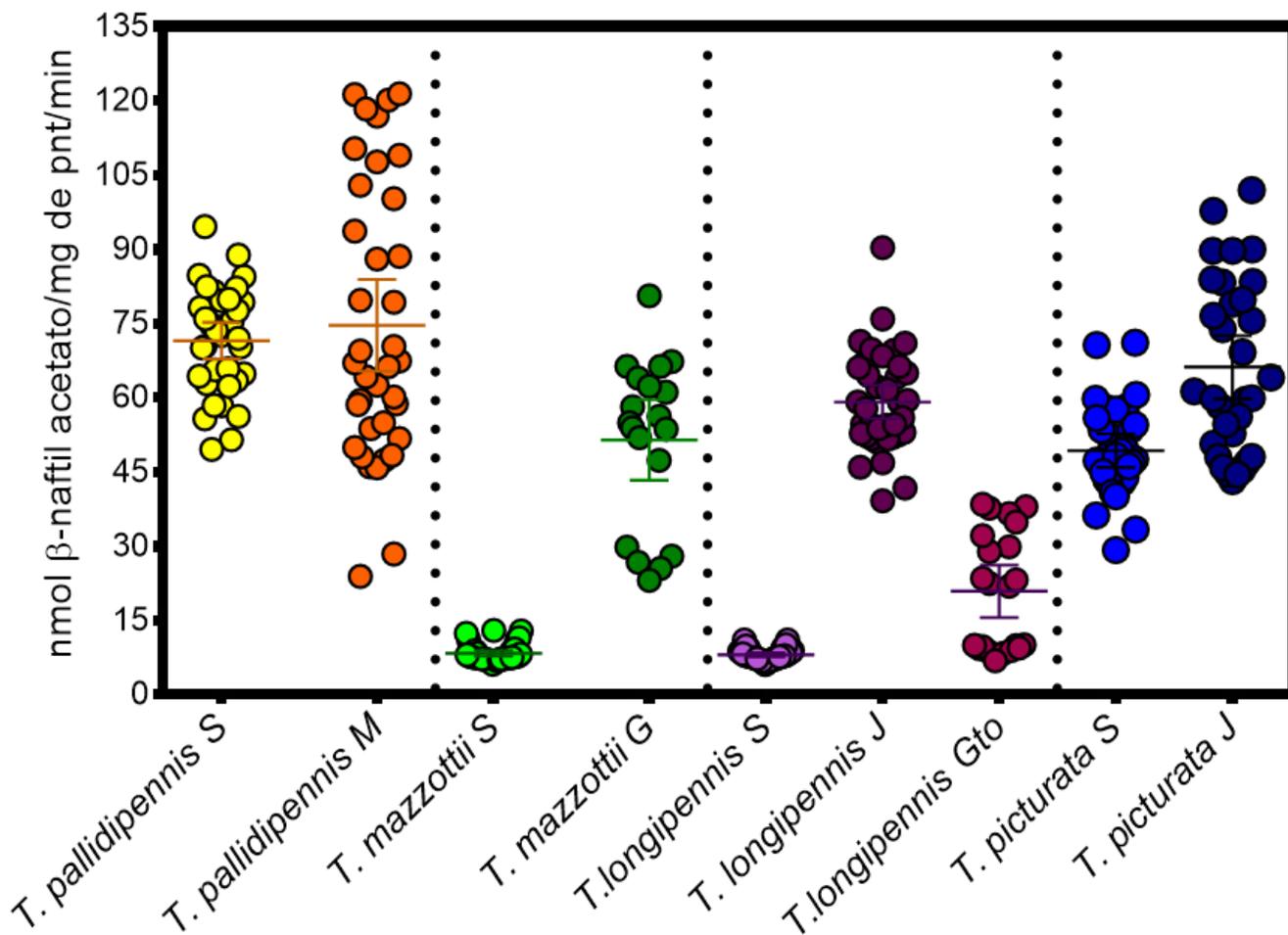


Figura 4.4. Perfiles de actividad enzimática de β-esterasas en triatominos de México.

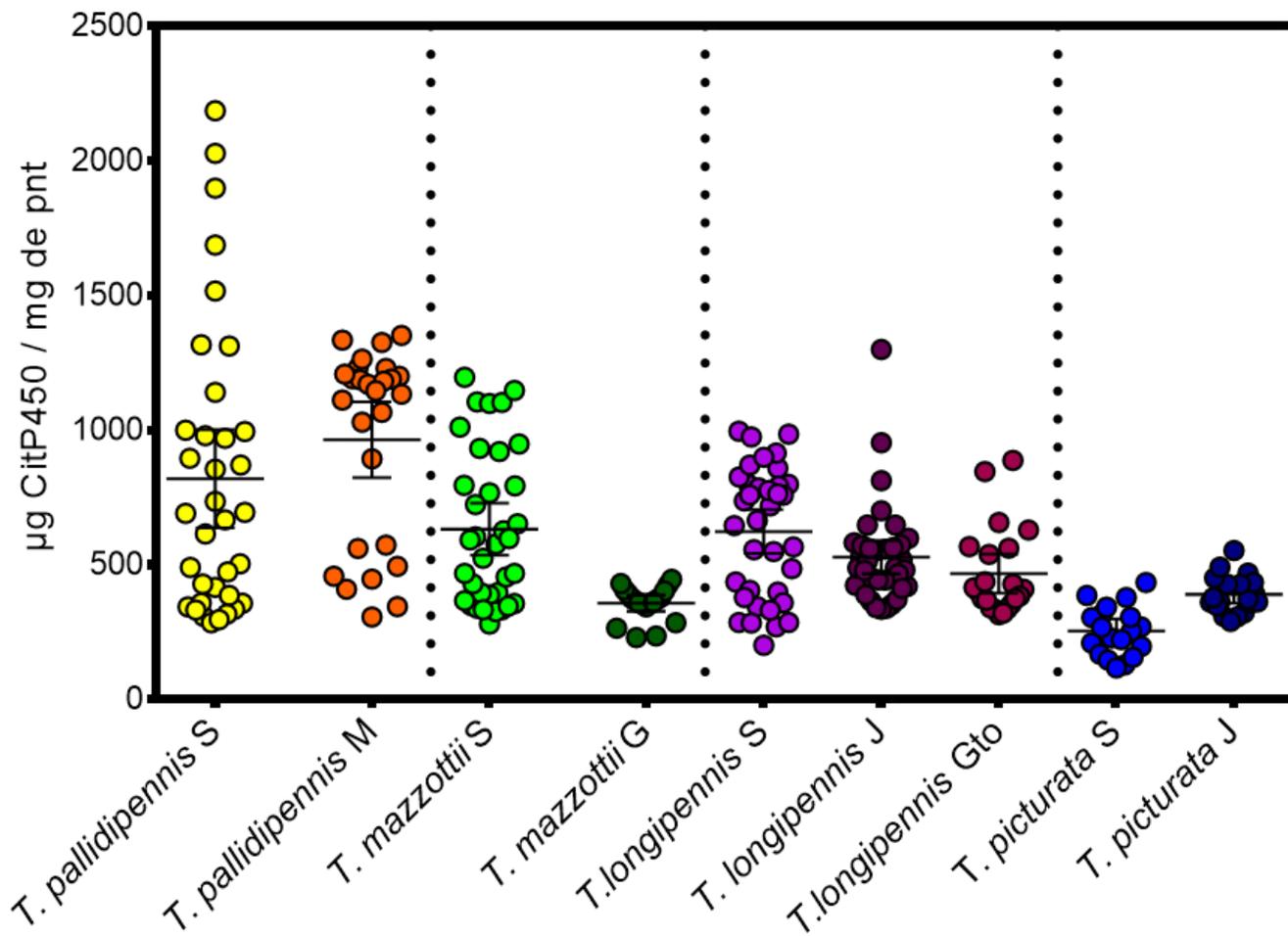


Figura 4.5. Perfiles de actividad enzimática de OFM (CitP<sub>450</sub>) en triatominos de México.

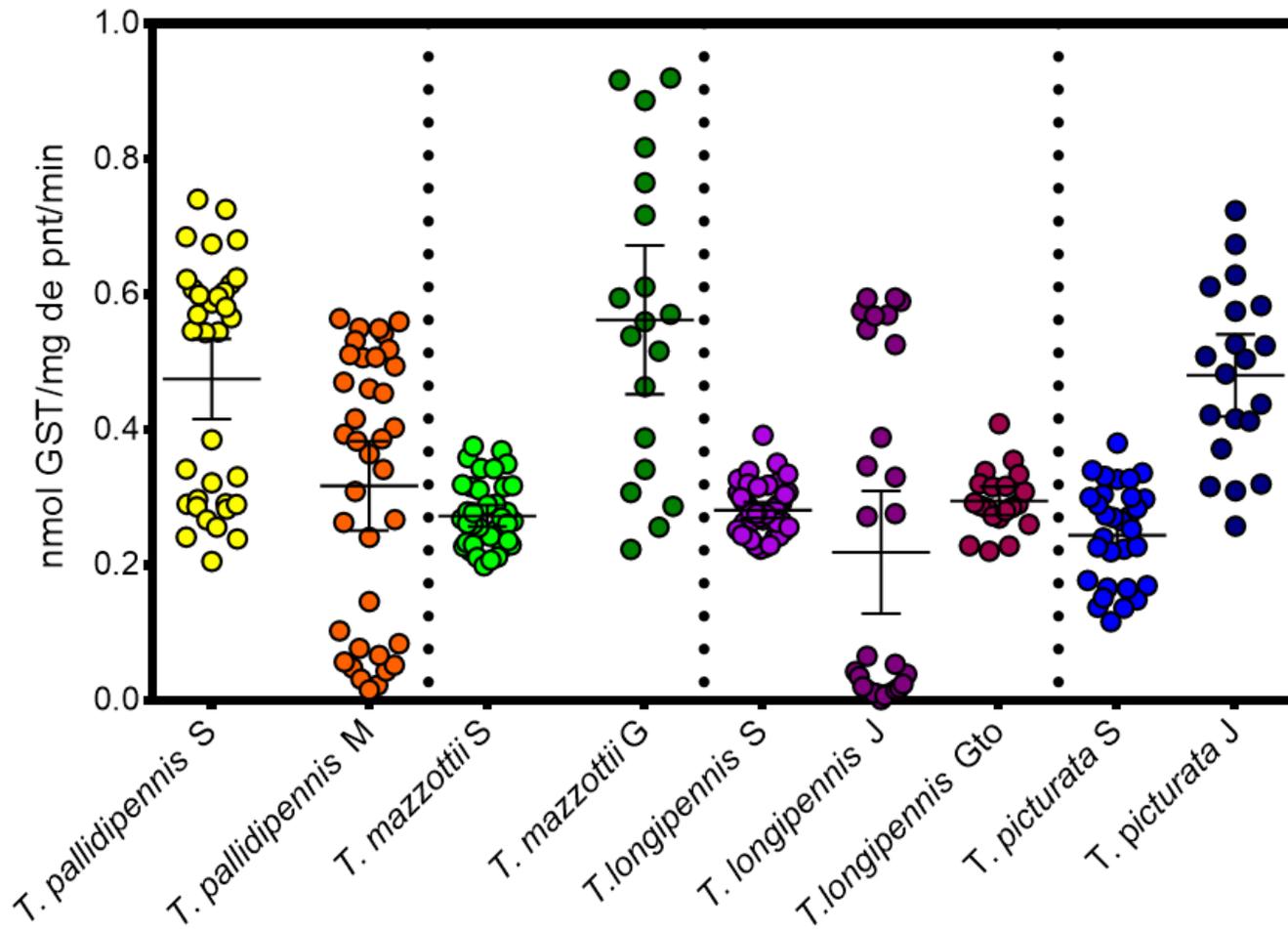


Figura 4.6. Perfiles de actividad enzimática de glutatión s-transferasa en triatominos de México.

Tabla 4.1. Cuantificación de la actividad enzimática en Triatominos.

Especie/Cepa	N <sup>a</sup>	$\alpha$ -esterasas (nmol/mg PNT/min)		$\beta$ -esterasas (nmol/mg PNT/min)		OFM ( $\mu$ g cit/mg PNT)		GST (mmol/mg PNT/min)	
		Media <sup>b</sup>	p99	Media	p99	Media	p99	Media	p99
<i>T. pallidipennis</i> S <sup>c</sup>	35	36.66	58.62	71.53	92.66	820	2133.21	0.4751	0.74
<i>T. pallidipennis</i> M <sup>g</sup>	37	82.22	%>p99 <sup>d</sup> 90**	74.63	%>p99 29*	964.7	%>p99 0	0.3172	%>p99 0
<i>T. mazzottii</i> S <sup>c</sup>	39	19.89	26.23	8.35	12.96	632.3	1179.44	0.2728	0.37
<i>T. mazzottii</i> G <sup>f</sup>	38	44.61	%>p99 78**	51.46	%>p99 100**	357.7	%>p99 0	0.5622	%>p99 68**
<i>T. longipennis</i> S <sup>c</sup>	42	20.34	26.19	8.05	11.07	689.9	992.24	0.2811	0.37
<i>T. longipennis</i> J <sup>h</sup>	37	54.64	%>p99 88**	59.17	%>p99 100**	528.4	%>p99 2	0.2991	%>p99 29*
<i>T. longipennis</i> Gto <sup>i</sup>	44	19.32	%>p99 0	20.88	%>p99 56**	467.8	%>p99 0	0.3056	%>p99 4
<i>T. picturata</i> S	30	35.09	49.75	49.29	71.01	254.57	426.29	0.0244	0.36
<i>T. picturata</i> J <sup>h</sup>	32	44.24	%>p99 30*	66.20	%>p99 41*	433	%>p99 34*	0.3034	%>p99 49*

<sup>a</sup> Numero de ninfas

<sup>b</sup> Valor medio de cada actividad enzimática

<sup>c</sup> Percentil 99° de la cepa de referencia

<sup>d</sup> Porcentaje de especímenes de triatominos con actividad por arriba del percentil 99° de la cepa de referencia

<sup>e</sup> Cepa de referencia

\* Actividad enzimática incipientemente alterada

\*\* Actividad enzimática alterada

f G Guerrero

g M Morelos

h J Jalisco

i Gto Guanajuato

### 4.3.3. Correlación de la resistencia en función de la actividad enzimática.

Al realizar la evaluación de la correlación entre la actividad enzimática de todas las especies respecto a su  $DL_{50}$ , se encontró una correlación significativa solo para  $\alpha$ -esterasas y deltametrina ( $r=0.84$ ,  $p< 0.02$ ), lo cual nos permite suponer la relación de esta enzima como principal mecanismo de desintoxicación a este piretroide (Figura 4.6).

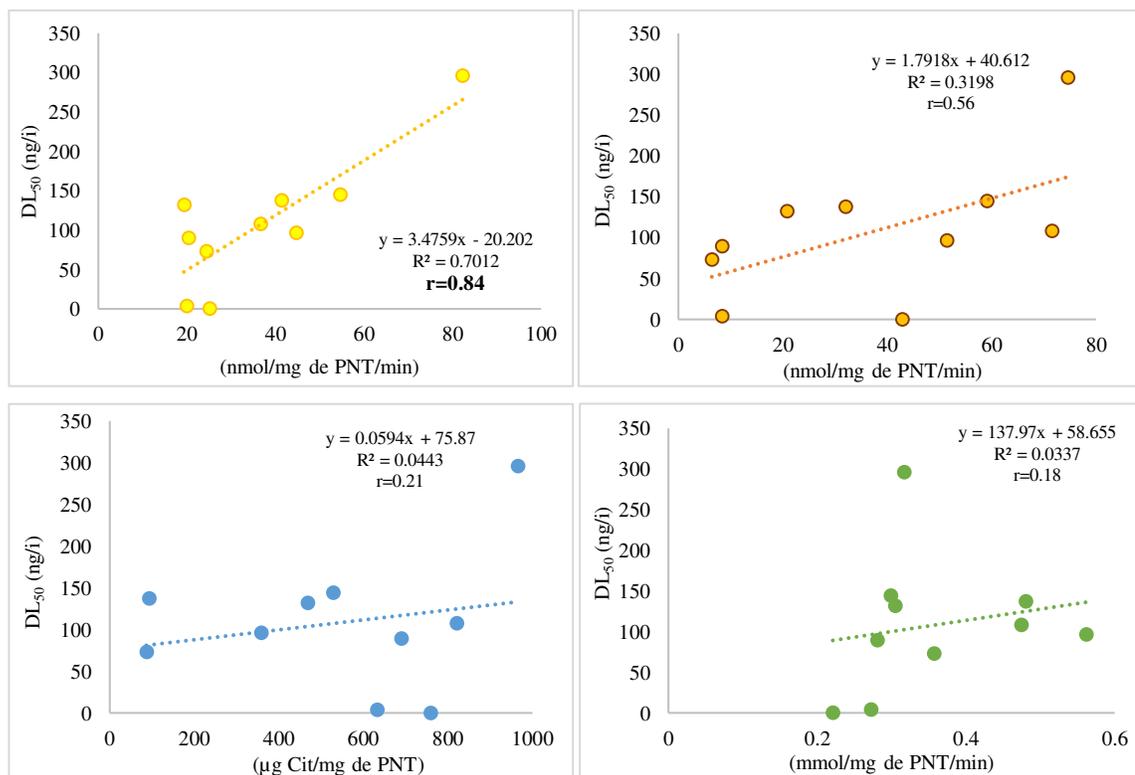


Figura 4.7. Correlación de actividad enzimática a)  $\alpha$ -esterasas, b)  $\beta$ -esterasas, c) GST y d) MFO y su correlación con la susceptibilidad a deltametrina.

Por otra parte, no se encontró correlación alguna entre la actividad enzimática de las especies respecto a su  $DL_{50}$  para permetrina (Figura 4.8).

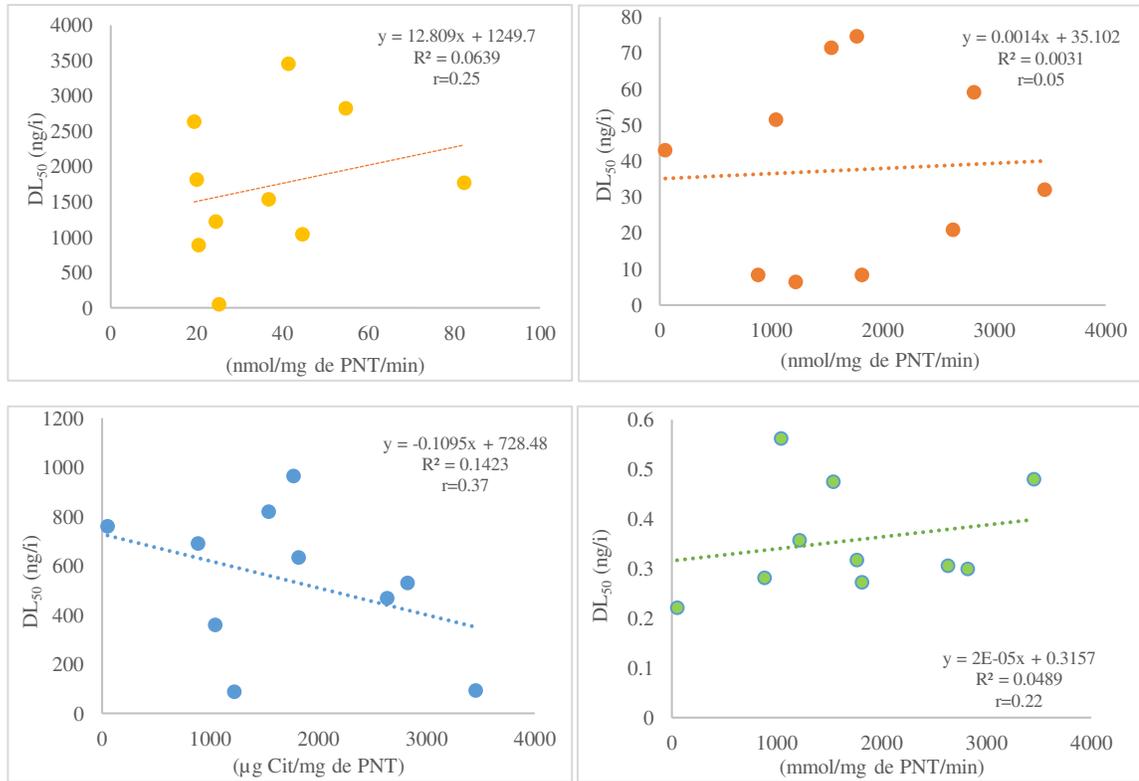


Figura. 4.8. Expresión de la actividad enzimática de a)  $\alpha$ -esterasas, b)  $\beta$ -esterasas, c) GST y d) MFO y su correlación con la susceptibilidad a permetrina.

#### 4.4.DISCUSIÓN

La determinación de la actividad enzimática como mecanismo de resistencia se ha evaluado en diversos estudios; esta evaluación no era confiable dado que solo se realizaba la medición de la absorbancia por minuto, sin tomar en cuenta otros factores, como son la edad de los ensayos, realizando las evaluaciones en ninfas de 2, 3, o 5 días de edad, por lo tanto se optó por realizar la estandarización para determinar la edad óptima para la evaluación de la actividad enzimática, encontrando que la edad óptima para esta evaluación es en NI de 5 a 7 días de edad, ya que, el contenido de proteínas totales (PNT) se encuentra estable, a diferencia de las ninfas de 3 días de edad cuyo contenido es mucho mayor por encontrarse aún en proceso de esclerotización y por lo tanto la lectura de la actividad enzimática no es confiable, y de ninfas de 9 días cuyo contenido proteico se encuentra en decremento por el estado de inanición. Otra de las inconsistencias en la determinación de la actividad enzimática es la evaluación de sin seguir una metodología bien establecida, comparando las cepas de referencia contra las silvestres estableciendo como UT (Umbral de Tolerancia) al 70% de los individuos (Germano *et al.* 2012; Picollo *et al.* 2005), pero si se tomara el percentil 99 (Montella *et al.* 2007) la alteración en la actividad enzimática sería nula; además, cabe destacar la inconsistencia en la cantidad de individuos utilizados para este tipo de ensayos (Picollo *et al.* 2005; Germano *et al.* 2012; Santo-Orihuela *et al.* 2011) o incluso evaluando solo 9 individuos por ensayo, en este trabajo se optó por seguir lo establecido por Valle *et al.* (2007) realizando la evaluación en al menos 30 individuos.

Independientemente de la metodología seguida, en triatominos de diversas especies se ha encontrado una relación entre el incremento en esterasas y la resistencia de estos (Santo-Orihuela *et al.* 2011, 2013; Germano *et al.* 2012; Roca-Acevedo *et al.* 2015). Para tener un mejor conocimiento del sistema involucrado en la desintoxicación se realizó por separado la determinación de la actividad de  $\alpha$ - y  $\beta$ -esterasas; para las especies evaluadas se encontró una actividad de  $\alpha$ -esterasas significativamente mayor ( $p < 0.01$ ), en *T. pallidipennis*, *T. mazzottii* y *T. longipennis* (J) y *T. picturata* con alteración insipiente, mientras que, para  $\beta$ -esterasas encontramos una actividad alterada

( $p < 0.01$ ) en *T. mazzottii* y en *T. longipennis* (J) y *T. longipennis* (Gto) comparadas con su cepa de referencia e incipientemente alterada en *T. pallidipennis* y *T. picturata*. En este caso para *T. pallidipennis* y *T. longipennis* (Gto) se puede observar como una de las dos esterasas juega un papel importante en la detoxificación mientras que para las demás poblaciones y especies ambas se encuentran actuando activamente. En OFM (CitP<sub>450</sub>) solamente *T. picturata* mostro actividad insipientemente alterada con respecto a su cepa de referencia ( $p < 0.01$ ), mecanismo menos relacionado con la resistencia a piretroides al menos en triatomos pero que también ha sido reportado en pocas poblaciones de *T. infestans* (Picollo *et al.* 2005, Santo-Orihuela *et al.* 2017). En el caso de GST solo *T. mazzottii* y *T. picturata* mostraron una actividad significativamente elevada con respecto a su cepa de referencia ( $p < 0.01$ ), aun cuando este mecanismo no está relacionado directamente en la resistencia a piretroides, se tiene reporte de su rol en la resistencia en *T. infestans* (Sivori *et al.* 1997), ya que, podría haber sido inducido como resultado de la resistencia cruzada a organofosforados (Díaz *et al.* 2004).

Los resultados obtenidos muestran que existe una diferencia significativa entre la actividad enzimática de las poblaciones silvestres y sus cepas de referencia. Sugiriendo que el incremento en la actividad de  $\alpha$ -esterasas en las poblaciones silvestres contribuye de forma activa como principal mecanismo de desintoxicación. Al comparar la actividad enzimática de  $\alpha$ -esterasas respecto a la DL<sub>50</sub> de las poblaciones de campo, la correlación obtenida ( $r = 0.85$ ,  $p < 0.01$ ) sustenta su importancia como vía de detoxificación a la deltametrina.

#### 4.5.BIBLIOGRAFÍA

- Berge JB, Feyereisen R, Amichot. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 352, 1701-1705.
- Brogdon WG, McAllister JC. 1998. Insecticide resistance and Vector Control. Emerg. Infect. Dis. 4: 605-613.
- Brogdon WG. 1989. Biochemical Resistance Detection: an alternative to bioassay. Parasitology Today. 5(1): 56-60.
- Carvajal G, Mougambure-Cueto G, Toloza AC. 2012. Toxicity of nonpyrethroid insecticides against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 107:675-679.
- Depickère S, Buitrago R, Siñani E, Baune M, Monje M, Lopez R. Susceptibility and resistance to deltamethrin of wild and domestic populations of *Triatoma infestans* (Reduviidae: Triatominae) in Bolivia: new discoveries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012; 107:1042-1047.
- Diaz C., Rodriguez M., Fresneda M. Y Bisset J. Determinación de la actividad glutatión-S-transferasa en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Cuba y otros países de América Latina. Rev Cubana Med Trop . 2004; 56(2): 111-116.
- Flores A, Albeldano W, Fernández, I., Badii M, Becerra H, Ponce G, Lozano S, Brogdon W, Black, W, Beaty, B. 2005. Elevated  $\alpha$ - esterases levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L) from Baja California, México. Pesticide Biochemistry and Physiology 82: 66-78.
- Germano M, Picollo MI, Spillmann C, Mougabure-Cueto G. Fenithrothion: an alternative insecticide for the control of deltamethrin-resistant populations of *Triatoma infestans* in northern Argentina. Med Vet Entomol. 2014; 28:21-25.

- Germano MD, Picollo MI, Mougabure-Cueto GS. Microgeographical study of insecticide resistance in *Triatoma infestans* from Argentina. *Acta Tropica*. 2013; 128:561-565.
- Germano MD, Roca-Acevedo G, Mougabure-Cueto GA, Toloza AC, Vassena C V., Picollo MI. New Findings of Insecticide Resistance in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) From the Gran Chaco. *J Med Entomol*. 2010; 47(6):1077–81.
- Germano MD, Santo-Orihuela P, Roca-Acevedo G, Toloza AC, Vassena C, Picollo MI. Scientific evidence of three different insecticide-resistant profiles in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol*. 2012; 49:1355-1360.
- Germano MD, Vassena CV, Picollo MI. Autosomal inheritance of deltamethrin resistance in field populations of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from Argentina. *Pest Manag Sci*. 2010; 66:705-708.
- Gonzalez Audino P, 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* 99: 335-339
- Gong M, Yan G, Hu X, Sun Y, Ma L, Li X, Sun L, Sun J, Qian J, Zhu C. 2005 Cloning and Overexpression of CYP6F1, a Cytochrome P450 Gene, from Deltamethrin-resistant *Culex pipiens pallens*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 37(5):317-326.
- Hemingway J, Karunaratne, SHPP. 1998. Mosquito carboxylesterases:a review of the molecular biology and biochemistry of major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 12:1-12.

- Hemingway J, Ranson H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 371–391.
- Ku SS, Chiang FM, Hsin CY, Yao YE, Sun CN. 1994. Glutathione transferase isozymes involved in insecticide resistance of diamondback moth larvae. *Pest Biochem Physiol.* 50:191-7.
- Lardeux F, Depickère S, Duchon S, Chavez T. Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. *Trop Med Int Heal.* 2010; 15(9):1037–48.
- Montella I., Martins A., Viana-Medeiros P., Pereira J., Braga I., Valle D. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77(3): 467–477.
- Nikou D, Ranson H, Hemingway. 2003. An adult specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene* 318: 91-102.
- Obara MT, Otrera VCG, Gurgel RG, Santos JP, Santalucia M, Rosa JA. Monitoring the susceptibility of *Triatoma sordida* Stal, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) to deltamethrin insecticide, in Central-Western Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44:206-212.
- Obara TM. Caracterização da resistência a inseticidas em populações da subfamília Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vetores de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. 2010. 246 p. (Doctors Thesis). Centro Universidade de São Paulo. São Paulo.

Palmquist K, Salatas J, Fairbrother A. Pyrethroid Insecticides: Use, Environmental Fate, and Ecotoxicology, *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management* Publisher: InTech. Edit: Farzana Perveen. 2012; pp. 708.

Pessoa GCA. Perfil da suscetibilidade a deltametrina em populações de *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) do Estado de Minas Gerais procedentes de áreas com infestação persistente. 179 p. (Doctor's Thesis). Universidade Federal de Minas Gerais; 2012. Belo Horizonte.

Pessoa GCD, Dias LS, Diotaiuti L. Deltamethrin pyrethroid susceptibility characterization of *Triatoma sordida* Stal, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) populations in the Northern Region of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014; 47:426-429.

Pessoa GCD, Rosa ACL, Bedin C, Wilhelms T, Mello F, Coutinho HS. Susceptibility characterization of residual Brazilian populations of *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae) to deltamethrin pyrethroid. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015; 48:157-161.

Pessoa GCD, Trevizani NAB, Dias LS, Melo BV, Diotaiuti L. Toxicological profile of deltamethrin in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in State of Ceará, Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015; 48:39-43.

Pessoa GCD. Monitoramento da suscetibilidade ao piretróide deltametrina em populações de *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae). 95 p. (Master's Dissertation). Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz; 2008. Belo Horizonte.

Piccollo MI, Vassena C, Santo 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* 42: 637-642

Ranson H, Claudianos C, Orтели F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298:179-181.

Reyes M, Angulo VM, Sandoval CM. Efecto tóxico de betacipermetrina, deltametrina y fenitrotión en cepas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae). *Biomédica*. 2007; 27 (suppl I):75-82.

Roca-Acevedo G, Mougabure-Cueto G, Germano M, Santo-Orihuela P, Rojas-Cortez M, Noireau F, *et al.* Susceptibility of sylvatic *Triatoma infestans* from Andean valleys of Bolivia to deltamethrin and fipronil. *J Med Entomol*. 2011; 48(4):828–35.

Roca-Acevedo G, Piollo MI, Santo-Orihuela. Expression of insecticide resistance in immature life stages of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol*. 2013; 50:816-818

Roca-Acevedo. 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). *Journal of Medical Entomology*. 2015; 52(5): 987–992.

Rodríguez MM, Bisset JA, Ruiz M, Soca A. 2002. Cross-Resistance to Pyrethroid and Organophosphorus Insecticides induced by selection with Temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J. Med. Entomol*. 39(6): 882-888.

- Rodriguez MM, Bissett J, Fernandez DMD, Lauzan L, Soca A. 2001. Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. *J Med Entomol.* 38:623–628.
- Santo-Orihuela PL, 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 PL, Picollo MI. 2011. Contribution of general esterases to pyrethroid resistant *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *Acta Toxicol. Argent.* 19:32–40.
- Santo-Orihuela PL, Carvajal G, Picollo MI, Vassena CV. Analysing deltamethrin susceptibility and pyrethroid esterase activity variations in sylvatic and domestic *Triatoma infestans* at the embryonic stage. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013; 108:1031-1036.
- Santo-Orihuela PL, Vassena CV, Carvajal G, *et al.* Toxicological, Enzymatic, and Molecular Assessment of the Insecticide Susceptibility Profile of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae) Populations From Rural Communities of Santa Cruz, Bolivia. *Journal of medical entomology.* 2017;54(1):187-195. doi:10.1093/jme/tjw163.
- Scott, J. A. 1995. The Molecular-genetics of resistance: Resistance as a response to stress. Kampling-Bushland USDA Livestock Insect Research Laboratory; Agricultural Research Service. Kerrville, TX 78028-9184. *Florida Entomologist*, 78: 399-414.

- Sonoda IV, Pessoa GCD, Cortez MR, Dias JC, Romanha AJ, Diotaiuti L. Susceptibility of *Triatoma infestans* to deltamethrin in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104:668-670.
- Sívorí JL, Casabé N, Zerba EN, Wood EJ. Induction of Glutathione S-transferase Activity in *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1997; 92(6): 797-802.
- Tolozá AC, Germano M, Cueto GM, Vassena C, Zerba E, Picollo MI. Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instar of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol*. 2008; 45:421-426.
- Vassena CV, Picollo MI, Zerba EN. Insecticida resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med Vet Entomol*. 2000; 14:51-55.
- Vassena CV, Picollo MI. Monitoreo de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, insectos vectores de la Enfermedad de Chagas. *Revista de toxicología en línea*. 2003; 3: 1-21.
- Wilce MC, Board PG, Feil SC, Parker MW. 1995. Crystal structure of a theta-class glutathione transferase. *EMBO J* 14(10): 2133-2143.
- Wood E, Casabé N, Melgar F, Zerba E. Distribution and properties of glutathione-S-transferase from *Triatoma infestans*. *Comp Biochem Physiol*. 1986; 84B: 607-618.
- Yon FC, Balta R, García N, Troyes A, Cumpa H, Valdivia A. Susceptibilidad y resistencia de *Triatoma infestans* y *Panstrongylus herreri* a los insecticidas piretroides, Perú 2001. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2004; 21:179-182.

Zerba EN, Wallace G, Picollo MI, Casabe N, Licastro S, Wood E, *et al.* Evaluación de la  $\beta$ -cipermetrina para el control de *Triatoma infestans*. Pan Am J Public Health. 1997; 1:133-137.

## CAPÍTULO 5

### NUEVAS MUTACIONES DE TIPO *kdr* EN TRIATOMINOS VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MEXICO.

#### RESUMEN

Uno de los mecanismos más importantes en la resistencia a insecticidas en triatominos para insecticidas piretroides son las mutaciones knockdown o *kdr*, dada por cambios puntuales en un aminoácido en la secuencia del gen *para* (SII –S6) del canal de sodio. Estas mutaciones son originadas por la presión de selección principalmente de los insecticidas piretroides, aunque, pueden originarse por otra clase de insecticida dando origen a una resistencia cruzada.

En triatominos se han reportado dos de estas mutaciones la L925I y la L1014F ambas para *T. infestans* en Sur América. El control de triatominos en México se encuentra establecido en la NOM-032-SSA-2014 donde se indica únicamente el uso de insecticidas piretroides para el control químico en localidades con infestación recurrente; siendo el mediante el uso de insecticidas piretroides como la deltametrina y la permetrina+esbioletrina para rociado en interiores y tratamiento UBV respectivamente.

En este trabajo se describe la secuencia de la región IIS4 – IIS6 del gen *para* logrando identificar las mutaciones L1014F/S en *Triatoma dimidiata*, *Triatoma pallidipennis* y *Triatoma picturata*, la mutación A943V en *Triatoma longipennis* y para *Triatoma mazzottii* la K964R en poblaciones resistentes a piretroides.

## 5.1. INTRODUCCIÓN

En México en los últimos años (2013 – 2017) se han registrado alrededor de 4,000 casos de la enfermedad de Chagas sin descartar que estos representan un sub-registro del verdadero estado de la enfermedad (SSA-DGE 2013 - 2017), dado que la transmisión de la enfermedad en el país es posible por 19 diferentes vectores entre ellos principalmente *T. dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. mazzottii* y *T. picturata*, entre otros (Salazar-Schettino *et al.* 2010); además, la ausencia de un programa para el monitoreo y vigilancia de estos vectores, el uso de insecticidas para otros vectores de enfermedades y la ausencia de evaluación es el estado de susceptibilidad de los triatomos a insecticidas propicia el mantenimiento de la enfermedad.

El control de triatomos en México se encuentra establecido en la NOM-032-SSA-2014 donde se indica únicamente el uso de insecticidas piretroides para el control químico en localidades con infestación recurrente; siendo el CENAPRECE (2017) quien regula los lineamientos del uso de insecticidas en México y que establece el uso de piretroides como la deltametrina y la permetrina+esbioletrina para rociado en interiores y tratamiento UBV respectivamente.

El uso indiscriminado de insecticidas es uno de los principales factores que propician la aparición de resistencia, actualmente se ha encontrado resistencia a los cuatro principales tipos de insecticidas utilizados para el control de vectores (OMS 2016). La resistencia a insecticidas puede estar dada por la presencia de uno o más mecanismos, como modificaciones fisiológicas (modificación en el integumento) que reducen la penetración de las moléculas del insecticida y alteraciones genéticas, como la sobreexpresión de genes que regulan la actividad enzimática (esterasas, monooxigenasas, glutatión s-transferasas) o la presencia de modificaciones en el sitio blanco del insecticida (acetil colinesterasas insensible o knowdown resistance *kdr*) (IRAC 2017).

Las mutaciones *kdr* se encuentran distribuidas en el canal de sodio más específicamente en el dominio II entre los segmentos transmembranales IV y VI (región IIS4 – IIS6) y ha sido reportada en más de 30 especies de insectos de importancia

económica o médica (Rinkevich *et al.* 2013). Las primeras mutaciones *kdr* reportadas en triatomíneos son la L1014F y L925I por Fabro *et al.* (2012) y Capriotti *et al.* (2014) respectivamente, y su asociación con la resistencia a deltametrina en *T. infestans*.

Se describe la secuencia de la región IIS4 – IIS6 del gen *para* de *T. dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. mazzottii* y *T. picturata*, logrando identificar las mutaciones L1014F/S, A943V y K964R en poblaciones resistentes a los insecticidas deltametrina y permetrina.

## 5.2. MÉTODOS

### 5.2.1. Análisis del dominio II del gen *para* de los canales de sodio en triatominos.

La secuencia del dominio II del gen *para* de los canales de sodio de *T. infestans* (Gen-Bank™ Acceso No. JF761319.1) fue usada para la elaboración de primers óptimos para la amplificación de este gen en *T. dimidiata* (Yucatán) (TdY), *T. pallidipennis* (Morelos) (TpM), *T. mazzottii* (Guerrero) (TmG), *T. longipennis* (Jalisco y Guanajuato) (TIJ y TIgto) y *T. picturata* (Jalisco) (TpJ) y usando el programa tBLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov) además, fueron utilizados primers previamente descritos para *T. infestans* por Fabro *et al.* (2014) y Capriotti *et al.* (2014) (Tabla 5.1.).

Tabla. 5.1. Secuencias de los primers utilizados.

Primer	Secuencias 5'-3'
JD5 (1-20)	AAATCCTGGCCAACATTGAA
TiFwd (7-32)	TGGCCAACATTGAATTTATTGATATC
TiRev2 (551-571)	TGAACCTTGTTTCCAGCTGG

Números dentro de paréntesis indican el sitio de unión Del primer en la secuencia del dominio II del gen *para* del canal de sodio. Gen-Bank™ Acceso No. JF761319.1

### 5.2.2. Extracción de RNA

El RNA total fue extraído por especie, a partir de grupos de 15 ninfas de primer estadio utilizando el reactivo TRIzol Reagent (ambion | RNA Cat. N0: 15596-026) 1:1 p/v. La separación del RNA se realizó con la utilización de cloroformo (1:5 v/v) para posteriormente precipitar el RNA con isopropanol (1:2 v/v) y dos lavados posteriores con etanol al 75% (1:1 v/v). El pellet de RNA fue resuspendido en 30 ul de agua grado molecular y fue cuantificado en un NanoDrop 2000/2000c Espectrofotómetro (Thermo Scientific).

### 5.2.3. Síntesis de cDNA

El cDNA fue sintetizado utilizando la enzima SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Cat. No: 18080-051) utilizando el inserto de protocolo adjunto por el proveedor.

### 5.2.4. Amplificación por PCR

El gene *para* de la región IIS4-IIS6 fue amplificado por PCR; para la reacción de amplificación se utilizaron 5µl de cDNA total (~100 ng), GoTaq DNA polimerasa (Promega, Madison, WI) y 5µM de cada primer, TiFwd y TiRev2 fueron usados para *T. mazzottii* y *T. longipennis*, mientras que los primer JD5 y TiRev2 fueron usados para *T. pallidipennis*, *T. dimidiata* y *T. picturata*. La reacción de amplificación se diseñó para tener un volumen final de 25µl y fue realizada en un termociclador Biorad T100, CA, USA. El programa de amplificación utilizado consistió de una desnaturalización inicial por 4 minutos a 94°C, seguida de 42 ciclos de 60 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 60 segundos a 72°C y un paso de elongación de 10 min a 70°C (Figura 5.1.). Los productos de la amplificación se sometieron a una electroforesis en agarosa al 2% (Bioline, Tauton, MA, USA), el ADN fue teñido con Gel red 10000X en DMSO (Biotium, Hayward, CA, USA). Los fragmentos esperados fueron de un tamaño de ~500 bp. Los fragmentos obtenidos fueron visualizados y fotografiados bajo luz ultra violeta (UV) y un transiluminador Uvitec (Cambridge, United Kingdom).

### 5.2.5. Secuenciación del gen *para* de los canales de sodio

Al menos tres amplificaciones del II dominio del gen *para* del canal de sodio fueron purificados (Wizard SV Gel and PCR Clean Up System, Promega, Madison, WI, USA) y secuenciados por electroforesis de capilaridad en MacroGen USA, por cepa, tanto susceptible como silvestre para cada especie.

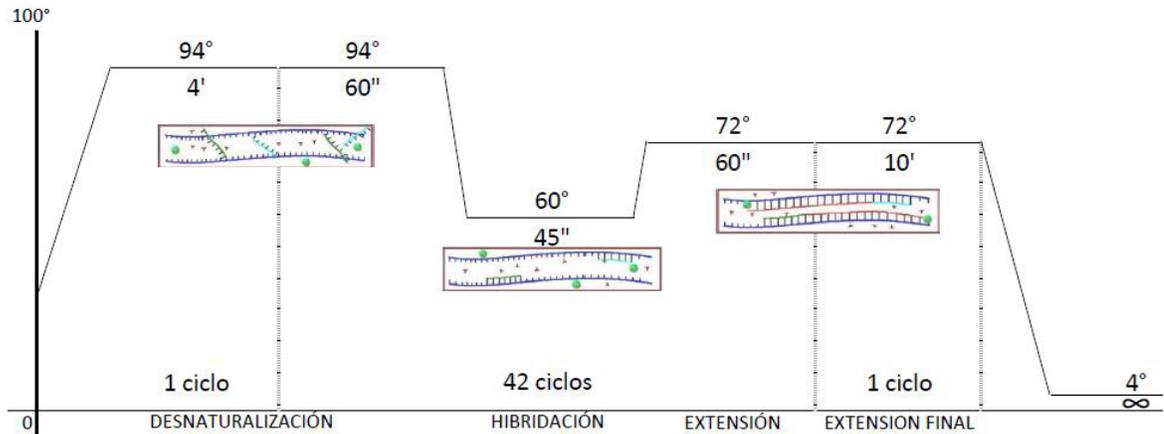


Figura. 5.1.- Representación gráfica del programa de PCR utilizado para la amplificación de los productos de DNA.

#### 5.2.6. Análisis de resultados

Los datos obtenidos de la secuenciación fueron analizados por BLAST para determinar su similitud con *T. infestans*, utilizando el programa Sequencher (version 5.4.6 DNA sequence analysis software, genecodes.com) y GeneStudio (Professional Edition, Version 2.2.0.0, genestudio.com). Así como la búsqueda de mutaciones puntuales no sinónimas entre las cepas susceptibles y silvestres.

### 5.3. RESULTADOS

#### 5.3.1. Análisis del dominio II del gen *para* de los canales de sodio en triatominos.

La secuencia del dominio II del canal de sodio de las especies de triatominos fue analizada obteniendo un fragmento correspondiente de ~500 bp. Así como la secuencia de sus correspondientes cepas de referencia (Figuras 5.2 y 5.3). La amplificación de los fragmentos mostro una alta similitud (99%) entre los individuos de las cepas de referencia y los de las cepas silvestres. El alineamiento de las secuencias resultantes, tanto de referencia como silvestres, con la secuencia de *T. infestans* [Gen-Bank™ Acceso No. JF761319.1] mostro diversos porcentajes (82% - 95%) de similitud dependientes de especies y cepas.

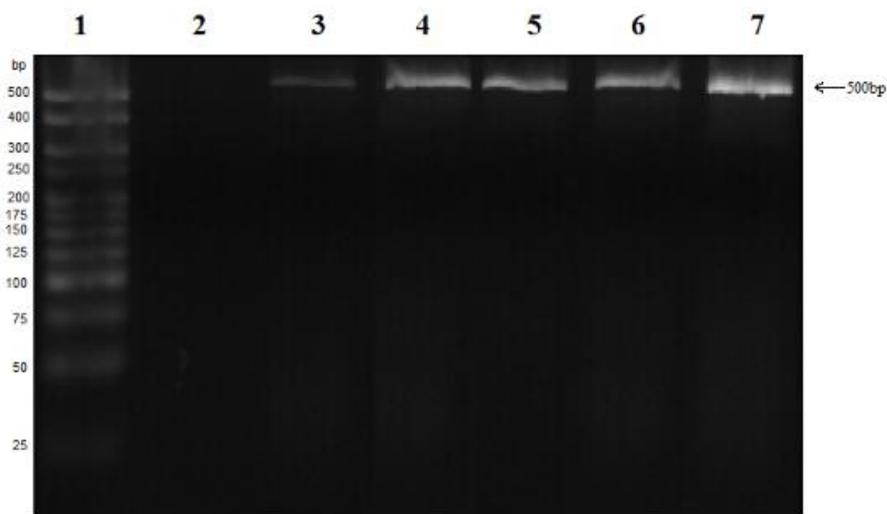


Figura 5.2. Amplificación por PCR del canal de sodio en gel de agarosa al 2% de las cepas de triatominos de referencia. Línea 3 *T. dimidiata*, línea 4 *T. pallidipennis*, línea 5 *T. longipennis*, línea 6 *T. mazzottii* y línea 7 *T. picturata*. El marcador se muestra en la primera línea 25-bp DNA ladder, control negativo en la línea 2.

Las secuencias de *T. dimidiata* correspondiente a la cepa silvestre al ser alineadas con la secuencia de *T. infestans* mostraron un 92% de similitud. *T. pallidipennis* al ser comparadas las secuencias de la cepa silvestre arrojó un 95% de similitud con la

secuencia de *T. infestans*. Para *T. mazzottii* tanto la cepa de referencia como la silvestre presentaron un 95% de similitud con la secuencia de *T. infestans*. Ambas poblaciones de silvestres de *T. longipennis* (TLJ y TLGTO) así como la cepa de referencia mostraron una similitud del 95% con la secuencia de *T. infestans*. La menor similitud encontrada en las especies evaluadas fue la de *T. picturata* con un 85% con la secuencia de *T. infestans*.

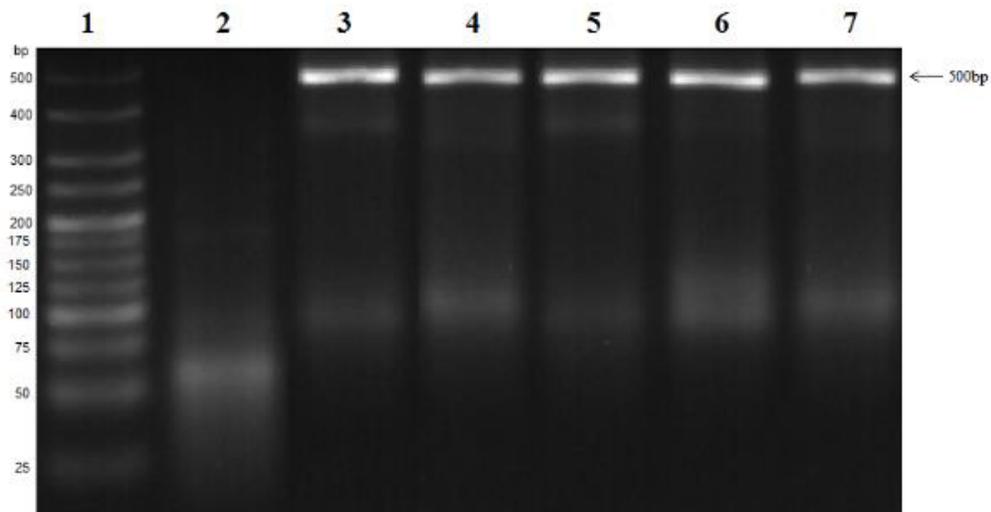


Figura 5.3. Amplificación por PCR del canal de sodio en gel de agarosa al 2% de las cepas de triatominos silvestres. Línea 3 *T. dimidiata*, línea 4 *T. pallidipennis*, línea 5 *T. longipennis*, línea 6 *T. mazzottii* y línea 7 *T. picturata*. El marcador se muestra en la primera línea 25-bp DNA ladder, control negativo en la línea 2.

El análisis de las secuencias de las cepas de referencia reveló que en todas las especies analizadas se encuentra presente al menos una mutación *kdr*. En los individuos de *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* se encontró la mutación caracterizada en varias especies de insectos como *kdr* (L1014F) incluyendo *T. infestans* (Fabro *et al.* 2012) dada por la sustitución de Leu (TTA) > Phe (TTT) mientras que, en *T. picturata* se encontró presente la sustitución de Leu (TTA) > Ser (TCC) (L1014S) (Figura 5.4, 5.5 y 5.6), En la población de *T. mazzottii* encontramos la mutación dada por la sustitución de Ala (GTT) > Val (GCA) en el sitio 943 (Figura 5.7) y para ambas poblaciones de *T. longipennis* la sustitución de Lys (AAA) > Arg (AGA) en la posición 964 (Figura 5.8), ninguno de los individuos de la cepa de referencia presentó las sustituciones de los

aminoácidos mencionadas, a excepción de la cepa de referencia de *T. longipennis* cuyo cromatograma revela la presencia de individuos homocigoto susceptibles (ARA) y para la población de Gto homocigoto resistente (ARA).

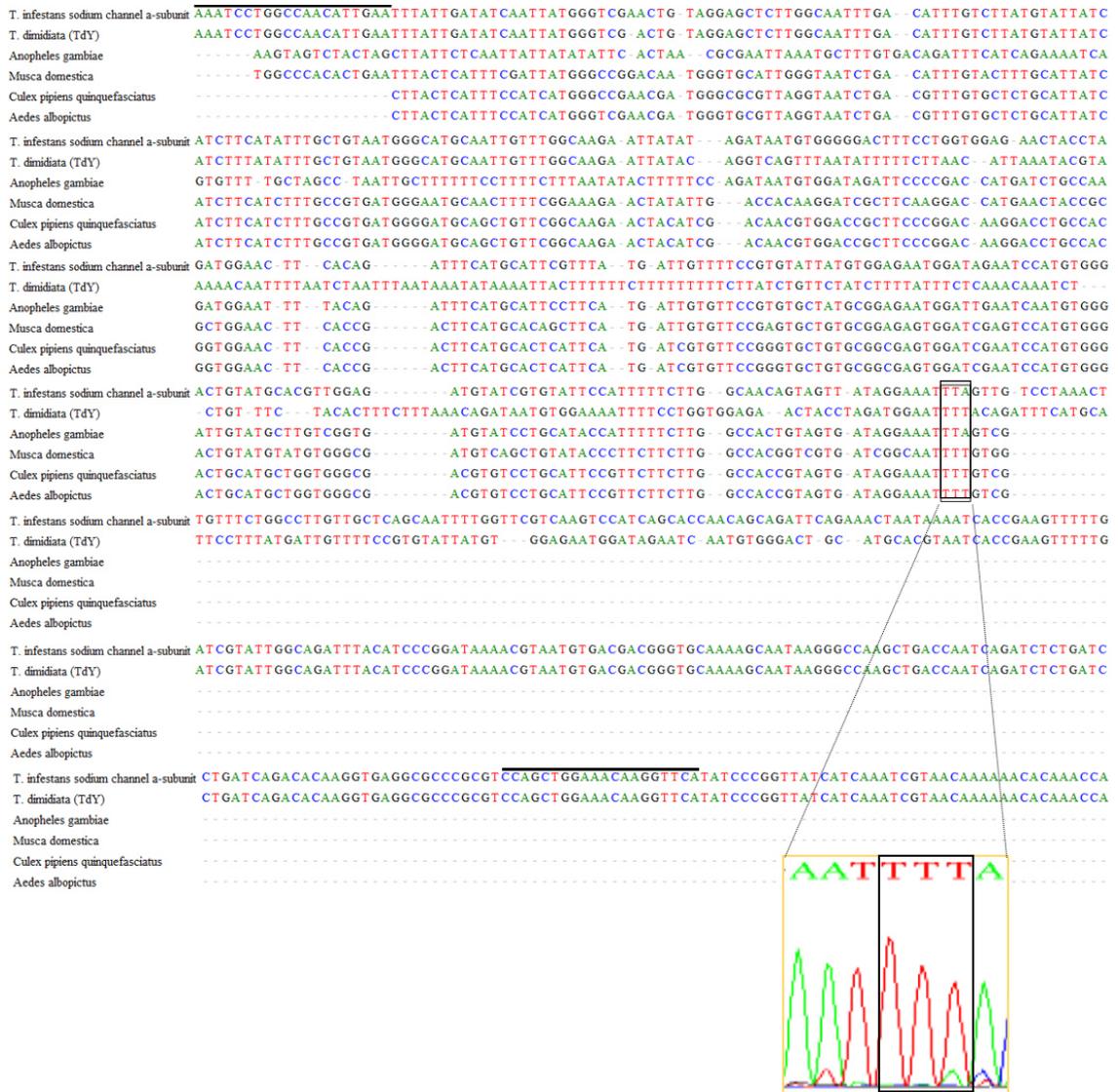


Figura 5.4. Alineamiento de las secuencias de *T. dimidiata* (TdY) en comparación con las secuencias de *T. infestans*. La posición de la mutación L1014F se encuentra enmarcada, las líneas superiores indican la posición de los primers.



Figura 5.5. Alineamiento de las secuencias de *T. pallidipennis* (TpM) en comparación con las secuencias de *T. infestans*. La posición de la mutación L1014F se encuentra enmarcada, las líneas superiores indican la posición de los primers.



Figura 5.6. Alineamiento de las secuencias de *T. picturata* (TpJ) en comparación con las secuencias de *T. infestans*. La posición de la mutación L014S se encuentra enmarcada, las líneas superiores indican la posición de los primers.



Figura 5.7. Alineamiento de las secuencias de *T. mazzottii* de referencia (S) en comparación con las secuencias de *T. mazzottii* Guerrero (G). La posición de la mutación A943V se encuentra enmarcada, las líneas superiores indican la posición de los primers.



Figura 5.8. Alineamiento de las secuencias de *T. longipennis* de referencia (S) en comparación con las secuencias de *T. longipennis* Jalisco (J) y *T. longipennis* Guanajuato (Gto). La posición de la mutación K964R se encuentra enmarcada, las líneas superiores indican la posición de los primers. Cromatograma muestra los genotipos *kdr* K964 (SR), K964 (RS) y K964 (RR).

## 5.4. DISCUSIÓN

### 5.4.1. Diversidad de la mutación *kdr*, L1014F

La mutación *kdr*, L1014 es una de las más relacionadas con la resistencia a insecticidas piretroides en insectos de importancia médica y económica (Rinkevich *et al.* 2013; Dong *et al.* 2014). Esta mutación puede encontrarse presente con una variación amplia de aminoácidos, por ejemplo, la sustitución Lys > Phe (L1014F) es la sustitución más comúnmente encontrada (Tan *et al.* 2012) y en una mayor cantidad de vectores (Dong *et al.* 2014); seguida de la sustitución de Lys > Ser (L1014S), además de L1014H/C/W en menor proporción. Tan *et al.* (2012) reportan la presencia de tres variaciones en esta mutación en una misma población de *Anopheles sinensis* con proporciones de 18% y 9% para L1014S/F y un 2% para L1014W. En triatominos únicamente se contaba con el registro de la mutación L1014F para *T. infestans* en Argentina y Bolivia (Fabro *et al.* 2012; Roca-Acevedo *et al.* 2015). El presente estudio es el primero en reportar la mutación L1014F en *T. dimidiata* y *T. pallidipennis* y L1014S en *T. picturata* con alta susceptibilidad a deltametrina y permetrina, a excepción de *T. dimidiata* de Yucatán cuyos individuos presentaron una baja susceptibilidad a la deltametrina, Hu *et al.* (2012) reportan para *Xenopus* la resistencia a piretroides del tipo I (permetrina) pero no a los del tipo II. (deltametrina) en presencia de la mutación *kdr* (F1515C). Por lo tanto, la presencia de estas mutaciones L1014 en los triatominos de campo evaluados en este trabajo sugieren la importancia de estas mutaciones *kdr* como un importante factor en la resistencia a piretroides.

### 5.4.2. Nuevas mutaciones *kdr* en triatominos

Este es el primer estudio en México sobre triatominos vectores de la enfermedad de Chagas, así como el primero en reportar nuevas mutaciones en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje en triatominos; Fabro *et al.* (2012) y Capriotti *et al.* (2014) reportan por primera vez mutaciones *kdr* (L925I y L1014I) y su relación con la resistencia a piretroides en *T. infestans* en poblaciones de Argentina; reportando dos

nuevas mutaciones. La sustitución de Arginina > Valina en la posición 943 del gen *para* del canal de sodio de *T. mazzottii*, mutaciones en esta posición han sido reportadas anteriormente principalmente en *Pediculus humanus capitis* (Kristensen 2005; Kristensen *et al.* 2006; Ponce-Garcia *et al.* 2017) como responsable de la resistencia a permetrina y en *Culex pipiens quinquefasciatus* por Zhao *et al.* (2014). Cabe destacar que la variación en la secuencia de nucleótidos no afecta la función de la mutación, las variaciones que se han encontrado para esta mutación son G943A, G943T y M943T (Ponce-Garcia *et al.* 2017; Kristensen *et al.* 2006; Zhao *et al.* 2014, respectivamente). En base a lo anterior podemos afirmar esta mutación tiene una contribución directa en la resistencia a deltametrina y permetrina en *T. mazzottii*.

Otra de las mutaciones encontradas en el estudio está dada por la sustitución de Lisina > Arginina en la posición 964 en *T. longipennis*, esta mutación se ha reportado únicamente en una poblaciones de *Anopheles koliensis* resistente a permetrina y que muy posiblemente se pueda fijar en otras especies bajo selección con insecticidas (Henry-Halldin *et al.* 2012). En base a lo anterior podemos suponer que esta mutación aún se encuentra fija en la población de Guanajuato cuyo genotipo es heterocigoto resistente (RS), mientras que en la población de Jalisco la mutación se encuentra fija, presentando los individuos un genotipo homocigoto resistente (RR), no así en la cepa susceptible siendo esta heterocigoto susceptible (SR) debido a que se trata de una población criada por 5 generaciones en laboratorio sin exposición a insecticidas ni introducción de individuos externos. El conjunto de estas mutaciones y su distribución se ejemplifica en figura 5.9.

Este estudio abre el panorama sobre la necesidad del manejo integrado de la resistencia en triatomíneos en México; considerando que los insecticidas piretroides son el principal grupo de insecticidas usado para su control en nuestro país.

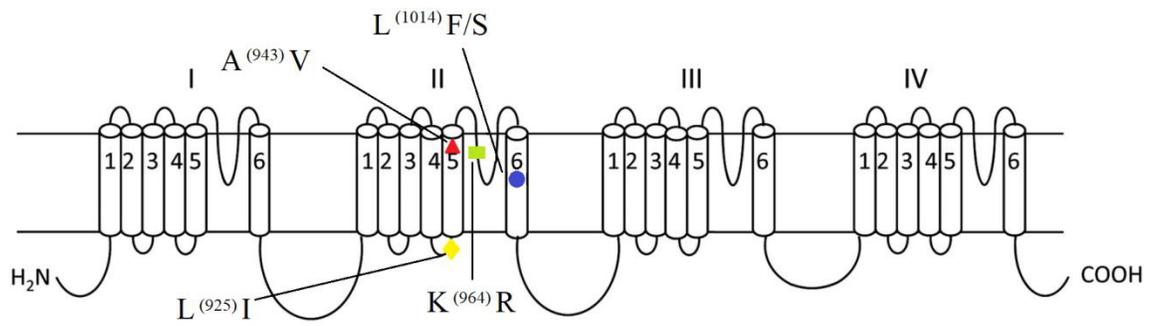


Figura 5.9. Distribución en el canal de sodio de las mutaciones asociadas a la resistencia a piretroides en especies de triatomíneos. *T. infestans* ◇L925I (Capriotti *et al.* 2014), *T. mazzottii* ▲A943V, *T. longipennis* ■K964R, *T. infestans* (Fabro *et al.* 2012) y *T. dimidiata* ●L1014 F y *T. picturata* ●L1014S.

## 5.5. BIBLIOGRAFÍA

- Capriotti N, Mougabure-Cueto G, Rivera-Pomar R, Ons S. L925I Mutation in the Para-Type Sodium Channel Is Associated with Pyrethroid Resistance in *Triatoma infestans* from the Gran Chaco Region. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(1):20.
- CENAPRECE, (2017) Monitoreo de resistencia a insecticidas (adulterados) utilizados en el programa de enfermedades transmitidas por vectores en México. Obtenido de: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf>.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). NOM-032-SSA-2-2014 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores, México. 2015; 1–43.
- Dong K, Du Y, Rinkevich F, Nomura Y, Xu P, Wang L, Silver K, Zhorov BS. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. Insect Biochem Mol Biol. 2014; 50:1-17.
- 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(2):487–91.
- GeneStudio™ version 2.2.0.0. GeneStudio Professional [Internet]. Molecular Biology Suite. Available from: <http://genestudio.com/>
- Henry-Halldin CN, Nadesakumaran K, Bosco Keven J, Zimmerman AM, Siba P, Mueller I, *et al.* Multiplex assay for species identification and monitoring of insecticide resistance in *Anopheles punctulatus* group populations of Papua New Guinea. Am J Trop Med Hyg. 2012; 86(1):140–51.

- Hu Z., Du Y., Nomura Y., Dong Ke. A sodium channel mutation identified in *Aedes aegypti* selectively reduces cockroach sodium channel sensitivity to type I, but not type II pyrethroids. Insect Biochem Mol Biol. Author manuscript; available in PMC 2012; 41(1): 9–13.
- IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) (2017). En [www.irc-online.org](http://www.irc-online.org) (fecha de consulta: Septiembre 28, 2017).
- Kristensen M. Identification of sodium channel mutations in human head louse (Anoplura: Pediculidae) from Denmark. J Med Entomol. 2005; 42(5): 826–829.
- Kristensen M., Knorr M., Rasmussen A., Jespersen J. Survey of permethrin and malathion resistance in human head lice populations from Denmark. J Med Entomol. 2006; 43(3): 533–538.
- OMS. 2016. [Internet]. Molecular Biology Suite. Available from: [http://www.who.int/malaria/areas/vector\\_control/insecticide\\_resistance/es/](http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/insecticide_resistance/es/)
- Ponce-Garcia G., Villanueva-Segura K., Trujillo-Rodriguez G., Rodriguez-Sanchez IP., Lopez-Monroy B., Flores AE. First Detection of the *Kdr* Mutation T929I in Head Lice (Phthiraptera: Pediculidae) in Schoolchildren of the Metropolitan Area of Nuevo Leon and Yucatan, Mexico. J Med Entomol. 2017; 54(4):1025-1030.
- Rinkevich FD, Du Y, Dong K. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. Pestic Biochem Physiol. 2013; 106:93–100.
- Roca-Acevedo G, Picollo MI, Capriotti N, Sierra I, Santo-Orihuela PL. Examining Mechanisms of Pyrethroid Resistance in Eggs of Two Populations of the Chagas' Disease Vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol. 2015; 52(5):987–92.

Salazar-Schettino PM, Rojas-Wastavino GE, Cabrera-Bravo M, Bucio-Torres MI, Martinez-Ibarra JS, Monroy-Escobar MC, Rodas-Retana A, Guevara-Gómez Y, Vences-Blanco MO, Ruiz-Hernandez AL, Torres-Gutiérrez E. Revisión de 13 especies de la familia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas, en México. *Journal of the Selva Andina Research Society*. 2010; 1 (1): 57–80.

Secretaría de Salud M. Boletín epidemiológico. Información Epidemiológica de Morbilidad. [Internet]. Secretaría de Salud. 2017 [cited 2017 Sep 30]. Available from: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/258161/sem37.pdf>

Sequencher® version 5.4.6. Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA [Internet]. DNA sequence analysis software. Available from: <http://www.genecodes.com>

Tan W., Chun X. Li, Zhong M. Wang, Mei D. Liu, Yan D. Dong, Xiang Y. Feng, Zhi M. Wu, Xiao X. Guo, Dan Xing, Ying M. Zhang, *et al.* First detection of multiple knockdown resistance (*kdr*)-like mutations in voltage-gated sodium channel using three new genotyping methods in *Anopheles sinensis* from Guangxi Province, China. *J Med Entomol*. 2012; 49(5): 1012–1020.

Zhao M, Dong Y, Ran X, Guo X, Xing D, Zhang Y, *et al.* Sodium channel point mutations associated with pyrethroid resistance in Chinese strains of *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasit&Vectors*. 2014; 7:369.

## CAPÍTULO 6

### SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS PIRETROIDES Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN HÍBRIDOS DE TRES ESPECIES DE TRIATOMINOS.

#### RESUMEN

El género *Meccus*, caracterizado por el complejo Phyllosoma, ha sido registrado solo en México, compartiendo ecosistemas (“land cover types”) en una marcada co-ocurrencia dentro de un mismo nicho ecológico. Dentro de este género se encuentran algunos de los principales vectores de la enfermedad de Chagas en México como *Meccus longipennis*, *M. mazzottii*, *M. pallidipennis* y *M. picturata*. Es importante destacar la capacidad de apareamiento entre estas especies obteniendo hasta un 100% de éxito de cruce en la generación F<sub>1</sub>. Así como el incremento de los índices entomológicos en los híbridos resultantes de la cruce entre *M. mazzottii*, *M. pallidipennis* y *M. pallidipennis*.

El control químico (NOM-SSA-023-2014) en México ha presentado constantes fallos debido a la presencia de resistencia a insecticidas en estos vectores, han sido reportadas poblaciones de vectores del complejo Phyllosoma como *M. pallidipennis*, *M. mazzottii*, *M. picturata* y *M. longipennis* con una baja susceptibilidad a insecticidas piretroides (deltametrina) incrementando con esto la importancia vectorial de los mismos. En este trabajo se evaluó la resistencia a insecticidas piretroides en híbridos de *M. pallidipennis*, *M. mazzottii* y *M. picturata* bajo condiciones de laboratorio. Dado que el impacto de hibridaciones naturales es desconocido, y por lo tanto es indispensable la evaluación de la resistencia en estos.

Se propició la cruce obteniendo los híbridos clasificados como PaxMa (*M. pallidipennis* X *M. mazzottii*) y PaxPi (*M. pallidipennis* X *M. picturata*) para la evaluación de la generación F<sub>1</sub> en laboratorio, para determinar la susceptibilidad a deltametrina así como la determinación de actividad enzimática para los sistemas de

desintoxicación a piretroides ( $\alpha$ - y  $\beta$ - esterasas, Oxigenasas de función múltiple (OFM) CitP<sub>450</sub> y Glutation s-transferasas (GST).

Los resultados de las DL<sub>50</sub> de los híbridos fueron DL<sub>50</sub> de 68.29 ng/i y de 62.72 ng/i PaxPi y PaxMa respectivamente encontrando resistencia únicamente en los híbridos de PaxMa cuando fueron comparados contra la cepa susceptible de *T. mazzottii* (RR<sub>50</sub> de 17.6X). Se observó que, solo los híbridos de PaxPi presentan una actividad alterada para OFM, por lo que se puede suponer que este sistema se encuentra activo en la resistencia a la deltametrina en estos híbridos.

## 6.1. INTRODUCCIÓN

La transmisión vectorial sigue siendo la principal forma de propagación de la enfermedad de Chagas, causada por el hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, llevada a cabo por insectos triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae), estos se dividen de acuerdo a su actividad en intradomiciliarios, peridomiciliarios y silvestres; en México de los vectores peridomiciliarios se destaca *Meccus longipennis*, *M. mazzottii*, *M. pallidipennis*, *M. phyllosomus*, *M. picturata*, *Triatoma gerstaeckeri*, *T. mexicana*, *T. rubida*, *Dipetalogaster máxima*, *Pastronylus rufotuberculatus* y *Rhodnius prolixus* (Salazar-Schettino *et al.*, 2010). El género *Meccus*, caracterizado por el complejo Phyllosoma, han sido registrado solo en México, cuyos ecosistemas (land cover types) son idénticos para sus especies lo que aumenta su coocurrencia dentro de un mismo nicho ecológico (Ibarra-Cerdeña *et al.*, 2009). Esto ha llevado a considerar la posibilidad de la existencia de híbridos entre estas especies; Martínez-Ibarra *et al.* (2008, 2011) han realizado dicha comprobación bajo condiciones de laboratorio para especies del complejo Phyllosoma: *M. mazzottii*, *M. picturata*, *M. longipennis*, *M. pallidipennis* y *M. bassolsae*, obteniendo hasta un 100% de éxito de cruce en la generación F<sub>1</sub>. Así mismo se ha registrado que los híbridos resultantes de la cruce entre *M. mazzottii*, *M. pallidipennis* y *M. pallidipennis* tienen un incremento de los índices entomológicos, comparados con individuos de su especie “pura” (Martínez-Ibarra *et al.* 2008, 2015).

El control de la enfermedad de Chagas está basado en el manejo integrado, teniendo como medidas de control, la difusión de información sobre la enfermedad y sus vectores, el mejoramiento físico de vivienda y peridomicilio y por último el control químico (NOM-SSA-023-2014). Constantes fallos en este sistema se han reportado debido a la presencia de resistencia a insecticidas en estos vectores, en México se han registrado poblaciones de vectores del complejo phyllosoma como *M. pallidipennis*, *M. mazzottii*, *M. picturata* y *M. longipennis* con una baja susceptibilidad a insecticidas piretroides (deltametrina) incrementando con esto la importancia vectorial de los mismos.

En este trabajo se evaluó la resistencia a insecticidas piretroides en híbridos de *M. pallidipennis*, *M. mazzottii* y *M. picturata* bajo condiciones de laboratorio. Dado que

el impacto de hibridaciones naturales es desconocido, y por lo tanto es indispensable la evaluación de la resistencia en estos híbridos.

## 6.2 MÉTODOS

### 6.2.1. Obtención de híbridos de triatominos

Los híbridos evaluados fueron obtenidos de cruzas entre las especies de *M. pallidipennis* de las localidades de Panchimalco, municipio de Jojutla de Juárez, en el estado de Morelos, en la región central de México (18°36' N, 99°10' O), con presencia peridomestica del vector; los individuos de *M. mazzottii* en Santa Catarina, situada en el municipio de Chilapa de Álvarez, estado de Guerrero, en la costa oeste de México (10° 32' N, 17° 32' O), y *M. picturata* de Los Guerreros, en el municipio de San Martin de Hidalgo, estado de Jalisco, también en la costa oeste de México (20°26' N, 103° 55' O). Los individuos parentales, ninfas y adultos de campo fueron mantenidos bajo condiciones de laboratorio 28 ± 2°C, HR de 70%, fotoperiodo de 12 h: 12 h, y alimentados con sangre de conejo casa 7 a 15 días.

Se propició la crusa de hembras de 5 días en estadio adulto y con una alimentación en este estadio previa al primer contacto con el macho, las parejas fueron formadas de la siguiente forma: *M. pallidipennis*♂ X *M. mazzottii*♀, *M. pallidipennis*♀ X *M. mazzottii*♂, *M. pallidipennis*♂ X *M. picturata*♀ y *M. pallidipennis*♀ X *M. picturata*♂. Los híbridos fueron obtenidos de este cruzamiento fueron clasificados como PaxMa (*M. pallidipennis* X *M. mazzottii*) y PaxPi (*M. pallidipennis* X *M. picturata*) para la obtención de la generación F1 en laboratorio; el factor del sexo de los progenitores fue descartado dado que la transmisión del carácter de resistencia no está asociado al sexo (Cardozo *et al.*, 2010).

### 6.2.2. Mantenimiento de la infección por *T. cruzi*

Para establecer la importancia vectorial de los híbridos, se realizó la infección de 10 ejemplares por crusa, alimentándose de sangre de rata (*Rattus norvegicus*) infectada con *T. cruzi*. La infección fue confirmada mediante la observación de hemoflagelados observados por microscopia en las heces de los triatominos infectados.

### 6.2.3. Bioensayos para la determinación de resistencia

Siguiendo el protocolo de la OMS (2005), ninfas de primer estadio sin alimentar de 5 a 7 días de edad, con un peso promedio de  $1.62 \pm 0.30$  mg para *T. mazzottii*,  $1.8 \pm 0.20$  mg para *T. picturata* y  $1.76 \pm 0.56$  mg para *T. pallidipennis*; el peso promedio para los híbridos fue de  $1.62 \pm 0.35$  mg para PaxMa y  $1.76 \pm 0.31$  mg para PaxPi.

La deltametrina (99.5% pureza) (ChemService, West Chester, PA. 250 mg), fue seleccionada debido a su uso en México para el control de *Aedes aegypti* L, es utilizada en aspersión residual en interiores (CENAPRECE, 2017), así como por reportes previos que registran la baja susceptibilidad para ambos insecticidas.

Se realizó la técnica de aplicación tópica con un volumen de 0.2  $\mu$ l de solución acetónica del principio activo insecticida, en la parte ventral del abdomen de cada insecto, con un microaplicador (Microliter Syringe Hamilton 0.5  $\mu$ l Hamilton Co®). En un primer ensayo se evaluaron 3 diferentes dosis con un factor 1/10 entre cada dosis y en los ensayos finales se incluyeron 2 dosis intermedias para obtener rangos de mortalidad entre 10% y 90%.

Se utilizaron 10 ninfas por dosis con un mínimo de dos repeticiones. Los insectos se colocaron en recipientes de boca ancha con papel plegado en su interior y cubierto con tela de gasa. Se registró la mortalidad a las 24 horas y los datos fueron utilizados para el cálculo de  $DL_{50}$  y  $DL_{90}$  y sus respectivos intervalos de confianza. Todos los parámetros se expresan en ng/i. Las condiciones ambientales post-tratamiento fueron: 25-30°C y 50-70% HR.

Se consideraron muertas aquellas ninfas con la inhabilidad de caminar del centro de una caja petri (100x15mm) con un papel filtro en el interior (157 mm diámetro) hacia su borde. Solo aquellas ninfas que fueron capaces de caminar hasta el borde con o sin estimulación mecánica fueron consideradas como vivas. Los grupos control consistieron en 10 insectos con el mismo volumen de acetona utilizado en los tratamientos. En caso de mortalidad en los grupos control se utilizó la corrección de Abbott (1925).

Los resultados obtenidos en los bioensayos fueron sujetos a un análisis probit usando el programa POLO Plus (LeOra Software 2002-2017) para determinar la  $DL_{50}$  y  $DL_{90}$ . La diferencia significativa entre estos parámetros fue determinada por el

sobrelapamiento de los intervalos de confianza (IC 95%). Se calculó la razón de resistencia ( $RR_{50}$ ) dividiendo los valores de las  $DL_{50}$  de los híbridos entre los obtenidos en la especie base. Se utilizó el criterio de Pessoa *et al.* (2014) donde un valor de  $RR > 1$  es considerado como indicativo de una susceptibilidad alterada.

#### 6.2.4 Determinación de enzimas relacionadas con la resistencia a piretroides.

Se realizaron ensayos bioquímicos utilizando la técnica de Valle *et al.* (2006), con modificaciones para su estandarización para triatomos, para determinar la actividad de las enzimas (actividad enzimática [AE]) involucradas en la desintoxicación a piretroides ( $\alpha$ - y  $\beta$ - esterasas, Oxigenasas de función múltiple (OFM) CitP<sub>450</sub> y Glutathion s-transferasas (GST)).

La actividad de  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas se determinó utilizando  $\alpha$ - y  $\beta$ -naftil esterasa como sustratos, e iniciando la hidrólisis enzimática con la adición de o-dianisidina, formando el complejo diazol (Miller y Karn 1980). La actividad fue determinada por la medición de la absorbancia a 570 nm. La actividad de OFM fue determinada por la medición del grupo hemo en el insecto. Esta prueba no mide la actividad enzimática. Solo cuantificara el grupo hemo de insectos no alimentados, y se asocia principalmente con el citocromo P<sub>450</sub>. La absorbancia se leyó a 650 nm. Para GSTs, 1-chloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) fue usado como sustrato, el cual es adecuado para una amplia gama de isoenzimas de GST (Brogdon y Barber 1990). La lectura de la absorbancia se realizó a 340 nm en el tiempo 0, a los 10 y 20 minutos. La determinación de proteínas totales fue realizada siguiendo la metodología de Bradford (1976), esta es utilizada para determinar los valores de actividad para todas las curvas de todas las enzimas evaluadas. A 10  $\mu$ l del homogenizado se le agregó el reactivo Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad) [1:5], la lectura de la absorbancia se realizó a 620 nm de 3 a 5 minutos.

Los datos de absorbancia obtenidos para cada enzima fueron utilizados para crear una base de datos y calcular los valores medios de absorbancia por insecto y transformados en actividad enzimática. Los valores de actividad enzimática resultantes se analizaron para verificar su distribución normal (Kolmogorov y Smirnov, 1971) y posteriormente analizarlos por ANOVA ( $p < 0.05$ ) y comparación múltiple de medias

(Tukey test,  $p < 0.05$ ) y por la prueba t de Student (GraphPad Prism programme v. 7) (SPSS 16.0. Chicago, SPSS Inc.) para determinar la diferencia significativa de la actividad enzimática entre las poblaciones estudiadas, así como, con su respectiva cepa de referencia.

Se calculó el percentil 99 para cada enzima con base a la cepa de referencia para cada especie con la finalidad de calcular el número de individuos con actividad enzimática mayor a este valor en cada una de las poblaciones silvestres. La actividad enzimática fue clasificada como: no alterada, incipientemente alterada o alterada, si los valores calculados anteriormente fueron menores al 15%, entre el 15% y 50% o mayores al 50%, respectivamente (Montella *et al.* 2007).

## 6.3 RESULTADOS

### 6.3.1 Bioensayos

Los resultados de las  $DL_{50}$  y  $DL_{90}$  para deltametrina de las especies estudiadas se presentan en la tabla 6.1. La  $DL_{50}$  para deltametrina en *M. mazzottii* fue de 94.55 ng/i para *T. picturata* el valor de la  $DL_{50}$  fue de 137.34 ng/i y para *T. pallidipennis* con una  $DL_{50}$  de 298.64 ng/i. Por otro lado, los híbridos mostraron  $DL_{50}$  de 68.29 ng/i y de 62.72 ng/i PaxPi y PaxMa respectivamente.

La diferencia entre las  $DL_{50}$  para ambas cruzas fue mínima, se encontró resistencia únicamente en los híbridos de PaxMa cuando fueron comparados contra la cepa susceptible de *T. mazzottii* ( $RR_{50}$  de 17.6X).

### 6.3.2 Actividad enzimática

No se encontró ninguna diferencia entre las cantidades de proteínas totales tanto para los híbridos como para sus especies base (Figura 6.1. a). Tampoco se encontró una correlación significativa entre las  $DL_{50}$  de los híbridos con algún sistema enzimático.

Únicamente se observó un incremento significativo ( $p < 0.01$ ) en la actividad enzimática para el sistema de desintoxicación por  $\alpha$ -esterasas de ambos híbridos y *T. mazzottii* (Figura 6.1. b). Para GST se observó el mayor incremento en la actividad enzimática con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de los híbridos con respecto a *T. mazzottii* y una diferencia aun mayor ( $p < 0.01$ ) contra *T. pallidipennis* y *T. picturata* (Figura 6.1. e).

Por otro lado, de acuerdo al criterio de Montella *et al.* (2007) ambos híbridos presentan una actividad alterada para  $\alpha$ -esterasas, FMO y GST, a excepción de PaxMi que presentan una actividad incipientemente alterada para GST y de PaxPi en OFM (Tabla 6.2). Cabe destacar que de las especies base utilizadas presentaron solo *T. mazzottii* y *T. picturata* mostraron una actividad alterada e incipientemente alterada para GST y *T. pallidipennis* y *T. mazzottii* una actividad alterada para  $\alpha$ -esterasas, y todas ellas con actividad enzimática alterada en  $\beta$ -esterasas.

Tabla 6.1. Estadísticos de los bioensayos y razón de resistencia (RR) para deltametrina en las especies base y sus híbridos.

Especie/cruza	DL <sub>50</sub> (ng/i)	(IC95%)	d±DE	DL <sub>90</sub> (ng/i)	(IC95%)	RR <sub>50</sub>	RR <sub>50</sub>			
							<i>T. pallidipennis</i>		<i>T. mazzottii</i>	
<i>T. pallidipennis</i> R	295.77	(268.7-321.5)	4.57±0.48	563.29	(501.35-662.52)	2.74				
<i>T. mazzottii</i> R	95.95	(85.4-108.7)	8.03±2.35	126.37	(113.17-169.49)	26.91	S	R	S	R
<i>T. picturata</i> R	137.35	(118.78-151.20)	6.01±1.25	224.36	(195.96-298.22)	1.88				
Pa x Ma	62.71	(40.49 - 97.13)	3.70 ± 0.41	260.2	(108.11 - 626.22)		0.58	0.21	<b>17.6</b>	0.65
Pa x Pi	68.29	(44.78 - 104.14)	1.53 ± 0.33	286.8	(141.17 - 582.59)		0.63	0.23	0.93	0.50

RR: Razón de resistencia

DL<sub>50</sub>: Dosis letal media

ng/i: nanogramos/insecto

R: Cepa de referencia

PaxMa: Híbridos de *T. pallidipennis* x *T. mazzottii*

PaxPi: Híbridos de *T. pallidipennis* x *T. picturata*

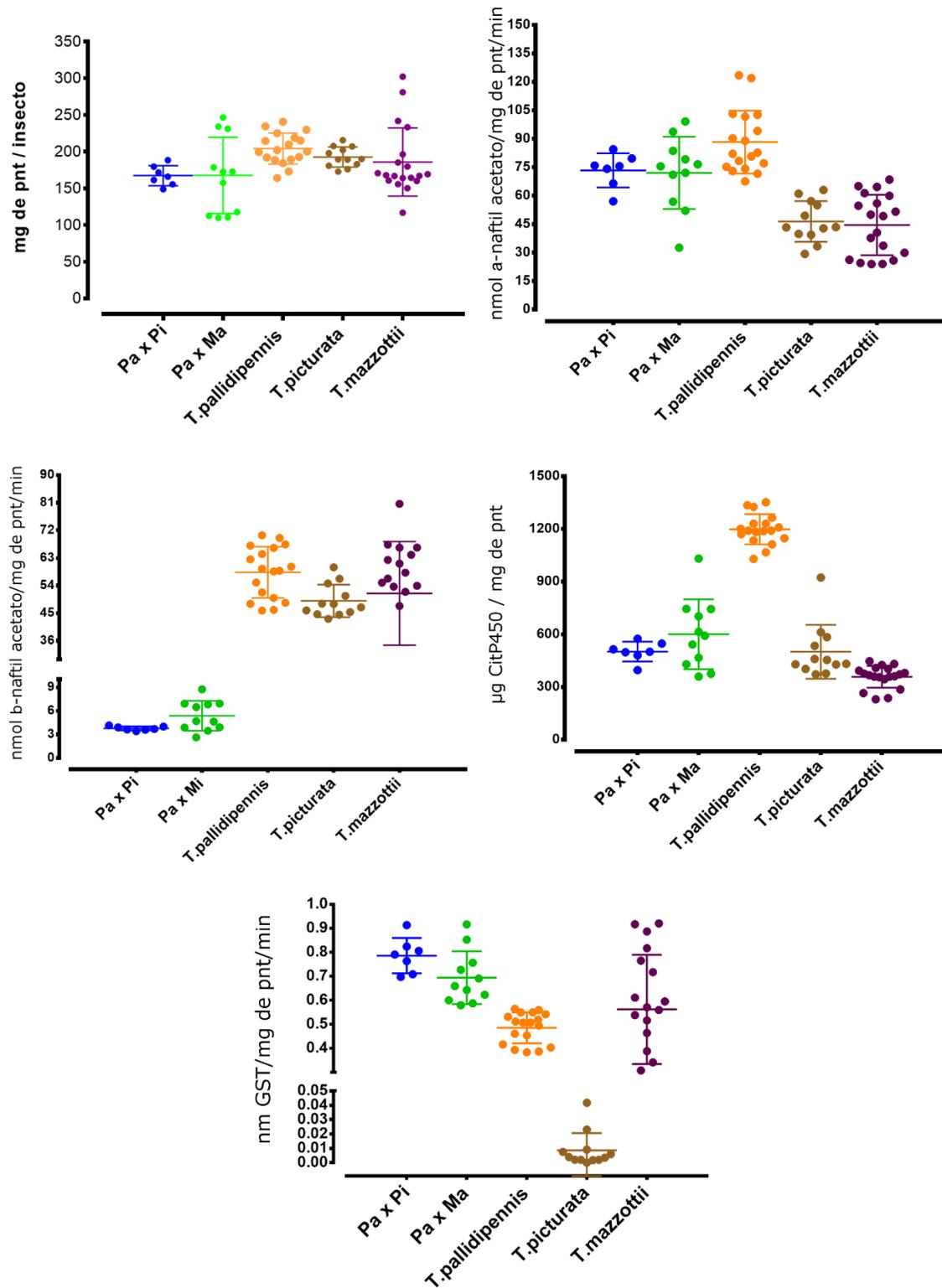


Figura 6.1. Perfiles de actividad enzimática de a) proteínas totales, b)  $\alpha$ -esterasas, c)  $\beta$ -esterasas, d) GST y e) MFO en híbridos de PaxPi y PaxMi y sus especies base.

Tabla 6.2. Cuantificación de la actividad enzimática en híbridos y sus especies base.

Especie	α-esterasas (nmol/mg pnt/min)		β-esterasas (nmol/mg pnt/min)		OFM (μg cit/mg pnt)		GST (nmol/mg pnt/min)	
	Media <sup>a</sup>	p99 <sup>b</sup>	Media	p99	Media	p99	Media	p99
<i>T.picturata</i>	42.93	69.70	76.50	101.198	393.4	541.8	0.4804	0.7142
Pa x Pi		%>p99 <sup>c</sup>		%>p99		%>p99		%>p99
	73.34	<b>76**</b>	3.77	0	501.4	19*	0.786	<b>100**</b>
<i>T.mazzottii</i>	44.61	67.87	51.46	78.225	357.6	443.6	0.562	0.919
Pa x Pi		%>p99		%>p99		%>p99		%>p99
	73.34	<b>72**</b>	3.77	0	599.9	<b>90**</b>	0.786	<b>81**</b>
<i>T.picturata</i>	42.93	69.70	76.50	101.198	393.4	541.8	0.480	0.7142
Pa x Ma		%>p99		%>p99		%>p99		%>p99
	72.02	<b>70**</b>	5.38	0	1002.4	<b>59**</b>	0.694	<b>100**</b>
<i>T.mazzottii</i>	44.61	67.87	51.46	78.225	357.6	443.6	0.056	0.919
Pa x Ma		%>p99		%>p99		%>p99		%>p99
	72.02	<b>80**</b>	5.38	0	1002.4	<b>76**</b>	0.694	33*

Pa x Pi: Híbridos de *T. pallidipennis* x *T. picturata*

Pa x Ma: Híbridos de *T. pallidipennis* x *T. mazzottii*

a Valor medio de cada actividad enzimática

b Percentil 99° de la cepa de referencia

c Porcentaje de especímenes de triatomos con actividad por arriba del percentil 99° de la cepa de referencia

\* Actividad enzimática incipientemente alterada

\*\* Actividad enzimática alterada

## 6.4. DISCUSIÓN

Este estudio además de confirmar la capacidad entre *T. pallidipennis* y *T. picturata* y *T. pallidipennis* y *T. mazzottii* de formar híbridos al estar evolutivamente cercanas incluidas en el complejo Phyllosoma, así como la capacidad de estos para mantener la infección por *T. cruzi*, se observó el aumento en la susceptibilidad a deltametrina en híbridos descendientes de progenitores resistentes. Cardozo *et al.* (2010) reportan una alta heredabilidad de la resistencia a piretroides en cruzas de cepas resistentes y susceptibles, pero incompletamente dominante. Germano *et al.* (2009) reportan poca diferencia entre valores de DL<sub>50</sub> y las RR en cruzas de cepas susceptibles y resistentes, además de determinar que no hay vinculación al sexo en este rasgo.

Siendo este el primer registro del estado de susceptibilidad en híbridos de triatomos, se encontró un incremento en la susceptibilidad de ambos híbridos, esto posiblemente por tratarse de individuos de diferentes especies. Únicamente se encontró una alteración/aumento en la susceptibilidad en los híbridos de Pa x Ma (RR 17.6), con respecto a la DL<sub>50</sub> de *T. mazzottii*, en estos híbridos solo GST presentó un incremento significativo ( $p < 0.5$ ) en su actividad con respecto a las especies base suponiendo que este mecanismo contribuye activamente a esta alteración en la susceptibilidad; por otro lado, se encontró una actividad alterada en las  $\alpha$ -esterasas (%p99 >70) en ambos híbridos, al igual que para OFM con una actividad enzimática alterada y con hasta un %p99 > 100 para GST. En base a esto podríamos suponer un decremento en la efectividad de los sistemas enzimáticos involucrados en la detoxificación en estos híbridos. Por lo tanto la resistencia puede atribuirse a factores autosomales semi- o incompletamente dominantes. Sin embargo, es necesario el análisis genotípico de los híbridos para determinar si alguna mutación *kdr* se encuentra presente.

Posiblemente la presencia de estos híbridos en forma natural pueda suponer una ventaja en el control de los vectores, sin descartar su importancia vectorial al ser capaz de mantener la infección por *T. cruzi*. Por lo que es importante se tomen en cuenta al desarrollar las estrategias de monitoreo y control de vectores.

## 6.5. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol.* 1925; 18:265–7.
- Brogdon WG, Barber AM. Microplate assay of glutathione s-transferase activity for resistance detection in single-mosquito triturates. *Comp Biochem Physiol -- Part B Biochem.* 1990; 96(2):339–42.
- Cardozo R. M., Panzera F., Gentile A. G., Segura M. A., Pérez R., Díaz R. A., Basombrío M. A. Inheritance of resistance to pyrethroids in *Triatoma infestans*, the main Chagas disease vector in South America. *Infect Genet Evol.* 2010; 10(8): 1174–1178.
- CENAPRECE, (2017) Monitoreo de resistencia a insecticidas (adulticidas) utilizados en el programa de enfermedades transmitidas por vectores en México. Obtenido de: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf>.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). NOM-032-SSA-2-2014 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores, México. 2015; 1–43.
- Germano M., Vassena C., Picollo MI. Autosomal inheritance of deltamethrin resistance in field populations of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) from Argentina. *Pest Manag Sci.* 2010; 66(7): 705–708.
- José Alejandro Martínez-Ibarra, Yunuen Grant-Guillén, Luz Verónica Ventura-Rodríguez, Paola Denisse Osorio-Pelayo, Michael Dassaejv Macías-Amezcu, Karla Meillón-Isáis, Ricardo Alejandro-Aguilar, Elvia Rodríguez-Bataz,

- Benjamín Nogueta-Torres. Biological and genetic aspects of crosses between species of the genus *Meccus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; 106(3): 293–300.
- Martínez-Ibarra JA., Ventura-Rodríguez L., Meillon-Isais K., Barajas-Martínez H., Alejandre-Aguilar R., Lupercio-Coronel P., Rocha-Chávez G., Nogueta-Torres B. Biological and genetic aspects of experimental hybrids from species of the *Phyllosoma* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2008; 103(3): 236-243.
- Martínez-Ibarra J. A., Nogueta-Torres B., Licón-Trillo Á., Alejandre-Aguilar R., Salazar-Schettino P. M. and Vences-Blanco M. O. Biological aspects of crosses between *Triatoma recurva* (Stål), 1868 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and other members of the *Phyllosoma* complex. *Journal of Vector Ecology*. 2015; 40: 117–122.
- Miller RB, Karn RC. A rapid spectrophotometric method for the determination of esterase activity. *J Biochem Biophys Methods*. 1980; 3(6):345–54.
- Montella I., Martins A., Viana-Medeiros P., Pereira J., Braga I., Valle D. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 77(3): 467–477.
- OMS. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 2005. Protocolo de evaluación de efecto insecticida en *Triatoma infestans*.
- Pessoa GCD, Dias LS, Diotaiuti L. 2014. Deltamethrin pyrethroid susceptibility characterization of *Triatoma sordida* Stal, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) populations in the Northern Region of Minas Gerais, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 47(4):426-429.

Salazar-Schettino, Rojas-Wastavino, Cabrera-Bravo. Bucio-Torres, Martínez-Ibarra, Monroy-Escobar, Rodas-Retana, Guevara-Gómez Y, Vences-Blanco, Ruiz-Hernández, Torres-Gutiérrez. Revisión de 13 especies de la familia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas, en México. J. Selva Andina Res. Soc. 2010; 1(1): 57-81.

Valle D., Montella IR., Ribeiro RA., Viana Medeiros PF., Martins Junior A de J, Pereira Lima JB. Metodologia para Quantificação de Atividade de Enzimas Relacionadas com a Resistência a Inseticidas em *Aedes aegypti*. Ministerio da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Ministerio Da Saúde. 2006; 129 pp.

## CONCLUSIONES

Se logró la estandarización de las **condiciones en laboratorio para la cría consecutiva** de las especies de *Triatoma dimidiata*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma mazzottii*, *Triatoma longipennis* y *Triatoma picturata*

Se **estandarizaron los protocolos** para la determinación de susceptibilidad por aplicación tópica, además de la adaptación de la técnica para la cuantificación de actividad enzimática y las bases para el análisis molecular **para las especies de *T. dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. mazzottii*, *T. longipennis* y *T. picturata*.**

Las poblaciones de campo de *T. pallidipennis*, *T. mazzottii*, *T. longipennis* y *T. picturata* mostraron **resistencia a la deltametrina**; a excepción de *T. dimidiata* que fue más susceptible que su cepa de referencia.

Todas las poblaciones de *T. dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. mazzottii*, *T. longipennis* y *T. picturata* resultaron **resistentes a permetrina**.

La **deltametrina** mostro **mayor potencial insecticida** con respecto a la permetrina para todas las poblaciones de *T. pallidipennis*, *T. mazzottii*, *T. longipennis* y *T. picturata* analizadas.

Las enzimas  **$\alpha$ -esterasas** mostraron una correlación significativa ( $p < 0.5$ ) con la desintoxicación a la **deltametrina**.

Se reporta la presencia de las mutaciones **L1014F/S** en *T. dimidiata*, *T. pallidipennis* y *T. picturata*. Y dos nuevas mutación para triatominos, **K964R** en *T. longipennis* de Jalisco y Guanajuato y **A943V** en *T. mazzottii* a deltametrina.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

Jesús Antonio Dávila Barboza

Candidato para el Grado de  
Doctor en Ciencias con Acentuación en Entomología Médica.

Tesis: MUTACIONES “kdr” y ENZIMAS ASOCIADAS A LA RESISTENCIA A PIRETROIDES EN TRIATOMINOS (HEMIPTERA: REDUVIIDAE), VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MEXICO.

Campo de Estudio: Entomología Médica.

Datos Personales: Nacido en Monterrey, N. L., el 17 de Agosto de 1986, hijo de Antonio Dávila Sánchez y Ma. De Jesús Barboza Castro.

Educación: Químico Bacteriólogo Parasitólogo egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido en Enero del 2012.