

Tesis Doctoral

Efectos letales y subletales de una pastilla fumígena conteniendo permetrina y pyriproxyfen sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Harburguer, Laura V.

2011-12-14

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Harburguer, Laura V.. (2011-12-14). Efectos letales y subletales de una pastilla fumígena conteniendo permetrina y pyriproxyfen sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Harburguer, Laura V.. "Efectos letales y subletales de una pastilla fumígena conteniendo permetrina y pyriproxyfen sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011-12-14.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Efectos letales y subletales de una pastilla
fumígena conteniendo permetrina y pyriproxyfen
sobre *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae)**

*Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área:
Ciencias Biológicas*

Laura V. Harburguer

Director: Dra. Susana Licastro

Consejero de estudios: Dr. Nicolás Schweigmann

Lugar de Trabajo: Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas – CIPEIN/CONICET

Buenos Aires, 2011

Agradecimientos

Al Dr. Eduardo Zerba, excelente persona e investigador, que me permitió llevar a cabo esta tesis en el CIPEIN y me acompañó a lo largo de estos años introduciéndome al mundo de la química y de la investigación científica.

A la Dra. Susana Licastro, quien siempre me demostró su afecto y con la que construí paso a paso esta tesis, intercambiando opiniones y formas de ver el mundo químico y biológico.

Al Dr. Héctor Masuh con quien realicé los ensayos de campo y conocí la provincia de la tierra colorada. Gracias por la corrección de esta tesis y la discusión de los resultados.

A mis compañeros del CIPEIN que día a día hacen que la palabra "trabajo" tenga otro significado. A Pau, que todos los días me saca una sonrisa, y no es compañera de trabajo sino una hermana. A Lau con la que compartí todo tipo de charlas entre mates y risas y en la que descubrí una amiga. A Emilia, con la que di mis primeros pasos en la cría de mosquitos y que también se convirtió en mi amiga. A Raúl, sin el cual esta tesis no sería lo que es, quien se tomó el trabajo de leerla y corregirla en tiempo record. A Toti y Ariel que siempre me sacan una sonrisa y están cuando los necesito. A Ani, Moni y Ceci, que día a día hacen que el trabajo sea más divertido y ameno. A Vale y Gastón, gracias por la ayuda y discusiones estadísticas. A Pablo y Claudia, por las charlas compartidas. A Ariadna, por hacer más divertida la obtención de puntos para el doctorado. A Marina, por ayudarme con los escaneos de las figuras y con los almuerzos (me pedís un ticket?). A Paola por sentar las bases de esta tesis y ayudarme durante la primera parte de la misma. A Gonza y Guille que día a día voy conociendo un poco más. A Mariné, por sus aportes e ideas durante los seminarios de avance de la tesis. A Santiago, con quien comparto el laboratorio. A Susi S. a la cual todos extrañamos y esperamos que vuelva pronto. A Pablo G. por medio del cual ingresé al CIPEIN y pude realizar esta tesis.

A mis padres que me dieron la posibilidad de estudiar esta maravillosa carrera y que siempre me dieron su ayuda, amor y contención para que pudiera terminarla.

A mi hermana, Ale, por ser mi consejera y confidente, con la que compartí el día a día durante mi carrera. Aunque ahora no nos veamos todos los días igual se que siempre está ahí.

A Male y Juli, con quienes comparto las alegrías, los momentos difíciles, la música, las películas, las tareas, el facebook, los gatos, en síntesis; la vida.

A Nelson, la extraordinaria persona que tengo a mi lado, que siempre me apoyó para que me superara día a día. Es el fin de algo muy importante en mi vida, pero el comienzo de otra cosa aún más importante en la nuestra.

Resumen

Efectos letales y subletales de una pastilla fumígena conteniendo permetrina y pyriproxyfen sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Harburguer, Laura.

El dengue es una infección viral aguda y sistémica, producida por un flavivirus. En América solamente ha sido demostrada la transmisión del dengue a través de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. En ausencia de una vacuna efectiva, la única forma de controlar la transmisión del dengue, es el control del vector.

Durante este trabajo se estudió la estabilidad térmica de los insecticidas pyriproxyfen y un piretroide (permetrina o *cis*-permetrina) como parte de una formulación fumígena y sus efectos letales y subletales sobre las formas inmaduras y los adultos del mosquito *Ae. aegypti*.

Se obtuvo una recuperación de los ingredientes activos en los humos de alrededor del 95% para el pyriproxyfen y del 50% para los piretroides. Estos mostraron una gran efectividad sobre las larvas y los adultos de *Ae. aegypti*. Se produjo una inhibición de la emergencia de los adultos de más del 95% con una dosis de 2 g/kg de pyriproxyfen; la mortalidad de los individuos ocurrió principalmente durante el estadio de pupa. Además, se encontró que este activo es capaz de reducir la fertilidad y la fecundidad de las hembras, aunque no interferiría con el desarrollo de las ovarias.

Se evaluó la efectividad de esta formulación en forma de pastilla en un ensayo de campo en la provincia de Misiones. Los resultados mostraron que su aplicación redujo las poblaciones del vector dentro de las viviendas. Por otro lado, la formulación fue ampliamente aceptada por la comunidad demostrando que ésta es capaz de participar en un programa de control de los mosquitos a través de la aplicación de herramientas de control de uso no profesional, como la pastilla fumígena.

Palabras clave: *Ae. aegypti*, pyriproxyfen, permetrina, fumígenos, inhibición de emergencia, fecundidad, fertilidad.

**Lethal and sublethal effects of smoke-generating formulation
containing permethrin and pyriproxyfen on *Aedes aegypti*
(Diptera: Culicidae)**

Harburguer, Laura

Dengue disease is an acute viral and systemic infection, caused by a flavivirus. In America, only has been demonstrated dengue transmission by mosquitoes of the species *Aedes aegypti*. In the absence of an effective vaccine, the only way to control the transmission of dengue is vector control.

In this work we studied the thermal stability of the insecticides pyriproxyfen and a pyrethroid (permethrin or *cis*-permethrin) as part of a smoke-generating formulation together with their lethal and sublethal effects on the immature stages and adults of *Ae. aegypti*.

We obtained a recovery of the active ingredients in the smoke of about 95% for pyriproxyfen and 50% for pyrethroids. When released in the fumes of the smoke-generating formulation showed a great efficacy on the larvae and adults of *Ae. aegypti*. There was an inhibition of adult emergence over 95% with a dose of 2 g/kg pyriproxyfen, mortality occurred mainly during the pupal stage. It was found that pyriproxyfen is capable of reduce fertility and fecundity of females but not interfere with the development of the ovarioles.

We evaluated the efficacy of this formulation in a field trial in the province of Misiones. The results showed that its application reduced vector populations inside the dwellings. On the other hand, the formulation was widely accepted by the community demonstrating that it is able to participate in a program of mosquito control through the application of non-professional control tools, such as the smoke-generating tablet.

Keywords: *Ae. aegypti*, pyriproxyfen, permethrin, fumigants, emergence inhibition, fertility, fecundity.

Índice

Resumen	3
Objetivos e Hipótesis	11
1. Objetivo general.....	12
1.1. Objetivos particulares.....	12
2. Hipótesis	13
Introducción	14
1. El mosquito <i>Aedes aegypti</i>.....	15
1.1. Distribución.....	15
1.1.1. Distribución en Argentina.....	16
1.2. Biología.....	18
1.2.1. Huevos.....	18
1.2.2. Larvas	19
1.2.3. Pupas	20
1.2.4. Adultos	20
1.3. Comportamiento.....	21
1.4. Metamorfosis.....	22
1.4.1. Discos imaginales	24
1.4.2. Control endocrino de la metamorfosis	24
1.5. Anatomía y fisiología de la reproducción.....	27
1.5.1. Estructura de las gónadas y gonoductos	29
1.5.2. Espermatogénesis y oogénesis.....	32
1.5.3. Vitelogénesis	34
1.5.4. Control endocrino del desarrollo del ovario y la vitelogénesis	35
2. El dengue y el dengue hemorrágico	38
2.1. El virus del dengue y sus serotipos	38
2.2. Transmisión del virus y características clínicas.....	39
2.3. Situación del dengue en las Américas.....	40
2.4. Situación del dengue en la Argentina	42

3. Estrategias de control de <i>Ae. aegypti</i>.....	43
3.1. Formulaciones utilizadas para control de <i>Ae. aegypti</i>	43
3.2. Principales familias de insecticidas utilizadas en el control de <i>Ae aegypti</i>	45
3.2.1. Reguladores del crecimiento de los insectos.	46
3.3. Control químico del adulto	48
3.4. Control químico de estadios inmaduros	48
 Materiales y Métodos	50
 1. Material biológico	51
 2. Sustancias Químicas	52
2.1. Componentes de la mezcla fumígena	52
2.2. Insecticidas	52
2.3. Solventes	53
2.4. Otros.....	53
 3. Desarrollo del formulado fumígeno	53
3.1. Preparación de mezclas fumígenas por mezcla de sólidos	53
3.2. Preparación de mezclas fumígenas en solución	54
3.3. Recuperación de los insecticidas presentes en los humos	54
3.4. Análisis de los residuos en la pastilla fumígena.....	55
3.5. Análisis por cromatografía líquida (HPLC).....	55
 4. Efecto insecticida de las pastillas fumígenas en condiciones de laboratorio	55
4.1. Efecto de pastillas fumígenas con distintos ingredientes activos sobre larvas de <i>Ae. aegypti</i> .	55
4.1.1. Vía de ingreso del pyriproxyfen liberado en los humos de la pastilla fumígena	57
4.2. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre los distintos estadios larvales de <i>Ae. aegypti</i>	58

4.3. Efecto de pastillas fumígenas con diferentes activos sobre adultos de <i>Ae. aegypti</i>	58
4.4. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre huevos de <i>Ae. aegypti</i>	59
4.5. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre la fertilidad de hembras de <i>Ae. aegypti</i> 60	
4.5.1. Disección de las hembras de <i>Ae. aegypti</i> y recuento del número de ovarias	61
4.5.2. Medición del tamaño del ala de las hembras de <i>Ae. aegypti</i>	63
4.6. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre la fecundidad de hembras de <i>Ae. aegypti</i>	63
5. Evaluación del efecto insecticida de la pastilla fumígena en campo.....	63
5.1. Lugar del ensayo.....	63
5.2. Tratamientos realizados	64
5.3. Evaluación de la efectividad de los tratamientos por medio de bioensayos	66
5.4. Evaluación de la efectividad de los tratamientos por medio de índices entomológicos	67
5.5. Participación de la comunidad	67
6. Análisis estadístico y software utilizado.....	68
6.1. Recuperación de los insecticidas en los humos de la pastilla fumígena	68
6.2. Calculo del porcentaje de inhibición de emergencia (∕ IE) y diferencias entre tratamientos ...	69
6.3. Diferencias en categorías de mortalidad.....	69
6.4. Tiempo de volteo 50∕ (TV50)	70
6.5. Efecto sobre huevos	70
6.6. Diferencias en la fecundidad y fertilidad de las hembras.....	71
6.6.1. Relación entre el número de ovarias y el tamaño de la hembra	71
6.7. Diferencias entre los tratamientos de campo	71
Resultados y Discusión	73
1. Desarrollo del formulado fumígeno	74
1.1. Recuperación de los insecticidas en humos y en los restos de la pastilla fumígena.....	74

2. Efecto insecticida de pastillas fumígenas en condiciones de laboratorio	76
2.1. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre las larvas de <i>Ae. aegypti</i>	76
2.1.1. Vía de ingreso del pyriproxyfen liberado en los humos de la pastilla	78
2.2. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen y un piretroide sobre larvas de <i>Ae. aegypti</i> ...	79
2.3. Efecto de pastillas fumígenas con distintos ingredientes activos sobre el desarrollo de <i>Ae. aegypti</i>	80
2.4. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen y piretroides sobre la progresión en el tiempo de los diferentes estadios	85
2.5. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre los distintos estadios larvales de <i>Ae. aegypti</i>	89
2.6. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen y permetrina sobre los adultos de <i>Ae. aegypti</i> ..	94
2.7. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre los huevos de <i>Ae. aegypti</i>	95
2.8. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre el desarrollo de las ovariolas de <i>Ae. aegypti</i>	98
2.8.1. Medición del tamaño de ala de las hembras.....	99
2.8.2. Disección de las hembras de <i>Ae. aegypti</i> y recuento de ovariolas.....	102
2.9. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre la fecundidad y fertilidad de las hembras de <i>Ae. aegypti</i>	104
3. Evaluación del efecto insecticida de la pastilla fumígena en campo.....	106
3.1. Evaluación de la efectividad de los tratamientos por medio de bioensayos	107
3.2. Evaluación de la efectividad de los tratamientos por medio de índices entomológicos	107
3.3. Participación de la comunidad	110
Conclusiones	114
Bibliografía	121
Anexos	136

Objetivos e Hipótesis

1. Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de tesis es estudiar la estabilidad térmica de los insecticidas pyriproxyfen y un piretroide (permetrina o *cis*-permetrina) como parte de una formulación fumígena y los efectos letales y subletales de estos ingredientes activos sobre las formas inmaduras y los adultos del mosquito *Aedes aegypti*. Los resultados obtenidos serán un aporte al conocimiento para el desarrollo de nuevas alternativas de control de este mosquito vector, con modos de acción más selectivos que los productos actualmente en uso y que representen un menor riesgo para los organismos no blanco y el ambiente.

1.1. Objetivos particulares

- Estudiar la estabilidad térmica del pyriproxyfen solo y acompañado con permetrina o *cis*-permetrina y, a partir de los resultados obtenidos, desarrollar una formulación fumígena que permita la mayor recuperación posible de estos ingredientes activos en sus humos.
- Determinar en condiciones de laboratorio, la efectividad biológica de los ingredientes activos contenidos en los humos producidos por la mezcla fumígena desarrollada en la primera parte de este trabajo sobre huevos, larvas y adultos de *Ae. aegypti*.
- Evaluar los efectos subletales del pyriproxyfen liberado en los humos de la formulación fumígena sobre la fecundidad y fertilidad de las hembras de *Ae. aegypti* emergidas de las larvas sobrevivientes al tratamiento con una dosis subletal.
- Estudiar el efecto de una exposición subletal a pyriproxyfen sobre la formación de las ovariolas de las hembras de *Ae. aegypti* sobrevivientes.
- Establecer las condiciones óptimas de uso de la formulación fumígena en forma de pastilla, y evaluar en condiciones de campo su eficacia sobre larvas y adultos de *Ae. aegypti* en particular y su impacto sobre la población de mosquitos en general.
- Estudiar la percepción y aceptación por parte de la comunidad de esta nueva herramienta para el control del mosquito vector del dengue.

2. Hipótesis

Durante la tesis se trabajó en el marco de las siguientes hipótesis:

- Es posible elaborar una mezcla fumígena utilizando un oxidante (KClO_3), un comburente (dextrina), un inerte (talco), un agente espumígeno (cianoguanidina) y los insecticidas pyriproxyfen y permetrina o *cis*-permetrina cuya combustión sin llama produzca humos conteniendo los ingredientes activos.
- Los ingredientes activos liberados en los humos de la pastilla presentan actividad insecticida en *Ae. aegypti*.
- La exposición de larvas de *Ae. aegypti* a una dosis subletal del componente de la formulación fumígena pyriproxyfen, disminuye la fecundidad y fertilidad de las hembras sobrevivientes.
- Los efectos de una dosis subletal de pyriproxyfen sobre la fecundidad y la fertilidad de las hembras de *Ae. aegypti* se deben a que este insecticida afecta la formación de las ovariolas.
- La aplicación de una pastilla fumígena conteniendo pyriproxyfen y permetrina es eficaz para controlar a las larvas y los adultos de *Ae aegypti* en condiciones de campo dentro de las viviendas.
- Es posible transferir a la comunidad el uso de herramientas de control no profesional, como la pastilla fumígena resultado de esta tesis, para que participe en la disminución del riesgo de epidemias de dengue a través del control del mosquito vector.

Introducción

1. El mosquito *Aedes aegypti*

1.1. Distribución

Los mosquitos son artrópodos de gran importancia médico epidemiológica pertenecientes a la Clase Insecta, Orden Diptera y a la Familia Culicidae. *Aedes aegypti* es una especie del subgénero *Stegomyia*, que intentó ser reclasificado como género entre 2004 y 2005¹. Sin embargo la reclasificación y el cambio de nombre a *Stegomyia aegypti* han sido muy discutidos² y actualmente la nomenclatura utilizada de forma mayoritaria continúa siendo la original.

Ae. aegypti es originario del continente africano, donde se encuentran tres formas o subespecies: *Ae. aegypti aegypti*, *Ae. aegypti queenslandensis* y *Ae. aegypti formosus*. Las dos primeras habitan en el continente americano, son de hábitos domésticos y poseen características taxonómicas similares. La subespecie *formosus* está limitada a ciertas regiones de África, siendo una subespecie silvestre que habita zonas selváticas, y presenta taxonomía y biología diferenciadas. Se cree que *Ae. aegypti aegypti*, especie a la cual nos referiremos a lo largo de esta tesis, fue introducida en América durante las primeras exploraciones europeas en el siglo XVI. Es en la actualidad la más distribuida en el mundo.

Ae. aegypti es una especie de regiones tropicales y sub-tropicales. A principios del siglo XX este mosquito se encontraba en casi todos los países de América con excepción de Canadá, desde el sur de los Estados Unidos hasta Buenos Aires, Argentina³. Durante la década de 1920 se hicieron avances para el control de este vector, y en 1947, los países miembros de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) resolvieron iniciar una campaña para erradicarlo. Esta campaña tuvo un gran éxito y para 1962 *Ae. aegypti* había sido eliminado de 18 países continentales y de varias islas pequeñas del Caribe (Figura 1). Solo los Estados Unidos, Venezuela, Surinam, Bahamas y algunas otras islas del caribe siguieron infestadas. Después de 1962 tres países más eliminaron este vector pero, al mismo tiempo, y debido a problemas financieros, políticos, técnicos y administrativos, ya había comenzado la reinfestación en los países que lo habían erradicado. En 1991, solo cuatro países no se habían reinfestado: Bermuda, Chile, Islas Caimán y Uruguay⁴.

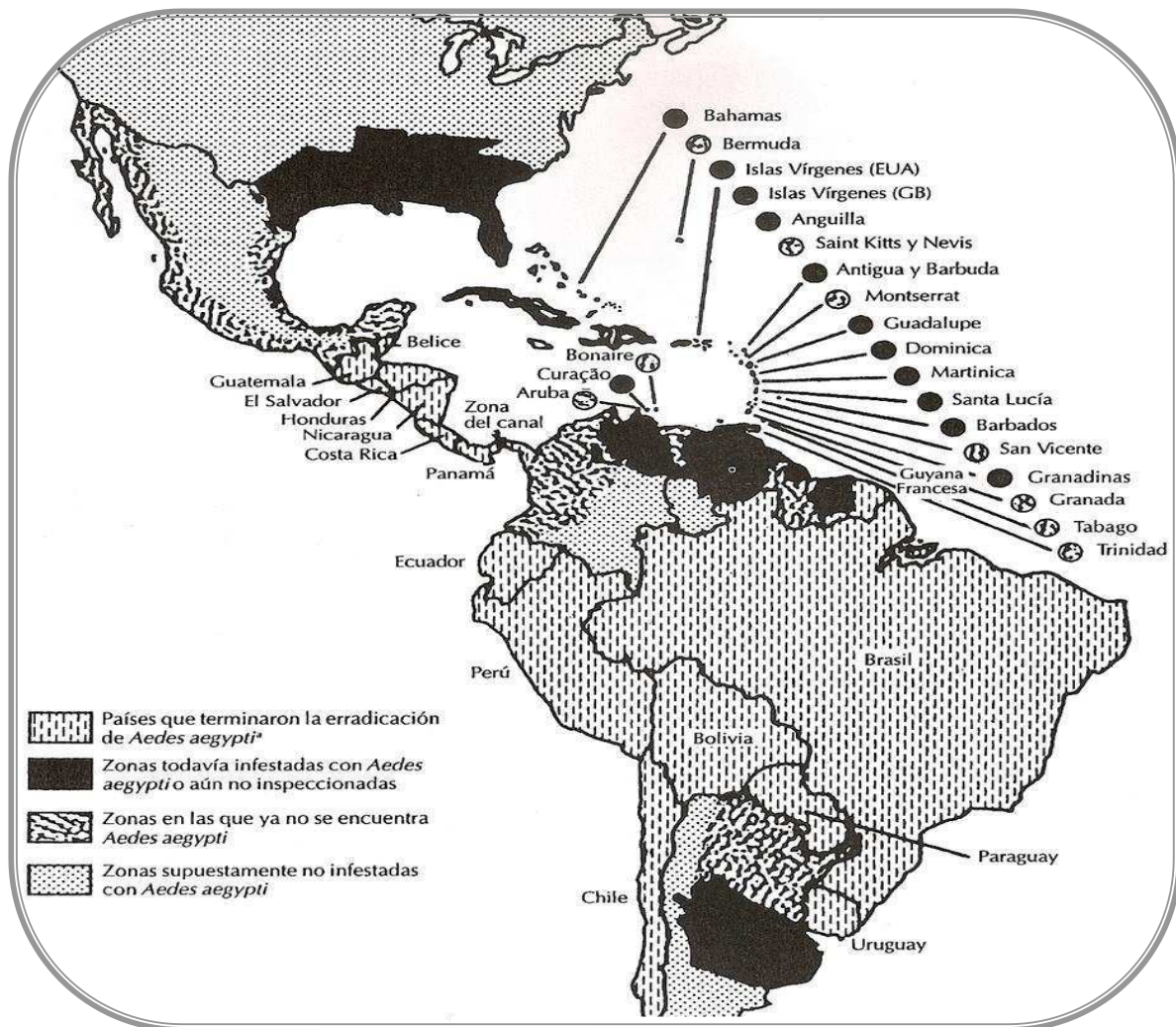


Figura 1. Estado de la campaña de erradicación de *Ae. aegypti*, abril 1962.⁴

1.1.1. Distribución en Argentina

Durante la primera mitad del siglo XX *Ae. aegypti* se encontraba presente en un amplio territorio de la República Argentina: en las provincias de Jujuy, Salta, Formosa, Misiones, Corrientes, Chaco, Santiago del Estero, Tucumán, Catamarca, La Rioja, Santa Fe, Entre Ríos, Córdoba y Buenos Aires⁵. En 1963, luego de la campaña iniciada en 1947 por la OPS, el Ministerio de Salud de la Nación consideró que este mosquito había sido erradicado⁶. En 1965, la Organización Panamericana de la Salud confirmó la erradicación⁵. El vector fue detectado nuevamente en Argentina en las provincias de Misiones (Posadas y Puerto Iguazú) y Formosa (Clorinda y Puerto Pilcomayo)⁷, en 1986, luego de haber sido reintroducido en Brasil en el año 1975. Unos años después, en 1995, ya se había extendido a las provincias del centro del país encontrándose en Buenos Aires^{8, 9} y Córdoba¹⁰ (Figuras 2A y 2B).

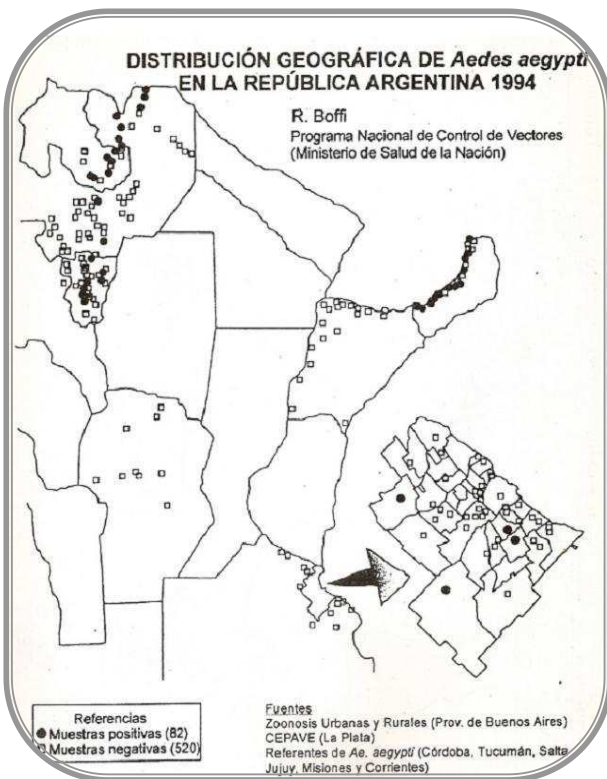


Figura 2A. Distribución de *Ae. aegypti* en Argentina, 1994.¹⁰

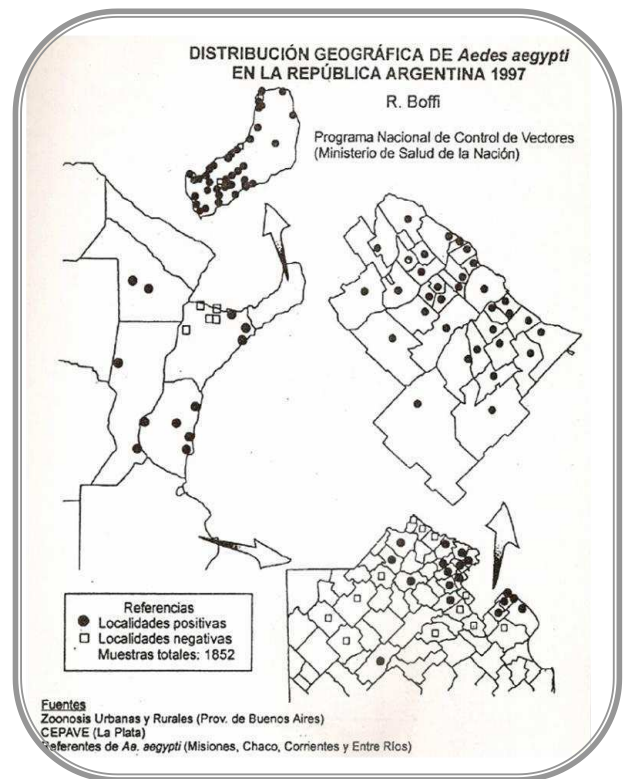


Figura 2B. Distribución de *Ae. aegypti* en Argentina, 1997.¹⁰

En la actualidad, el hallazgo más occidental corresponde a la provincia de Mendoza en el año 2000 (Departamento de Guaymallén)¹¹ y el registro más austral a la provincia de La Pampa (Santa Rosa)¹². Esto implica que la distribución se ha ampliado hacia el Oeste y el Sur en comparación con la distribución histórica¹³ (Figura 3).



Figura 3. Distribución de *Ae. aegypti* (gris claro) y de *Ae. albopictus* (gris oscuro) en Argentina.¹³

1.2. Biología

Ae. aegypti es una especie urbana que se alimenta casi exclusivamente sobre humanos. Sus estadios juveniles se han adaptado a vivir en recipientes naturales o artificiales, que se encuentran en las viviendas o sus alrededores³. Es un insecto con metamorfosis completa u holometábolo y durante su desarrollo ontogénico, que se completa entre 7 y 13 días, atraviesa una etapa acuática (estadios de huevo, larva y pupa) y otra aérea (adulto) (Figura 4).

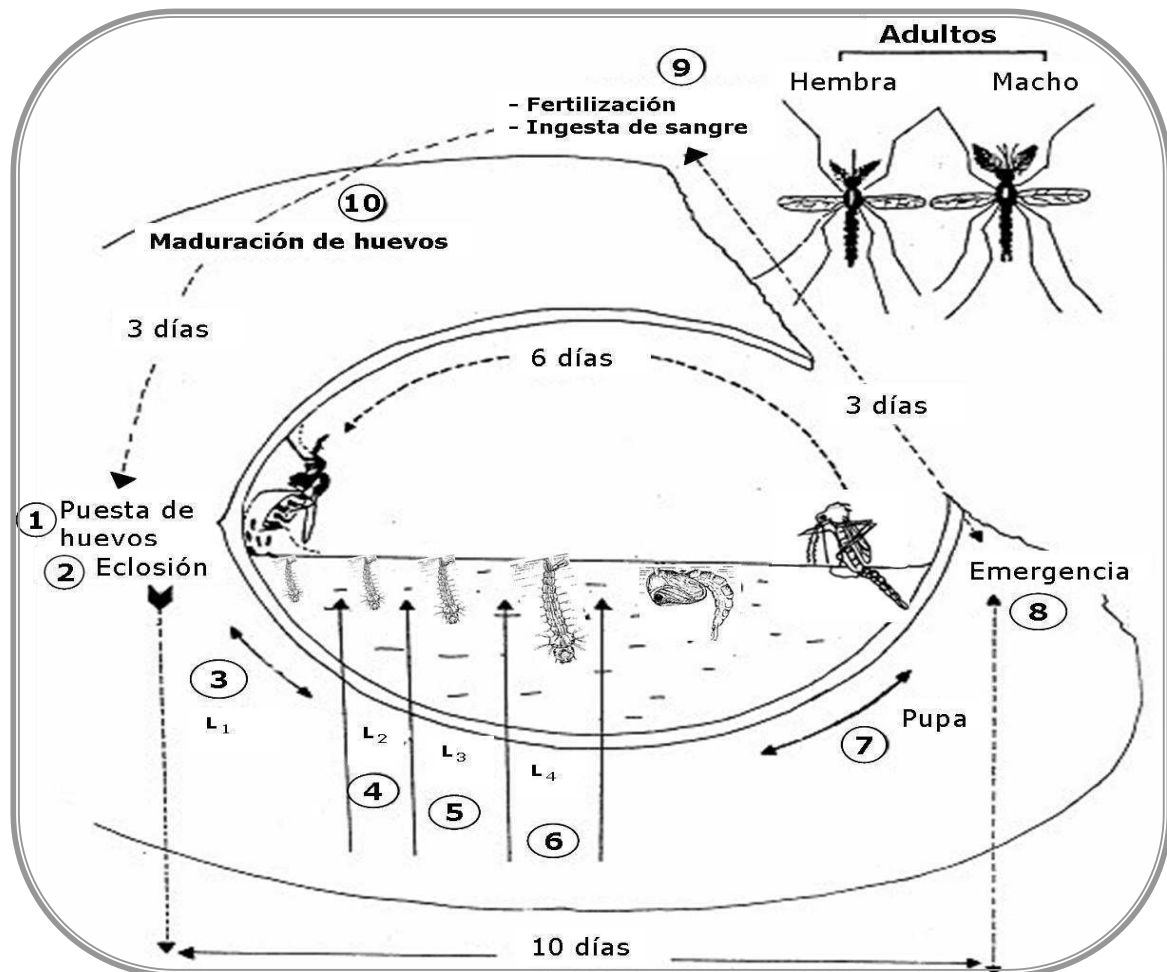


Figura 4. Desarrollo ontogénico del mosquito *Aedes aegypti*.

1.2.1. Huevos

Los huevos son depositados individualmente en las paredes de los recipientes por encima del nivel del agua. Miden alrededor de 1 mm de longitud y en el momento de la postura son blancos. Al cabo de unas tres horas adquieren un color negro brillante³. En óptimas condiciones de temperatura y humedad el desarrollo del embrión se completa en dos o tres días. Cuando los huevos quedan sumergidos bajo el agua la mayoría eclosiona rápidamente, pero otros lo hacen recién después de haber sido mojados varias veces. Si los huevos no quedan sumergidos, son

capaces de resistir largos períodos de desecación, que pueden prolongarse por más de un año en algunas ocasiones.

La capacidad de resistencia a la desecación es uno de los principales obstáculos en el control de este mosquito, ya que permite su supervivencia y posterior reinfestación en condiciones climáticas favorables y la dispersión de los huevos a grandes distancias en recipientes secos. Por lo tanto, la supresión de los adultos y larvas en una localidad no garantiza que ésta no sea nuevamente reinfestada a través de los huevos residuales.

1.2.2. Larvas

Luego de la eclosión, las larvas pasan por un ciclo de cuatro estadios larvales, creciendo a lo largo de tres mudas desde un largo de 1 mm a los 6 o 7 mm finales. Se alimentan del material orgánico sumergido o acumulado en las paredes y el fondo del recipiente que habitan⁴.

La duración del desarrollo larval depende de la temperatura, la disponibilidad de alimento y la densidad de larvas en el recipiente. En condiciones óptimas, con temperaturas de 25 a 29°C, el período desde la eclosión hasta la formación de la pupa puede ser de 5 a 7 días. Los tres primeros estadios se desarrollan rápidamente, mientras que el cuarto demora más y se caracteriza por un mayor aumento de tamaño y peso respecto a los estadios anteriores. En condiciones desfavorables (baja temperatura, escasez de alimento) el cuarto estadio larval puede prolongarse por varias semanas previo a su transformación en pupa³.

Como otras larvas de mosquitos, la larva de *Ae. aegypti* posee la cabeza y el tórax ovoides y el abdomen presenta nueve segmentos. Sin embargo el sifón, órgano utilizado para respirar en la superficie del agua, es más corto que en la mayoría de los otros culícidos. La posición de reposo también es diferente en los distintos géneros: las larvas de *Aedes* se mantienen en una posición casi vertical mientras que las de *Anopheles* permanecen paralelas a la superficie del agua y las de *Culex* lo hacen formando un ángulo agudo.

1.2.3. Pupas

Las pupas son la última fase del ciclo acuático. Aunque no se alimentan, son muy activas y se desplazan por todo el recipiente, reaccionando rápidamente ante diferentes estímulos externos. En la base del tórax tienen un par de tubos respiratorios o trompetas que les permiten respirar en la superficie del agua. El estadio de pupa dura de 1 a 3 días en condiciones favorables (entre 28 y 32 °C) aunque las variaciones extremas de temperatura pueden dilatar este período³.

1.2.4. Adultos

El adulto emergente es un mosquito de color negro. En el dorso del tórax presenta diseños blanco-plateados formados por escamas claras que se disponen simulando la forma de una "lira". Los segmentos tarsales de las patas poseen un anillado característico. El macho se distingue de la hembra por sus antenas plumosas y sus palpos más largos⁴.

Al emerger de la pupa, el adulto permanece en reposo durante varias horas, lo que permite el endurecimiento del exoesqueleto y las alas y, en el caso de los machos, la rotación de la terminalia masculina en 180°. Dentro de las 24 horas siguientes a la emergencia pueden aparearse. Para esto, el macho sujeta el ápice del abdomen de la hembra con su terminalia e inserta su edeago dentro del receptáculo genital, inseminándola. El espermatozoos es almacenado en la espermateca de la hembra y es suficiente para fecundar todos los huevos que la hembra produzca durante su vida⁴.

Las hembras son las únicas que succionan sangre, mostrando preferencia por la sangre humana, necesaria como fuente de proteínas para el desarrollo de los huevos. La alimentación sanguínea se lleva a cabo principalmente durante el día, en las primeras horas de la mañana o al anochecer. Generalmente, después de cada alimentación sanguínea se desarrolla una camada de huevos, pero si el mosquito es perturbado antes de completar la alimentación puede volver a ingerir sangre antes de la postura. La oviposición generalmente se produce hacia el final de la tarde; la hembra grávida deposita sus huevos en las paredes de recipientes oscuros o sombreados a pocos milímetros de la superficie del agua. Suele distribuir cada lote de huevos entre varios recipientes distintos³.

Las piezas bucales de los machos no están adaptadas para chupar sangre, tienen la misma forma general que las de la hembra, sin embargo algunos estiletes se encuentran reducidos o faltan. Procuran su alimento de carbohidratos como el néctar de las plantas. Las hembras también pueden sobrevivir alimentándose de esta manera aunque no podrán producir huevos.

1.3. Comportamiento

Debido a su estrecha relación con los seres humanos, *Ae. aegypti* es esencialmente un mosquito urbano, que se encuentra en mayor abundancia en poblados y ciudades. Sin embargo, se han registrado invasiones rurales de importancia en Perú¹⁴, Colombia¹⁵, Brasil y México³. En Argentina recientemente se han encontrado larvas de este mosquito en una zona rural de la provincia de Corrientes¹⁶.

La distancia de vuelo de *Ae. aegypti* es bastante corta. Las hembras no sobrepasan los 100 metros de distancia de vuelo durante su vida, y a menudo permanecen en la misma casa donde emergen siempre que dispongan de hospedadores y sitios de reposo y postura adecuados. Sin embargo, una hembra grávida puede volar hasta 3 km en busca de un lugar para oviponer si no encuentra recipientes propicios en su entorno.

Para reposar eligen lugares oscuros y tranquilos en el interior de las viviendas, dentro de los armarios en los dormitorios o debajo de las camas y otros muebles; sólo ocasionalmente se los encuentra al aire libre.

El comportamiento de los insectos está determinado principalmente por su genotipo, aunque es obviamente modificable por las circunstancias ambientales. Es por eso que los patrones de abundancia y oviposición de *Ae. aegypti* varían en las diferentes regiones del país. En el noroeste se ha detectado oviposición de esta especie durante todo el año, con un pico en el mes de marzo asociado con la precipitación pluvial.¹⁷ En otras áreas estudiadas (Chaco, Córdoba y Buenos Aires) no se detectó presencia de estadios inmaduros ni puesta de huevos durante el invierno. Si bien los picos de oviposición varían en las diferentes provincias, en general se registran desde octubre-noviembre hasta mayo-junio, fuertemente asociados con la temperatura y/o variaciones de las precipitaciones pluviales¹⁸⁻²².

1.4. Metamorfosis

Como insectos holometábolos, los mosquitos deben atravesar una metamorfosis completa antes de llegar al estado adulto. A medida que las larvas pasan por los cuatro estadios el exoesqueleto resulta demasiado pequeño para su tamaño corporal; es cuando se produce la muda, durante la que se sintetiza una nueva cutícula que es blanda y extensible y permite el crecimiento antes de endurecerse y adquirir rigidez. Este tipo de muda, llamada no metamórfica, ocurre a intervalos regulares a lo largo del ciclo de vida del insecto. Por otro lado, durante la llamada muda metamórfica o metamorfosis, los insectos no sólo se desprenden de su exoesqueleto viejo, sino que atraviesan un proceso de cambio fisiológico, morfológico y de maduración hacia la siguiente etapa de desarrollo de su ciclo de vida. En el caso de los mosquitos y otros insectos holometábolos, hay dos mudas metamórficas: de larva hacia pupa, y de pupa a adulto²³.

La muda consta de dos fases: la apólsis, durante la cual la epidermis se separa de la vieja cutícula, y la ecdisis, durante la cual el insecto abandona los restos de la cutícula vieja o exuvia. Durante la apólsis se forma un espacio ecdisial entre la cutícula vieja y la epidermis, que permite el crecimiento. El líquido de muda, que contiene enzimas como quitinasas y proteinasas, llena este espacio comenzando la digestión de la capa más interna de la vieja cutícula, la endocutícula. Las capas más externas, formadas por la exocutícula y la epicutícula, no sufren cambios durante la muda y formarán parte de la exuvia. Tiempo después, las células de la epidermis empiezan a secretar una capa que recibe el nombre de cuticulina, y forma parte de la nueva epicutícula. Inicialmente la secreción ocurre como pequeños parches discontinuos que eventualmente se alargan y forman una capa continua. A este proceso le sigue la secreción de la mayor parte de la nueva cutícula que aún no se encuentra esclerotizada y recibe el nombre de procutícula²³.

El líquido de muda que se acumula en el espacio ecdisial es reabsorbido a través de las células de la epidermis antes de la ecdisis. Inmediatamente después, los insectos aumentan su tamaño incorporando agua o aire, dependiendo del medio en donde se desarrollen. Al momento de la ecdisis la cutícula es suave y prácticamente sin color, luego de una o dos horas se endurece y oscurece, proceso llamado esclerotización. Las áreas más esclerotizadas formarán parte de la exocutícula mientras que las de pobre esclerotización formaran parte de la

endocutícula. Más adelante las células de la epidermis secretarán cemento y cera que serán transportados hacia la epicutícula, constituyéndose parte de ella.²³

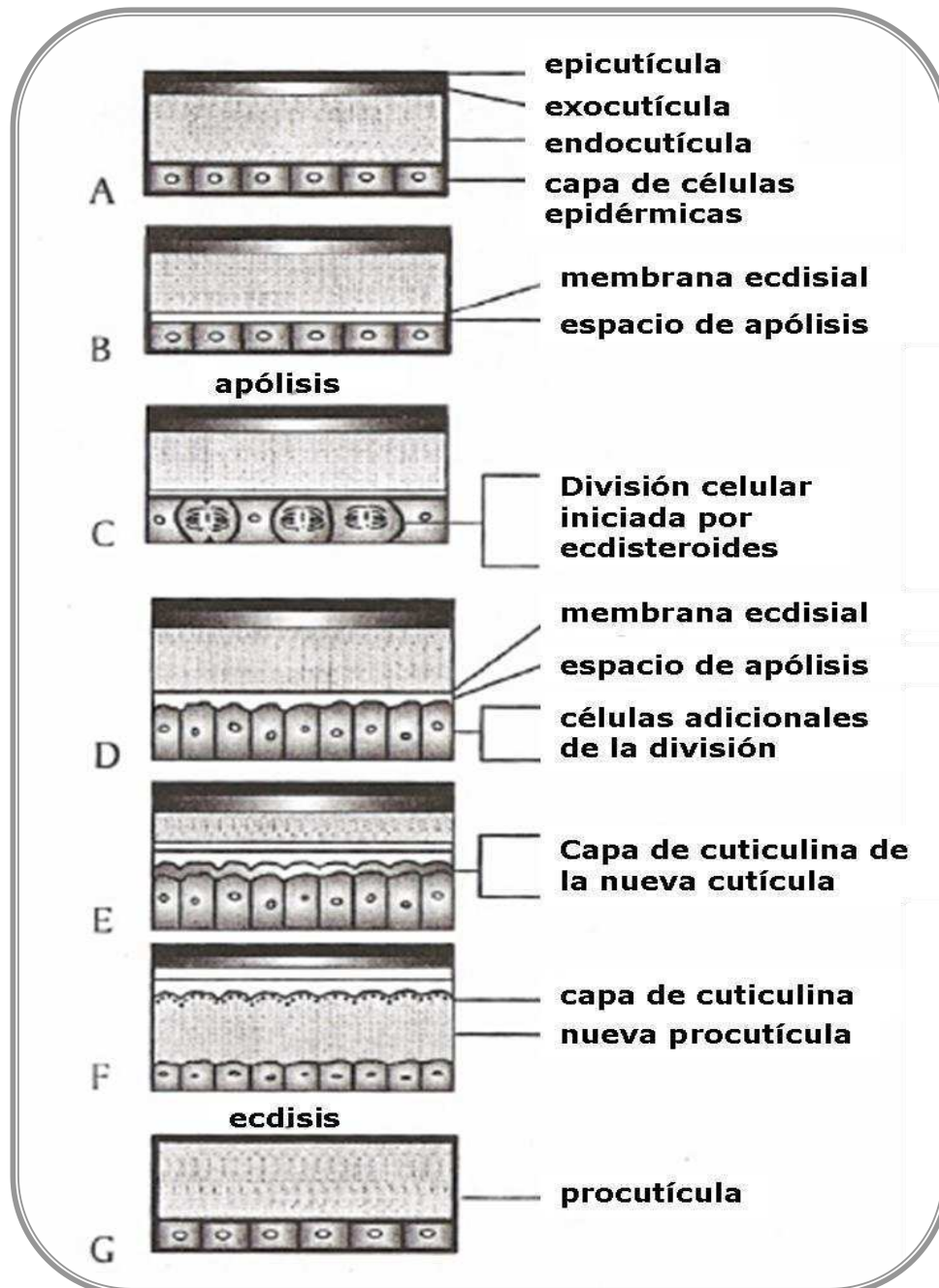


Figura 5. Representación esquemática del proceso de apólisis, secreción de la nueva cutícula, y la ecdisis. A: vieja cutícula justo antes de comenzar la muda. B: formación de la membrana ecdisial y el espacio de apólisis. C: inicio de la división celular en la epidermis en respuesta a la hormona de la muda. D: nuevas células de la epidermis. E: comienza la secreción de la nueva cutícula con la secreción de la capa de cuticulina, continúa la digestión de la antigua endocutícula. F: Se forma la nueva procutícula no esclerotizada. G: se produce la ecdisis de la vieja cutícula; la nueva cutícula se cubre de cera y una capa de cemento, parte de la procutícula puede ser esclerotizada en exocutícula, dependiendo del insecto y la ubicación en el cuerpo.²³

1.4.1. Discos imaginales

Las larvas de los insectos holometábolos, como los mosquitos, llevan células cuyo desarrollo se encuentra comprometido para formar los tejidos adultos, pero que se mantienen indiferenciadas bajo control hormonal. Algunas de estas células se encuentran agrupadas de forma poco organizada y reciben el nombre de histoblastos, sin embargo la mayoría se concentra en sacos epiteliales discretos que reciben el nombre de discos imaginales²⁴.

En los mosquitos, los rudimentos de algunos discos imaginales están presentes en las larvas recién eclosionadas y se desarrollan lentamente durante esta etapa; mientras que otros aparecen recién en el tercer estadio²⁵.

En la cabeza de la larva se encuentran discos pares correspondientes a las antenas, labium y palpos maxilares, además de un único disco correspondiente al labrum. Cada uno de los tres segmentos torácicos contiene un par de discos dorsales y un par ventral; los dorsales darán origen a las trompetas de la pupa, las alas y los balancines; los discos ventrales formarán las patas. Los segmentos abdominales 8 a 10 contienen los discos que constituirán los remos o paletas de la pupa, partes de los conductos genitales y sus glándulas asociadas, los genitales masculinos y los cercos²⁶.

Las células de los discos imaginales se multiplican en todos los estadios larvales, sin embargo el mayor incremento en el tamaño se produce durante la segunda mitad del cuarto estadio, acompañado de numerosas mitosis. Es este aumento en la tasa de crecimiento de los discos imaginales durante el último estadio larval lo que ha dado lugar a suponer la participación de hormonas en la regulación de éste proceso.^{25, 26}

1.4.2. Control endocrino de la metamorfosis

Los procesos de metamorfosis y muda se encuentran bajo el control de tres hormonas: la hormona protoracicotrófica (PPTH), la hormona de la muda o ecdisona y la hormona juvenil (JH).

La PPTH es fabricada por células neurosecretoras del cerebro (SNC) y es almacenada en el órgano neurohemal ubicado en la corpora cardiaca. En unos pocos insectos se han logrado identificar las señales que estimulan a las SNC a secretar PPTH, reconociéndose al menos tres tipos de estímulos: ambientales (frío, en un insecto con diapausa como el lepidóptero *P. cecropia*²⁷), la adquisición de un determinado peso o tamaño como en algunos lepidópteros²⁸, o el estiramiento del

abdomen en respuesta a una alimentación con abundante cantidad de sangre como en los insectos reducidos^{29, 30}. La PTTH es liberada desde la corpora cardiaca a la hemolinfa y se une a receptores ubicados en la glándula protorácica iniciando una cascada de reacciones que culmina en la síntesis de ecdisona.

A medida que es sintetizada, la hormona de la muda es secretada hacia la hemolinfa. La ecdisona es considerada como una pro-hormona, ya que por medio de la enzima 20-hidroximonooxigenasa es convertida a su forma más activa, la 20-hidroxiecdisona (20-E)³¹. Esta enzima se encuentra presente en muchos tejidos de los insectos (túbulos de Malpighi, intestino, cuerpos grasos, etc.) pero no en la glándula protorácica.

La hormona juvenil es sintetizada por las células de la corpora allata (CA) ubicada en la parte posterior del cerebro. Es un sesquiterpenoide del cual se han encontrado cuatro variantes: la JH 0, I, II y III, siendo ésta última la más abundante en la mayoría de los insectos, incluidos los mosquitos^{32, 33}. La JH es transportada por la hemolinfa unida a una lipoproteína, conocida como proteína de unión a JH (JHBPs, *JH binding proteins*). Esta hormona es secretada de manera continua durante la etapa larval del insecto, produciéndose fluctuaciones específicas a lo largo de cada estadio. La JH no es almacenada en ningún tejido y su título está regulado a través de los procesos de síntesis y degradación. Las principales vías degradativas involucran esterasas y epoxidohidrolasas, tanto específicas como no específicas³⁴.

El comienzo de los primeros eventos asociados con la muda está determinado por un título alto de 20E en la hemolinfa del insecto^{31, 35}. El tipo de muda (es decir, metamórfica o no metamórfica) se encuentra definido por el título de JH en la hemolinfa en el momento que la 20E establece el inicio la muda^{36, 37}. Si el título de JH es alto, la muda será desde un estadio larval al siguiente; si el título de JH es menor, la presencia de 20E producirá la primer muda metamórfica, desde larva a pupa; finalmente si el título JH en la hemolinfa es muy bajo o nulo, el aumento en el título de 20E provocará la segunda muda metamórfica, es decir, de pupa a adulto. Los eventos asociados con PTTH, 20E y JH se resumen en la Figura 6.

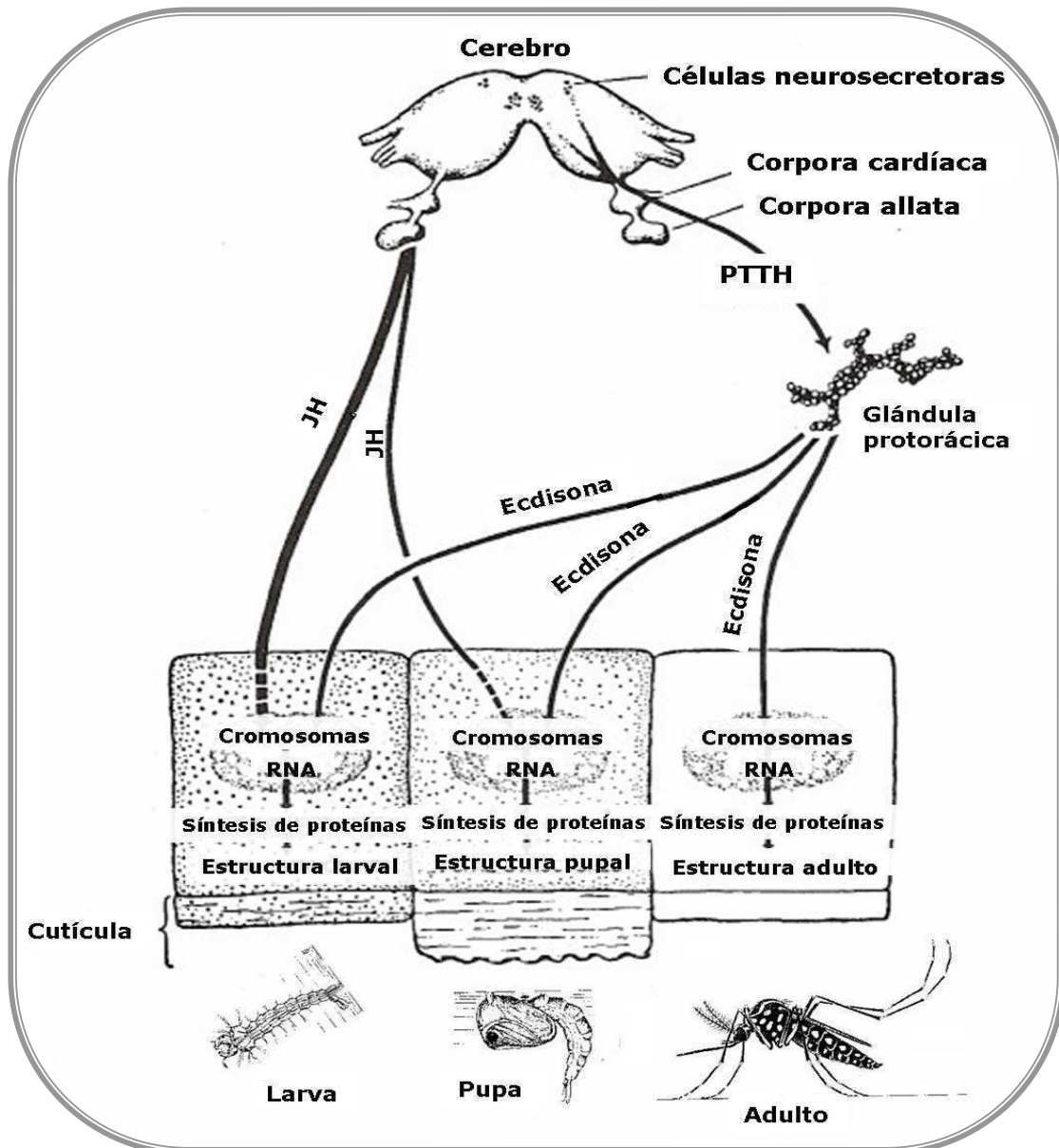


Figura 6. Diagrama esquemático de los principales órganos endocrinos de los insectos y el sitio de acción de sus hormonas. Los cambios en la etapa larval son iniciados por PTTH, que estimula a la glándula protorácica a secretar ecdisona. Al mismo tiempo, la corpora allata secreta JH, lo que favorece la síntesis de estructuras relacionadas con la etapa larval, de manera que la larva muda a larva. Al final de la etapa larval, la secreción de la corpora allata disminuye y por lo tanto disminuye la concentración de JH en la larva. En la siguiente muda, las células epidérmicas responden a ecdisona y a la baja concentración de JH, secretando cutícula pupal; los otros tejidos del insecto o se descomponen o se transforman en estructuras de pupa. En la última muda la JH está ausente y las células epidérmicas responden a ecdisona secretando cutícula característica del estadio adulto; los tejidos de la pupa se descomponen o se convierten en estructuras del adulto.³⁴

Finalmente un descenso en el título de 20E en la hemolinfa sirve como señal para la liberación de un neuropéptido conocido como hormona de eclosión. Ésta induce los movimientos musculares necesarios para la ecdisis y, a su vez, sirve como señal para la liberación de bursicón. Este neuropéptido, originado en el cordón nervioso ventral, inicia el proceso de esclerotización y oscurecimiento de la nueva cutícula³⁸.

1.5. Anatomía y fisiología de la reproducción

En los mosquitos adultos el dimorfismo sexual se manifiesta de diversas formas: en la estructura de las gónadas, en los caracteres sexuales primarios que derivan de los discos imaginales genitales, y en los caracteres sexuales secundarios, tales como las antenas de los adultos, sus palpos maxilares y el tamaño corporal²⁶.

En ambos sexos, las gónadas y la parte anterior de los conductos genitales se desarrollan a partir de primordios gonadales que están presentes en el embrión. Las partes posteriores de los conductos genitales y los órganos genitales externos se desarrollan a partir de los discos imaginales localizados en los segmentos abdominales 8, 9 y 10. Algunos de estos discos imaginales pueden ser identificados en las larvas recién nacidas, mientras que otros sólo son reconocibles al avanzar la etapa larval³⁹.

El mayor incremento en el tamaño de las gónadas rudimentarias, tanto en machos como en hembras, se produce durante el final del cuarto estadio larval, alcanzando su tamaño completo en el estado de pupa. Durante la hora anterior a la ecdisis de larva a pupa, en los machos pueden observarse los espermátocitos y espermátidas. A mediados de la etapa pupal los espermatozoides maduros se encuentran a lo largo de los testículos; el ovario primitivo desaparece durante el cuarto estadio larval²⁶.

En las hembras los primordios gonadales se ubican en el sexto segmento abdominal y muestran algo de complejidad en su estructura desde el primer estadio larval. El ovario rudimentario crece de forma continua durante el segundo y tercer estadio larval, principalmente por medio de un aumento del número de células. Durante el tercer estadio las células del ovario comienzan a diferenciarse, y al comenzar el cuarto estadio se encuentran visiblemente diferenciadas en células germinales e intersticiales. La multiplicación y diferenciación celular continuará durante el final del cuarto estadio, alcanzando los ovarios su forma definitiva durante la fase de pupa²⁶.

La evaginación de los discos imaginales 8, 9 y 10 que darán origen a las partes posteriores de los conductos genitales y los órganos genitales externos tanto masculinos como femeninos, se produce durante el estadio pupal; esta diferenciación es dependiente de la presencia de 20-E.

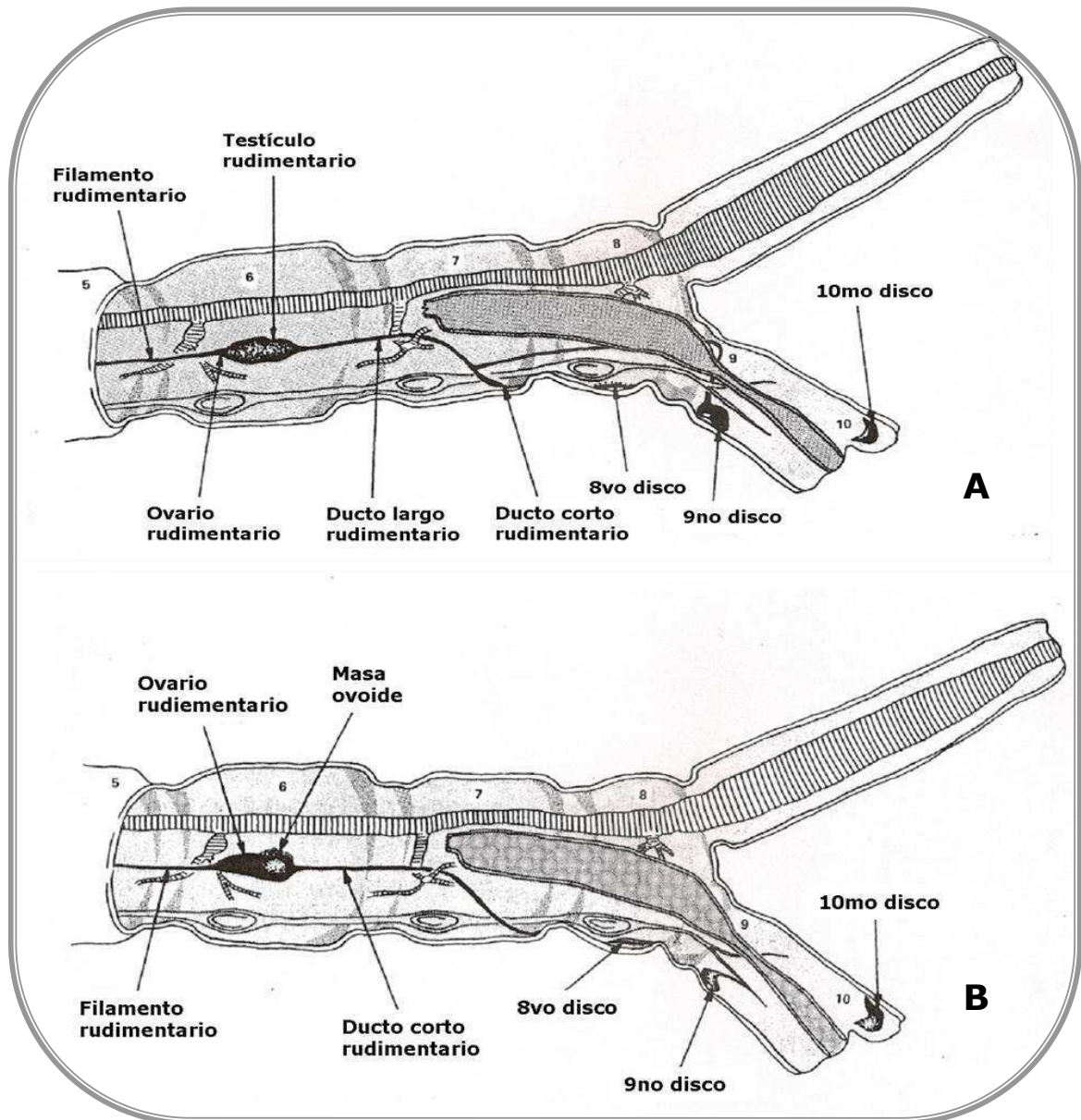


Figura 7. Primordios genitales de una larva del tercer estadio de *Aedes stimulans*, genotipo masculino (A) y genotipo femenino (B)²⁶.

1.5.1. Estructura de las gónadas y gonoductos

Los órganos sexuales masculinos del mosquito³⁹ (Figura 8) incluyen un par de testículos, un par de conductos testiculares deferentes o *vasa deferentia*, que se ensanchan posteriormente para formar un par de vesículas seminales que, en algunas especies como *Ae. aegypti*, se encuentran unidas. Las vesículas desembocan en un corto conducto eyaculatorio, que recibe el contenido de las glándulas accesorias y luego se abre directamente en la base del aedeago.

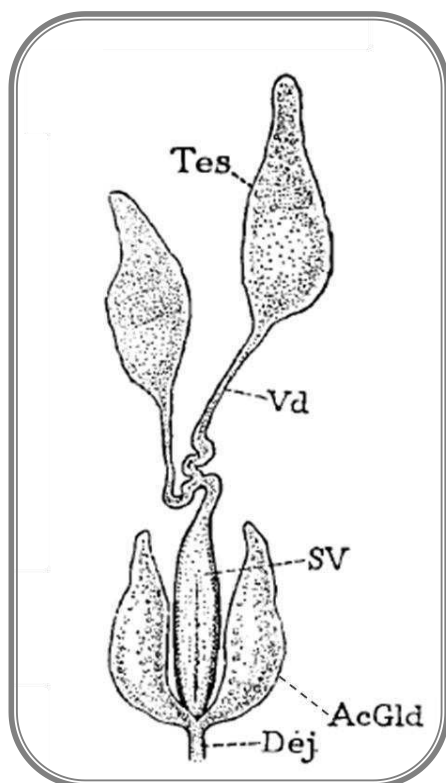


Figura 8. Órganos sexuales del macho de *Ae. aegypti*. Tes: testículos, Vd: conductos deferentes, SV: vesícula seminal, AcGld: glándulas accesorias, Dej: conducto eyaculatorio.³⁹

El extremo superior de los testículos está constituido por una masa de células indiferenciadas, la parte restante se encuentra ocupada por espermatozoides en distintas etapas de desarrollo. Los espermatozoides maduros son muy largos y filiformes, y al ser liberados de los testículos muestran activos movimientos ondulatorios. Antes del apareamiento los espermatozoides son almacenados en las vesículas seminales; las glándulas accesorias probablemente cumplen una función similar a la próstata, dando a los espermatozoides un medio líquido en el cual pueden ser liberados.

Los órganos sexuales de la hembra del mosquito³⁹, representados esquemáticamente en la Figura 9, incluyen los elementos característicos de los órganos femeninos de los insectos en general. Estos son un par de ovarios, los oviductos laterales de los ovarios y un oviducto común al cual se unen los

conductos laterales. El conducto común se abre en una pequeña bolsa, llamada cámara genital o atrio, localizada entre los segmentos abdominales 8 y 9; la apertura externa del atrio recibe el nombre de gonotrema. En la pared dorsal del atrio se abren los conductos de la espermateca y detrás de estas aberturas se encuentra la glándula accesoria, cuya función no se conoce en los mosquitos. En el momento del apareamiento los espermatozoides del macho son almacenados en la espermateca, cumpliendo el atrio la función de bolsa copulatoria. Cuando los huevos dejan el oviducto, son recibidos en el atrio y allí son fertilizados por el esperma que ha sido descargado desde la espermateca.

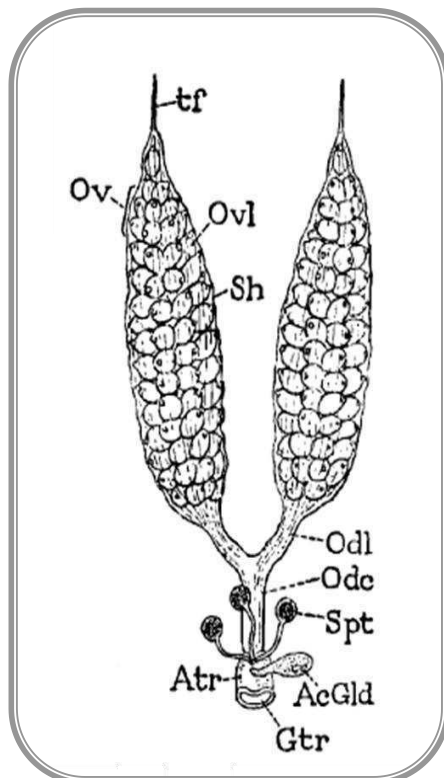


Figura 9. Órganos sexuales de la hembra de *Ae. aegypti*. tf: filamento terminal, Ov: ovario, Ovl: ovariola, Sh: membrana, Odl: oviducto lateral, Odc: oviducto común, Spt: espermateca, Atr: atrio, AcGld: glándula accesoria, Gtr: gonotrema.³⁹

Los ovarios de los mosquitos difieren en varios aspectos de la estructura habitual en otros insectos. Un ovario típico consiste en un grupo de tubos delgados, conocidos como ovariolas, que se abren en su extremo hacia un oviducto lateral. Una ovariola madura contiene una serie de óvulos de tamaño cada vez mayor en diferentes etapas de maduración, con el ovocito maduro ubicado en su extremo inferior. Al igual que en los mosquitos, cada huevo está acompañado por un número de células nutritivas o "nurse cells", que son absorbidas por el ovocito a medida que madura; su función consiste en sintetizar ribosomas y mRNA que luego son transferidos al ovocito en desarrollo. Cada uno de los ovocitos y sus células nutritivas están contenidos en una porción de la ovariola conocida como folículo. El ovocito y las células nutritivas están conectadas a través de puentes intercelulares

y se forman por la división de células indiferenciadas en una cámara localizada en el extremo superior del folículo llamada germario. El resto de la ovariola recibe el nombre de vitelario y contiene uno o dos folículos en desarrollo⁴⁰.

En los ovarios de mosquitos (Figura 9), las ovariolas son muy cortas y están dispuestas en filas a lo largo de una cavidad axial del ovario. Al igual que en otros dípteros, cada ovario se encuentra rodeado de una delgada membrana que posee finas fibras musculares, esta membrana acaba en un filamento denominado filamento terminal que se encuentra unido a tejidos ubicados a ambos lados del corazón. Cada ovariola esta formada por un gran folículo que contiene un ovocito y sus células nutritivas, y una pequeña proyección en su extremo que forma el germario (Figura 10)³⁹.

Las ovariolas de los mosquitos son clasificadas como meroísticas, porque contienen tanto a las células nutritivas como a los ovocitos; además se clasifican como politróficas porque un grupo de células nutritivas se asocia con un ovocito en cada folículo ovárico⁴⁰.

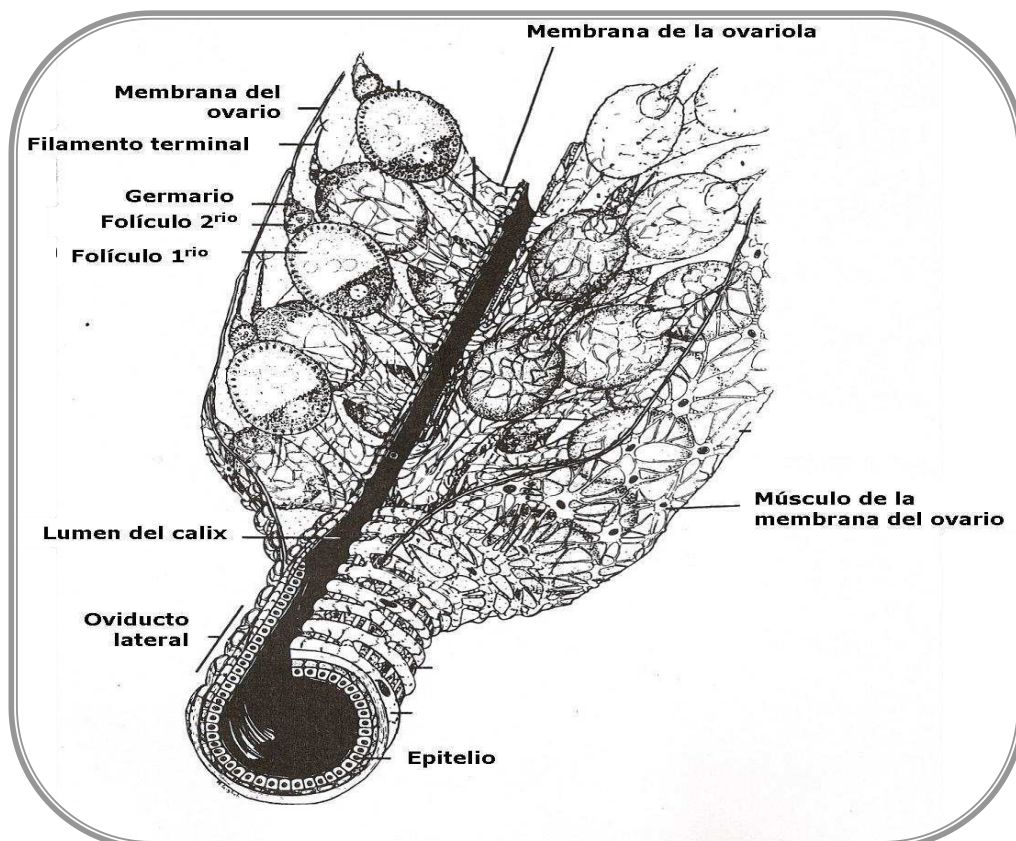


Figura 10. Parte de un ovario y el oviducto lateral de una hembra de mosquito núlpara, abierto para mostrar el cáliz²⁶.

1.5.2. Espermatogenesis y oogénesis

En los mosquitos la espermatogénesis se produce principalmente durante las fases de larva y pupa. Los espermatozoides pueden aparecer en la zona posterior de los testículos tan solo 5 horas luego de la ecdisis de larva a pupa, y aproximadamente 95 horas después se encuentran presentes a lo largo de los testículos⁴⁰.

Durante las sucesivas etapas de la espermatogénesis un pequeño número de células germinales se multiplican y diferencian para formar miles de espermatozoides. En la primera fase de la espermatogénesis, se forman las espermatogonias primarias a partir de las células germinales. Con la formación de espermatogonias, las células germinales inician una fase de multiplicación que conduce al desarrollo de los espermatocitos que sufrirán meiosis, con la consecuente reducción a la mitad del número de cromosomas, esencial para la formación de gametos. Por último, dichos productos haploides, llamados espermátidas, atraviesan una diferenciación celular que culmina en la formación de los espermatozoides⁴⁰.

En las hembras, durante el cuarto estadio larval los ovarios ya se encuentran diferenciados, y al inicio del estadio pupal cada ovario está formado por grupos de ovariolas. Durante la etapa pupal tardía puede distinguirse en cada ovariola un germario y un vitelario que contiene uno, dos o incluso tres folículos ováricos⁴⁰.

La producción de huevos es un proceso cíclico. Los grupos de folículos hermanos se separan sucesivamente del germario y se desarrollan de manera sincrónica a través de una secuencia de pasos que culminan con la formación de los ovocitos. Los pasos desde la formación de un grupo de folículos hermanos hasta la formación de un grupo de ovocitos maduros constituyen el ciclo ovárico³⁹.

Durante este ciclo se alternan períodos de crecimiento y desarrollo con períodos de letargo. Los folículos que han entrado en un período de letargo reanudan el crecimiento solo en determinadas condiciones fisiológicas, lo que permite el desarrollo de los grupos de folículos de manera coordinada. Con fines descriptivos, el ciclo ovárico se puede dividir en cuatro fases de desarrollo siguiendo criterios fisiológicos y anatómicos⁴¹:

- **Fase pre-vitelogénica.** Durante este período un folículo se separa del germario y los diferentes tipos celulares se tornan visiblemente distintos. El ovocito se vuelve competente para incorporar vitelogenina, y finalmente se produce un breve crecimiento del folículo antes de su ingreso en una etapa de reposo, conocida como etapa de letargo pre-vitelogénica o "*previtelogenic resting stage*".
- **Fase de iniciación.** Este período comienza inmediatamente después de una ingesta de sangre, cuando se reanuda el crecimiento del folículo. Se produce la formación de microvellosidades y depresiones revestidas en la membrana celular del ovocito donde se encuentran los receptores que facilitarían el ingreso de vitelogenina. Al mismo tiempo comienza la síntesis de vitelogenina en el cuerpo graso.
- **Fase trófica.** Esta fase esta caracterizada por un marcado aumento en la síntesis de vitelogenina y su incorporación al ovocito, que conduce a su crecimiento acelerado. Finaliza con la formación de una capa endocorionica entre las células epiteliales del folículo y el ovocito, sumado al cese de la síntesis de vitelogenina.
- **Fase post-trófica.** En esta fase, el ovocito adquiere su forma madura y es rodeado por el corion aun no endurecido.

El corion es la parte de la cubierta del huevo que es secretada antes de la oviposición por las células epiteliales del ovario. La secreción se produce en dos fases, resultando en la formación de las dos capas que constituyen el corion, el endocorion y el exocorion. Se cree que en *Ae. aegypti* dos genes, 15a-1 y 15a-2, codifican para las proteínas del endocorion. Utilizando una sonda derivada del gen 15a-1, se ha detectado la presencia de un transcrito de ARN sólo en los ovarios de hembras que habían sido alimentadas con sangre, indicando la especificidad de la localización del transcrito y la necesidad de la ingesta de sangre para iniciar el proceso de síntesis de proteínas del corion⁴². El exocorion comienza a secretarse alrededor del endocorion entre las 40 y 60 horas posteriores a la ingesta de sangre; luego de 72 horas esta capa se encuentra completamente formada y las células epiteliales que la secretan degeneran^{43, 44}.

El corion se mantiene blando hasta después de la oviposición, momento en que sufre un proceso de endurecimiento y oscurecimiento en el que están involucradas dos enzimas, la dopa descarboxilasa y la dopamina N-acetiltransferasa.

1.5.3. Vitelogénesis

Los huevos de los insectos contienen todos los nutrientes necesarios para el desarrollo del embrión. El término vitelogénesis hace referencia a todos los procesos involucrados en la formación de dichos nutrientes.

La vitelogenina es el precursor de la vitelina, principal proteína encontrada en los huevos de los insectos. Las vitelogeninas son grandes glicolipofosfoproteínas oligoméricas, con un peso molecular de entre 200 y 600 kDa. Son sintetizadas en el cuerpo graso y luego liberadas a la hemolinfa²⁶.

Estudios en *Ae. aegypti* han demostrado que el ARN mensajero de 6,5 kb que codifica la vitelogenina no se encuentra presente antes de la ingesta de sangre, sin embargo fue detectado en el cuerpo graso sólo una hora después. Su título en este órgano aumenta de manera constante y alcanza su punto máximo entre 24 y 36 horas después de la ingesta de sangre, para luego caer rápidamente hasta volverse indetectable⁴⁵. El producto principal de la traducción del ARNm de vitelogenina es un polipéptido de 224 kDa. Éste es primero procesado por glicosilación, seguido por una fosforilación parcial que conduce a la formación de una pro-vitelogenina de 250 kDa. La pro-vitelogenina es cortada proteolíticamente, fosforilada y luego sulfatada en el complejo de Golgi, dando origen a dos subunidades de 200 y 66 kDa. Estas dos subunidades oligomerizan para dar un producto de 375 kDa que se secreta en la hemolinfa y es captado por los ovocitos.

Los ovocitos en desarrollo acumulan nutrientes proteicos mediante la incorporación de grandes cantidades de vitelogenina circulante. Esta incorporación es realizada a través del proceso de endocitosis mediada por receptor, en el cual la vitelogenina se une a receptores localizados en depresiones revestidas de la membrana del ovocito y es incorporada por medio de vesículas recubiertas, principalmente con clatrina. Una vez que la vitelogenina ha ingresado en el ovocito, es transformada a su forma final, los cristales de vitelina.

1.5.4. Control endocrino del desarrollo del ovario y la vitelogénesis

En los mosquitos, los folículos se desarrollan de forma sincrónica en todas las ovariolas. Se ha demostrado la participación de hormonas del cerebro, la corpora allata y los propios ovarios en la regulación del desarrollo de los ovarios y la síntesis de vitelogenina, de las cuales la acción de dos, la JH y la 20-E es considerada fundamental³⁷.

El inicio de la fase pre-vitelogénica está caracterizado por la separación de los folículos del germario. Los folículos primarios se separan del mismo poco después de la emergencia. No se han encontrado evidencias directas del mecanismo que controla la separación, sin embargo se sabe que la 20-E producida durante el ciclo ovárico induce la separación de los folículos secundarios después de la ingesta de sangre. Se cree entonces que la separación de los folículos primarios del germario observada en las hembras de *Ae. aegypti* recién emergidas⁴⁶ es una consecuencia de la secreción de 20-E durante la fase de pupa.

Una vez que el ovocito se separa del germario, su tamaño se incrementa ligeramente antes de entrar en una etapa de letargo. Algunos experimentos han demostrado que el desarrollo de los folículos más allá de esta etapa es estimulado por la JH. Si se remueve la corpora allata de hembras de *Ae. aegypti* dentro de la primer hora post-emergencia, los folículos ováricos primarios muestran poco o ningún crecimiento y no alcanzan la etapa de letargo pre-vitelogénica. Sin embargo, este efecto puede ser revertido si la corpora allata es reimplantada o si las hembras son tratadas con un análogo de JH, produciéndose un ciclo ovárico normal luego de la ingesta de sangre^{46, 47}.

Durante la fase pre-vitelogénica, la JH no sólo estimula el crecimiento inicial y el desarrollo de los folículos ováricos, sino que también promueve la capacidad de los folículos de responder a la hormona ecdisteroideogénica ovárica (OEH) luego de una ingesta de sangre.

La OEH (también conocida como EDNH) es producida por las células neurosecretoras del cerebro y controla la síntesis de ecdisona en el ovario. El título de OEH aumenta rápidamente, después de la ingesta de sangre y comienza a declinar antes de que finalice el primer día luego de la alimentación⁴⁸. El ovario de hembras recién emergidas no tiene la capacidad de responder a esta hormona,

pero desarrolla competencia para hacerlo durante las siguientes 36 horas, en un proceso controlado por la JH⁴⁹.

Los ovarios sintetizan ecdisona que es inmediatamente convertida a 20-E. Esta hormona interviene en la iniciación, el mantenimiento de la síntesis y la liberación, desde el cuerpo graso, de la vitelogenina⁵⁰. La 20-E no es detectable en la hemolinfa de hembras que no han sido alimentadas con sangre, sin embargo alcanza máximos entre las 10 y 25 horas luego de una ingesta sanguínea⁴⁸. La producción de ecdisona en el ovario no se encuentra exclusivamente bajo el control de la OEH ya que, como se mencionó anteriormente, se requiere a su vez la exposición del ovario a JH para que estos se vuelvan competentes y respondan a la OEH.

La síntesis de vitelogenina es iniciada en el cuerpo graso luego de la ingesta de sangre (Figura 11) y es controlada por la 20-E del ovario. Sin embargo, la JH también juega un papel importante ya que el cuerpo graso no responde a la 20-E sin exposición previa a la JH.

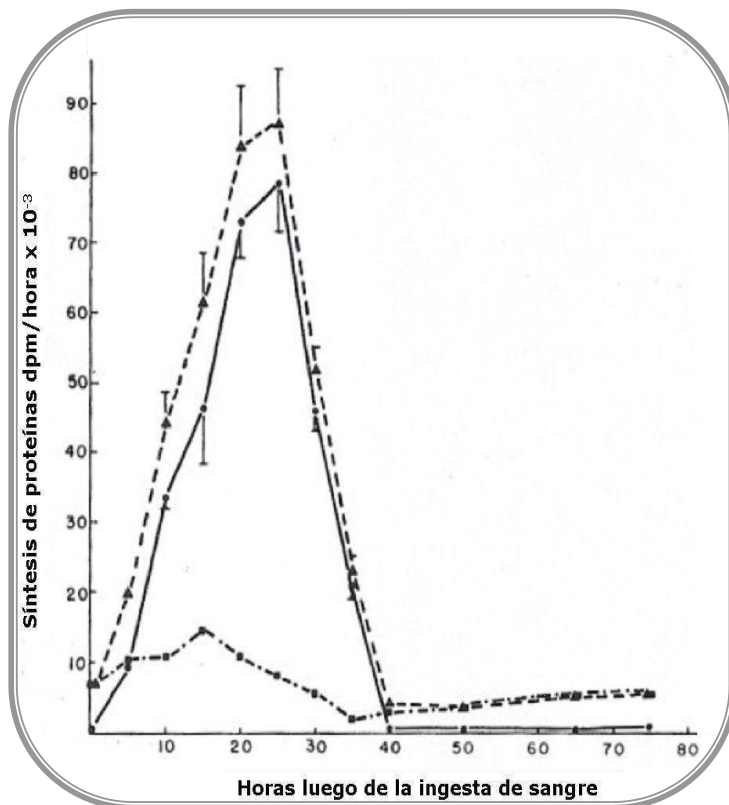


Figura 11. Síntesis de vitelogenina y proteínas totales después de la ingesta de sangre en *Ae. aegypti* a partir de preparados de cuerpo graso. Los puntos representan 3 réplicas de 5 preparaciones de cuerpo graso \pm ES. ▲ proteínas totales; ● vitelogenina, ■ no-vitelogenina.⁴⁸

Ae. aegypti realiza varias ingestas de sangre y cada ciclo de desarrollo del huevo requiere la reaparición de las mismas hormonas. El desarrollo de un nuevo folículo requiere en primer lugar la aparición de 20-E para estimular su separación del germario, seguido de la JH para estimular el crecimiento hasta la etapa de letargo pre-vitelogénica. El cuerpo graso pierde la competencia de responder a la 20-E después de la primera ingesta de sangre y, presumiblemente, requiere una segunda exposición a la JH para recuperar esta capacidad⁵¹. Dado que el cuerpo graso no conserva ninguno de los mecanismos de síntesis de proteínas o el ARNm de la vitelogenina desde una ingesta de sangre a la siguiente, estas macromoléculas deben volverse a sintetizar luego de cada ingesta. Así, el proceso de desarrollo de los huevos en los mosquitos requiere la aparición secuencial de JH, OEH y ecdisona, como se resume en la figura 12.

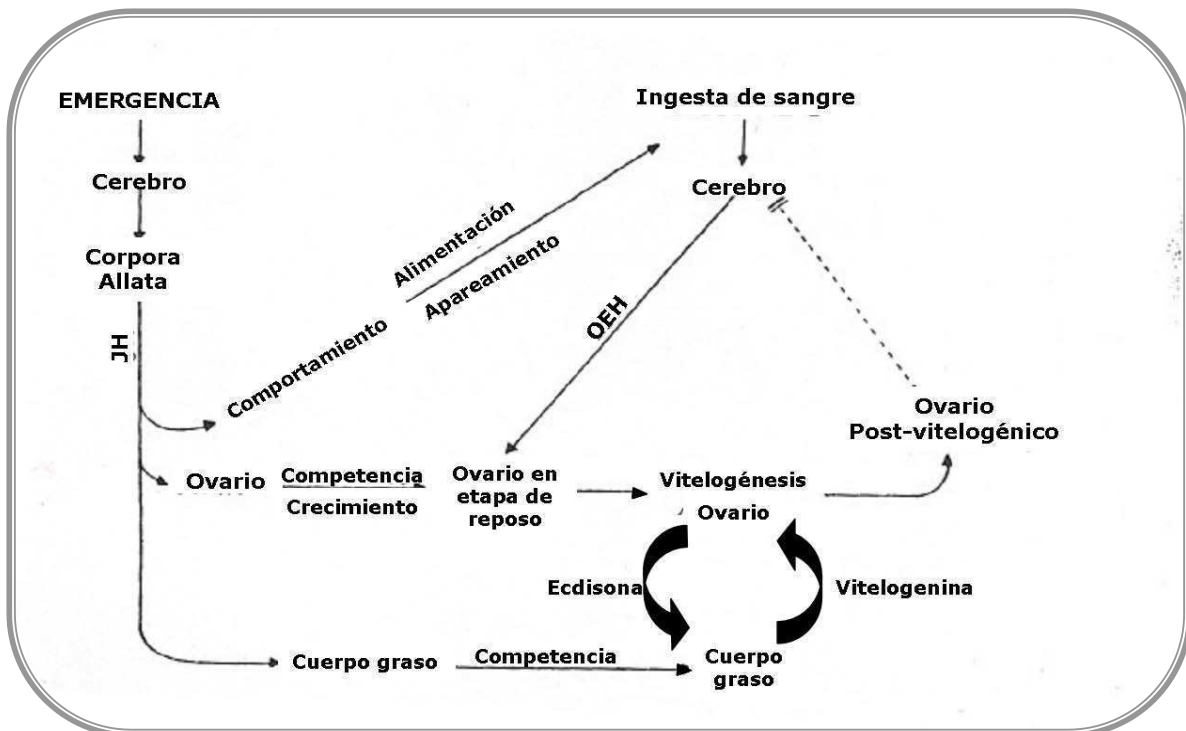


Figura 12. Modelo del control del desarrollo de los huevos en *Ae. aegypti*. Dos señales del ambiente (emergencia e ingesta de sangre) y al menos 3 hormonas (JH, OEH y ecdisona) interactúan para controlar el desarrollo de los huevos. La emergencia del adulto provoca la liberación de JH, que induce cambios en el comportamiento de alimentación y apareamiento. También causa el crecimiento de los folículos ováricos a la fase de reposo; la capacidad de los ovarios de responder a OEH y del cuerpo graso para responder a ecdisona. La ingesta de sangre provoca la liberación de OEH, que actúa sobre el ovario, estimulando la síntesis de ecdisona. Esta última actúa sobre el cuerpo graso, estimulando la síntesis de vitelogenina. Adaptado de ⁴⁸.

2. El dengue y el dengue hemorrágico

El dengue es una infección viral aguda y sistémica, producida por un flavivirus. Es la enfermedad más importante entre las virales transmitidas por artrópodos. La incidencia mundial anual del dengue alcanza a 50 millones de casos por año, de los cuales 500.000 personas deben ser hospitalizadas y 20.000 mueren. Se estima que aproximadamente un 40% de la población mundial corre el riesgo de contraer la enfermedad al vivir en áreas donde el virus del dengue puede ser transmitido. Esto involucra a regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, principalmente zonas urbanas y semiurbanas de más de 100 países de África, América, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental⁴.

El dengue es un problema creciente para la salud pública mundial, debido a varios factores: el cambio climático, el aumento de la población mundial en áreas urbanas de ocurrencia rápida y desorganizada, la insuficiente provisión de agua potable que obliga a su almacenamiento en recipientes caseros habitualmente descubiertos, la inadecuada recolección de residuos y la gran producción de recipientes descartables que sirven como criaderos del mosquito al igual que los neumáticos desechados. A esto hay que sumarle al aumento de los viajes y migraciones, las fallas en el control de los vectores y la falta de una vacuna eficaz para prevenir la enfermedad. Esta situación ha dado lugar a epidemias cada vez mayores y más frecuentes, y a la presencia de regiones hiperendémicas con circulación de varios serotipos del virus.

En América solamente ha sido demostrada la transmisión del dengue a través de mosquitos de la especie *Ae. aegypti*. En cambio, *Ae. albopictus*, relacionado a la transmisión de la enfermedad en otras partes del mundo, solo es un vector potencial en América.

2.1. El virus del dengue y sus serotipos

El dengue es causado por uno de cuatro serotipos del virus, designados como DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4⁵². La infección con uno de estos serotipos proporciona una inmunidad de por vida contra él, pero no proporciona inmunidad cruzada contra los otros tres. Cuando una persona tiene anticuerpos contra uno de los serotipos del virus del dengue y es infectada por otro, se produce una respuesta infrecuente, casi exclusiva de la infección por dengue: una amplificación que se traduce en una elevada replicación viral y aumento de la viremia, que condiciona y favorece el desarrollo de la forma grave de la enfermedad, el dengue hemorrágico.

Aquellas personas que viven en una zona endémica, pueden tener hasta cuatro infecciones de dengue, aumentando el riesgo de sufrir dengue hemorrágico con cada nueva infección.

Durante tres décadas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido y recomendado la clasificación del dengue en: fiebre del dengue y fiebre hemorrágica por dengue o dengue hemorrágico con o sin síndrome de shock por dengue. En los últimos años se han publicado artículos que cuestionan la utilidad de esta clasificación, por considerarla rígida, demasiado dependiente de los resultados de laboratorio, no inclusiva de enfermos de dengue con otras formas de gravedad, tales como la encefalitis, miocarditis o hepatitis grave, e inútil para el manejo clínico de los enfermos. Por ésta razón, la OMS auspició un estudio internacional, llamado Denco (Dengue Control), cuyo objetivo principal fue encontrar una forma mejor de clasificar la enfermedad e identificar los signos de alarma útiles para mejorar el manejo de casos. Como resultado de este estudio se arribó a la propuesta de una clasificación binaria de la enfermedad: dengue y dengue grave.⁵³

2.2. Transmisión del virus y características clínicas

Las hembras de *Ae. aegypti* adquieren el virus de una persona virémica (con virus en sangre periférica) al ingerir de ésta la sangre que necesitan para el desarrollo de sus huevos. El virus se multiplica dentro de la hembra en un ciclo que dura entre 10 a 14 días llamado período de incubación extrínseca. Al ingresar a las glándulas salivales, el virus se concentra. Cuando la hembra pica a una persona sana para ingerir sangre, inyecta la saliva que contiene un anestésico y actúa como un lubricante para las partes móviles de la boca y anticoagulante; suministrando una cierta cantidad de virus que, si la persona no es inmune, provocará la enfermedad. La hembra del mosquito permanece con capacidad de infectar individuos susceptibles por el resto de su vida⁵⁴.

La infección por dengue puede ser clínicamente inaparente o puede causar una enfermedad de variada intensidad. Luego de un período de incubación intrínseca (dentro del humano) que puede ser de 5 a 7 días, aparecen las primeras manifestaciones clínicas, aunque una alta proporción de las personas infectadas cursan la enfermedad de manera asintomática⁵⁵.

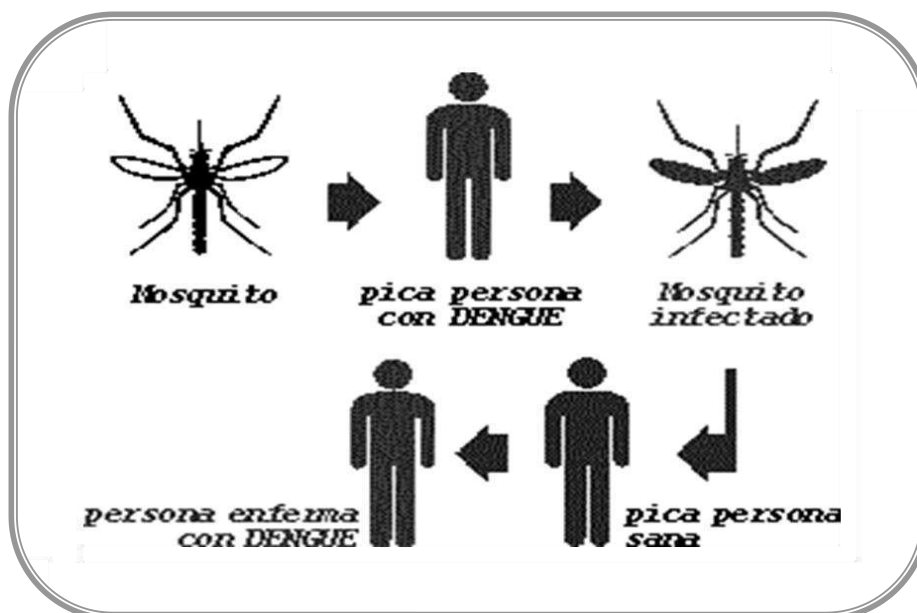


Figura 13. Transmisión del virus del dengue. El virus se transmite al humano a través de la picadura de la hembra hematófaga de los mosquitos *Aedes (aegypti* y *albopictus)* cuando se alimenta de una persona enferma y luego pica a otra persona sana. La enfermedad no se trasmite directamente de una persona a otra.

Los casos de dengue grave son más frecuentes en personas que ya padecieron dengue por un serotipo y se infectan nuevamente con un serotipo diferente. Este fenómeno puede suceder hasta muchos años después de ocurrida la infección primaria, pero no implica necesariamente que toda infección secundaria conduzca a dengue grave. No obstante, también la infección primaria puede asociarse a dengue grave, en relación a la virulencia de la cepa u otros factores del hospedador.⁵⁵

2.3. Situación del dengue en las Américas

A pesar de que el virus del dengue se aisló por primera vez en América en 1942⁵⁶ se sabe que ocasionó grandes brotes en el Caribe desde la primera mitad del siglo XVII, así como epidemias continentales o verdaderas pandemias a lo largo de los siglos XIX y XX.

A fines de los años setenta el DEN-1 se reintrodujo en la Región en forma de una pandemia que afectó El Salvador, Guatemala, Honduras, México, el estado de Texas en Estados Unidos, Colombia, Guayana Francesa, Guyana, Surinam y Venezuela, así como todas las islas del Caribe. Durante el decenio de 1980 el DEN-1 se expandió hacia Sudamérica, con brotes en Bolivia, Brasil, Ecuador, Paraguay y Perú, países que hacía muchos años no experimentaban la enfermedad o que jamás

la habían notificado. La primera gran epidemia de dengue hemorrágico ocurrió en Cuba en 1981, con 158 muertes documentadas en un período de tres meses.^{56, 57}

Durante los años noventa se incrementó notablemente el número de casos de dengue hemorrágico y en 1994 se introdujo el DEN-3 en la Región. Debido a que este serotipo no circulaba en América desde 1978, su reaparición resultó particularmente preocupante por la ausencia de inmunidad a este serotipo entre la creciente población urbana de la región.

En la Figura 14, se resume la situación de esta enfermedad en las Américas⁵⁸:

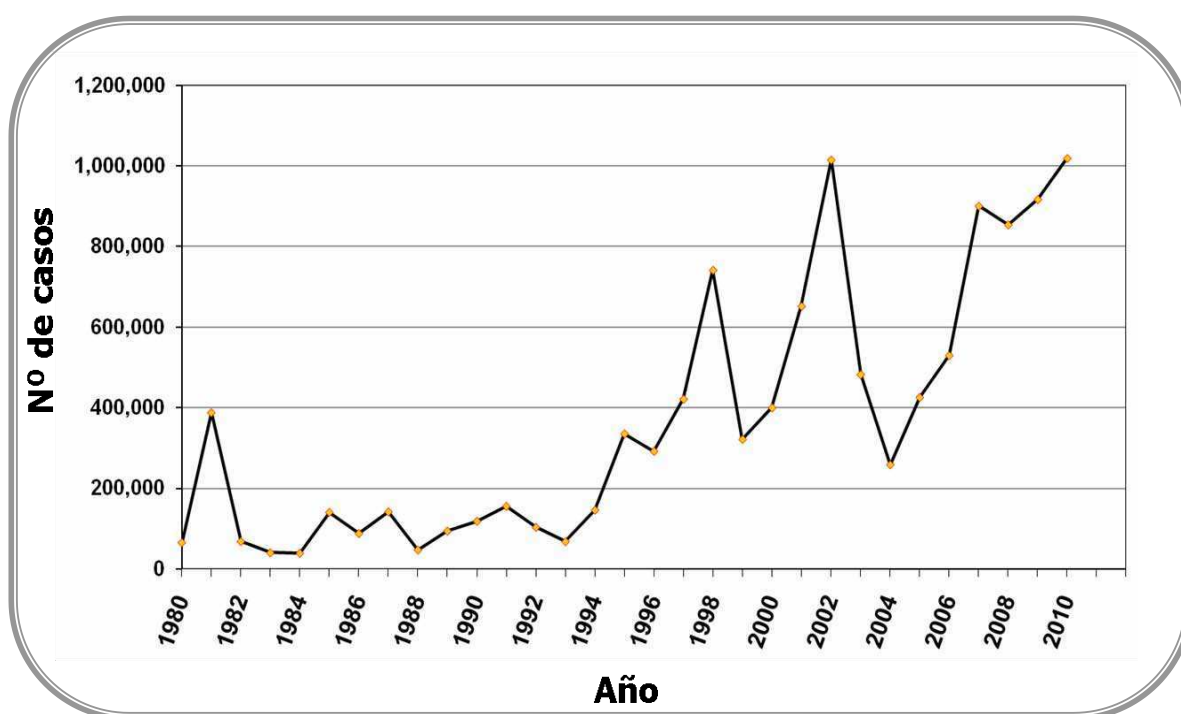


Figura 14. Evolución del dengue en las Américas 1980-2010. Fuente: OPS/OMS, Dr. José Luís San Martín.⁵⁸

Hoy día, en la Región de las Américas existen condiciones epidemiológicas y sociales similares a las que favorecieron el agravamiento del dengue hemorrágico en Asia durante el decenio de los años cincuenta. Es decir, se encuentran altas densidades del vector junto con circulación de varios serotipos del virus y hacinamiento de poblaciones marginadas en los cinturones de pobreza de las grandes ciudades.

2.4. Situación del dengue en la Argentina

En 1916 se produjo el primer brote de dengue registrado en nuestro país. Fue introducido desde Paraguay y afectó las provincias de Corrientes y Entre Ríos. Desde esta epidemia, no se informaron casos autóctonos hasta el año 1997.⁵⁹

En 1998, un brote epidémico en la región del chaco salteño, con epicentro en la ciudad de Tartagal y producido por el serotipo DEN-2, causó varios cientos de casos, todos de dengue clásico, con un pico epidémico en el mes de mayo. Todo indicó que la introducción del virus provino de Bolivia.⁶⁰

En la frontera Noroeste comenzaron a circular los serotipos DEN-1 y DEN-3, con brotes epidémicos reducidos, hasta que en 2004, en el chaco salteño, se produjo un brote extendido con miles de casos atribuidos al serotipo DEN-3. La situación en esta región se agravó en el año 2006 por las inundaciones que sufrió Tartagal. Los casos confirmados de dengue en Argentina en el 2007 ascendieron a 192, de los cuales sólo uno fue de tipo hemorrágico.⁶¹

En el año 2009, se produjo en el país una gran epidemia con un total de 26.644 casos, Catamarca y Chaco fueron las provincias más afectadas. Todos los casos en el país correspondieron al serotipo DEN-1.⁶²

En la Figura 15, se resume la situación de esta enfermedad en la Argentina⁶³:

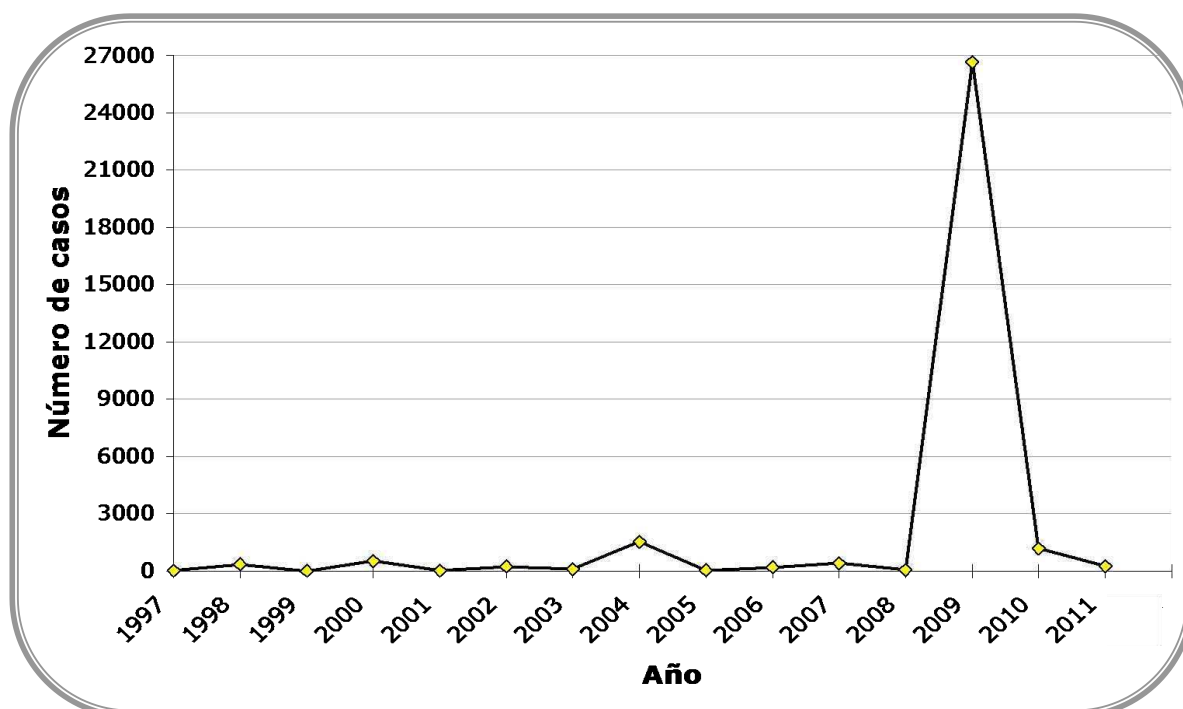


Figura 15. Evolución del dengue en la Argentina 1997-2011*. Elaborado sobre la base de datos del Ministerio de Salud de la Nación. * Hasta semana epidemiológica 42.

3. Estrategias de control de *Ae. aegypti*

En ausencia de una vacuna efectiva, el control del vector es la única forma de controlar la transmisión del dengue. La eliminación de recipientes artificiales como los envases descartables, llantas y barriles donde se cría el mosquito, es fundamental para prevenir la enfermedad. Sin embargo, junto con el control de los criaderos, deben implantarse el saneamiento ambiental, la participación de la comunidad, la comunicación y educación para la salud, el control químico y el control biológico.

La participación de la comunidad requiere un vínculo continuo entre ésta y el personal encargado de ejecutar el programa, con objeto de poner en marcha actividades tendientes a modificar los comportamientos humanos que propician la proliferación y el mantenimiento de criaderos potenciales de *Ae. aegypti*. Los criaderos no pueden eliminarse con solo mejorar los servicios básicos; también es esencial modificar las prácticas y comportamientos humanos que favorecen su existencia.

Por otro lado, los programas de saneamiento ambiental y eliminación de criaderos no han sido suficientes por si solos para disminuir los índices de infestación; por tal motivo, durante los últimos 40 años, el control del mosquito se ha logrado principalmente por métodos químicos.⁴ Éstos consisten básicamente en la aplicación de larvicidas en aquellos recipientes que funcionen como criaderos y no puedan ser eliminados, y el rociado con adulticidas en casos de epidemia o cuando las densidades del vector sean muy elevadas.

3.1. Formulaciones utilizadas para control de *Ae. aegypti*

Por lo general, los plaguicidas o ingredientes activos no son utilizados en su forma pura, también llamada grado técnico. El ingrediente activo es mezclado con diferentes componentes no insecticidas para mejorar la estabilidad, reducir la toxicidad en organismos diferentes a la plaga, mejorar la eficacia o facilitar la manipulación del producto, creando así una formulación plaguicida. Algunas de las formulaciones más frecuentemente utilizadas para el control de *Ae. aegypti* son^{64,65}.

- **Gránulos.** Es una formulación sólida, uniforme, en forma de gránulos con dimensiones bien definidas, para aplicación directa. La materia inerte que sirve de soporte a los gránulos es un producto ya preformado, capaz de

absorber el plaguicida o de recubrirse con él. Si el plaguicida es líquido, se absorbe directamente en el gránulo, y si es sólido se absorbe a través de una solución concentrada, o bien provocando su adherencia al gránulo, que previamente ha sido recubierto con materias adecuadas y compatibles con el plaguicida.

- **Concentrado Emulsionable.** Es una formulación líquida, homogénea para ser aplicada como emulsión en agua.
- **Suspensión concentrada (floable).** Es una formulación líquida formada por una suspensión estable de un ingrediente activo sólido en un líquido, en presencia de surfactantes, fabricada para ser suspendida en agua antes de su uso.
- **Polvo mojable.** Es un formulado que se presenta en forma de polvo capaz de ser mojado y mantenerse en suspensión en agua. El ingrediente activo está disperso en un inerte, y es formulado con coadyuvantes tales como humectantes, agentes de suspensión, adherentes y estabilizantes.
- **Formulaciones de liberación lenta.** Se preparan como briquetas, hilos o bloques, para proporcionar una liberación lenta del activo en el agua.
- **Formulaciones fumígenas.** Están constituidas por el principio activo mezclado con sustancias combustibles, comburentes e inertes, proporcionando humos letales a las plagas. El activo es liberado en los humos, quedando un residuo formado por las sustancias acompañantes que actuaron como soporte, catalizadores u oxidantes en las reacciones químicas.

Las formulaciones fumígenas han sido objeto de estudio de nuestro laboratorio desde hace más de veinte años, aplicadas principalmente para el control del vector de la Enfermedad de Chagas^{66, 67}, aunque también han sido utilizadas con éxito en experiencias preliminares para el control del mosquito vector del dengue⁶⁸.

3.2. Principales familias de insecticidas utilizadas en el control de *Ae aegypti*

Existe una gran variedad de familias y modos de acción de los insecticidas; a continuación se describen las familias más importantes que se utilizan en el control de *Ae. aegypti*. Para una revisión de la información sobre las familias descritas véase a Stenersen, J.⁶⁹

★ **Organofosforados.** Este término incluye a todos los insecticidas derivados del ácido fosfórico. Actúan como inhibidores irreversibles de la acetilcolinesterasa (AChE) enzima que hidroliza la acetilcolina, un neurotransmisor presente en la sinapsis, que permite la continuidad del impulso nervioso. Si la acetilcolinesterasa es inhibida, la acumulación de acetilcolina en la sinapsis colinérgica provoca la aparición de síntomas tóxicos cuya secuencia típica es la pérdida de coordinación muscular, convulsiones y muerte. Es por esto que en condiciones normales, una vez que la acetilcolina ha cumplido su función, es hidrolizada inmediatamente por la AChE, generando como producto de la reacción colina y acetato, que son inocuos para el organismo.

La AChE es una enzima muy importante del sistema nervioso, tanto en vertebrados como invertebrados, por lo que el modo de acción de los insecticidas organofosforados es el mismo en ambos grupos.

★ **Carbamatos.** Este término incluye a los insecticidas derivados del ácido carbámico. Los carbamatos, al igual que los organofosforados, inhiben la AChE, sin embargo esta inhibición es reversible.

★ **Piretroides.** Son análogos sintéticos de las piretrinas, un conjunto de moléculas insecticidas obtenidas a partir del piretro, un componente que se extrae de las flores de determinadas especies de *Chrysanthemum*. El piretro ha sido un insecticida muy exitoso, pero hay una serie de problemas asociados con su uso: es degradado rápidamente en presencia de la luz solar (su vida media promedio al aire libre es de unas pocas horas) y es fácilmente detoxificado por el metabolismo de los organismos blanco. En décadas recientes, los esfuerzos de la investigación se han encaminado a la obtención de productos de síntesis con estructura similar a las piretrinas pero con

propiedades más favorables, conocidos como piretroides. Son más estables en presencia de luz solar (su vida media promedio al aire libre es de un mes) y muy efectivos contra una gran variedad de insectos plaga. Los piretroides, al igual que las piretrinas, interfieren con el funcionamiento de los canales de sodio dependientes de voltaje de las neuronas. Las células nerviosas intoxicadas producen descargas repetitivas del impulso nervioso, llevando a la parálisis y muerte del insecto.

- ★ **Toxinas microbianas.** Desde hace tiempo se conoce la acción de distintas bacterias patógenas para los insectos, pero a pesar de varios casos conocidos, solamente unos pocos han alcanzado importancia en los tratamientos de control de plagas. Un ejemplo de ello es el *Bacillus thuringiensis* (Bt). Esta bacteria produce una protoxina o cristal tóxico durante la fase de esporulación denominada δ -endotoxina que es depositada junto con la spora y es altamente tóxica para los insectos susceptibles, quienes deben ingerirlas para que se ejerza su acción. Una vez ingerida la bacteria, la protoxina se disuelve en el pH alcalino del intestino del insecto, se produce su activación proteolítica y se unen a receptores específicos localizados en la superficie de las membranas epiteliales. Como consecuencia, las células se destruyen y la larva cesa de alimentarse. Además, el pH alcalino provoca la germinación de las esporas, ocasionando la proliferación de las bacterias. Finalmente la larva muere por inanición y/o septicemia.

3.2.1. Reguladores del crecimiento de los insectos.

En la búsqueda de insecticidas más seguros, es decir, con modos de acción más selectivos y menor riesgo para los organismos no blanco y el medio ambiente, se ha avanzado en los últimos 20 años con el desarrollo de compuestos naturales y sintéticos capaces de interferir con los procesos de crecimiento, desarrollo y metamorfosis de los insectos blanco. Estos productos han sido llamados reguladores del crecimiento de los insectos (IGR, del inglés *insect growth regulators*). Los IGR difieren notablemente de los insecticidas de uso común, ya que ejercen su efecto insecticida a través de su acción sobre el desarrollo, la metamorfosis y la reproducción de los insectos, perturbando la actividad normal del sistema endocrino⁷⁰.

Hay varios tipos de reguladores del crecimiento, según el proceso fisiológico de desarrollo de los insectos con el que interfieren, por ejemplo: los agonistas y los antagonistas de la ecdisona, los antagonistas de la hormona juvenil, los análogos de la hormona juvenil y los inhibidores de la síntesis de quitina; siendo estos últimos dos los más numerosos.⁷⁰

Cuando los estadios inmaduros mudan, deben sintetizar una nueva cutícula, y uno de sus principales componentes es la quitina, un polímero de N-acetilglucosamina. Los inhibidores de la síntesis de quitina, interfieren con la síntesis de este polímero y ocasionan la formación de una cutícula anormal. La larva o pupa no puede mudar correctamente y muere en el intento sufriendo una rápida deshidratación. Son ejemplo de inhibidores de la síntesis de quitina las benzoilfenilureas como el diflubenzurón, el triflumurón y el hexaflumurón.

Los análogos de la hormona juvenil, también conocidos como juvenoides, imitan la actividad de la hormona del mismo nombre, que es producida en forma natural por los insectos durante el desarrollo larvario. Afectan mayormente la muda de larva a pupa o de pupa a adulto. Según la dosis, su efecto hace que las pupas o los adultos no se formen correctamente, o generan la aparición de larvas supernumerarias o adultoides que no existen en condiciones naturales⁷⁰. Este grupo esta formado por insecticidas de estructura química muy diversa, algunos como el metoprene, muy similares a la hormona juvenil endógena, y otros como el fenoxycarb y el pyriproxyfen, muy diferentes (Figura 16).

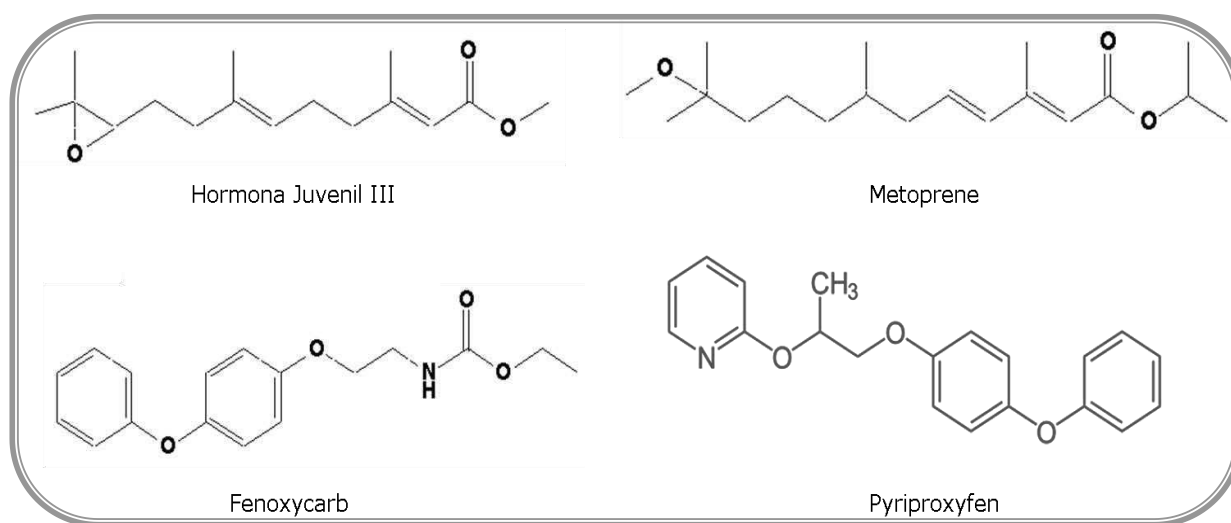


Figura 16. Estructura química de la JH III en comparación con la estructura de algunos IGRs del grupo de los análogos de hormona juvenil.

3.3. Control químico del adulto

El rociado espacial de insecticidas en forma de microgotas es la metodología más utilizada para controlar al mosquito adulto. Este tipo de rociado, denominado Ultra Bajo Volumen o ULV (del inglés *Ultra Low Volume*), se aplica desde un equipo portátil (tipo motomochila), o desde un equipo pesado montado en un vehículo. La eficacia del rociado ULV depende de un gran número de factores como el tamaño de gota (entre 15-20 μm), la velocidad del vehículo cuando se utiliza equipo pesado, la dirección del viento, el solvente utilizado, etc. Es recomendable que su aplicación sea realizada durante el pico de actividad del vector. Además se debe contar con la colaboración de la comunidad la cual debe mantener abiertas las puertas y ventanas de las viviendas cuando se realice el rociado, para aumentar la penetración del insecticida en las mismas.

Debido a que los adultos de *Ae. aegypti* reposan en el interior de las viviendas, los tratamientos en interiores utilizando máquinas portátiles son particularmente eficaces y son la única opción cuando el acceso con vehículo no es posible.

En la Argentina se han utilizado para el rociado ULV, el organofosforado fenitrotión, los piretroides permetrina y deltametrina y más recientemente el isomero *cis* de la permetrina^{71, 72}. Nuestro laboratorio ha realizado ensayos con un nuevo formulado para rociado espacial conteniendo un adulticida como la permetrina y un larvicida del grupo de los IGR, el pyriproxifen. Este ensayo, realizado en la ciudad de Puerto Libertad, Misiones, a mostrado excelentes resultados sobre los adultos y larvas de este vector.⁷³ Como otra herramienta de control, diferente de las formulaciones líquidas, nuestro laboratorio también ha realizado ensayos con un pote fumígeno conteniendo beta-cipermetrina al 5% en la ciudad de Colonia Delicia, Misiones, encontrando una excelente penetración del insecticida y muy buena eficacia sobre los adultos en el interior de las viviendas.⁶⁸

3.4. Control químico de estadios inmaduros

El uso de larvicidas solo debe considerarse como una medida complementaria al saneamiento básico. No es recomendado para especies cuyos criaderos están constituidos en sitios naturales difíciles de encontrar, como los huecos de los árboles. Sin embargo, ha resultado muy eficaz contra especies domésticas como *Ae. aegypti*, aunque muy tedioso y poco práctico por la gran cantidad y diversidad de recipientes a inspeccionar. Debido a que este mosquito se cría en recipientes

donde es almacenada agua de consumo, los larvicidas deben tener muy baja toxicidad para los mamíferos y no alterar el sabor, olor o color del agua. En la actualidad, solo unos pocos compuestos cumplen con estos criterios: los IGR, metoprene, pyriproxyfen, diflubenzurón y novalurón; el organofosforado temefós; el biolarvicida Bti y el piretroide permetrina, aunque éste último está siendo cuestionado para este tipo de uso.⁷⁴

En la Argentina el larvicida más utilizado es el temefos en su formulación de gránulos. Lamentablemente se ha detectado una resistencia incipiente a este activo en nuestro país^{75, 76} y está siendo reemplazado por el uso de Bti.

Materiales y Métodos

1. Material biológico

Se usaron insectos pertenecientes a una colonia de *Aedes aegypti* originaria de la cepa Rockefeller de Venezuela, mantenida en nuestro laboratorio desde 1996, libre de exposición a patógenos, insecticidas o repelentes. Las condiciones de cría se mantuvieron a una temperatura de 26-29 °C, 70–80% de humedad relativa y fotoperíodo luz:oscuridad 12:12 horas.

Para llevar a cabo la cría de *Ae. aegypti*, se siguieron los lineamientos descritos en el "Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia de mosquitos a insecticidas" establecido durante la reunión de la RELCOV (Red Latinoamericana para el Control de Vectores) desarrollada en Iguazú (Argentina) en diciembre de 2004⁷⁷.

Los huevos, colocados en discos de algodón, son rehidratados en 2 litros de agua deionada y mantenidos a una temperatura de entre 25-30 °C con un fotoperíodo luz:oscuridad 12:12 horas. Luego de 24 horas se observan larvas del primer estadio, que son alimentadas con una mezcla de alimento balanceado molido para conejos y levadura de cerveza en polvo natural (Virgen[®], calidad Calsa–Elisium S.A., Argentina). Las larvas se mantienen en las mismas condiciones y a medida que aparecen las pupas, son transferidas a un pequeño recipiente con agua y colocadas en una jaula de cría hasta la eclosión de los adultos (Figura 17). Éstos se mantienen en las mismas condiciones ambientales que las larvas, alimentados con pasas de uva y agua. Dos veces por semana se coloca en la jaula de cría una paloma inmovilizada como fuente de sangre para las hembras, indispensable para recolectar nuevamente huevos. Como sustrato de oviposición se usaron discos de algodón (de 8 cm de diámetro) colocados sobre un recipiente plástico de 250 ml con 230 ml de agua y la tapa perforada. Dentro del recipiente se coloca algodón formando una mecha que sobresale por la tapa y humecta al disco colocado sobre ella. Una vez realizada la oviposición, los discos se retiran, se dejan secar y se conservan a temperatura ambiente para ser rehidratados cuando sea necesario.

Para los bioensayos se utilizaron adultos de ambos sexos de 3 a 6 días de edad y larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto estadio, excepto para los bioensayos donde se evaluó el efecto sobre los distintos estadios larvales utilizando larvas del primer (L₁ de 24 hs de vida), segundo (L₂ de 48-72 hs), tercero (L₃ de 72-96 hs) y cuarto (L₄ de 96 a 120 hs) estadio.

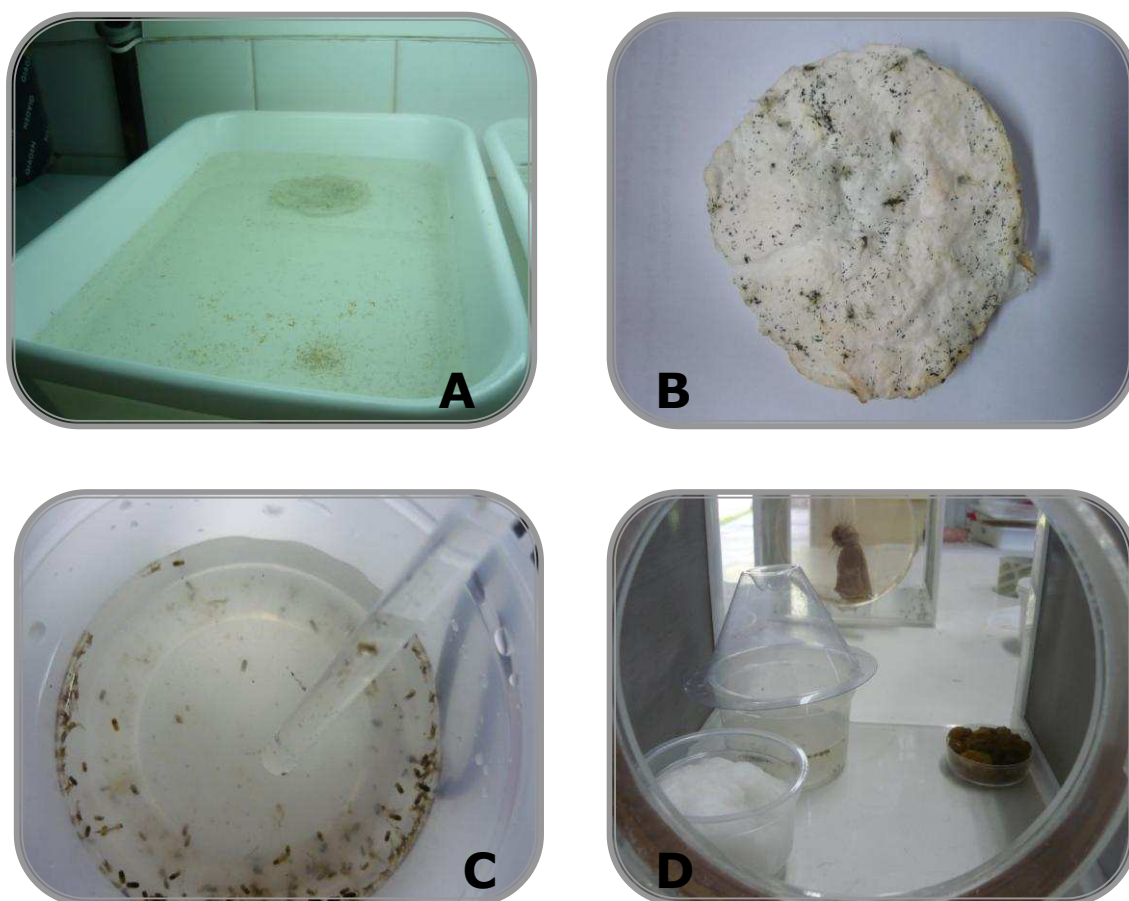


Figura 17. Cría de de *Ae. aegypti*. **A.** Disco de algodón con huevos, hidratado de manera de favorecer su eclosión. **B.** Detalle de los huevos depositados sobre el disco de algodón. **C.** Separación de pupas en un recipiente. **D.** Incorporación del recipiente con pupas en una jaula con pasas de uva y agua como alimento para los adultos emergentes.

2. Sustancias Químicas

2.1. Componentes de la mezcla fumígena

- * Clorato de potasio (KClO_3): grado técnico, Parafarm (Argentina).
- * Dextrina: + 95% Aldrich (USA).
- * Caolín: grado técnico, Serain Juárez S.A. (Argentina).
- * Talco: China Haicheng Doyo Talc Powder Factory (China)
- * Cianoguanidina o Diciandiamida (CNG): 99% Aldrich (USA).

2.2. Insecticidas

- * Permetrina, 3-fenoxibencil (1RS, 3RS; 1RS, 3SR) – 3 - (2,2-diclorovinil) - 2,2-dimetilciclopropanocarboxilato, (95,4%; *cis:trans*52,4:47,6), Chemotecnica S.A. (Argentina).
- * *cis*-permetrina, 3-fenoxibencil(1RS) – *cis* – 3 - (2,2-diclorovinil) - 2,2 - dimetilciclopropanocarboxilato, 99%, Chemotecnica S.A. (Argentina).

- * Pyriproxyfen, 4-fenoxifenil (*RS*) – 2 - (2 - pyridiloxi) propil eter, (grado técnico 97,8%) de China Kelinon Agrochemical Co., Ltd, China.

2.3. Solventes

- * Acetona: 99%, Merck (USA)
- * Acetonitrilo: Grado HPLC, Sintorgan (Argentina).
- * Agua: Grado HPLC, Sintorgan (Argentina).
- * Diclorometano: grado analítico, Sintorgan (Argentina).
- * Metanol: Grado HPLC, Sintorgan (Argentina).

2.4. Otros

- * Dibutilftalato: + 99%, Aldrich (USA).
- * Sulfato de Sodio (Anhidro), 1 kg, J.T. Baker

3. Desarrollo del formulado fumígeno

3.1. Preparación de mezclas fumígenas por mezcla de sólidos

De acuerdo con trabajos previos del laboratorio⁶⁷ se comenzó preparando una mezcla base compuesta por KClO_3 20% (oxidante), dextrina 8% (reductor) y caolín 72% (inerte). Debido a la gran variabilidad en la calidad de cada partida de caolín entregada por el proveedor, se decidió reemplazarlo por talco, preparando una nueva mezcla base con las siguientes proporciones: KClO_3 25%, talco 63% y dextrina 12%. Estas proporciones fueron determinadas mediante ensayos preliminares, de manera de obtener la mayor liberación posible de los ingredientes activos en los humos y un fácil encendido de la pastilla. Los componentes se mezclaron por agitación mecánica, previa molienda en molinillo. Trabajos previos del laboratorio demostraron que el agregado de cianoguanidina (CNG) en un 20% protege a los ingredientes activos de la descomposición térmica^{67, 78}; por lo tanto se incorporó este componente a la mezcla como agente espumígeno y protector. A continuación se agregó la cantidad necesaria del insecticida, pyriproxyfen, *cis*-permetrina o ambos, y se mezcló nuevamente en agitador mecánico para su homogeneización.

3.2. Preparación de mezclas fumígenas en solución

A temperatura ambiente, la permetrina es un líquido viscoso. Para incorporarla a la mezcla fumígena, se la disolvió en diclorometano y la solución fue adsorbida en talco. Luego se evaporó el solvente mediante exposición al vacío. Posteriormente se incorporó el talco, con la permetrina adsorbida, a la mezcla de la misma forma y en las mismas proporciones descritas en 3.1.

3.3. Recuperación de los insecticidas presentes en los humos

Con un pastillero por presión manual (Parr Instrumental Co., IL, USA) se prepararon pastillas fumígenas de 1 gr. conteniendo el/los insecticidas evaluados (Figura 18). Las pastillas se quemaron en un recipiente para combustión (modificación del *Thomas-Schoniger Flask*, USA) con salida lateral y robinete de teflón para regular la presión. Para encender las pastillas se utilizó una lámpara infrarroja (GE Projection Lamp, USA). Luego de la combustión el recipiente se enfrió a 4 °C durante 30 minutos, se lavó con 20 ml de metanol y se filtró utilizando una pequeña columna con sulfato de sodio anhidro. Esta solución fue analizada por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC). La recuperación de los insecticidas presentes en los humos se realizó por triplicado o cuadruplicado para cada insecticida o combinación.



Figura 18A. Pastillero manual empleado para preparar la pastilla

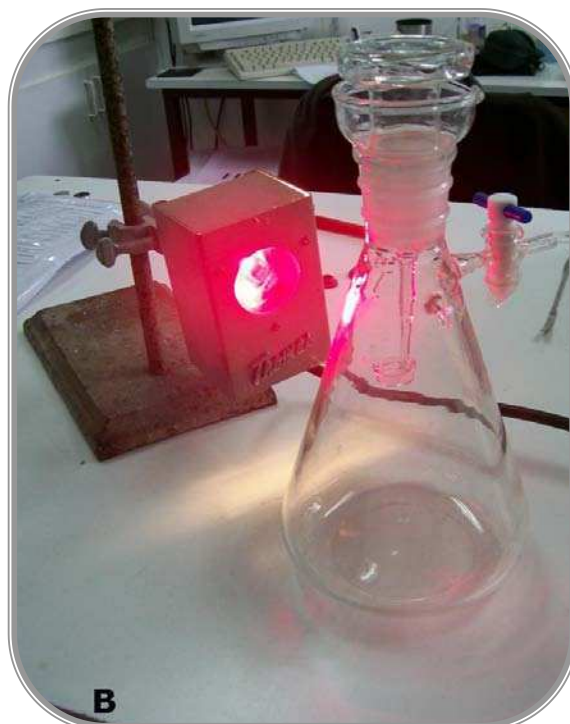


Figura 18B. Recipiente para combustión y lámpara IR

3.4. Análisis de los residuos en la pastilla fumígena

Para analizar los residuos de insecticidas en la mezcla fumígena usada, se quemaron las pastillas bajo un sistema extractor de aire para evitar la deposición de las partículas de humos sobre los restos de la pastilla. Se extrajo el residuo con metanol, se filtró como se describió en 3.3 y luego se analizó por HPLC.

3.5. Análisis por cromatografía líquida (HPLC)

Tanto la recuperación de los insecticidas presentes en los humos como en los residuos de las pastillas fueron analizados por HPLC, utilizando como estándar interno dibutilftalato. Para ello, al resultado de los filtrados descritos en los puntos 3.3 y 3.4 se les agregó 1 ml de la solución de estándar interno y se llevó a un volumen final de 25 ml en matraz aforado. Luego se inyectaron 20 μ l de esta solución en el equipo HPLC Jasco 300S, utilizando una columna C-18 Phenyl Microsorb-MV Varian[®] (4,6 mm x 250 mm) y un detector UV UVIDEC-100-VI fijado a 254 nm. Se utilizó un flujo de 0,8 ml/min y el solvente de elusión consistió en una mezcla de acetonitrilo:agua en proporción 60:40.

4. Efecto insecticida de las pastillas fumígenas en condiciones de laboratorio

4.1. Efecto de pastillas fumígenas con distintos ingredientes activos sobre larvas de *Ae. aegypti*

Para este ensayo se utilizó una cámara de vidrio tipo Peet-Grady con un volumen de 0,34 m³ (70 x 70 x 70 cm). En esta cámara se colocaron cuatro recipientes de plástico de 500 ml con 250 ml de agua y 20 larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto cada uno. Cada recipiente fue ubicado en una esquina diferente de la cámara (Figura 19). En el centro de la cámara se encendió con un fósforo una pastilla de 300 mg conteniendo 0,2; 0,5; 1,0 o 2,0 g/kg de pyriproxyfen. La cámara permaneció herméticamente cerrada durante el ensayo. El tiempo de exposición de las larvas a los humos fue de 5, 15 o 30 min. Se realizaron cuatro réplicas independientes para cada combinación de concentración de pyriproxyfen y tiempo de exposición. Los ensayos control se llevaron a cabo según lo descrito, utilizando una pastilla con idéntica composición pero sin pyriproxyfen.

Después del ensayo, las larvas se mantuvieron en condiciones de cría y fueron alimentadas cada dos días con 100 mg de alimento para larvas. Los recipientes fueron examinados diariamente, y se registró el número de larvas, pupas o adultos vivos o muertos, hasta la muerte o emergencia de todos los individuos. Tanto los individuos muertos como los adultos vivos fueron retirados de los recipientes. Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición de la emergencia de adultos (%IE) para cada tratamiento.



Figura 19. Cámara de vidrio tipo Peet Grady utilizada para los ensayos biológicos. Se muestra la disposición de los recipientes de plástico de 500 ml conteniendo larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto, colocados uno en cada esquina de la cámara.

Los individuos muertos se clasificaron en función de la severidad del efecto producido por el tratamiento en los siguientes grupos (de acuerdo a Braga y cols.⁷⁹ con algunas modificaciones): A. individuos que murieron como larvas; B. individuos que murieron como pupa blanca; C. individuos que murieron como pupa melanizada; D. individuos que murieron como adultos parcialmente emergidos y E. individuos que murieron como adultos. Para cada tratamiento se calculó el porcentaje de mortalidad como el número de individuos muertos en cada categoría sobre el número total de individuos muertos.

Siguiendo la misma metodología se evaluó el efecto de una pastilla de 300 mg conteniendo 0,2 g/kg de pyriproxyfen + 1,0 g/kg de permetrina o 0,2 g/kg de pyriproxyfen + 1,0 g/kg de *cis*-permetrina. Se eligió mantener una proporción de 5:1 adulticida:larvicida en el formulado fumígeno, de acuerdo con la experiencia adquirida por nuestro laboratorio durante el desarrollo del formulado líquido para rociado ULV conteniendo los mismos ingredientes activos⁷³. El tiempo de exposición de las larvas a los humos fue de 5, 15 o 30 min. Se realizaron tres réplicas independientes para cada tiempo de exposición.

4.1.1. Vía de ingreso del pyriproxyfen liberado en los humos de la pastilla fumígena

Este ensayo se realizó para determinar si el efecto del pyriproxyfen sobre las larvas es causado por la inhalación de los humos o por ingestión/contacto directo con el larvicida en el agua.

Para esto, se colocó en cada esquina de la cámara un recipiente de plástico de 500 ml con 250 ml de agua y sin larvas. En el centro de la cámara se encendió con un fósforo una pastilla de 300 mg conteniendo 0,2 g/kg de pyriproxyfen y se mantuvo la cámara herméticamente cerrada durante 5, 15 o 30 minutos. Transcurridos los respectivos tiempos, se abrió la cámara, se retiraron los recipientes y se agregó a cada uno 20 larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto. Después del ensayo, las larvas se mantuvieron en condiciones de cría y se alimentaron cada dos días con 100 mg de alimento para larvas. Los recipientes fueron examinados diariamente y se registró el número de larvas, pupas o adultos vivos o muertos, hasta la muerte o emergencia de todos los individuos. Tanto los individuos muertos como los adultos vivos fueron retirados de los recipientes. Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición de la emergencia de adultos (%IE) para cada tratamiento.

El ensayo control se llevó a cabo de la misma forma pero utilizando una pastilla sin insecticida. Se realizaron tres replicas independientes para cada tiempo de exposición.

4.2. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre los distintos estadios larvales de *Ae. aegypti*

Para evaluar el efecto del pyriproxyfen liberado en la pastilla fumígena sobre los diferentes estadios larvales se realizaron experimentos similares al descrito en el apartado 4.1, pero usando distintos estadios larvales (primero, segundo, tercero o cuarto). Se utilizó una pastilla de 300 mg conteniendo 0,2 g/kg de pyriproxyfen y el tiempo de exposición de las larvas a los humos fue de 5, 15 o 30 min. Los ensayos control se realizaron en idénticas condiciones, encendiendo una pastilla sin pyriproxyfen. Se realizaron entre tres y cuatro réplicas independientes para cada tiempo de exposición y estadio larval.

Después del ensayo, las larvas se mantuvieron en condiciones de cría y se alimentaron cada dos días con el alimento de larvas. Los recipientes fueron examinados diariamente, y se registró el número de larvas, pupas o adultos vivos o muertos, hasta la muerte o emergencia de todos los individuos. Tanto los individuos muertos como los adultos vivos fueron retirados de los recipientes. Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición de la emergencia de adultos (%IE) para cada tratamiento.

4.3. Efecto de pastillas fumígenas con diferentes activos sobre adultos de *Ae. aegypti*

Usando un aspirador de boca, se tomaron de las jaulas de cría entre 26 y 30 adultos de *Ae. aegypti* de 3 a 4 días de edad (50% de cada sexo). Los insectos fueron liberados en la cámara tipo Peet-Grady, donde se les permitió aclimatarse durante 5 minutos. Luego, en el centro de la cámara, se encendió con un fósforo una pastilla de 300 mg conteniendo alguno de estos ingredientes activos o combinación de los mismos: 1,0 g/kg de permetrina, 1,0 g/kg de *cis*-permetrina, 0,2 g/kg de pyriproxifen + 1,0 g/kg de permetrina o 0,2 g/kg de pyriproxyfen + 1,0 g/kg de *cis*-permetrina. A intervalos de 1 minuto se registró el número de mosquitos "volteados" (es decir aquellos que no mantenían una postura normal y no eran capaces de volar o yacían en el piso de la cámara) hasta que se produjo el volteo de todos los individuos. Con estos datos se calculó el tiempo de volteo 50 (TV₅₀) para cada tratamiento, es decir el tiempo que tarda en voltearse el 50% de los individuos tratados.

Los ensayos de control se llevaron a cabo en las mismas condiciones, pero utilizando una pastilla sin insecticidas, manteniendo a los adultos en la cámara durante 30 minutos. Se realizaron cuatro réplicas independientes de cada tratamiento.

4.4. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre huevos de *Ae. aegypti*

En la cámara de vidrio tipo Peet-Grady se colocaron dos recipientes de plástico, uno de 500 ml con 250 ml de agua y otro de 250 ml con 230 ml de agua y un disco de algodón utilizado como sustrato de oviposición igual al que se utiliza en la cría (ver sección 1). En el centro de la cámara se encendió con un fósforo una pastilla de 300 mg conteniendo 2,0 g/kg de pyriproxyfen. La cámara se mantuvo herméticamente cerrada durante 30 minutos. Se eligió la mayor concentración de pyriproxyfen en la pastilla combinada con el mayor tiempo de exposición a humos de manera de obtener la mayor cantidad del IGR posible depositado en el agua, debido a que descripciones sobre la estructura de los huevos de esta especie sugieren que el ingreso de moléculas grandes a través del corion no sería probable⁸⁰. Los controles se llevaron a cabo el mismo día, en idénticas condiciones, pero utilizando pastillas sin pyriproxyfen. Se realizaron cinco réplicas independientes de este ensayo.

Transcurridos los 30 minutos se abrió la cámara y se retiraron los recipientes. El recipiente de 500 ml se usó para evaluar el efecto del pyriproxyfen sobre huevos de mosquito mediante inmersión (Ensayo 1). Para esto, se colocó en el recipiente la mitad de un disco de algodón proveniente de la cría con un número conocido de huevos de 15 a 20 días de edad; la otra mitad del disco se colocó en el recipiente control. Se colocaron 100 mg de alimento para larvas en cada recipiente y se determinó el número de individuos emergidos luego de 2, 4 y 7 días, retirando a los mismos del recipiente. Se eligieron diferentes días para realizar el recuento ya que se sabe que los huevos de *Ae. aegypti* suelen eclosionar de manera errática o asincrónica dependiendo de las condiciones ambientales⁸¹. Luego se calculó la diferencia en el porcentaje de eclosión de los huevos entre el grupo control y el tratado.

El recipiente de 250 ml fue usado para evaluar el efecto del pyriproxyfen sobre los huevos depositados en una superficie tratada (Ensayo 2). Para esto, se colocó el recipiente plástico de 250 ml con el disco de algodón humedecido tratado como se describe más arriba, en una jaula de cría con pasas de uva y agua. Se agregaron entre 10-15 hembras de 3 o 4 días de edad, alimentadas con sangre unas horas antes y 5-7 machos. Las hembras se volvieron a alimentar a las 48 horas. Dos a cuatro días luego de la última alimentación se retiró el algodón y se dejó secar. Se contó el número de huevos colocados tomando una fotografía del algodón con cámara digital e imprimiéndola para realizar el recuento. Luego se calculó el número de huevos/hembra para ambos grupos (tratado y control). Transcurridos 10 a 15 días los algodones fueron colocados en agua para favorecer la eclosión. Dos, 4 y 7 días después se contó el número de larvas y se calculó la diferencia en el porcentaje de eclosión de los huevos entre el grupo control y el tratado.

El número de huevos/hembra se calculó con el objetivo de descartar que la ingestión del agua a través del algodón humedecido o el contacto con la superficie tratada con pyriproxyfen pudiera actuar como repelente o afectar de alguna manera la postura de los huevos.

4.5. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre la fertilidad de hembras de *Ae. aegypti*

En cada esquina de la cámara de vidrio se colocó un recipiente plástico de 500 ml con 250 ml de agua y 30 larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto. En el centro de la cámara se encendió con un fósforo una pastilla de 300 mg conteniendo 0,2 g/kg de pyriproxyfen. La cámara se mantuvo herméticamente cerrada durante 8 minutos, tiempo necesario para obtener un %IE entre 40 y 45%. Luego se abrió la cámara y se retiraron los recipientes. Los ensayos control se llevaron a cabo el mismo día, en idénticas condiciones, pero utilizando pastillas sin el agregado de pyriproxyfen.

Después del ensayo, los cuatro recipientes con larvas se colocaron en jaulas de cría, a los que cada dos días se les agregaron 100 mg de alimento para larvas. El ensayo se dio por finalizado cuando emergieron todos los adultos en los recipientes control. Se registraron el número de individuos muertos y la cantidad de hembras vivas en el grupo tratado y el control para calcular el %IE. El ensayo se repitió cuatro veces de forma independiente.

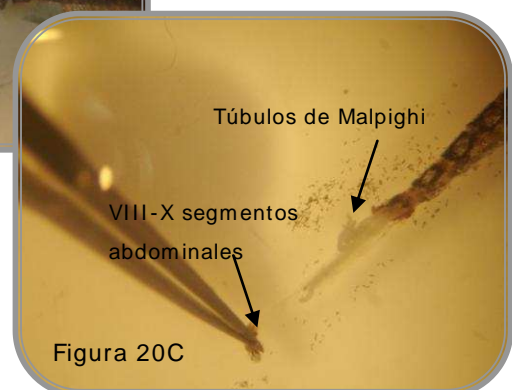
Los adultos emergidos fueron mantenidos en las jaulas con agua y pasas de uva. Además, a los 2, 4 y 6 días posteriores a la emergencia, se ofreció una paloma inmovilizada como fuente de sangre para las hembras. Dentro de la jaula se colocó un recipiente con un círculo de algodón humedecido como sustrato para la oviposición. Aquellas hembras que no se alimentaron fueron descartadas del ensayo. Dos a 4 días luego de la última alimentación se retiró el algodón y se dejó secar. Se contó el número de huevos colocados a partir de una fotografía del algodón y se calculó el número de huevos/hembra para ambos grupos (tratados y control).

4.5.1. Disección de las hembras de *Ae. aegypti* y recuento del número de ovariolas

Algunas de las hembras sobrevivientes de la exposición a los humos fueron diseccionadas bajo un microscopio estereoscópico con el objetivo de aislar sus ovarios (Figura 20). Las hembras fueron sumergidas en agua destilada, y se les separó los últimos tres segmentos abdominales, a los cuales quedaron adheridos los ovarios. A continuación se retiraron los tejidos circundantes y se separaron ambos ovarios. Cada ovario fue transferido a una gota de agua destilada a la que se agregó una solución de azul de metileno para reconocer más fácilmente las ovariolas. Se determinó, entonces, el número de folículos basales, numéricamente igual al número de ovariolas ya que cada ovariola contiene un folículo basal⁸².



Figura 20A-I. Disección de ovarios en las hembras de *Ae. aegypti*.



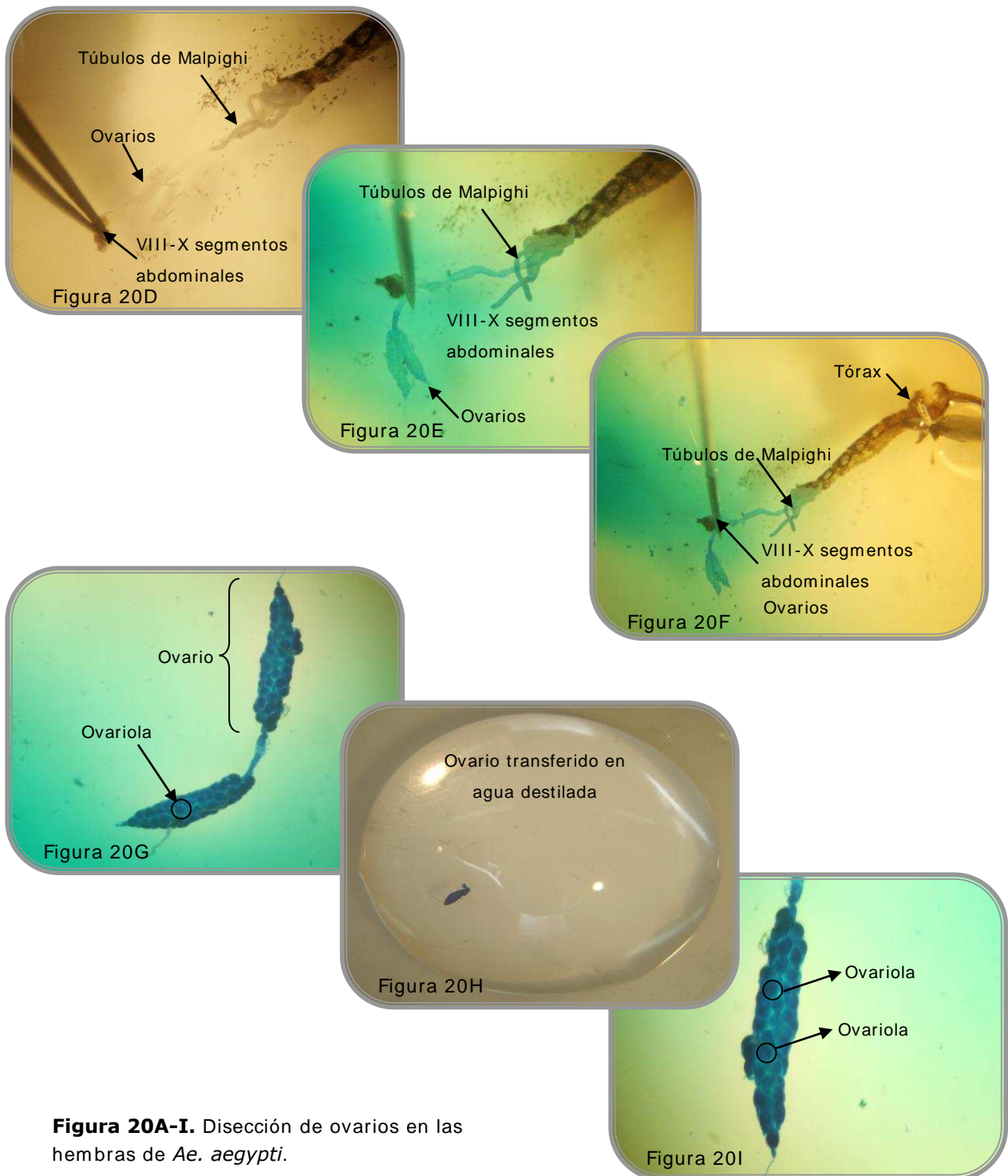


Figura 20A-I. Disección de ovarios en las hembras de *Ae. aegypti*.

La disección de las hembras se realizó en diferentes momentos. Para cada réplica se seleccionaron al azar y se diseccionaron tres hembras de 48 horas de edad no alimentadas con sangre y dos hembras alimentadas con sangre 24 horas antes.

4.5.2. Medición del tamaño del ala de las hembras de *Ae. aegypti*

Se ha informado que el estado nutricional de la hembra puede influir en el desarrollo de los ovarios y el número de ingestas de sangre necesarias para formar los huevos⁸³. Por esta razón, en el momento de la disección se midió con un calibre la longitud del ala de cada hembra como medida indirecta de su estado nutricional. Luego se evaluó si existía una relación entre el tamaño del ala de la hembra y el número de ovariolas, para tener en cuenta este efecto a la hora de analizar las diferencias entre el grupo control y el tratado.

4.6. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre la fecundidad de hembras de *Ae. aegypti*

Para evaluar el efecto del pyriproxyfen sobre la fecundidad de las hembras de *Ae. aegypti*, se tomó el algodón donde habían sido colocados los huevos en el punto 4.5, se dejó secar y luego de 10-15 días, un número conocido de huevos se puso a eclosionar en agua. Este mismo procedimiento se realizó con el grupo tratado y el control. Dos, 4 y 7 días después se contó el número de larvas y se calculó la diferencia en la eclosión de los huevos entre ambos grupos.

5. Evaluación del efecto insecticida de la pastilla fumígena en campo

5.1. Lugar del ensayo

Los ensayos de campo se realizaron en Puerto Libertad (25° 55' S, 54° 35' O), una pequeña ciudad subtropical de 6.143 habitantes (Censo 2001) y 834,5 km² localizada en la Provincia de Misiones, a 40 km al sur de Puerto Iguazú. Esta ciudad registra casos históricos de dengue y una abundante densidad del mosquito vector.

Casi todas las viviendas de Puerto Libertad se basan en dos tipos de construcción: paredes de madera y techados de chapa o paredes de ladrillo y techos de tejas. Una casa típica posee una sola planta, con dos o tres dormitorios, un living, una cocina y un gran patio en el frente, en el contrafrente o en ambos.



Figura 21. Viviendas típicas de la ciudad de Puerto Libertad, Provincia de Misiones.

5.2. Tratamientos realizados

Se delimitaron cuatro zonas de la ciudad con 200 viviendas cada una. En cada zona las casas eran de tamaño similar y se encontraban uniformemente espaciadas y distribuidas. Se asignaron al azar a cada área uno de cuatro tratamientos posibles. En dos de las áreas se aplicó la pastilla fumígena, una fue tratada por la propia comunidad de Puerto Libertad (área A) y la otra por trabajadores locales del Programa Nacional de Control de Vectores (área B o de aplicación profesional). En cada casa se aplicaron dos pastillas de 50 g conteniendo 10% de permetrina y 2% de pyriproxyfen fabricadas por Chemotécnica S.A. (Carlos Spegazzini, Argentina). Una de las pastillas se colocó en el living o cocina y la otra cerca de los dormitorios/baño. Las puertas de las habitaciones y los armarios se mantuvieron abiertas para favorecer la penetración y dispersión de los humos. Luego de encender la pastilla, las viviendas permanecieron cerradas durante 1 hora y posteriormente fueron ventiladas. En el área donde la pastilla fue aplicada por los habitantes, se realizó un taller comunitario (ver sección 5.5) y se les repartió a los habitantes de cada casa dos pastillas fumígenas con el correspondiente instructivo de seguridad y modo de uso; se les pidió encenderlas durante la misma semana en la que se aplicaron las pastillas en el área B.

En la tercera zona (área C), los trabajadores locales del Programa Nacional de Control de Vectores aplicaron la pastilla fumígena en el interior de las viviendas, que permanecieron cerradas durante 1 hora. Luego, se abrieron las puertas y

ventanas y se realizó un rociado espacial ULV con una máquina generadora de niebla fría (Fog XXI Minor Plus, Simpya, Ringuelet, Bs. As.) montada sobre una camioneta. El caudal se reguló para liberar 380 cm^3 de la mezcla cada 36 s, el tiempo necesario para pulverizar 1 hectárea (conduciendo el vehículo a 10 km/h), aplicando 10 g de permetrina y 2 g de pyriproxyfen por hectárea. La aplicación se llevó a cabo durante el pico de actividad de vuelo del mosquito (antes del amanecer o después del atardecer). La cuarta zona (área D), con características similares a las tres anteriores, no fue tratada y se utilizó como zona de control.



Figura 22A. Aplicación de la pastilla fumígena en una vivienda de Puerto Libertad (interior).



Figura 22B. Aplicación de la pastilla fumígena en una vivienda de Puerto Libertad (exterior).



Figura 22C. Pastilla fumígena (50 gr.). La zona negra indica el lugar para el encendido.



Figura 22D. Aplicación del rociado ULV en exteriores.

5.3. Evaluación de la efectividad de los tratamientos por medio de bioensayos

La evaluación de la efectividad de los tratamientos en campo se realizó de acuerdo a los protocolos de la Organización Mundial de la Salud⁸⁴ con algunas modificaciones. Se utilizaron jaulas centinela cilíndricas de 15 cm de largo x 3 cm de diámetro, construidas con una malla de nylon N° 18. Una hora antes del tratamiento, 16 adultos (50% de cada sexo), de 1 a 3 días de edad y alimentados con pasas de uva, se transfirieron a cada jaula. Se colgaron diez jaulas en el interior de diez viviendas (una por vivienda) en el área B, diez jaulas en el interior de diez viviendas en el área C, y diez jaulas más en la zona control (área D). En el interior de las viviendas de las áreas B, C y D también se colocaron diez recipientes de plástico de 250 ml con 200 ml de agua y quince larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto. Tanto las jaulas como los recipientes de plástico se colocaron a una distancia comprendida entre los 4 y 5 metros de la pastilla fumígena y fueron llevados al laboratorio local una vez finalizado el tratamiento. En las jaulas se agregó un algodón humedecido para evitar la deshidratación de los mosquitos adultos y se evaluó la mortalidad a las 24 horas. Los recipientes de plástico de 250 ml se inspeccionaron diariamente y se registró el número de larvas, pupas o adultos, hasta la emergencia o muerte de todos los individuos, calculándose el %IE.



Figura 23. Jaulas centinela (A) y potes de plástico de 250 ml (B) utilizados para evaluar la efectividad de los tratamientos sobre adultos y larvas de *Ae. aegypti*.

Dado que a los residentes del área A se les dió una semana para completar la aplicación de la pastilla fumígena, no fue posible determinar su eficacia en dicha área a través del uso de jaulas centinela con adultos y recipientes plásticos con larvas, pero si a través del uso de índices entomológicos.

5.4. Evaluación de la efectividad de los tratamientos por medio de índices entomológicos

Para conocer el efecto de los tratamientos sobre la densidad poblacional de las larvas de *Ae. aegypti* se realizó un muestreo de acuerdo a lo establecido por la OMS⁸⁵ y se calculó el índice de Breteau (IB: número de recipientes positivos por cada 100 viviendas inspeccionadas) y el índice de vivienda (IV: número de viviendas positivas dividido el total de viviendas inspeccionadas). Además se evaluó el efecto sobre la densidad de adultos en el interior de la vivienda; para ello se calculó el índice de adultos como el número promedio de adultos de *Ae. aegypti* capturados por casa durante 10 minutos de búsqueda por una persona. Los adultos fueron capturados con un aspirador manual (Philips FC 6092 12 V), colocados en pequeños vasos de plástico, cubiertos con un tul y llevados al laboratorio para su identificación.

Tanto el IB, como el IV y el índice de adultos fueron determinados semanalmente, comenzando dos semanas antes del tratamiento y hasta que los niveles de población de mosquitos volvieron a los valores pre-tratamiento. Para evaluar la infestación con larvas y adultos, cada semana se seleccionaron al azar 25 casas en cada área. Los estudios entomológicos se llevaron a cabo durante un total de 12 semanas, desde el 13 de marzo al 5 de junio de 2009.

5.5. Participación de la comunidad

Para evaluar la aceptación de los residentes de Puerto Libertad de esta nueva herramienta de control de aplicación no profesional, se utilizó una estrategia integrada desarrollada en tres etapas. En la primera etapa, o etapa de planificación, se trabajó de forma conjunta con un grupo de sociólogos conformado por las licenciadas Laura y Lucila Goldberg y el Dr. Gastón Beltrán, realizando entrevistas informales a 45 hogares seleccionados al azar en el área A. A partir de estas entrevistas, se recogieron datos sobre las percepciones y prácticas de la comunidad acerca del dengue y las estrategias de control de vectores; estos datos permitieron diseñar la siguiente etapa, un taller de capacitación. Esta segunda etapa, o etapa

de comunicación, consistió en un taller de capacitación de la comunidad sobre la enfermedad del dengue, el control del mosquito vector y las correspondientes medidas de seguridad e instrucciones de encendido para la aplicación de la pastilla fumígena. El taller fue promocionado varias veces a través de la radio local, y las personas fueron invitadas a participar casa por casa. Se llevó a cabo en la sala de conferencias pública de la ciudad y consistió en presentaciones orales y una demostración de cómo manipular y encender la pastilla fumígena y cómo manejar los residuos de la combustión. A los asistentes se les entregó un folleto con las instrucciones de seguridad y uso de la pastilla, que fue redistribuido con la pastilla una semana después del taller en el 100% de las casas del área A.

En la tercera etapa, o etapa de evaluación, el grupo de sociólogos diseñó una encuesta (ver Anexo I) para obtener información cuantitativa sobre las percepciones y prácticas de la comunidad después del taller de capacitación y la aplicación de la pastilla fumígena. Este cuestionario fue realizado en 111 de las 200 viviendas donde los residentes aplicaron la pastilla fumígena. Las casas fueron seleccionadas de forma aleatoria y la encuesta recayó en los jefes de hogar.

Todas las encuestas y entrevistas se llevaron a cabo con el consentimiento de los encuestados.

6. Análisis estadístico y software utilizado

6.1. Recuperación de los insecticidas en los humos de la pastilla fumígena

Los valores de recuperación del pyriproxyfen en los humos liberados de la pastilla fumígena y en sus restos, conteniendo pyriproxyfen solo o combinado con los piretroides, fueron analizados con un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Las diferencias entre medias se compararon mediante el test de rangos múltiples de Duncan. Para el caso de los valores de recuperación en humos o en los restos entre los piretroides, se realizó una comparación entre permetrina y *cis*-permetrina cuando se encontraban solos en la pastilla y entre cada uno de ellos solo y en presencia del pyriproxyfen, utilizando un test de t de Student. En todos los casos, el nivel de significación se fijó en $p \leq 0,05$ (Statistica for Windows V7.0, StatSoft, Tulsa, OK, USA).

6.2. Cálculo del porcentaje de inhibición de emergencia (%IE) y diferencias entre tratamientos

La eficacia de las formulaciones fumígenas conteniendo distintas concentraciones de pyriproxyfen o un piretroide + pyriproxyfen, sobre las larvas de *Ae. aegypti*, se evaluó como el porcentaje de inhibición de la emergencia de adultos (%IE), calculado como se describe a continuación y ajustado por la mortalidad de las larvas o pupas en los controles de acuerdo a lo descrito por Mulla⁸⁶:

$$IE(\%) = 100 - 100 (T/C)$$

donde T es el porcentaje de adultos emergidos en los recipientes tratados y C es el porcentaje de adultos emergidos en los recipientes control. El (%)IE puede tomar valores entre 0 y 100, correspondiendo el valor de 100% a una inhibición total, y el de 0% a ausencia de inhibición.

Los datos para las diferentes dosis de pyriproxyfen y diferentes tiempos de exposición se analizaron con un análisis de varianza de dos vías (MANOVA). A los valores de IE% se les aplicó una transformación arco seno de la raíz cuadrada, cumpliendo así el criterio de normalidad. Las diferencias entre medias se compararon mediante el test de rangos múltiples de Duncan o el test de Tukey HSD para N desigual cuando el número de réplicas en los diferentes tratamientos no fue el mismo. El nivel de significación aceptado para todas las comparaciones fue de $p \leq 0,05$ (Statistica for Windows V7.0, StatSoft, Tulsa, OK, USA). El mismo análisis se realizó para comparar el %IE en el ensayo donde se evaluó la vía de ingreso del pyriproxyfen liberado en los humos de la pastilla (sección 4.1.1).

6.3. Diferencias en categorías de mortalidad

Para evaluar en cuál de las etapas del desarrollo del mosquito se produjo la mayor mortalidad de los tratamientos, se realizó un ANOVA de medidas repetidas para cada concentración del/los insecticida/s en la pastilla dentro de un mismo tiempo de exposición. Las diferencias entre las medias se compararon mediante el test de rangos múltiples de Duncan. Para evaluar las diferencias entre las concentraciones se realizó un ANOVA de una vía para cada una de las categorías de mortalidad dentro de un mismo tiempo de exposición. Las diferencias entre las medias se compararon mediante el test de rangos múltiples de Duncan. Todos los datos fueron sometidos a una transformación arco seno de la raíz cuadrada antes

de los análisis, y el nivel de significación aceptado para todas las comparaciones fue de $p \leq 0,05$ (Statistica for Windows V7.0, StatSoft, Tulsa, OK, USA).

6.4. Tiempo de volteo 50% (TV₅₀)

La eficacia de las formulaciones sobre los adultos de *Ae. aegypti* se evaluó como TV₅₀, el tiempo necesario para producir el volteo del 50% de los adultos tratados. Los valores de TV₅₀ con sus intervalos de confianza del 95% se determinaron utilizando un software basado en el método probit⁸⁷ (POLO PC 2.0, LeOra Software, 2002, USA). Los valores de TV₅₀ obtenidos para los diferentes tratamientos se consideraron significativamente distintos cuando sus intervalos de confianza del 95% no se superpusieron ($P < 0,05$).

6.5. Efecto sobre huevos

Para evaluar el efecto del pyriproxyfen sobre los huevos por inmersión (Ensayo 1), se calculó el porcentaje de diferencia en la eclosión (%DE) como:

$$DE(\%) = 100 - 100 (T/C)$$

donde T es el porcentaje de huevos eclosionados colocados por hembras tratadas y C es el porcentaje de huevos eclosionados colocados por hembras control. DE(%) puede tomar valores mayores o menores a cero, un valor positivo indica que se produjo una reducción en la eclosión de los huevos tratados respecto al control; un valor negativo indica que se produjo una reducción en la eclosión de los huevos control respecto a los tratados, valores cercanos a cero indican que no hay diferencias en la eclosión entre ambos grupos. Luego se utilizó un test de t para una sola muestra para evaluar si dicho porcentaje era diferente de cero. El nivel de significación se fijó en $p \leq 0,05$ (Sigmaplot 11.0; Systat Software Inc., San José, CA).

Como se describió anteriormente, se calculó el número de huevos por hembra para descartar que la ingestión del agua, el contacto con la superficie tratada, o el pyriproxyfen, pudieran tener un efecto en la postura de los huevos de las hembras colocadas en la jaula con el recipiente para oviposición tratado. Las diferencias entre el grupo tratado y el control en el número de huevos/hembra fueron comparadas con un test de t de Student. El nivel de significación se fijó en $p \leq 0,05$ (Statistica for Windows V7.0, StatSoft, Tulsa, OK, USA). Una vez realizado éste análisis se calculó el porcentaje de diferencia en la eclosión (%DE) de los huevos

colocados sobre la superficie tratada y el control (Ensayo 2) siguiendo el mismo procedimiento y adoptando los mismos criterios de análisis antes descritos.

6.6. Diferencias en la fecundidad y fertilidad de las hembras

Para comparar el número de ovariolas/hembra entre el grupo tratado y el control, ya sea de hembras diseccionadas antes o después de la alimentación con sangre, se utilizó un test de t de Student. El nivel de significación se fijó en $p \leq 0,05$ (Statistica for Windows V7.0, StatSoft, Tulsa, OK, USA). El mismo test se utilizó para comparar el número de huevos/hembra entre el grupo tratado y el control.

Para evaluar el efecto sobre la fertilidad de las hembras, se calculó el porcentaje de diferencia en la eclosión (%DE) como se describió en el punto anterior. Luego se utilizó un test de t para una sola muestra para evaluar si dicho porcentaje era diferente de cero. El nivel de significación se fijó en $p \leq 0,05$ (Sigmaplot 11.0; Systat Software Inc., San José, CA).

6.6.1. Relación entre el número de ovariolas y el tamaño de la hembra

La relación entre el número de ovariolas por hembra y el tamaño de ésta última fue evaluada realizando un análisis de correlación entre estas variables para el grupo control y el tratado con el software estadístico SGWIN Graphics (Statgraphics Plus 4.0, Statistical Graphics Corporation, 1994-1999, Hendon, VA, USA). Se consideró que las variables correlacionaban para un valor de $p \leq 0,05$.

6.7. Diferencias entre los tratamientos de campo

La mortalidad a 24 horas de los adultos colocados en las jaulas centinela se corrigió con la fórmula de Abbott⁸⁸ y a los datos se les aplicó una transformación arcoseno de la raíz cuadrada antes de los análisis. El %IE se calculó según lo descrito en 6.2 y a los valores también se les aplicó una transformación arcoseno de la raíz cuadrada. Ambos parámetros fueron comparados entre las diferentes áreas utilizando un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). El nivel de significación se fijó en $p \leq 0,05$ (Statistica for Windows V7.0, StatSoft, Tulsa, OK).

Los valores del índice de adultos se compararon mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), para cada fecha y las diferencias entre medias se compararon con el test de rango múltiple de Duncan. A los datos del 3 de abril, 17

de abril, y 22 de mayo se les aplicó la raíz cuadrada antes del análisis, lo que permitió cumplir el supuesto de normalidad. El nivel de significación se fijó en $p \leq 0,05$.

Resultados y Discusión

1. Desarrollo del formulado fumígeno

1.1. Recuperación de los insecticidas en humos y en los restos de la pastilla fumígena

La mezcla de la formulación fumígena en forma de pastilla está constituida por tres componentes principales: KClO_3 (25%), dextrina (12%) y talco (63%) (en el ANEXO II pueden observarse los resultados preliminares que llevaron a esta composición de la mezcla fumígena). El KClO_3 actúa como oxidante; la dextrina como combustible orgánico, que produce calor por la reacción química de alta energía, y funciona como ligante o *binder*, manteniendo a los componentes unidos en una mezcla homogénea evitando su disgregación durante la manufactura y el almacenamiento. El talco es un ingrediente inerte que actúa como retardador, es decir que disminuye la velocidad de quemado por absorción de calor.

Ha sido informado a través de algunas patentes^{89, 90}, que la incorporación de agentes productores de gases (espumígenos) en las mezclas fumígenas permiten una máxima liberación del insecticida y al mismo tiempo una mínima descomposición del mismo por combustión, actuando como vehículo de los principios activos. Entre otras sustancias, se han usado como vehículo azodicarbonamida (ADC) y cianoguanidina (CNG). Trabajos previos del laboratorio^{67, 78} han demostrado que la incorporación de CNG en una proporción del 20% maximiza la recuperación de los piretroides en los humos. Teniendo en cuenta estos antecedentes se incorporó a la mezcla de tres componentes antes descrita, CNG en un 20% como agente protector de los activos a ser evaluados.

Al ser encendidas, las pastillas produjeron una combustión sin llama, resultando en la liberación de los insecticidas componentes de la formulación fumígena en los humos. La Tabla I muestra los valores de recuperación en los humos y en los restos de las pastillas conteniendo pyriproxyfen, permetrina, *cis*-permetrina o sus combinaciones.

Cuando la pastilla fumígena contenía solo pyriproxyfen, se recuperó alrededor del 95% del insecticida en los humos. Lo mismo ocurrió cuando se trabajó con pastillas que contenían pyriproxyfen y *cis*-permetrina, no encontrándose diferencias significativas en la recuperación del IGR (test de rangos múltiples de Duncan $p > 0,05$). Sin embargo, cuando se estudiaron pastillas que contenían pyriproxyfen y permetrina (la cual fue adsorbida en talco, porque a temperatura ambiente es un

líquido viscoso) la recuperación del IGR en los humos fue significativamente menor que cuando este último se encontraba sólo o combinado con *cis*-permetrina ($F = 10,7$; $gl = 6$; $p \leq 0,05$).

Insecticidas en la pastilla	Recuperación en humos ($\pm ES$) (% de la concentración inicial)		Residuos en los restos de la pastilla ($\pm ES$) (% de la concentración inicial)	
	Pyriproxyfen	Piretroide	Pyriproxyfen	Piretroide
Pyriproxyfen	95,3 \pm 2,4a	---	5,6 \pm 0,6a	---
Permetrina	---	50,8 \pm 1,1a	---	1,0 \pm 0,3a
<i>Cis</i> -permetrina	---	54,0 \pm 1,3a	---	1,0 \pm 0,1a
Pyriproxyfen + permetrina	78,3 \pm 3,7b	47,2 \pm 2,5a	5,7 \pm 0,1a	2,9 \pm 0,1b
Pyriproxyfen + <i>cis</i> -permetrina	96,2 \pm 3,0a	53,5 \pm 1,8a	5,2 \pm 0,4a	2,2 \pm 0,6a

Tabla I. Recuperación de los insecticidas en los humos o en los restos de las pastillas fumígenas. La concentración inicial de pyriproxyfen fue de 2,0 g/kg y la de los piretroides de 10,0 g/kg. En cada columna, los valores seguidos por la misma letra no mostraron diferencias significativas (ANOVA o t de Student, $p > 0,05$). Cada valor es el resultado de tres o cuatro réplicas independientes.

Los valores de recuperación de la permetrina fueron de aproximadamente 50% ya sea cuando se encontraba sola en la formulación fumígena o en presencia del pyriproxyfen, no encontrándose diferencias significativas en ambos casos ($t = 1,43$; $gl = 5$; $p > 0,05$). Se obtuvieron resultados similares con la pastilla que tenía *cis*-permetrina sola o en combinación con pyriproxyfen ($t = 0,18$; $gl = 5$; $p > 0,05$).

Los resultados de recuperación de los piretroides coinciden con trabajos previos del laboratorio^{67, 78} en los cuales se recuperó alrededor de un 50% de la concentración inicial, con el uso de un agente protector como la cianoguanidina. Estos trabajos también demostraron que cuando las formulaciones fumígenas se preparaban por mezclas de sólidos, el porcentaje de recuperación del insecticida evaluado era mayor que cuando la mezcla se realizaba en solución. En el caso de la permetrina, la única manera de incorporarla a la mezcla fumígena era adsorbiéndola sobre el talco, dejando evaporar luego el solvente; si bien esto no

afectó la liberación del piretroide solo ni en presencia de pyriproxyfen, la recuperación de este último resultó afectada.

La cantidad de los activos en los restos de la pastilla se mantuvo por debajo del 6% para el caso del pyriproxyfen y por debajo del 3% para los piretroides. Esto indica que el descenso en la cantidad de pyriproxyfen recuperado en los humos estaría dado por una mayor descomposición del mismo ya que no quedó retenido en los residuos. En el análisis de los residuos de la pastilla que contenía pyriproxyfen y permetrina, parecería quedar en los mismos una mayor proporción del piretroide que en la pastilla con permetrina sola, sin embargo esto no modifica significativamente su liberación en los humos.

Una posible explicación de la mayor descomposición del pyriproxyfen en presencia de la permetrina es que en este caso el contenido en isómero *trans* presente podría dar lugar a otras rupturas que generen moléculas o radicales libres que causen la descomposición del IGR. Esta posible ruptura del isómero *trans* daría lugar a diferencias cualitativas en las especies químicas formadas pero no en el porcentaje de descomposición. Por otro lado, durante la combustión de la mezcla podría ocurrir algún tipo de interacción fisicoquímica desconocida entre los componentes que favorezca la descomposición del pyriproxyfen.

2. Efecto insecticida de pastillas fumígenas en condiciones de laboratorio

2.1. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre las larvas de *Ae. aegypti*

Para conocer el efecto del pyriproxyfen liberado en los humos sobre las larvas de *Ae. aegypti*, se prepararon pastillas con diferentes concentraciones de este IGR. Teniendo en cuenta que se aplicaría como humos, y que por lo tanto su efecto dependería de la cantidad de partículas que contuvieran el ingrediente activo que se depositaran sobre el agua, también fue considerado relevante exponer las larvas a los humos durante diferentes tiempos.

Los resultados de la Figura 24 muestran los valores de %IE correspondientes a diferentes concentraciones del pyriproxyfen en la pastilla y a diferentes tiempos de exposición a humos. Se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones usadas ($F = 24,8$; $gl=3$; $p < 0,001$) y los tiempos de exposición

elegidos ($F = 65,9$; $gl=2$; $p < 0,001$). La interacción entre estas variables también fue significativa ($F = 6,25$; $gl = 6$; $p < 0,001$).

Cuando se utilizó la concentración más baja de pyriproxyfen en la pastilla, el %IE fue significativamente distinto para todos los tiempos de exposición. Además, el %IE para la combinación de la concentración más baja con el menor tiempo de exposición fue diferente de todas las otras combinaciones de estos dos factores.

En la Figura 24 también puede observarse que para un tiempo de exposición de 5 minutos, los valores del %IE aumentaron al aumentar la concentración de pyriproxyfen utilizada. A medida que el tiempo de exposición se incrementó a 30 minutos, no se observaron diferencias en el %IE entre las diferentes concentraciones de pyriproxyfen en la pastilla, obteniéndose valores de casi el 100% para todas ellas. En la concentración más alta, se observó una diferencia pequeña pero significativa ($p = 0,032$) entre los valores de %IE para 5 y 30 minutos de exposición pero, incluso en un tiempo de exposición tan corto como 5 minutos el %IE fue de alrededor del 90%.

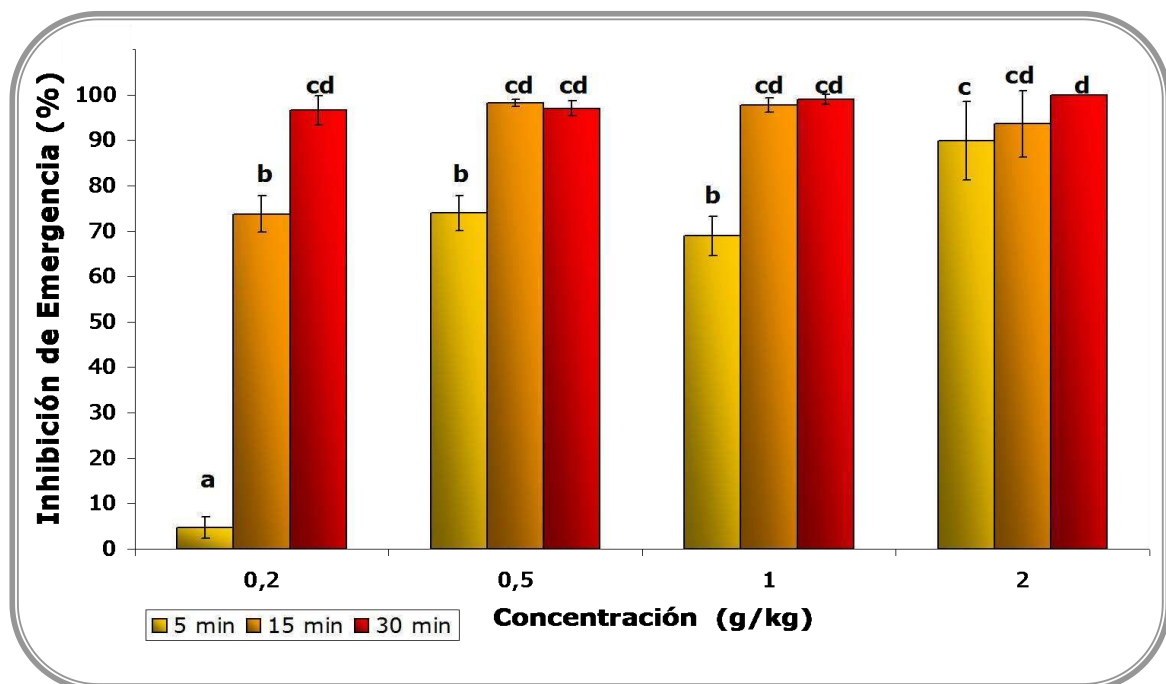


Figura 24. Inhibición de la emergencia de adultos (IE% \pm ES) de *Ae. aegypti* tratados desde larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto con pastillas con diferentes concentraciones de pyriproxyfen durante diferentes tiempos de exposición. Los tratamientos con la misma letra no difieren significativamente ($p > 0,05$) en el test de rangos múltiples de Duncan ($N = 4$).

2.1.1. Vía de ingreso del pyriproxyfen liberado en los humos de la pastilla

Una vez conocido el efecto de las diferentes dosis de pyriproxyfen aplicadas durante distintos tiempos de exposición sobre larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto, se intentó determinar si el efecto del pyriproxyfen sobre las mismas es causado por la inhalación de los humos o por ingestión/contacto directo con el larvicida en el agua donde se depositó el activo.

Para este ensayo se decidió utilizar una concentración de pyriproxyfen de 0,2 g/kg ya que en el ensayo anterior se habían observado diferencias entre los tres tiempos de exposición evaluados. Los resultados pueden observarse en la Figura 25.

No se encontraron diferencias significativas entre los valores de %IE de los tratamientos con o sin exposición de las larvas a los humos ($F = 0,11$; $gl = 1$; $p > 0,05$). Sin embargo, al igual que en los ensayos anteriores, se observaron diferencias significativas entre los tiempos de exposición ($F = 486,4$; $gl = 2$; $p < 0,001$). Este resultado indica que el efecto del pyriproxyfen sería causado por la ingestión o contacto directo con el larvicida más que por su inhalación en los humos. Esto coincide con el hecho de que el pyriproxyfen es un compuesto altamente hidrofóbico (coeficiente de partición octanol/agua $Kow: 2,36 \times 10^5$) y dicha característica favorece el efecto larvicida por contacto⁹¹.

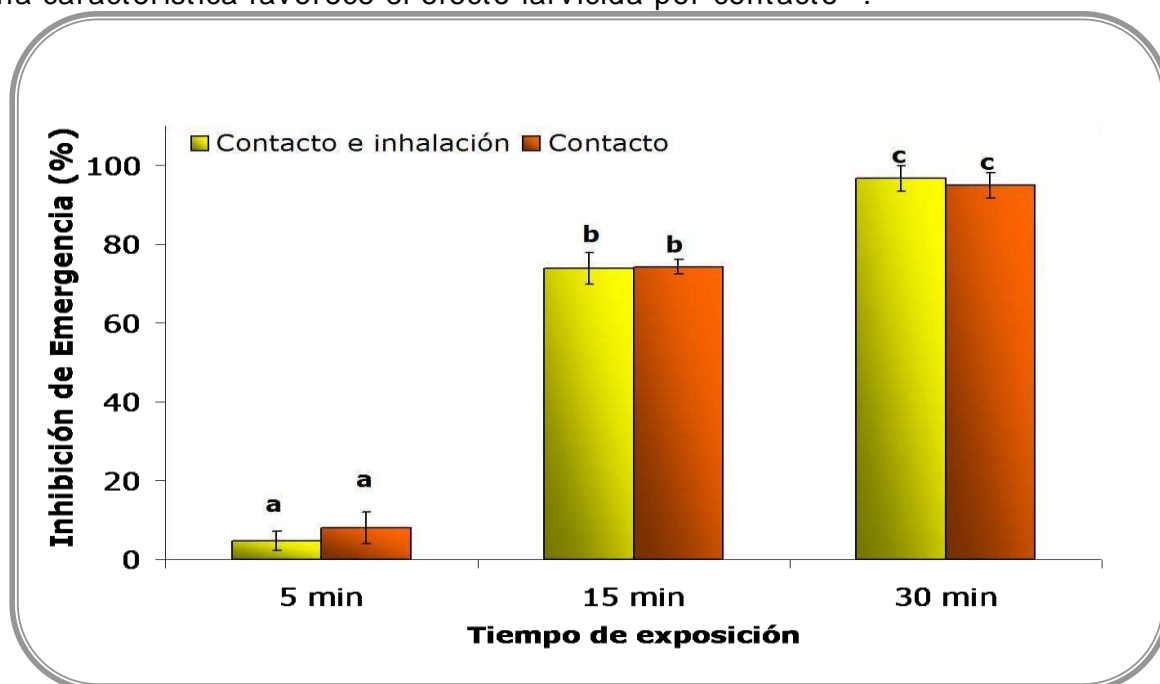


Figura 25. Inhibición de la emergencia de adultos (IE% \pm ES) de *Ae. aegypti* expuestos desde larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto a una pastilla conteniendo 0,2 g/kg de pyriproxyfen con o sin exposición a los humos. Las barras señaladas con la misma letra no difieren significativamente ($p > 0,05$) en el test de rango múltiple de Duncan ($N = 4$).

2.2. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen y un piretroide sobre larvas de *Ae. aegypti*

Una vez conocido el efecto sobre las larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto de las diferentes concentraciones de pyriproxyfen, se prepararon pastillas incorporando un piretroide, ya sea permetrina o *cis*-permetrina en una proporción 1:5.

En la Tabla II se pueden observar los valores del %IE de larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto expuestas a los humos de una pastilla que contenía 0,2 g/kg de pyriproxyfen y 1,0 g/kg de permetrina ó 0,2 g/kg de pyriproxyfen y 1,0 g/kg de *cis*-permetrina. Esta concentración de pyriproxyfen en la formulación fue elegida debido a que en el ensayo del punto 2.1, con la pastilla que contenía solo este ingrediente activo, la toxicidad varió en una forma dependiente del tiempo. En la Tabla II se incluyen los valores de %IE para la pastilla que contenía solo pyriproxyfen obtenidos en el punto 2.1, que fueron usados en el análisis estadístico a modo comparativo.

Composición de la pastilla	%IE(±ES) a diferentes tiempos de exposición a humos		
	5 min	15 min	30 min
Pyriproxyfen + permetrina	6,2 ± 3,8a	58,6 ± 2,0b	95,4 ± 2,3c
Pyriproxyfen + <i>cis</i> -permetrina	8,1 ± 2,3a	65,5 ± 0,8b	91,0 ± 4,4c
Pyriproxyfen	4,7 ± 2,4a	73,7 ± 3,2b	96,6 ± 3,2c

Tabla II. Porcentaje de Inhibición de Emergencia (%IE ± ES) de larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto expuestas a los humos de una pastilla con pyriproxyfen (0,2 g/kg) y un piretroide (1,0 g/kg). Los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (ANOVA seguido de test de Tukey para desigual N, $p > 0,05$).

Se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de exposición a los humos ($F = 251,6$; $gl = 2$, $p < 0,001$), pero no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con pyriproxyfen o pyriproxyfen más un piretroide ($F = 1,29$; $gl = 2$; $p > 0,05$).

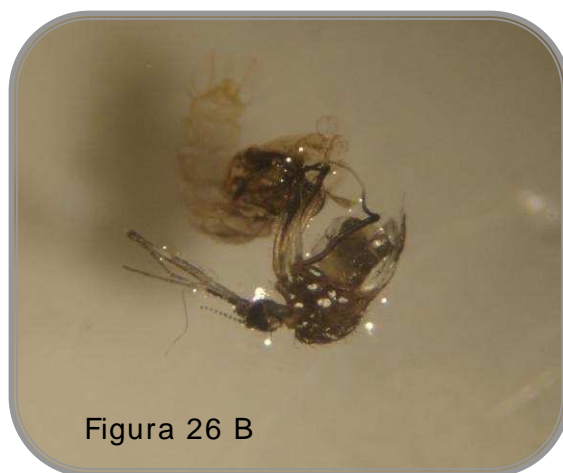
Al usar pastillas preparadas con pyriproxyfen y permetrina o *cis*-permetrina, los valores de %IE aumentaron al aumentar el tiempo de exposición; es decir, se obtuvo el mismo resultado que al usar pastillas que sólo contenían pyriproxyfen.

Cuando se compararon los valores de %IE para un mismo tiempo de exposición, no se observaron diferencias significativas entre las pastillas que contenían pyriproxyfen solo o en combinación con un piretroide. Este resultado indica que la concentración de permetrina o *cis*-permetrina utilizada en la tableta no incrementa la mortalidad de las larvas, probablemente por hallarse en dosis subletales para las mismas.

2.3. Efecto de pastillas fumígenas con distintos ingredientes activos sobre el desarrollo de *Ae. aegypti*

Los IGR producen alteraciones morfológicas en el desarrollo de los estadios inmaduros que finalmente llevan a la muerte de los individuos. En particular, si bien no se conoce detalladamente el modo de acción de los juvenoides, se han encontrado evidencias de que actúan como agonistas de la hormona juvenil⁹²⁻⁹⁵. Al ser aplicados en un momento del desarrollo cuando dicha hormona no debería estar presente, perturban la muda y la metamorfosis, interrumpiendo el desarrollo de los insectos tratados y provocándoles la muerte.

Durante el transcurso de este ensayo se han encontrado diferentes tipos de malformaciones en el desarrollo de los individuos tratados con pyriproxyfen desde larvas, algunas de ellas pueden observarse en la Figura 26(A-F).



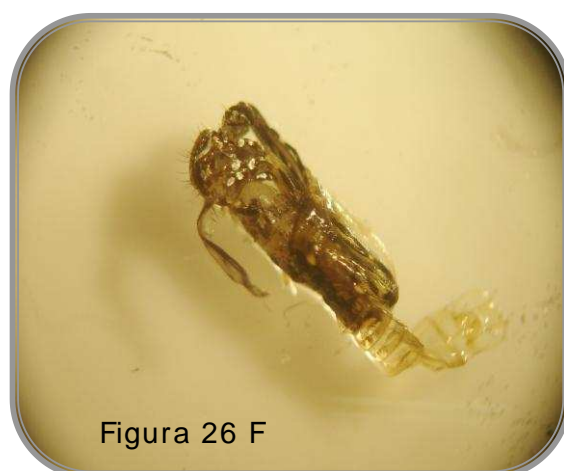
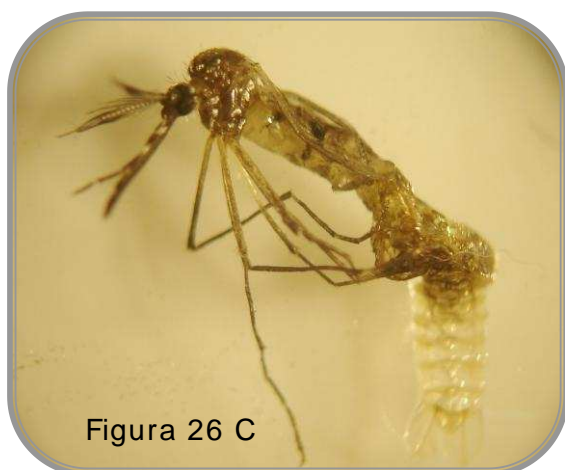


Figura 26. Efectos sobre el desarrollo de los adultos de *Ae. aegypti* en individuos tratados con pastillas que contenían pyriproxyfen desde larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto.

Con el objetivo de conocer la etapa del desarrollo donde se produce la acción del pyriproxyfen, los individuos muertos en los tratamientos de los puntos 2.1 y 2.2 se clasificaron en función de la severidad del efecto producido por el tratamiento.

La Figura 27 muestra el porcentaje de mortalidad, en cada una de las categorías, de los individuos expuestos desde larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto a pyriproxyfen solo o con un piretroide.

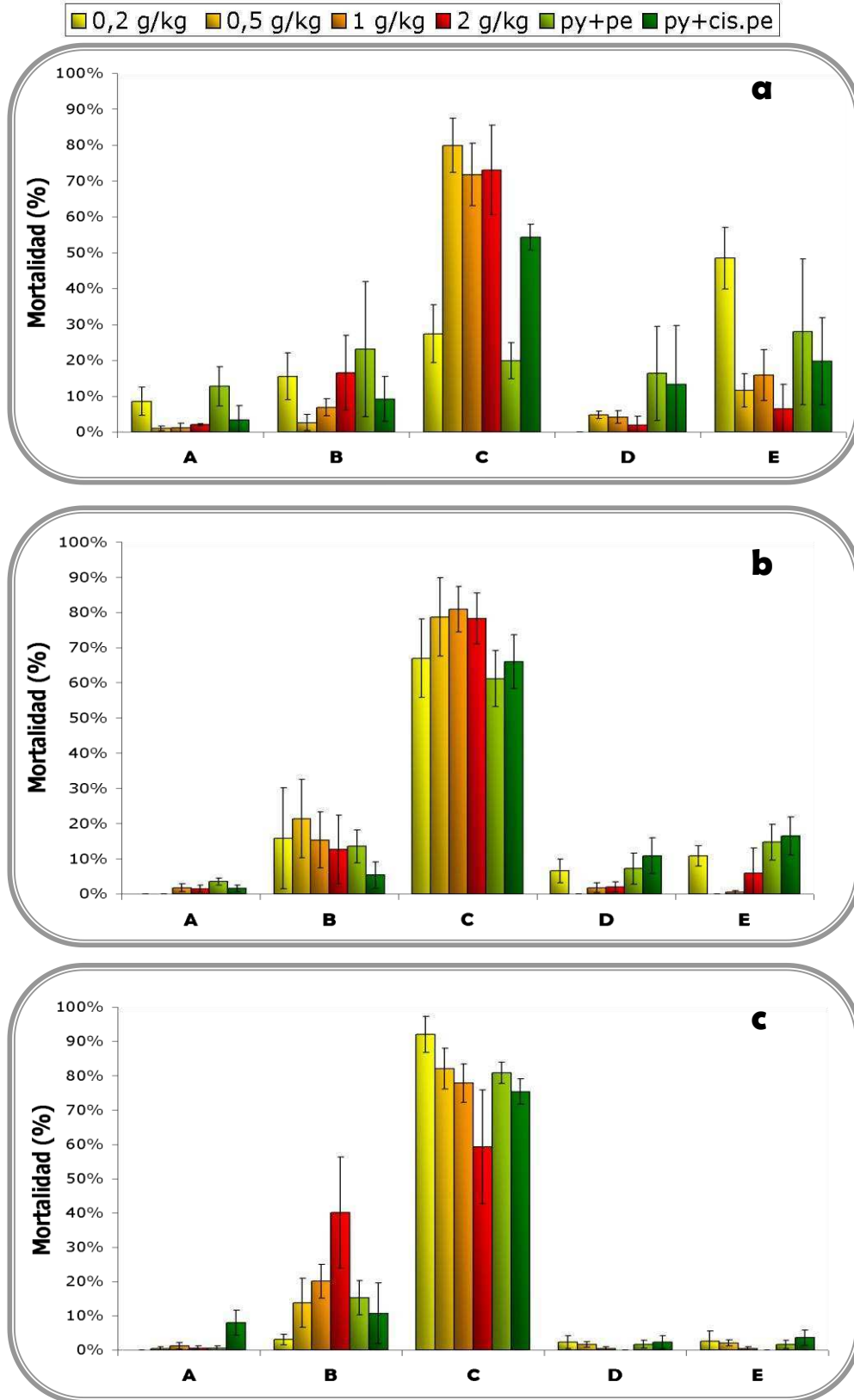


Figura 27. Mortalidad (% \pm ES) de acuerdo con las diferentes etapas del desarrollo de *Ae. aegypti* (A: muerto como larva, B: muerto como pupa no melanizada, C: muerto como pupa melanizada, D: muerto como adulto parcialmente emergido, E: muerto como adulto) expuestos desde larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto a diferentes concentraciones de pyriproxyfen (0,2; 0,5; 1,0 y 2,0 g/kg) o pyriproxyfen (0,2 g/kg) + piretroide (1,0 g/kg). En el grupo control la mortalidad fue menor al 5%. Tiempo de exposición a humos: 5 (a), 15 (b) y 30 (c) minutos.

Con un tiempo de exposición a los humos de 5 minutos (Figura 27a), la mayor parte de los individuos murió durante la etapa de pupa, principalmente como pupa melanizada (ANOVA de medidas repetidas, $p \leq 0,05$). Esto coincide con los datos obtenidos por Braga y cols. para metoprene⁷⁹. El efecto fue evidente para todas las concentraciones de pyriproxyfen evaluadas con excepción de la más baja (0,2 g/kg), en la que se observó la emergencia de un mayor número de adultos que en los otros tratamientos que luego murieron. Este efecto se repitió cuando se usaron pastillas que contenían pyriproxyfen y permetrina, y fue menos pronunciado cuando se usaron pastillas con pyriproxyfen y *cis*-permetrina.

Con un tiempo de exposición de 15 minutos (Figura 27b), la mayor mortalidad se produjo como pupa melanizada ($p \leq 0,05$) para todas las concentraciones, incluso con el tratamiento combinado de pyriproxyfen más un piretroide. La categoría que le siguió fue la de mortalidad como pupa blanca o no melanizada. Finalmente cuando el tiempo de exposición se incrementó a 30 minutos (Figura 27c), los individuos murieron más rápido, con una mortalidad de más del 90% en las categorías B y C. Al utilizarse la mayor concentración de pyriproxyfen en la pastilla (2,0 g/kg) no hubo diferencias significativas entre estas dos categorías ($p > 0,05$). Por otro lado, cuando se usó la pastilla con pyriproxyfen y *cis*-permetrina se observa que el número de individuos que muere como larva es del 8% y es significativamente mayor que para el resto de los tratamientos ($p \leq 0,05$). Esto podría indicar un incipiente efecto neurotóxico de la *cis*-permetrina.

Los resultados confirman que la mortalidad causada por pyriproxyfen, un análogo de JH (JHA), se produce principalmente en la fase de pupa, según lo descrito previamente para *Ae. aegypti* y otros culícidos.^{79, 96, 97}

Al inicio de la metamorfosis de pupa hacia adulto, los niveles de JH disminuyen notablemente hasta casi desaparecer, y la ecdisona inicia los cambios metamórficos en el insecto³⁷. Estos cambios son controlados por una gran cantidad de nuevas proteínas, resultantes de la activación de genes y de la represión de los genes larvales y pupales. Los genes tempranos, activados por la ecdisona, codifican para factores de transcripción que a su vez regulan los genes efectores directamente responsables de los cambios morfológicos y fisiológicos que caracterizan a la metamorfosis. Si durante este período se aplica un JHA, éste se unirá a proteínas que interactúan con la JH, y el complejo JHA-proteína alterará la expresión de uno o más de los genes tempranos regulados por la ecdisona. De esta manera, la falla en la expresión de estos genes producirá alteraciones en la expresión de los genes

efectores que controlan, y en consecuencia se producirán alteraciones fisiológicas y del desarrollo de las pupas hacia adultos.⁹⁸

El punto del último estadio larval en el que comienzan a activarse los genes responsables de la metamorfosis a pupa, con un aumento del título de ecdisona en ausencia de la hormona juvenil, se conoce como compromiso pupal o *pupal commitment*. En *Ae. aegypti*, se han encontrado dos picos de ecdisteroides en el último estadio larval⁹⁹. El primer pico, en ausencia de JH, inicia los cambios fisiológicos en la larva necesarios para efectuar su desarrollo hacia pupa; el segundo pico resulta en la ecdisis de larva a pupa. La aplicación de JH o JHA antes o en el momento de producirse el compromiso pupal afecta la expresión de los genes del desarrollo, como los que codifican para proteínas de la cutícula^{100, 101}. Algunos trabajos describen un retraso en la expresión de genes específicos del estadio de pupa o adulto cuando se trataban larvas del cuarto estadio con IGRs¹⁰². Sin embargo aún no se sabe como estos compuestos ejercen su acción a nivel molecular.

Por otro lado, se sabe que la JH inhibe la diferenciación de los discos imaginales. Esto ha sido demostrado en varias especies de Dípteros y Lepidópteros, aplicando JH o JHA durante la última etapa del último estadio larval o en el estadio pupal²⁵. Por esta razón, la muda de larva a pupa se produce cuando la JH aún se encuentra presente, ya que la misma es necesaria para prevenir el desarrollo precoz de los discos imaginales.

Por lo tanto, la aplicación de pyriproxyfen en las larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto de *Ae. aegypti* podría estar afectando la expresión de genes vinculados con la metamorfosis de larva a pupa o de pupa hacia adulto, e inhibiendo el desarrollo de los discos imaginales. Así, al momento de producirse el pico de ecdisona que marca la metamorfosis hacia pupa o adulto, ésta se produciría de manera incompleta o defectuosa provocando la muerte del individuo. Esto coincide con lo observado en este trabajo, donde la mortalidad de los individuos ocurre principalmente en la fase de pupa o durante la muda a adulto.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran además que, la concentración de permetrina o *cis*-permetrina en la pastilla no incrementa la mortalidad de las larvas, probablemente por hallarse en dosis subletales para las mismas. Como puede observarse en la Figura 27, la mortalidad se produce mayormente en la fase de pupa. En la etapa larval, donde se debería observar el efecto de los insecticidas neurotóxicos como los piretroides, no se encontraron diferencias entre este

tratamiento y el tratamiento con las pastillas que contenían sólo pyriproxyfen. La única excepción se presentó cuando se utilizó una mezcla con el IGR junto a *cis*-permetrina y un tiempo prolongado de exposición a humos (30 minutos), observándose un efecto neurotóxico incipiente con una mortalidad menor al 10%.

2.4. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen y piretroides sobre la progresión en el tiempo de los diferentes estadios

La Figura 28 muestra el desarrollo en el tiempo de las larvas de *Ae. aegypti* expuestas por 5 minutos a los humos de diferentes concentraciones de pyriproxyfen o pyriproxyfen y un piretroide.

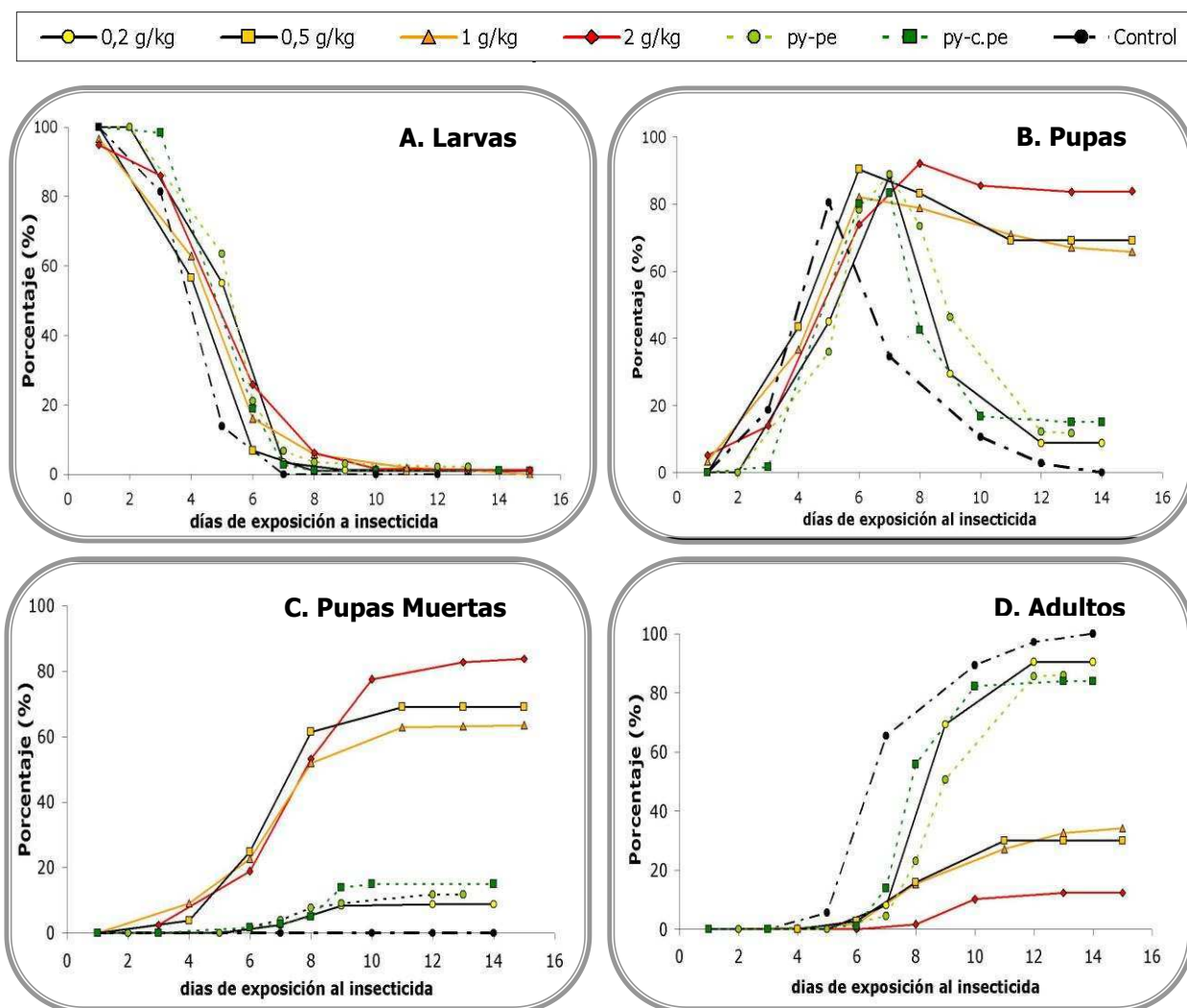


Figura 28. Desarrollo a lo largo del tiempo de larvas *Ae. aegypti* expuestas por 5 minutos a los humos liberados de una pastilla conteniendo pyriproxyfen (0,2; 0,5; 1,0 y 2,0 g/kg) o pyriproxyfen + piretroide desde larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto. Los valores están expresados como porcentaje (%) de cada grupo respecto al número total de individuos. (Se omitieron las barras de error para mejorar la visualización el gráfico.)

Luego de 5 días de exposición al insecticida, el 80% de las larvas del grupo control pasó al estadio de pupa, y para el 7º día no se encontraron más larvas (Figura 28A). La transición al estado de pupa alcanzó su punto máximo en el 5º día después de comenzado el tratamiento, y para el día 14 todas las pupas habían mudado a adultos. La progresión para las larvas tratadas con la menor concentración de pyriproxyfen fue similar al grupo control, con un retraso de dos días en la formación de pupas. Esto coincide con los resultados de los trabajos de Braga y cols.⁷⁹ y Busvine y cols.⁹⁷ El resto de los grupos experimentales mostró una progresión menos eficiente hacia al estadio adulto (Figuras 28B y D). Por otro lado, entre los 10 y 14 días se produjo la emergencia de todos los adultos, sin diferencias aparentes entre el control y los grupos tratados (Figuras 28D). Estos resultados difieren de los encontrados para metoprene⁷⁹ donde se observó un retraso de 7-8 días en la emergencia de adultos de los grupos tratados con respecto al control.

El principal factor responsable de la inhibición de la emergencia fue la mortalidad en la fase de pupa. El número de pupas muertas aumentó proporcionalmente con la concentración de pyriproxyfen en la pastilla, y casi todos los individuos murieron como pupas en la concentración más alta (Figuras 28C y D).

Los resultados obtenidos para el tratamiento con pyriproxyfen más permetrina o *cis*-permetrina (Figura 28) muestran una progresión similar al tratamiento con la menor concentración de pyriproxyfen, lo que confirma que la mortalidad en los estados inmaduros fue causada por el pyriproxyfen y no por los piretroides presentes en la pastilla.

La Figura 29 muestra el desarrollo en el tiempo de las larvas de *Ae. aegypti* expuestas durante 15 minutos a los humos de diferentes concentraciones de pyriproxyfen o pyriproxyfen y un piretroide. Estas curvas son similares a las curvas con un tiempo de exposición de 5 minutos. En la Figura 29B se repite el retraso de entre 2 y 3 días en la formación de pupas, que se observa en todos los grupos tratados, quienes además muestran una progresión menos eficiente hacia al estadio adulto respecto de un tiempo de exposición de 5 minutos, incluso con la dosis más baja de pyriproxyfen (Figuras 29C y D). Por otro lado, entre los 10 y 14 días se produjo la emergencia de todos los adultos, sin retrasos aparentes entre el control y los grupos tratados (Figura 29D). La única excepción fue el grupo expuesto a la concentración más alta de pyriproxyfen, donde la emergencia de unos pocos

adultos se extendió hasta el día 16. Esto mostraría un incipiente retraso en la formación de adultos que no alcanza al de 7-8 días observado para metoprene⁷⁹.

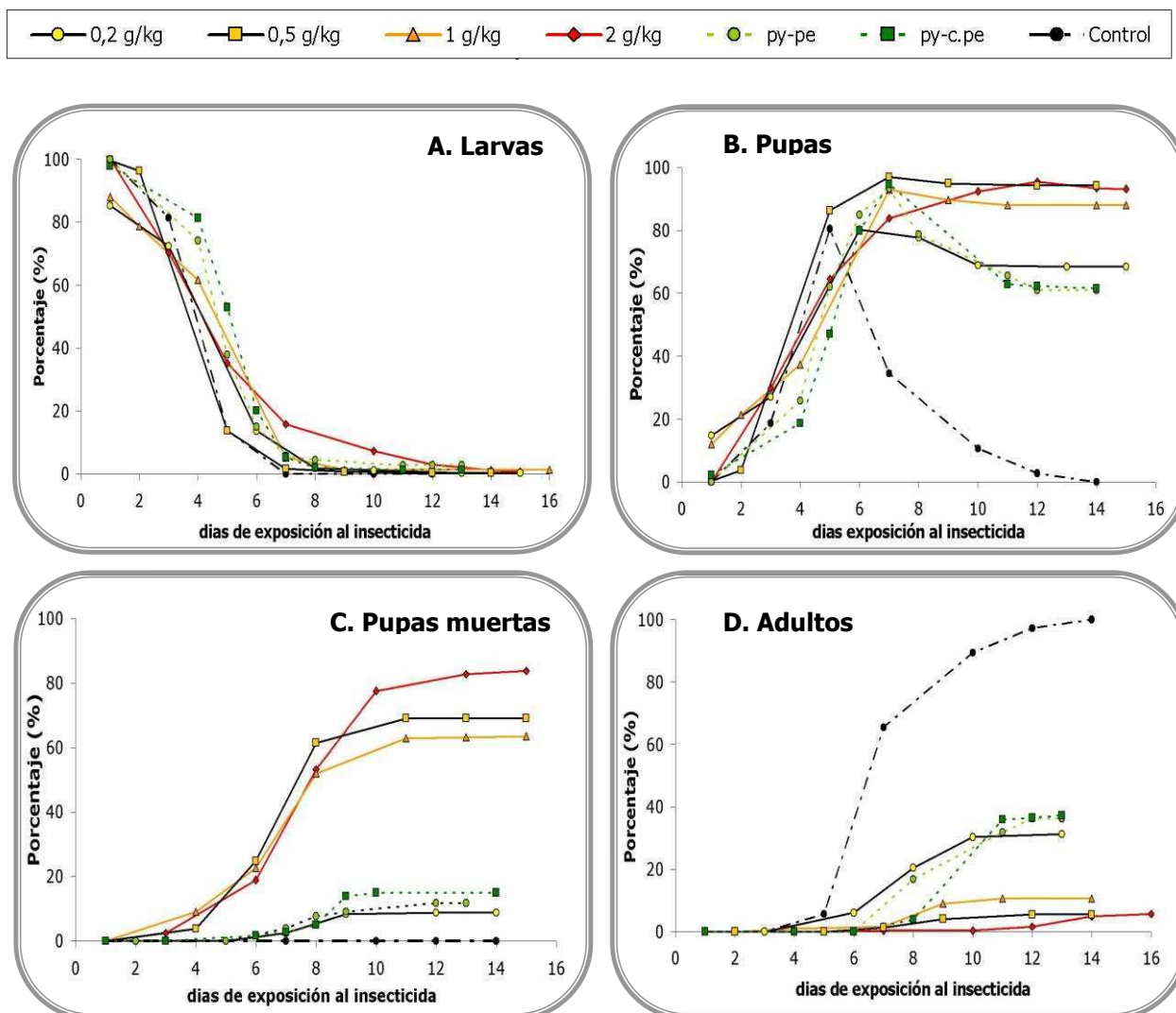


Figura 29. Desarrollo a lo largo del tiempo de larvas *Ae. aegypti* expuestas por 15 minutos a los humos liberados de una pastilla conteniendo pyriproxyfen (0,2; 0,5; 1,0 y 2,0 g/kg) o pyriproxyfen + piretroide desde larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto. Los valores están expresados como porcentaje (%) de cada grupo respecto al número total de individuos. (Se omitieron las barras de error para mejorar la visualización el gráfico.)

Nuevamente, el principal factor responsable de la IE fue la mortalidad en la fase de pupa (ver punto 2.3). El número de pupas muertas fue elevado y similar para las tres concentraciones más altas de pyriproxyfen en la pastilla (0,5; 1,0 y 2,0 g/kg), donde más del 80% de los individuos murieron como pupas (Figuras 29C y D).

Los resultados obtenidos para el tratamiento con la dosis más baja de pyriproxyfen muestran una progresión similar a los tratamientos con este activo junto a un piretroide, registrándose un aumento en el número de pupas muertas respecto al tiempo de exposición de 5 minutos. Esto confirma que, aún aumentando

el tiempo de exposición a los humos, la mortalidad es causada por el pyriproxyfen y no por los piretroides presentes en la pastilla, ya que el incremento en la mortalidad esta dado en la fase de pupa y no en la de larvas donde, debido a su modo de acción neurotóxico, actuarían los piretroides.

La Figura 30 muestra el desarrollo en el tiempo de las larvas de *Ae. aegypti* expuestas durante 30 minutos a los humos de diferentes concentraciones de pyriproxyfen o pyriproxyfen y un piretroide.

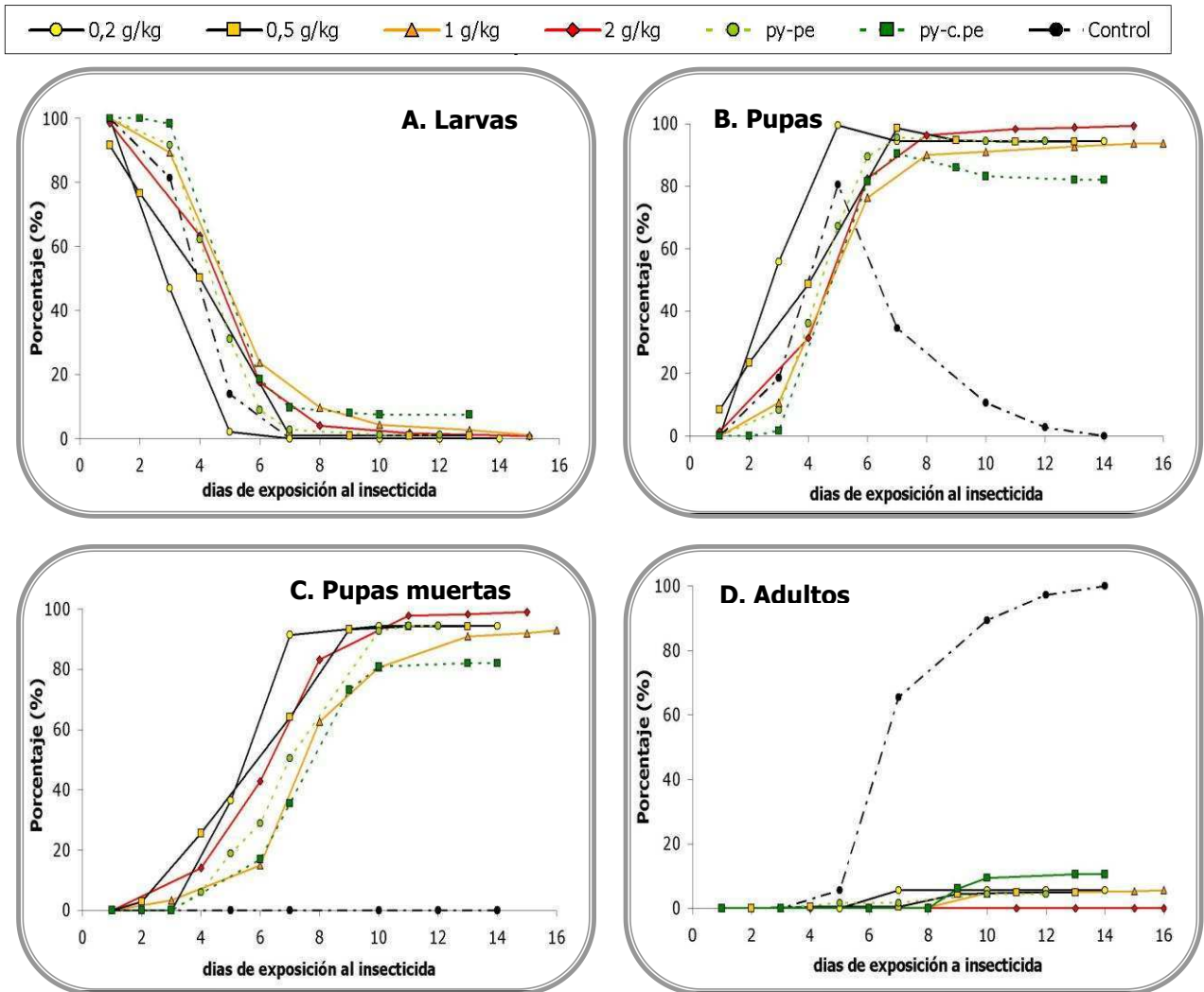


Figura 30. Desarrollo a lo largo del tiempo de larvas *Ae. aegypti* expuestas por 30 minutos a los humos liberados de una pastilla conteniendo pyriproxyfen (0,2; 0,5; 1,0 y 2,0 g/kg) o pyriproxyfen + piretroide desde larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto. Los valores están expresados como porcentaje (%) de cada grupo respecto al número total de individuos. (Se omitieron las barras de error para mejorar la visualización el gráfico.)

Las curvas son similares a las correspondientes a los tiempos de exposición de 5 y 15 minutos. Se observa que para todas las concentraciones de pyriproxyfen evaluadas, con o sin piretroide, la mayor parte de los individuos murieron como pupas y emergieron menos del 20% de los adultos.

2.5. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre los distintos estadios larvales de *Ae. aegypti*

Si bien se han realizado varios trabajos demostrando la efectividad de los IGRs, muy pocos trabajos se han concentrado en conocer la susceptibilidad de los distintos estadios inmaduros de los mosquitos a estos compuestos.

La Figura 31 muestra el efecto del pyriproxyfen liberado en los humos de la pastilla fumígena sobre los diferentes estadios larvales de *Ae. aegypti*. Los resultados indican que cuando el tiempo de exposición a los humos fue bajo (5 min) no se encontraron diferencias significativas en el %IE entre los diferentes estadios larvales ($F = 1,91$; $gl = 3$; $p > 0,05$), localizándose este valor entre 5 y 20%. Cuando el tiempo de exposición ascendió a 15 minutos, el %IE para las L₄ fue significativamente mayor que para el resto de los estadios larvales ($F = 33,7$; $gl = 3$; $p < 0,0001$, seguido de test de Tukey HSD para N desigual), con un valor de alrededor del 90%.

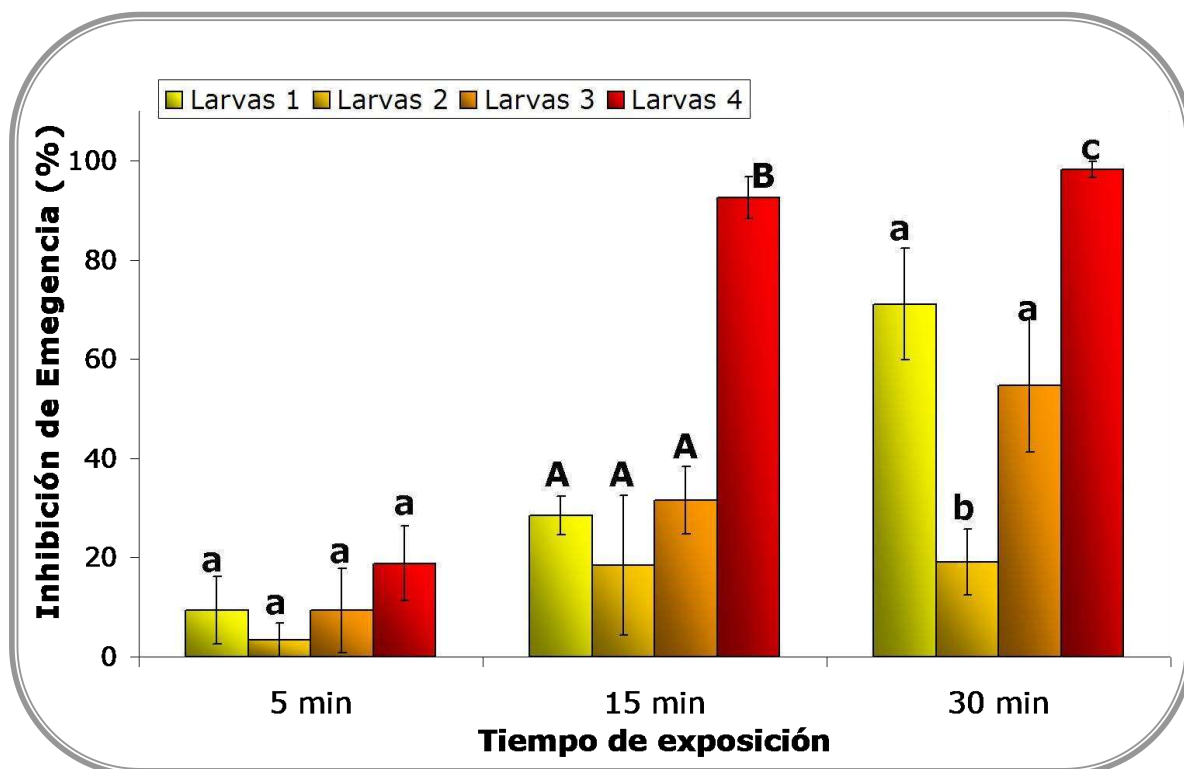


Figura 31. Inhibición de la emergencia (% \pm ES) de L₁, L₂, L₃ o L₄ de *Ae. aegypti* expuestas a los humos de una pastilla de 300 mg que contenía 0,2 g/kg de pyriproxyfen durante diferentes tiempos de exposición. Letras distintas dentro de cada tiempo de exposición indican diferencias significativas (ANOVA de una vía; seguido de test de Tukey HSD para N desigual $p \leq 0,05$)

Finalmente con un tiempo de exposición a los humos de 30 minutos, el %IE para las L₄ continuó siendo cercano al 100% y mayor que para el resto de los estadios larvales ($F = 44,9$; $gl = 3$; $p < 0,0001$, seguido de test de Tukey HSD para N desigual). Al mismo tiempo, no se encontraron diferencias significativas en el valor del %IE entre las L₁ y L₃, pero si entre ambas y las L₂, siendo el de éstas últimas el más pequeño.

Los resultados indican que el estadio de L₄ es el más susceptible al pyriproxyfen, alcanzando un valor de %IE mayor al 90% con sólo 15 minutos de exposición a los humos de una pastilla conteniendo 0,2 g/kg de este IGR. Estos resultados coinciden con el trabajo de Lan y Grier¹⁰³ quienes encontraron que las L₄ son más sensibles a metoprene que las L₃. En una revisión realizada por Wilson⁹⁸, también se indica que el último estadio larval es el más susceptible a los JHA. La mayor sensibilidad de las L₄ podría deberse a que el tiempo que transcurre desde este estadio hasta el comienzo de la formación de la pupa no sería suficiente para que el metabolismo degradativo de xenobióticos llegue a disminuir los niveles de los JHA de manera significativa, produciéndose entonces los efectos ya descritos sobre la metamorfosis debido a la presencia de un compuesto que actúa como la JH cuando esta no debería estar presente. Diferentes autores han demostrado que una de las principales rutas del metabolismo degradativo de la JH en *Ae. aegypti* es la vía de la JH esterasa^{32, 104}, sin embargo también se ha encontrado que la ruta metabólica de la JH epóxido hidrolasa es importante¹⁰⁵. Estas rutas podrían ser válidas para JHA de estructura similar a la JH, como el metoprene, pero no necesariamente para el pyriproxyfen. Poco se sabe acerca del modo de acción de este compuesto y de su metabolismo degradativo. De manera indirecta, se ha encontrado que en otros Dípteros como la mosca doméstica¹⁰⁶ (*Musca domestica*) y en la mosca blanca¹⁰⁷ (*Bemisia tabaci*), poblaciones resistentes a este compuesto presentaban un descenso de la CL₅₀ cuando se aplicaba butóxido de piperonilo (inhibidor de la actividad oxidasa microsomal de función mixta) y dietil maleato (inhibidor de la glutatión transferasa), pero no cuando se utilizaba S,S,S-tributil fosforotritioato (inhibidor de esterasas). Esto indica que las vías degradativas del pyriproxyfen podrían ser la de las oxidasas microsomales de función mixta y las glutatión transferasas.

Los resultados también muestran una aparente tolerancia al pyriproxyfen en las L₂ respecto del resto, aún más evidente cuando el tiempo de exposición es de 30 minutos. Esto coincide con los resultados de da Silva y Mendes¹⁰⁸ quienes encontraron que larvas de *Ae. aegypti* de 48 horas de edad (L₂), tratadas con la CL₉₅ de metoprene calculada para L₄ tempranas, presentaban una mortalidad del 56%, mientras que para las L₁ y L₃ este valor fue de 69 y 91%, respectivamente. Estos mismos autores no encontraron diferencias en la mortalidad de los diferentes estadios larvales tratados con diflubenzuron, un inhibidor de síntesis de quitina. Phonchevin y cols.¹⁰⁹ hallaron resultados similares utilizando metoprene sobre *Anopheles dirus*, *Culex quinquefasciatus* y *Ae. aegypti*. Para esta última especie, los valores de CL₅₀ para L₂, L₃ y L₄ fueron 0,0077; 0,0034 y 0,0025 ppm (mg/l) respectivamente. Por otro lado los mismos autores hallaron el resultado inverso para ciromazina, siendo las L₄ las más tolerantes y las L₂ las más susceptibles.

Esta tolerancia de las L₂ respecto al tratamiento con pyriproxyfen podría deberse a que la exposición al insecticida en un momento en el que el mismo no produce efecto induciría a las enzimas que participan en el metabolismo de xenobioticos, incrementando su degradación. Así cuando las L₂ llegan a L₄ la cantidad de pyriproxyfen en el agua y en compartimiento interno sería menor. Por lo tanto el %IE es más bajo en las L₂ que en las L₃ o L₄. Este efecto es más evidente a concentraciones más altas del insecticida en el agua. El aumento del metabolismo detoxificante con la exposición previa a insecticidas o xenobioticos ha sido descrito por varios autores. Poupardin y cols.¹¹⁰ observaron que la exposición previa de L₄ de *Ae. aegypti* a dosis subletales (que causaban menos de un 5% de mortalidad) de permetrina, temefós y atrazina, entre otros, incrementaba la tolerancia a los insecticidas permetrina y temefós en un porcentaje entre un 4 y un 20%. Este incremento estaría dado por un aumento de la expresión de genes que codifican para monoxigenasas P₄₅₀. Riaz y cols.¹¹¹ obtuvieron resultados similares al exponer larvas de *Ae. aegypti* a dosis subletales de glifosato y α -benzopireno, registrando un aumento de entre 1,2 y 4 veces en la tolerancia a insecticidas como imidacloprid, permetrina y propoxur.

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que en el presente trabajo la aplicación del pyriproxyfen se realizó en forma de humos, por lo tanto otra posible explicación para la diferencia de susceptibilidad observada podría ser el sucesivo descenso en la biodisponibilidad de este insecticida a medida que transcurre el tiempo. Esto implicaría que las partículas de pyriproxyfen dispersadas en los humos podrían interactuar con las paredes del recipiente plástico donde se encuentran las larvas, quedando menos biodisponible en el momento en que las L_2 o las L_3 alcanzan el estadio de L_4 donde el IGR ejerce su acción. Así, las larvas más jóvenes presentan un %IE menor que las más grandes.

La idea de que la exposición previa al insecticida podría aumentar el metabolismo detoxificante o la de que el pyriproxyfen quedaría menos biodisponible a medida que transcurre el tiempo, no explicaría lo observado con las L_1 , que resultan más susceptibles que las L_2 . Esto puede deberse a que las L_1 son más sensibles a factores externos, probablemente al igual que en otros insectos, la cutícula aún no se encuentre del todo formada, situación que favorecería el ingreso del pyriproxyfen¹¹²⁻¹¹⁴. Por otro lado la maquinaria enzimática podría estar destinada al desarrollo de otros procesos metabólicos, como la formación de la cutícula, con lo que la inducción y actividad de las enzimas del metabolismo detoxificante podría ser baja durante las primeras horas de vida. Esto podría provocar la mortalidad de las larvas como L_1 antes de llegar al momento del ciclo de vida donde actúa el pyriproxyfen.

En la Figura 32 se observa el porcentaje de mortalidad, en cada una de las categorías utilizadas anteriormente, de los individuos tratados desde L_1 , L_2 , L_3 o L_4 con pyriproxyfen a diferentes tiempos de exposición a los humos. Cuando el tiempo de exposición a humos es corto (5 minutos, Figura 32a), todas las categorías de mortalidad se encontraron casi igualmente representadas. Aunque más de un 15% de los individuos murió como larva en los estadios L_1 y L_2 , en las L_4 no hay mortalidad larval. Los resultados son similares a los encontrados cuando se utilizaron larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto (Figura 27a). Muchos de los individuos mueren como adultos luego de la emergencia.

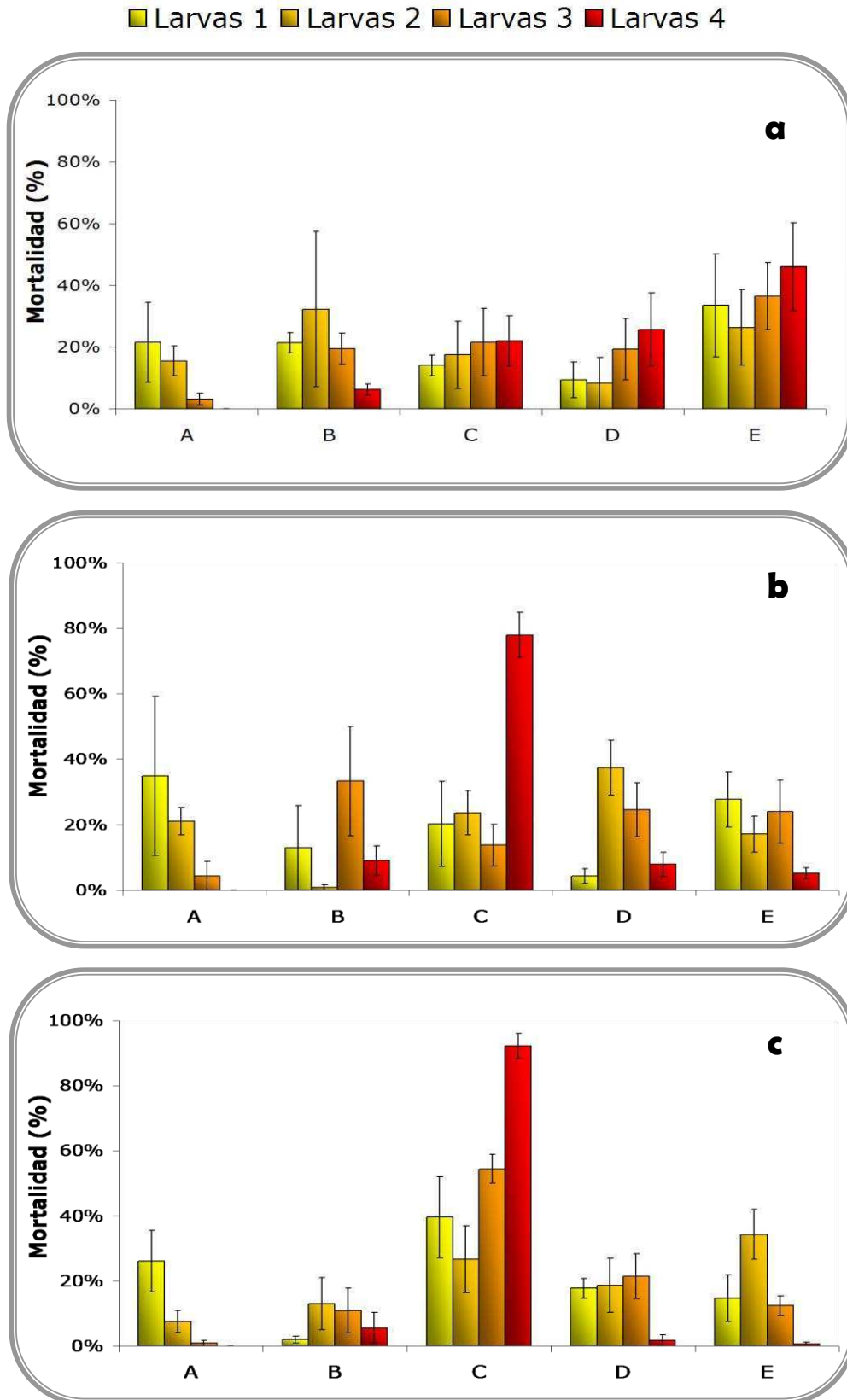


Figura 32. Mortalidad (% \pm ES) de acuerdo con las diferentes etapas del desarrollo de *Ae. aegypti*. (A: muerto como larva, B: muerto como pupa no melanizada, C: muerto como pupa melanizada, D: muerto como adulto parcialmente emergido, E: muerto como adulto) de larvas expuestas desde L₁, L₂, L₃ o L₄ a una concentración de pyriproxyfen en la pastilla de 0,2 g/kg. En el grupo control la mortalidad fue menor al 5%. Tiempo de exposición a humos: 5 (a), 15(b) y 30(c) minutos.

Cuando el tiempo de exposición a humos aumentó a 15 minutos (Figura 32b), casi un 40% de los individuos tratados desde L₁ murió como larva. El porcentaje de individuos que muere como larva disminuye al aumentar la edad de las larvas tratadas hasta llegar a las L₄ que no presentan mortalidad en esta categoría. En este caso la mayoría de los individuos, casi un 80%, murió como pupa melanizada.

Finalmente, con un tiempo de exposición a los humos de 30 minutos (Figura 32c) la mortalidad en la categoría de larva siguió siendo alta para las L₁ respecto del resto de los estadios larvales ($p \leq 0,05$), aunque también se observó una mortalidad elevada en la categoría de pupa melanizada. Para las L₂ todas las categorías de mortalidad se encontraron casi igualmente representadas. La mortalidad para las L₃ presentó un patrón similar que para las L₁, salvo la mortalidad en la categoría de larva que fue prácticamente insignificante. Para las L₄ el comportamiento fue el mismo que con un tiempo de exposición de 15 minutos, alcanzando una mortalidad de más del 90% como pupa melanizada.

Estos resultados indican que la mayor mortalidad en las L₁ respecto de las L₂ ocurriría debido a que las L₁ son más sensibles, ya que se observó para todos los tiempos de exposición a humos, más del 20% de los individuos tratados desde L₁ murieron como larva, mientras que esto no ocurrió en el resto de los estadios larvales utilizados. Las L₁ que sobrevivieron las primeras horas de exposición al pyriproxyfen hasta llegar a L₂ o L₃ continuaron normalmente su desarrollo hasta alcanzar el estadio de L₄ tardía o pupa donde este larvicida ejerce su acción. Esta explicación sería válida tanto para la hipótesis del aumento inducido del metabolismo detoxificante como para la del descenso en la biodisponibilidad del pyriproxyfen a medida que transcurre el tiempo.

2.6.Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen y permetrina sobre los adultos de *Ae. aegypti*

El agregado de un adulticida como la permetrina o la *cis*-permetrina a la pastilla fumígena aumentaría la capacidad de esta herramienta para lograr un control efectivo del *Ae. aegypti* en el interior de las viviendas, dado que la mayoría de los mosquitos adultos se refugian o reposan en su interior.

La Tabla III muestra los resultados del efecto de la aplicación de la pastilla fumígena con permetrina o *cis*-permetrina solas o junto con pyriproxyfen, sobre los adultos de *Ae. aegypti*.

Composición de la pastilla	TV ₅₀ min (Int. confianza 95%)
Permetrina	19,9 (19,4 – 20,4)a
<i>Cis</i> -permetrina	16,0 (15,5 – 16,7)b
Permetrina + pyriproxyfen	19,3 (18,8 – 19,9)a
<i>Cis</i> -permetrina + pyriproxyfen	17,3 (16,6 – 17,9)b

Tabla III. Tiempo de volteo 50 (TV₅₀) de adultos de *Ae. aegypti* expuestos a los humos de una pastilla de 300 mg que contenía 1,0 g/kg de permetrina o *cis*-permetrina solas o junto con 0,2 g/kg de pyriproxyfen. Los valores seguidos por la misma letra no mostraron diferencias significativas usando como criterio el intervalo de confianza al 95% (N: 4).

Los intervalos de confianza del 95% muestran que hay diferencias entre la efectividad de la permetrina y de la *cis*-permetrina sobre los adultos de *Ae. aegypti*, siendo ésta última la más efectiva, como ya ha sido descrito anteriormente¹¹⁵. Por otro lado, la efectividad de los piretroides en presencia del pyriproxyfen no se vio modificada. Esto indica que el IGR no interfiere con la liberación de los piretroides en los humos, confirmando lo encontrado en la sección 1.1, y tampoco tiene actividad de volteo sobre los adultos, resultado esperable dado el modo de acción de estos insecticidas.

2.7. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre los huevos de *Ae. aegypti*

Como se ha citado a lo largo de esta tesis, varios trabajos han demostrando la efectividad de diferentes clases de IGRs sobre *Ae. aegypti* y otras especies de mosquitos, sin embargo muy pocos han evaluado su acción ovicida.

La JH aparece en el embrión de los holometábolos en la mitad de su desarrollo, luego de la blastogénesis y sería fundamental para que ocurra el cierre dorsal, la formación de la cutícula de la larva y la diferenciación del intestino medio^{116, 117}. Por lo tanto, es de interés estudiar si un JHA podría tener efecto ovicida.

En este punto de la tesis se evaluó el efecto del pyriproxyfen liberado en los humos de la pastilla fumígena sobre los huevos de *Ae. aegypti*, los resultados pueden observarse en la Tabla IV.

Ensayo por inmersión de los huevos	Ensayo de oviposición en superficie tratada
% Diferencia en la eclosión (\pm ES)	% Diferencia en la eclosión (\pm ES)
10,2 \pm 4,0 [†]	-5,8 \pm 7,2 [†]

Tabla IV. Diferencia en la eclosión de los huevos (DE% \pm ES) tratados por inmersión o colocados sobre una superficie tratada con una pastilla de 300 mg con pyriproxyfen (2 g/kg) por un tiempo de exposición a los humos de 30 min. [†] No difiere significativamente de cero (test de t de Student para una muestra $p > 0,05$) (N: 5).

Cuando se evaluó el efecto del pyriproxyfen por inmersión de los huevos en una solución donde se depositaron los humos conteniendo este ingrediente activo no se encontró una diferencia significativa entre el porcentaje de eclosión de los huevos tratados y los control (test t de Student para una sola muestra, $t = 2,53$; $df = 4$; $p > 0,05$). Tampoco se observó un efecto ovicida cuando los huevos fueron colocados sobre una superficie en la cual se depositaron los humos conteniendo pyriproxyfen (test t de Student para una sola muestra, $t = -0,80$; $df = 4$; $p > 0,05$). En este último caso no hubo diferencias en el número de huevos colocados por hembra, entre las hembras utilizadas en el grupo tratado y el control (test t de Student, $t = 0,1$; $df = 8$; $p > 0,05$), obteniéndose valores de $73,7 \pm 7,60$ y $74,8 \pm 5,74$ respectivamente. Esto indica que la dosis de pyriproxyfen utilizada en el ensayo no afecta la formación de los huevos en las hembras, probablemente debido al escaso ingreso de este IGR a través de la cutícula al no estar vehiculizado en un solvente orgánico. Tampoco actuaría como repelente para la oviposición; coincidiendo con los resultados de Sihuincha y cols.¹¹⁸, que encontraron que incluso en concentraciones de pyriproxyfen muy elevadas (mayores a 30000 ppb) los recipientes tratados eran igualmente utilizados como sitios de oviposición que los no tratados.

La falta de efecto ovicida del pyriproxyfen cuando los huevos se sumergen en una solución conteniendo este IGR podría deberse a la baja permeabilidad de los mismos. En el momento de la oviposición, los huevos de *Ae. aegypti* están rodeados sólo por el corion secretado por las células epiteliales del ovario. Esto permite el ingreso de agua, lo que resulta en un aumento de su tamaño y su peso.

Se conoce muy poco acerca de la permeabilidad de los huevos de mosquitos, pero se cree que tanto la permeabilidad a los solutos como al agua se ve afectada, a medida que transcurre el tiempo desde la oviposición. El ingreso de agua es rápido durante las dos horas posteriores a la oviposición, continúa a un ritmo apreciable hasta luego de 10 horas y alrededor de las 16 finaliza¹¹⁹. Este descenso de la permeabilidad del corion se ha asociado con la secreción de una capa de cera asociada a la cutícula serosa, ya que los huevos desarrollan la máxima resistencia a la pérdida de agua en el momento en que se forma la cutícula serosa aproximadamente entre las 11 y las 13 horas luego de la oviposición^{26, 80}. También podría deberse a que la concentración y el tiempo de exposición a humos utilizados no son suficientes para producir un efecto sobre la eclosión de los huevos.

Los JHA son más eficaces durante la fase inicial de la embriogénesis. Este proceso sería interrumpido cuando son aplicados en huevos recién colocados o jóvenes¹²⁰. Sin embargo en esta tesis tampoco se observa efecto ovicida cuando las hembras colocan los huevos en una superficie donde se depositaron los humos conteniendo pyriproxyfen. Esto puede deberse a que el pyriproxyfen podría no solubilizarse en el agua que se encuentra sobre el algodón utilizado para oviposición no quedando biodisponible para producir un efecto ovicida. También podría ocurrir que el corion actúe como una barrera para el ingreso de moléculas de gran tamaño, como insecticidas; o que la concentración y el tiempo de exposición a humos utilizados no son suficientes para producir un efecto sobre la eclosión de los huevos.

En general la aplicación exógena de JH o JHA sobre los huevos de moscas y polillas no tiene efecto sobre el crecimiento embrionario y la morfogénesis^{117, 121}. Sólo Naqvi y cols.¹²² encontraron una inhibición de la eclosión de huevos de *Ae. aegypti* tratados con una formulación comercial de metoprene. Esta inhibición se produjo luego de una exposición continua a metoprene durante siete días y varió entre el 13 y el 79%. En otros géneros como Lepidóptera y Ortóptera se observó un efecto del pyriproxyfen sobre los huevos, siendo más afectados los huevos más jóvenes, probablemente debido a que en este período la JH no se encuentra presente en el embrión^{123, 124}.

En mosquitos, tampoco se ha detectado un efecto ovicida con insecticidas diferentes a los IGR, como por ejemplo spinosad y temefos¹²⁵. Tianyun y Mulla¹²⁶ encontraron que la azadiractina aplicada como concentrado emulsionable inhibía la eclosión de huevos de *Culex tarsalis* recién colocados sobre una solución de este

compuesto, aunque huevos de más de cuatro horas no fueron afectados. Recientemente algunos extractos de plantas o aceites esenciales han mostrado actividad ovicida sobre huevos de mosquitos¹²⁷⁻¹²⁹, sin embargo las dosis utilizadas son mayores a 200 ppm y probablemente la mortalidad sea producida por asfixia debido a la oclusión de los aeropilos más que por un efecto sobre la embriogénesis.

2.8. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre el desarrollo de las ovariolas de *Ae. aegypti*

Luego de la eclosión, las hembras recién emergidas atraviesan importantes cambios fisiológicos y de comportamiento hasta iniciar la puesta de huevos. En ese momento, un grupo de folículos en desarrollo se separa del germario, iniciando la fase previtelogénica de desarrollo del ovario. La hormona que regula el desarrollo previtelogénico es la JH²⁶. Se ha demostrado que si las hembras son decapitadas una hora luego de la emergencia o si la *corpora allata* (CA) es removida poco después de la eclosión, se detiene el desarrollo previtelogénico del ovario. La aplicación tópica de un JHA estimula el crecimiento normal de los ovarios previtelogénicos en las hembras decapitadas o en aquellas a las que se les removió la CA^{45, 130}.

En las hembras adultas, el aumento de la JH señala que el proceso de ecdisis ha finalizado y deben comenzar los procesos relacionados con la reproducción. Los niveles de JH aumentan durante el primer día posterior a la emergencia del adulto. Este aumento inicial es esencial para que ocurra la maduración reproductiva. La JH actúa en varios tejidos, incluyendo los ovarios, el cuerpo graso y el intestino medio, volviéndolos competentes para desempeñar sus funciones específicas en los adultos¹³¹. Después del incremento inicial, el título de JH disminuye lentamente y, luego de la ingesta de sangre, el nivel de JH cae rápidamente alcanzado su punto más bajo luego de 24 horas¹³².

La exposición a IGRs, provoca una reducción de emergencia de adultos. Pero también parecen tener efectos secundarios, particularmente sobre la reproducción de las hembras, como lo indican estudios utilizando inhibidores de la síntesis de quitina y análogos de JH¹³³. Debido a que la regulación estricta del título de JH es crítica en los procesos de ovogénesis y vitelogénesis, es de interés conocer el efecto de la aplicación de un JHA en dosis subletales. Por otro lado *Ae. aegypti* es un mosquito doméstico cuyos sitios de reproducción (en su mayoría recipientes de almacenamiento de agua para consumo) experimentan frecuentes variaciones de

volumen de agua, lo que resulta en una disminución del efecto insecticida. En este sentido, los estudios detallados de los efectos de dosis subletales de IGRs sobre la viabilidad, fecundidad y fertilidad de los adultos son importantes.

En esta parte del trabajo se evaluó el efecto del pyriproxyfen sobre el desarrollo de las ovariolas, la fertilidad y fecundidad de *Ae. aegypti* sobrevivientes a un tratamiento con este compuesto desde larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto.

2.8.1. Medición del tamaño de ala de las hembras

La diferencia en la cantidad de reservas acumuladas durante la vida de las larvas afecta la maduración de los ovocitos en las hembras de los mosquitos¹³⁴. La fase previtelogénica de desarrollo es iniciada sólo cuando los nutrientes son adecuados⁴⁵.

En *Ae. aegypti* se ha observado que la síntesis de JH por la CA se reduce significativamente en las hembras con bajas reservas nutricionales (hembras de pequeño tamaño). Además, las hembras que nacen con altas reservas de nutrientes producen una mayor cantidad de huevos luego de la ingesta de sangre que las hembras con baja cantidad de reservas nutricionales^{135, 136}

En esta parte de la tesis se midió el tamaño del ala, indicador del tamaño corporal y por lo tanto del estado nutricional¹³⁷ de las hembras diseccionadas para realizar el conteo del número de ovariolas. Luego se realizó un análisis de correlación entre estas dos variables con la intención de separar el efecto del tratamiento del pyriproxyfen sobre la formación del ovario de un posible efecto del IGR sobre la nutrición y por consiguiente el tamaño de los adultos emergidos.

El análisis de correlación no encontró una relación estadísticamente significativa entre el número de ovariolas por hembra y el tamaño del ala, ni para el grupo control ($p = 0,32$; Coef. correlación = $0,23$; $R^2 = 5,5\%$), ni para el tratado con una concentración de pyriproxyfen que provoca un %IE₄₀ ($p = 0,96$; Coef. correlación = $0,01$; $R^2 = 0,01\%$) (Figuras 33A y 34A.). Tampoco se encontró correlación cuando se realizó el análisis dividiendo ambos grupos en hembras alimentadas y no alimentadas (Figuras 33B, 33C, 34B y 34C).

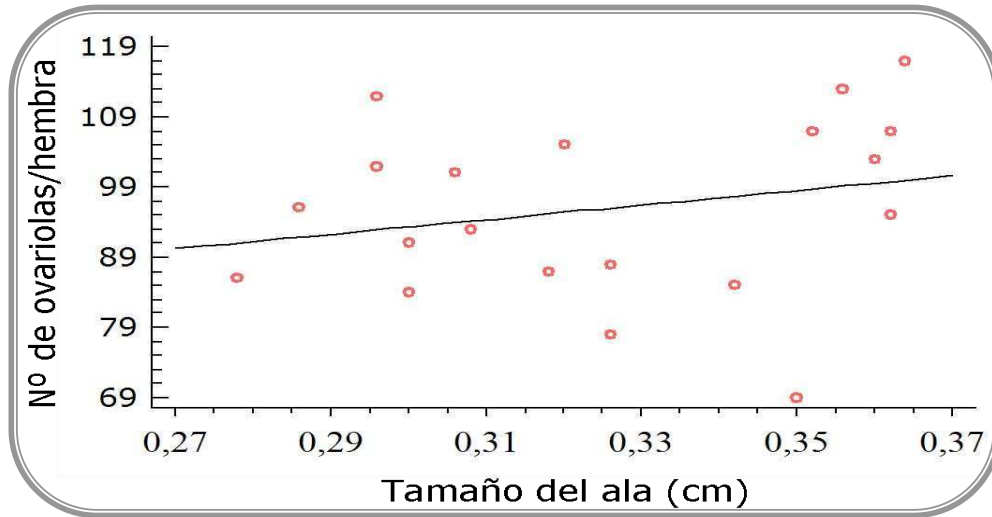


Figura 33A. Análisis de correlación entre el número de ovariolas por hembra y el tamaño del ala (cm) para las hembras control (N: 20). $p = 0,32$; Coef. correlación = 0,23; $R^2 = 5,5\%$

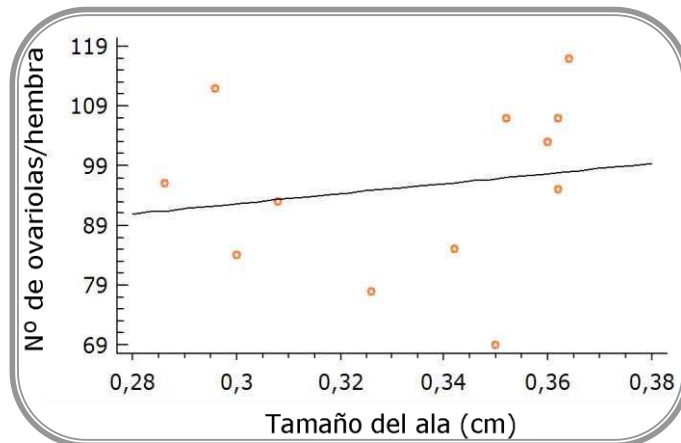


Figura 33B. Análisis de correlación entre el número de ovariolas/hembra y el tamaño del ala (cm) para las hembras control, no alimentadas (N: 12). $p = 0,60$; Coef. correlación = 0,17; $R^2 = 2,9\%$

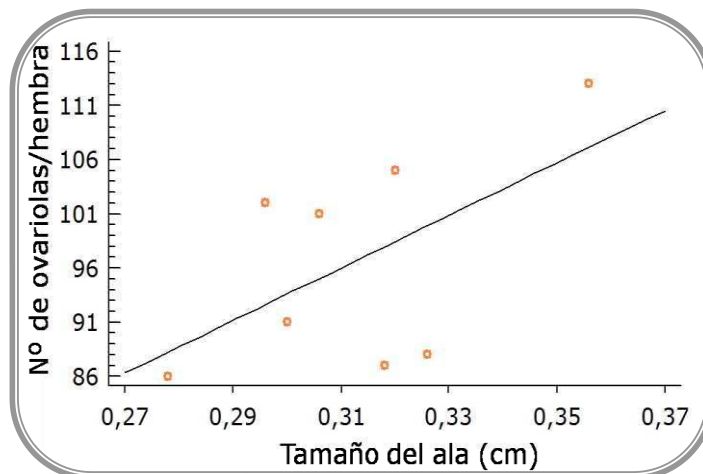


Figura 33C. Análisis de correlación entre el número de ovariolas/hembra y el tamaño del ala (cm) para las hembras control, alimentadas (N: 8). $p = 0,14$; Coef. correlación = 0,5; $R^2 = 32\%$

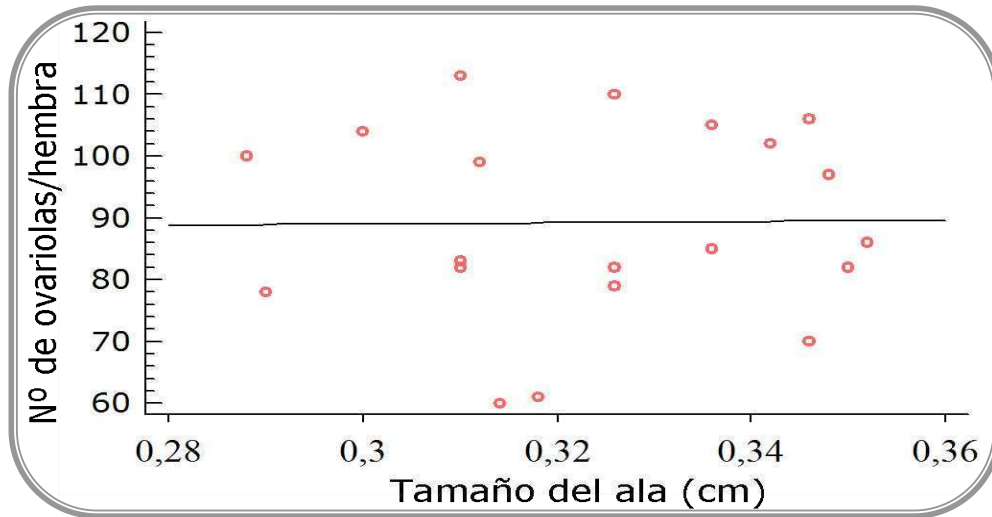


Figura 34A. Análisis de correlación entre el número de ovariolos por hembra y el tamaño del ala (cm) para las hembras tratadas con pyriproxyfen (N: 20). $p = 0,96$; Coef. correlación = 0,01; $R^2 = 0,01\%$

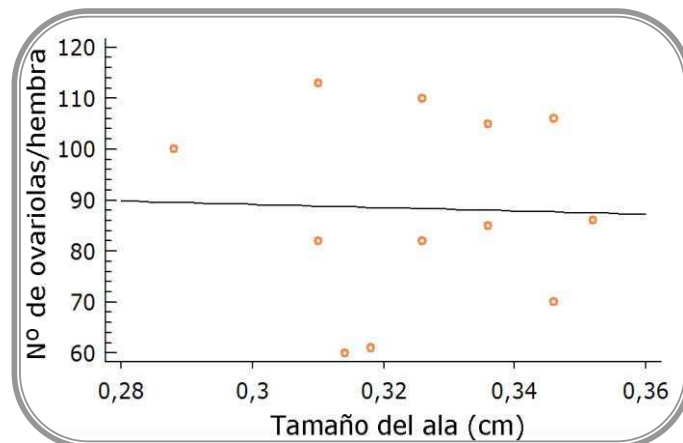


Figura 34B. Análisis de correlación entre el número de ovariolos/hembra y el tamaño del ala (cm) para las hembras tratadas, no alimentadas (N: 12). $p = 0,92$; Coef. correlación = -0,03; $R^2 = 0,09\%$

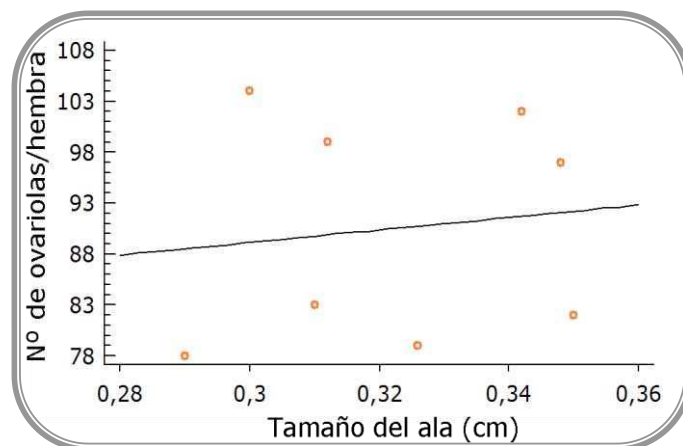


Figura 34C. Análisis de correlación entre el número de ovariolos/hembra y el tamaño del ala (cm) para las hembras tratadas, alimentadas (N: 8). $p = 0,76$; Coef. correlación = 0,13; $R^2 = 1,62\%$

Los resultados de Hernández-Martínez y cols¹³⁸ indican que las larvas criadas en condiciones de baja cantidad de nutrientes dan como resultado hembras de tamaño pequeño con un largo de ala de $0,25 \pm 0,05$ cm; mientras que aquellas criadas en condiciones de alta cantidad de nutrientes dan origen a hembras de tamaño grande que tienen un largo de ala de $0,34 \pm 0,06$ cm. Esto indica que las hembras utilizadas en este trabajo, tanto control como tratadas, tienen un tamaño de intermedio a grande ($0,33 \pm 0,03$ cm para los controles; y $0,32 \pm 0,02$ cm para las tratadas) no encontrándose diferencias significativas entre ambas (test t de Student, $t = 0,26$; $gl = 38$; $p > 0,05$).

Con esto se puede concluir que para los rangos utilizados en este trabajo, no existe una relación entre el número de ovariolas y el tamaño de las hembras, y por lo tanto los análisis del punto 2.8.2 pueden hacerse agrupando los datos obtenidos, sin la necesidad de utilizar rangos de tamaño de ala para analizar el número de ovariolas de las hembras.

2.8.2. Disección de las hembras de *Ae. aegypti* y recuento de ovariolas

Los resultados de la Figura 35 muestran el número de ovariolas por hembra registrados en individuos sobrevivientes al tratamiento desde larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto con una dosis subletal (IE_{40}) de pyriproxyfen liberado en humos.

No se encontraron diferencias en el número de ovariolas por hembra entre los grupos control y tratado, ya sea antes o después de que las hembras fueran alimentadas con sangre ($t = 0,79$; $df = 6$; $p > 0,05$; $t = 0,79$; $df = 6$; $p > 0,05$). Tampoco hubo diferencias dentro del grupo control entre las hembras no alimentadas y las alimentadas con sangre ($t = 0,01$; $df = 6$; $p > 0,05$), lo mismo ocurrió dentro del grupo de las hembras tratadas ($t = -0,22$; $df = 6$; $p > 0,05$).

Fournet y cols.¹³³ realizaron ensayos similares sobre *Ae. aegypti* utilizando dos IGRs pertenecientes al grupo de los inhibidores de la síntesis de quitina (OMS 2017 y diflubenzurón). Para ambos compuestos, el número de ovariolas (o folículos basales) mostró una gran variabilidad con el tratamiento resultando igual, menor o mayor que el control. Los resultados obtenidos llevaron a los autores a formular la hipótesis de que en los tratamientos que inducen una mortalidad alta, los individuos más débiles mueren y los sobrevivientes presentan un mayor número de ovariolas. Por otro lado, con una presión más baja del IGR inhibidor de la síntesis de quitina ($IE < 30$), el número de ovariolas disminuyó mostrando el efecto fisiológico de los

tratamientos. Sin embargo, los resultados obtenidos en dicho trabajo no siempre reflejaron esta hipótesis, además todas las hembras que sobrevivieron al tratamiento se diseccionaron en un mismo punto, ya sea 48 horas luego de la emergencia o 24 horas luego de la alimentación, por lo tanto estos ensayos serían independientes entre si y poco comparables. Por otro lado el modo de acción de estos IGRs es diferente al del pyriproxyfen.

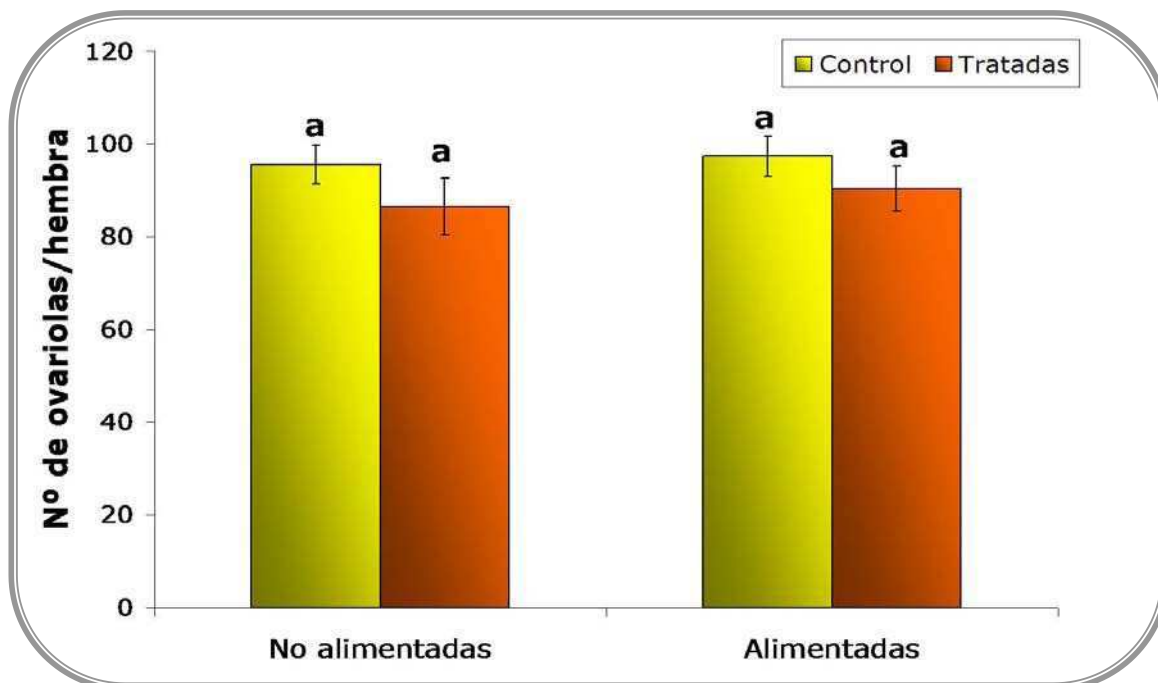


Figura 35. Número de ovariolos por hembra (\pm ES) de *Ae. aegypti* tratadas desde larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto con una concentración subletal de pyriproxyfen (IE_{40}). Se muestran hembras de 48 h de edad, no alimentadas y hembras diseccionadas 24h luego de la ingesta de sangre. Los valores seguidos por la misma letra no mostraron diferencias significativas (test de t de Student ($p < 0,05$) (N: 4))

En hembras de *Cx. pipiens* que sobrevivieron al tratamiento con dosis subletales de metoprene o diflubenzuron desde larvas, el número de folículos basales aumentó¹³⁹. Según los autores de este trabajo, estos tratamientos podrían inducir un estímulo antes o en el momento en que se determina el número de ovariolos. Los ovarios rudimentarios aparecen en las larvas del tercer estadio, la organización de las gónadas se hace evidente al inicio del cuarto estadio y las ovariolos solo se diferencian en la etapa de pupa. Posiblemente la aplicación de un IGR podría inducir la maduración de algunas ovariolos rudimentarias e inhibir otras. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis indicarían que el uso de pyriproxyfen, en la concentración subletal evaluada, no interferiría con el desarrollo de los discos imaginales que dan origen a las gónadas en las hembras de mosquitos de *Ae. aegypti*, o al menos no afectando la cantidad de las mismas.

2.9. Efecto de pastillas fumígenas con pyriproxyfen sobre la fertilidad y fecundidad de las hembras de *Ae. aegypti*

En *Ae. aegypti*³² y otros culícidos¹⁴⁰ se encontró que entre las 24 y 36 horas posteriores a la alimentación con sangre, el título y la biosíntesis de JH se reduce drásticamente. Este breve período de descenso en el título de JH inicia la vitelogénesis, permitiendo la liberación de la OEH y ecdisteroides.^{131, 141}

Por lo tanto, es de interés conocer el efecto de la aplicación de un JHA en el momento en que la JH no debería estar presente. Se ha demostrado que el tratamiento de larvas con dosis subletales de diferentes IGR produce efectos sobre la fecundidad (aumento o disminución del número de huevos puestos) y sobre la fertilidad (reducción del porcentaje de eclosión o de la viabilidad de los huevos)^{94, 133, 142}

En esta parte del trabajo se pretendió evaluar el efecto del pyriproxyfen sobre la fertilidad y fecundidad de las hembras de *Ae. aegypti* sobrevivientes a un tratamiento con este compuesto desde el estadio larval. Para esto se midió el número de huevos colocados por hembra y la diferencia porcentual de su eclosión con el grupo control. La Tabla V muestra el efecto sobre la fecundidad de las hembras sobrevivientes del punto 2.8, en comparación con las hembras control.

El número de huevos colocados por hembra fue significativamente mayor para el grupo control que para el tratado (test t de Student, $t = 7,71$; $df = 6$; $p \leq 0,05$). Además el porcentaje de diferencia en la eclosión de los huevos fue de alrededor del 20% siendo este valor significativamente distinto de cero (test t de Student para una sola muestra, $t = 10,9$; $df = 3$; $p \leq 0,05$).

Dosis	Nº huevos/hembra (\pm ES)		% Diferencia en Eclosión (\pm ES)
	Control	Tratados	
IE ₄₀ (N= 4)	77,4 \pm 1,4 ^a	33,7 \pm 5,5 ^b	23,4 \pm 2,2*

Tabla V. Número de huevos colocados por hembra tratadas desde larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto con una concentración subletal de pyriproxyfen (IE₄₀). También se muestra el % de diferencia en la eclosión de los huevos respecto al control. Letras diferentes indican diferencias significativas (test t de Student $p \leq 0,05$). * Difiere significativamente de cero (test de t de Student para una muestra $p \leq 0,05$) (N:4).

Estos resultados muestran que el pyriproxyfen tiene efectos sobre la fertilidad y fecundidad de las hembras sobrevivientes a un tratamiento desde larvas tardías del

tercer estadio o tempranas del cuarto con una dosis subletal de este compuesto. Ha sido demostrado que en hembras adultas expuestas durante 30 minutos a una superficie conteniendo pyriproxyfen en una dosis de 1 g/m² todavía pueden encontrarse restos de este compuesto luego de 5 o 6 días¹⁴³. Por lo tanto, el efecto sobre la fecundidad y fertilidad observado en este trabajo podría deberse a la presencia de pyriproxyfen, imitando la acción de la JH en un momento en que no debería estar presente, afectando la vitelogénesis o algún otro paso en la formación del huevo. Sin embargo, Braga y cols.⁷⁹ no encontraron diferencias entre el número de huevos colocados por hembras de *Ae. aegypti* que sobrevivieron a un tratamiento con metoprene (en dosis de IE₅₀ y IE₉₀) y las hembras control. Tampoco encontraron una reducción en la viabilidad de los huevos. Esta diferencia con los resultados encontrados en este trabajo puede deberse a que la estructura del metoprene es más lábil, muy similar a la de la JH y por lo tanto podría ser degradado más fácilmente, no encontrándose presente al momento de la vitelogénesis.

Por otro lado, cuando se trataron hembras de Dípteros y Lepidópteros con inhibidores de la síntesis de quitina^{144, 145} se encontró una reducción en el número de huevos colocados por hembra. Bellinato y cols.¹⁴⁶ trataron larvas tardías del tercer estadio con triflumurón, y encontraron un descenso en el número de huevos colocados por las hembras que eclosionaron respecto a las hembras control. El tratamiento con triflumurón también afectó la capacidad de las hembras sobrevivientes de alimentarse con sangre, tanto el número de hembras alimentadas como la cantidad de sangre ingerida se redujo en los individuos tratados con este insecticida. Los autores atribuyeron el descenso en el número de huevos colocados a la menor cantidad de sangre ingerida por las hembras. La ingesta podría estar afectada por una malformación en la cutícula de las hembras adultas causada por este tipo de IGR, que le otorgaría menor elasticidad a la hora de ingerir sangre. Vasuki¹⁴⁷ encontró los mismos resultados y arribó a la misma conclusión que Bellinato y cols. utilizando otro IGR perteneciente al grupo de los inhibidores de la síntesis de quitina, hexaflumurón, en dosis subletales sobre larvas tardías del cuarto estadio de tres especies de mosquitos, incluido *Ae. aegypti*. Si bien en esta tesis no se cuantificó la cantidad de sangre ingerida por las hembras, no sería de esperar que un compuesto que actúa como un JHA interfiriera con la elasticidad de la cutícula; aunque sería interesante evaluar este aspecto, así como también el

efecto del IGR sobre el desarrollo de las gónadas y la espermatogénesis en los machos.

3. Evaluación del efecto insecticida de la pastilla fumígena en campo

La metodología más utilizada para controlar el mosquito adulto durante los brotes de dengue, es el rociado espacial de insecticidas en formulados tipo ULV. Este tratamiento tiene un bajo o nulo efecto larvicida, tanto fuera como dentro de las viviendas y muchas veces ha resultado ser ineficaz en el control de las poblaciones de mosquitos adultos¹⁴⁸. Una de las razones de esta baja efectividad es el comportamiento de reposo de *Ae. aegypti*, que puede ser encontrado en los armarios, debajo de las camas, detrás de los muebles, y en espacios cerrados donde es difícil el ingreso de las gotas del insecticida nebulizado^{149, 150}. Otra dificultad que se presenta es lograr que los propietarios abran las puertas y ventanas de las casas durante el rociado para permitir el ingreso del aerosol.

Dado que la formulación líquida conteniendo permetrina y pyriproxyfen, desarrollada por nuestro laboratorio, ha mostrado una muy buena efectividad sobre las formas inmaduras y los adultos de *Ae. aegypti*⁷³, en esta parte de la tesis se evaluó la efectividad, en campo, de la formulación fumígena estudiada en el laboratorio durante la primera parte de la tesis. Esta experiencia tuvo como objetivo plantear una alternativa a las herramientas convencionales de control utilizadas en el interior de las viviendas y evaluar la aceptación, por parte de la comunidad, de la pastilla fumígena.

Según los resultados obtenidos en laboratorio utilizando la cámara tipo Peet Grady de 0,34 m³ y la máxima concentración de pyriproxyfen en la pastilla (2 g/kg) con la cual se obtuvo un 100% de IE, se estarían aplicando 0,001 g de pyriproxyfen por m³. Cuando se realizan evaluaciones de nuevos formulados en campo se suele utilizar una concentración diez veces mayor a la obtenida como óptima en laboratorio. Esto se basa en recomendaciones internacionales no disponibles en bibliografía de acceso público. Por lo tanto, en campo correspondería aplicar 0,01 g de pyriproxyfen por m³. Es por eso que la recomendación de uso del prototipo de pastilla evaluada durante esta tesis en campo fue una pastilla de 50 gr (con 2% de pyriproxyfen y 10% de permetrina, proporción 1:5) cada 75 m³.

3.1. Evaluación de la efectividad de los tratamientos por medio de bioensayos

Los resultados de la efectividad de los tratamientos realizados en campo pueden observarse en la Tabla VI. La mortalidad de los adultos en las jaulas centinela, tomada 24 horas luego del ensayo, fue mayor a 95% tanto en el tratamiento donde se utilizaron solo las pastillas fumígenas dentro de las viviendas (Área B), como en el tratamiento donde las mismas se combinaron con la aplicación ULV en exteriores (Área C). No se encontraron diferencias significativas entre estos dos tratamientos ($F = 0,81$; $gl = 18$; $p > 0,05$). En ésta misma tabla se puede ver que la IE fue de alrededor del 90% para los tratamientos en ambas áreas, no encontrándose diferencias significativas entre ellos ($F = 1,12$; $gl = 18$; $p > 0,05$).

Tratamiento	Mortalidad Adultos (% ± ES)	%IE (± ES)
Pastilla fumígena (Área B)	100 ± 0,001a	89,5 ± 2,4b
Pastilla fumígena + ULV (Área C)	95,5 ± 4,7a	92,6 ± 1,8b

Tabla VI. %IE y mortalidad de adultos (± ES) luego del tratamiento con la pastilla fumígena (Área B) o una combinación de la pastilla fumígena y rociado ULV en exteriores (Área C). La pastilla fumígena pesa 50 gr y contiene 2% de pyriproxyfen y 10% de permetrina. Letras iguales en la misma columna indica que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía $p > 0,05$).

3.2. Evaluación de la efectividad de los tratamientos por medio de índices entomológicos

Los resultados de la evaluación entomológica antes de la aplicación del tratamiento mostraron que, en las cuatro áreas estudiadas, los valores de índice de larvas y adultos eran muy elevados, lo cual es característico de esta zona de la Argentina.⁶⁸ Los valores del índice de adultos pueden observarse en la Figura 36. Antes de realizar los tratamientos, este índice alcanzaba valores de entre 3 y 5 adultos de *Ae. aegypti* por vivienda capturados durante 10 minutos de búsqueda. No se observaron diferencias significativas entre los valores pre-tratamiento de las cuatro áreas ($F = 2,38$; $gl = 96$; $p > 0,05$; $F = 0,66$; $gl = 96$; $p > 0,05$), lo que muestra que la población de mosquitos fue relativamente consistente a lo largo de

la región, facilitando la comparación de los tratamientos e indicando que no hubo diferencias en la eficiencia de captura de adultos entre los colectores.

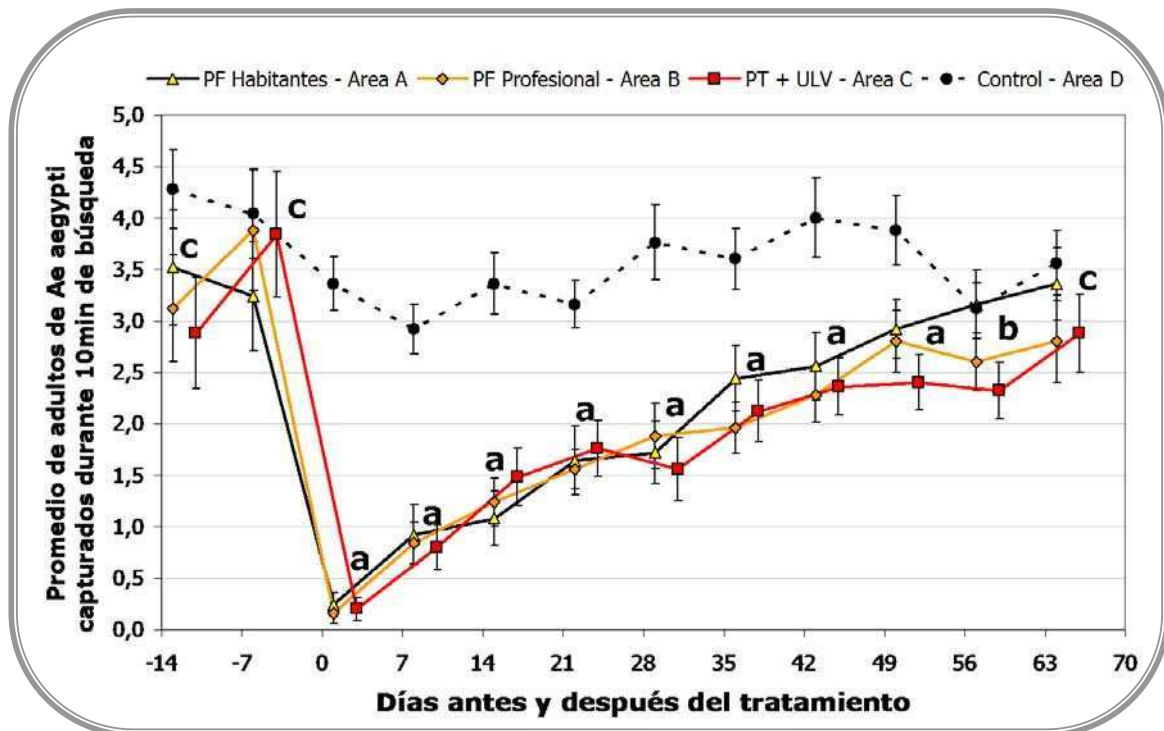


Figura 36. Índice de adultos (promedio de adultos capturados por casa durante 10 min de búsqueda por persona) para todas las zonas tratadas y el área de control. Día 0 indica el día en que se realizó la aplicación. PF: pastilla fumígena, **a.** el índice de adultos en el área tratada es significativamente diferente al de la zona control ($p \leq 0,05$), **b.** al menos un tratamiento es significativamente diferente de la zona de control (en este caso el tratamiento PF + ULV), **c.** no hay diferencias significativas entre las áreas ($p > 0,05$).

Inmediatamente después del tratamiento, el índice de adultos se redujo casi a cero en todas las áreas tratadas, incluyendo el área A, donde los residentes fueron los que aplicaron la pastilla fumígena. No hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$), y todos los valores fueron significativamente menores que el área de control ($F = 100,4$; $gl = 96$; $p \leq 0,05$). Luego de 8 semanas de aplicado el tratamiento, no se encontraron diferencias significativas entre el índice de adultos en las áreas A y B, tampoco entre éstas áreas y la zona control ($p > 0,05$). Sin embargo, el índice de adultos se mantuvo significativamente más bajo ($p \leq 0,05$) en el área C, donde se realizó el tratamiento combinado de pastilla fumígena en el interior de las viviendas y rociado ULV en el exterior. Esta diferencia entre las áreas A y B con el área C podría deberse a que el rociado ULV en exteriores contribuyó a bajar la población de los mosquitos adultos en el exterior de las viviendas y por lo tanto la reinfestación en el interior fue más lenta.

Nueve semanas después del tratamiento (aproximadamente 63 días), el valor del índice de adultos de todas las áreas tratadas alcanzó valores similares y no difirió significativamente del valor del área control ($F = 1,62$; $gl = 96$; $p > 0,05$).

En la Figura 37 se pueden observar los resultados del índice de Breteau. Los valores pre-tratamiento se encontraban entre 110 y 150 para las cuatro áreas. En las áreas A y B, el índice de Breteau muestra un ligero descenso desde 140 a 120, con una duración de solamente dos semanas después de las cuales los valores del índice en estas zonas se asemejan a los de la zona de control. Se trata de un resultado esperable dado que en las áreas A y B el tratamiento solo se realizó en el interior de las viviendas. En el área C, el índice de Breteau comenzó a descender alrededor de 2 semanas después del tratamiento, mostrando un valor mínimo de 96 a las 4 semanas después de la aplicación. Si bien este valor sigue siendo muy elevado, esto representaba una disminución de entre 30 y 40 en comparación con los valores pre-tratamiento y el control coincidiendo con resultados previos de nuestro laboratorio⁷³. Casi 8 semanas después del tratamiento en el área C los valores del índice de Breteau fueron similares a los de la zona de control.

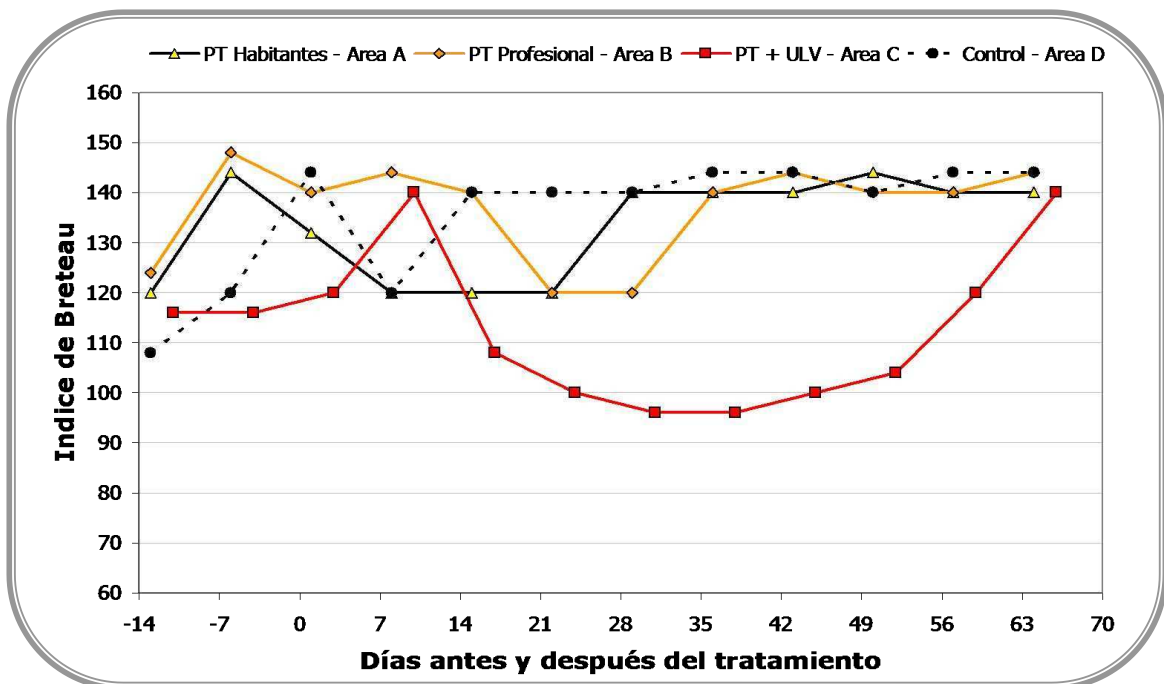


Figura 37. Abundancia de larvas medida como Índice de Breteau, para todas las áreas tratadas y el área de control. Día 0 indica el día en que se realizó la aplicación. PF: pastilla fumígena.

Los resultados de los puntos 3.1 y 3.2 muestran una buena penetración de los humos emitidos por la pastilla fumígena y su muy buena efectividad adulticida y larvicida. Su utilización podría representar una nueva alternativa para el control del mosquito *Ae. aegypti* en el interior de las viviendas. Asimismo una estrategia basada en la aplicación combinada de pastillas fumígenas en el interior de la vivienda con la formulación ULV en el exterior podría constituir una nueva y exitosa alternativa para controlar las poblaciones de esta especie durante los brotes epidémicos de dengue.

3.3. Participación de la comunidad

Los programas de control del mosquito vector del dengue basados en la participación de la comunidad han sido definidos como "*cualquier intervención en la que al menos un componente está dirigido a la comunidad*" (reuniones educativas, la participación de líderes locales, cubrir aquellos recipientes útiles que podrían funcionar como criaderos o eliminar aquellos que ya no se usan, etc.)¹⁵¹. Sin embargo, hay pocas referencias de la participación activa de la comunidad utilizando herramientas no profesionales de control químico de mosquitos, salvo algunas experiencias recientes en México y Venezuela¹⁵² con cortinas y tapas para contenedores de agua tratadas con insecticidas. Para el control del mosquito vector de la malaria se utilizan mosquiteros impregnados con insecticidas con la participación de la comunidad¹⁵³, también se utilizaron en algunos ensayos para el control de la vinchuca, vector de la enfermedad de Chagas¹⁵⁴. En esta parte de la tesis se hizo una primera evaluación acerca de la aceptación de la pastilla fumígena como herramienta de control aplicada por la propia comunidad de Puerto Libertad (Misiones)

En la Figura 38 se muestran los resultados de las percepciones y prácticas de la comunidad respecto de la aplicación de la pastilla fumígena como método de control de *Ae. aegypti*. Sólo el 16% de las personas que viven en el área A asistieron al taller de formación organizado durante la segunda etapa o etapa de comunicación (Figura 38A). A pesar de esta baja asistencia, cuando se les preguntó acerca de "cómo se sienten con respecto al dengue", en una escala del 1 al 10 en la cual 1 significa que no le preocupa en absoluto y 10 es que están muy preocupados, el 88% de la gente respondió dando un valor de 10. Entre los que no asistieron al taller, el 57% no lo hizo por impedimentos personales (trabajo,

enfermedad, no tengo tiempo, etc.), el 26% no se enteró del taller, y el 16% no mostró interés en participar.

Por otro lado, el 81% de las personas a las que les fue entregada la pastilla la aplicaron (Figura 38B). Entre los que no lo hicieron, el 47% no lo hizo porque no pudo organizar la aplicación (no tuvo tiempo, no pudo salir de la casa, etc.), el 39% no quiso aplicar la pastilla, y el 14% no la recibió. A aquellas personas que aplicaron la pastilla se les preguntó su percepción acerca de la facilidad de la aplicación, en una escala de 1 a 10 donde 1 es muy difícil y 10 muy fácil, el 82% de las personas respondió dando un valor de 10 (promedio = 9,43).

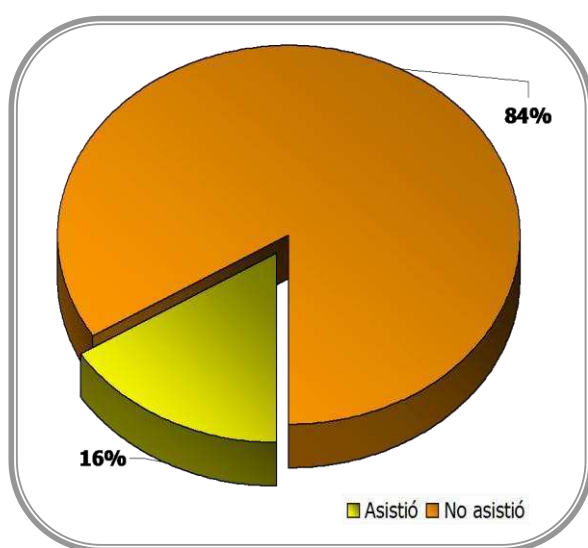


Figura 38A. Resultados de la encuesta. Porcentaje de jefes/jefas de hogar del área A que asistieron/no asistieron al taller de formación.

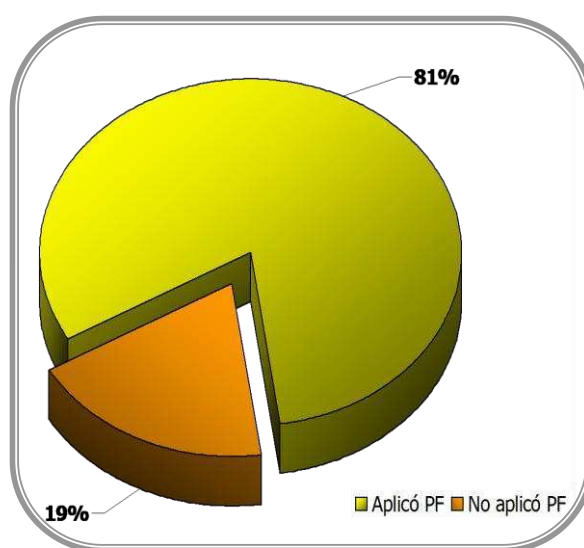


Figura 38B. Resultados de la encuesta. Porcentaje de viviendas que aplicaron/no aplicaron la pastilla fumígena.

También se les preguntó sobre los resultados obtenidos luego de la aplicación de la pastilla fumígena, en una escala de 1 a 10, en la cual 1 significa que los resultados fueron malos y 10 que fueron excelentes, la media de todas las respuestas fue 7,08. Por otro lado, el 80% de los residentes que aplicó la pastilla lo hizo durante la misma semana en que se realizó la aplicación profesional, como se les había solicitado.

La Figura 39 muestra la preferencia de los residentes respecto a quién debería aplicar la pastilla fumígena, los resultados muestran que el 80% de los encuestados prefiere aplicarla ellos mismos.

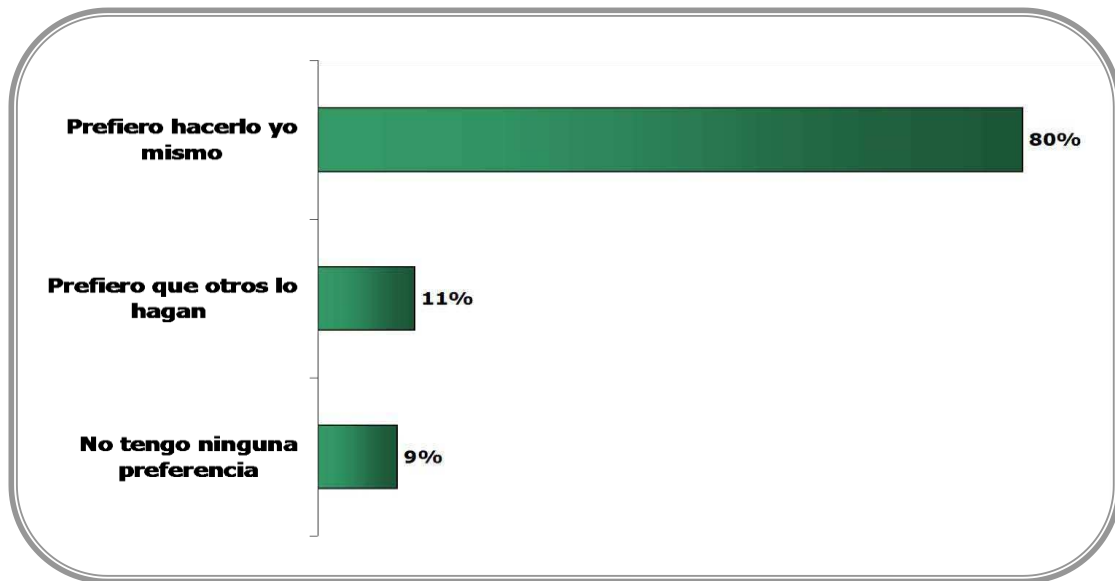


Figura 39. Preferencia de los residentes del área A respecto de quién debería aplicar la pastilla fumígena.

Para que un programa de control del *Ae. aegypti* sea sostenible en el tiempo requiere la participación de la comunidad. Como se ha indicado en varios trabajos^{155, 156}, las estrategias de participación comunitaria en áreas urbanas son difíciles de mantener debido a que la comunidad a menudo carece de cohesión y no mantiene los esfuerzos de control. Por otro lado, las campañas educativas presentan resultados diferentes en cuanto a la reducción de los índices entomológicos, mientras que algunos estudios muestran que las mismas tienen efectos limitados^{157, 158}, otros encontraron un descenso de estos índices¹⁵⁵.

Los resultados del ensayo de campo muestran que el 88% de los residentes de Puerto Libertad estaban muy preocupados por contraer dengue. Sin embargo, es evidente que no se tuvo en cuenta el taller de capacitación como parte de un programa de participación comunitaria, ya que sólo el 16% de los residentes asistió. Por otro lado, la pastilla fumígena fue ampliamente aceptada; el 81% de los residentes que la recibieron la aplicó, y los índices entomológicos mostraron que tuvo la misma efectividad cuando fue aplicada por la comunidad que cuando lo hizo el personal del Programa Nacional de Control de Vectores. Es interesante destacar que los residentes que no aplicaron la pastilla fumígena (19%) tampoco asistieron al taller de capacitación.

Aunque el 80% de los residentes prefieren aplicar la pastilla fumígena ellos mismos, la mayoría dijo que la capacitación previa es fundamental, aunque esto se

contradice con el hecho de que solo unas pocas personas asistieron al taller de capacitación correspondiente. Casi todos los habitantes consideraron que la pastilla fumígena es de fácil aplicación, lo que se corresponde con los resultados entomológicos obtenidos, particularmente con el índice de adultos.

Esta parte de la tesis demuestra que la comunidad es capaz de participar en un programa de control de los mosquitos a través del uso de herramientas de control de uso no profesional, como la pastilla fumígena. Por otro lado, habría que buscar aproximaciones alternativas a los talleres de capacitación, ya que no toda la comunidad está dispuesta o tiene tiempo disponible para asistir.

Por lo tanto, en una ciudad como Puerto Libertad, los resultados de esta tesis sugieren que, una estrategia de control que les otorgue a los habitantes una herramienta no profesional de control químico es preferible a una estrategia basada exclusivamente en programas de comunicación orientados a promover cambios culturales.

Conclusiones

Durante el desarrollo de esta tesis se estudió la estabilidad térmica de los insecticidas pyriproxyfen, permetrina y *cis*-permetrina solos o combinados como parte de una formulación fumígena. Asimismo se evaluaron los efectos letales y subletales de estos ingredientes activos sobre las formas inmaduras y los adultos del mosquito *Ae. aegypti*.

A partir del estudio de la estabilidad térmica de los ingredientes activos antes mencionados, se elaboró una mezcla fumígena en forma de pastilla conteniendo KClO₃, dextrina, talco y cianoguanidina. Al ser encendida, la pastilla produjo una combustión sin llama y permitió la liberación de los ingredientes activos en los humos. El porcentaje de recuperación de la permetrina o la *cis*-permetrina en los humos fue de aproximadamente un 50%, tanto en pastillas que contenían solo uno de estos piretroides como en las que contenían además pyriproxyfen. Este valor de recuperación de los piretroides coincide con trabajos previos de nuestro laboratorio^{67, 78}. Por otro lado, se recuperó alrededor del 95% del pyriproxyfen presente en los humos, tanto cuando se encontraba solo en la mezcla fumígena o junto con *cis*-permetrina. Sin embargo cuando se incorporó permetrina (la cual fue adsorbida en talco por encontrarse en estado de líquido viscoso a temperatura ambiente) la recuperación del IGR en los humos fue más baja, con valores cercanos al 80%. Este descenso en la recuperación del pyriproxyfen podría estar dado por la presencia del isomero *trans* de la permetrina, cuyos productos de descomposición podrían dar lugar a moléculas o radicales libres que causen una mayor descomposición del IGR.

El pyriproxyfen liberado en los humos de la formulación fumígena mostró una gran efectividad sobre las larvas de *Ae. aegypti*. Cuando se utilizaron larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto, que son las recomendadas para evaluar la efectividad de los IGR¹⁵⁹, se obtuvieron valores de IE de casi 100%, con una concentración de pyriproxyfen en la pastilla de solo 0,2 g/kg y un tiempo de exposición a los humos de 30 minutos. Por otro lado, utilizando una concentración del IGR en la pastilla diez veces mayor (2 g/kg) pudo obtenerse un valor de IE de más del 90% con solo 5 minutos de exposición a los humos.

La vía de ingreso del pyriproxyfen liberado en los humos de la formulación fumígena es a través de su ingestión o contacto directo de los individuos tratados con el larvicida y no por su inhalación en los humos. Este resultado coincidió con el

hecho de que este insecticida es altamente hidrofóbico, característica que favorece el efecto larvicida por contacto⁹¹.

Cuando se combinó el pyriproxyfen con un piretroide, ya sea permetrina o *cis*-permetrina, los valores de IE fueron similares a los obtenidos cuando el IGR se encontraba solo en la mezcla fumígena. Es decir que la concentración de los piretroides utilizada (1 g/kg) no produjo una mortalidad adicional de los individuos tratados desde larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto. Esto sugiere que los piretroides fueron aplicados en una dosis subletal para las larvas tratadas.

Durante la evaluación del efecto del pyriproxyfen sobre las larvas de *Ae. aegypti* se observaron una serie de malformaciones en el desarrollo de los individuos tratados, como por ejemplo: pupas que no mudaron o lo hicieron de forma defectuosa, adultos parcialmente emergidos o unidos a la exuvia de la pupa, adultos emergidos con deformaciones en el aparato bucal, en las patas y/o las alas. Estas malformaciones en el desarrollo han sido observadas en varios trabajos tanto cuando se utilizaron IGRs pertenecientes al grupo de los inhibidores de síntesis de quitina como al de los análogos de hormona juvenil^{79, 94-97}.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la mayor parte de las larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto tratadas con pyriproxyfen liberado en los humos de la pastilla fumígena, mueren en el estadio de pupa, principalmente como pupas melanizadas. Esto coincide con los datos obtenidos en otros trabajos sobre *Ae. aegypti* y otros Culícidos^{79, 96, 97}. Por otro lado, cuando la concentración de pyriproxyfen en la pastilla fumígena fue baja se observó que un mayor número de individuos alcanzó el estadio adulto y murió luego. Cuando la cantidad del IGR fue más elevada, una mayor cantidad de individuos murió como pupa blanca o no melanizada. La aplicación de pyriproxyfen en las larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto podría haber afectado la expresión de genes vinculados con la metamorfosis de larva a pupa o de pupa hacia adulto, e inhibiendo el desarrollo de los discos imaginales. Así, al momento de producirse el pico de ecdisona que marca la metamorfosis hacia pupa o adulto, la muda se produciría de manera incompleta o defectuosa, provocando la muerte del individuo.

Además del efecto sobre la mortalidad, la aplicación de los IGR pertenecientes al grupo de los JHA puede prolongar la duración de los diferentes estadios inmaduros del ciclo de vida de los individuos tratados^{79, 97}. En esta tesis se encontró que la aplicación de pyriproxyfen liberado en los humos de la pastilla fumígena produjo un

retraso de dos días en la formación de las pupas respecto al grupo control. Sin embargo no provocó el mismo efecto en el pasaje del estadio de pupa a la emergencia del adulto.

El estadio de L₄ resultó ser el más susceptible al pyriproxyfen, coincidiendo con el trabajo realizado por Lan y Grier¹⁰³ utilizando metoprene. La mayor sensibilidad de las L₄ podría estar dada por la presencia de un JHA en un período en que los niveles de la JH endógena comienzan a descender para permitir la muda hacia el estadio de pupa. Las L₂ mostraron una aparente tolerancia al pyriproxyfen en comparación con el resto de los estadios larvales. Este hecho podría deberse a la exposición al insecticida en un momento del ciclo de vida de los mosquitos en que no produce efecto, induciendo a las enzimas que participan en el metabolismo de xenóbioticos e incrementando su degradación. Fenómenos similares han sido observados para otros insecticidas^{110, 111}. Otra posible explicación para la diferencia de susceptibilidad observada en los estadios larvales podría ser una disminución de la biodisponibilidad del pyriproxyfen a medida que transcurre el tiempo. Esto se podría deber a una interacción de las partículas del IGR dispersadas en los humos con las paredes del recipiente plástico donde se encuentran las larvas, cuya consecuencia sería que la concentración del insecticida en el momento en que las L₂ o las L₃ alcanzan el estadio de L₄, donde este larvicida ejerce su acción, sería insuficiente para producir el efecto deseado.

La mortalidad para todos los estadios larvales evaluados, excepto el de L₁, se produjo principalmente en el estadio de pupa o adulto dependiendo del tiempo de exposición a los humos. El 20% de las L₁ murió como larva y la IE fue superior a la de las L₂. Esto indicaría que las L₁ son más sensibles, probablemente debido a que la cutícula aún no se encuentra del todo formada, hecho que favorecería el ingreso del pyriproxyfen¹¹²⁻¹¹⁴. En estas circunstancias, el insecticida podría actuar a través de un modo de acción secundario produciendo la mortalidad de las L₁ durante las primeras horas posteriores al tratamiento.

El agregado de un piretroide a la mezcla fumígena con pyriproxyfen mostró una muy buena efectividad sobre los adultos de *Ae. aegypti* con un TV₅₀ de entre 15 y 20 minutos, siendo más efectiva la pastilla conteniendo el isómero *cis* de la permetrina que aquella que contenía la mezcla de isómeros. Estos resultados coinciden con trabajos previos que demostraron que el isómero *cis* de la permetrina es más efectivo sobre los adultos de esta especie de mosquito¹¹⁵.

Muy pocos trabajos han evaluado el efecto de insecticidas sobre los huevos de mosquitos. En el presente trabajo, cuando se evaluó el efecto del pyriproxyfen liberado en los humos de la pastilla fumígena sobre los huevos de *Ae. aegypti*, no se manifestó actividad ovicida ni por inmersión ni cuando fueron depositados sobre una superficie tratada con este IGR.

La baja permeabilidad de los huevos de *Ae. aegypti* podría explicar la falta de efecto ovicida del pyriproxyfen por inmersión. Se ha demostrado que entre las 11 y las 13 horas luego de la oviposición, momento en que se forma la cutícula serosa en el embrión, los huevos desarrollan la máxima resistencia a la pérdida o ingreso de agua^{26, 80}. Entonces sería probable que tampoco ingresen moléculas de mayor tamaño como insecticidas. Los JHA son más eficaces durante la fase inicial de la embriogénesis interrumpiendo el desarrollo del embrión cuando son aplicados en huevos recién colocados o jóvenes¹²⁰. Sin embargo en esta tesis tampoco se observó efecto ovicida cuando las hembras colocan los huevos en una superficie donde se depositaron los humos conteniendo pyriproxyfen. Esto puede deberse a que el pyriproxyfen podría no solubilizarse en el agua que se encuentra sobre el algodón utilizado para la oviposición y por lo tanto no quedaría biodisponible para producir un efecto ovicida. Por otro lado, la concentración y el tiempo de exposición a humos utilizados en esta tesis podrían ser insuficientes para producir un efecto sobre la eclosión de los huevos de esta especie de mosquito.

Cuando se utilizan IGRs, tanto los pertenecientes al grupo de los JHA como los inhibidores de la síntesis de quitina, se observa como resultado una reducción de la emergencia de adultos. También, parecen tener efectos secundarios sobre la reproducción de las hembras, particularmente sobre la fecundidad (aumento o disminución del número de huevos puestos) y sobre la fertilidad (reducción del porcentaje de eclosión o de la viabilidad de los huevos)^{94, 133, 142}. En esta tesis, las hembras sobrevivientes a un tratamiento con pyriproxyfen desde larvas tardías del tercer estadio o tempranas del cuarto depositaron menos huevos que el respectivo control. Sin embargo, no se encontraron diferencias en el número de ovariolas por hembra entre el grupo control y el tratado, tanto en las hembras que habían sido alimentadas con sangre como en aquellas que no lo fueron. Estos resultados indicarían que el uso de pyriproxyfen, en la concentración subletal evaluada, no interferiría con el desarrollo de los discos imaginales que dan origen a las gónadas en las hembras de mosquitos de *Ae. aegypti*, ni con otro proceso de formación de

las ovariolas, pero alterarían el proceso de formación de los huevos. Además, la eclosión de los huevos colocados por las hembras sobrevivientes al tratamiento fue un 20% menor que en el grupo control. Estos resultados indican que el pyriproxyfen disminuye la fertilidad y fecundidad de las hembras sobrevivientes a un tratamiento desde larvas con una dosis subletal.

Ae. aegypti es un mosquito doméstico cuyos sitios de reproducción (en su mayoría recipientes de almacenamiento de agua para consumo) experimentan frecuentes variaciones de volumen de agua, resultando en una disminución del efecto insecticida. El hecho de que el pyriproxyfen disminuya la fertilidad y fecundidad de las hembras que emergen de un recipiente conteniendo dosis subletales es altamente relevante dado que, aunque no cause la mortalidad de los individuos tratados, podría producir un descenso en la población del vector a través de sus efectos subletales sobre el adulto.

La metodología más utilizada para controlar el mosquito adulto durante los brotes de dengue es el rociado espacial de insecticidas en formulados de tipo ULV. Este tratamiento tiene un bajo o nulo efecto larvicida, tanto fuera como dentro de las viviendas y muchas veces ha resultado ser ineficaz en el control de las poblaciones de mosquitos adultos¹⁴⁸. Una de las razones de esta baja efectividad es el comportamiento de reposo de *Ae. aegypti*, que puede ser encontrado en los armarios, debajo de las camas, detrás de los muebles y en espacios cerrados donde es difícil el ingreso de las gotas del insecticida nebulizado^{149, 150}. La aplicación del formulado fumígeno con pyriproxyfen y permetrina estudiado en esta tesis en condiciones de laboratorio podría funcionar como una alternativa a las herramientas convencionales de control utilizadas en el interior de las viviendas. Por esto se decidió probar en un ensayo de campo su efectividad sobre las larvas y los adultos de *Ae. aegypti* junto con una evaluación de la aceptación, por parte de la comunidad, de esta herramienta de control.

El ensayo de campo se realizó en Puerto Libertad, Misiones. La pastilla fumígena conteniendo permetrina y pyriproxyfen se aplicó en el interior de las viviendas produciendo una mortalidad de los adultos del 95% y una IE de alrededor del 90%. El índice de adultos se redujo casi a cero inmediatamente después del tratamiento, tanto en el área donde la aplicación la realizó la comunidad como en la de aplicación profesional, indicando que la pastilla es de fácil aplicación y que la comunidad está dispuesta a aplicarla. Esto coincidió con el hecho de que el 81% de las personas que recibieron la pastilla la aplicó y cuando se les preguntó acerca de

la facilidad de la aplicación, en una escala de 1 a 10 donde 1 es muy difícil y 10 muy fácil, el 82% de las personas respondió dando un valor de 10 (promedio = 9,43).

Por otro lado, solo el 16% de las personas asistió al taller de formación que incluyó en su temática: características de la enfermedad del dengue, el control del mosquito vector y las correspondientes medidas de seguridad e instrucciones de encendido para la aplicación de la pastilla fumígena. Esto se encuentra en contraposición con el hecho de que el 80% de los encuestados valora la posibilidad de aplicar ellos mismos la pastilla fumígena destacando que la capacitación previa es fundamental.

Los resultados de esta tesis muestran una muy buena efectividad del pyriproxyfen y la permetrina liberados en los humos de la pastilla fumígena sobre los estadios inmaduros y el adulto del mosquito *Ae. aegypti*, tanto en condiciones de laboratorio como en campo. La utilización de esta nueva formulación podría representar una nueva alternativa de control del mosquito en el interior de las viviendas con un modo de acción más selectivo que los productos actualmente en uso. Además, se demuestra que la comunidad es capaz de participar en un programa de control de los mosquitos a través de la aplicación de herramientas de control de uso no profesional, como la pastilla fumígena. Sin embargo, a pesar de que la capacitación previa en la utilización de dicha herramienta es fundamental, habría que buscar aproximaciones alternativas a los talleres de capacitación, ya que no toda la comunidad está dispuesta o tiene tiempo disponible para asistir.

Bibliografía

Bibliografía

- 1. Reinert J.F., Ralph E., Harbach H. y Kitching I.J., 2004.** Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zool. J. Linn. Soc.* 142: 289–368.
- 2. Polaszek A., 2006.** Two words colliding: resistance to changes in the scientific names of animals -Aedes vs Stegomyia. *Trends. Parasitol.* 22(1): 8-9.
- 3. Nelson M.J., 1986.** *Aedes aegypti*: Biología y Ecología. OPS. Washington, D.C.
- 4. OPS, 1995.** Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: Guías para su prevención y control. Organización Panamericana de la Salud (OPS) - Publicación Científica N° 548.
- 5. Carcavallo R.U. y Martínez A., 1968.** Fiebre amarilla, vectores y cadena epidemiológica. En: RU Carcavallo, A Martínez, *Comunicaciones Científicas - Entomoepidemiología de la República Argentina*, N° 13, Tomo I, Investigaciones Científicas de las Fuerzas Armadas. Argentinas, Argentina, 105-144.
- 6. Bejarano J.F.R., 1979.** Estudio sobre la fiebre amarilla selvática en la República Argentina, Subsecretaria de Medicina Sanitaria, República Argentina, 38 pp.
- 7. Curto S.I., Boffi R., Carbajo A.E., Plastina R. y Schweigmann N., 2002.** Reinfestación del territorio argentino por *Aedes aegypti*. Distribución geográfica (1994-1999). En Salomón O.D., *Actualizaciones en Artropodología Sanitaria Argentina*, Fundación Mundo Sano, Buenos Aires, 127-137.
- 8. Campos R.E., 1993.** Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. (Diptera: Culicidae) en la localidad de Quilmes (Buenos Aires, Argentina). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 52: 36.
- 9. Junín B., Grandinetti H., Marconi J.M. y Carcavallo R.U., 1995.** Vigilancia de *Aedes aegypti* (L) en la ciudad de Buenos Aires (Argentina). *Entomol. Vect.* 2: 71-75.
- 10. Boffi R., 2002.** Erradicación y reinfestación por el *Aedes aegypti* en la Republica Argentina. Tesis para optar por el título de Magíster en Control de plagas y su impacto ambiental, Universidad de San Martin, UNSAM.
- 11. Domínguez C. y Lagos S., 2001.** Presencia de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en la provincia de Mendoza, Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 60: 79-80.

- 12. Rossi G.C., Lestani E.A. y D'Oria J.M., 2006.** Nuevos registros y distribución de mosquitos de la Argentina (Diptera: Culicidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 65: 51-56.
- 13. Vezzani D. y Carbajo A.E., 2008.** *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 103(1): 66-74.
- 14. Troyes Rivera L., Villegas B.Z. y Troyes R.M., 2006.** Expansión del *Aedes aegypti* a localidades rurales de Cajamarca. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública* 23(3): 163-167.
- 15. Morales A., 1981.** *Aedes aegypti* en zona rural del municipio de La Mesa (Cundinamarca) Colombia. *Biomedica (Colombia)* 1(4): 223-223.
- 16. Sandoval M., Rea M., Gené C., Boda E. y Mosqueda L., 2009.** Hallazgo de *Aedes aegypti* Linneus 1762, en una zona rural de Iratí (Corrientes, Argentina). VI Jornadas Regionales de mosquitos, Corrientes, Argentina. Poster N° 29, página 39 del libro de resúmenes.
- 17. Micieli M.V. y Campos R.E., 2003.** Oviposition activity and seasonal pattern of a population of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in Subtropical Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98: 659-663.
- 18. Campos R.E. y Macia A., 1996.** Observaciones biológicas de una población natural de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 55: 67-72.
- 19. Domínguez C., Ludueña Almeida F.F. y Almirón W.R., 2000.** Dinámica poblacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Córdoba Capital. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 59: 41-50.
- 20. Vezzani D., Velázquez S.M. y Schweigmann N., 2004.** Seasonal pattern of abundance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Buenos Aires City, Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99: 351-356.
- 21. Stein M., Oria G.I., Almirón W.R. y Willener J.A., 2005.** Seasonal fluctuation of *Aedes aegypti* in Chaco Province, Argentina. *Rev. Saude Publica* 39: 559-564.
- 22. Micieli M.V., García J.J., Achinelly M.F. y Martí G.A., 2006.** Dinámica poblacional de los estadios inmaduros del vector del dengue *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): un estudio longitudinal (1996-2000). *Rev. Biol. Trop.* 54: 979-983.

- 23. Nation J.L., 2001.** Insect physiology and biochemistry. CRC Press (editorial), Boca Ratón, Florida, USA.
- 24. Christophers S.R., 1960.** *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito, Cambridge University Press, Cambridge.
- 25. Oberlander H., 1985.** The imaginal discs. En: Kerkut G.A y Gilbert L.I. (Eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol 2, Pergamon Press, Oxford, England, 151-182.
- 26. Clements A.N., 1992.** The biology of mosquitoes. Development, nutrition, and reproduction, vol. 1. Chapman & Hall, New York, USA.
- 27. Williams C.M., 1947.** Physiology of insect diapause. II. Interactions between the pupal brain and prothoracic glands in the metamorphosis of the giant silkworm *Platysamia cecropia*. *Biol. Bull. Woods Hole* 93: 86-98.
- 28. Roundtree D.B. y Bollenbacher W.E., 1986.** The release of prothoracicotropic hormone in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, is controlled intrinsically by juvenile hormone. *J. Exp. Biol.* 120: 41-48.
- 29. Wigglesworth V.B., 1978.** Fisiología de los insectos. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- 30. Nijhout H.F., 1984.** Abdominal stretch reception in *Dipetalogaster maximus* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Insect. Physiol.* 30: 629-633.
- 31. Smith S.L., 1985.** Regulation of ecdysteroid titer: synthesis. En: Kerkut G.A. y Gilbert L.I. (Eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* Vol. 7: Endocrinology I, Pergamon Press, Oxford, England, 295-341.
- 32. Baker F.C., Hagedorn H.H., Scholey D.A. y Wheelock G., 1983.** Mosquito juvenile hormone identification and bioassay activity. *J. Insect Physiol.* 29: 465-470.
- 33. Borovsky D. y Carlson D.A., 1992.** In vitro assay for the biosynthesis and metabolism of juvenile hormone by exposed corpora allata of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 29: 318-324.
- 34. Hammock B.D., 1985.** Regulation of juvenile hormone titer: degradation. En: Kerkut G.A. y Gilbert L.I. (Eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* Vol. 7: Endocrinology I, Pergamon Press, Oxford, England, 431-472.
- 35. Gilbert L.I., Rybczynski R. y Warren J.T., 2002.** Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Ann. Rev. Entomol.* 47: 883-916.

- 36. Riddiford L.M. y Truman J.W., 1978.** Biochemistry of insect hormones and insect growth regulators. En *Biochemistry of Insects*, ed. Rockstein, Academic Press, New York, USA, 307-357.
- 37. Goodman W.G. y Granger N.A., 2005.** The juvenile hormones. En: Gilbert L.I., Iatrou K. y Gill S.S. (Eds.), *Comprehensive molecular insect science*. Amsterdam, Alemania, Elsevier, 319-408.
- 38. Truman J.W., 1985.** Hormonal control of ecdysis. En: Kerkut G.A. y Gilbert L.I. (Eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* Vol 8: Endocrinology II, Pergamon, Oxford, England, 413-440.
- 39. Snodgrass R.E., 1959.** The anatomical life of the mosquito. Smithsonian Miscellaneous Collections, Washington. 139(8).
- 40. Horsfall W.R. y Ronquillo M.C., 1970.** Genesis of the reproductive system of mosquitos. II. Male of *Aedes stimulans* (Walker). *J. Morphol.* 131: 329-357.
- 41. Troy S., Anderson W.A. y Spielman A., 1975.** Lipid content of maturing ovaries of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Comp. Biochem. Physiol* 50: 457-461.
- 42. Lin Y., Hamblin M.T. y Edwards M.J., 1993.** Structure, expression and hormonal control of genes from the mosquito, *Aedes aegypti*, which encode proteins similar to the vitelline membrane proteins of *Drosophila melanogaster*. *Develop. Biology* 155: 558-568.
- 43. Mathew G. y Rai K.S., 1975.** Structure and formation of egg membranes in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Int. J. Insect. Morphol. Embryol.* 4: 369-380.
- 44. Powell J.R., Hollander A.L. y Fuchs M.S., 1988.** Development of *Aedes aegypti* chorion: proteins and ultrastructure. *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* 13: 39-54.
- 45. Racioppi J.V., Gemmill R.M. y Kogan P.H., 1986.** Expression and regulation of vitellogenin messenger RNA in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect. Biochem.* 16: 255-262.
- 46. Gwadz R.W. y Spielman A., 1973.** Corpus allatum control of ovarian development in *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 19: 1441-1448.
- 47. Lea A.O., 1970.** Endocrinology of egg maturation in autogenous and anautogenous *Aedes taeniorhynchus*. *J. Insect. Physiol.* 16: 1689-1696.
- 48. Steel C.G.H. y Davey K.G., 1985.** Integration in the insect endocrine system. En: Kerkut G.A. y Gilbert L.I. (Eds) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol 8 Endocrinology II, Pergamon Press, Oxford, England, 1-36.

- 49. Shapiro J.P. y Hagedorn H.H., 1982.** Juvenile hormone and the development of ovarian responsiveness to a brain hormone in the mosquito *Aedes aegypti*. *Gen. Comp. Endocr.* 46: 176-183.
- 50. Fallon A.M., Hagedorn H.H., Wyatt G.R. y Laufer H., 1974.** Activation of vitellogenin synthesis in the mosquito *Aedes aegypti* by ecdysone. *J. Insect. Physiol.* 20: 1815-1823.
- 51. Bohm M.K., Behan M. y Hagedorn H.H., 1978.** Termination of vitellogenin synthesis by mosquito fat body, a programmed response to ecdysterone. *Physiol. Ent.* 3: 17-25.
- 52. Rothman A.L. y Ennis F.A., 1999.** Immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever. *Virology.* 257(1): 1-6.
- 53. Ministerio de Salud de la Nación Argentina, 2009.** Enfermedades infecciosas. Dengue. Guía para el equipo de salud. 2da Edición.
- 54.** Organización Panamericana de la Salud.
<http://www.paho.org/english/HCP/HCT/VBD/dengue.htm>
- 55.** Organización Mundial de la Salud. http://www.who.int/health_topics/dengue/en
- 56. Schneider J. y Droll D., 2001.** A timeline for dengue in the Americas to December 31, 2000 and noted first occurrences.
http://www.paho.org/English/HCP/HCT/dengue_timeline.xls
- 57. Gubler D.J., 1988.** Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol Rev.* 11: 480.
- 58. San Martín J.L., 2010.** Situación del dengue en las Américas Componente entomológico y de control vectorial dentro de la EGI-dengue. En el marco de la "Reunión regional sobre el uso de nuevas alternativas y estrategias para el control del *Aedes aegypti* en las Américas" - Ciudad de Panamá, 7 al 9 de septiembre de 2010.
- 59. Avilés G., Rangeón G., Vorndam v., Briones A., Baroni P., Enria D., y Sabattini M.S., 1999.** Dengue Reemergence in Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 5(4): 575-578.
- 60. Seijo A., 2001.** Situación del dengue en la Argentina. *Medicina* (Buenos Aires) 61: 137-141.
- 61. Ministerio de Salud de la Nación. Dirección de Epidemiología, 2009.** Sala de situación de coyuntura de dengue, 16 de junio de 2009.

- 62. De la epidemia a la eficacia, 2010.** Antecedentes, implementación y resultados del Plan Nacional de Prevención y Control del Dengue y la Fiebre Amarilla. Ministerios de Salud de la Nación Argentina.
- 63.** Ministerio de Salud de la Nación Argentina. **Informes de vigilancia de dengue.** Partes N° 1 a 42.
http://www.msal.gov.ar/dengue/partes/partes_todos.html.
- 64. Chavasse D.C. y Yap H.H., 1997.** Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. WHO. WHO/CTD/WHOPES/97.2
- 65. Barberá C., 1989.** Pesticidas Agrícolas. 4ta Edición. Ediciones Omega, Barcelona, España.
- 66. Zerba E., Word E., Melgar F., Licastro S.A, de Villar M.I.P., Casabé N., Fontán A., Segovia S., Arguello N., Maddrery L., Cari L. y Lopez G., 1988.** Ensayo de campo para la evaluación del pote fumígeno CIPEIN PF-3 en el control del *Triatoma infestans*. *Chagas* 5(2): 19-28.
- 67. González Audino P., 1998.** Estabilidad térmica y actividad insecticida de compuestos piretroides y metoprene en formulaciones fumígenas. Tesis Doctoral en Química. FCEN/UBA.
- 68. Masuh H., Arnstein de Licastro S., Lopez P.A., Vega C. y Zerba E., 2003.** Field evaluation of a smoke generating formulation containing beta cypermethrin against the dengue vector in Argentina. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 19(1): 53-57.
- 69. Stenersen J., 2004.** Chemical pesticides: Mode of action and toxicology. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- 70. Hoffmann K.H. y Lorenz M.W., 1998.** Recent advances in hormones in insect pest control. *Phytoparasitica* 26(4): 323-330.
- 71. Masuh H., Seccacini E., Licastro S. y Zerba E., 2000.** A new aqueous concentrate suspension of *cis*-permethrin and its insecticidal activity. *Pest. Sci.* 56: 1-4.
- 72. Seccacini E., Masuh H., Licastro S. y Zerba E., 2006.** Laboratory and scaled up evaluation of *cis*-oermethrin applied as a new ultra low volume formulation against *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). *Acta Tropica* 97: 1-4.
- 73. Lucia A., Harburguer L., Susana L., Zerba E. y Masuh H., 2009.** Efficacy of a new combined larvicidal-adulticidal ultra-low volume formulation against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), vector of dengue. *Parasitol. Res.* 104: 1101-1107.
- 74. Guidelines drinking water quality, 2008.** Incorporating 1st and 2nd addenda, Vol.1, Recommendations. – Third Edition. WHO.

- 75. Seccacini E., Lucia A., Zerba E., Licastro S. y Masuh H., 2008.** *Aedes aegypti* (L.) resistance to temephos in Argentina. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 24: 608-609.
- 76. Albrieu Llinás G., Seccacini E., Gardenal C.N. y Licastro S., 2009.** Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105(1): 113-116.
- 77. Bisset J., Blanco S., Braga I., Coto H., Masuh H., Moncayo A., Nathan M., Orellano P., Vazquez Cangas J. y Zerba E., 2005.** Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. Disponible en the Latin American Network for Vector Control (RECOLV), Fundación Mundo Sano, Buenos Aires, Argentina.
- 78. González Audino P., Licastro S. y Zerba E., 1999.** Thermal behaviour and biological activity of pyrethroids in smoke-generating formulations. *Pestic. Sci.* 55: 1187-1193.
- 79. Braga I.A., Mello C.B., Peixoto A.A. y Valle D., 2005.** Evaluation of methoprene effect on *Aedes aegypti* development in laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100: 435-440.
- 80. Lazzaro Rezende G., Martins A.J., Gentile C., Farnesi L.C., Pelajo-Machado M., Afrânio Peixoto A. y Valle D., 2008.** Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev. Biol.* 8(1): 82-89.
- 81. Gillett J.D., Roman E.A. y Phillips V., 1977.** Erratic hatching in *Aedes* eggs: A new interpretation. *Proc. R. Soc. Lond.* 1123(196): 223-232.
- 82. Sutherland D.J., Beam F.D. y Gupta A.P., 1967.** The effects on mosquitoes of sublethal exposure to insecticides. I. DDT, dieldrin, malathion and the basal follicles of *Aedes aegypti* (L.). *Mosq. News* 27: 316-323.
- 83. Feinsod F.M. y Spielman A., 1980.** Nutrient mediated juvenile hormone secretion in mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 26: 113-117.
- 84. Reiter P. y Nathan M.B., 2003.** Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides: Guía para la evaluación de la eficacia del rociado espacial de insecticidas para el control del vector del dengue. (WHO/CTD/WHOPES/IC/96.1). WHO, Geneva, Switzerland.
- 85. WHO/TDR, 2009.** Dengue. Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control – New Edition. WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1

- 86. Mulla M.S., 1974.** Laboratory and field evaluation of insect growth regulators against mosquitoes. *Proc. Papers Calif. Mosq. Contr. Assoc.* 42: 175–176.
- 87. Litchfield J.T. y Wilcoxon F.A., 1949.** A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99-113.
- 88. Abbott W.S., 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- 89. Patente Japonesa Nº 01090101, 1989.** Smoking insecticide and smoking thereof. Katsuta Yoshio.
- 90. Patente Japonesa Nº 58140002, 1983.** Smoke fumigant formulations. Taisho Seiyaku KK y otros.
- 91. Fahmy M.A.H., Mallipudi M. y Fukuto T.R, 1978.** Selective toxicity of N,N-thiodicarbamates. *J. Agrc. Food Chem.* 26(3): 550-557.
- 92. Madhavan K., 1973.** Morphogenetic effects of juvenile hormone and juvenile hormone mimics on adult development of *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* 19: 441–453.
- 93. Postlethwait J.H., 1974.** Juvenile hormone and the adult development of *Drosophila*. *Biol. Bull.* 147: 119–135.
- 94. Riddiford L.M. y Ashburner M., 1991.** Effects of juvenile hormone mimics on larval development and metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Gen. Comp. Endocr.* 82: 172–183.
- 95. Spielman A. y Williams C.M., 1966.** Lethal effects of synthetic juvenile hormone on larvae of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Science* 154: 1043–1044.
- 96. Arias J.R. y Mulla M.S., 1975.** Morphogenetic aberrations induced by a juvenile hormone analogue in the mosquito *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 12: 309–316.
- 97. Busvine J.R., Rongssriyam Y. y Bruni D., 1976.** Effects of some insect development inhibitors in mosquito larvae. *Pestic Sci* 7: 153–160.
- 98. Wilson T.G., 2004.** The molecular site of action of juvenile hormone and juvenile hormone insecticides during metamorphosis: how these compounds kill insects? *J. Insect Physiol.* 50: 111-121.
- 99. Margama V.M., Dale B.G. y Subba R.P., 2006.** Ecdysteroid titers and developmental expression of ecdysteroid-regulated genes during metamorphosis of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Insect Physiol.* 52: 558–568.

- 100. Riddiford L.M., 1975.** Juvenile hormone-induced delay of metamorphosis of the viscera of the cecropia silkworm. *Biol. Bull.* 148: 429–439.
- 101. Riddiford L.M., Baeckmann A., Hice R.H. y Rebers J., 1986.** Developmental expression of three genes for larval cuticular proteins of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* 118: 82–94.
- 102. Downer R.G., Wiegand M. y Smith S.M., 1975.** Suppression of pupal esterase activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by an insect growth regulator. *Experientia* 31: 1239–1240.
- 103. Lan Q. y Grier C.A., 2004.** Critical period for pupal commitment in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 50: 667–676.
- 104. Shapiro A.B., Wheelock G.D., Hagedorn H.H., Baker F.C., Tsai L.W. y Schooley D.A., 1986.** Juvenile hormone and juvenile hormone esterase in adult females of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 32: 867–877.
- 105. Lassiter M.T., Apperson C.S. y Roe R.M., 1995.** Juvenile hormone metabolism during the fourth stadium and pupal stage of the southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *J. Insect Physiol.* 41(10): 869–876.
- 106. Pospischil R., Londershausen M., Szomm K. y Turberg A., 1996.** Resistance in German housefly populations (*Musca domestica* L., Diptera) – Summary of recent studies. Proceedings of the Second International Conference on Urban Pests. K.B. Widey (editor). 255–262.
- 107. Ma W., Li X., Dennehy T.J., Lei C., Wang M., Degain B.A. y Nichols R.L., 2010.** Pyriproxyfen resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) biotype B: metabolic mechanism. *J. Econ. Entomol.* 103(1): 158–165.
- 108. da Silva J. y Mendes J., 2007.** Susceptibility of *Aedes aegypti* (L) to the insect growth regulators diflubenzuron and methoprene in Uberlândia, State of Minas Gerais. *Rev. Soc. Brasileira Med. Trop.* 40(6): 612–616.
- 109. Phonchevin T., Upatham E.S., Phanthumachinda B., Prasittisuk C. y Sukhapanth N., 1985.** Effects of cyromazin and methoprene on the developmental stages of *Anopheles dirus*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *South Asian J. Trop. Med. Pub. Health* 16: 240–247.
- 110. Poupardin R., Reynaud S., Strode C., Ranson H., Vontas J. y David J.P., 2008.** Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Bioch. Mol. Biol.* 38: 540–551.

- 111. Riaz M.A., Poupardin R., Reynaud S., Strode C., Ranson H. y David J.P., 2009.** Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. *Aquatic Toxicol.* 93: 61–69.
- 112. Colwell D.D., 1991.** Ultrastructure of the Integument of First-Instar *Hypoderma lineatum* and *H. bovis* (Diptera: Oestridae). *J. Med. Entomol.* 28(1): 86-94.
- 113. Ochieng V.O., Osir E.O., Ochanda J.O. y Olembo N.K., 1993.** Temporal synthesis of cuticle proteins during larval development in *Glossina morsitans*. *Comp. Biochem. Physiol.* 105(2): 309-316.
- 114. Roberts P.E. y Willis J.H., 1980.** The cuticular proteins of *Tenebrio molitor*: I. Electrophoretic banding patterns during postembryonic development. *Dev. Biol.* 75 (1): 59-69.
- 115. Perry A.S., Yamamoto I., Ishaaya I. y Perry R., 1998.** Applied agriculture. Insecticides in agriculture and environment. Retrospects and prospects. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- 116. El-Shazly M.M. y Refaie B.M., 2002.** Larvicidal effect of the juvenile hormone mimic pyriproxyfen on *Culex pipiens*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 18(4): 321-328.
- 117. Truman J.W y Riddiford L.M., 1999.** The origins of insect metamorphosis. *Nature* 401: 447-452.
- 118. Sihuíncha M., Zamora-perea E., Orellana-rios W., Stancil J.D., López-sifuentes V., Vidal-oré C. y Devine G.J., 2005.** Potential Use of Pyriproxyfen for Control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Perú. *J. Med. Entomol.* 42(4): 620-630.
- 119. Kliewer J.W., 1961.** Weight and hatchability of *Aedes aegypti* eggs (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 54: 912-917.
- 120. Tunaz H. y Uygun N., 2004.** Insect Growth Regulators for Insect Pest Control. *Turk. J. Agric. For.* 28: 377-387.
- 121. Riddiford L.M. y Williams C.M., 1967.** The effects of juvenile hormone on the embryonic development of silkworms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 57: 595-601.
- 122. Naqvi S.N.H., Rashid S. y Ashrafi S.H., 1976.** Effect of Altosid (JHA-ZR 515) on *Aedes aegypti* (PCSIR strain). *J. Appl. Entomol.* 80: 316–324.

- 123. Oouchi H., 2005.** Insecticidal properties of a juvenoid, pyriproxyfen, on all life stages of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Appl. Entomol. Zool.* 40(1): 145-149.
- 124. Vennard C., Nguama B., Dillon R.J., Oouchi H. y Charnley A.K., 1998.** Effects of the juvenile hormone mimic pyriproxyfen on egg development, embryogenesis, larval development, and metamorphosis in the desert locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera : Acrididae). *J. Econ. Entomol.* 91(1): 41-49.
- 125. Pérez C.M., Marina C.F., Bond J.G., Rojas J.C., Valle J., y Williams T., 2007.** Spinosad, a naturally derived insecticide, for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): efficacy, persistence, and elicited oviposition response. *J. Med. Entomol.* 44(4): 631-638.
- 126. Tianyun S. y Mulla M.S., 1998.** Ovicidal activity of neem products (Azadirachtin) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14(2): 204-209.
- 127. Valarmathy D., Govindaraju M. y Elumalai K., 2011.** Studies on ovicidal activity of plant essential oil formulation against the eggs of important vector mosquitoes, *Anopheles stephensi* (Liston), *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (L.) at laboratory condition. *International Journal of Current Research.* 33(6): 378-381.
- 128. Govindarajan M., Mathivanan T., Elumalai K., Krishnappa K. y Anandan A., 2011.** Ovicidal and repellent activities of botanical extracts against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 1(1): 43-48.
- 129. Elango G., Bagavan A., Kamaraj C., Abdus Zahir A. y Abdul Rahuman A., 2009.** Oviposition-deterrent, ovicidal, and repellent activities of indigenous plant extracts against *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 105(6): 1567-1576.
- 130. Hagedorn H.H., Turner S., Hagedorn E.A., Pontecorvo D., Greenbaun P., Pfeiffer D., Wheelock G. y Flanagan T. R., 1977.** Post emergence growth of the ovarian follicles of *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 23: 203-206.
- 131. Klowden M. J., 1997.** Endocrine aspects of mosquito reproduction. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 35: 491-512.
- 132. Mulla M. S., Darwazeh H.A. y Norland R.L., 1974.** Insect growth regulators: evaluation procedure and activity against mosquitoes. *J. Econ. Entomol.* 67: 329-332.

- 133. Fournet F, Sannier C. and Monteny N., 1993.** Effects of the insect growth regulators OMS 2017 and diflubenzuron on the reproductive potencial of *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9(4): 426-430.
- 134. Briegel H., 1990.** Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 36: 165-172.
- 135. Telang A., Li Y., Noriega F.G. y Brown M.R., 2006.** Effects of larval nutrition on the endocrinology of mosquito egg development. *J. Exp. Biol.* 209: 645-655.
- 136. Noriega F.G., 2004.** Nutritional regulation of JH synthesis: a mechanism to control reproductive maturation in mosquitoes? *Insect Bioch. Mol. Biol.* 34: 687-693.
- 137. Nasci R.S., 1990.** Relationship of wing length to adult dry weight in several mosquito species (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 27: 716-719.
- 138. Hernández-Martínez S., Mayoral J.G., Li Y. y Noriega F.G., 2007.** Role of juvenile hormone and allatotropin on nutrient allocation, ovarian development and survivorship in mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 53: 230-234.
- 139. Kelada N.L., Gaaboub I.A. y Rawash. I.A., 1981.** The effect on reproduction and morphometrics of females of *Culex pipiens* L. of treatment with six insect growth regulators. *J. Agric. Sci.* 96: 611-618.
- 140. Readio J., Peck K., Meola R. y Dahm K. H., 1988.** Corpus allatum activity (in vitro) in female *Culex pipiens* during adult life cycle. *J. Insect Physiol.* 34: 131-135.
- 141. Hagedom H.H., Shapiro J.P. y Hanaoka K., 1979.** Ovarian ecdysone secretion is controlled by a brain hormone in an adult mosquito. *Nature* 282: 92-94.
- 142. Miura T., Schaeffer C.H., Takahashi R.M. y Mulligan F.S., 1976.** Effects of the insect growth inhibitor, Dimilin, on hatching of mosquito eggs. *J. Econ. Entomol.* 69: 655-658.
- 143. Itoh T., Kawada K., Abe A., Eshita Y., Rongsriyam Y. y Igarashi A., 1994.** Utilization of bloodfed females of *Aedes aegypti* as a vehicle for the transfer of the insect growth regulator pyriproxyfen to larval habitats. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 10(3): 344-347.
- 144. Miura T., Schaefer C.H., Takahashi R.M. y Mulligan F.S., 1976.** Effects of the insect growth inhibitor, Dimilin, on hatching of mosquito eggs. *J. Econ. Entomol.* 69: 655-665.

- 145. Sáenz-de-Cabezón F.J., Pérez-Moreno I., Zalom F.G. y Marco V., 2006.** Effects of lufenuron on *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) egg, larval and adult stages. *J. Econ. Entomol.* 99: 427-431.
- 146. Belinato T.A., Martins A.J., Pereira Lima J.B., Nunes de Lima-Camara T., Afrânio Peixoto A. y Valle D., 2009.** Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104(1): 43-47.
- 147. Vasuki V., 1999.** Influence of IGR treatment on oviposition of three species of vector mosquitos at sublethal concentrations. *South Asian J. Trop. Med. Pub. Health.* 30(1): 200-203.
- 148. Perich M.J., Tidwell M.A., Williams D.C., Sardelis M.R., Pena C.J., Mandeville D. y Boobar L.H., 1990.** Comparison of ground and aerial ultra-low volume applications of malathion against *Aedes aegypti* in Santo Domingo, Dominican Republic. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6: 1-6.
- 149. Pant C.P. y Yasuno M., 1970.** Indoor resting sites of *Aedes aegypti* in Bangkok, Thailand. (WHO/VBC/70.235).
- 150. Perich M. J., Davila G., Turner A., Garcia A. y Nelson M., 2000.** Behavior of resting *Aedes aegypti* (Culicidae: Diptera) and its relation to ultra-low volume adulticide efficacy in Panama City, Panama. *J. Med. Entomol.* 37: 541-546.
- 151. Heintze C., Velasco Garrido M. y Kroeger A., 2007.** What do community-based dengue control programmes achieve? A systematic review of published evaluations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101: 317-325.
- 152. Kroeger A., Lenhart A., Ochoa M., Villegas E., Levy M., Alexander N. y McCall P.J., 2006.** Effective control of dengue vectors with curtains and water container covers treated with insecticides in Mexico and Venezuela cluster randomized trials. *Br. Med. J.* 332: 1247-1252.
- 153. Nahlen B.L., Clark J.P. y Alnwick D., 2003.** Insecticide treated bednets. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68: 1-2.
- 154. Kroeger A., Villegas E., Ordoñez-Gonzalez J., Pabon E. y Scorza J.V., 2003.** Prevention of the trasmission of Chagas disease with pyrethroid impregnated materials. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68: 302-311.
- 155. Espinoza-Gómez F., Hernández-Suárez C.M. y Coll-Cárdenas R., 2002.** Educational campaign versus malathion spraying for the control of *Aedes aegypti* in Colima, Mexico. *J. Epidemiol. Comm. H.* 56: 148-152.

- 156. Lardeux F., Sechan Y., Loncke S., Deparis X., Cheffort J. y Faaruia M., 2002.** Integrated control of peridomestic larval habitats of *Aedes* and *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Atoll villages of French Polynesia. *J. Med. Entomol.* 39: 493-498.
- 157. Lloyd L.S., Winch P., Ortega-Canto J. y Kendall C., 1992.** Results of a community-based *Aedes aegypti* control program in Mérida, Yucatán, Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 635-642.
- 158. Rosenbaum J., Nathan M.B., Ragoonanansingh R., Rawlins S., Gayle C., Chadee D.D. y Lloyd L.S., 1995.** Community participation in dengue prevention and control: a survey of knowledge, attitudes and practice in Trinidad and Tobago. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53: 111-117.
- 159.** Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides, WHO. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13, 2005.

ANEXO I

ENCUESTA DENGUE – ABRIL 2009

N° ENCUESTA

1. HOMBRE

2. MUJER

BLOQUE PASTILLAS FUMÍGENAS

1. Usaron en su casa la pastilla fumígena que se le entregó para matar los mosquitos que transmiten dengue?

1	Si
2	No
9	No sabe/No contesta (NO LEER)

A QUIENES RESPONDIERON NO (CÓDIGO 2) EN PREGUNTA ANTERIOR. RESTO PASA A PREGUNTA 3

2. ¿Por qué no la usó? **ESPONTÁNEA – MÚLTIPLE - REGISTRAR RESPUESTA EN EL CÓDIGO DE LA GRILLA QUE CORRESPONDA**

1	Porque no me llegó la pastilla fumígena
2	Porque no sabía cómo usarlo
3	Porque no me parecía que fuera a dar buenos resultados
4	Porque tengo hijos y creo que les va a hacer mal
5	Porque tenía miedo/no quería que nos hiciera mal a las personas de la casa
6	Porque me parece peligrosa
7	Porque no tuve tiempo
8	Porque no quise
9	Porque no me pareció urgente
10	Porque se me perdió
11	Otra: Especificar:
12	Ns/Nc

ATENCIÓN: LUEGO DE RESPONDER PREGUNTA 2 PASAR A “BLOQUE CAPACITACIÓN” (PREGUNTA 17)

A QUIENES RESPONDIERON SI (CODIGO 1) EN PREGUNTA 1

3. ¿Quién se encargó de poner la pastilla fumígena en la casa? **ESPONTÁNEA – PUEDE SER MÚLTIPLE (Ej: si responde “yo y mi marido” se registran los dos códigos que correspondan) – REGISTRAR Y MARCAR CÓDIGO QUE CORRESPONDA**

1	Yo/El encuestado
2	El cónyuge
3	Mi hija/o / mis hijos
4	Mi hermana/o / mis hermanos
5	Mi yerno/nuera
6	Mi suegra/suegro
7	Un amigo / vecino
8	Otro: Especificar:
9	Ns/Nc

4. ¿Aproximadamente cuánto tiempo después que le entregaran la pastilla fumígena la pusieron en su casa? **ESPONTÁNEA - UNA SOLA RESPUESTA - REGISTRAR PUNTAJE EN GRILLA NUMÉRICA Y LUEGO MARCAR EL CÓDIGO QUE CORRESPONDA. ATENCIÓN: SI RESPONDE “EL MISMO DÍA” REGISTRAR “0” EN GRILLA NUMÉRICA.**

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

1	El mismo día que me lo entregaron
2	1 ó 2 días después
3	3 ó 4 días después
4	5 ó 6 días después
5	Una semana después
6	Otro, Especificar:
7	Ns/Nc

5. ¿Qué cosas hicieron en su casa para poder poner la pastilla fumígena? **ESPONTÁNEA – MÚLTIPLE - REGISTRAR RESPUESTA EN EL CÓDIGO DE LA GRILLA QUE CORRESPONDA**

1	Cerré todos los alimentos
2	Guardé todo lo que estaba a la vista
3	Cerré ventanas y puertas que dan afuera de la casa
4	Abrí puertas y placares de adentro de la casa
5	Les dije a todos los de la casa que se fueran
6	Otra, Especificar:
7	Ns/Nc

6. ¿Cuánto tiempo esperó afuera para volver a entrar a su casa, luego de poner la pastilla fumígena? **ESPONTÁNEA – UNA SOLA RESPUESTA - REGISTRAR RESPUESTA EL CÓDIGO DE LA GRILLA QUE CORRESPONDA**

1	Menos de 50 minutos
2	50 minutos
3	Más de 50 minutos
4	Otro, Especificar:
5	Ns/Nc

7. Si Ud. tuviera que evaluar la dificultad de la pastilla fumígena que ustedes mismos pusieron en su casa, con un puntaje del 1 al 10 donde 1 es muy difícil y 10 es muy fácil, ¿qué puntaje le pondría? **ESPONTÁNEA - UNA SOLA RESPUESTA - REGISTRAR PUNTAJE EN GRILLA NUMÉRICA**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

99. Ns/Nc

A QUIENES EVALUARON LA DIFICULTAD CON UN PUNTAJE INFERIOR A 5; RESTO PASE A P9

8. ¿Por qué razones Ud. considera que la dificultad es un...? **ESPONTÁNEA – PROFUNDIZAR – REGISTRAR TEXTUAL**

--

99. Ns/Nc

9. ¿Y cómo evaluaría la experiencia de haber hecho ustedes mismos el tratamiento en su casa? También utilizando una escala del 1 al 10 donde 1 es que la experiencia fue muy mala y 10 que la experiencia fue muy buena. **ESPONTÁNEA - UNA SOLA RESPUESTA - REGISTRAR PUNTAJE EN GRILLA NUMÉRICA**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

99. Ns/Nc

10. ¿Por qué razones Ud. la evalúa con un...? **ESPONTÁNEA – PROFUNDIZAR – REGISTRAR TEXTUAL**

--

99. Ns/Nc

11. Y también utilizando un puntaje del 1 al 10, donde 1 es que dio pésimos resultado y 10 es que dio resultados excelentes, ¿qué puntaje le pondría a la pastilla fumígena que ustedes mismos pusieron en su casa? **ESPONTÁNEA - UNA SOLA RESPUESTA - REGISTRAR PUNTAJE EN GRILLA NUMÉRICA**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

99. Ns/Nc

12. ¿Qué cosas, si es que alguna, le parecieron negativas/malas de la pastilla fumígena que pusieron ustedes mismos es su casa? Registrar hasta 3 cosas. Profundizar en las tres primeras. **ESPONTÁNEA – MÚLTIPLE - REGISTRAR RESPUESTA EN EL CÓDIGO DE LA GRILLA QUE CORRESPONDA**

1	Que tira humo / mucho humo
2	Que hace mal a los niños
3	Que tiene olor muy fuerte / olor fuerte
4	Que hay que esperar mucho tiempo para volver a entrar a la casa
5	Que no llega a todos los ambientes
6	Que se usa con fuego
7	Que la mecha no prende bien
8	Que hace mal a la salud
9	Que ensucia la casa
10	Que lo tengo que hacer yo
11	Todo
12	Nada
13	Otras, Especificar:
14	Ns/Nc

13. ¿Y qué le pareció lo mejor del tratamiento? **ESPONTÁNEA – MÚLTIPLE - REGISTRAR RESPUESTA EN EL CÓDIGO DE LA GRILLA QUE CORRESPONDA**

1	Que se hace con humo
2	Que no hace mal a las personas
3	Que llega a todos los ambientes
4	Que llega al techo
5	Que mata todos los bichos que hay en la casa
6	Que es de buena calidad
7	Que no es tóxico
8	Que es gratis
9	Que lo puede hacer uno mismo
10	Todo
11	Nada
12	Otras, Especificar:
13	Ns/Nc

14. Teniendo en cuenta la experiencia que tuvo de haber hecho Ud. mismo/ustedes en su casa el tratamiento y recordando otras veces en las que vinieron otras personas a hacerlo en su casa, ¿qué prefiere, hacerlo Ud. mismo o prefiere que vengan otras personas? **SOLO UNA RESPUESTA**

1	Prefiero hacerlo yo mismo / alguien de la casa
2	Prefiero que vengan otras personas a hacerlo
3	Me da lo mismo (NO LEER)
4	Ns/Nc

15. ¿Con qué frecuencia cree Ud. que debería ponerse la pastilla fumígena en las casas? **ESPONTÁNEA – SOLO UNA RESPUESTA - REGISTRAR RESPUESTA EN EL CÓDIGO DE LA GRILLA QUE CORRESPONDA**

1	Todos los días
2	1 / 2 veces por semana
3	Cada dos semanas / Cada 15 días
4	Cada tres semanas
5	1 vez por mes
6	Más de una vez por mes
7	Otra, Especificar:
8	Ns/Nc

16. Los expertos en la temática del dengue dicen que para poder prevenir el dengue es necesario hacer el tratamiento en las casas como mínimo una vez al mes. ¿Qué opina Ud. de esta frecuencia? Ud. diría que es... **LEER – UNA SOLA RESPUESTA**

1	Demasiado seguido / debería hacerse con menor frecuencia
2	El tiempo justo y necesario
3	Muy espaciado en el tiempo / debería hacerse con mayor frecuencia
4	Ns/Nc (NO LEER)

BLOQUE CAPACITACIÓN

17. ¿Ha asistido a la capacitación que se hizo, en la cuál se explicó cómo usar la pastilla fumígena?

1	Si
2	No
9	No sabe/No contesta (NO LEER)

A QUIENES NO ASISTIERON (CODIGO 2) SEGÚN PREGUNT ANTERIOR. RESTO PASA A PREGUNTA 19

18. ¿Por qué razones no ha asistido a la capacitación? **ESPONTÁNEA – MÚLTIPLE - REGISTRAR RESPUESTA EN EL CÓDIGO DE LA GRILLA QUE CORRESPONDA**

1	Porque no llegué
2	Porque no sabía donde era/ a qué hora era
3	Porque no podía
4	Porque no me parecía que fuera a ser útil
5	Porque no me enteré / no me avisaron
6	Porque no me interesa
7	Otras, Especificar:
8	Ns/Nc

ATENCIÓN: LUEGO DE PREGUNTA 18 PASAR A “BLOQUE DENGUE” (PREGUNTA 21)

A QUIENES ASISTIERON A LA CAPACITACIÓN SEGÚN PREGUNTA 17.

19. ¿Cómo evaluaría Ud. la capacitación? Utilice por favor una escala del 1 al 10 donde 1 es muy mala y 10 que es muy buena. **ESPONTÁNEA - UNA SOLA RESPUESTA - REGISTRAR PUNTAJE EN GRILLA NUMÉRICA**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

99. Ns/Nc

20. ¿Por qué razones la evalúa Ud. con un...? **ESPONTÁNEA - PROFUNDIZAR - REGISTRAR TEXTUAL**

99. Ns/Nc

BLOQUE DENGUE

21. Ahora pensando en la enfermedad del Dengue. ¿Cuánto le preocupa a Ud. la enfermedad? Utilizaremos nuevamente un puntaje de 1 a 10 donde 1 es que no le preocupa nada y 10 que le preocupa muchísimo. **ESPONTÁNEA - UNA SOLA RESPUESTA - REGISTRAR PUNTAJE EN GRILLA NUMÉRICA**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

99. Ns/Nc

22. Ahora voy a leerle una serie de frases y me gustaría que me diga en qué medida está Ud. de acuerdo con cada una de ellas, utilizando nuevamente la escala de 1 a 10 donde 1 significa que Ud. está nada de acuerdo con la frase y 10 que está muy de acuerdo con ella. **LEER FRASES - UNA SOLA RESPUESTA POR FRASE – REGISTRAR PUNTAJE EN CADA GRILLA SEGÚN CORRESPONDA**

El dengue es una enfermedad que puede afectar a cualquier persona

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

99. Ns/Nc

El dengue solo puede prevenirse si todos los vecinos hacemos algo en conjunto

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

99. Ns/Nc

El dengue solo puede prevenirse si cada uno cuida bien su casa

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

99. Ns/Nc

El dengue solo puede combatirse si el gobierno se hace cargo del problema

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

99. Ns/Nc

23. Además de la pastilla fumígena, qué otras cosas hace / hizo para prevenir el dengue?
ESPONTÁNEA – MÚLTIPLE - REGISTRAR RESPUESTA EN EL CÓDIGO DE LA GRILLA QUE CORRESPONDA

1	No acumulo cacharros en la casa
2	Limpio bien la casa
3	No acumulo basura
4	Charlo con otros vecinos sobre el tema / me junto con otros vecinos a charlar sobre el tema
5	Fumigo
6	Quemo basura
7	Tapo todo para que no se acumule agua
8	Nada
9	Otras, Especificar:
10	Ns/Nc

24. ¿Qué cosas cree Ud. que deberían hacer las autoridades para evitar que haya una epidemia de dengue? **ESPONTÁNEA – MÚLTIPLE - REGISTRAR RESPUESTA EN EL CÓDIGO DE LA GRILLA QUE CORRESPONDA**

1	Repartir pastillas fumígenas más seguido
2	Fumigar más seguido
3	Que organicen charlas informativas más seguido
4	Que nos entreguen folletos
5	Que nos expliquen / enseñen más
6	Se tienen que hacer cargo de todo
7	Nada
8	Otras, Especificar:
9	Ns/Nc

25. ¿Piensa Ud. que podría haber aquí una epidemia de dengue?

1	Si
2	No
9	No sabe/No contesta (NO LEER)

26. ¿Y quién cree Ud. que es el principal responsable de evitar una epidemia de dengue? **LEER – REGISTRAR UNA SOLA RESPUESTA**

1	El gobierno nacional
2	El gobierno provincial
3	El municipio
4	Los vecinos
5	Todos (NO LEER)
6	Nadie (NO LEER)
7	Otro, Especificar:
8	Ns/Nc

ANEXO II

Pastillas con pyriproxyfen solo

		Humos	Restos	Total
<i>Pastilla N°</i>	<i>% KClO₃ final en la pastilla</i>	<i>%</i>	<i>%</i>	<i>%</i>
1	12,8	51,8	22,6	74,4
2	14,1	63,9	28,0	91,9
3	15,3	53,2	24,4	77,5
4	15,3	56,5	7,5	64,0
5	16,0	63,2	5,0	67,8
7	16,0	53,7	4,6	58,3
8	20,0	93,4	5,3	98,7
9	20,0	92,5	8,5	101,0

Pastillas con cis-permetrina solo

		Humos	Restos	Total
<i>Pastilla N°</i>	<i>% KClO₃ final en la pastilla</i>	<i>%</i>	<i>%</i>	<i>%</i>
1	16,0	53,1	1,1	54,2
2	16,0	50,5	0,1	51,6
3	20,0	56,7	1,3	58,0
4	20,0	61,5	1,1	62,6
5	20,0	55,3	0,7	56,0

Pastilla pyriproxyfen - cis-permetrina

Pastilla N°	% KClO ₃ final en la pastilla	pyriproxyfen		cis-permetrina	
		Humos (%)	Restos (%)	Humos (%)	Restos (%)
1	15,5	48,5	---	22,4	---
2	15,5	42,7	---	16,9	---
3	15,5	42,3	7,7	21,8	0,5
4	20,0	91,2	---	50,1	---
5	20,0	95,9	6,1	56,3	1,1

Las pastillas con permetrina se prepararon directamente con 20% de KClO₃ y los resultados de recuperación son los presentados en la tesis.