



TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Exactas

EL HONGO ENTOMOPATÓGENO *BEAUVERIA BASSIANA*: SU INTERACCIÓN CON INSECTOS VECTORES DE LA ENFERMEDAD DEL CHAGAS Y CON EL INSECTICIDA DELTAMETRINA

Autor:

Microbiólogo Lucas Forlani

Director: Dra. M. Patricia Juárez

Codirector: Prof.Dr. Nicolás Pedrini

Año 2014

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Exactas, se realizó durante el periodo de noviembre/2009- marzo/2014 en el Instituto de investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP-CONICET), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, bajo la dirección de la Dra. M. Patricia Juárez y el Prof. Dr. Nicolás Pedrini.

Publicaciones en revistas científicas derivadas de este trabajo de tesis:

1) Toxicological and biochemical response of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* after exposure to deltamethrin. *Pest Management Science*.

doi: 10.1002/ps.3583. **2013**

L. Forlani, M. Patricia Juárez, Sabrina Lavarías and Nicolás Pedrini.

2) Parámetros de virulencia de un hongo entomopatógeno en *Triatoma infestans*.

Revista Argentina de Salud Pública. Editorial: Ministerio de Salud de la Nación. Año: Agosto **2012**. Pag. 69

L. Forlani, N. Pedrini y M.P. Juárez.

3) Contribution of the horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the overall performance of a fungal powder formulation against *Triatoma infestans*. *Research and Report in Tropical Medicine* 2:135–140 **2011**.

L. Forlani, Pedrini N. and Juárez M.P.

A mis hijos, Leandro y Malena

Esta tesis va dedicada a:

Al CONICET y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por las becas que me otorgaron oportunamente, sin las cuales esta tesis no hubiera sido posible.

A Patricia, por seleccionarme como becario, por las sugerencias, correcciones y consejos para este manuscrito, así como de las presentaciones a congresos y trabajos que realizamos durante estos 4 años de labor.

A mis co-directores de laboratorio 12; Nicolás, Facundo, Juan, Luciana, Sergio, Cecilia y Gustavo, porque gracias a todos, hoy puedo terminar esta tesis.

A los Drs. Jorge Rabinovich y Sabrina Lavarías por, sus colaboración en el análisis estadístico de los datos y determinaciones experimentales.

A Mariana, porque una caricia vale más que mil tesis doctorales.

A mis viejos y hermanos, por que sin su apoyo contante esta tesis me hubiera costado el doble.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, a su Director Dr. Horacio Garda y a todos sus integrantes, por abrirme las puertas para poder realizar este trabajo de tesis con la mejor comodidad.

A la Facultad de Ciencias Exactas y a la UNLP, por la aceptación al doctorado.

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	1
Aspectos generales de los hongos	2
Los hongos entomopatógenos	3
➤ Generalidades.	
➤ Mecanismos de acción.	
➤ Control biológico mediante hongos entomopatógenos.	
El hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i>	12
➤ Características generales	
➤ Clasificación taxonómica	
➤ Capacidad insecticida	
Insectos vectores de la enfermedad del Chagas	16
➤ Aspectos generales de la enfermedad del Chagas	
➤ <i>Triatoma infestans</i>	
➤ Lípidos cuticulares de insectos triatominos: Composición química y su rol como feromona de contacto	
Bases bioquímicas de la interacción hongo entomopatógeno y lípidos cuticulares de triatominos	20
Hongos entomopatógenos como herramientas potenciales para el manejo integrado de insectos vectores del Chagas	22
Control químico de insectos vectores del Chagas	24
➤ Generalidades	
➤ Mecanismos de resistencia a insecticidas	
Insecticidas piretroides: Deltametrina	25
Compatibilidad entre insecticidas químicos y hongos entomopatógenos	28
Metabolismo de xenobióticos	29
➤ Generalidades	
➤ Enzimas de detoxificación de Fase I y II	
Generación de especies reactivas del oxígeno (EROS) y estrés oxidativo	33
➤ Generalidades	

<ul style="list-style-type: none"> ➤ Antioxidantes y sus funciones biológicas ➤ Mecanismos de defensa intracelular contra (EROS): sistemas enzimáticos antioxidantes 	
Peroxidación lipídica por estrés oxidativo	40
<u>CAPÍTULO II OBJETIVOS</u>	42
<hr/>	
Objetivos generales.	
Objetivos específicos.	
<u>CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS</u>	45
<hr/>	
<u>A) Interacción <i>B.bassiana</i>-<i>T.infestans</i></u>	
Cepa fúngica y formulación	46
Insectos: procedencia y mantenimiento.....	46
Cuantificación de parámetros de virulencia.....	46
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Porcentaje de Mortalidad y Tiempo Letal Medio (TLM) ➤ Determinación de la Dosis letal 50 (DL₅₀) ➤ Cuantificación de los parámetros reproductivos 	
Transmisión horizontal de esporas entre insectos (autodiseminación).....	48
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Capacidad de diseminación de esporas de un insecto a diferentes periodos de tiempos ➤ Efecto de la densidad de insectos en la autodiseminación 	
Determinación de la actividad residual del micoinsecticida.....	50
Evaluación de trampas de infección para el control de <i>T.infestans</i> en ensayos a campo.....	50
Simulación de la dinámica poblacional de <i>T.infestans</i> en presencia de <i>B.bassiana</i> mediante el desarrollo de un modelo matricial	53
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Generalidades ➤ Determinación de los parámetros del modelo 	

➤ Construcción de la matriz de proyección	
<u>B) Interacción <i>B.bassiana</i>–deltametrina</u>	
Solventes, reactivos, enzimas y oligonucleótidos utilizados	61
Kits comerciales empleados	61
Cultivo de <i>B.bassiana</i> GHA	61
Obtención de fracciones subcelulares de <i>B.bassiana</i>	62
Estimación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀)	62
Cuantificación de proteínas	62
Cuantificación de la actividad de enzimas antioxidantes	63
➤ Actividad específica de superóxido dismutasa (SOD)	
➤ Actividad específica de Catalasa (CAT)	
➤ Actividad específica Glutación peroxidasa (GPx)	
➤ Actividad específica Glutación-S-Tranferasa (GST)	
Cuantificación de la peroxidación lipídica (LPO)	64
Análisis de expresión de genes	66
➤ Extracción de ARN y síntesis de ADNc.	
➤ Cuantificación de la expresión de los genes por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).	
<u>CAPÍTULO IV RESULTADOS</u>	69
<u>A) Interacción <i>B.bassiana</i>–<i>T.infestans</i></u>	
Estimación de la Mortalidad (%), (TLM) y (DL₅₀)	70
Cuantificación de los parámetros reproductivos	71
Transmisión horizontal de esporas entre insectos (autodiseminación)	72
➤ Capacidad de diseminación de esporas de un insecto a diferentes periodos de tiempos.	
➤ Efecto de la densidad de insectos en la autodiseminación.	

Determinación de la actividad residual del micoinsecticida	73
Evaluación de trampas de infección en pruebas a campo	74
Simulación de la dinámica poblacional de <i>T.infestans</i> en presencia de <i>B.bassiana</i>	77
➤ Efecto sobre la tasa de recambio poblacional (R ₀).	
➤ Efecto sobre la densidad poblacional.	
<u>B) Interacción <i>B.bassiana</i>-deltametrina</u>	
Determinación de la CI₅₀	82
Actividad de enzimas antioxidante	82
Actividad específica GST	84
Cuantificación de la peroxidación lipídica	85
Expresión diferencial de genes	85
➤ Extracción de ARN.	
➤ Cuantificación de la expresión génica.	
➤ Genes del sistema detoxificantes.	
➤ Genes del sistema antioxidante.	
<u>CAPÍTULO V DISCUSIONES</u>	90
Interacción <i>B.bassiana</i> – <i>T.infestans</i>	91
Interacción <i>B.bassiana</i> – Deltametrina	101
<u>CAPÍTULO VI CONCLUSIONES</u>	110
<u>CAPÍTULO VII BIBLIOGRAFÍA</u>	113

Figura I. Esquema del ciclo de vida de un hongo entomopatógeno y su relación con el huésped.....	4
Figura II. Esquema general de la interacción entre los hongos entomopatógenos y la cutícula del insecto.....	6
Figura III. <i>Beauveria bassiana</i> crecida en placa de Petri en medio de cultivo completo y esquema del conidióforo.....	13
Figura IV. Ninfa de quinto estadio de <i>T.infestans</i> . Izquierda: ejemplar infectado con <i>B.bassiana</i> , derecha: ejemplar sano.....	14
Figura V. Ciclo de vida de <i>T.infestans</i> (“vinchuca”).....	17
Figura VI. Diagrama de un corte transversal del integumento de insectos.....	18
Figura VII. Perfil lipídico representativo mediante HPTCL del integumento de ninfas de <i>T.infestans</i> 5 ^{to} estadio.....	19
Figura VIII. Ruta metabólica propuesta para la degradación de hidrocarburos por <i>B.bassiana</i>	22
Figura IX. Corte transversal (SEM) de la cutícula de <i>T.infestans</i>	25
Figura X. Estructura molecular de la deltametrina.....	27
Figura XI. Mecanismo de reacción de la citocromo P450.....	31
Figura XII. Diferentes formas de reducción de oxígeno en los sistemas biológicos.....	32
Figura XIII. Mecanismos de regulación implicados en la respuesta adaptativa de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno.....	34
Figura XIV. Principales sistemas enzimáticos involucrados en la defensa antioxidante en las células.....	35
Figura XV. Etapas de la peroxidación lipídica.....	39

Figura XVI. Unidad experimental para evaluar el efecto de la densidad de insectos en la autodiseminación de esporas.....	50
Figura XVII. Zona de los experimentos y tipo de vivienda.....	52
Figura XVIII. Trampa de infección.....	52
Figura XIX. Trampas de infección dispuesta en paredes de habitación y gallinero.....	52
Figura XX. Diagrama del ciclo de vida de un triatmino en términos de estadíos.....	54
Figura XXI. Ciclo de desarrollo de <i>T. infestans</i> "sanos" acoplados al del desarrollo de los infectados.....	54
Figura XXII. Matriz de transición.....	60
Figura XXIII. Gel de agarosa de 1% para ARN extraído de <i>B. bassiana</i> crecida en los cultivos controles y con diferentes dosis de deltametrina.....	85
Tabla 1.I. Toxinas sintetizadas por distintos géneros de hongos entomopatógenos.....	9
Tabla 2.A. Estimación de los valores de P_i y G_i mediante las formulas (1) y (2).....	56
Tabla 2.B. Valores estimados de los parámetros propuestos para el desarrollo del modelo matricial.....	58
Tabla 2.C. Secuencias de los primers utilizados en las reacciones de PCR a tiempo real para medir la expresión de los genes de interés.....	68
Tabla 3.A. Virulencia de un micoinsecticida de <i>B. bassiana</i> formulado en polvo	

frente a diferentes estadios de <i>T.infestans</i>	70
Tabla 3.B. Determinación de la DL ₅₀ del micoinsecticida en ninfas de 4 ^{to} estadio.....	71
Tabla 3.C. Parámetros reproductivos de hembras de <i>T.infestans</i> expuestas al micoinsecticida.....	71
Tabla 3.D. Capacidad de diseminación de esporas de un insecto en diferentes periodos de tiempos.....	72
Tabla 3.E. Total de viviendas evaluadas y número de insectos iniciales estimados.....	75
Tabla 3.F. Efecto de las trampas de infección sobre el número de <i>T.infestans</i> en las viviendas.....	76
Tabla 3.G. Efecto de la deltametrina en la germinación de esporas y determinación de la 50 (CI ₅₀).....	81
Tabla 3.H. Porcentaje de eficiencias y valores de R ² de primers obtenidos de curvas estándares.....	85
Gráfico 1. Efecto de la densidad de insectos en la autodiseminación de esporas.....	73
Gráfico 2. Determinación de la actividad residual del micoinsecticida expuesto a condiciones de temperatura y humedad no controladas durante 5 meses.....	74
Gráfico 3. Porcentaje de mortalidad acumulativa de <i>T.infestans</i> por infección fúngica.....	76
Gráfico 4. Valores de tasa neta de crecimiento (Ro) para diferentes combinaciones de eficacias y número de trampas.....	77
Gráfico 6. Evolución en el tiempo de la densidad	

poblacional de <i>T.infestans</i> como resultado de una simulación en base a un número de 5 trampas y eficacias con valores de 0.01, 0.005 y 0.001.....	79
Gráfico 7. Evolución en el tiempo de la densidad poblacional de <i>T.infestans</i> como resultado de una simulación en base a un número de 10 trampas y eficacias con valores de 0.01, 0.005 y 0.001.....	79
Gráfico 8. Evolución en el tiempo de la densidad poblacional de <i>T.infestans</i> como resultado de una simulación en base a un número de 20 trampas y eficacias con valores de 0.01, 0.005 y 0.001.....	80
Gráfico 9. Actividad enzimática antioxidante SOD de <i>B.bassiana</i> expuesta a diferentes dosis de deltametrina.....	82
Gráfico 10. Actividad enzimática antioxidante CAT.....	82
Gráfico 11. Actividad enzimática antioxidante GPX.....	83
Gráfico 12. Actividad enzimática GST.....	83
Gráfico 13. Niveles de peroxidación lipídica estimados por TBARS en <i>B.bassiana</i> crecidas en diferentes dosis de deltametrina.....	84
Gráfico 14. Patrones de expresión de genes del sistema detoxificante de <i>B.bassiana</i> expuesta a distintas concentraciones de deltametrina.....	86
Gráfico 15. Patrones de expresión de genes del sistema antioxidante de <i>B.bassiana</i> expuesta a distintas concentraciones de deltametrina.....	87

INTRODUCCIÓN

Aspectos generales de los hongos

Los hongos pueden definirse como organismos eucarióticos, aclorófilos, con nutrición heterófila y/o absorptiva, saprófitos, parásitos o simbioses y de distribución cosmopolita. Son organismos provistos de pared celular de quitina y/o celulosa, en la fase de reproducción. El cuerpo fúngico se denomina talo o micelio, no presenta diferenciación de verdaderos tejidos ni órganos y es generalmente inmóvil. De acuerdo a su función, el micelio puede ser vegetativo o de fructificación. En la fase vegetativa, primera fase de desarrollo, crece en forma de estructuras filamentosas llamadas hifas, células levaduriformes u otras unidades vegetativas. Este micelio vegetativo cumple con las funciones de nutrición, sostén, propagación y resistencia. En una segunda fase de desarrollo se origina el micelio de fructificación a partir del micelio vegetativo. La función de este micelio es generar hifas fértiles que producen células que intervienen en la reproducción sexual, asexual o parasexual del hongo (Alexopoulos C.J. & Mims C.W.,1985).

Los conidios (esporas) son células que intervienen en la reproducción asexual y son generados por hifas especializadas denominadas conidióforos. Tienen un nivel metabólico bajo y se producen como respuesta primaria al deterioro físico y químico del ambiente. Presentan una pared celular cuya composición físico-química particular proporciona al protoplasma protección contra varios factores de stress ambiental como la radiación ultravioleta, desecación, lisis enzimática y compuestos tóxicos. La pared celular se compone principalmente de quitina, glucanos, proteínas y glicoproteínas (manoproteínas, galactomanoproteínas y xylomanoproteínas) (Alexopoulos C.J. & Mims C.W.,1985).

Los blastosporos, también son células que intervienen en la reproducción asexual. Presentan una composición similar a los conidios que se desarrollan en medios sumergidos (medios de cultivo líquido o hemocele de insectos), pero son de mayor tamaño que los conidios, de pared celular más delgada y con menor resistencia y

viabilidad que los conidios (Taborsky, 1992).

Los hongos entomopatógenos

Generalidades

Los hongos entomopatógenos son importantes reguladores naturales de las poblaciones de insectos. Debido a la gran biodiversidad de especies y variedad de metabolitos secundarios tóxicos que producen presentan un potencial importante como agentes micoinsecticida contra insectos plagas de la agricultura y vectores de enfermedades (Butt & Goettel, 2000; Inglis et al., 2001).

Estos hongos infectan a sus insectos huésped penetrando a través de la cutícula, para luego acceder a la hemolinfa, producir toxinas, y crecer mediante la utilización de nutrientes presentes en el hemocele (Hajek & St. Leger, 1994). Distintas especies de hongos y aún distintas cepas de una misma especie pueden ser más o menos virulentas para un huésped determinado (Roberts, 1989).

Se han descrito aproximadamente 750 especies de hongos entomopatógenos, incluidas en más de 100 géneros diferentes (Roberts, 1989; Alves, 1986; Samson et al., 1993; Tanada & Kaya, 1993; Hajek, 1997; Latge et al., 1988)

Como herramientas de control, los hongos entomopatógenos se usan en forma de conidios que esporula después de la aplicación (Howard y Miller, 1996; Bidochka & Small, 2005; Furlong & Pell, 2005; Roy et al., 2006).

Mecanismos de acción

A diferencia de los virus y bacterias entomopatógenas que ingresan a su huésped generalmente por vía digestiva, los hongos entomopatógenos actúan principalmente como insecticidas de contacto y deben atravesar la cutícula del insecto huésped para lograr una colonización exitosa. En este caso, la cutícula provee un sustrato de adhesión y de nutrición, así como las señales químicas necesarias para la germinación del hongo y su posterior invasión al insecto blanco (Boucias & Pendland, 1991a,

1991b; Hajek & St. Leger, 1994).

El ciclo de vida de los hongos entomopatógenos en un insecto huésped puede dividirse en las siguientes 7 etapas (basado en Roberts & Humber, 1981 y Fargues, 1984) (figura I):

1- *Adsorción de los propágulos fúngicos a la superficie cuticular.*

Las condiciones ambientales favorables de temperatura y humedad, conjuntamente con una compatibilidad del conidio con la cutícula del insecto, pueden desencadenar la activación de los mismos y el desarrollo de la enfermedad. Los conidios constituyen el estado infectivo del hongo por ser las primeras estructuras fúngicas que entran en contacto con el insecto huésped. Pueden ser estructuras hidrofóbicas o hidrofílicas,

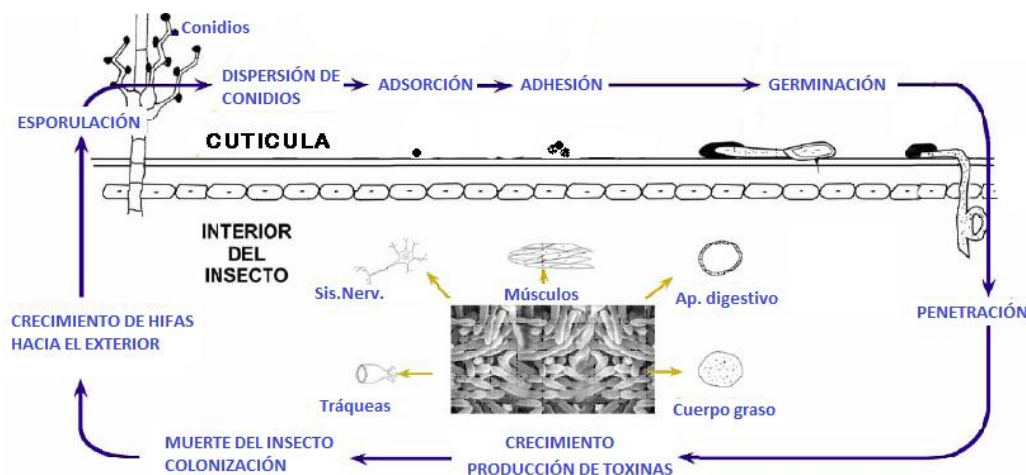


Figura I. Esquema del ciclo de vida de un hongo entomopatógeno y su relación con el huésped. Modificado de Crespo, 2006.

de acuerdo a la composición fisicoquímica de las proteínas de su capa más externa. Las hidrofobinas constituyen un grupo de estas proteínas, que incrementan la resistencia de los conidios a la desecación, e intervienen en los procesos de adhesión de las estructuras fúngicas a las superficies hidrofóbicas (Wösten, 2001; Boucias & Pendland, 1991a, 1991b; Bidochka et al., 1995; Paris et al., 2003). La interacción inicial del conidio con la cutícula del insecto es un proceso pasivo que se produce por interacciones inespecíficas de carácter fisicoquímico, como son las interacciones

hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, etc. (Boucias & Latgé, 1988).

2- Adhesión o consolidación de la interface entre propágulos pregerminantes y la epicutícula

Esta etapa implica la formación de envolturas o matrices de sustancias adhesivas mucilaginosas e hidrofóbicas secretadas por el hongo cuya composición no se conoce con exactitud, aunque se sugieren estructuras glucoproteicas y/o polisacáridos (Boucias & Pendland, 1991a, 1991b). También se pueden originar formación de microextensiones en las células fúngicas y modificaciones en la cutícula del huésped, producidas por el microorganismo. Las modificaciones más frecuentes implican la predigestión de la epicutícula por diversas enzimas entre las que se encuentran algunas como lipasas, N-acetilglucosaminidasa, proteasas y esterases. Estas enzimas se localizan en gránulos en el extremo apical de los conidios previo a la formación del apresorio (Fargues, 1984). La adhesión es un proceso activo que requiere un estímulo específico del huésped (Fargues, 1984; Nielsen et al., 2000)

3- Germinación del hongo y crecimiento en la superficie cuticular del insecto

Cuando las condiciones de temperatura y humedad son apropiadas se produce un incremento del tamaño de los conidios con la aparición de una o varias evaginaciones que se prolongan generando estructuras hifales denominadas tubos germinales o germinativos, a partir de los cuales pueden originarse, a su vez, hifas laterales cortas y especializadas, como órganos de fijación que se denominan apresorios. Estas estructuras proporcionan al hongo una sujeción mecánica frente a fuerzas opuestas generadas por las condiciones ambientales adversas, favoreciendo el inicio de la penetración (Boucias & Pendland, 1982; Roberts & Humber, 1981; Wraight et al., 1998). Generalmente la formación del apresorio ocurre conjuntamente con la secreción de sustancias viscosas mucilaginosas (Bidochka et al., 1997). La

germinación y el crecimiento del hongo son etapas que generan estructuras de rápido desarrollo y gran colonización, pero muy vulnerables a los distintos factores de stress ambiental (Roberts & Humber, 1981). La disponibilidad de nutrientes en la cutícula del insecto, es uno de los factores principales que condiciona el proceso de germinación (St. Leger et al., 1988; Lecuona et al., 1997; Szafranek et al., 2001). Los hongos requieren de una fuente de carbono exógena como glucosa, N-acetilglucosamina, glucosamina, quitina, almidón y/o lípidos, y poseen diversas enzimas hidrolíticas (quitinasas, proteasas, lipasas y esterases, entre otras) capaces de degradar estos compuestos (St. Leger et al., 1986a, 1986b; St. Leger et al., 1991; St. Leger et al., 1996) Los componentes estructurales y químicos (antimicrobianos) de la cutícula del huésped, pueden favorecer o inhibir la germinación del microorganismo (Fargues, 1984; Boucias & Pendland, 1991a, 1991b; Sosa-Gómez et al., 1997) (figura II).

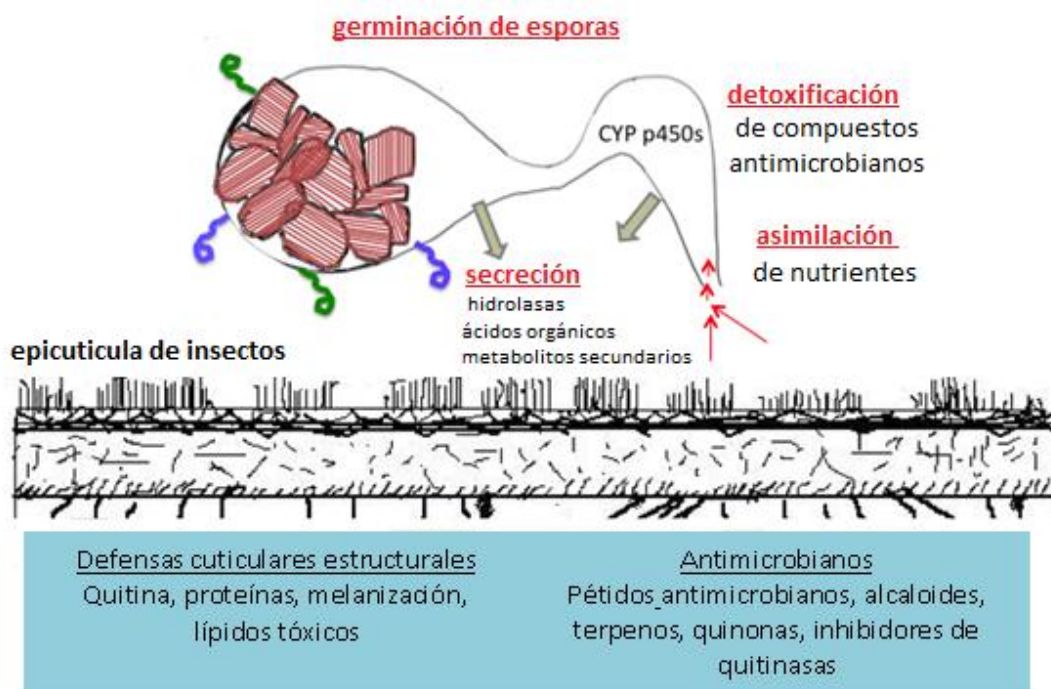


Figura II. Esquema general de la interacción entre los hongos entomopatógenos y la cutícula del insecto (Modificado de Ortiz-Urquiza, A. & Keyhani, N.O., 2013).

Además, la propia cutícula del insecto es una estructura altamente heterogénea que

puede variar en gran medida en la composición, incluso durante las diversas etapas de la vida en un insecto particular (Anderson, 2005). En cuanto a la influencia de la composición química del hongo en el proceso de germinación, al tomar contacto con una fuente de carbono o nitrógeno, los conidios muestran valores de germinación mayores que los conidios hidrofílicos (Boucias & Pendland, 1991a, 1991b).

4- Penetración del hongo en el insecto huésped

Los eventos tempranos de la infección fúngica, previos a la penetración, resultan cruciales para el hongo debido a los riesgos de deshidratación y fotodegradación a los que se encuentra expuesto en la superficie del insecto. Las hifas desarrolladas a partir de los conidios comienzan el proceso de penetración al insecto para alcanzar prontamente una mayor protección y sustrato alimenticio. La vía de entrada más frecuente de los hongos entomopatógenos al insecto es a través de la cutícula, en zonas donde el integumento ofrece menor resistencia (regiones intersegmentarias, bases de los pelos y setas) (Boucias y Latgé, 1988; Sosa Gomez et al., 1997). Eventualmente los hongos pueden ingresar a través de orificios naturales, como cavidad bucal, espiráculos, orificio anal o sifonal o bien heridas y sitios de ruptura de la cutícula (Tanada y Kaya, 1993).

El mecanismo de penetración del hongo es generalmente una combinación de procesos físicos (presión mecánica del tubo germinal) y químicos (secreción de enzimas líticas) (St. Leger et al., 1986a; St. Leger et al., 1986b; St. Leger et al., 1991). Asimismo, las propiedades particulares de la cutícula del huésped, principalmente su espesor, grado de esclerotización y presencia de sustancias antifúngicas y/o disponibilidad de nutrientes, son factores importantes que pueden determinar la penetración del hongo (Charnley, 1984).

En insectos con cutículas de poco espesor y escasamente esclerotizado, el tubo germinal penetra sin alterar su morfología, mientras que en cutículas esclerotizadas resistentes a la degradación, los tubos germinales forman estructuras más complejas,

como apresorios y haustorio, que secretan sustancias mucoides adherentes y enzimas líticas (McCauley et al., 1968, Goettel et al., 1989, St. Leger et al., 1991, Tanada y Kaya, 1993).

5-Crecimiento del hongo en el hemocele

En el interior del insecto, los hongos se desarrollan generalmente como células de tipo levaduriforme, los blastosporos, que se multiplican rápidamente por gemación, desarrollando protoplastos y estructuras ameboideas sin pared celular (Roberts & Humber, 1981). La ausencia de pared celular sería una estrategia adaptativa del hongo para evadir los mecanismos de defensa del insecto infectado. Se ha reportado que los hongos que carecen o enmascaran los componentes antigénicos propios de la pared celular no desencadenan una reacción inmunitaria en el huésped (Wang y St. Leger, 2006).

6- Producción de toxinas fúngicas

Las toxinas (tabla 1.I.) cumplen un rol importante en el modo de acción de los hongos entomopatógenos. Si bien estos compuestos no serían los responsables directos de la muerte del insecto, ésta ocurre más rápidamente cuando el hongo infectante produce grandes cantidades de toxinas. En estos casos, la toxemia conjuntamente con la deficiencia nutricional del insecto y con la destrucción de sus tejidos por la invasión y crecimiento del hongo en su interior, desencadenarían la muerte del mismo (Alves. 1986). Este múltiple mecanismo de acción podría sugerir la ausencia de resistencia por parte de los insectos a los hongos entomopatógenos (Robert & Hajek 1992; Robert & Leger, 2004; Quesada-Moraga & Vey, 2004)

7- Muerte del insecto, producción y dispersión de conidios

El desarrollo de las hifas en el interior del insecto es muy variable, ya que puede abarcar únicamente las zonas próximas al sitio de penetración o bien puede invadir completamente a su huésped. El crecimiento de las hifas comienza en el hemocele y

continúa avanzando hasta alcanzar los distintos órganos del insecto.

Tabla 1.1. Toxinas sintetizadas por distintos géneros de hongos entomopatógenos.

Nombre de la toxina	Especies	Referencia
Dextrusinas	<i>Metarhizium sp</i>	Roberts et al., 1992
Beauvericina, bassianolida, bassianinas, tenellinas, oosporeína, beauverolides, isarolides, bassiacridina	<i>Beauveria sp</i>	Quesada-Moraga & Vey, 2004
Ciclosporina, efraeptinas	<i>Tolyocladium sp</i>	Hoppert et al., 2001; Strasser et al., 2000
Leucinostatinas, Beauvericina	<i>Paecilomyces sp</i>	Mikami et al., 1984, Klaric y Pepeljnjak, 2005
Cordicepina	<i>Cordyceps sp</i>	Alves, 1986

Con la muerte del insecto termina el desarrollo parasítico del hongo y empieza su fase saprofítica. El crecimiento del hongo en el hemocele forma masas micelianas que producen la momificación del huésped (Tanada & Kaya, 1993, Boucias & Pendland, 1998). Asimismo se produce un agotamiento de los nutrientes y por consiguiente una situación de stress alimenticio para el hongo, que sale al exterior del insecto fundamentalmente por las regiones intersegmentales o por aberturas naturales (espiráculos, boca y ano). Cuando las condiciones ambientales son favorables, se produce la esporulación del hongo sobre el cadáver, generando esporas o conidios. Esta propiedad del hongo de generar estructuras de resistencia permite mantener una fuente de microorganismos latentes que pueden permanecer sobre la materia orgánica del suelo o sobre los cadáveres de los insectos, con capacidad de reproducirse y renovarse de forma continua. La dispersión del patógeno puede ocurrir por varias vías: los micelios originados en los cadáveres pueden diseminarse en el suelo, o bien los conidios pueden ser dispersados por el viento, el agua, e infectar a otros insectos cuando las condiciones de temperatura y humedad sean favorables. Otro mecanismo importante de propagación de los hongos en las poblaciones de insectos es mediante autodiseminación o transmisión horizontal de las esporas (Furlong & Pell, 2001).

Control biológico mediante hongos entomopatógenos.

En la agricultura convencional, el control químico ha sido el método más difundido, con las consecuencias negativas que su empleo produce sobre el hombre y el medio ambiente. En la actualidad, la tendencia es utilizar productos químicos más selectivos, menos tóxicos para los humanos, aplicándolos en dosis mínimas y complementándolos con otras estrategias de control ecológicamente aceptables. Este sistema alternativo al uso excluyente de pesticidas se denomina “manejo integrado de plagas” (MIP). Entre sus tácticas se destaca el control biológico, basado en el empleo de bioplaguicidas: productos derivados de animales, plantas y microorganismos (entomopatógenos) para prevenir, repeler, eliminar o reducir los daños causados por las plagas (Lecuona, 1996).

Numerosos hongos son enemigos naturales de insectos, representando así un gran potencial como biocontroladores.

Entre las principales especies de hongos entomopatógenos utilizadas en el control biológico encontramos a: *Beauveria bassiana*, *B.brongniartii*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosoroseus*, *Verticillium lecanii* e *Hirsutella thompsonii* (Robert & Humber 1981; Robert & Hajek 1992; Butt et al., 2002; Wraight et al., 2001; Copping, 2004; Zimmerman, 2007; Khan et al., 2012;).

Las ventajas que presentan estos microorganismos en relación a sus aplicaciones para el control de insectos son:

- Presentar un potencial epizootico importante, ya que pueden dispersarse rápidamente a través de una población, haciendo que ésta disminuya progresivamente en el tiempo.
- Su uso prolongado no ha evidenciado aún, a diferencia de los insecticidas químicos, fenómenos de resistencia.
- Presentar grados variables de especificidad. Pueden infectar un amplio rango de insectos o bien pueden ser específicos de un grupo restringido de especies, e incluso

de una única especie.

-Invadir el cuerpo de su huésped a través de su cutícula o exoesqueleto.

-No contaminar el medio ambiente, ni afectar la salud humana ni la de otros animales superiores.

Se ha sugerido que el uso de hongos entomopatógenos o su aplicación combinada con insecticidas podría ser muy útil para el manejo de insectos resistentes a los insecticidas químicos (Anderson & Robert, 1983). Dado que las plagas de artrópodos son conocidos por desarrollar fácilmente resistencia a los insecticidas químicos, el interés en la utilización de hongos entomopatógenos va en aumento en todo el mundo. En este sentido en los últimos años se ha producido un gran progreso en el desarrollo de los micoinsecticidas (Khan et al., 2012; Butt, 2002; Wraight et al., 2001; Copping, 2004; Zimmerman, 2007). Los conidios son las estructuras más utilizadas para ser aplicadas en programas de control con hongos entomopatógenos (Robert, 1989; Pereira & Roberts, 1990; Feng et al., 1994). El mayor obstáculo que presenta el uso de estos microorganismos como biocontroladores, es su elevada susceptibilidad a los factores ambientales como la luz UV, la temperatura y la humedad, que restringen la supervivencia prolongada de los conidios en el medio ambiente (Braga et al., 2001; Lord, 2001, Lord, 2007; Maniania et al., 2006). Actualmente estos inconvenientes están siendo sorteados mediante la preparación de formulados fúngicos que garanticen la estabilidad y viabilidad del producto (Bateman, 1998; Copping, 2004; Khan, 2012; Zimmerman, 2007). La formulación es el proceso por el cual el ingrediente activo (conidios) se combina con materiales inertes tales como aceites, solventes, emulsificantes y otros aditivos, que protegen al hongo en el momento de la aplicación, evitan su sedimentación (garantizando una mezcla homogénea necesaria para una buena aplicación y distribución) y ayudan a aumentar su viabilidad en el medio ambiente. Los formulados mayormente utilizados consisten en suspensiones de conidios en aceites de origen mineral o vegetal, o en medios acuosos con sustancias

emulsificantes (Aud, 1991; Feng et al., 1994; Prior et al., 1995).

Los principales parámetros de la virulencia de los hongos entomopatógenos sobre los insectos huésped son: Tiempo Letal Medio (TLM) (indica el tiempo necesario para matar el 50% de los insectos a una dosis determinada), Dosis letal 50 y Porcentaje de mortalidad (Lecuona, 1996).

La virulencia de los hongos puede variar por crecimiento en distintos sustratos nutritivos, presencia de otros microorganismos, factores climáticos, e incluso cuando se realiza el pasaje sobre insectos de distinta susceptibilidad al patógeno, o cuando se multiplican en medios de cultivo sintéticos (Lecuona, 1996).

Actualmente los hongos entomopatógenos se emplean exclusivamente como agentes de control de insectos plaga del agro (Roberts & Hajek, 1992; Lomer, 2001; Rehner, 2005); su uso para el manejo de insectos vectores de enfermedades todavía no ha sido autorizado en ningún país. Respecto al control de plagas del agro su uso se ha extendido en países como Cuba (Fernández-Larrea Vega, 2001; Estrada y López, 1997), China (Xu, 1988) y Brasil (Alves, 1986). Asimismo en EEUU, Australia, Inglaterra, Francia, Canadá, Corea y varios países de África (Proyecto LUBILOSA) se han implementado estrategias de control de una amplia variedad de insectos mediante distintas especies de hongos entomopatógenos, con resultados altamente satisfactorios. En nuestro país, hay numerosos estudios realizados con el objetivo de utilizar micoinsecticidas como estrategia de control de insectos plagas del agro (López-Lastra, 1999; Dal Bello et al., 2001; López-Lastra & Scorsetti, 2002; Toledo et al., 2004; Lecuona & Díaz, 2005).

El hongo entomopatógenos *Beauveria bassiana*

Características generales

B. bassiana (Bálsamo) Vuillemin es una especie que se encuentran habitualmente en el suelo. Posee características especiales que le permite sobrevivir en forma

saprofítica sobre material orgánico en descomposición, o bien sobre seres vivos. Este hongo puede ser parásito o patógenos oportunista de un amplio rango de insectos, lo que lo convierte en una de las especies más utilizada entre los hongos entomopatógenos (Rehner, 2005; Zimmerman, 2007). Es fácilmente cultivado en el laboratorio debido a su desarrollo miceliano y a la producción de conidióforos y de conidios. Las condiciones favorables para la formación de esporas son generalmente distintas y más restringidas que aquellas que controlan el crecimiento miceliano (Jenkins & Goettel, 1997). Por ejemplo, la calidad y concentración de los nutrientes que favorecen la esporulación son muy específicos (Taborsky, 1992).

El crecimiento del hongo es variable de acuerdo al medio de cultivo y a los nutrientes utilizados. En medios de cultivo agarizados, *B. bassiana* desarrolla colonias blancas y algodonosas en forma rampante que pueden presentar un pigmento amarillo-anaranjado en el reverso de las colonias maduras (figura III). En un medio de cultivo líquido desarrolla principalmente conglomerados hifales y blastosporos (Latgé & Moletta, 1988). En insectos, luego del proceso de infección y muerte, *B. bassiana* desarrolla hifas que emergen de sus huéspedes generando manojos hifales blancos, aéreos y pulverulentos. Estas estructuras cubren completamente a sus huéspedes, a manera de manto blanco; por lo que se denomina a la enfermedad muscardina blanca (figura IV).

En relación a la morfología de los conidios, generalmente estos son hialinos, no pigmentados, esféricos y miden entre 1 y 5 μm .

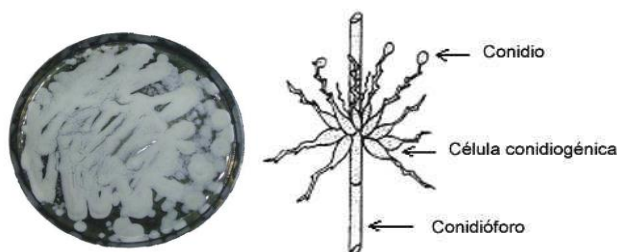


Figura III. *Beauveria bassiana* crecida en placa de Petri en medio de cultivo completo y esquema del conidióforo (modificado de Lecuona, 1996).



Figura IV. Ninfa de quinto estadio de *T. infestans*. Izquierda: ejemplar infectado con *B. bassiana*, derecha: ejemplar sano (Modificado de Crespo, 2006).

Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Beauveria*

Especie: *Beauveria bassiana*

Clasificación basada en Hodge (2003).

Capacidad insecticida

B.bassiana es un enemigo natural de varias especies de artrópodos (insectos y ácaros) tanto en sus estadios larvarios como en el adulto, presentando una lista extensa de hospederos. Debido su propiedad bioinsecticida y a su fácil disponibilidad y desarrollo, *B.bassiana* es utilizada como micoinsecticida en distintas partes del mundo. En 1835, el científico italiano Agostino Bassi de Lodi demostró que los hongos eran causantes de enfermedades en larvas de insectos y *B.bassiana* (denominación otorgada en honor a su descubridor), fue el primer microorganismo reconocido como agente patógeno contagioso en animales pero no en el hombre. Actualmente existen varias empresas comerciales que están desarrollando formulados insecticidas con estos microorganismos. Cabe destacar que *B.bassiana* no sólo presenta una considerable variación en su rango de hospederos, sino también exhibe variaciones en

cuanto a su virulencia y patogenicidad (Lecuona et al., 2001).

Se ha sugerido que la virulencia de los micoinsecticidas podría ser mejorada mediante la sobreexpresión de enzimas fúngicas involucradas en la degradación de la cutícula dado que es el primer sitio de contacto con el hongo (St. Legar, 1986a, 1989b). En los últimos años se han obtenido cepas recombinantes de hongos entomopatógenos con una alta estabilidad genética logrando reducir el tiempo letal medio y/o aumentar el porcentaje de mortalidad de sus insectos blanco (St. Leger et al., 1996b; Valadares & Inglis 1997; Inglis et al., 2000; Hu & St. Leger, 2002; Fang et al., 2005).

Por otro lado, se debe considerar que la virulencia está relacionada con la rapidez en la germinación y el crecimiento sobre la cutícula de sus insectos hospedadores (Altre et al., 1999). Los eventos tempranos en el proceso de germinación fúngica requieren de una fuente de carbono exógena (Smith & Grula, 1981; Roberts, 1989).

Estudios realizados por nuestro grupo de investigación, empleando hidrocarburos de larga cadena (análogos a los encontrados en cutícula de insecto) como única fuente de carbono, determinaron que el porcentaje de germinación de esporas de *B.bassiana* aumentó 4 veces respecto a los controles (Crespo, 2006), sugiriendo que los hidrocarburos pueden disparar el proceso germinativo además de servir como sustrato catabólico. Asimismo fue observado que la virulencia puede ser aumentada mediante el cultivo de los hongos en medios conteniendo estos sustratos como única fuente de carbono. En este laboratorio se demostró un aumento significativo en el porcentaje de mortalidad en insectos plagas de granos almacenados empleando hongos crecidos en estos medios (Crespo et al., 2002; Pedrini et al., 2011). Resultados similares fueron obtenidos empleando insectos vectores de la enfermedad del Chagas (Pedrini et al., 2009).

Insectos vectores de la enfermedad del Chagas

Aspectos generales de la enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana, es una infección parasitaria causada por el protozoo flagelado *Tripanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) y transmitida al hombre principalmente mediante las deyecciones de los insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae).

El ciclo de transmisión se inicia cuando estos insectos incorporan el parásito en su tracto digestivo al tomar sangre de un organismo infectado; luego al tomar sangre de un segundo huésped, eventualmente defecan sobre la piel y/o membranas mucosas del mismo, desde donde el parásito penetra al torrente sanguíneo iniciando la infección. Las transfusiones sanguíneas, la vía transplacentaria y la ingestión constituyen otras formas de transmisión de menor incidencia. En términos de salud pública e impacto económico, la Enfermedad de Chagas constituye la enfermedad desatendida con mayor impacto en morbilidad y mortalidad de Latinoamérica, con unos 9,8 millones de infectados en la actualidad, cerca de 100 millones en riesgo de infectarse y 15.000 muertes anuales (Schofield et al., 2006; Barbosa da Silva, 2007; WHO, 2007; OMS, 2009). En la actualidad, en ausencia de una vacuna efectiva, la prevención de la transmisión vectorial consiste principalmente en el rociado residual de las viviendas con insecticidas y el mejoramiento de las viviendas para evitar la proliferación de los insectos vectores (WHO, 2009).

Triatoma infestans

T. infestans (Subfamilia: Triatominae) (figura V) es el principal vector doméstico del parásito *T. cruzi* en Sudamérica. Su ciclo de vida incluye cinco estadios ninfales y adultos que tienen alas (figura V). Se caracteriza por su comportamiento gregario, sus hábitos nocturnos de alimentación y su alimentación exclusiva de sangre (Zeledón & Rabinovich, 1981; Canale & Carcavallo, 1985; Lazzari, 1992). En Argentina es conocida popularmente como “chinche gaucha” o *vinchuca*.

Entre sus rasgos biológicos se destacan su elevada capacidad de ayuno, la adaptación al ambiente domiciliario y a diferentes condiciones climáticas (Schofield, 1979); su relativamente baja tasa de crecimiento poblacional en relación a otros insectos vectores su gran eficiencia vectorial (Zeledón y Rabinovich, 1972, 1981; Schofield, 1979). Su alta capacidad de dispersión, juega un papel importante en la propagación local del insecto vector, ya que desde unos pocos focos residuales peridomésticos (corrales, gallineros) pueden volver a reinfectar una vivienda (Cecere et al., 2004). La presencia de *T. infestans* en las viviendas humanas se halla asociada principalmente a precarias condiciones de vivienda y determinados materiales y tipos de construcción (i.e., “ranchos”) (Schofield, 1979; Gürtler et al., 1993; Gürtler et al., 1994; Gürtler et al., 1998).

Lípidos cuticulares de triatominos: Composición química y su rol como feromona de contacto

En los insectos, la cutícula constituye la primera barrera de protección contra agentes externos (químicos, físicos o biológicos). Estructuralmente la cutícula está formada por varias capas, que de afuera hacia adentro son: la epicutícula, la procutícula y la epidermis (figura VI).



Figura V. Ciclo de vida de *T. infestans* (“vinchuca”).

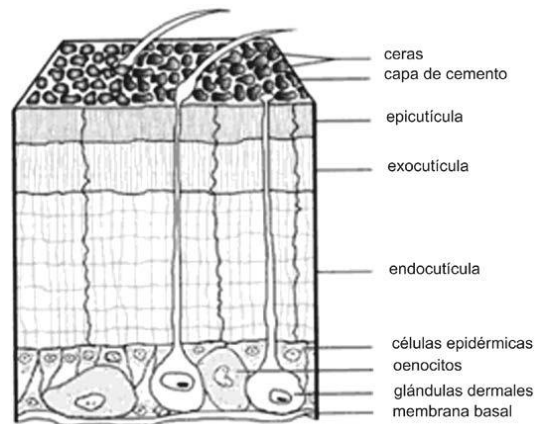


Figura VI. Diagrama de un corte transversal del integumento de insectos, donde se ilustran las capas principales de la cutícula (Tomado de Juárez & Calderón Fernández G, 2007).

La superficie cuticular está cubierta con una capa de lípidos que forman una mezcla compleja de hidrocarburos, ceras, ácidos grasos libres, alcoholes grasos y varios compuestos oxigenados, con cadenas carbonadas lineales y metil ramificadas de más de 70 átomos de carbono (Blomquist & Jackson, 1979; Lockey, 1998). Los lípidos cuticulares tienen un rol esencial en la fisiología y comportamiento de los insectos a lo largo de su ciclo de vida, previniendo la pérdida de agua por evaporación (Blomquist & Dillwith, 1985; Blomquist et al., 1987; Buckner, 1993), actuando como feromonas sexuales y de reconocimiento inter e intraespecífico (Steinmetz et al., 2002; Blomquist & Vogt, 2003; Jurenka, 2004) regulando la proliferación de microorganismos patógenos (Crespo et al., 2002; Pedrini et al., 2007; Szafranek et al., 2001; Gołębiowski et al., 2010) y la penetración de insecticidas (Juárez, 1996; Juárez et al., 2010).

Los aspectos bioquímicos de la cutícula de insectos, con especial énfasis en los lípidos cuticulares de triatomíneos ha sido muy estudiada en nuestro laboratorio. En estos insectos los lípidos cuticulares están formados de manera característica por cadenas hidrocarbonadas largas de entre 18 a más de 40 carbonos, entre los que se encuentran hidrocarburos, alcoholes grasos libre y esterificado, triglicéridos, ácidos grasos libres, diacilglicerol y menores cantidades de esteroides, ésteres de esteroides,

y monoacilgliceroles entre otros (figura VII)(Juárez et al., 1984; Juárez & Brenner, 1985; Juárez et al., 1992; Juárez,1996; Juárez, 1994; Juárez & Calderón Fernández G., 2007). Los hidrocarburos son componentes predominantes de la cutícula en todos los estadios, junto con los alcoholes grasos y diacilgliceroles en los adultos y los triacilgliceroles en las ninfas, seguidos por proporciones similares de ceras y ácidos grasos libres. La composición de estos lípidos varía cualitativamente entre las ninfas y los adultos y también en relación al sexo (Juárez & Blomquist, 1993; Juárez et al., 2001; Calderón-Fernández et al., 2011).

Por otro lado se comprobó que los triacilgliceroles, diacilgliceroles, y ácidos grasos libres de la cutícula de *T.infestans* muestran un patrón similar en su composición de ácidos grasos en adultos y ninfas, predominando no sólo ácidos grasos de larga cadena (palmítico, oleico, esteárico, palmitoleico, linoleico, y ácidos mirístico), sino también cantidades variables de ácidos grasos de cadenas muy largas como el ácido hexacosanoico (Juárez et al., 1985).

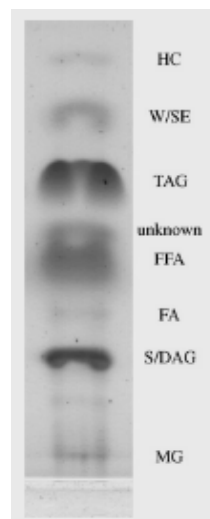


Figura VII. Perfil lipídico representativo mediante HPTCL del integumento de ninfas de *T. infestans* 5^o estadio: HC, Hidrocarburos; W/SE, ceras/esteroles esterificados; TAG, Triglicéridos; FFA, ácidos grasos libres; FA, alcoholes grasos; S/DAG, esteroles/diglicéridos; MG; monoglicéridos.(Calderón-Fernández et al., 2011

Lípidos cuticulares como feromona de contacto (agregación)

Las feromonas son compuestos químicos que median en la interacción entre organismos de una misma especie (Howse, 1998). Actúan como mensajeros químicos y son utilizadas por los organismos para modificar distintos comportamientos, como por ejemplo, la probabilidad de apareamiento, la búsqueda de alimento, agregación y alarma o defensa, entre otros. La composición química de las feromonas pueden consistir de una o varias sustancias, conformando una mezcla en el que los distintos constituyentes tienen un efecto modulador entre sí (Blomquist & Vogt, 2003).

Los lípidos cuticulares de *T.infestans* estarían involucrados en el reconocimiento intraespecífico. Estudios en este laboratorio identificaron al menos dos ácidos grasos, de la fracción de ácidos grasos libres, que podrían jugar un rol importante en las señales químicas de contacto, actuando como feromonas de agregación (que favorecen la concentración de insectos donde se hayan depositados) (Lorenzo et al., 2009). No obstante, estas moléculas utilizadas individualmente no reproducen el mismo efecto de atracción que el extracto total de lípidos cuticulares, sugiriendo la participación de otros lípidos (Lorenzo Figueiras et al., 2009). También fueron reportados dos alcoholes específicos en hembras que actuarían como feromona sexual de contacto, esenciales para la cópula (Cocchiararo B. et al., 2011).

Bases bioquímicas de la interacción entre los hongos entomopatógenos y

lípidos cuticulares de triatominos.

En este laboratorio se demostró que los lípidos cuticulares y en particular los hidrocarburos, pueden actuar como fuente de carbono primaria para el desarrollo de las primeras etapas de crecimiento y penetración de hongos entomopatógenos como *B.bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Napolitano & Juárez 1997; Crespo et al., 2000; Crespo et al., 2002; Crespo, 2006). Luego de incubar cepas de *B.bassiana* y *M. anisopliae* en presencia de n-hexadecano (Napolitano & Juárez, 1997) o n-octacosano

(como única fuente de carbono) (Crespo et al., 2000) marcados radiactivamente, se detectó la síntesis de una variedad de lípidos fúngicos, los cuales incluyen triacilglicéridos, ácidos grasos libres, lípidos polares e hidrocarburos; además de la liberación de cantidades importantes de CO₂ y ácido acético (figura VIII). Estos datos sugirieron que la actividad oxidativa estaría incrementada en estos cultivos adaptados a crecer en hidrocarburos. La primera oxidación de los hidrocarburos estaría catalizada por un sistema de citocromo P450 monooxigenasa de localización microsomal. El alcohol resultante atraviesa la membrana peroxisomal y luego de sucesivas transformaciones por la acción concertada de las enzimas alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa y acil CoA sintetasa y catalasas, se convierte en un ácido graso que inicia el proceso de β -oxidación (Tanaka & Ueda, 1993; Alconada & Juárez 2006; Pedrini et al., 2006). Eventualmente, el ácido graso es generado directamente en los microsomas y luego de atravesar la membrana peroxisomal sigue con la vía oxidativa antes mencionada (Scheller et al., 1998; Juárez et al., 2004).

Respecto al inicio de la vía degradativa, investigaciones llevadas a cabo por este laboratorio en colaboración con laboratorios extranjeros permitieron identificar 8 genes de citocromo P450 monooxigenasa (CYP), los cuales se inducen fuertemente en presencia de hidrocarburos de diferente longitud de cadena y de lípidos cuticulares de insectos (Pedrini et al., 2010).

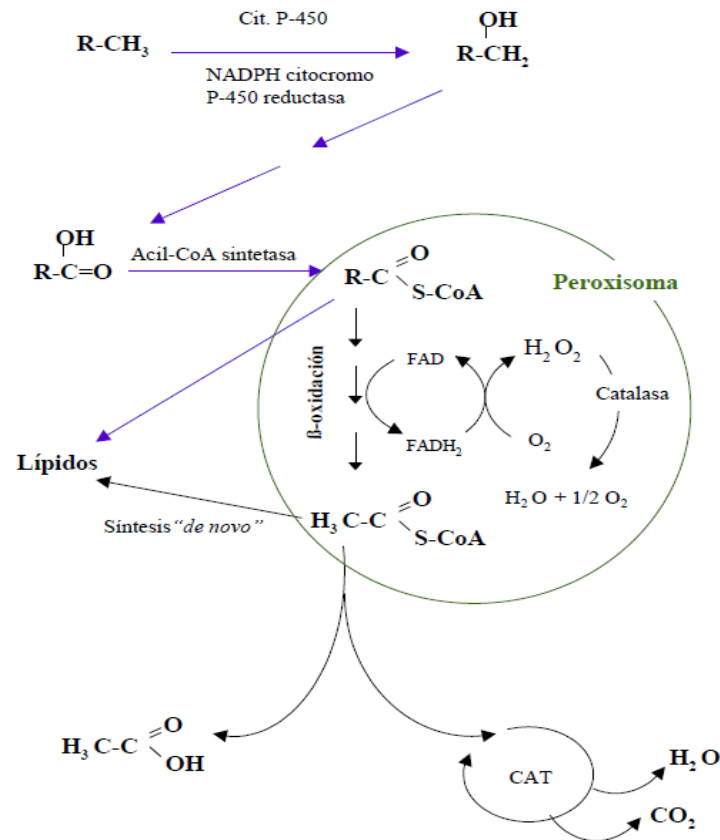


Figura VIII. Ruta metabólica propuesta para la degradación de hidrocarburos por *B. bassiana*. CAT: ciclo del ácido tricarboxílico. Esquema basado en Tanaka y Ueda, 1993.

Hongos entomopatógenos como herramientas potenciales para el manejo integrado de triatominos

En relación al manejo de insectos vectores de la enfermedad del Chagas, tanto la Organización Mundial de la Salud como la Organización Panamericana de la salud consideran prioritarios el mejoramiento de métodos existentes (control químico), así como la innovación de nuevos métodos basados en control biológico. En este sentido, se ha reconocido la creciente necesidad de implementar un manejo integrado de vectores (MIV), debido a que ello proporciona los medios para reducir la dependencia hacia los insecticidas químicos (OMS 2009).

Los hongos entomopatógenos presentan un gran potencial como biocontroladores de

insectos vectores de enfermedades. Tanto en la malaria como en otras enfermedades tropicales transmitidas por insectos vectores, se ha demostrado la eficacia del control vectorial con hongos entomopatógenos (Kaaya & Munyinyi, 1995; Kaaya & Hassan, 2000; Scholte et al., 2005; Kanzok & Jacobs-Lorena, 2006; Thomas & Read, 2007). Asimismo es importante mencionar que hasta el momento no hay reportes de resistencia de los insectos hacia estos microorganismos.

Respecto a los insectos triatominos, los estudios de susceptibilidad con los hongos entomopatógenos comenzaron en la década del 60 (Dias, 1967). Inicialmente los trabajos fueron realizados en la especie *Rhodnius prolixus*, y se basaron principalmente en la detección de cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* patógenas para estos triatominos (Silva & Messias, 1985; Romaña & Fargues, 1987; Luz et al., 1998; Luz et al., 2003). Por su parte en nuestro país, conociendo que *T. infestans* es el principal vector del Chagas, los estudios de susceptibilidad sobre esta especie sugieren que los hongos entomopatógenos podrían ser utilizados como herramienta para el manejo integrado de la misma (Lecuona et al., 2001; Lecuona et al., 2005; Pedrini et al., 2009).

En base a los conocimientos adquiridos durante más de 20 años de investigación, este laboratorio ha propuesto un cambio de paradigma en el control de *T. infestans*, empleando trampas de infección que combinan esporas del hongo *B. bassiana* con atractantes específicos (Juárez et al., 2008). Es importante mencionar que este método resultó efectivo tanto en el control de insectos susceptibles como resistentes a los insecticidas de la familia de los piretroides (Pedrini et al., 2009). La eficiencia de la trampa como la metodología de aplicación fue probada en ensayos de laboratorio, estaciones experimentales (Servicio Nacional de Chagas, Córdoba) y en viviendas habitadas en zonas con alto porcentaje de infestación de *T. infestans* resistentes a insecticidas (Provincia de Salta y Departamento de Tarija en Bolivia) (Pedrini et al., 2009). El Ministerio de Salud de la provincia de Salta participó activamente en los

ensayos a campo y actualmente utiliza esta metodología para el control de poblaciones de vinchuca resistentes a piretroides (comunicación personal).

Control químico de insectos vectores de la enfermedad del Chagas

Generalidades

Como consecuencia de las acciones de control vectorial mediante el uso de insecticidas químicos (piretroides y organofosforados en menor medida), el área de distribución de *T.infestans* se ha reducido desde un total estimado de 6,28 millones de km² a unos 0,93 millones de km² (Gorla, 2002; Schofield et al., 2006), y la transmisión vectorial de *T.cruzi* ha sido interrumpida en distintas áreas de Brasil, Chile, Uruguay, Argentina y Paraguay (Dias et al., 2002; Schofield et al., 2006). Sin embargo, en la región del Gran Chaco (Argentina, Bolivia y Paraguay) sólo se ha logrado un éxito limitado ya que *T.infestans* no ha podido ser eliminado aún y la transmisión doméstica persiste aunque a menores niveles en vastas áreas (Gürtler et al., 2005; Gürtler et al., 2007). Las posibles causas subyacentes incluyen la cobertura irregular y discontinua de las acciones de control; la frecuente ocurrencia de estructuras peridomésticas infestadas que albergan animales domésticos; la limitada efectividad de los insecticidas piretroides en las estructuras peridomésticas y la emergencia de resistencia a piretroides en el noroeste de Argentina y en Bolivia (Cecere et al., 2006; Gürtler et al., 2004; Picollo et al., 2005; Toloza et al., 2008).

Mecanismos de resistencia a insecticidas

La resistencia se define como la habilidad adquirida por una población para tolerar dosis de insecticidas que resultarían letales a los individuos en una población normal de la misma especie (Roush & McKenzie, 1987; Perry et al., 1998). Los mecanismos de resistencia pueden estar dados por: aumento de la actividad de enzimas detoxificantes (citocromo p450, esterases y glutatión S-transferasas), modificaciones

del sitio de acción del insecticida y una reducida penetración (Hemingway & Ranson, 2000; Hardstone et al., 2009; Delorme et al., 1988).

En *T.infestans*, el Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN), inició la detección de poblaciones resistentes al insecticida piretroide deltametrina de hace más de 10 años (Zerba E., 2004). Las diferencias observadas entre insectos resistentes y susceptibles, respecto a las actividades de las enzimas detoxificantes no son suficientes para justificar una participación de este mecanismo en el fenómeno de resistencia en *T.infestans* (Santo Orihuela et al., 2010). Por otro lado, respecto a modificaciones en el sitio de acción, se ha detectado la sustitución de aminoácidos en los canales de Sodio (sitio de acción de los insecticidas piretroides), sugiriendo la participación de este mecanismo en la resistencia (Fabro et al., 2012). En relación al mecanismo de resistencia debido a penetración reducida, investigaciones de este laboratorio demostraron que una disminución en la penetración del insecticida se correlaciona con un aumento en el espesor de la cutícula y un mayor contenido de hidrocarburos en insectos resistentes (figura IX) (Juárez M.P, 2010; Pedrini et al., 2009).

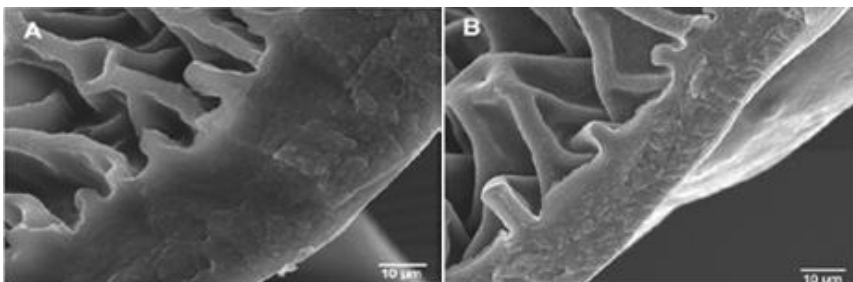


Figura IX. Corte transversal (SEM) de la cutícula de *T.infestans* resistente (A) y susceptible (B) a insecticidas piretroides (Pedrini et al., 2009).

Insecticidas piretroides: Deltametrina

Los insecticidas piretroides son ésteres de ácidos derivados del ciclopropano. Pertenecen a una familia de insecticidas sintéticos desarrollados a partir de la

estructura química de las piretrinas naturales, las cuales son extraídas del aquenio de la flor del piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium* (Compositae)) (Head, 1973). Son compuestos lipofílicos, con un alto punto de ebullición y baja presión de vapor (Ruigt, 1985). Los piretroides poseen gran actividad insecticida, no obstante, a diferencia de otros insecticidas sintéticos como los organoclorados, organofosforados y carbamatos, se caracterizan por presentar menor toxicidad hacia el hombre, animales y el medio ambiente en general.

Debido su estructura química los piretroides son degradados con facilidad por los diferentes organismos. Las principales reacciones de degradación son la hidrólisis del grupo éster, oxidación, descarboxilación y conjugación (Albert et al., 1990).

Se distinguen diferentes generaciones de piretroides según sus modificaciones químicas en el tiempo. La primera generación, la mayoría desarrollada principalmente en la década de 1960, incluye bioaletrina, tetrametrina, resmetrina y biorresmetrina. Son más activos que el piretro natural, pero son inestables a la luz solar. La segunda generación (finales de la década del 70) corresponden a la permetrina, cipermetrina y deltametrina. Son sustancialmente más resistentes a la degradación por la luz, lo que los hace adecuados para su uso en la agricultura. Su acción insecticida está fuertemente aumentada por la adición de un grupo ciano en el carbono del hidroxilo alcoholílico (presente solo en la deltametrina y cipermetrina).

La deltametrina ($C_{22}H_{19}Br_2NO_3$) (figura X) es un compuesto fotoestable que está clasificado como moderadamente tóxico por la OMS. Este piretroide es considerado un insecticida de amplio espectro, por lo que es utilizado en todo el mundo tanto en la agricultura como en el control de insectos vectores de enfermedades. Es efectivo principalmente como insecticida de contacto y no tanto por ingestión. Como muchos otros insecticidas, su principal mecanismo de acción consiste en la alteración de la permeabilidad de las membranas nerviosas a los átomos de sodio (Lund, 1985). Actúa a nivel de los canales de sodio dependientes de voltaje en los sistemas nerviosos

central y periférico. Se une a los canales manteniéndolos abiertos durante más tiempo, prolongando así el ingreso de iones tanto durante la polarización como la despolarización de la membrana. Como consecuencia, disminuye la velocidad de regreso al estado inactivo o de reposo, suprimiendo el potencial de acción e impidiendo el correcto funcionamiento de la célula (Lund, 1985).

La biodegradación es el principal modo de degradación de la deltametrina en el medio ambiente (Khan et al., 1988). Es conocido que en el catabolismo de deltametrina y en los insecticidas piretroides en general, los principales sistemas enzimáticos involucrados tanto en los insectos como en microorganismos incluyen la oxidación por citocromo P450s y epóxido hidrolasas (EH)(Kasai, 2004), e hidrólisis por acción de esterasas (Topp & Akhtar, 1991; Halden et al., 1999).

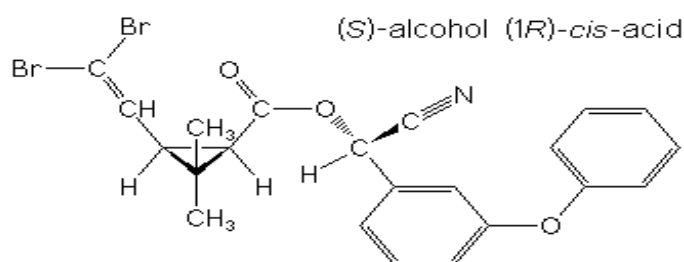


Figura X. Estructura molecular de la deltametrina. Se observa la presencia de un grupo ciano, característico de los piretroides de segunda generación.

Compatibilidad entre insecticidas químicos y hongos entomopatógenos

La combinación de hongos entomopatógenos con otros insecticidas químicos o biológicos es una práctica aconsejada para el manejo integrado de plagas (Ambethgar, 2009). Esta asociación podría minimizar el riesgo de contaminaciones ambientales, además de retrasar la expresión de resistencia a insecticidas en los insectos plagas y vectores (Bajan et al., 1995; Ambethgar, 2009).

Por otro lado, las aplicaciones combinadas de entomopatógenos y dosis subletales de insecticidas sintéticos también han sido propuestas como una estrategia para mejorar la eficacia del agente microbiano (Boucias et al., 1996; Quintela & McCoy, 1998). Las dosis subletales podrían actuar como a un factor de estrés adicional, alterando el

comportamiento de los insectos y aumentando la susceptibilidad de los mismos hacia los hongos entomopatógenos (Anderson & Roberts, 1989; Boucias et al., 1996; Inglis et al., 2001; Juárez, 1994a, 1994b; Juárez, 1996).

Con el objetivo de implementar nuevas herramientas de control integrado de plagas basadas en el uso de hongos entomopatógenos y su posible combinación con agentes insecticidas, los efectos adversos de estos últimos sobre los microorganismos deberían ser evaluados. Algunos de estos efectos, como la inhibición de la germinación, el crecimiento vegetativo y la conidiogénesis, deberían ser utilizados como parámetros en ensayos de compatibilidad entre insecticidas químicos y los micoinsecticidas (Alves et al., 1998; Alves et al., 2007; Schumacher & Poehling, 2012).

La compatibilidad entre los insecticidas y los hongos entomopatógenos ha demostrado ser variable dependiendo de las cepas y de las clases de insecticida utilizados. Los insecticidas organofosforados (inhibidores de acetilcolinesterasa) resultaron ser los de mayor efecto fungistático y fungicida (Rivera et al., 1994; Tamai et al., 2002). Asimismo, se demostró que a dosis recomendadas para el control de insectos triatomíneos, estos insecticidas retardan la germinación de los conidios y el crecimiento del micelio (Cazorla & Morales, 2010).

Los insecticidas piretroides han sido uno de los grupos más estudiados en los ensayos de compatibilidad. Los mismos pueden presentar acción fungicida (Duarte et al., 1992; De Oliveira & Neves, 2004) o fungistática (Clark et al., 1982; Pachamuthu & Kamble 2000). Por ejemplo, la cipermetrina, a dosis recomendadas a campo mostró un efecto fungistático sobre diferentes cepas de *B.bassiana* (Durán, 1998; Cazorla & Morales, 2010). Sin embargo, en *M.anisopliae* tanto la cipermetrina como la deltametrina resultaron ser compatibles en un amplio rango de dosis (Tavarez, 2002; Batista Filho et al., 2001; Schumacher & Poehling, 2012). Por su parte, la permetrina en un amplio rango de dosis evaluadas no afectó significativamente la germinación de las esporas en distintas cepas de *B.bassiana* y *M.anisopliae* (Anderson & Roberts, 1983;

Schumacher & Poehling, 2012). En *B.bassiana*, cepas virulentas para *T.infestans*, mostraron ser compatibles con deltametrina a dosis similares a las usadas para el control de estos insectos (Lecuona, 2001).

Como hemos mencionado la deltametrina es un insecticida muy utilizado en el manejo de los vectores de la enfermedad de Chagas (Zerba, 2004). Su compatibilidad, con los hongos entomopatógenos, podría ser una herramienta alternativa para el control integrado de las poblaciones triatominas (Alzogaray et al., 1998; Lecuona 2001). Sin embargo, aún no existen reportes sobre los efectos a niveles metabólicos tanto de este como de otros insecticidas en hongos entomopatógenos.

Metabolismo de xenobióticos

Generalidades

El metabolismo celular implicado en la desintoxicación de xenobióticos generalmente es llevado a cabo en la mayoría de los organismos mediante tres fases. En la fase I, las sustancias son activadas por oxidación, reducción o hidrólisis mediante la introducción de un grupo funcional. En esta etapa se generan compuestos más hidrofílicos (como quinonas y epóxidos), debido principalmente a enzimas P450 monooxigenasas (CYP), esterasas y epoxi hidrolasas (EH) (Guengerich, 2001; Peter Hlavica, 2013).

Las enzimas de fase I transforman los xenobióticos (incorporando grupos hidroxilos, aminos, carboxilos, epoxi, sulfhidrilos y halógenos) en sustratos de las enzimas encargadas de catalizar las reacciones de fase II, al mismo tiempo que los vuelven más hidrofílicos debido a la incorporación de un grupo polar reactivo; aunque la mayor solubilidad al tóxico es dada por las reacciones de fase II. Las reacciones de fase I pueden dar lugar a bioactivaciones, donde los metabolitos resultantes de la biotransformación del xenobiótico suelen, en algunos casos ser más tóxicos que la sustancia original. En la fase II, las enzimas como la glutatión S transferasas (GST) están implicadas en la conjugación de xenobióticos o de sus metabolitos con sustratos

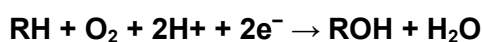
endógeno (Choi et al., 1998). En la fase III, los conjugados son eliminados desde el citosol por una bomba situada en la membrana plasmática de las células.

Las actividades de estas enzimas han sido caracterizadas en numerosos organismos expuestos a insecticidas. Asimismo, en insectos, se ha demostrado que cumplen un rol clave en los mecanismos de resistencia a insecticidas (Kasai, 2004). No existen reportes sobre la participación de estas enzimas en hongos entomopatógenos expuestos a insecticidas.

Enzimas de detoxificación de Fase I y II

Citocromo P450 monooxigenasas

Las citocromo P450 son hemo-tiolato proteínas que catalizan reacciones de monooxigenación estereo selectivas en un amplio rango de sustratos lipofílicos, originando derivados más hidrofílicos por la adición de un átomo de oxígeno a partir de oxígeno molecular. La reacción más común catalizada por el citocromo P450 es una reacción monooxigenasa, en donde un átomo del oxígeno molecular (O₂) es insertado en un sustrato orgánico (RH):



Las citocromo P450 constituyen un sistema microsomal de dos componentes formado por la NADPH citocromo P450 reductasa (flavoproteína que contiene FAD y FMN) y la hemoproteína P450 monooxigenasa. Debido su mecanismo de reacción las P450 pertenecen al grupo de enzimas llamadas oxidasas de función mixta, por oxidar simultáneamente dos sustratos diferentes. Como se observa en la figura XI estas reacciones conllevan a la formación de especies reactiva de oxígeno (EROS).

Colectivamente estas enzimas están involucradas en el metabolismo de compuestos alifáticos, cíclicos y aromáticos; catalizando reacciones de hidroxilación, epoxidación, dealquilación, N-hidroxilación, sulfoxidación, desulfuración, dehalogenación reductiva y reducción de compuestos nitrogenados (Guengerich, 2001). De acuerdo al sistema

especial de nomenclatura para las P450, el prefijo *CYP* es seguido por un número para cada familia, y luego por una letra para indicar la subfamilia (Ej: *CYP1A1*) (<http://drnelson.utmem.edu/homepage.html>).

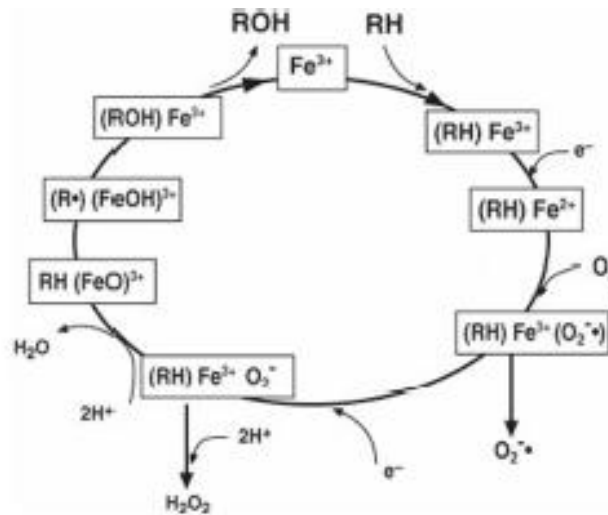


Figura XI. Mecanismo de reacción de la citocromo P450. Este esquema es una simplificación del mecanismo de reacción propuesto por Coon et al. (1992). En él, el Fe^{3+} representa al hierro del grupo hemo oxidado, RH y ROH a los sustratos y productos respectivamente. En este ciclo de óxido-reducción se produce la liberación de radicales libres anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Los hongos son una fuente importante de citocromos P450, probablemente debido a la diversidad del metabolismo primario como secundario, la transformación de xenobióticos y sus diferentes vías de desintoxicación (Peter Hlavica, 2013). Asimismo, estas enzimas juegan un rol predominante en la patogénesis y resistencia a compuestos antifúngicos producidas por los huésped (Peter Hlavica, 2013).

En *B.bassiana*, investigaciones previas en este laboratorio, han identificado hasta el momento 23 genes codificantes para citocromo P450 monooxigenasas (Pedrini et al., 2013). De estos genes, se han caracterizado ocho codificantes para P450alk involucradas en la degradación de hidrocarburos de insecto, correspondientes a 7 familias diferentes (Pedrini et al., 2010).

Epoxi hidrolasas (EH)

Las enzimas epóxido hidrolasas (EH; EC3.3.2.3) representan una ruta relativamente sencilla y eficiente hacia la síntesis de epóxidos y dioles, los cuales, suelen ser utilizados para las moléculas intermediarias que conllevan a la formación de metabolitos secundarios. Las EH son enzimas que catalizan la hidrólisis del epóxido, generalmente producto de una P450, para formar un diol vecinal. Estas dos enzimas (P450 y EH) no sólo actuarían concertadamente durante la degradación de los xenobióticos aromáticos, sino, que además la EH es activada a través de una interacción física entre ambas enzimas en la membrana microsomal (Taura et al., 2002).

En *B.bassiana* estudios previos en este laboratorio determinaron que la actividad de un gen homólogo a EH resultó incrementada en cultivos expuestos a hidrocarburos de diferente longitud de cadena y de lípidos cuticulares de insecto (Pedrini, 2006).

Glutación-S-transferasa (GST)

Las GST, EC 2.5.1.18, son enzimas diméricas de desintoxicación de fase II que presentan la capacidad de conjugar una amplia gama de xenobióticos potencialmente dañinos con el glutatión (GSH). Las GSTs también se ha demostrado que exhiben actividad peroxidasa GSH-dependiente y por lo tanto pueden estar implicados en la resistencia al estrés oxidativo. Además, se sugiere su participación en la resistencia a los pesticidas tanto en plantas como en insectos (Sheehan et al., 2001; Vontas et al., 2001; Kostaropoulos et al., 2001).

Investigaciones reportadas en hongos indican que las GSTs pueden exhibir diferentes patrones de expresión, mostrando una expresión inducible en presencia de distintos xenobióticos. Por ejemplo, en *Aspergillus fumigatus*, 3 genes que sintetizan para GST, fueron inducidos en presencia de H₂O₂ o 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (Burns et al., 2005). En *Schizosaccharomyces pombe*, una levadura modelo usado en

estudios moleculares, fue demostrado que distintas isoformas de GST se inducen en presencia de sustancias antifúngicas (Cho et al., 2002).

Generación de especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo

Generalidades

Una especie reactiva del oxígeno (EROS) es una molécula que contiene uno o más electrones desapareados en un orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Esto lo hace muy reactivo, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, con distintas moléculas estructurales de las células (Lushchak, 2011; Morano et al., 2012).

La generación de EROS es un proceso inevitable de la vida en condiciones aerobias. Las EROS se producen de forma continua como productos secundarios de ciertas vías metabólicas y también por algunos sistemas específicos bajo el control celular. Al mismo tiempo, las EROS son degradados a través de varios mecanismos específicos e inespecíficos. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, el equilibrio entre la producción y la eliminación de EROS es perturbado, conduciendo a un estado fisiológico dominado "estrés oxidativo". La supervivencia de las células al estrés va a depender de su estado fisiológico, la intensidad y la naturaleza de estrés oxidativo. El estrés oxidativo puede dañar una amplia variedad de componentes celulares, dando lugar a la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas, y daño genético a través de alteraciones del ADN (Lushchak, 2011; Morano et al., 2012).

La mayor proporción de EROS (generalmente más del 90 %) en los organismos vivos es generado por las cadenas mitocondriales de transporte de electrones (Lushchak V, 2011). Además, pequeñas cantidades de EROS son producidos por algunas enzimas tales como oxidasas, a través de la autooxidación de diferentes moléculas (Coon et al., 1992).

En la figura XII se muestra el metabolismo de los EROS. La mayor parte del oxígeno

consumido por los organismos vivos, se utiliza para producir energía por fosforilación oxidativa en la cadena de transporte de electrones a través de la incorporación de cuatro electrones, que lleva a la producción de ATP y de agua. La adición consecutiva de un electrón a una molécula de oxígeno también, finalmente, conduce a la producción de agua (no se obtiene ATP), pero conlleva la formación de EROS. Estas últimas, incluyen los radicales libres tales como el anión superóxido (O_2^-) y (OH), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singlete (Lushchak, 2011).

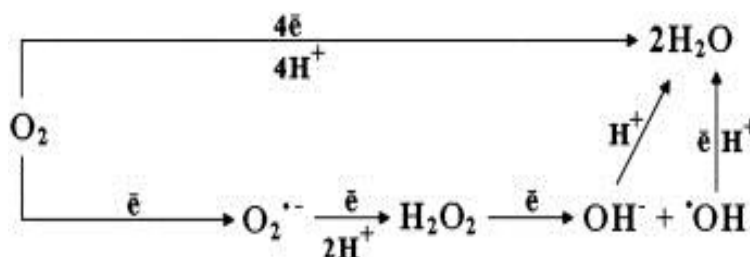


Figura XII. Diferentes formas de reducción de oxígeno en los sistemas biológicos. La parte superior del esquema muestra la reducción de la molécula de oxígeno en la cadena de transporte de electrones mediante la incorporación de cuatro electrones. La parte inferior muestra la adición consecutiva de un electrón a una molécula de oxígeno con la formación EROS. En ambos casos se alcanza el máximo estado reducido de oxígeno en la molécula de agua (Lushchak, 2011).

El metabolismo de xenobióticos, mediante las reacciones oxidativas de detoxificación implicadas en la Fase I, puede incrementar la producción de (EROS) e inducir a un estado de estrés oxidativo en la mayoría de los organismos alterando las defensas antioxidantes (Banerjee et al., 1999).

Antioxidantes y sus funciones biológicas

La regulación de la generación de EROS y de la actividad de los sistemas de defensa antioxidante se determina por el estado redox de la célula, el cual depende de factores intracelulares, así como extracelular (Lushchak, 2011). Un número importante de enzimas con diferentes funciones celulares que contienen grupos tioles activos, podrían estar involucradas en la detección de EROS (Busi et al., 2006; Bouton, 1999;

Hancock et al., 2006; Morano et al., 2012)

Por otra parte, han sido reportados factores de transcripción que interaccionan directamente con elementos reguladores de transcripción (presentes en el ADN) controlando, la expresión de los genes involucrados en la respuesta al estrés (figura XIII). Yap1, Skn7, Msn2, y Msn4 son los factores de transcripción más importantes que regulan la respuesta al estrés. El factor Yap1, regula la expresión de genes de enzimas y compuestos antioxidantes reduciendo los tioles celulares. Skn7, induce una adicional expresión a Yap1, y de al menos 15 proteínas en respuesta a H₂O₂. Por su parte, los factores Msn2 y Msn4, activan la expresión de los genes que contienen la secuencia STRE en su promotor como respuesta a diversos factores de estrés (Lushchak, 2001; Morano et al., 2012). En hongos entomopatógenos se demostró que Msn2 es vital para la regulación transcripcional de numerosos genes efectores y factores de señalización involucrados en la conidiación, virulencia y la respuesta multiestres (Qian Liu et al., 2013).

Por último debemos mencionar que el estrés oxidativo puede ser simulado experimentalmente mediante la adición y o el manejo de agentes de generación de EROS, lo cual constituye una herramienta útil para la investigación in Vitro respecto a los mecanismos de defensa antioxidantes de varios microorganismos (Marcus Vinícius de Oliveira et al., 2013).

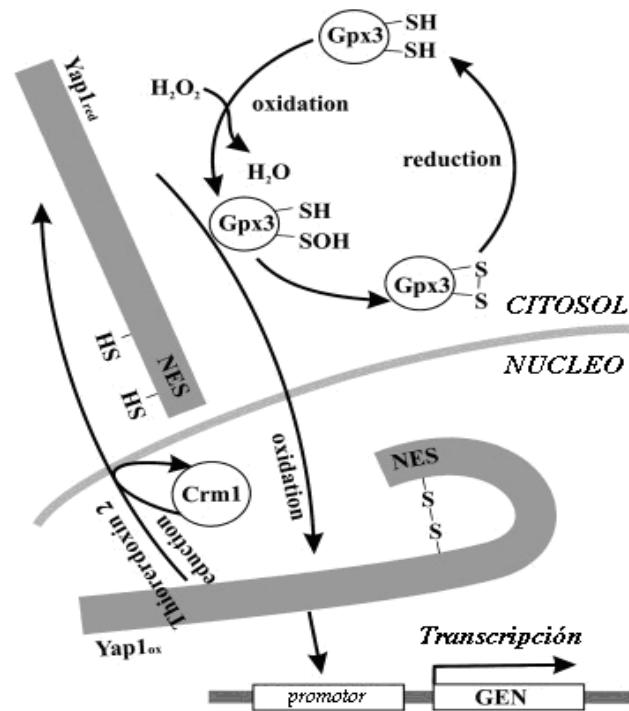
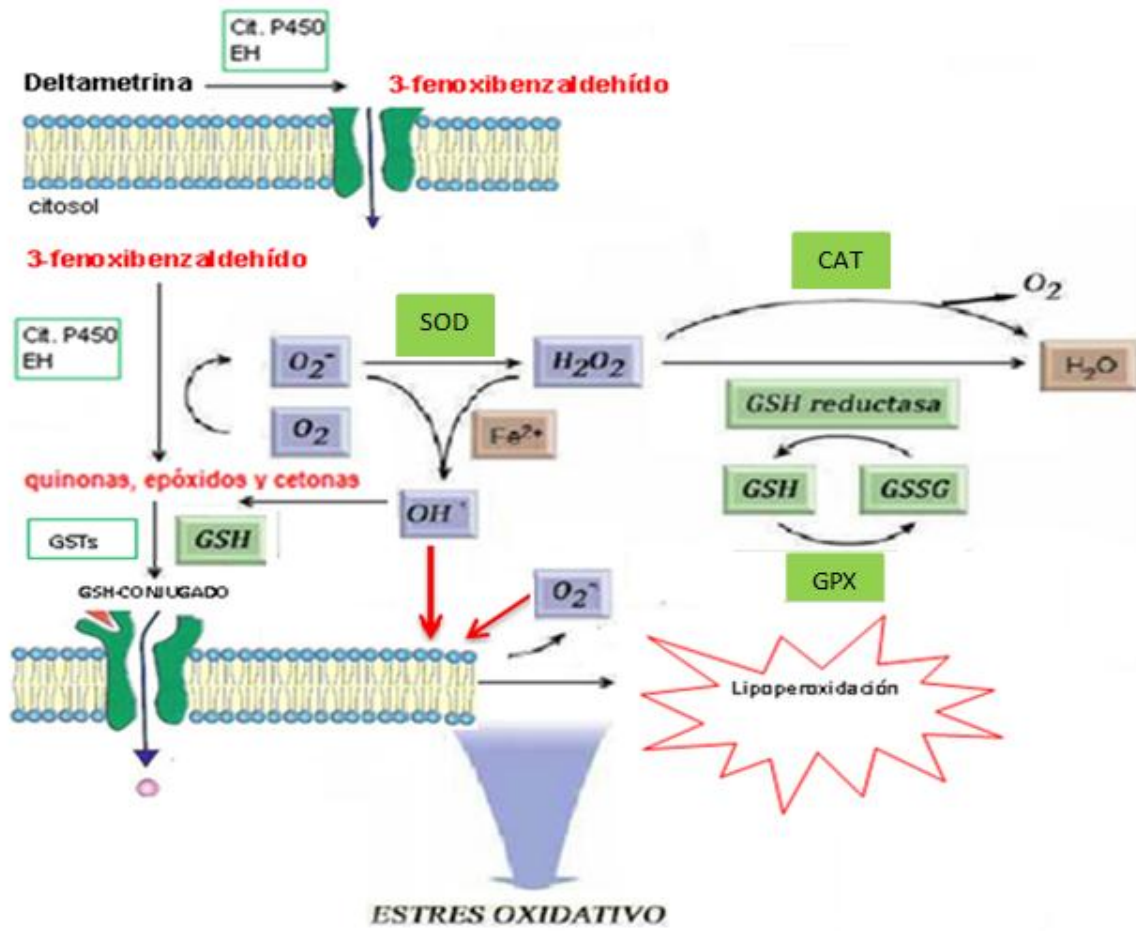


Figura XIII. Mecanismos de regulación implicados en la respuesta adaptativa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno. La oxidación de los grupos tioles de GPX3 (glutación peroxidasa) por peróxido de hidrogeno inicia la cascada de respuestas adaptativas en célula de levadura resultando en aumento del potencial antioxidante. Bajo condiciones normales, Yap1 se concentra en mayor proporción en el citoplasma, debido a la exportación activa desde el núcleo por la proteína Crm1. Cuando GPX3 oxida Yap1, conduce a su acumulación a su el núcleo debido al bloqueo de la secuencia de exportación nuclear (NES) en Yap1p. En el núcleo Yap1p es capaz de unirse a promotores de genes diana activando su expresión (Lushchak VI., 2011).

Mecanismos de defensa intracelular contra EROS: Sistemas enzimáticos antioxidantes

Los organismos pueden adaptarse a los incrementos de EROS aumentando la producción de enzimas antioxidantes (figura XIV). Estas enzimas se caracterizan principalmente por presentar una alta especificidad hacia EROS y diferentes compartimentación intracelular (Belozerskaya & Gessler, 2007; Lushchak VI., 2011; Morano et al., 2012).



Principales sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo de xenobioticos y la defensa antioxidante en las células; Cit p450(citocromo p450), EH(epoxihidrolasas), GST(glutation-S-Tranferasas),SOD (superóxido dismutasa), GSH(glutación peroxidasa o reductasa), CAT(catalasa) (Morano et al., 2012).

Las principales enzimas involucradas en la defensa contra EROS se indican a continuación:

Superóxido dismutasa (SOD)

Las SODs, EC 1.15.1.1 constituyen la primera línea en el sistema de defensa celular contra el daño por superóxido (Halliwell & Gutteridge, 1991). Se han descrito 2 a 3 isoformas, pero todas tienen un mecanismo en común: la dismutación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno, el cual puede ser reducido a agua por catalasas o peroxidasas (figura XIV). Su actividad está regulada por los niveles de H₂O₂ y, por lo tanto, presenta mecanismos de retroalimentación con las enzimas encargadas de

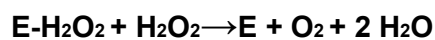
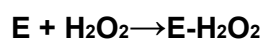
transformar el H₂O₂ en agua. Los hongos tienen dos isomorfos de SOD que difieren respecto a su cofactor y la ubicación intracelular: la cobre / cinc (Cu, Zn-SOD) que se encuentra en el citosol y en pequeñas cantidades en el espacio intermembranal de las mitocondrias y la SOD manganeso (SOD Mn), que es considerada una de las más importantes enzimas antioxidantes de la célula, y se encuentra en las mitocondrias (Natvig et al., 1996). Ha sido demostrado que la sobreexpresión de ambas enzimas es una respuesta primaria de los hongos a estrés oxidativo, particularmente inducida por la anión superóxido (Marcus Vinícius de Oliveira et al., 2013).

Tres isoformas de SOD fueron identificadas en *B.bassiana* incluyendo: una Cu / ZnSOD (BbSod1) y dos MnSOD (Sod2 no reportada en las mitocondrias y Sod3) (Xie X-Q et al., 2012).

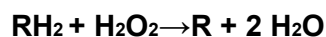
Catalasas (CAT)

Las CAT, EC 1.11.1.6 son enzimas que catalizan la degradación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) generado junto a otras especies reactivas de oxígeno, como consecuencia del metabolismo celular aeróbico.

El H₂O₂ puede actuar como sustrato y dador de hidrógeno simultáneamente (función catalasa) produciendo H₂O y O₂:



O bien, ser utilizado para oxidar diversos compuestos (alcoholes, aldehídos) mediante una reacción de peroxidación (función peroxidasa):



En hongos filamentosos, las catalasas son homotetrámeros y presentan diferentes estructuras, función y localización celular (Natvig et al., 1996). La familia de la catalasa de *B.bassiana* se compone de cinco catalasas: CATA (espora - específico), CATB

(secretada), *CATP* (peroxisomal), *CATC* (citoplásmica) y *CATD* (secretada peroxidasa /catalasa), las cuales se diferencian en su estructuras, funcionalidad y filogenia (Wang et al., 2013).

En relación con su funcionalidad se ha reportado en diferentes especies de *Aspergillus* que una catalasa extracelular protege a las células del H₂O₂ exógeno (Witteveen et al., 1992). Asimismo, una expresión diferencial de esta enzimas se observó en *Cladosporium fulvum* bajo condiciones de estrés nutricional (Bussink y Oliver, 2001) y en *Neurospora crassa* durante procesos de diferenciación celular y en respuesta al estrés oxidativo (Díaz et al., 2001; Wang et al., 2013). En los hongos entomopatógenos ha sido demostrado un aumento de la actividad catalasa durante la germinación y el crecimiento (Wang et al., 2013).

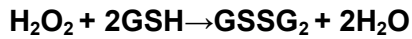
En estudios previos en este laboratorio, se demostró la presencia de dos isoformas de catalasa en *B.bassiana*, una de las cuales (de localización peroxisomal) está inducida en cepas adaptados a crecer en hidrocarburos de larga cadena (análogos a los de cutícula de insectos) (Pedrini et al., 2006).

Glutación peroxidasa (GPx)

Aunque la regulación de la actividad SOD y CAT, son muy importantes para prevenir los daños celulares causado por el anión superóxido y el peróxido, no aseguran una protección celular completa contra los efectos nocivos del estrés oxidativo. Para una protección eficaz de los componentes celulares, también se deberían desencadenar mecanismos encargados de reducir el peróxido a agua, evitando o disminuyendo la formación de radical hidroxilo. Se ha manifestado que la regulación en la expresión de la enzima glutación peroxidasa (GPX) junto con la catalasa forman un sistema de prevención vital contra el peróxido de hidrogeno en la mayoría de las células. Así, la expresión de GPX constituye un mecanismo esencial para completar el proceso de desintoxicación del superóxido (Michiels et al., 1994).

La GPx reduce peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos, tales como

hidroperóxidos de ácidos grasos, utilizando la energía de la reducción proporcionada por el glutatión (GSH) (Michiels et al., 1994). La función principal de esta enzima es reducir el H₂O₂ a agua oxidando a una molécula de glutatión (GSH) como se presenta en la siguiente ecuación:



La reducción del glutatión oxidado (GSSG) es catalizado por la glutatión reductasa, como se muestra en la siguiente ecuación:



Peroxidación lipídica por estrés oxidativo

Todas las membranas celulares de los organismos son especialmente vulnerables a la oxidación por EROS debido a su alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) (Esterbauer, 1996). La peroxidación lipídica (lipoperoxidación) (LPO) es uno de los principales mecanismos de lesión de las células en los organismos aerobios sometidos a estrés oxidativo (Gutiérrez et al., 2002; Marmunti & Catalá, 1998). De la peroxidación lipídica resultan dos consecuencias importantes: daños estructurales en las membranas y la generación de productos secundarios altamente tóxicos. Los principales productos secundarios incluyen el malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HHE). Estos procesos se combinan para producir cambios en las propiedades biofísicas de las membranas que pueden tener efectos sobre la actividad de las proteínas unidas a la membrana, como la inactivación de enzimas, además de efectos letales sobre la división celular (Aruoma, 1994; Bonorden & Pariza, 1994; Halliwell & Gutteridge, 1990). El proceso general de la peroxidación de lípidos se compone de tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Catalá, 2006).

El mecanismo de la lipoperoxidación se ilustra en la figura XV. Se inicia con la

remoción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado, lo que da por resultado la formación del radical lipídico. Este puede reaccionar con el oxígeno molecular y producir un radical peroxil lipídico, el cual, puede remover un átomo de hidrógeno de un lípido adyacente para formar un peróxido y un segundo radical lipídico. El peróxido conduce generalmente a la formación de MDA y 4-HHE como productos de su degradación (Catalá, 2006). La cuantificación del malondialdehído (MDA), es uno de los principales indicadores de la lipoperoxidación. Una de las técnicas comúnmente utilizadas para cuantificar este metabolito es el ensayo de TBARS, en el cual dos moléculas de ácido tiobarbitúrico reaccionan con una molécula de MDA a pH bajo y elevadas temperaturas, lo que resulta en un cromógeno rosa que se puede cuantificar (Esterbauer, 1996).

Por último, debemos mencionar que el grado de peroxidación lipídica es uno de los parámetros más utilizados para cuantificar el daño inducido por radicales libres a nivel celular (Esterbauer, 1996; Pamplona et al 2002; Catalá, 2006).

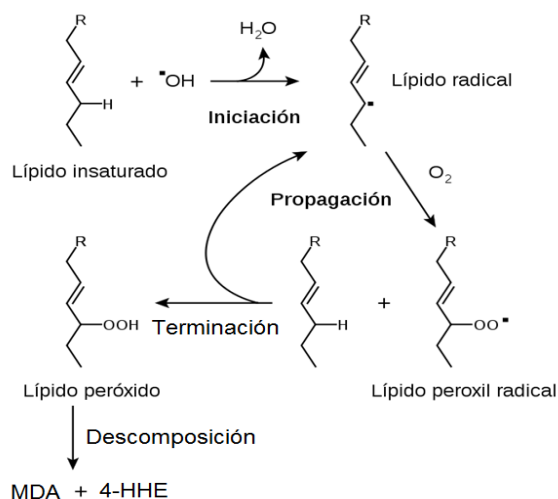


Figura XV. Etapas de la peroxidación lipídica. Malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonal (4-HHE).

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

En esta tesis se propone avanzar en el conocimiento de la interacción entre el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y el insecto *Triatoma infestans* (principal vector de la Enfermedad de Chagas en nuestro país). Asimismo, se estudiarán aspectos de la respuesta bioquímica y molecular del hongo en presencia de un insecticida químico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Interacción *B. bassiana*-*T. infestans*

El hongo entomopatógeno *B. bassiana* presenta un gran potencial como herramienta para el control biológico de *T. infestans*. El estudio de diferentes parámetros que analicen la interacción entre ellos podría contribuir con ese fin. En el marco de estas premisas se proponen los siguientes objetivos:

1.a) Evaluar la virulencia de una cepa comercial de *B. bassiana* frente a los distintos estadios de *T. infestans* así como su efecto en la capacidad reproductiva.

1.b) Evaluar la virulencia del hongo luego de ser expuesto a condiciones ambientales no controladas de temperatura y humedad.

1.c) Analizar la capacidad de transmisión horizontal de esporas entre insectos y cuantificar la infección fungica de una población en función de la densidad de insectos.

1.d) Evaluar la eficacia de una trampa de infección, conteniendo esporas del hongo entomopatógeno y feromonas cuticulares de *T. infestans*, en ensayos a campo.

1.e) Analizar la dinámica poblacional de *T. infestans* en presencia de *B. bassiana* mediante el desarrollo de un modelo matemático matricial.

2) Interacción *B.bassiana*-deltametrina

Las citocromo P450 (*CYP*) y epoxi hidrolasas (*EH*) constituyen importantes grupos de enzimas implicadas en las vías metabólicas degradativas. Tanto la sobreexpresión de los genes que codifican para estas enzimas, como la actividad de las mismas, han sido demostradas en diversos organismos expuestos a insecticidas. Este mecanismo podría ocurrir también en hongos entomopatógenos, junto con un incremento en los niveles de estrés oxidativo. Se propone analizar los efectos de la deltametrina en *B. bassiana*, mediante los siguientes objetivos:

2.a) Determinar la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de deltametrina.

2.b) Evaluar la cinética de las siguientes enzimas involucradas en la respuesta antioxidante: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GPX).

2.c) Cuantificar los niveles de lipoperoxidación lipídica.

2.d) Cuantificar la expresión de genes codificantes para citocromo P450 (*cyp*) y epóxido hidrolasa (*eh*); potencialmente involucradas en la degradación de insecticidas piretroides.

2.e) Cuantificar la expresión de los genes que codifican para enzimas involucradas en la respuesta antioxidante: *cat*, *sod*, *gst* y *gpx*.

MATERIALES Y MÉTODOS

A) Interacción *B.bassiana*-*T.infestans*

Cepa fúngica y formulación

Se utilizó un formulado en polvo (micoinsecticida) el cual presentaba esporas de una cepa comercial (GHA) (Laverlam International, USA) de *B.bassiana*, combinandas con tierra de diatomeas (Perma-Guard Inc., Albuquerque, USA) en una relación 2:1 (3 x 10¹⁰ conidios/gramo) (Pedrini et al., 2009). Para el cálculo de la dosis letal 50, el formulado fue disuelto en agua destilada conteniendo Tween 80(polisorbato de sodio) (0.01%).

Insectos: procedencia y mantenimiento

Se emplearon ejemplares de *T.infestans* (Hemiptera, Reduviidae), criados en insectario del INIBIOLP, Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). Los insectos fueron mantenidos a 28 °C, 60% de humedad relativa, con un ciclo de 12hs oscuridad-12hs luz y alimentados con sangre de gallina. En todos los ensayos, para asegurar la homogeneidad fisiológica, los insectos fueron alimentados con gallinas en periodos de 45 minutos. La medición del peso (para asegurarse la misma ingesta de alimento) se realizó antes y después de la alimentación utilizando una balanza analítica. Posteriormente fueron sometidos a un mismo tiempo de ayuno (cinco a seis días).

Cuantificación de parámetros de virulencia

a)Porcentaje de Mortalidad y Tiempo Letal Medio (TLM)

Placas de Petri conteniendo el micoinsecticida (3 x 10¹⁰ conidios/gramo) fueron utilizadas para infectar a los insectos. Entre cuatro y siete lotes, con cinco a diez insectos cada uno, fueron liberados dentro de placas durante 5 minutos. Todos los estadios(incluyendo huevos) de *T.infestans* se contaminaron por separado. Posteriormente, los insectos fueron colocados en recipientes de plástico de 250 ml cubiertos con una tela de muselina, y se mantuvieron en ayuno durante 3 semanas a 26°C y 60% humedad relativa. Insectos y huevos mantenidos en las mismas condiciones, pero sin ser expuestos al micoinsecticida, fueron utilizaron como

controles. En todos los casos la mortalidad se determinó diariamente durante las 3 semanas, a fin de calcular el porcentaje de mortalidad acumulado y el TLM. El valor de TLM se estimó mediante la siguiente ecuación: $TLM = \frac{\sum [Días^n \times insecto\ infectado^n]}{\text{Total de insectos infectados}}$. Para confirmar la muerte por infección fúngica, los insectos muertos fueron lavados con etanol/agua con el objetivo de eliminar cualquier residuo de esporas sin germinar de la superficie. Posteriormente, los cadáveres se mantuvieron bajo una atmósfera con alta humedad (generada por un algodón húmedo) dentro de placas de Petri selladas. Después de 4 días, los cadáveres fueron observados bajo lupa, la presencia de micelio blanco confirmó la muerte por la infección fúngica.

b) Determinación de la Dosis letal 50 (DL₅₀)

Debido a la disponibilidad de insectos, la DL₅₀ (indica la dosis necesaria para matar al 50% de los insectos expuestos al micoinsecticida) fue estimada solo en ninfas de cuarto estadio. El porcentaje de mortalidad se determinó mediante el método de inmersión. Para ello los insectos fueron sumergidos en suspensiones seriadas de conidio contenidas en vasos precipitados durante 6 segundos. Las suspensiones se prepararon con el micoinsecticida, agua destilada y 0.01% de tween. Fueron evaluadas las siguientes concentraciones (conidios/ml); 10¹, 10³, 10⁵, 10⁶, 10⁷ y 10⁹. Una vez inoculados, los insectos se mantuvieron en papel filtro durante 6 segundos para escurrir el exceso de líquido. Se establecieron entre 4 y 6 lotes (replicas) de diez individuos cada uno. La concentración de conidios capaz de matar al 50% y 95% (CL₅₀ y CL₉₅) de los insectos fue calculada por análisis del método probit (Finney & Stevens, 1948). La mortalidad por infección fúngica se determinó como mencionamos en el inciso a.

c) Cuantificación de parámetros reproductivos

Para este ensayo se separaron parejas (machos/hembras) en frascos individuales y se comprobó la cópula mediante un protocolo previamente establecido (Cocchiararo et

al., 2011). Inmediatamente después de la cópula un grupo de hembras fueron seleccionadas al azar y se expusieron al micoinsecticida (3×10^{10} conidios/gramo) como se explicó en el inciso a. Las hembras copuladas (tanto controles como contaminadas) se mantuvieron en frascos individuales a 26°C y 60% de humedad relativa. Se cuantificaron los siguientes parámetros reproductivos: Porcentaje de hembras ovipositoras, número de huevos por hembras y porcentaje de fertilidad de los huevos.

Todos los parámetros fueron medidos diariamente hasta la muerte, en los insectos contaminados, y durante ocho semanas en el grupo control. Los huevos fueron separados para cuantificar su eclosión.

Transmisión horizontal de esporas entre los insectos (autodiseminación)

Capacidad de diseminación de esporas de un insecto a diferentes periodos de tiempos

Para estimar durante cuánto tiempo un insecto podría contaminar a otro insecto libre de esporas, ninfas de tercer estadio fueron expuestas al micoinsecticida como se explicó anteriormente y mantenidas a 26°C y 60% de humedad relativa durante 7 días. Inmediatamente después de ser expuesto al micoinsecticida, el insecto fue introducido en una vial de 20ml junto con otro insecto libre de esporas (también de tercer estadio). Ambos insectos se mantuvieron en el vial durante 5 minutos. A los días 2, 4 y 7 se repitieron los experimentos con nuevos insectos (expuestos al micoinsecticidas y libres de esporas). Para cada uno de los días, entre 4 y 8 insectos expuestos al micoinsecticida fueron seleccionados para contactar con insectos libres de esporas. El período de tiempo se prolongó hasta el día 7, ya que, la mayoría de los insectos expuestos al micoinsecticida se espera que mueran pasado ese periodo. Los insectos infectados por contacto se mantuvieron en ayuno durante 3 semanas a 26°C y 60% de humedad relativa. La mortalidad de estos insectos se evaluó durante 3

semanas a fin de determinar el porcentaje de mortalidad y el TLM. La infección fúngica se determinó por cámara humedad como mencionamos en el inciso a.

Efecto de la densidad de insectos en la autodiseminación

El efecto de la densidad de insectos en la autodiseminación de esporas fue determinado en unidades experimentales construidas en un cuartos no climatizados (figura XVI) con diferente número de insectos. Tres unidades experimentales de 1m^3 diseñados con ladrillos de adobe fueron utilizadas para los ensayos. Ninfas de cuarto estadio fueron liberadas en el interior de las mismas. Luego de 20 minutos, 10 ninfas de cuarto estadio, previamente expuestas al micoinsecticida (como describimos anteriormente) fueron liberadas dentro de las unidades experimentales. El número de insectos por unidad experimental fue de 35 (25 libres de esporas mas 10 previamente expuestas al micoinsecticida), 70 (60 libres de esporas mas 10 previamente expuestas al micoinsecticida) y 140 (130 libres de esporas mas 10 previamente expuestas al micoinsecticida).

Los insectos se mantuvieron sin alimentar en las unidades experimentales durante 30 días y en condiciones no controladas de humedad y temperatura. Posteriormente, las unidades experimentales fueron desarmadas y se recolectaron la totalidad de los insectos vivos y muertos. Los insectos recolectados vivos se dispusieron de manera individual en viales de 20 ml y su mortalidad fue cuantificada semanalmente durante 1 mes. El porcentaje de mortalidad por infección fúngica fue calculado como $N \times 100 / N_t$, donde: N representa el número de insectos muertos por autodiseminación y N_t el total de insectos en cada unidad experimental. Un total de 3 réplicas fueron ejecutadas para cada una de las densidades evaluadas. Las réplicas se realizaron en enero, febrero y marzo de 2011, con temperaturas medias de $24\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ y $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, respectivamente (los datos fueron provistos por el Departamento de Sismología e Información Meteorológica, Facultad de Ciencias Astronómicas y Geofísicas, Universidad Nacional de La Plata). Los valores de humedad relativa media

correspondiente (mínimo-máximo) fueron de 74,1% (32% - 99%), 67,4% (25% - 91%), y 66,2% (19% - 93%), respectivamente. La mortalidad por infección fúngica se confirmó como mencionamos en el inciso **a**



Figura XVI. Unidad experimental para evaluar el efecto de la densidad de insectos en la autodiseminación de esporas.

Determinación de la actividad residual del micoinsecticida

La actividad residual fue evaluada exponiendo el micoinsecticida (contenido en placas de petri), durante cinco meses, a condiciones ambientales no controladas de temperatura y humedad. Durante ese tiempo la temperatura varió de $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, y la humedad relativa de 34% a 100%. Cada intervalo de un mes, de ninfas de primer y tercer estadio fueron expuestas al micoinsecticida. La mortalidad por infección fúngica se confirmó como mencionamos en el inciso **a**.

Evaluación de trampas de infección para el control de *T.infestans*

Los ensayos con trampas de infección fueron ejecutados en la localidad de Salvador Mazza, Salta, Argentina ($22^{\circ} 03' \text{ S}$, $63^{\circ} 41' \text{ W}$) durante los meses de noviembre (2009) y enero (2010) (figura XII). Las trampas de infección consistieron en cajas de fibrofácil

de $16 \times 11 \times 4 \text{ cm}^3$ con 5 orificios por cada lateral. En su interior fueron agregados feromonas cuticulares de *T.infestans* ((con actividad de feromona de agregación) (Lorenzo et al., 2008)) y el micoinsecticida formulado en polvo (figura XVIII). Las feromonas se obtuvieron a partir de mudas de *T.infestans* criados en laboratorio.

Para los ensayos fueron seleccionadas siete viviendas habitadas, altamente infestadas con *T.infestans* resistentes a insecticidas piretroides (Picollo et al, 2005). Las casas eran de uno y dos ambientes y estaban construidas de adobe, techos de pajas y piso de tierra (figura XII). Las estructuras peridomiciliarias consistían en gallineros y corrales.

El número de *T.infestans* por vivienda fue estimado mediante una hora /hombre (no se usó un agente expurgante). Seis trampas por ambiente, conteniendo unos 2g de micoinsecticida, fueron colocadas en las paredes de habitaciones y gallineros (figura XIX). Al siguiente mes (diciembre 2009) se renovaron la totalidad de las trampas, se cuantificó el número de vinchucas vivas y se recolectaron todas las vinchucas encontradas muertas en la vivienda. Dos meses después de iniciado los ensayos (enero 2010) las trampas fueron retiradas y se recolectaron la totalidad de las vinchucas vivas y muertas. Los insectos vivos fueron mantenidos en el INIBIOLP durante 40 días pos-recolección para evaluar su mortalidad. A fin de confirmar la mortalidad por infección con *B.bassiana*, todos los insectos muertos fueron colocados en cámaras húmedas.

Declaración de Ética

Este ensayo se llevó a cabo con la aprobación del Ministerio de Salud Pública de la provincia de Salta. Antes del estudio, se explicaron los objetivos y el protocolo de los experimentos mediante reuniones con los líderes comunitarios, personal técnico y profesional de la salud. Cada jefe/a de familia proporcionó consentimiento para realizar el ensayo en la presencia de los agentes sanitarios locales, los cuales que participaron como mediadores.



Figura XVII. Zona de los experimentos y tipo de vivienda.



Figura XVIII. Trampa de infección conteniendo feromonas de agregación de *T.infestans* y un micoinsecticida de *B.bassiana* formulado en polvo.



Figura XIX. Trampas de infección dispuesta en paredes de habitación y gallinero (A y B).

Simulación de la dinámica poblacional de *T.infestans* en presencia de *B. bassiana* mediante el desarrollo de un modelo matricial

Generalidades

La simulación de la dinámica de *T.infestans* se efectuó utilizando datos de esta tesis y de investigaciones previamente reportadas por el grupo de investigación.

Se trabajó con un modelo matemático del estilo de las llamadas matrices de Lefkovitch (Lefkovitch, 1965), las cuales tienen elementos que representan los estadios de desarrollo de los insectos. Las matrices de transición de Lefkovitch constituyen un método estándar para cuantificar y analizar la dinámica poblacional de organismo con ciclos de vida complejos (Caswell, 2001). Los modelos matriciales incorporan las probabilidades de sobrevivencia, crecimiento y reproducción específicos, para cada estadio de la población (Caswell, 2001). El modelo básico de una proyección matricial está representado por la ecuación:

$$\mathbf{N}_{t+1} = \mathbf{A} \mathbf{n}_t,$$

Dónde \mathbf{N} es el tamaño inicial de la población, \mathbf{n}_t es un vector que describe la estructura de estadios de desarrollo de una población en un tiempo t , y \mathbf{A} es la matriz de los parámetros demográficos asociados. La matriz \mathbf{A} contiene todos los estadios de desarrollo, y representa las transiciones (probabilidades) de uno a otro, es cuadrada, con i columnas y con i filas para una población con i estadios de desarrollo (Caswell, 2001). Una vez definida la matriz se procedió a simular el crecimiento en el tiempo considerando los efectos de la infección con *B.bassiana* en la población de insectos.

Esquema del ciclo de vida general de los triatominos

La figura XX muestra el esquema general del ciclo de vida de *T.infestans* en base a sus estadios de desarrollo. Los estadios se identificaron mediante círculos, donde E son los huevos; N1, N2, N3, N4, N5 los cinco estadios ninfales y A los adultos. La flecha que conecta los adultos con los huevos, representa la fecundidad, y se denota por F. Las demás flechas representan las diversas probabilidades de un individuo de

seguir vivo: las flechas horizontales representan la probabilidad de pasar vivo del estadio i al siguiente estadio $(i + 1)$, denotadas por P_i ; las flechas curvas que comienzan y terminan en un mismo círculo representan la probabilidad de seguir vivo en el mismo estadio, y se denota por G_i .

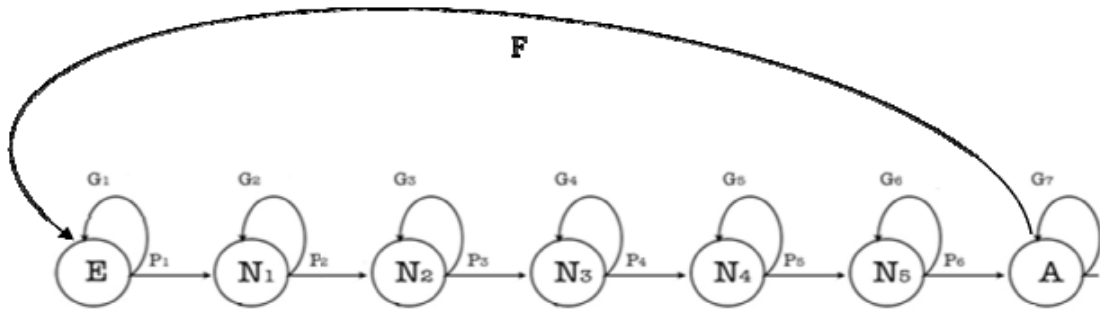


Figura XX. Diagrama del ciclo de vida de un triatomino en términos de estadios.

Esquema incorporando la infección por *B. bassiana*

Al diagrama de la figura XX se le “acopló” la presencia de triatomino infectados por *B.bassiana* (identificados con un asterisco) de manera separada del ciclo de los individuos sanos (sin asterisco) (Figura XXI).

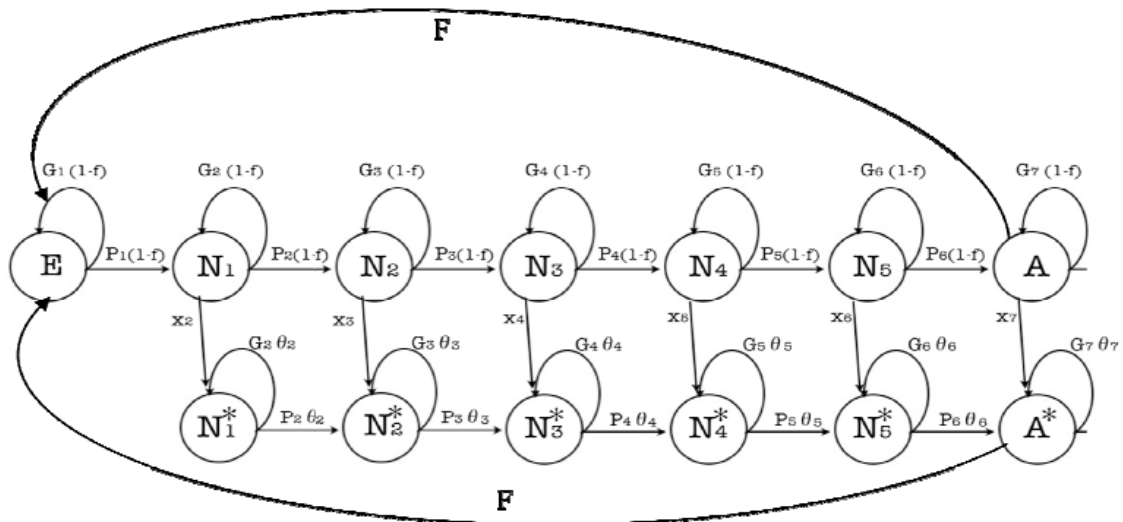


Figura XXI. Ciclo de desarrollo de *T. infestans* "sanos" acoplados al del desarrollo de los infectados (con asterisco).

Donde:

f , se consideró la probabilidad de que un insecto se infecte con *B.bassiana* (quedó implícito el hecho de que todo individuo que ingresa a una trampa se infecte), y

θ_i , una medida del efecto producido por el hongo sobre un individuo perteneciente al estadio i ($0 \leq \theta_i \leq 1$), expresado en términos de probabilidad de supervivencia (o sea, a mayor valor de θ menor es el efecto de la infección por el hongo sobre la probabilidad de que el insecto infectado siga vivo). En base a la figura XXI se determinó que la probabilidad de que un individuo sano sobreviva hasta la siguiente unidad de tiempo es la suma $P_i + G_i$, mientras para un individuo infectado la supervivencia es reducida a $(P_i + G_i)\theta_i$.

x_i , se definió como transiciones (representadas como x_2, x_3, x_4, x_5, x_6 y x_7), y sus valores estuvieron dados por $x_i = (P_i + G_i)f$. Las transiciones representan un cambio de "condición" de sano a infectado y no de un cambio de estadio (aunque se incluye el P_i en el cálculo ya que este expresa cuantos individuos pasan vivos al siguiente estadio en un tiempo $x + 1$).

Determinación de los parámetros del modelo

De acuerdo a lo observado en los diagramas de las figuras XX y XXI para el desarrollo del modelo fueron estimados los siguientes parámetros:

-Estimación de P_i 's y G_i 's

Las estimaciones de P_i y G_i fueron dadas por las siguientes expresiones:

$$G_i = 1 - (\text{tiempo medio en el estadio } i)^{-1} \quad (1)$$

$$P_i = (1 - G_i) \cdot P \quad (\text{supervivencia del estadio } i \text{ al } i + 1) \quad (2)$$

Donde P (supervivencia del estadio i al $i + 1$) denota la probabilidad de un individuo de pasar vivo al estadio siguiente. Los datos que se necesarios para estimar P_i y G_i se muestran en la tabla 2.A.

-Estimación de f (probabilidad de que un insecto se infecte por día)

El cálculo de f se hizo considerando lo siguiente: sea c_n la probabilidad de que un individuo sea infectado por alguna de n trampas en un día y r la probabilidad de que un individuo sea infectado por otro individuo en un día, entonces:

$$f = c_n \cdot (1 - r) + r \cdot (1 - c_n)$$

Esta ecuación implica la probabilidad de que el insecto sea infectado por la trampa y no infectado por autodiseminación, más la probabilidad de que no sea infectado por la trampa e infectado mediante autodiseminación.

Tabla 2. A. Estimación de los valores de Pi y Gi mediante las fórmulas (1) y (2).

Estadio (i)	Nombre	Tiempo medio en el estadio*	P (Supervivencia al estadio siguiente)*	Gi	Pi
1	Huevos	19,025	0,8313	0,9474	0,0437
2	N1	19,965	0,8676	0,9499	0,0435
3	N2	24,159	0,8803	0,9586	0,0364
4	N3	30,246	0,8765	0,9669	0,0290
5	N4	40,600	0,8790	0,9754	0,0217
6	N5	63,875	0,8526	0,9843	0,0133
7	A	241,81	0	0,9959	0,0000

Nota: Los tiempos de los estadios ninfales están en días.

*Datos obtenidos de Jorge E. Rabinovich 1972.

-Estimación de Cn (probabilidad de que una vinchuca se infecte por alguna de n trampas en un día)

Para determinar el valor de Cn se consideró que una trampa tiene una probabilidad α de infectar una vinchuca por unidad de tiempo. Así, la probabilidad de que una vinchuca no sea infectado por una caja pasa a ser $(1 - \alpha)$ por unidad de tiempo y la probabilidad de que no sea infectado por n de ellas por unidad de tiempo es $(1 - \alpha)^n$, por lo que la probabilidad de que sea infectado por alguna trampa en d unidades de tiempo resultó:

$$Cn = 1 - [(1 - \alpha)^{(n*d)}] \quad (3)$$

Debemos aclarar que el valor de α se calculó en base a datos de experimentos previos realizados por este laboratorio, en los que colocando sólo 1 trampa por día en unidades experimentales de $1m^3$ la infección resultó del 58% (Pedrini et al., 2009).

Por lo tanto, aplicando la fórmula (3):

$$0,58 = 1 - (1 - \alpha)^{(1*1)}$$

se determinó un $\alpha = 0,58$. De este modo, la probabilidad de infección con n cajas por día quedó definida por la siguiente ecuación:

$$C_n = 1 - (0,42)^n \quad (4)$$

donde 0,42 es el complemento de α , es decir, $(1 - \alpha)$.

-Estimación de r (probabilidad de que un individuo sea infectado por otro individuo en un día)

Para estimar la probabilidad diaria de autodiseminación de esporas por vinchuca, se utilizaron los datos correspondientes al experimento de *efecto de la densidad en la autodiseminación de esporas* (página 50), en el que de un total de 629 vinchucas susceptibles, expuestas a 100 vinchucas infectadas, 267 fueron infectadas debido a transmisión horizontal (valores obtenidos considerando la suma de todas las 3 réplicas realizadas, ver resultados (página 73)).

En base a lo anterior la probabilidad de sobrevivencia estimada resultó: $362/629 = 0,575\%$.

Por otro lado se definió la probabilidad de que un individuo se infecte por transmisión horizontal por día (r). Esta probabilidad cumple con:

$$(1 - r)^T = \text{probabilidad de sobrevivencia}$$

donde T es el tiempo de exposición. Usando como tiempo de exposición 30 días, (tiempo que una vinchuca estuvo potencialmente expuesta a otra previamente infectada con el micoinsecticida, en los experimento de densidad) se obtuvo valor de r :

$$r = 1 - (0,5755)^{(1/30)} = 0,01825$$

-Estimación de θ_i

La estimación de θ_i se calculó en base al valor de "Hazard Ratio" (HR) o riesgo relativo de morir por la infección fúngica. El HR es una medida comparativa de cuanto más probable es que una vinchuca infectada por el hongo muera en un día determinado en comparación con una vinchuca no infectada. El HR es constante (no depende de un día dado), y se calculó mediante la "Regresión de Cox" (Cox, 1972). La estimación del

HR mediante esta regresión se basa en conocer el efecto de la mortalidad del hongo sobre las vinchucas. La descripción y análisis de los cálculos efectuados para la estimación de HR mediante la regresión de Cox no son presentados en esta tesis debido a que exceden los objetivos propuestos.

Para estimar los valores de los θ_i para cada estadio i , debemos recordar que, de acuerdo al modelo desarrollado, la probabilidad de que un individuo infectado en el estadio i muera en un día determinado, dividido entre la probabilidad de que un individuo no infectado en el estadio i muera en un día, es justamente el “Hazard Ratio” (HR) de este estadio y está determinado esta dado por:

$$HR_i = 1 - (G_i + P_i)\theta_i / 1 - (G_i + P_i)$$

Usando las estimaciones de P_i y G_i (tabla 2.A.) y HR_i (mediante la regresión de Cox) fueron calculados los valores de θ_i mediante la siguiente igualdad:

$$\theta_i = 1 + HR_i(G_i + P_i - 1)/G_i + P_i$$

En la tabla 2.B se muestran los valores correspondientes de los parámetros para cada uno de los estadios de *T.infestans*.

Tabla 2.B. Valores estimados de los parámetros propuestos para el desarrollo del modelo matricial.

Estadio	G_i	P_i	θ_i
Huevo	0,9474	0,0437	0,99105764
N1	0,9499	0,0435	0,32609326
N2	0,9586	0,0364	0,497537641
N3	0,9669	0,0290	0,586273777
N4	0,9754	0,0217	0,533510981
N5	0,9843	0,0133	0,548553977
Adulto	0,9959	0,0000	0,584199161

Construcción de la matriz de proyección

Conociendo el valor de f , y con los datos de P_i , G_i y θ_i presentados en la tabla 2.B, se construyó la matriz de proyección (figura XXII) incluyendo todos los estadios sanos e infectados de la figura XXI. Mediante métodos estándar de análisis de matrices, se

estimó el parámetro **R_o** (que representa la cantidad de individuos hembras que reemplazara a cada hembra en la población en el periodo de una generación) y el crecimiento poblacional. Debemos mencionar que el parámetro demográfico R_o es un buen indicador de si la población crece ($R_o > 1$), se mantiene constante ($R_o = 1$) o decrece ($R_o < 1$) en función del tiempo.

Las simulaciones se efectuaron variando tanto el **número** de trampas como la **eficacia** de las mismas. La eficacia fue definida como una constante (con valores entre 0 y 1) que multiplica a α (la capacidad de infección de una trampa por día) previamente calculado. Eficacia = 1 implica que el α no disminuye del calculado en la ecuación (3) usando los datos de Pedrini et al., 2009. En nuestro caso se evaluaron “condiciones adversas” (es decir aquellas en las que las trampas estarían en ciertas condiciones donde eficacia sea mucho menor a 1 o sea, que el α como parámetro que determina la atracción de las cajas fuera menor que el calculado usando los datos de unidades experimentales del trabajo de Pedrini et al., 2009).

Las simulaciones se efectuaron con un número de 0 y 20 trampas y valores de eficacias de 0,0006 a 0,01, empleando el programa en MATLAB *vinchucas 6.m.*, el cual tiene como input el valor de n (número de cajas) y el valor de eficacia que se desea probar. Por ejemplo, el comando: `>>vinchucas7 (1,0.5)`

... calcula el R_o para 1 caja y una eficacia de 0,5 el resultado es $R_o = 0,8297$

	H	N1	N2	N3	N4	N5	A	N1*	N2*	N3*	N4*	N5*	A*
H	G1	0	0	0	0	0	F	0	0	0	0	0	F
N1	P1	$G2*(1-f2)$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N2	0	$P2*(1-f2)$	$G3*(1-f3)$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N3	0	0	$P3*(1-f3)$	$G4*(1-f4)$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N4	0	0	0	$P4*(1-f4)$	$G5*(1-f5)$	0	0	0	0	0	0	0	0
N5	0	0	0	0	$P5*(1-f5)$	$G6*(1-f6)$	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0	0	0	0	$P6*(1-f6)$	$G7*(1-f7)$	0	0	0	0	0	0
N1*	0	$X2=(G2+P2)*f2$	0	0	0	0	0	$G2*\theta2$	0	0	0	0	0
N2*	0	0	$X3=(G3+P3)*f3$	0	0	0	0	$P2*\theta2$	$G3*\theta3$	0	0	0	0
N3*	0	0	0	$X4=(G4+P4)*f4$	0	0	0	0	$P3*\theta3$	$G4*\theta4$	0	0	0
N4*	0	0	0	0	$X5=(G5+P5)*f5$	0	0	0	0	$P4*\theta4$	$G5*\theta5$	0	0
N5*	0	0	0	0	0	$X6=(G6+p6)*f6$	0	0	0	0	$P5*\theta4$	$G6*\theta6$	0
A*	0	0	0	0	0	0	$X7=G7*f7$	0	0	0	0	$P6*\theta6$	$G7*\theta7$

Figura XXII. Matriz de proyección. Como se indicó anteriormente H= huevo, N1...N5 son las ninfas desde 1 a 5, A son los adultos, y los asteriscos representan los individuos infectados. Los valores de f y de θ_i , así como los P_i y los G_i tienen la interpretación dada en las definiciones anteriores. Los diferentes elementos de esta matriz se interpretan como la probabilidad de eventos que se dan desde las columnas hacia las filas; por ejemplo, el elemento [$G2*(1-f2)$] de la segunda columna y segunda fila es la probabilidad de que una Ninfa 1 “sana” se quede viva en ese mismo estadio en su condición de sana, mientras que el elemento [$(G2+P2)* f2$] de la segunda columna y octava fila es la probabilidad de que una Ninfa 1 “sana” se quede viva en ese mismo estadio pero pasando a una condición de infectada. Obsérvese que toda la diagonal de esta matriz está compuesta de los elementos G_i (probabilidad de seguir vivo en el mismo estadio de una unidad de tiempo a la siguiente), mientras que toda la sub-diagonal está compuesta de los elementos P_i (probabilidad de pasar vivo al estadio siguiente de una unidad de tiempo a la próxima). El elemento que aparece identificado como F representa la fecundidad de las hembras expresadas en huevos por días. Para este valor se utilizaron datos del Dr. Rabinovich y los obtenidos en esta tesis correspondientes a los experimentos sobre alteraciones en la capacidad reproductiva de hembras.

B) Interacción *B.bassiana*-deltametrina

Solventes, reactivos, enzimas y oligonucleótidos utilizados

La acetona utilizada fue grado proanálisis obtenidos de Carlo Erba (Milán, Italia).

La deltametrina, 1-chloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), pirogalol, glutatión reducido, ácido tiobarbitúrico, inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF), y el H₂O₂, se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). El beta-mercaptoetanol, adquirieron en Promega (Madison, USA). Los primers para reacciones de PCR fueron sintetizados por Macrogen (Corea).

Kits comerciales empleados

- Cuantificación de proteínas: Micro BCA TM Protein Assay Kit (Pierce, Biotechnology Rockford, USA)
- Extracción de ARN: RNAeasy Plant Mini kit (Qiagen, Germany)
- Síntesis de ADNc: iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, USA)
- Cuantificación por PCR real time: iQ script SYBR Green (Bio-Rad Laboratorios, Inc)

Cultivo de *B.bassiana*

Se emplearon conidios de *B.bassiana* GHA obtenidos luego de crecer en un medio de cultivo sólido contenido en placas de Petri. La composición del medio completo (MC) sólido fue: 0,4g de PO₄H₂K, 1,4g de PO₄HNa₂, 0,6g de SO₄Mg, 1g ClK, 1,4 g de NO₃NH₄, 20 g de glucosa, 10 g de extracto de levadura y 15 g de agar disueltos en 1000 ml de agua destilada. Excepto en el medio de utilizado para determinar la concentración inhibitoria 50, para todos los experimentos la cepa fue crecida sobre la superficie de una hoja de celofán (Hoefer, EE.UU.) en placas conteniendo el MC. En todos los experimentos, las placas se incubaron a 26 °C durante 4 días.

Obtención de fracciones subcelulares fúngicas

Luego de 4 días de crecimiento, el hongo fue cosechado e inmediatamente colocado

en una solución fría de buffer fosfato 50 mM pH 7 conteniendo PMSF 1mM. El micelio fue procesado con un homogeneizador Mini-Bead Beater (BioSpec, Bartlesville, USA) operado a 50.000 rpm, utilizando perlas de vidrio de 0,5mm de diámetro. La homogenización se realizó en 4 ciclos de 30 segundos cada uno, manteniendo las muestras en hielo entre cada ciclo para evitar el sobrecalentamiento producido por la agitación. Posteriormente el homogenato se centrifugó a $10,000 \times g$ durante 20 minutos para remover mitocondrias y restos de células. El sobrenadante fue utilizado para la determinación de la concentración de proteínas, la actividad enzimática y la peroxidación lipídica.

Estimación de la Concentración inhibitoria media (CI_{50})

Para este ensayo una suspensión fúngica con 1×10^4 conidios / ml fue dispersada homogéneamente en la superficie de distintas placas conteniendo diferentes dosis de deltametrina. La deltametrina, disuelta en acetona, fue agregada uniformemente esparcida en toda la superficie, una vez solidificado los MC de las placas. Se evaluaron las siguientes concentraciones de deltametrina: 0 (solo acetona), 40, 100, 250 y 625 mg/cm² de agar. Previo a la inoculación de los conidios, la acetona fue evaporada mediante una corriente de N₂. Después de 4 días de cultivo, se cuantificó las unidades formadoras de colonias (UFC) de cada placa. La CI_{50} fue determinada mediante un análisis Probit (Finney & Stevens, 1948). Tres réplicas fueron ejecutadas para cada uno de lo MC con diferentes concentraciones de deltametrina.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas fue estimada según por el método del ácido bicinonínico (BCA) (Brown et al., 1989). Para la construcción de la curva patrón se utilizó una solución estándar de 1,0 mg/ml de Sero albúmina Bovina (BSA). La lectura

de la absorbancia se realizó a 562 nm.

Cuantificación de la actividad de enzimas antioxidantes

La cuantificación de las actividades enzimáticas se efectuaron utilizando un espectrofotómetro Ultrospec 2100 pro (Biochrom Ltd., Cambridge, UK), y cubetas de cuarzo de 10 mm de paso de luz.

Actividad específica superóxido dismutasa (SOD)

La actividad SOD fue cuantificada mediante el método de Marklund (Marklund & Marklund, 1974). Este método se basa en la autooxidación de pirogalol (a pH: 8,2 y 28 °C) que da como producto pirogalina (un compuesto amarillo) y radical superóxido que autocataliza la oxidación del pirogalol. La cinética de aparición del producto de la autooxidación del compuesto se registra durante 1 min a 480nm. Se calculó el porcentaje de inhibición de la autooxidación y se consideró que una unidad de actividad enzimática es la cantidad de enzima para lograr una inhibición de 50 %.

Actividad específica de catalasa (CAT)

La actividad específica CAT fue definida como la cantidad de enzima necesaria para descomponer 1 μmol de H_2O_2 /min *mg proteína a 25 °C. El consumo de H_2O_2 (20 mM en buffer fosfato 50 mM, pH 7) se midió espectrofotométricamente por el decaimiento de la absorbancia a 240 nm (Beers y Sizer, 1952).

Actividad específica glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad específica de GPx se analizó mediante la cuantificación de NADPH (St-Clair & Chow CK, 1996). La técnica se basa en la determinación de la oxidación del glutatión reducido (GSH) por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en una reacción catalizada por la GSH-Px (Reacción 1). El GSH se mantiene a una concentración constante durante la reacción mediante la adición de glutatión reductasa (GR; EC 1.6.4.2) así, el glutatión oxidado (GSSG) se reduce formando GSH y el NADPH es

oxidado y consumido durante la reacción (Reacción 2).

$2 \text{ GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{ H}_2\text{O}$ (Reacción 1)

$\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow 2 \text{ GSH} + \text{NADP}$ (Reacción 2)

La tasa de formación de GSH es monitoreada mediante la disminución en la absorbancia a 340 nm producida por el consumo del NADPH a 37°C. La diferencia en el consumo de NADPH entre el blanco y la muestra determina la actividad enzimática de GSH-Px, siendo ésta directamente proporcional a la disminución en la absorbancia. La actividad GPx fue expresada como pmol NADPH consumido/min*mg proteínas.

Actividad específica glutatión-s-transferasa (GST)

La determinación de la actividad específica GST se realizó por el método de Habig (Habig et al., 1984), utilizando 0,5 mM de (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) disuelto en etanol y GSH 2,5 mM como sustrato. Se inicio la reacción con el agregado de 20ul del homogenato y se leyó la absorbancia de manera continua a 340 nm con lecturas de 1 minuto a 30°C. La actividad de la enzima se refirió como la cantidad de enzima requerida para conjugar GSH con 1 μmol de CDNB/min*mg proteína

Cuantificación de la peroxidación lipídica (LPO)

La LPO fue estimada mediante el método de TBARS (sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico) (Esterbauer, 1996). Esta técnica consiste en cuantificar la cantidad de malondialdehido, cuya formación se considera como un indicador de lipoperoxidación. El malondialdehido, al ser mezclado con el ácido tiobarbitúrico, reacciona formando un pigmento rosa que puede ser detectado a una longitud de onda de 530 nm. Los resultados fueron expresados como nanomoles de sustancias reactivas a TBARS por mg. de proteína y fueron calculados en base al coeficiente de extinción molar (ϵ) de malondialdehido de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Análisis de expresión de genes

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Para la extracción de ARN fueron utilizados 2,5g de micelio provenientes de cultivos de *B.bassiana*, crecidos durante 4 días con concentraciones de deltametrina de 0, 25, 50 y 500 ug /cm². El ARN se extrajo con el kit comercial utilizando DNAsa en la columna de extracción. La integridad del ARN fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Para la síntesis de ADNc la cantidad de ARN molde se estimó por fluorescencia utilizando el sistema Qubit (Invitrogen, USA). El ADNc se obtuvo a partir de ARN empleando los kit comerciales. La amplificación fue ejecutada con un equipo Mx3000P QPCR System (Stratagene, USA) utilizando como molde 20 ng del total de ARN transcripto reverso obtenido. Este ADNc fue posteriormente utilizado como molde para la evaluar la expresión de los genes de interés.

Cuantificación de la expresión de los genes por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Se cuantificó mediante qRT-PCR la expresión de genes implicados en la síntesis de enzimas detoxificantes (*cyp*, *eh* y *gst*) y antioxidantes (*sod*, *cat* y *gpx*). La cuantificación de la expresión de los genes *cyp* incluyó 6 genes que previamente habían sido caracterizado en este laboratorio (Pedrini et al., 2010). Para los genes del sistema antioxidante se evaluaron 3 genes *sod* y 4 *cat*. El total de genes analizados (incluyendo los genes normalizadores) y sus secuencias se muestran en la tabla 2.C. Previa a la cuantificación por RT-PCR, todos los primers seleccionados fueron evaluados mediante una amplificación en PCR utilizando el ADNc anteriormente obtenido.

La técnica de PCR cuantitativa a tiempo real qTR-PCR se basa el agregado de un fluorocromo (que puede ser un agente intercalante o una sonda específica) a la mezcla de reacción de PCR. El fluorocromo se une al producto amplificado y un programa informático va registrando el incremento de fluorescencia (proporcional al

aumento de ADN) en cada ciclo. Esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles. Para cada muestra el programa calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral (Ct, de *threshold cycle*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN molde presente en la muestra (Kubista et al., 2006).

Los valores registrados de Ct deben ser normalizados con respecto a determinados genes usados como referencia. La condición que debe cumplir este gen es que se exprese en forma constante en todas las condiciones estudiadas.

Para la amplificación del ADNc fue utilizado el siguiente programa: desnaturalización a 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos con la amplificación de 3 segmentos (30s a 95 °C para la desnaturalización, 30s a 56 °C para la hibridación, y 30s a 72 °C para alargamiento de la cadena de ADN). Para confirmar la amplificación solo de productos específicos, se realizó una etapa de la temperatura de fusión.

Los controles negativos fueron realizados utilizando ADNc obtenido sin el agregado de transcriptasa inversa como molde. Como control blanco, fueron efectuadas reacciones con primers sin el agregado de ADNc. En total se utilizaron 3 muestras independientes de cultivos controles y con el agregado de deltametrina (25, 50 y 500 ug/cm²). Cada una de las muestras fue corrida en el qRTi-PCR por duplicado, utilizando β-tubulina como gen normalizador. La β-tubulina es una de las constituyentes de los microtúbulos que componen el citoesqueleto y está involucrada en el movimiento y transporte intracelular (Beltramo et al., 1989). La expresión de los genes se estimó mediante la relación de expresión (R), dada por la siguiente ecuación:

$$R = \frac{E_{\text{gen objetivo}}^{(C_t(\text{control}) - C_t(\text{muestra}))}}{E_{\text{gen referencia}}^{(C_t(\text{control}) - C_t(\text{muestra}))}}$$

Un valor de $R = 1$, indica que el gen de interés se expresa igual ya sea en presencia o ausencia de deltametrina. $E = 1 + e$, (donde e es la eficiencia de la PCR). El valor de e para cada par de primers se calculó a partir de curvas de calibración obtenidas empleando diferentes cantidades del pool de muestras. Las diluciones seriadas de ADNc fueron realizadas empleando un pool de todos los ADNc de cada una de las muestras.

Tabla 2.C. Secuencias de los primers utilizados en las reacciones de PCR a tiempo real para medir la expresión de los genes de interés.

Nombre	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')	Cita
qSOD ₁	ACAACACCAACGGCTGCACC	ACGGCCAACAACGCTGTGAG	Xie et al., 2012
qSOD ₂	CCAGTGTTTGGCATTGACATG	TCAGCCGTCTTCCAGTTGATG	Xie et al., 2012
qSOD ₃	ACATCAATCACACTCTCTTCTG	GCGTTGGTCTGCTTCTTG	Xie et al., 2012
qCAT _A	GAAAGCCGCGCAAGTGAAAG	TCTCTGGCAAAGACATCCAG	Wang et al., 2013
qCAT _B	GAAGACGCCCATGTTTGTTCG	AAAGTTGCCCTCATCGGTATAGC	Wang et al., 2013
qCAT _P	TGTAAGGGGCTCCGAACC	ATGAGACCTGTGTAGCGTTAG	Wang et al., 2013
qCAT _C	TGCTGGACGATGTGTCTGAC	CACGCACCGTATCGCTAGAG	Wang et al., 2013
qCAT _D	GCGCTCGCAGTACTGTAC	CTAGCACGGCCCTGTATAATGG	Wang et al., 2013
qGPx	CAAGGTCGTCCTCGTCGCAAC	CTTGTCGCCATTGACCTCCACC	Forlani et al., 2013
qGST	TCTTGTAGCCAGCCCTCCATCG	AGAGATGTGGTCGCGGAACGA	Forlani et al., 2013
qCYP52X1	CTACGGCAGCAACTACTGGA	CCGGCGAGCAGTATGTTGAT	Pedrini et al., 2010
qCYP655C1	AACGAGTATCGGCCTGAACGCTG	AATACGCATTCTGGCCCTAAACGG	Pedrini et al., 2010
q CYP5337A1	GTCCGGATGCAATGGAGTG	GCGGCTTATTACGATCGACC	Pedrini et al., 2010
q CYP52G11	ACCTTTGGCGGCTACGAGAACC	AACGGCCTGACCCTTCTTGACG	Pedrini et al., 2010
q CYP539B5	GGCGTCGTATCATCTTCACC	GCTGGCAACTTGAGATGAG	Pedrini et al., 2010
q CYP 617N1	GATGCGCACGAGTTCAACC	GGACATGCCAGCTCCGATT	Pedrini et al., 2010
qEH	GTGACGAGGACTTGGTTGC	CCACCCATGAATGAATGC	Pedrini, 2006
qTub	GATGGCTGCTTCTGACTTCC	TTACGCATCTGGTCCTCAAC	Pedrini, 2006

RESULTADOS

A) Interacción *B.bassiana*–*T.infestans*

Estimación de Mortalidad (%), TLM y Dosis Letal 50(LD₅₀)

Todos los estadío resultaron altamente susceptibles al micoinsecticida formulado en polvo (tabla 3.A). En ninfas, el porcentaje de mortalidad varió de 81,7 % ± 6,2 % (cuarto estadío) a 100 % (primer estadío), y el TLM de 5,1 ± 0,4 días (primer estadío) a 9,1 ± 1,5 días (cuarto estadío). En los insectos adultos, la mortalidad fue del 87,5 % ± 14,0% con un TLM de 10,9 ± 2,4 días. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el porcentaje de mortalidad entre todos los estadíos. Sin embargo, para el TLM se observó diferencia significativa entre ninfas I y los demás estadíos ($p < 0,05$, test tukey). No se observó mortalidad en los insectos control.

La eclosión no fue significativamente diferente ($p > 0,05$) entre los huevos expuestos al micoinsecticida (73,8 % ± 6,2 %) y los control (77,5 % ± 7,2 %). La DL₅₀, calculada en ninfas de cuarto estadío, fue de $2,39 \times 10^6$ conidios/ml (tabla 3.B).

Tabla 3.A. Virulencia de un micoinsecticida de *B.bassiana* formulado en polvo (conidios: tierra de diatomea, 2:1g: g.) frente a diferentes estadíos de *T.infestans*.

Estadio	Mortalidad (%)	TLM (días)
Ninfa I	100	5,1 ± 0,4 *
Ninfa II	87,0 ± 12,0	8,2 ± 2,0
Ninfa III	92,7 ± 4,8	8,7 ± 0,9
Ninfa IV	81,7 ± 6,2	9,1 ± 1,5
Ninfa V	89,5 ± 13,9	8,3 ± 1,6
Adultos	87,5 ± 14,0	10,9 ± 2,4

Notas: Todos los insectos estadíos fueron contaminados por contacto con el micoinsecticida formulado en polvo de esporas (3×10^{10} conidios/gramo). La mortalidad fue evaluada diariamente durante 15 días. Los valores representan la media ± el error estandar. Abreviaciones: TLM: tiempo letal medio.

*Diferencia significativa $p < 0,05$ (tukey test).

Tabla 3.B. Determinación de concentraciones letales de *B.bassiana* GHA en ninfas de *T.infestans*

Dosis (conidios/ml)	TLM (días)	Mortalidad (%)
$x 10^3$	13,11 ± 3,72	14,28 ± 9,75
$x 10^5$	8,72 ± 4,19	17,50 ± 12,50
$x 10^6$	8,54 ± 3,81	26,87 ± 9,81
$x 10^7$	6,33 ± 0,89	78,00 ± 17,80
$x 10^9$	4,85 ± 0,43	95,00 ± 10,00

Notas: Los valores representan la media ± el error estandar. Las CL_{50} y CL_{95} fueron de $2,39 \times 10^6$ y $0,23 \times 10^9$ conidios/ml respectivamente, $R^2 = 0,8$.

Abreviaciones: TLM: tiempo letal medio.

Cuantificación de los parámetros reproductivos

Los parámetros reproductivos fueron significativamente afectados por la infección fúngica (Tabla 3.C). Sólo el 57% de las hembras expuestas al micoinsecticida ovipusieron, en comparación con 100% de los controles (tabla 3.C). El número de huevos / hembra se redujo significativamente de $35,6 \pm 15,5$ (hembras control) a $9,89 \pm 12,14$ (hembras contaminadas). No se detectaron diferencias significativas sobre la fertilidad de los huevo entre ambos tratamientos. Todas las hembras contaminadas resultaron muertas por el hongo con un TLM de $8,27 \pm 2,75$ días. No se observó mortalidad en las hembras control en el periodo de estudio.

Tabla 3.C. Parámetros reproductivos de hembras de *T.infestans* expuestas al micoinsecticida.

Tratamientos	Número de hembras	Hembras que oviponen (%)	Huevos por hembra	Fertilidad de los huevos (%)
Control	18	100*	$35,61 \pm 12,50^*$	$85,90 \pm 9,04$
Contaminadas	28	57	$9,89 \pm 12,14$	$83,98 \pm 21,00$

*p < 0,05 (t Student).

Tabla 3.D. Capacidad de diseminación de esporas de un insecto expuesto al microinsecticida en diferentes periodos de tiempo.

Parámetros	Periodo de tiempo (días) después de la exposición al microinsecticida				ANOVA (P)
	0	2	4	7	
Mortalidad (%)	56,2 ± 12,0	43,7 ± 6,2	43,7 ± 18,7	46,9 ± 12,0	0,9245
TLM (días)	14,4 ± 3,0	14,1 ± 3,5	15,4 ± 1,5	18,5 ± 1,4	0,4233

Notas: Los parámetros corresponden a la media ± error estándar de ninfas infectadas por transmisión horizontal.

Efecto de la densidad de insectos en la autodiseminación

El efecto de la densidad de insectos en el % mortalidad fungica por autodiseminación se muestra en el gráfico 1. La mortalidad fue significativamente diferente ($p < 0,05$ ANOVA) entre las unidades experimentales con "baja densidad" (35 insectos) y las de "alta densidad" (140 insectos), ambas con una relación de insectos sin contaminar/insecto contaminado de 2,5 y 13, respectivamente. Los valores de mortalidad fueron del 11,9% ± 3,6% para las unidades experimentales de "baja densidad" y el 29,5% ± 6,2% para las de "alta densidad". Por su parte, en las unidades experimentales de densidad "intermedia" (con una relación de insectos sin contaminar y contaminados igual a 6) se estimó una mortalidad por transmisión horizontal de 20,5% ± 7,1%.

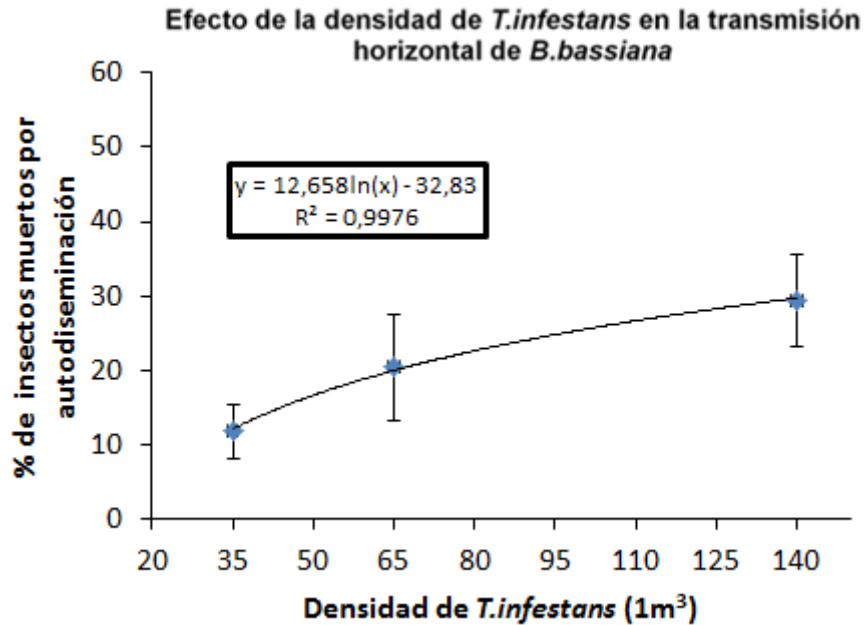


Gráfico 1. Efecto de la densidad de insectos en la autodiseminación de esporas. Los valores corresponden a las medias \pm el error de los porcentajes de mortalidad por autodiseminación de 3 repeticiones. Los porcentaje de mortalidad fueron calculados como se indica en la sección Materiales y Metodos (pag. 50).

Determinación de la actividad residual del micoinsecticida

Los resultados indican que el micoinsecticida mantuvo su capacidad infectiva frente a ninfas luego de permanecer expuesto durante 5 meses a condiciones de temperatura y humedad no controladas (gráficos 2.A y 2.B). No fueron observadas diferencias significativas ($P > 0,05$ t Student), tanto para porcentaje de mortalidad como en el TLM entre ninguno de los tiempos evaluados. En ninfas de primer estadio, la mortalidad fue del 100% a tiempo 0 (micoinsecticida sin ser expuesto a condiciones ambientales no controladas), y $95,2\% \pm 2,1\%$ a tiempo 5 (gráfico 2.A). Los respectivos TLM registrados fueron $5,1 \pm 0,3$ días y $5,8 \pm 0,1$ días (gráfico 2B). Por su parte, en ninfas de tercer estadio se observó una mortalidad de $93,0\% \pm 2,4\%$ (Tiempo 0) y $69,6\% \pm 7,9\%$ (Tiempo 5) respectivamente (gráfico 2.A). Los valores correspondientes a TLM fueron $8,7 \pm 0,5$ días y $10,4 \pm 0,6$ días (gráfico 2.B).

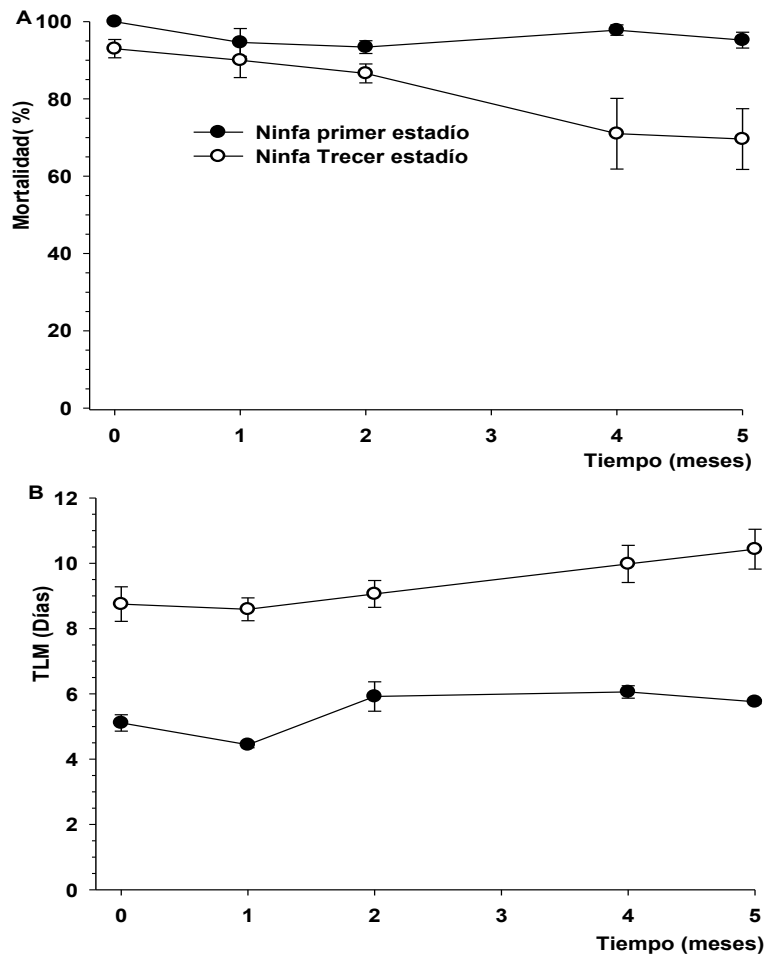


Gráfico 2. Determinación de la capacidad insecticida residual del microinsecticida expuesto a condiciones ambientales no controladas durante 5 meses. Los valores representan la media \pm error estándar de Mortalidad (A) y TLM (B) para los insectos expuesto al microinsecticida a intervalos mensuales.

Evaluación de trampas de infección en experimentos a campo

Se evaluó el desempeño de trampas de infección, conteniendo el microinsecticida formulado en polvo y feromonas de agregación de *T. infestans*, en 7 viviendas de la zona de Salvador Mazza (Salta). El número de insectos vivos iniciales por vivienda varió entre 10 a 63 (tabla 3.E). Luego de 30 días de iniciados los experimentos, fueron cuantificados tanto los insectos vivos como los muertos (tabla 3.F). Respecto al total de estadios adultos, se obtuvo un valor promedio de mortalidad por *B. bassiana* de $53,2 \pm 11,8\%$, mientras que para ninfas este valor fue de $12,7 \pm 5,7\%$ (tabla 3.F).

Una segunda evaluación fue realizada después de 60 días de iniciados los experimentos, recolectándose todos los insectos vivos y muertos. Se cuantificó, para adultos y ninfas un porcentaje de mortalidad promedio de $45,1 \pm 5,6\%$ y $12,6 \pm 3,4\%$, respectivamente (tabla 3.F).

Finalmente, si referimos el porcentaje de mortalidad por infección fúngica acumulada desde el inicio de los experimentos, con respecto al total de insectos vivos iniciales, se obtiene un valor de mortalidad promedio de $81,9 \pm 12,8\%$ y $53,4 \pm 17,5\%$ para adultos y ninfas respectivamente (gráfico 3). Respecto al total de la población, la mortalidad acumulada fue de $67,6 \pm 11,0\%$ (gráfico 3).

Tabla 3.E. Total de viviendas evaluadas y número de insectos iniciales estimados.

Viviendas evaluadas	Estadios Ninfales	Estadios Adultos
1	22	11
2	19	5
3	29	34
4	17	9
5	3	7
6	8	13
7	11	10

Nota: Los experimentos fueron realizados en viviendas habitadas, infestadas con insectos resistentes a insecticidas piretroides, durante los meses de noviembre (2009) y enero (2010). Inicialmente fueron colocadas 6 trampas/ambiente. El número de insectos vivos fue estimado mediante hora/hombre sin la utilización de agente espurgante.

Tabla 3.F. Efecto de las trampas de infección sobre el número de *T.infestans* en las viviendas.

Periodo de tiempo después de colocadas las trampas							
30 días				60 días			
Total de insectos (vivos y muertos)		Insectos muertos por <i>B.bassiana</i> (%) [*]		Total de insectos recolectados		Insectos muertos por <i>B.bassiana</i> (%)	
Ninfas	Adultos	Ninfas	Adultos	Ninfas	Adultos	Ninfas	Adultos
9	10	33,3	70,0	76	27	18,4	51,9
4	5	0	60,0	0	3	0	66,7
38	15	2,6	0,0	59	14	11,9	28,6
34	9	35,3	77,7	26	14	23,1	57,1
4	10	0,0	50,0	14	7	18,7	28,6
20	4	10,0	25,0	25	21	4,0	33,3
13	10	7,7	90,0	16	2	0	50,0

Nota: A los 30 días de iniciados los experimentos, se cuantificaron tanto insectos vivos como muertos; sólo se recolectaron los muertos. Luego de 60 días, las trampas fueron retiradas y recolectaron tanto *T. infestans* vivos y muertos. La viabilidad de los insectos vivos se determinó hasta 40 días post-recolección.

* Calculado sobre el total de insectos.

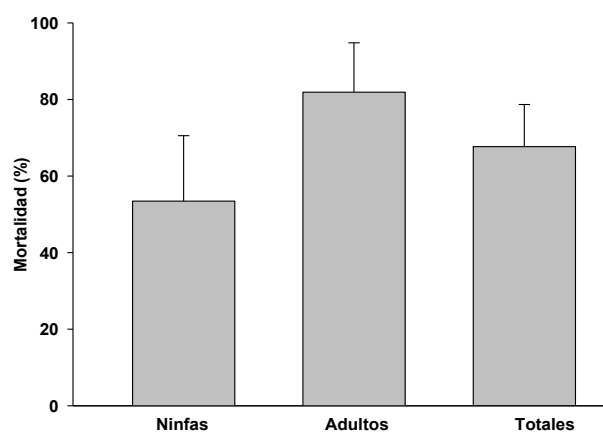


Gráfico 3. Porcentaje de mortalidad acumulativa de *T.infestans* por infección fúngica. Los valores corresponden a la media ± error estandar del porcentaje de mortalidad acumulada luego de 2 meses de tratamiento, respecto al total de *T.infestans* vivos cuantificados inicialmente (tabla 3. E).

Simulación de la dinámica poblacional de *T.infestans* en presencia de *B. bassiana*

Efecto sobre la tasa de recambio poblacional (R_0)

El gráfico 4 muestra el valor resultante de R_0 a partir del análisis de la matriz de proyección (página 60) después de evaluar el modelo para un número de trampas entre 0 y 20 y eficacias con valores de 0,0006, 0,0012 y 0,0024. Se observa que con un número de trampas igual a 0 (control) el valor de R_0 estimado fue de 3,43. Si consideramos una eficacia de 0,0006, que de acuerdo a la ecuación 4 (página 57) equivale a 0,03% infectados por una trampa/día, el valor de R_0 resulta mayor que 1 (la población crece). Sin embargo, una eficacia de 0,0012 (0,06% de insectos infectados por una trampa/día) y un número de trampas igual a 20, el valor de R_0 disminuye a 0,955. Asimismo, para una eficacia de 0,0024 (0,12% de insectos infectados/día) y al menos 10 trampas, el valor de R_0 también resulta menor a 1. Manteniendo esta eficacia e incrementando el número de trampas, los valores de R_0 resultan del orden del 0,5.

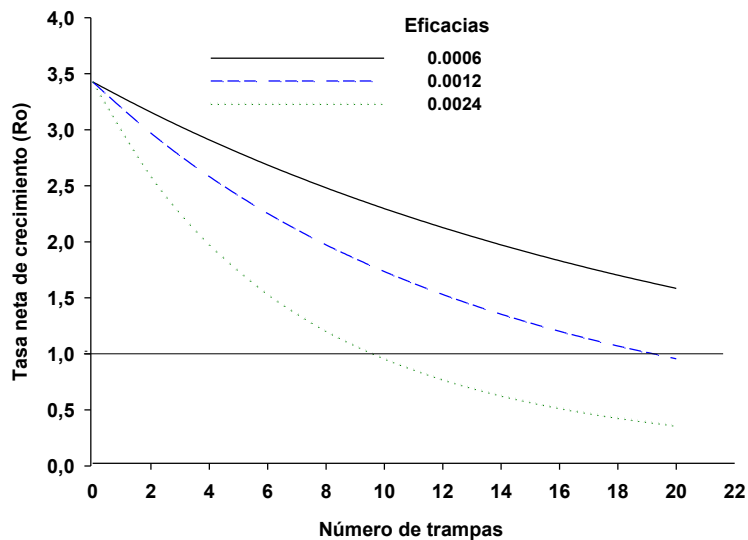


Gráfico 4. Valores de tasa neta de crecimiento (R_0) para diferentes combinaciones de eficacias y número de trampas. La línea horizontal identifica la condición crítica de $R_0 = 1$ (el número de insectos de la población se mantiene constante), para $R < 1$ la población decrece en el lapso de una generación).

Efecto sobre la densidad poblacional

Los gráficos 5, 6 y 7 muestran cómo varía la densidad poblacional de *T. infestans* en el tiempo, considerando un número de 5, 10 y 20 trampas con valores de eficacias de 0,01, 0,005 y 0,001.

Las simulaciones se iniciaron con un número pequeño y arbitrario vinchucas infectadas. En nuestro caso se utilizó una población inicial compuesta arbitrariamente por: huevos = 30; vinchucas sanas de I, II, III, IV V y Ad ♀ = 30, 20, 10, 9, 8, 5 respectivamente; vinchucas infectadas de I, II, III, IV V y Ad ♀ = 6, 7, 0, 10, 0, 5 respectivamente; Población Inicial total (sin huevos) = 100; Población Inicial total “sana” (sin huevos) = 82; Inicial total “infectada” (sin huevos) = 28 respectivamente.

Para todas las simulaciones se observa que considerando trampas con una eficacia de 0,001 (0,058% de insectos infectados por trampa/día), la población crece. Sin embargo, dependiendo del número de trampas, este crecimiento puede ser significativamente diferente.

Para reducir la población, se desprende que con 5 trampas y suponiendo un valor de eficacia de 0,01 (0,58% de insectos infectados por trampa/día) la población disminuye más del 80% luego de los 300 días (gráfico 5). Empleando 10 trampas y considerando una eficacia de 0,005 (0,26% de insectos por trampa/día), obtenemos una reducción similar (gráfico 6). Se observa que con 10 trampas, y una eficacia de 0,01, la población se reduce en más del 50% luego de los 100 días (gráfico 6). El mismo resultado se obtiene empleando 20 trampas y suponiendo una eficacia de 0,005 (gráfico 7). Por último, con 20 de trampas, pero considerando un valor de eficacia de 0,01, la población se reduce a la mita antes de los 50 días (gráfico 7). Para esta simulación, el porcentaje de insectos infectados por todas las trampas, de acuerdo a la ecuación 4, resulta del 11%/día.

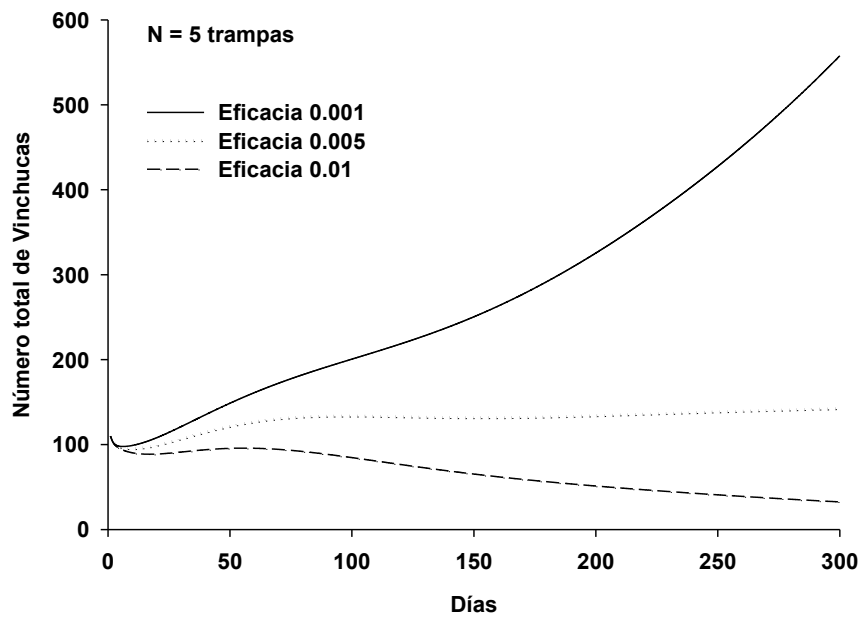


Gráfico 6. Evolución en el tiempo de la densidad poblacional de *T. infestans* como resultado de una simulación en base a un número de 5 trampas y eficacias con valores de 0,01, 0,005 y 0,001.

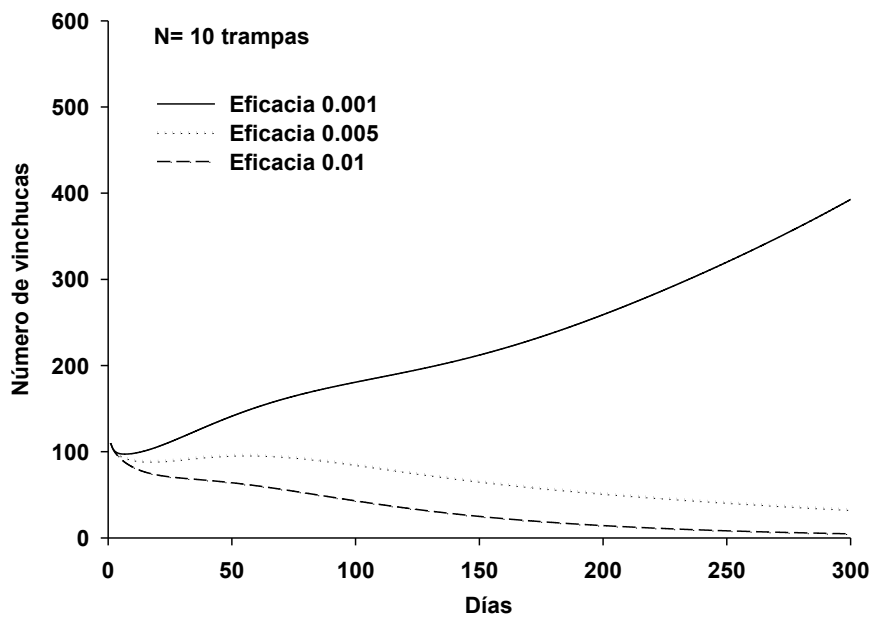


Gráfico 7. Evolución en el tiempo de la densidad poblacional de *T. infestans* como resultado de una simulación en base a un número de 10 trampas y eficacias con valores de 0,01, 0,005 y 0,001.

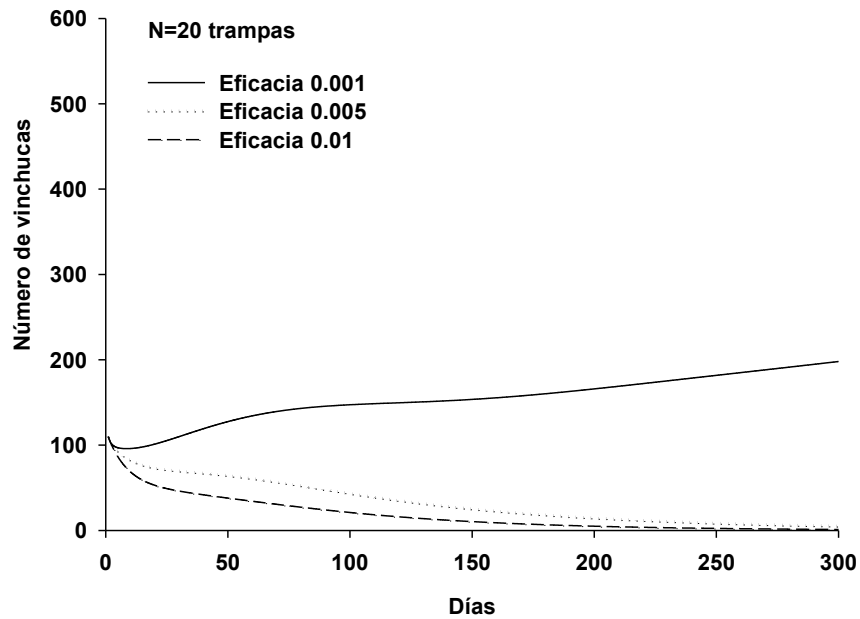


Gráfico 8. Evolución en el tiempo de la densidad poblacional de *T.infestans* como resultado de una simulación en base a un número de 20 trampas y eficacias con valores de 0,01, 0,005 y 0,001.

B) Interacción *B.bassiana*-deltametrina**Determinación de Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀)**

La CI₅₀ fue determinada en cultivos de *B.bassiana* expuestos a concentraciones de 0 a 625 ug/cm² de deltametrina. Luego de 4 días de crecimiento se obtuvo una CI₅₀ de 50ug deltametrina/cm² ($r^2 = 0,92$) (tabla 3.G). Las dosis de deltametrina utilizadas para cuantificar la concentración de proteínas; la expresión de los genes, las actividades de las enzimas y los grados de peroxidación lipídica variaron entre 0,5CI₅₀ y 10CI₅₀.

Tabla 3.G. Efecto de la deltametrina en la germinación de esporas y determinación de la concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀).

Deltametrina (µg/cm ²)	Unidades formadoras de colonias (UFC)
Control ^a	648 ± 14
0	687 ± 21
16	600 ± 27
40	475 ± 21
100	279 ± 7
250	147 ± 8
625	85 ± 9

Nota: CI₅₀ = 50µg/cm², $r^2 = 0.92$. La CI₅₀ fue calculada por el método probit. Los valores representan la media de 3 réplicas ± error estándar.

^a*B.bassiana* crecida en medios de cultivos sin el agregado de acetona.

Actividad de enzimas del sistema antioxidante

La actividad SOD mostró diferencias significativas entre los tratamientos y el control (gráfico 9). Los valores de actividad variaron de 6,5 ± 1,0 U/mg (de control) a 8,6 ± 0,5 U/mg (250 ug/cm²). A la dosis más alta de deltametrina (500 ug/cm²), la actividad SOD se redujo a niveles similares a los controles (gráfico 9). Respecto a la actividad CAT no

fueron observadas diferencias significativas entre los tratamientos y el control (gráfico 10). Sin embargo, a la dosis más alta del insecticida, la actividad fue significativamente reducida ($51,6 \pm 4,0$ U/mg) en comparación con dosis menores (gráfico 10).

La actividad GPx no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, con valores entre $4,7 \pm 0,6$ (control) y $6,3 \pm 0,5$ U/mg ($250\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (gráfico 11).

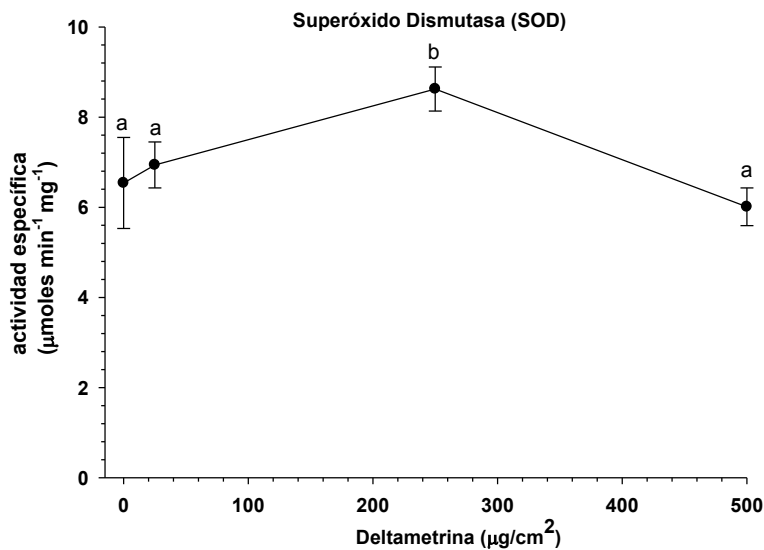


Gráfico 9. Actividad enzimática antioxidante SOD de *B.bassiana* expuesta a diferentes dosis de deltametrina. Los valores representan la media de 6 a 12 réplicas \pm desviación estándar. Las letras distintas indican diferencias significativas (test Tukey).

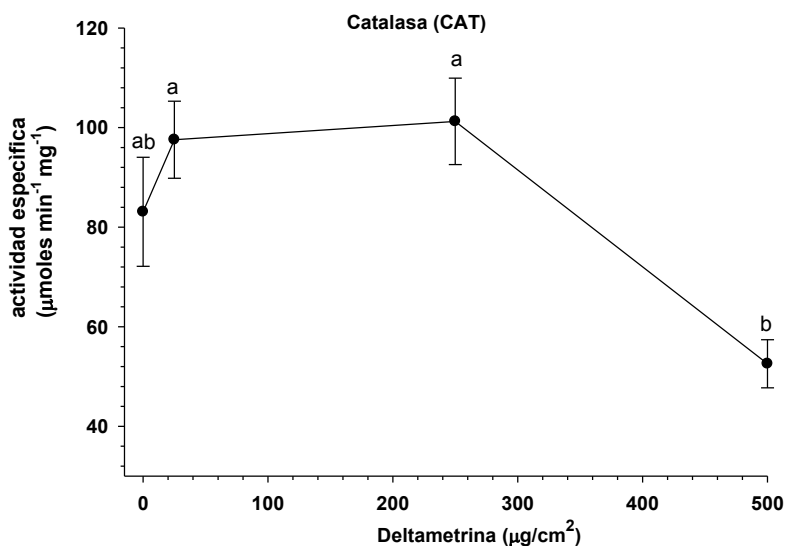


Gráfico 10. Actividad enzimática antioxidante CAT. Las letras distintas indican diferencias significativas (test Tukey).

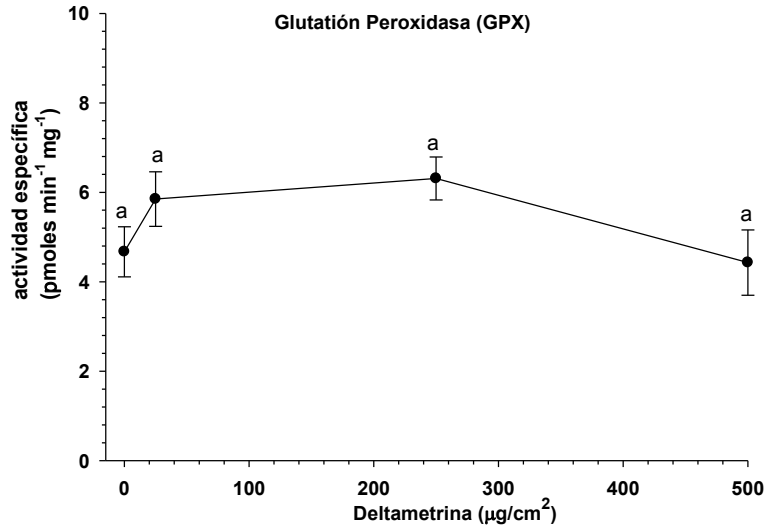


Gráfico 11. Actividad enzimática antioxidante GPX. Las letras distintas indican diferencias significativas (test Tukey).

Actividad específica GST

La actividad GST no presentó diferencia significativa en comparación con los controles a 25ug de deltametrina/cm² (0,11 ± 0,01 U/mg) (gráfico 12). Sin embargo, una significativa disminución (0,07 ± 0,005 U/mg), se determinó a concentraciones del insecticida ≥ 50ug/cm².

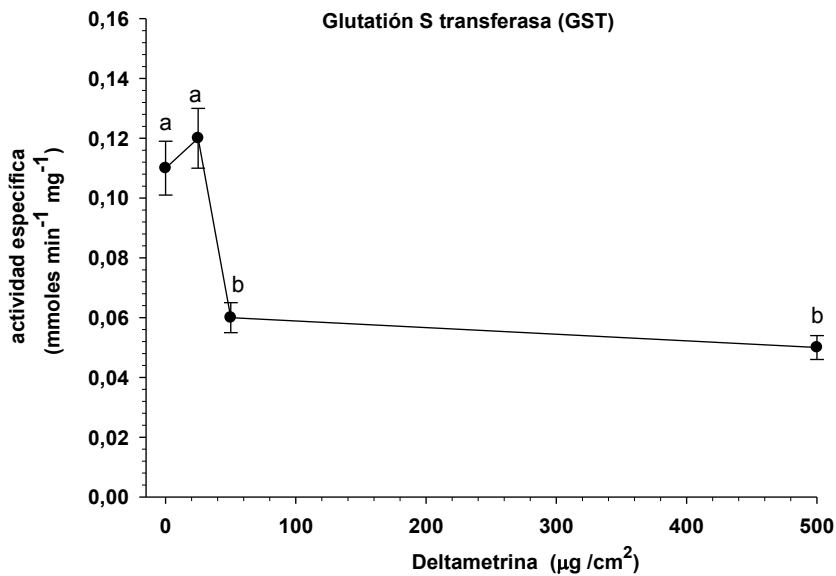


Gráfico 12. Actividad enzimática GST. Las letras distintas indican diferencias significativas (test Tukey).

Cuantificación de peroxidación lipídica

El gráfico 13 muestra los valores medios de peroxidación lipídica en *B.bassiana*, resultantes del ensayo de TBARS para cada una de las dosis de deltametrina testeadas. Los niveles de TBARS fueron significativamente superiores en los cultivos expuestos a concentraciones de deltametrina de 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($0,25 \pm 0,02$ y $0,25 \pm 0,01$ μmol TBARS/mg proteína) en relación a los controles ($0,18 \pm 0,01$ μmol TBARS/mg); dosis inferiores del insecticida no resultaron en diferencias significativas.

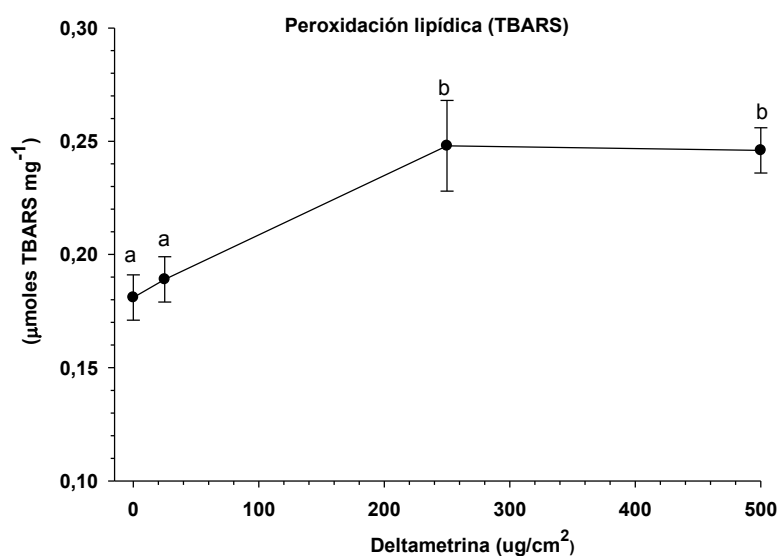


Gráfico 13. Niveles de peroxidación lipídica estimados por TBARS en *B.bassiana* crecidas en diferentes dosis de deltametrina. Las letras distintas indican diferencias significativas (test Tukey).

Expresión diferencial de genes

Extracción de ARN

El ARN se extrajo de cultivos de *B.bassiana* crecidos durante 4 días como se describe en la sección materiales y métodos. El ARN presentó una buena calidad para las posteriores aplicaciones. En la figura XXIII puede observarse las dos bandas de ARN ribosómico 18S y 28S, con una relación aproximada de 2:1.

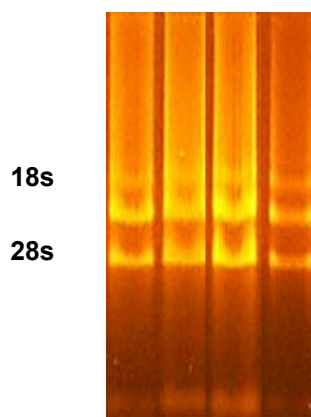


Figura XXIII. Gel de agarosa de 1% para ARN total extraído de *B.bassiana* crecida en los cultivos controles y con diferentes dosis de deltametrina (25, 50 y 500 ug/cm²) donde se muestran las subunidades mayores de ARNr.

Cuantificación de la expresión génica

La eficiencia de las amplificaciones por qRT-PCR de cada uno de los genes cuantificados fue evaluada mediante curvas estándares. De la tabla 3.H se desprende, para todas las curvas, buenos coeficientes de regresión ($r^2 > 0,98$) y porcentajes de eficiencias superiores al 65%. La β -tubulina resultó un buen gen normalizador, ya que, tanto en los cultivos con deltametrina como en los controles se obtuvieron valores similares de Ct.

Tabla 3. H. Eficiencias (%) y valores de R^2 de primers obtenidos mediante curvas estándares.

Primers	Eficiencia (%)	R^2
CATA	100	0,99
CATB	100	0,99
CATC	98,9	0,99
CATD	100	0,99
SOD1	75,5	0,97
SOD2	99,9	1
SOD3	95	0,99
GPx	98	0,99
GST	65	0,92
EH	71,1	0,98
β -tubulina	93,7	0,9

Genes detoxificantes

Los resultados indican que 5 de los 6 genes *cyp* analizados resultaron inducidos en al menos una de las dosis de deltametrina ensayadas en relaciona a los controles (gráfico 14). El nivel de expresión fue diferencial para cada uno de los genes; a dosis de deltametrina $> 50\mu\text{g}/\text{cm}^2$, *cyp52X1* fue inducidos en más de 2 veces. Asimismo, *cyp617N1* incrementó su expresión en más de 2 veces en todas las concentraciones de deltametrina. Por su parte, *cyp655C1* y *cyp539B5* fueron inducidos entre 1,5 y 1,8. El gen *cyp52G11* no mostró variaciones significativas en comparación con los cultivos crecidos sin deltametrina.

Los cultivos de *B.bassiana* expuestos al insecticida incrementaron significativamente los patrones de expresión de los genes *eh* y *gst* (grafico 14). En promedio, para las tres dosis de deltametrina, tanto *eh* como *gst* se indujeron 1,7 y 1,4 veces, respectivamente. Asimismo, *gst* se expresó de manera significativa en todas las dosis del insecticida.

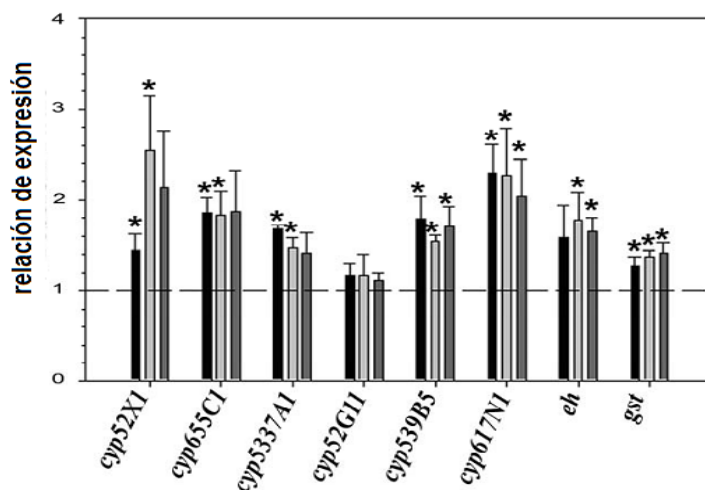


Gráfico 14. Patrones de expresión de genes del sistema detoxificante de *B.bassiana* expuesta a distintas concentraciones de deltametrina. La línea de trazos muestra una relación de expresión = 1, lo cual indica que el gen se expresa igual ya sea en presencia o ausencia de deltametrina. Los valores la representan la media de 3 réplicas \pm desvío estándar.

El asterisco indica diferencia significativa comparada con el control (student's test).

Dosis de deltametrina evaluadas: 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Genes del sistema antioxidante

La expresión de genes *sod* y *gpx* resultó significativamente aumentada en los cultivos expuestos a deltametrina (gráfico 15). Los genes *sod2* y *sod3*, exhibieron un nivel de transcripción mayor que el gen *sod1*. La inducción por deltametrina varió de 1,8 (*sod3*) a 2 veces (*sod2*) en promedio. El gen *gpx* se expresó entre 1,5 y 1,8 veces en comparación con los controles, dependiendo de la dosis de deltametrina evaluada.

Todos los genes *cat* mostraron un incremento significativo en los niveles de expresión en presencia de deltametrina (gráfico 15). Los genes *catB* y *catD* (que codifican para catalasa secretada) resultaron inducidos en promedios en más de 2 veces.

Los genes *catA* (espora-especifico) y *catC* (citoplasmática) se expresaron significativamente 1,7 veces en comparación con los cultivos controles.

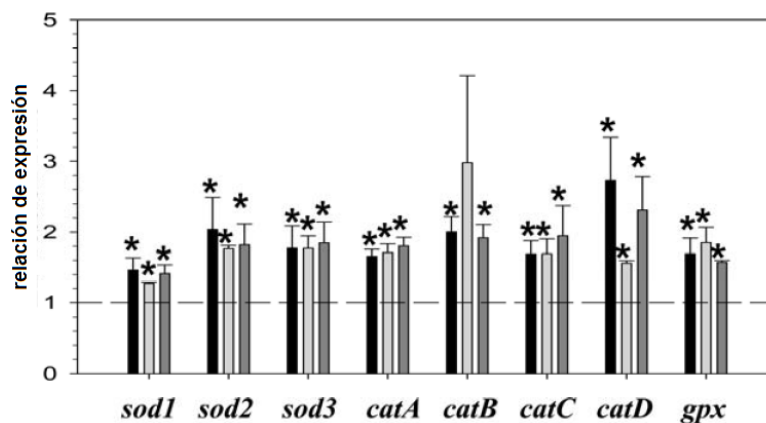


Gráfico 15. Patrones de expresión de genes del sistema antioxidante de *B. bassiana* expuesta a distintas concentraciones de deltametrina.

El asterisco indica diferencia significativa comparada con el control (student's test).

Dosis de deltametrina evaluadas: 25 ug/cm², 50 ug/cm², 500 ug/cm².

DISCUSIONES

Interacción *B.bassiana-T.infestans*

Capacidad bioinsecticida de *B.bassiana* GHA

T.infestans es el principal vector de la enfermedad de Chagas en nuestro país. Actualmente la problemática de esta enfermedad es abordada con gran preocupación debido a las fallas en el control químico de los insectos vectores en algunas provincias de norte, especialmente por el desarrollo de resistencia a la deltametrina, lo cual, ha llevado al uso de insecticidas más agresivos para los humanos, como los organofosforados. Estas medidas de control son cuestionadas principalmente por riesgos para la salud humana y sus elevados costos operativos.

Teniendo en cuenta la alta susceptibilidad de distintas especies de triatomíneos a los hongos entomopatógenos, estos microorganismos constituyen una alternativa novedosa y prometedora para el control biológico de insectos vectores de la enfermedad de Chagas (Pedrini, 2009), sin embargo, a la fecha aún no existen micoinsecticidas registrados.

Este es el primer trabajo que demuestra la susceptibilidad de todos los estadios de *T.infestans* a una cepa de *B.bassiana*. Se obtuvo un porcentaje de mortalidad que varió, dependiendo de los estadios, del 82% al 100%, y un TLM de entre 5 y 10 días (tabla 3.A). Si bien en este trabajo no se discriminó entre machos y hembras, en cuanto a su susceptibilidad, ensayos preliminares indican que no hay diferencias entre ambos sexos. La DL_{50} , determinada en ninfas de cuarto estadio, fue de 2.39×10^6 conidios/ml. Un valor similar de DL_{50} fue estimado en investigaciones previas, empleando distintas cepas de *B.bassiana* frente a ninfas de *T.infestans* (Lecuona et al., 2001). Respecto a TLM, se observó una diferencia significativa entre las ninfas de primer estadio y los demás estadios (tabla 3.A). Esta diferencia podría ser debido a las propiedades de resistencia y dureza de la cutícula, atribuidas a los procesos de esclerotización que se originan luego de la ecdisis (muda) (Andersen, 2005).

La eclosión de los huevos no resultó afectada por exposición al micoinsecticida. No hay información previa sobre los efectos ovicidas de hongos entomopatógenos contra triatominos; sin embargo, en otros insectos la actividad ovicida de los hongos depende de las especies y cepas seleccionadas (Luz et al., 2011). Por otra parte, debemos mencionar la ausencia de poder ovicida contra huevos de triatominos también ha sido demostrada en distintos insecticidas químicos (Zerba & Rúbeda 1976a y 1976b).

Aunque la virulencia de un hongo entomopatógeno hacia el insecto huésped es medida principalmente en términos de porcentaje de mortalidad y TLM, otros parámetros necesarios e importantes a evaluar, debido a su efecto sobre el crecimiento de poblaciones, son las alteraciones sobre la capacidad reproductiva como la fecundidad y fertilidad (Fargues et al., 1991; Ekesi & Maniania, 2000).

Este es el primer trabajo que estudia los efectos de un hongo entomopatógenos sobre la capacidad reproductiva en hembras de *T. infestans*. Demostramos que tanto el número de hembras que oviponen como la relación huevos/hembra fueron significativamente menores en los insectos contaminados, en comparación con los controles (tabla 3.C).

Las alteraciones en la actividad reproductiva han sido reportadas en otros insectos vectores de enfermedades, luego de ser expuestos a hongos entomopatógenos. Tanto en el mosquito *Anopheles gambiae* como en la cucaracha (Blattodea: Blattellidae) se demostró una disminución significativa en el número de huevos por hembra cuando fueron contaminadas con diferentes dosis de *M. anisopliae* (Quesada-Moraga et al., 2004; Scholte et al., 2006). Asimismo, en insectos de plagas agrícolas han sido observadas alteraciones en la fecundidad y fertilidad luego de su exposición a *B. bassina* (Fargues et al., 1991; Fargues et al., 1994) y *M. anisopliae* (Thomas et al., 1997; Ekesi & Maniania, 2000; Blanford & Thomas, 2001).

A pesar de que no son conocido los efectos específicos sobre la reproducción, se sugiere que las lesiones histológicas y citológicas de los ovarios (Sikura et al., 1972) o

una disminución de sustancias esenciales para la reproducción como resultado de alteraciones del cuerpo graso (órgano de reserva nutrientes) debido al efecto de las toxinas, en conjunto con el daño físico producido por el crecimiento de las hifas, podrían ser algunos de los mecanismos que afecten la capacidad reproductivas de las hembras.

Por último, debemos mencionar que la eclosión de los huevos no resultó significativamente diferente entre las hembras infectadas y controles. En *T.infestans* ha sido demostrado que este parámetro varía en función a la temperatura y la humedad relativa y generalmente en condiciones de laboratorio sus valores llegan a ser superiores al 80% (Juárez, datos no publicados; Ravinobich, 1972).

Autodiseminación de esporas fúngicas

La infección fúngica puede diseminarse entre insectos mediante un mecanismo de transmisión horizontal (autodiseminación), el cual, consiste en una transferencia pasiva de conidios presentes en la superficie de insectos infectados (vivos o muertos) a insectos sanos (Quesada-Moraga et al., 2004). Para que este evento ocurra, es esencial un contacto estrecho entre ambos insectos. Este mecanismo ha sido demostrado que puede ocurrir durante la cópula en algunos insectos (Scholte et al., 2005; Quesada-Moraga 2008). En *T.infestans* su comportamiento gregario (que permanece agrupados en contacto estrecho durante la mayor parte del día), podría potenciar la contaminación de las esporas entre los insectos.

En experimentos de laboratorio comprobamos que insectos previamente expuestos al micoinsecticida mantienen sin cambios significativos la capacidad de transferir conidios a otros insectos, durante al menos una semana, produciendo una mortalidad del 50% en los insectos contactados (tabla 3.D). Por otro lado, este es el primer trabajo que relaciona la densidad de insectos con la mortalidad por autodiseminación. Demostramos que manteniendo constante el número de insectos infectados con el micoinsecticida, la mortalidad por autodiseminación se incrementa proporcionalmente

en función del número de insectos sin infectar (gráfico 1). Aunque no sabemos si esta tendencia se mantiene a densidades de insectos mayores que las experimentadas, los resultados sugieren que la autodiseminación de esporas entre los insectos podría ser un mecanismo importante de contaminación.

Determinación de la actividad residual del micoinsecticida

Los principales factores que limitan el empleo de los hongos entomopatógenos son el modo de aplicación y la formulación de los ingredientes activos (esporas) (Braga et al., 2001; Lord, 2001; Maniania et al., 2006). Se ha establecido que la efectividad de los hongos contra los insectos blancos puede ser incrementada mediante la optimización de aquellos factores (Faria & Wraight, 2007).

En cultivos agrícolas el uso más difundido de los hongos entomopatógenos es mediante rociado de suspensiones líquidas, sin embargo, los costos de su manipulación y la pérdida de viabilidad de las esporas implican serios inconvenientes (Braga et al., 2001; Lord, 2001; Maniania et al., 2006).

Los micoinsecticidas formulados en polvo, en combinación con materiales inertes, han mostraron ser efectivos como potenciales métodos de control, especialmente en insectos plagas de granos almacenados (Lord, 2001; Akbar et al., 2004; Oliveira & Alves, 2007; Vassilakos et al., 2006).

Nuestro grupo de investigación comprobó la efectividad de un formulado en polvo conteniendo esporas de *B.bassiana* y tierras de diatomeas para el control de *T. infestans* en pruebas a campo (Pedrini et al., 2009). En esta tesis demostramos que el formulado mantuvo su capacidad bioinsecticida durante al menos 5 meses expuesto a condiciones no controladas de temperatura y humedad (gráfico 2). La extendida capacidad bioinsecticida observada podría deberse principalmente a que en nuestros experimentos las esporas no fueron expuestas a la radiación UV. Es conocido que esta radiación origina una pérdida significativa de viabilidad de las esporas (Braga et al., 2001). En relación con los estos resultados obtenido en esta tesis, fue demostrado

que la viabilidad de las esporas de *B.bassiana* (evaluada en medios de cultivos) no se ve afectada bajo condiciones similares a las desarrollada en este trabajo (Pedrini et al., 2009).

Evaluación de trampas de infección en experimentos a campo

Existen pocos antecedentes sobre el empleo de hongos entomopatógenos como métodos de control para insectos vectores de enfermedades de importancia sanitaria. Los mayores esfuerzos han sido focalizados en el manejo de mosquitos que transmiten la malaria y en insectos de otras pestes tropicales (Kaaya & Hassan, 2000; Scholte et al., 2004; Kanzok & Jacobs-Lorena, 2006; Thomas & Read, 2007). Sin embargo, es importante mencionar que aún no se ha aprobado ningún método de control de insectos vectores de enfermedades sanitarias mediante el uso de hongos entomopatógenos.

Las investigaciones sobre la actividad de estos microorganismos en insectos, bajo condiciones de campo, son muy importantes con el fin de evaluar su potencial como herramienta de control integrado de plagas.

Este laboratorio ha propuesto un cambio de paradigma al tradicional control químico de triatominos, mediante el desarrollo de una trampa de infección basada en el empleo de hongos entomopatógenos (Juárez et al., 2008; Pedrini et al., 2009; Juárez et al., 2010). Los experimentos descriptos en esta tesis soportan el método de control propuesto y contribuyen a profundizar la comprensión de la dinámica poblacional de *T.infestans* en presencia de *B.bassiana*.

Los ensayos a campo fueron ejecutados en viviendas de la localidad de Salvador Mazza (Salta), donde predominan focos de insectos resistentes a insecticidas piretroides (Picollo et al, 2005). Luego de 2 meses de aplicación se obtuvo un porcentaje de mortalidad total (en relación al número de insectos vivos iniciales) de 67,65 %; discriminando entre adultos y ninfas la mortalidad fue de 81,9% y 53,4 % respectivamente (gráfico 3). La menor mortalidad observada en ninfas, se explica

porque los experimentos fueron realizados durante el periodo de mayor crecimiento de la población de estadios juveniles; en tanto que la población de insectos adultos no varía significativamente a lo largo del año (Castañera et al., 2003).

Los resultados de este trabajo son similares a los de ensayos previos efectuados en la misma localidad, en los cuales fueron utilizadas trampas sin el agregado de los extractos cuticulares (Pedrini et al., 2009). En esos experimentos, además del micoinsecticida, las trampas contenían una fuente que emitía CO₂ como señal volátil de atracción. Sin embargo, el mecanismo para generar CO₂, no resultó una herramienta práctica. A la fecha, aún no han sido diseñado dispositivos económicos y prácticos que emitan este compuesto de manera constante y puedan ser utilizados en trampas para atraer insectos. Los valores de mortalidad obtenidos en esta tesis, reemplazando un atrayente volátil de bajo peso molecular (CO₂), por uno no volátil (extractos cuticulares de *T.infestans*), sugieren la posibilidad de desarrollar atractantes específicos a partir de los extractos cuticulares con actividad feromona de agregación. Es importante mencionar que no existen reportes que involucren el uso de feromonas de agregación para el control de insectos en pruebas a campo. La mayoría de los estudios fueron focalizados en el uso de feromonas volátiles (de bajo peso molecular) debido a su capacidad de atracción a distancia. Las feromonas agregación (también denominadas de contacto) son sustancias de alto peso molecular y reducida volatilidad que actúan como señales químicas de contacto (Nojima et al., 2007). Ha sido demostrado que los lípidos cuticulares de insectos juegan un rol importante como feromonas de agregación en los insectos (Lockey, 1998). En distintas especies, estos compuestos comprenden mezclas de hidrocarburos que incluyen n-alcános, n-alquenos, monometilalcános, dimetilalcános y 16 trimetilalcános (Blomquist y Vogt, 2003). Investigaciones pioneras en este laboratorio, utilizando *T.infestans* como insecto modelo, determinaron que la fracción de los ácidos grasos libres, de los lípidos cuticulares, son reconocidos como las señales químicas con mayor actividad (Figueria

et al., 2009).

Las feromonas de agregación han sido relegadas como herramienta para el control de insectos, debido probablemente a su baja capacidad de atracción a distancia. Sin embargo, en *T.infestans* su comportamiento gregario podría beneficiar el empleo de estas feromonas. Por ejemplo, en nuestros experimentos los extractos cuticulares con actividad feromonas, contenidos en las trampas, aumentarían el tiempo de residencia del insecto dentro de las mismas, favoreciendo el contacto de los insectos con las esporas del micoinsecticida. Así, los insectos que ingresen a la trampa se contaminarían con una elevada carga de conidios y el proceso de infección resultaría más eficiente.

Por otro lado, es importante mencionar que la trampa de infección no es un método de captura; los insectos pueden entrar, contaminarse y salir libremente de la misma. Esta particularidad resulta sumamente ventajosa, ya que, un insecto contaminado puede regresar a su nido y diseminar los conidios por autodiseminación a otros insectos que eventualmente no hayan ingresado a la trampa, potenciando así la infección de la población.

La trampa de atracción-infección, es el único método de control biológico de triatomíneos resistentes comprobado en pruebas a campo. También es una herramienta transferible a toda la comunidad, pues su utilización resulta sencilla y segura (Environmental Protection Agency, USA). Sin embargo, aún no existe interés por parte de autoridades sanitarias (ANMAT) en para validar su uso a nivel nacional.

Dinámica poblacional de *T.infestans* en presencia de *B.bassiana*

Los modelos matemáticos pueden ser utilizados para simular el crecimiento de una población en presencia de factores que afecten su dinámica (Rabinovich, 1971). Distintos modelos han sido desarrollados para comprender la dinámica de los insectos vectores de la enfermedad del Chagas. Algunos de los cuales incluyen modelos tablas de vida, modelos logísticos y modelos de ciclos de vida (Rabinovich & Himschoot,

1990; Gorla, 1992; Cateñera et al., 2003). Otros modelos, fueron realizados con el objetivo de evaluar el efecto de insecticidas químicos en el la densidad poblacional de *T.infestans* y la transmisión de la enfermedad (Spagnuolo et al., 2011; Stevens et al., 2013). Respecto al control biológico, una simulación preliminar de la interacción vinchuca-agente de control biológico (la avispa *Telenomus fariai*), fue desarrollado por el Dr. Rabinovich (1971). Sin embargo, a la fecha aún no se han desarrollado modelos que simulen la dinámica poblacional de insectos vectores de la enfermedad del Chagas en presencia de hongos entomopatógenos.

Los modelos matriciales tales como los que se utilizan en poblaciones de plantas y animales, basados p.ej. en modelos matemáticos generales sobre la dispersión y propagación de hongos patógenos (Klanjscek, 2006; Caswell, 2007; Caswell, 2009) podrían ser utilizados para simular la interacción *T.infestans-B.bassiana*. Estos modelos son una importante herramienta teórica y analítica para estudios de la dinámica de poblaciones que incluyen estadios de desarrollo (Caswell, 2001). Si consideramos poblaciones estructuradas como la de triatominos (que incluyen huevos, estadios ninfales y adultos) su dinámica de crecimiento puede ser analizada utilizando estos modelos (Rabinovich & Himschoot, 1990).

En esta tesis se desarrolló un modelo matricial, considerando la probabilidad de que un insecto se contamine, ya sea, mediante el contacto con el micoinsecticida contenido en una trampa o por autodiseminación de las esporas entre los insectos. El modelo predice una disminución progresiva de la población en función del número de trampas y la probabilidad de que los insectos ingresen a las mismas (gráficos 5, 6 y 7). La capacidad de atracción de una trampa (probabilidad de ingreso) fue definida como alfa (α), cuyo valor, fue estimado en 0,58 (ecuación 3, sección Materiales y Métodos). Este valor de alfa se calculó en base a los datos de ensayos previos, los cuales, fueron ejecutados en unidades experimentales de 1m^3 , conteniendo sólo una trampa como única fuente de atracción para los insectos (Pedrini et al., 2009). Sin embargo,

es importante mencionar que el alfa estimado no es extrapolable a las condiciones de una vivienda habitada, debido, principalmente, a la presencia de numerosas fuentes de atracción y refugios disponibles para los insectos (compuestos volátiles emitidos por personas y/o animales, así como estructuras habitacionales y mobiliarios diversos). Por este motivo, se introdujo el concepto de eficacia, la cual se definió en forma de una constante ($0 < \text{eficacia} < 1$) que multiplica al valor α previamente calculado (0,58). Por ejemplo, una eficacia igual a 0,5 implica que en una población de 300 vinchucas (cantidad estimada para una vivienda habitada (Gürtler et al., 1992) el número de insectos contaminados por día, de acuerdo a la ecuación 4 (página 57), sería de 87/trampa. Conociendo que con valores de eficacias cercanas a 1 la capacidad de atracción de una trampa (α) resultaría similar a la estimada en las mencionadas unidades experimentales (Pedrini et al., 2009), en este trabajo las simulaciones se efectuaron con valores de eficacias entre 0,0006 y 0,01.

Los resultados indican que la eficacia debería ser mayor a 0,001 (0,058 % insectos infectados por trampa/día) para que el número de insectos de la población no se incremente (gráficos 5, 6 y 7). Suponiendo valores de eficiencia iguales a 0,005 (0,29 % insectos infectados por trampa/día), necesitaríamos al menos 10 trampas para lograr una disminución de la población (gráfico 6). Sin embargo, con este número de trampas se requieren más de 300 días para reducir la población al 50%. Manteniendo la misma eficacia, pero empleando 20 trampas, de acuerdo a la ecuación 4, el porcentaje de insectos contaminados por día resultaría mayor al 5 %, y la población se reduciría más del 50% luego de 100 días (gráfico 7). La marcada disminución en el número de insectos podría ser explicada, por efecto de la autodiseminación de las esporas y la menor de fecundidad de las hembras infectadas, como demostramos en los experimentos de laboratorio (tabla 3.C).

Considerando que las simulaciones, tanto del número de insectos como el valor de R_0 , fueron efectuadas suponiendo bajas probabilidades (valores de eficacia) de que un

insecto se contamine por el ingreso a la trampa, los datos obtenidos sugieren que el efecto de las trampas sobre la disminución de la población resultaría significativo. Debemos mencionar que la eficacia de una trampa podría ser optimizada mediante modificaciones en su diseño; la incorporación de cepas fúngicas más virulentas (que maten al insecto a tiempos menores) o el agregado de nuevos atractantes (que favorezcan el contacto de los insectos con el micoinsecticida contenido en las trampas).

Como se indica en la sección de resultados, el modelo desarrollado permitió estimar el efecto de la infección fúngica sobre la tasa neta de crecimiento poblacional (R_0). Este parámetro demográfico representa el número de hembras que reemplazará a cada hembra de la población en el lapso de una generación (equivalente al periodo comprendido entre el nacimiento de los estadíos adultos y el de la progenie) (Rabinovich 1969). Debemos mencionar que, un valor de R_0 menor a 1 indica que la población decrece en el lapso de una generación.

Las simulaciones efectuadas en esta tesis muestran que el crecimiento de la población resultaría significativamente afectado ($R_0 < 1$) con eficacias mayores a 0,001 (0,058 % insectos infectados por trampa/día) y al menos 20 trampas (gráfico 4). Manteniendo el mismo número de trampas pero suponiendo un valor de eficiencia superior a 0,002 (0,116 % insectos infectados por trampa/día) la disminución de la población en el lapso de una generación resultaría aún mayor ($R_0 < 0,5$).

Los efectos observados sobre el valor de R_0 sugieren que el empleo de las trampas de infección podría ser efectivo para disminuir el crecimiento de las poblaciones de *T.infestans* resistentes a insecticidas piretroides, en las cuales, fue reportado un valor de R_0 significativamente menor que en las poblaciones susceptibles a estos insecticidas (Genaro, 2012).

Si bien, en esta tesis no fueron presentados los análisis de sensibilidad (que determinan cual de los parámetros propuestos para el modelo matricial tienen mayor

impacto sobre el valor de R_0), una estimación preliminar determinó que el tiempo medio de los estadios adultos infectados ($G7^*07$ (ver matriz de proyección, página 60)) es el principal factor que incide en los valores de R_0 , y por lo tanto sobre el crecimiento poblacional. Esta información resultaría sumamente importante, ya que, para un control biológico exitoso podríamos optimizar las herramientas que favorezcan un aumento en la infección de los estadios adultos. Investigaciones realizadas por este laboratorio reportaron la presencia de feromonas sexuales de contacto en hembras de *T.infestans* (Cocchiararo-Bastías et al., 2011), las cuales, podrían ser incorporadas en las trampas para aumentar la permanencia de los insectos en su interior, favoreciendo el contacto con el micoinsecticida.

Por último, considerando que las simulaciones predijeron una disminución sobre la tasa de reemplazo poblacional (R_0) como en el número de insectos de una población hipotética, las predicciones del modelo podrían ser consideradas en un potencial manejo integrado de insectos vectores de la enfermedad del Chagas.

Los resultados obtenidos en esta tesis subrayan la importancia de uso de *B.bassiana* como herramienta complementaria para el control de *T.infestans*. Esta información es ciertamente transferible a otros triatomíneos de importancia vectorial en América Latina.

Interacción *B.bassiana*-deltametrina

Compatibilidad

La compatibilidad entre insecticidas químicos y hongos entomopatógenos ha sido ampliamente estudiada (Anderson & Roberts, 1983; Alves, 1998; Hiromori & Nishigaki, 2001; Schumacher & Poehling, 2011). La asociación de estos agentes podría ser una herramienta efectiva en el control integrado de insectos plagas y vectores, siempre que el o los insecticidas seleccionados no afecten la viabilidad, el desarrollo y el crecimiento de las esporas fúngicas (Alves, 1998). La germinación de las esporas es un evento crucial en las primeras etapas del desarrollo de la infección fúngica en el insecto huésped (Roberts & St Legar, 2004). Un elevado porcentaje de germinación puede incrementar la probabilidad de infección antes que las estructuras infectivas se separen de la cutícula (Altre et al., 1999). Cuando la germinación y penetración han tenido éxito, la velocidad y la intensidad del crecimiento vegetativo del hongo determinan la virulencia. Así, cualquier alteración en la germinación afectaría fuertemente la eficacia bioinsecticida de los hongos entomopatógenos (Anderson & Roberts, 1983).

En esta tesis se evaluó el efecto de la deltametrina sobre una cepa *B.bassiana* virulenta contra *T.infestans* (Pedrini et al., 2009). Se determinó una CI_{50} de 50ug de deltametrina/cm² (tabla 3.G), la cual, resultó 20 veces mayor que la dosis recomendada para el control *T.infestans* (Zerba et al., 1976a). En base a este resultado una combinación entre la cepa y el insecticida podría ser sugerida como herramienta para el control integrado de *T.infestans*.

La tolerancia de *B.bassiana* a los insecticidas piretroides varía en relación con la cepa, la identidad del compuesto químico y su concentración. Por ejemplo, a diferencia de nuestros resultados, fue comprobado que la deltametrina en dosis recomendada para el control de triatominos afectó significativamente la germinación de las esporas en una cepa de *B.bassiana* (Cazorla & Morales, 2010). En otros experimentos, utilizando

medios líquidos para el desarrollo de los conidios, fue observado que el porcentaje de germinación disminuye en función de la concentración de este insecticida luego de las 24 hs de crecimiento (Alzogaray et al., 1998; Ming Sun et al., 2011).

Como explicamos anteriormente el mecanismo de acción de los insecticidas piretroides implica alteraciones en los canales de sodio en el sistema nervioso de insectos. En los hongos entomopatógenos podríamos sugerir que actúan a nivel celular de una manera similar, afectando proteínas de membrana que tengan funciones análogas a la de los canales iónicos (Teng et al., 2008).

Por otro lado, ha sido reportado que los insecticidas piretroides incrementan significativamente las concentraciones celulares de EROS, los cuales, pueden contribuir a potenciar sus efectos letales (Sayeed et al., 2003; Yousef et al., 2006; Bashir et al., 2007). En hongos entomopatógenos, no existen estudios sobre los niveles de estrés oxidativo luego de su exposición a estos insecticidas.

Estrés oxidativo en *B.bassiana* inducido por deltametrina

Investigaciones realizadas en diferentes especies de hongos indican que tanto la germinación de las esporas como el crecimiento del micelio pueden ser disminuidos por estrés oxidativo (Belozerskaya & Gessler, 2007; Morano et al., 2012; Marcus Vinícius de Oliveira et al., 2013).

Es conocido que los EROS causan daño en diversas biomoléculas sustrayendo electrones para lograr su estabilidad (Lushchak VI., 2011; Morano et al., 2012). Los lípidos celulares, tanto los estructurales como los de reserva, son muy susceptibles a la acción de los radicales libres. Esta susceptibilidad se incrementa conforme aumenta el grado de insaturación de los ácidos grasos que los constituyen (Pamplona et al., 2002; Catalá, 2006). El daño oxidativo de los lípidos implica graves consecuencias para el funcionamiento celular (Aruoma, 1994; Bonorden & Pariza, 1994; Halliwell & Gutteridge, 1990). La peroxidación lipídica también ha sido sugerida como uno de los mecanismos involucrados en la toxicidad inducida por pesticidas (Banerjee et al.,

1999).

Los ácidos grasos fúngicos, son cuantitativa y cualitativamente muy variable de acuerdo a la especie, el estado de desarrollo del hongo, el sustrato nutritivo y las condiciones ambientales (Daum et al., 1999; Tuller et al., 1999). Estudios efectuados en este laboratorio determinaron un predominio de ácidos grasos insaturados oleico y linoleico en los lípidos totales de *B.bassiana* crecidas en un medio completo (Crespo, 2006). Este conocimiento podría sugerir una elevada sensibilidad a los EROS por parte de esta especie.

La cuantificación de TBARS es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para indicar la magnitud de los efectos del estrés oxidativo lípidos celulares (Pamplona et al., 2002; Catalá, 2006). En esta tesis reportamos un incremento significativo en la concentración TBARS sólo en los cultivos expuestos a dosis de deltametrina $\geq 250\text{ug}/\text{cm}^2$ (gráfico 13). Se ha comprobado que los niveles de TBARS pueden ser aumentados significativamente en tejidos de organismos superiores luego de su exposición a deltametrina (Kale et al., 1999; Sayeed et al., 2003; Yousef et al., 2006; Bashir et al., 2007). Este es el primer trabajo que relaciona la peroxidación lipídica y estrés oxidativo en un hongo entomopatógenos frente a un insecticida. Las altas dosis de deltametrina, requeridas para aumentar significativamente los niveles de TBARS, sugieren que la cepa es muy tolerante al estrés por el insecticida. La tolerancia podría ser debida a que tanto los sistemas metabólicos antioxidante como detoxificantes no sufren alteraciones significativas. No existen reportes acerca del rol de estos sistemas en hongos entomopatógenos expuestos a insecticidas.

Análisis de expresión de genes y enzimas del sistema antioxidante

Con el fin de evitar incrementos significativos en las concentraciones de EROs y daños subsiguientes a moléculas, las células pueden modificar las actividades de las enzimas antioxidantes y los patrones de transcripción de los genes que codifican para tales enzimas (Gasch & Werner-Washburne, 2002; Causton et al., 2012; Marcus

Vinícius de Oliveira et al., 2013).

Este es el primer reporte de la expresión de genes de los sistemas antioxidantes de un hongo entomopatógeno en presencia de un insecticida piretroide. Los resultados muestran una sobreexpresión en los genes *sod*, *cat* y *gpx* en los cultivos fúngicos crecidos con todas las dosis de deltametrina testeadas (gráfico 15), sugiriendo que la deltametrina induce la producción de EROS

Se observa que para *sod*, la expresión de *sod1* (que codifica para SOD-Cu-Zn) fue menor que la de *sod2* y *sod3* (codifican para la enzima superóxido dismutasa conteniendo manganeso (SOD-Mn).

En relación con nuestros resultados, investigaciones previas indican que en células de levaduras tanto *sod2* como *sod3* juegan un rol clave en la defensa contra EROS (Gralla and Valentine, 1991; Longo et al., 1996; Jeong et al., 2001). En *B.bassiana* fue demostrado que la actividad SOD está influenciada principalmente por los genes *sod2* y *sod3* (Xie X-Q et al., 2012). En otros hongos filamentosos, la expresión de estos genes también resultó inducida en presencia de plaguicidas (Marcus Vinícius de Oliveira et al., 2013).

Los genes que codifican catalasas fueron inducidos en presencia de deltametrina (gráficos 15). En este trabajo se cuantificó los niveles de expresión de 4 genes *cat* involucrados en la síntesis de diferentes catalasas identificadas en *B.bassiana*. Observamos que: *catB* (secretada) y *cat D* (secretada/citosólica) se indujeron más que *catA* (espora específico) y *catC* (citosólica), sugiriendo una participación activa en la respuesta al estrés por deltametrina. Investigaciones previas en *B.bassiana* reportaron que *catB* tiene un rol predominante en la actividad catalasa total. El gen *catD* estaría involucrada principalmente en la tolerancia a UV-B y en la virulencia contra los insectos (Wang et al., 2013). Aunque no pudimos medir la expresión de *catP* (peroxisomal), debido a fallas en los primers, estudios previos efectuados en nuestro laboratorio indican un rol clave de la catalasa peroxisomal en la vía oxidativa de

alcanos (Pedrini et al., 2006), sugiriendo que esta enzima podría estar involucrada en el catabolismo de insecticidas piretroides.

Las actividades de las enzimas antioxidantes no resultaron modificadas en presencia de deltametrina, aún en dosis superiores a la CI_{50} (gráficos 9, 10 y 11). Estos resultados podrían explicar la tolerancia de esta y otras cepa a las elevadas concentraciones del insecticida. No existen reportes acerca de las actividades de enzimas antioxidantes en hongos entomopatógenos expuestos a insecticidas. Sin embargo, en organismos superiores ha sido demostrado una disminución significativa en las actividades de alguna de estas enzimas en presencia de dosis crecientes de deltametrina (Sayeed et al., 2003; Yousef et al., 2006). Una disminución de la actividad CAT fue observada en plantas expuestas a deltametrina (Bashir et al., 2007). En nuestros experimentos, solo fue reportado una reducción en la actividad a la dosis más elevadas de deltametrina ($500\mu\text{g}/\text{cm}^2$), respecto a concentraciones menores (gráfico 10). Esta disminución podría haberse debido a un exceso de radical superóxido, los cuales en determinadas concentraciones pueden modificar la actividad catalasa (Kono & Fridovich, 1982; Hertwig et al., 1992). En contraposición, estudios previos en este laboratorio indican que en *B. bassiana* la actividad catalasa (tanto citosólica como peroxisomal) no resulta afectada a concentraciones de H_2O_2 de 40 nM (Pedrini et al., 2006), sugiriendo una elevada tolerancia a los radicales libres.

De la actividad SOD se desprende que, aún en las máximas concentraciones de deltametrina, la enzima mantiene un nivel de actividad similar a la de los cultivos controles (gráfico 9). Varios estudios han demostrado que la actividad de esta enzima es un mecanismo de los hongos en respuesta al estrés oxidativo, particularmente inducida por el anión superóxido (Gasch et al., 2000; Jeong et al., 2001; Marcus Vinícius de Oliveira et al., 2013).

Aunque las actividades de las enzimas antioxidantes no resultaron incrementadas significativamente en cultivos expuestos a deltametrina, la expresión de los genes

involucrados en su síntesis si resultó inducida (gráfico 15). En relación con estos resultados, ha sido propuesto que la inhibición de la síntesis de proteínas sería un mecanismo utilizado en la mayoría de las células sometidas a estrés oxidativo (Preiss et al., 2003; Smirnova et al., 2005). En células de levaduras fue reportado que algunos genes incrementan sus niveles de transcripción en presencia de H₂O₂; sin embargo la traducción a proteínas no se correlaciona con ese incremento (Shenton et al., 2006). Se sugiere que el aumento de los niveles de transcripción en ausencia de una traducción activa podría proporcionar una fuente de ARNm remanente, el cual, rápidamente sería traducido una vez que los niveles de EROs hayan disminuido (Shenton et al., 2006).

Análisis de expresión de genes y enzimas detoxificantes

Análisis de expresión de genes *cyp* y *eh*

Los hongos, generalmente, pueden metabolizar pesticidas y otros xenobióticos mediante la introducción de cambios estructurales en las moléculas diana (Diez, 2010). La degradación de un amplio espectro de pesticidas ha sido evaluada en distintas especies de hongos (Kulshrestha et al., 2000; Bending et al., 2002; Liang et al., 2005; Bhalerao & Puranik, 2007; Nian Li et al., 2009; Pinto et al., 2012). Respecto a los insecticidas piretroides, una piretroide hidrolasa fue purificada y caracterizada en una cepa del hongo *Aspergillus niger* (Liang et al., 2005). En el genoma de *B. bassiana* todavía no han sido identificados genes con secuencias de alta identidad a las de piretroide hidrolasas (Xiao et al., 2012), probablemente otras enzimas estén implicadas en el catabolismo de estos insecticidas.

Por otro lado, ha sido comprobado que la biodegradación de deltametrina, mediante hidrólisis, puede generar 3-fenoxibenzaldehído, un metabolito altamente tóxicos para las células (Yuan et al., 2010). En hongos entomopatógenos expuestos a deltametrina y se desconocen los mecanismos involucrados en la detoxificación de este compuesto. Las *CYP* y las *EH* constituyen importantes grupos de enzimas implicadas en las vías

metabólicas degradativas Fase I; su expresión es inducida por exposición a los xenobióticos (Guengerich, 2001; Peter Hlavica, 2013).

La sobreexpresión de genes *cyp* ha sido demostrada en diversas especies de insectos resistentes a deltametrina (Kasai, 2004). En este trabajo estudiamos el efecto de la deltametrina sobre los patrones de expresión de genes *cyp* y *eh*. Se observó un incremento significativo en la inducción de los genes en al menos una de las dosis de deltametrina testeadas, sugiriendo un rol activo en la detoxificación del compuesto (gráfico14). Ha sido determinado que la sobreexpresión de los genes *cyp* estaría relacionada con la presencia de la secuencia STRE (elemento de respuesta al estrés) en sus promotores (Swanson, 2002; Tsuchiya et al., 2003). Esta secuencia fue descrita en varios promotores de genes *cyp* en levaduras. Se sugiere que el elemento STRE juega un rol clave en la inducción de ciertos genes en respuesta a diferentes agentes xenobióticos y determinadas condiciones fisiológicas (Treger et al., 1998). En *B.bassiana*, investigaciones previas efectuadas en este laboratorio, revelaron la presencia de la secuencia STRE en los genes *cyp* implicados en el catabolismo de hidrocarburos cuticulares de insectos (Pedrini et al., 2010).

Es importante destacar que los genes *cyp52X1* y *cyp617N1* fueron los únicos que indujeron en más de 2 veces, sugiriendo un rol activo en el catabolismo del insecticida. Respecto a las funciones metabólicas de estos genes, trabajos realizados por nuestro grupo de investigación en colaboración con otras instituciones, determinaron que el gen *cyp52X1* juega un papel importante en la oxidación ácidos grasos de larga cadena, contribuyendo significativamente a la virulencia en *B.bassiana* (Zhang et al., 2012).

La detoxificación de insecticidas también puede ser mediada por enzimas EH (Smit, 2004). En *Phanerochaete chrysosporium*, un hongo filamentoso utilizado como modelo para el estudios del metabolismo secundario, fue reportado que distintas EHs están involucradas en el metabolismo de xenobióticos (Nian Li et al., 2009). En este tesis se

comprobó un aumento significativo en los patrones de expresión del gen homólogo a *eh* en cultivos expuestos al insecticida (gráfico 14), sugiriendo alguna participación en la vía degradativa de deltametrina.

En coincidencia con nuestros resultados, estudios previos en *B.bassiana*, indican que *eh* se expresó en más de 2 veces en los cultivos crecidos con hidrocarburos sintéticos de larga cadena similar a los de cutícula de insectos (Pedrini, 2006).

Glutación S Transferasa: Análisis de expresión génica y actividad enzimática

Las glutación-s-transferasas (GST) son enzimas que catalizan reacciones de Fase II y están implicadas en la conjugación del glutatión con diversos de sustratos (Sheehan et al., 2001; Vontas et al., 2001; Kostaropoulos et al., 2001). Las GSTs pueden unirse con diferentes afinidades a compuestos hidrófobos, como hidrocarburos aromáticos policíclicos e insecticidas piretroides (Kostaropoulos et al., 2001; Singh et al., 2009).

Los resultados de esta tesis muestran una sobreexpresión del gen *gst* en los cultivos expuestos a todas las dosis de deltametrina (gráfico 15). Respecto la actividad de la enzima se observa una marcada reducción en más de un 40% a concentraciones de deltametrina $\geq 50 \text{ ug/cm}^2$ (gráfico 12). No existen reportes respecto de actividad de esta enzima en hongos entomopatógenos expuestos a xenobióticos. No obstante, fue comprobado que las mismas pueden ser afectadas por estrés oxidativo debido a deltametrina y otros piretroides en tejidos de organismos superiores (Kale et al., 1999; Dubey et al., 2013). Se sugiere que los cambios en la actividad de GST, podrían ser debido a un exceso de ion peróxido, o a la acción de los pesticidas sobre la misma (Oruc & Uner, 2000). Fue demostrado que los grupos halógenos contenidos en las moléculas de los insecticidas piretroides pueden ser un blanco específico para las GST (Yu & Nguyen, 1996). Las GSTs ofrecen una protección pasiva hacia los insecticidas piretroides, uniéndose a ellos mediante un mecanismo secuestrante (Kostaropoulos et al., 2001). En base a estos conocimientos es razonable sugerir que

las GST funcionan como una proteína de unión, contribuyendo a la acción de otras enzimas que puedan estar involucradas en la degradación de piretroides.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En esta tesis se cuantificaron parámetros biológicos de la interacción entre *B.bassiana* y el insecto vector *T.infestans*. Además, se simuló la dinámica poblacional del insecto en presencia del micoinsecticida. Por otra parte, este es el primer reporte de la expresión de genes y enzimas de los sistemas detoxificantes y antioxidantes de un hongo entomopatógeno expuesto a un insecticida piretroide. En base a los resultados obtenidos y a las discusiones planteadas se formularon las siguientes conclusiones:

1)-*B.bassiana* GHA resultó altamente virulenta para todos los estadios de *T.infestans*. Además, la infección fúngica disminuye significativamente la capacidad reproductiva de las hembras.

2)-*B.bassiana* GHA, formulada en polvo de esporas y tierra de diatomea, mantiene su virulencia bajo condiciones ambientales variables de temperatura y humedad.

3)-La transmisión horizontal de esporas está asociada a la densidad de insectos en *T.infestans* y contribuye significativamente a la infección de la población.

4)-La trampa de infección, conteniendo feromonas cuticulares de *T.infestans* y esporas de *B.bassiana*, es el único método ecológico probado para el control de *T.infestans* resistentes y susceptibles al insecticida deltametrina.

5)-Las predicciones del modelo matricial reflejan un marcado descenso poblacional de *T.infestans* en función del número de trampas y subrayan la importancia de las mismas como herramienta complementaria para el control integrado de vinchucas.

6)-La expresión los genes *cyp* *gst* y *eh*, en cultivos expuestos a un amplio rango de

concentraciones de deltametrina, permite inferir que el insecticida podría ser metabolizado por *B.bassiana* GHA.

7)-Las actividades de las enzimas involucradas en la respuesta antioxidante no resultaron alteradas por exposición a deltametrina, sugiriendo que este insecticida no produce cambios metabólicos significativos en *B.bassiana* GHA.

8)-La peroxidación de los lípidos se observa solo a dosis del insecticida mayores que la CI_{50} , sugiriendo que la cepa GHA presenta una elevada resistencia al estrés por deltametrina.

9)-La respuesta bioquímica y molecular de *B.bassiana* GHA frente a deltametrina permitiría explicar la tolerancia observada en otras cepas expuestas a piretroides.

10)-El elevado valor de la CI_{50} de deltametrina (en relación a la dosis recomendada para el control de insectos triatominos) sugiere que *B.bassiana* GHA podría ser aplicada en combinación con el insecticida.

BIBLIOGRAFÍA

Akbar W., Lord J., Nechols J.R., Howard R.W., Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. J. Econ. Entomol., 2004. 97, 273-280.

Alexopoulos C.J., Mims C.W., Introducción a la Micología. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 1985.

Alzogaray R., Luz C., Ionizete G., Silva I., Lecuona R., Tigano M., Effect of Deltamethrin on Germination and Virulence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.on *Triatoma infestans* (Klug). An. Soc. Entomol. Brasil., 1998. 27: 663- 667.

Albert L.A., Alpuche L., Aranda H.E., Badillo F., Bárcenas P.C., Chediack R., Loera G.R., Pomares T.G., Rendón Von O.J., Viveros R.A., Los plaguicidas, el ambiente y la salud. Centro de Ecodesarrollo, México. 1990. Pp. 157-173.

Alconada T.M., Juárez M.P., Acyl-CoA oxidase activity from *Beauveria bassiana*, an entomopathogenic fungus. J Basic Microbiol., 2006. 46(6).

Altre J.A., Vanderberg J., Cantone F.A., Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. J. Invertebr.Pathol., 1999. 73:332-338.

Alves S.B., Haddad M.L., Faion M., de Baptista G.C., Rossi-Zalaf L.S., Novo índice biológico para classificação da toxicidade de agrotóxicos para fungos entomopatogênicos. In: X SICONBIOL, Brasília , 2007. Anais do X Siconbiol.

Alves, S.B., Fungos entomopatogênicos. En: Controle microbiano de insetos, S.B.

Alves, editor. São Paulo: Editora Manole, 1986.

Ambethgar V., Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management (IRM): A Review. *Journal of Entomological Research*, 2009. 26 (2): 1-7.

Andersen S.O., Cuticular sclerotization and tanning. In: Gilbert L.I., Iatrou K., Gill S.S., editors. *Comprehensive Molecular Insect Science*, 2005. Vol. 4. Elsevier; Oxford: 145-170.

Anderson T.E., Roberts D.W., Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleoptera:Chrysomelidae) control. *Journal of Economic Entomology*, 1983.76: 1437e1441.

Aruoma O.I., Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chemistry & Toxicology*, 1994. 32, 671-683.

Aud B.A., Mass production, formulation and application of fungi as biocontrol agents. En: Lomer C.J. & Prior C., editors. *Biological control of locusts and grasshoppers*. Wallingford, UK: CAB International, 1991. p. 219-229.

Bajan C., Fedorko A., Kmitowa K., Reactions of entomopathogenic fungi to pesticides. *Pol. Ecol. Stud.*, 1995. 21: 69-88.

Banerjee B.D., Seth V., Bhattacharya A., Pasha S.T., Chakraborty A.K, Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters*, 1999. 107.33-47.

Barbosa da Silva J., Prólogo En: Silveira AC (Ed.). La enfermedad de Chagas, a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. Buenos Aires. Organización Panamericana de la Salud / Fundación Mundo Sano. (2007).

Bashir F., Mahmooduz zafar, Siddiqi, Muhammad I., The antioxidative response system in *Glycine max* (L.)Merr. exposed to Deltamethrin, a synthetic pyrethroid insecticide. *Environmental Pollution*, 2007.147.94-100.

Bateman, R.P., Delivery systems and protocols for biopesticides. En: Hall, F.R. & Menn J.J., editors. *Biopesticides: use and delivery*, Totowa, NJ: Humana Press, 1998, p. 509-528.

Batista Filho A., Almeida JE., Lamas C., Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*, 2001.30: 437e447.

Beers R.F. and Sizer I.W., A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.*, 1952. 195:133-140.

Belozerskaya T.A. and Gessler N.N., Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: a review. *Appl Biochem Microbiol*, 2007. 43(5): 506e15.

Beltramo D., Arce C., Barra H., Tyrosination-detyrosination of tubulin and microtubules during the development of chick erythrocytes. *Mol. Cell. Biochem.*, 1989. 89:47-56.

Bending G.D., Friloux M., Walker A., Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiol Lett.*, 2002. 212:59-63.

Bhalerao T.S., Puranik P.R., Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungus isolate, *Aspergillus niger*. Int Biodeterior Biodegrad., 2007.59: 315-21.

Bidochka M.J., Khachatourians G.G., Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. J. Invertebr. Pathol., 1990. 56:362-370.

Bidochka M.J., Small, Ch. L., Phylogeography of *Metarhizium anisopliae* and insect pathogenic fungus. En: Vega, F. & Blackwell, M., Eds. Insect fungal associations, ecology and evolution, Oxford Univ. Press. N.Y., 2005. p.28-50.

Bidochka M.J., St. Leger R.J., Roberts D.W., Mechanisms of Deuteromycete fungal infections in Grasshoppers and Locusts: an overview. Memoirs Entomol.Soc.Can., 1997. 171:213-224.

Bidochka M.J., St. Leger, R.J., Joshi L., Roberts D.W., The rod let layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. Mycol. Res., 1995. 99:403-406.

Blanford, S., Thomas, M.B., Adult survival, maturation and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Journal of Invertebrate Pathology, 2001.78, 1–8.

Blomquist G.J, Nelson D.R., de Renobales M., Chemistry, biochemistry and physiology of insect cuticular lipids. Arch. Insect Biochem, 1987. Physiol. 6:227-265.

Blomquist G.J., Biosynthesis and ecdysteroid regulation of housefly sex pheromone

production. En: Blomquist, G.J., Vogt, R.G., editors. Insect pheromone biochemistry and molecular biology. Elsevier Academic Press: London, 2003 .p 231-252.

Blomquist G.J., Dillwith J.W., Cuticular lipids. En: Kerkut G.A., Gilbert L.I., editores. Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology.Vol 3. Pergamon Press: Oxford, 1985.p 117-154.

Blomquist G.J., Jackson L.L., Chemistry and biochemistry of insect waxes. Prog.Lipid. Res., 1979. 17: 319-345.

Bonorden W. R., Pariza M. W., Antioxidant nutrients and protection from free radicals. n F. N. Ketosis (Ed.), Nutrition toxicology, 1994. (pp. 19-45).

Boucias D.G., Latgé J.P., Non-specific induction of germination of *Coridiobolus obscurus* and *Nomuraea rileyi* host and non-host cuticle extracts. J. Invertebr. Pathol., 1988. 51:168-171.

Boucias D.G., Pendland J.C., Attachment of mycopathogens to cuticle. En: Cole, G.T. & Hoch H.C., editors. The fungal spore and disease initiation in plants and animals. New York: Plenum Press, 1991b, p. 101-127.

Boucias D.G., Pendland J.C., Insect-pathogen relationship. En: Boucias G.D. & Pendland J.C., editors. Principles of insect pathology. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998.

Boucias D.G., Pendland J.C., Ultrastructural studies on the fungus, *Nomuraea rileyi*, infecting the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. J. Invertebr. Pathol., 1982.

39:338-345.

Boucias D.G., Brasaemle D.L., Nation J.L., Lipid composition of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol., 1984. 43:254-258.

Boucias D.G., Pendland J.C., The fungal cell wall and its involvement in the pathogenic process in insect hosts. En: Latgé J.P. & Boucias D.G, editors. Fungal cell wall and immune response. Berlin: Springer-Verlag, 1991a. p. 303-316.

Boucias D.G., Stokes C., Storey G., Pendland J.C., The effect of imidacloprid on the termite *Reticulitermes Xavipes* and its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana*. Pflanzenschutz Nachr. Bayer, 1996. 49, 103-144.

Bouton C., Nitrosative and oxidative modulation of iron regulatory proteins. Cell. Mol. Life Sci, 1999. 55, 1043-1053.

Braga G.U.L., Flint S.D., Messias C.L., Anderson A.J., Roberts D.W., Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. Photochem Photobiol, 2001a. 73:140-146.

Braga G.U.L., Flint S.D., Messias C.L., Anderson A.J., Roberts D.W., Effects of uv-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. Mycol Res, 2001b. 105:874-882.

Braga G.U.L., Flint S.D., Messias C.L., Anderson A.J., Roberts D.W., Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the

entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Photochem Photobiol, 2001c. 74:734-739.

Brown R.E., Jarvis K.L., Hyland K.J., Protein measurement using bicinchoninic acid: Elimination of interfering substance. Anal. Biochem, 1989. 180: 136-39.

Buckner JS., Cuticular polar lipids of insects. In Insect Lipids. Chemistry, Biochemistry and Biology Edited by: Stanley-Samuelson DW, Nelson DR. Lincoln, University of Nebraska Press; 1993.227-270.

Burns C., Rachel Geraghty, Claire Neville, Alan Murphy, Kevin Kavanagh, Sean Doyle. Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from *Aspergillus fumigatus*. Fungal Genetics and Biology, 2005. 42,319-327.

Busi M.V., Maliandi M.V., Valdez H., Clemente M., Zabaleta E.J., Araya A., Gomez-Casati D.F., Deficiency of *Arabidopsis thaliana* frataxin alters activity of mitochondrial Fe-S proteins and induces oxidative stress. Plant J., 2006. 48, 873-882.

Butt T.M., Use of entomogenous fungi for the control of insect pests, In: Esser K., and Bennett J.W. (eds.), Mycota, Springer, Berlin, 2002, pp.111-134.

Butt T.M. , Goettel M.S., Bioassays of entomogenous fungi. Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. Ed. CAB International, 2000.141-195.

Calderón-Fernández G.M., Girotti J.R., Juárez M.P., Cuticular Hydrocarbons of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera:Reduviidae): Intraspecific Variation and Chemotaxonomy.J. Med. Entomol, 2011. 48(2):262-271.

Canale D.M., Carcavallo R.U., *Triatoma infestans* (Klug). Factores biológicos y ecológicos en la Enfermedad de Chagas (Eds R.U. Carcavallo, J.E. Rabinovich, R.J. Tonn). Servicio Nacional de Chagas (Argentina), Buenos Aires, Argentina, 1985. 237-250.

Castañera M. B., Aparicio J. P., Gürtler R. E., A stage-structured stochastic model of the population dynamics of *Triatoma infestans*, the main vector of Chagas disease. *Ecological Modelling*, 2003. 162:33-53.

Caswell H., Sensitivity Analysis of Transient Population Dynamics. *Ecology Letters*, 2007.10: 1-15.

Caswell H., Stage, Age and Individual Stochasticity in Demography. *Oikos*, 2009.118: 1763-1782.

Caswell H., *Matrix population models: construction, analysis and interpretation*, 2nd ed. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, 2001.

Catalá A., An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Review. Int J Biochem Cell Biol* vol., 2006. 38 p.1482 – 1482.

Causton H. C., Ren B., Koh S., Harbison C., Kanin E., Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.*, 2001. 12: 323-337.

Cazorla D. & Morales Moreno J., Compatibilidad de 13 aislamientos de *Beauveria bassiana* patógenos para *Rhodnius prolixus* (Triatominae) con insecticidas químicos.

Bol. Mal. Salud Amb, 2010.

Cecere M.C., Vazquez-Prokopec G.M., Gürtler R.E., Kitron U., Reinfestation Sources for Chagas Disease Vector, *Triatoma infestans*, Argentina. Emerging Infectious Diseases, 2006. 12(7): 1096-1101.

Charnley A.K., Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. En: Anderson J.M., Rayner A.D.M. & Walton D.W.H., editors. Invertebrate-microbial interactions: British Mycology Society Symposium 6. London: Cambridge University Press, 1984. p. 229-270.

Cho Y.W., Park, E.H., Fuchs J.A., Lim C.J., A second stress inducible glutathione S-transferase gene from *Schizosaccharomyces pombe*. Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr., 2002. 1574 (3), 399-402.

Choi J.H., Lou W., Vancura A., A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem., 1998. Nov 6; 273(45):29915-22.

Clark R.A., Casagrande R.A., Wallace D.B., Influence of pesticides on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the colorado potato beetle. Environmental Entomology, 1982. 11:67e70.

Cocchiararo-Bastias.LM., Mijailovsky S.J., Calderón-Fernández G.M., Lorenzo Figueiras A.N., Juárez M.P., Epicuticle lipids mediate mate recognition in *Triatoma infestans*. J Chem Ecol, 2011.37(3):246-252.

Cohen J.E., Gürtler R.E., Modeling Household Transmission of American Tripanosomiasis. *Science*, 2001. 293: 694-697.

Coon M.J., Ding X., Pernecky S.J., Vaz A.D., Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.*, 1992. 6:669-673.

Copping L.G., The manual of biocontrol agents, british crop protection council, crop protection, *Crop Prot.*, 2004. 23: 275-285.

Cox DR., Regression model and life tables. *J Roy Statist Soc B*, 1972.34: 187-220.

Crespo R., Bioquímica de la interacción Hongo entomopatogenos-Cuticula de triatomino. Tesis Doctoral, Facultad de ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de la Plata. 2006.

Crespo R., Juárez M.P., Cafferata L.F., Biochemical interaction between entomopatogenous fungi and their host-like hydrocarbons. *Mycologia*, 2000. 92:528-536.

Crespo R., Juárez M.P., Dal Bello G.M., Padín S.B., Calderón Fernández G.M. and Pedrini N., Increased Mortality of *Acanthoscelides obtectus* by Alkane-grown *Beauveria bassiana*. *BioControl*, 2002. 47(6): 685-696.

Dal Bello, G., Padín, S., López Lastra, C., Fabricio, M., Laboratory evaluation of chemical biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae L.*) in stored grains. *J. Stored Prod. Res.*, 2001. 37:77-84.

Daum G., Tuller G., Nemeč T., Hrašnik C., Balliano G., Cattell L., Milla P., Rocco T., Conzelmann A., Schuller J., Hojad U., Greiner E., Finger K., Yeast functional analysis reports: systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism. *Yeast*, 1999. 15:601-614.

De Oliveira R.C., Neves P., Compatibility of *Beauveria bassiana* with acaricides. *Neotropical Entomology*, 2004. 33: 353e358.

Delorme R., Fournier D., Bride J., Auge D., Berge D.W., Pesticide Biochemistry & Physiology, 1988. 32: 240-246.

Dias J.C.P., Parasitismo de fungos (*Beauveria bassiana*) sobre triatomíneos brasileiros criados em laboratório. *Atas Soc. Biol*, 1967.2: 85-87.

Dias JCP., Silveira AC, Schofield CJ., The impact of Chagas disease control in Latinoamerica. A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2002.97: 603 612.

Dias JCP., Enfermedad de Chagas: Las etapas recorridas y las perspectivas futuras. En: Silveira, AC (Ed). *La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral*. Buenos Aires. Organización Panamericana de la Salud / Fundación Mundo Sano, 2007.37-50.

Dias JCP., Aspectos del Chagas en la secuencia de su control. En Storino R. y Colaboradores. (Eds). *Chagas en el Siglo XXI. De la enfermedad a la problemática social*. Akadia Editorial. Buenos Aires, 2010. 25-36.

Díaz A., Rangel P., Montes de Oca, Y., Lledías F., Hansberg W., Molecular and kinetic

study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001.31:1323-1333.

Diez M.C., Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. *J Soil Sci Plant Nutr*, 2010.10:244-67.

Duarte A., Menendez J.M., Triguero N., Estudio preliminar sobre la compatibilidad de *Metarhizium anisopliae* con algunos plaguicidas químicos. *Revista Baraco*, 1992. 22:31e39.

Dubey N., Raina R., Khan A.M., Sub-acute Deltamethrin and Fluoride Toxicity Induced Hepatic Oxidative Stress and Biochemical Alterations in Rats. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2013. 91:334-338.

Environmental Protection Agency. *Beauveria bassiana* strain GHA (128924) Fact Sheet.©2001 [updated 2011 February 17] At:http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_128924.htm#environmentrisk. Accessed February 16, 2011.

Ekesi S., Maniania N.K., Susceptibility of *Megalurothrips sjostedti* developmental stages to *Metarhizium anisopliae* and the effects of infection on feeding, adult fecundity, egg fertility and longevity. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2000. 94, 229–236.

Esterbauer H., Estimation of peroxidative damage. A critical review *Pathologie Biologie*, 1996. 44 pp. 25-28.

Estrada J., López M.T., Los bioplaguicidas en la agricultura sostenible cubana [en línea]. Agroecol. Des., 1997. 11/12.

Fabro J., Sterkel M., Capriotti N., Mougabure Cueto G., Germano M., Rivera Pomar R., Ons S., Identification of a point mutation associated with pyrethroid resistance in the paratype sodium channel of *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease infection. Genetics and Evolution, 2012. 12, 2.

Fang, W., Leng, B., Xiao, Y., Yin, K., Ma, J., Fan, Y., Feng, X., Yang, X., Zhang, Y., Pei, Y., Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. Appl. Environ. Microbiol., 2005. 71: 363-370.

Fargues J., Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. En: Roberts, D.W. & Aist, J.R, editors. Infection processes of fungi. New York: Rockefeller Foundation, 1984, p. 90-110.

Fargues J., Delmas, J.C., Auge, J., Lebrun, R.A., Fecundity and egg fertility in the adult colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) surviving larval infection by the fungus *Beauveria bassiana*. Entomologia Experimentalis Applicata, 1991.61, 45–51.

Fargues J., Delmas, J.C., Lebrun, R.A., Leaf consumption by larvae of the coloradopotato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*) infected with the entomopathogen *Beauveria bassiana*. Journal of Economic Entomology, 1994. 87, 67–71.

Faria M.R., Wraight S.P., Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biol. Control, 2007. 43, 237-256.

Feng M.G., Poprawski, T.J., Khachatourians, G.G., Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Sci. Technol.*, 1994. 4:3-34.

Fernandez S., Groden E., Vandenberg J.D., Furlong M.J., The effect of mode of exposure to *Beauveria bassiana* on conidia acquisition and host mortality of colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Invertebr. Pathol.*, 2001. 77: p. 217-226.

Fernández-Larrea Vega O., La reproducción de los hongos entomopatógenos y antagonistas: experiencia cubana. Capacitación Productos Fitosanitarios No Sintéticos. Proyecto NOQ-CATIE/GTZ, 2001.

Finney D.J. and Stevens W.L., A table for the calculation of working probits and weights in probit analysis. *Biometrika*, 1948. 35(1-2): 191-201.

Furlong M.J, Pell JK., Horizontal transmission of entomopathogenic fungi by the Diamond back moth. *Biol Control*, 2001. 22(3):288-299.

Furlong, M.J., Pell, J.K., Interactions between Entomopathogenic Fungi and Arthropod Natural Enemies. En: Vega, F. & Blackwell, M., Eds. *Insect fungal associations, ecology and evolution*, Oxford Univ. Press. N.Y., 2005 .Pag. 51-73.

Gasch A. P., and Werner-Washburne M., The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct. Integr. Genomics*, 2002. 2: 181-192.

Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel., Eisen M. B., Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol.*

Biol. Cell, 2000. 11: 4241-4257.

Germano, Mónica Daniela, Herencia y efectos demográficos de la resistencia a deltametrina en *Triatoma infestans*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires. 2012.

Goettel M.S., Johnson D.L., Inglis G.D., The role of fungi in the control of grasshoppers. Can. J. Bot., 1995. 73:S71-S75.

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

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

Gorla D. E., Population dynamics and control of *Triatoma infestans*. Medical and Veterinary Entomology, 1992. 6:91-97.

Gorla D. E., Schofield C. J., Population dynamics of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in the Argentine Chaco. Medical and Veterinary Entomology, 1989.3:194.

Gralla E.B., Valentine J.S., Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu, Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. J. Bacteriol., 1991. 173, 5918-5920.

Guengerich F.P., Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 2001.14:611-650.

Gürtler R.E., Cecere M.C., Rubel D.N., Schweigmann N.J., Determinants of the domiciliary density of *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. *Medical and Veterinary Entomology*, 1992. 6: 75-83.

Gürtler R.E., Petersen R.M., Cecere M.C., Schweigmann N.J., Chuit R., Gualtieri J.M., Wisnivesky-Colli C., Chagas disease in north-west Argentina: risk of domestic reinfestation by *Triatoma infestans* after a single community-wide application of insecticides. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1994. 88: 27-30.

Gürtler R.E., Cecere M.C., Petersen R.M., Rubel D.N., Schweigmann N.J., Chagas disease in a north-west Argentina: association between *Trypanosoma cruzi* parasitaemia in dogs and cats and infection rates in domestic *Triatoma infestans*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1993. 87: 12-15.

Gürtler R.E., Cohen E., Cecere M.C., Lauricella M.A., Chuit R., Segura E.L., Influence of humans and domestic animals on the household prevalence of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* populations in northwest Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1998. 58(6): 748-758.

Gürtler R. E., Cecere M. C., Lauricella M. A., Cardinal M. V., Kitron U., Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*, 2007.134:69-82.

Gürtler R. E., Cecere M. C., Lauricella M. A., Petersen R. M., Chuit R., Segura E. L., Cohen J.E., Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2005. 73:95-103.

Gutierrez A. M., Reboredo G. R., Catala A., Fatty acid proles and lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from liver, heart and brain of *Cairina moschata*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2002. 34,605-612.

Habig W., Pabst M.J., Jakoby W.B., Glutathione-S-Transferases. *Biol. Chem.*, 1974. 249:7130-7139.

Hajek A.E., Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Advances in Microbial Ecology*, 1997. 15:193-249.

Hajek A.E., St. Leger R.J., Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.*, 1994. 39:293-322.

Halden R.U., Tepp S.M., Halden B.G., Dwyer D.F., Degradation of 3-phenoxybenzoic acid in soil by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310 (pPOB) and two modified *Pseudomonas strains*. *Appl Environ Microbiol*, 1999. 65:3354-3359.

Halliwell B., Gutteridge J. M. C., *Free radicals in biology and medicine* (third edition). Midsomer Norton, Avon, England: Oxford University Press. 1999.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*, second

ed. Clarendon Press, Oxford, 1991. pp. 86-187.

Hancock J., Desikan J., Bright J., Hooley R., Neill S., Doing the unexpected: proteins involved in hydrogen peroxide perception. *J. Exp. Bot.*, 2006. 57, 1711-1718.

Hardstone M.C., Leichter C.A., Scott J.G., Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, *kdr* and cytochrome P450-monoxygenase detoxification, in mosquitoes. *J. Evol. Biol.*, 2009. 22:416–423.

Head S. W., Composition of pyrethrum extract and analysis of pyrethrins, pp. 25-55. En J. E. Casida (ed.), *Pyrethrum, the natural insecticide*. Academic Press., 1973.

Hemingway J. and H. Ranson., Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology.*, 2000. 45: 371-391.

Hertwig B., Streb P., Feierabend D., Light Dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol.*, 1992. Vol.100.

Hiromori H., Nishigaki J., Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. *Applied Entomology and Zoology*, 2001. 36: 231e236.

Hoppert M., Gentsch C., Schorgendorfer K., Structure and localization of cyclosporin synthetase, the key enzyme of cyclosporin biosynthesis in *Tolypocladium inflatum*. *Arch. Microbiol.*, 2001. 176:285-293.

Howard D., Miller J.D., Human and animal relationships. En: Esser, K. & Lemke, P.A., editors. The mycota: a comprehensive treatise of fungi as experimental systems for basic and applied research. Berlin: Springer Verlag, 1996, v. 6.

Howse P.E., Pheromones and behaviour. In: Howse, P.E., Stevens, I., Jones, O.T. (Eds.), Insect Pheromones and their Use in Pest Management. Chapman & Hall, London, 1998.1-130.

Hu G., St. Leger R.J., Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. Appl. Environ. Microbiol., 2002. 68:6383-6387.

Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H., Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. Fungi as Biocontrol Agents. Ed. CAB International, 2001.23-67.

Inglis P.W., Aragão L., Frazão B.P., Magalhães M.C., Valadares-Inglis M.C., Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. acridum strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. FEMS Microbiol. Lett., 2000.191:249-254.

Jenkins N.E., Goettel G., Methods for mass-production of microbial control agents of grasshopper and locusts. En: Goettel, M.S. & Johnson, D.L., editors. Microbial control of grasshoppers and locusts. Memoirs Entomol. Soc. Can., 1997. 171:37-48.

Jeong J.H., Kwon E.S., Roe J.H., Characterization of the manganese-containing superoxide dismutase and its gene regulation in stress response of *Schizosaccharomyces pombe*. Biochem. Biophys. Res. Commun, 2001. 283, 908-914.

Johnson D.R., Knoll L.J., Levin D.E., Gordon J.L., *Saccharomyces cerevisiae* contains four fatty acid activation (FAA) genes: an assessment of their role in regulating protein N-myristoylation and cellular lipid metabolism. *J Cell Biol*, 1994. 127:751-762.

Juárez M.P., Composición de efecto insecticida, método de aplicación. Patente #249780, Argentina. 1996.

Juárez M.P., Ayala S., Brenner R.R., Methyl branched fatty acid biosynthesis in *Triatoma infestans*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 1996. 26: 593-598.

Juárez M.P., Calderón Fernández G., Cuticular hydrocarbons of triatomines (review). *Comp. Biochem. Physiol.*, 2007. 147(3) A:711-730.

Juárez M.P., Chase J., Blomquist G.J., A microsomal FAS from the integument of *Blattella germanica* integument synthesizes pheromone and methylbranched hydrocarbon precursors. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992. 293: 333-341.

Juárez M.P., Pedrini N., Girotti J.R., Mijailovsky S.J., Pyrethroid resistance in Chagas disease vectors: The case of *Triatoma infestans* cuticle. *Resistance Pest Management Newsletter*, 2010. 19(2):59-61.

Juárez M.P., Pedrini N., Girotti J.R., Mijailovsky S.J. and Lorenzo Figueiras A.N., Trap for hematophagous insects, control method and method of detection of *Triatoma infestans*. Patent pending, Argentina, AR068790 INPI. *Boletín* 568:5. (2008). Spanish.

Juárez M.P., Brenner, R.R., The epicuticular lipids of *Triatoma infestans* II Hydrocarbon dynamics. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1985. 82B:793-803.

Juárez M.P., Blomquist G.J., Schofield C.J., Cuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans* and *Triatoma mazzottii*. Comp. Biochem. Physiol., 1993. 106B:667-674.

Juárez M.P., Blomquist G.J., Schofield C.J., Hydrocarbons of *Rhodnius prolixus*, a Chagas disease vector. Comp. Biochem. Physiol., 2001. 129B:733-746.

Juárez M.P., Brenner R.R., Labayén I.L., Gros E.G., Bioquímica del ciclo evolutivo del *Triatoma infestans*. VII. Composición de los lípidos de la superficie de la cutícula extraíbles con hexano. Acta Physiol. Pharm. Latinoam., 1984. 35:223-236.

Juárez M.P., Fernández R., Schofield C.J., Dujardin J.P., Intergeneric comparison of epicuticular hydrocarbons in Triatominae. Res. Rev. Parasitol., 2000. 60:121-127.

Juárez M.P., Hydrocarbon biosynthesis in *Triatoma infestans* eggs. Arch. Insect Biochem. Physiol. 1994b. 25, 193-206.

Juárez M.P., Inhibition of cuticular lipid synthesis and its effect on insect survival. Arch. Insect Biochem. Physiol., 1994a. 25:177-191.

Juárez M.P., Pedrini, N., Crespo, R., Mycoinsecticides against Chagas disease vectors: Biochemistry involved in insect host hydrocarbon degradation. En: Mas-Comas, S., editor., Multidisciplinary for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases Bologna: Monduzzi Editore. 2004.p 137-142.

Juárez M.P., The effect of sublethal doses of insecticides on *Triatoma infestans* lipid synthesis. Pest, Biochem., 1995.52:81-89.

Jurenka R., Insect pheromone biosynthesis. Topics in Current Chemistry, 2004. 239:97-132.

Kaaya G.P., Munyinyi, D.M., Biocontrol potential of the entomogenous Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. J. Invertebr. Pathol., 1995. 66:237-241.

Kaaya G.P., Hassan S., Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. Exp. Appl. Acarol., 2000. 24, 913-926.

Kale M., Rathore N., Jone S., Bhatnagar D., Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen specie. Toxicol. Lett., 1999. 105, 197-205.

Kanzok S.M., Jacobs-Lorena M., Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. Trends Parasitol., 2006. 22, 49-51.

Kasai S., Role of cytochrome P450 in mechanism of pyrethroid resistance. J. Pestic. (2004). Sci., 29:220-221.

Khan S., Lihua G., Yushanjiang M., Mahmut M., Dewen Q., Entomopathogenic Fungi as Microbial Biocontrol Agent, Molecular Plant Breeding, 2012. Vol.3, No.7 63-79.

Khan SU, Bekhi RM, Tapping RI, Akhbar M.H., Deltamethrin residues in an organic soil under laboratory conditions and its degradation by bacterial strain. J Agric Food Chem., 1988.36:636-638.

Klanjscek T., Caswell H., Neubert M.G., Nisbet R.M., Integrating dynamic energy budgets into matrix population models. *Ecological Modelling*, 2006. 196 (3-4): 407-420. {80277}.

Klaric M.S ,Pepeljnjak S., Bovericin: kemizam, bioloski aspekti rasirenost [Beauvericin: chemical and biological aspects and occurrence] *Arh. Hig.Rada Toksikol.*, 2005. 56:343-350.

Kono Y., Fridovich I., Superoxide radical inhibits catalase. *Journal of Biological Chemistry*,1982. 257, 5751e5754.

Kostaropoulos, A.I. Papadopoulos, A. Metaxakis, E. Boukouvala, Papadopoulou-Mourkidou E., Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2001.313-319.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., Zoric, N., The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.*, 2006. 27:95-125.

Kulshrestha G, Singh SB, Lal SP, Yaduraju NT., Effect of long-term application of pendimethalin: enhanced degradation in soil. *Pest. Manag. Sci.*, 2000;56: 202-6.

Lardeux, F., S. Depickère, S. Duchon, Chavez T., Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. *Tropical Medicine and International Health*, 2010. 15:1037-1048.

Latge J., Moletta R., *Biotechnology*. En: Sampson R.A., Evans, H.C., Latge, J.P.,

editors. Atlas of entomopathogenic fungi, Berlin: Springer Verlag, 1988.

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

Lecuona R., Rôle des lipides épicuticulaires des insectes dans la pathogenèse des hyphomycètes. Francia: Université Pierre et Marie Curie, Paris VI. 1989. Tesis doctoral.

Lecuona, R., Riba, G., Cassier, P., Clement, J.L., Alterations of insect epicuticular hydrocarbons during infection with *Beauveria bassiana* or *B. brongniartii*. J. Invertebr. Pathol., 1991. 58:10-18.

Lecuona, R.E., Díaz, B.M., Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) a los hongos entomopatógenos *Nomuraea rileyi*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. RIA, INTA, Argentina, 2001. 30(1): 25-42.

Lecuona, R.E., Clement, J-L., Riba, G., Joulie, C., Juárez, M.P., Spore germination and hyphal growth of *Beauveria sp.* on insect lipids. J. Econ. Entomol., 1997. 89:119-123.

Lecuona, R.E., Edelstein, J.D., Berretta, M.F., La Rossa, F.R., Arcas, J.A., Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potencial agents of control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). J. Med. Entomol., 2001. 38:172-179.

Lecuona R.E., Hongos entomopatógenos. En: Lecuona, R.E., editor. Microorganismos patógenos empleados en el control de insectos plaga, Buenos Aires: M.Mas, 1996, p. 143-150.

Lecuona, R.E., Turica, M., Tarocco, F., Crespo, D.C., Microbial control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected strains of *Beauveria bassiana*. J. Med. Entomol., 2005. 42:332-336.

Lefkovitch L., The study of population growth in organisms grouped by stages. Biometrics, 1965.21:1-18.

Liang W.Q., Wang Z.Y., Li H, Wu PC, Hu J.M., Luo N., Purification and characterization of a novel pyrethroid hydrolase from *Aspergillus niger* ZD11. J Agric Food Chem., 2005.53:7415-20.

Lockey KH: Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. Comp Biochem Physiol B, 1998. 89:595-645.

Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J., Thomas M., Biological control of locust and grasshoppers. Annu. Rev. Entomol., 2001. 46:667-702.

Longo, V.D., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. J. Biol. Chem. 1996. 271, 12275-12280.

López Lastra, C.C., Scorsetti, A.C., Hongos Entomophthorales patógenos de insectos de la República Argentina. Rev. Biol. Trop., 2002.

López Lastra, C.C., Hongos entomopatogenos para control biológico de insectos de interés sanitario: estado de avance. Rev. Soc. Ent. Argen., 1999. 58:312-315.

Lord J.C., Desiccant dusts synergize the effect of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) on stored-grain beetles. J. Econ. Entomol., 2001. 94, 367-372.

Lord, J.C., Desiccation increases the efficacy of *Beauveria bassiana* for stored grain pest insect control. J. Stored Prod. Res., 2007.43, 535-539.

Lorenzo F., Girotti J.R., Mijailovsky S.J., Juárez M.P. Epicuticular lipids induce aggregation in Chagas disease vectors. Parasite & Vectors, 2009. 2:8.

Lund A. E., Insecticides: effects on the nervous system, En G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (eds.), Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Pergamon Press, Gran Bretaña. 1985.

Lushchak V.I., Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol., 2011 Mar; 153(2):175-90.

Luz C, Mnyone LL, Russell TL., Survival of anopheline eggs and their susceptibility to infection with *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* under laboratory conditions. Parasitol Res. 2011; 109(3):751-758.

Luz, C., Fargues, J., Romaña, C., Influence of starvation and blood meal-induced moult on the susceptibility of nymphs of *Rhodnius prolixus* Stål (Hem., Triatominae) to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.infection. J. Appl. Entomol., 2003. 127:153.

Luz, C., Tigano, M.S., Silva, I.G., Cordeiro, C.M.T., Aljanabi, S.M., Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to control *Triatoma infestans*. Mem. Inst. O. Cruz, 1998. 93:839-846.

Maniania N.K., Ekesi S., Adedapo O., Okech M. A., Nadel D.J., Prospects of a fungus-contamination device for the control of tsetse fly *Glossina fuscipes fuscipes*. *Biocontrol Sci. Techn.*, 2006. 16(1/2):129-139.

Maniania N.K, Takasu K., Development of microbial agents at the centre for insect physiology and ecology. *Bulletin of the Institute of Tropical Agriculture.*, 2006:291-299.

Marcus Vinícius de Oliveira, Ana Claudia de Freitas Oliveira, Cláudio S. Shida, Regina Costa de Oliveira, Luiz R. Nunes., Gene expression modulation by paraquat-induced oxidative stress conditions in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet.Biol.*, 2013

Marklund S.L. and Marklund G., Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.*, 1974. 47:469-474.

Marmunti M., Catala A., Non-enzymatic lipid peroxidation of rat liver nuclei and chromatin fractions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1998. 30, 967-972.

Michiels C., M. Raes, O. Toussaint., Remacle J., Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 1994. 17: 235-248.

Mikami,Y., Fukushima, K., Arai, T., Abe, F., Shibuya, H., Ommura, Y., Leucinostatins, peptide mycotoxins produced by *Paecilomyces lilacinus* and their possible roles in fungal infection. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*, 1984. 257:275-83.

Ming Sun, Qiao yun Ren, Zhijie Liu, Gui quan Guan, Hui tian Gou, Miling Ma, You quan Li, Aihong Liu, Jifei Yang, Hong Yin, Jian xun Luo., *Beauveria bassiana*: Synergistic effect with acaricides against the tick *Hyalomma anatolicum* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology.*, 2011.128.192-195.

Morano Kevin A., Chris M. Grant, Scott Moye-Rowley W., The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2012. Vol. 190, 1157-1195.

Napolitano R., Juárez M.P., Entomopatogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997. 344: p. 208-214.

Natvig D.O., Sylvester K., Dvorachek W.H., Baldwin J.L., Superoxide dismutases and catalases. En: Brambl R, Marzluf, G.A., editores. *The Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology*. Berlin: Springer-Verlag., 1996. p 191-209.

Nian L., Yizheng Z., Hong F., Biochemical characterization and transcriptional analysis of the epoxide hydrolase from white-rot fungus *phanerochaete chrysosporium*. *Acta Biochim Biophysin.*, 2009. | Volume 41 | Issue 8 | Page 639.

Nielsen K., Nicholson R.L., Carver T.L.W., Kunoh H., Oliver, R.P., First touch: an immediate response to surface recognition in conidia of *Blumeria graminis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 2000. 56:63-70.

Nojima S., Shimomura K., Honda H., Yamamoto I., Ohsawa K., Contact sex pheromone components of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. *J. Chem. Ecol.* 2007.33: 923-933.

Oliveira D., Alves L., Interacao do fungo *Beauveria bassiana*. (Bals)Vuill. com terra diatomacea para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), o cascudinho dos aviarios. BioAssay 2, 6. 2007.

OMS. Enfermedad de Chagas: control y eliminación. Informe de Secretaría. (2009).

Ortiz-Urquiza, A. and Keyhani, N.O., Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle, Insects., 2013. 4:357-374.

Oruc E.O., Uner N., Combined effects of 2,4-D and azin- phosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. Comp. Biochem. Physiol. Part C., 2000.127, 291-296.

Pachamuthu P., Kamble S.T., In vivo study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 with sublethal doses of chlorpyrifos, propetamphos, and cyuthrin against German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). Journal of Economic Entomology., 2000. 93:60e70.

Pamplona R., Barja G., Portero-Otin M., Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation? Annals of the New York Academy of Sciences, 2002.959, 475-490.

Paris S., Debeaupuis J.P., Crameri R., Carey M., Charles F., Prevost M.C., Schmitt C., Philippe B., Latge J.P., Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. Appl Environ Microbiol, 2003. 69:1581-1588.

Pedrini N., Crespo R., Juárez M.P., Biochemistry of the insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. Comp Biochem Physiol C, 2007, 146:124-137.

Pedrini N., Mijailovsky S.J, Girotti J.R, Stariolo R., Cardozo R.M., Gentile A., Juarez M.P., Control of pyrethroid resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. PLoS Negl Trop Dis., 2009. 3(5):e434.

Pedrini N., Ortiz-Urquiza A., Huarte-Bonnet C., Zhang S., Keyhani N.O., Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. Front Microbiol 4:24. doi:10.3389/fmicb. 2013. 00024 (2013).

Pedrini N., Zhang S., Juárez M.P., Keyhani N.O., Molecular characterization and expression analysis of a suite of cytochrome P450 enzymes implicated in insect hydrocarbon degradation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Microbiology, 2010. 156:2549-2557.

Pedrini, N. 2006. Enzimas fúngicas involucradas en el catabolismo de hidrocarburos. Su aplicación a la optimización de bioinsecticidas. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Pedrini N., Dal Bello G., Padín S., Juárez M. P., Capacidad insecticida de *Beauveria bassiana* cultivada en hidrocarburos para el control de coleópteros en granos almacenados. Agrociencia Uruguay, 2011. Volumen 15 1:64-69 - enero-junio.

Pereira R.M., Roberts D.W., Dry mycelium preparations of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol., 1990. 56:39-46.

Perry S., Yamamoto Y., Ishaaya I., Insecticides in agriculture and environment. Retrospects and prospects. Springer. India. 1998.

Peter Hlavica., Evaluation of structural features in fungal cytochromes P450 predicted to rule catalytic diversification. *Biochimica et Biophysica Acta* 1834. 2013. 205-220.

Phillips T.W., *Semiochemicals of Stored-product Insects: Research and Applications*. J. Stored Prod. Res. 1997. 33: 17-33.

Picollo M.I., Vassena C.V., 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* 1995 42: 637-642.

Pinto A.P., Serrano R., Pires D., Mestrinho N., Dias L., Martins Teixeira F., Caldeira T., Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures. *Science of the Total Environment*. 2012. 435: 402-410.

Preiss T., Baron-Benhamou J., Ansorge W., and Hentze W., Homodirectional changes in transcriptome composition and mRNA translation induced by rapamycin and heat shock. *Nat. Struct. Biol.*, 2003. 10: 1039-1047.

Prior C., Bateman R.P., Moore D., *Entomopathogenic sprays*. 1995, UK Patent GB2255018B, 36.

Qian L., Sheng-Hua Y., Jin-Gen L., Chao T., Ming-Guang F., Insight into the transcriptional regulation of Msn2 required for conidiation, multi-stress responses and virulence of two entomopathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 2013. 54, 42-5.

Quesada-Moraga E., Santos-QuiroR., Valverde-Garcia P., Santiago-Alvarez C.,

Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (Anamorphic fungi) on the *German cockroach* (Blattodea: Blattellidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 2004. 87, 51–58.

Quesada-Moraga E., Santos-Quiro´R., Valverde-Garcia P., Santiago-Alvarez C., Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 2008. 47 115–124.

Quesada-Moraga, E., Vey, A., Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycol Res*, 2004. 108:441-452.

Quintela E.D., McCoy W., Synergistic eVect of Imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behaviour and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Col.: Curculionidae) in soil. *J. Econ. Entomol.*, 1998. 91, 110-122.

Rabinovich J.E., Simulación en una computadora digital de la regulación poblacional de triatomínos vectores de la enfermedad de Chagas, por el parásito *Telenomus fariai* (Hymenoptera: Scelionidae), y de las estrategias para el control integrado. *Revista Peruana de Entomología*, 1971. 14: 117-126.

Rabinovich J. E., Contribución al estudio de la dinámica de poblaciones. I. Análisis poblacional de *Nasonia vitripennis* Walk. (Hymenoptera: Pteromalidae). *Acta Biol. Venez.*, 1969. 6(1): 68-81.

Rabinovich J. E., The applicability of some population growth models to a single species laboratory population. *Annals of the Entomological Society of America*, 1969.

62:437-442.

Rabinovich J.E., Valor reproductivo: un parámetro poblacional útil en el control de insectos perjudiciales. *Acta Biologica Venezuelana*. 1972a. 8:25-34.

Rabinovich J.E., Vital statistics of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae) under laboratory conditions. I. *Triatoma infestans* Klug. *Journal of Medical Entomology*, 1972b. 9:351-370.

Rabinovich J. E., Himschoot P., A population dynamics simulation model of the main vectors of Chagas' Disease transmission, *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *Ecological Modelling*. 1990. 52:249-266.

Rehner S.A., Phylogenetic of the insect pathogenic *Beauveria bassiana*. En: Vega, F. & Blackwell, M., Eds. *Insect fungal associations, ecology and evolution*. Oxford Univ. Press. N.Y., 2005. p. 3-28.

Rivera M., Bustillo P., Marin M., Compatibilidad de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. En mezcla con insecticidas usados en el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Rev. Colomb. Entomol.*, 1994 . 20: 209-214.

Roberts D.W., St. Leger R.J., *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*, 2004. 54: 1e70.

Roberts D.W., Humber R.A., Entomogenous fungi. En: Cole, G.T. & Kendrick, B.C., editors. *Biology of conidial fungi*, New York: Academic Press, 1981.p. 201-236.

Roberts D.W., Hajek A.E., Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. En: Leatham, G.J., editor. *Frontiers in industrial mycology*. New York: Chapman & Hall, 1992, p. 145-159.

Roberts D.W., Gupta, S., St. Leger, R.J., Metabolite production by entomopathogenic fungi. *Pesqui.Agropecu.Bras.*, 1992. 27:325-47.

Roberts D.W., World picture of biological control of insects by fungi. *Mem. Inst. O. Cruz*, 1989. 84:89-100.

Romaña C.A., Fargues J., Sensibilité des larves de l'hémiptère hémathophage *Rhodnius prolixus* aux hyphomycetes entomopathogenes. *Entomophaga*, 1987. 32:363-368.

Roush R., McKenzie J. A., Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annual Review of Entomology*. 1987. 32:361-380.

Roy H.E., Steinkraus D.C., Eilenberg J., Hajek A.E., Pell J.K., Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Ann. Rev. Entomol.* 2006. 51: 331- 357.

Ruigt G. F., Pyrethroids, En G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press, Gran Bretaña. 1985. P. 183-262.

Samson R.A., Latge J.P., Evans H.C., editors. *Atlas of entomopathogenic fungi*, New York: Springer-Verlag, 1993.

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

Sayed I., Parvez S., Pandey S., Bin-Hafeez B., Haque R., Raisuddin S., Oxidative stress biomarkers of exposure to Deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003. 56, 295 e 301.

Scheller U., Zimmer T., Becher D., Schauer F., Schunck W.H., Oxygenation cascade in conversion of n-alkanes to dioic acids catalized by cytochrome P450 52A3. *J. Biol. Chem.*, 1998. 273:32528-32534.

Schmunis G., Riesgo de la Enfermedad de Chagas a través de transfusiones en las Américas. *Medicina (Buenos Aires)*, 1999. 59 (II): 125-134.

Schmunis G.A., A tripanossomiase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. En Brener, Andrade, Barral Neto (eds). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Editora Guanabara-Koogan, 2000. Brasil: 1-15.

Schofield C.J., Jannis J., Salvatella R., The future of Chagas disease control. *Parasitology*, 2006. 22: 583-588.

Schofield C.J., Lehane M.J., McEwen S, Catala S., Gorla D.E., Dispersive flight by *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*, 1992. 6: 51-56.

Schofield C.J., The behaviour of Triatominae (Hemiptera; Reduviidae): a review. Bull. Ent. Res., 1979. 69: 363-379.

Schofield C.J., Triatominae: biología y control, Eurocommunica Publications, West Sussex, United Kingdom. 1994.

Scholte E.J., Ng'habi K., Kihonda J., Takken W., Paaijmans K., Abdulla S., Killeen G.F., Knols B.J., An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. Science, 2005. 308: 1641-1642.

Scholte E.J., Knols B.G.J., Samson R.A., Takken W., Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. J. Insect Sci., 2004. 4, 19.

Scholte E.J., Bart G.J., Takken W., Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. Journal of Invertebrate Pathology, 2006. 91 43–49.

Schumacher V., Poehling S., In vitro effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two MA strains. Fungal Biology, 2012. 116, pag.28-31.

Sheehan D., G. Meade, V.M. Foley, Dowd C.A., Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem. J., 2001. pp. 3601-16.

Shenton D., Smirnova J. N., Selley K., Hubbard S. J., Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. J. Biol. Chem., 2006.

281: 29011-29021.

Sikura A.I., Sikura L.V., Trebesava R.M., Influence of white muscardine fungus (*Beauveria bassiana* Balsamo Vuillemin) on the reproductive system of the colorado potato beetle. Zashch. Rast.Kichinev., 1972. 2, 89–97.

Silva J., Messias CL., Virulência de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* a *Rhodnius prolixus*. Cienc.Cult., 1985. 7:37-40.

Singh AK, Saxena PN, Sharma H.N., Stress induced by beta-cyfluthrin, a type-2 pyrethoid, on brain biochemistry of Albino rat (*Rattus norvegicus*). Biol. Med., 2009.1:74-86.

Smirnova J. B., Selley J. N., Sanchez-Cabo F., Carroll K., Eddy A., Global Gene Expression Profiling Reveals Widespread yet Distinctive Translational Responses to Different Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B-Targeting Stress Pathways. Mol. Cell. Biol., 2005. 25: 9340-9349.

Smit M., Fungal epoxide hydrolases: new landmarks in sequence-activity space TRENDS in Biotechnology, 2004. Vol.22 No.3 March 2004.

Smith R.J., Gula A., Nutricional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 1981.37, 222-230.

Sosa-Gómez D.R., Boucias D.G., Nation J.L., Attachment of *Metarhizium anisopliae* to de southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. J. Invertebr. Pathol., 1997. 69:31-39.

Spagnuolo A.M, Meir S., Stryker R., A model for Chagas disease with controlled spraying. *Journal of Biological Dynamics*, 2011. Vol. 5, No. 4, 299-317.

St.Leger, R.J., Frank, D.C., Roberts, D.W., Staples R.C., Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur. J. Biochem.*, 1992. 204:991-1001.

St.Leger R.J., Roberts D.W., Engineering improved mycoinsecticides. *Trends Biotechnol.*, 1997. 15:83-85.

St.Leger R.J., Screen S., Prospects for strain improvement of fungal pathogens of insects and weeds. En: Butt, T.M., Jackson, C. & Morgan, N., editors, *Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford UK: CAB International, 2001, p. 219-238.

St. Leger R.J., Bidochka, M.J., Roberts D.W., Germination triggers of *Metarhizium anisopliae* conidia are related to host species. *Microbiology*, 1994. 140:1651-1660.

St.Leger R.J., Charnley, A.K., Cooper R.M., Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *J. Invertebr. Pathol.*, 1986b. 48:85-95.

St.Leger R.J., Cooper, R.M., Charnley A.K., Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *J. Invertebr. Pathol.*, 1986a. 47:167-177.

St.Leger R.J., Cooper R.M., Charnley A.K., Utilization of alkanes by entomopathogenic fungi. *J. Invertebr. Pathol.*, 1988. 52:356-359.

St. Leger R.J., Goettel M., Roberts D.W., Staples R.C., Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1991. 58:168-179.

St. Leger R.J., Joshi L., Bidochka M.J., Roberts D.W., Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996. 93:6349-6354.

St-Clair D.K., Chow C.K., Glutathione peroxidase: activity and steady-state level of mRNA, in *Free Radicals A Practical Approach*, ed. by PUNCHARD NA and KELLYK FJ, Oxford University Press, New York, pp. 227-240 (1996).

Steinmetz I., Schmolz E., Ruther J., Cuticular lipids as trail pheromone in a social wasp. *Proc R Soc B.*, 2002, 270:385-391.

Stevens I., Rizzo D.M, Lucero E., Pizarro J., Household Model of Chagas Disease Vectors (Hemiptera: Reduviidae) Considering Domestic, Peridomestic, and Sylvatic Vector Populations. *Med. Entomol.*, 2013. 50(4): 907-915.

Strasser H., Vey A., Butt T., Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria species*?. *Biocontrol Sci. Technol.*, 2000. 10: p. 717-735.

Swanson H.I., DNA binding and protein interactions of the AhR/ARNT heterodimer that

facilitate gene activation. *Chem Biol Interact*, 2002. 141, 63-76.

Szafranek B., Maliński E., Nawrot J., Sosnowska D., Ruszkowska M., Pihlaja K., Trumpakaj Z., Szafranek J., In vitro effects of cuticular lipids of the aphids *Sitobion avenae*, *Hyalopterus pruni* and *Brevicoryne brassicae* on growth and sporulation of the *Paecilomyces fumosoroseus* and *Beauveria bassiana*. *Arkivoc*, 2001. (iii):81-84.

Tabashik B. E., Croft B. A., Evolution of pesticide resistance in apple pests and their natural enemies. *Entomophaga*, 1985.30:37-49.

Taborsky V., Standardization of products in small-scale processing of microbial pesticides. *FAO Agricul. Serv. Bull.*, 1992, no. 96.

Tamai M., Alves S., Lopes R., Faion M., Padulla L., Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arq. Inst. Biol.*, 2002. 69: 89-96.

Tanada Y., Kaya H.K., Fungal infections. En: *Insect pathology*. San Diego: Academic Press, 1993, p. 666.

Tanaka A., Fukui, S., Metabolism of n-alkanes. En: Tanaka, A. & Fukui, S., editors. *The yeast*, New York: Academic Press, 1989, p. 261-287.

Tanaka A., Ueda, M., Assimilation of alkanes by yeasts: functions and biogenesis of peroxisomes. *Mycol. Res.*, 1993. 97:1025-1044.

Tanaka A., Osumi M., Fukui S., Peroxisomes of alkane-grown yeast: fundamental and practical aspects. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1982. 386:183-199.

Taura K., Yamada H., Naito E., Ariyoshi N., Mori M., Oguri K., Activation of microsomal epoxide hydrolase by interaction with cytochromes P450: kinetic analysis of the association and substrate-specific activation of epoxide hydrolase function. Arch. Biochem. Biophys., 2002. 402:275-80.

Tavares A., Efeito de carrapaticidas químicos e observações citológicas em *Metarhizium anisopliae* var. Acridum. Trabajo de grado de Maestría, Universidad Federal de Pernambuco. Recife, Brasil. (2002).

Teng J., Goto R., Iida K., Kojima I., Iida H., Ion-channel blocker sensitivity of voltage-gated calcium-channel homologue Cch1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology, 2008. 154: 3775-3781.

Thomas M.B., Blandford S., Lomer C.J., Reduction of feeding by the variegated grasshopper, *Zonocerus variegates*, following infection by the fungal pathogens, *Metarhizium flavoviride*. Biocontrol Science and Technology, 1997. 7, 327– 334.

Thomas M.B., Read E.F., Can fungal biopesticides control malaria? Nat. Rev. Microbiol, 2007. 5: 377-383.

Toledo A.V., Scorsetti A.C., Dikgolz, V.E. y López Lastra C.C., *Paecilomyces fumosoroseus* y *Nomuraea rileyi* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) hongos patógenos de insectos plaga de la agricultura en la Argentina. Boletín de Sociedad Argentina de Botánica, 2004. 39 (1-2): 21-26.

Tolosa A., Germano M., Cueto G., Vassena C., Zerba E., Picollo M. I., Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans*

(Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *Journal of Medical Entomology*, 2008. 45:421-426.

Topp E., Akhtar M.H., Identification and characterization of a pseudomonas strain capable of metabolizing phenoxybenzoates. *Appl Environ Microbiol*, 1991. 57:1294-1300.

Treger J. M., Magee T. R., McEntee K., Functional analysis of the stress response element and its role in the multistress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 243, 13-19.

Tsuchiya Y., Nakajima, M., Yokoi T., Critical enhancer region to which AhR/ARNT and Sp1 bind in the human CYP1B1 gene. *J. Biochem.*, 2003.133, 583-592.

Tuller G., Nemeč T., Hraštnik C., Daum G., Yeast functional analysis reports: lipid composition of subcellular membranes of a FY1679-derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources. *Yeasts*, 1999. 15:1555-1564.

Valadares-Inglis M.C., Inglis P.W., Transformation of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* strain CG423 to benomyl resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997.155:199-202.

Vassena C., Picollo M. I., 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*, 2003.

Vassena C., Picollo M. I., Zerba E., Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma*

infestans and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. Medical and Veterinary Entomology, 2000.14:51-55.

Vassilakos T.N., Athanassiou C.G., Kavallieratos N.G., Vayias B.J., Influence of temperature on the insecticidal effect of *Beauveria bassiana* in combination with diatomaceous earth against *Rhyzopertha dominica* and *Sitophilus oryzae* on stored wheat. Biol. Control, 2006. 38, 270-281.

Vontas J.G., Small G.J., Hemingway J., Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*, Biochem. J., 2001. 357. 65-72.

Wang Z.L., Zhang L.B., Ying S.H., Feng M.G., Catalases play differentiated roles in the adaptation of a fungal entomopathogen to environmental stresses. Environ Microbiol, 2013. 15(2):409-418.

Wang C., St. Leger, R.J., A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 2006. 103:6647-6652.

WHO. Control of Chagas´ disease. WHO Technical Report. Series 905. World Health Organization. Geneva. Switzerland. (2002).

WHO. New strategy to eliminate Chagas disease. Partners set out strategy against the "kissing bug" disease. (2007).

WHO. World Health Report 2009: Control and Prevention of Chagas disease in

Europe. Geneva. Switzerland. (2009).

Witteveen C.F.B., Veenhuis M., Visser J., Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992. 58:1190-1194.

Wösten H.A.B., Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001. 55:625-646.

Wraight S.P., Jackson M.A. De Kock S.L., Production, stabilization and formulation of fungal biological agents, In: Butt T.M., Jackson C., and Magan N. (eds.), *Fungi as Biocontrol Agents*, CABI, Wallingford, 2001.pp.253-287.

Xiao G, Ying S-H, Zheng P, Wang Z-L, Zhang S, Xie X-Q, Shang Y, St. Leger RJ, Zhao G-P, Wang C, Feng M.G., Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Sci.Rep.*, 2012. 2:483.

Xie X-Q, Li F, Ying S-H, Feng M.G., Additive contributions of two manganese-cored superoxide dismutases (MnSODs) to antioxidation, UV tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. *PLoS ONE*, 2012. 7(1): e30298.

Xu, Q., Some problems about study and application of *Beauveria bassiana* against agricultural and forest pest in China. En: Li, Y.W., Li, Z.Z., Lian, Z.Q., Wu, J.W., Wu, Z.K. & Xu, Q.F., editors. *Study and application of entomogenous fungi in China*, Beijing: Academic Periodical Press, 1988, v. 1, p. 1-9.

Yousef M.I, Talaat I., Mohamed E., Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. *Toxicology*, 2006. 227.

240–247.

Yu S.J., Nguyen S.N., Insecticide susceptibility and detoxication enzyme activities in permethrin-selected diamondback moths. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1996. 56, 69-77.

Yuan C, Wang C, Gao SQ, Kong TT, Chen L, XF L, Song L, Wang YB., Effects of permethrin, cypermethrin and 3- phenoxybenzoic acid on rat sperm motility in vitro evaluated with computer-assisted sperm analysis. *Toxicol Vitro*, (2010). 24:382-386.

Zeledon R., Rabinovich J., Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vector. *Annual Review Entomology*, (1981). 26: 101-13.

Zerba E., Factores que influyen en la resistencia de triatominos a los insecticidas. (2004). Documento en línea: www.conhu.org.pe/chagas/E.Zerba.pdf. (Consultado: 2013, Noviembre 19).

Zerba E., Licastro S.A., Rúbeda M.A., Acción ovicida de insecticidas organofosforados en *Triatoma infestans*. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 1976b. 10:319.

Zerba E., Licastro S.A., Rúbeda M.A., Laboratory test for measuring toxicity of insecticides in *Triatoma infestans*, Klug. *Acta Bioquímica Latinoamericana*, 1976a. X:67-70.

Zhang S., Widemann E., Bernard G, Lesot A, Pinot F, Pedrini N., CYP52X1, representing new cytochrome P450 subfamily, displays fatty acid hydroxylase activity and contributes to virulence and growth on insect cuticular substrates in entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J. Biol. Chem.*, 2012. 287:13477–

13486.

Zimmerman G., Review on safety of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*, *Biocontrol Sci. Technol.*, 2007.17: 553-596.