

Susceptibilidad a insecticidas comerciales reguladores del crecimiento en larvas y pupas del mosquito *Aedes Aegypti*

Autor: Torrano Juan Martín

Tutor: Lucas Forlani

Co-Tutor: Cecilia Travella

Tesis presentada para optar al título de:

Médico

Universidad Abierta Interamericana

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Medicina

Rosario, Argentina

2019

RESUMEN

Aedes Aegypti es vector de virosis tales como dengue, zika, chikungunya, fiebre amarilla. Dichas enfermedades impactan directamente sobre los seres humanos debido a que el ciclo biológico de este insecto se desarrolla principalmente en áreas urbanas. La Organización Panamericana de la Salud (PAHO) instó a los países de la región a que impulsen la investigación científica sobre nuevas herramientas técnicas y ejecuten evaluaciones permanentes de las existentes para lograr el mayor impacto en el control vectorial. El control de estadios acuáticos -larvas y pupas- del mosquito es una de las estrategias elegidas para mitigar el impacto de las enfermedades que transmiten. Reguladores del Crecimiento de Insectos (IGRs) han demostrado ser capaces de combatir mosquitos de importancia para la salud pública, con una seguridad considerable para el ambiente y organismos no blanco, incluyendo mamíferos. Para contribuir al control de los estadios inmaduros de los mosquitos utilizando métodos con bajo impacto ambiental, evaluamos, bajo condiciones de laboratorio, la eficacia dos formulados comerciales de IGRs en una población colonizada de *Ae*. *Aegypti* provenientes de huevos recolectados de la ciudad de Rosario. En los experimentos, larvas y pupas del mosquito fueron expuestas a diferentes concentraciones de los insecticidas de acuerdo a dosis recomendadas. La eficacia de las formulaciones fue expresada como Porcentaje de Inhibición del Desarrollo del Estadio Adulto (IE %). Los resultados mostraron una diferencia en la susceptibilidad a ambos insecticidas entre larvas y pupas. En el presente experimento se demostró la efectividad de los dos formulados comerciales IGR contra una cepa de *Ae*. *Aegypti* en concentraciones menores a las recomendadas.

PALABRAS CLAVE: *Aedes Aegypti*, Dengue, Control, Insecticidas, Susceptibilidad.

ÍNDICE

RESUMEN II
INTRODUCCIÓN 1
PROBLEMÁTICA 3
MARCO TEÓRICO 5
Mosquito 5
Huevo 6
Larva 6
Pupa 7
Adulto 7
Bases fisiológicas del crecimiento 10
Reguladores del crecimiento de insectos (IGRs) 10
Piriproxifeno 12
Triflumuron 12
Dengue 13
Fiebre amarilla 14
Zika 14
Chikungunya 14
OBJETIVOS 15
MATERIALES Y MÉTODOS 16
Procedencia de los mosquitos 16
Insecticidas 17
Bioensayos de toxicidad 18
La eficacia del insecticida a dosis recomendadas 20
Evaluación del grado de Toxicidad de los insecticidas 21
RESULTADOS 23
Eficacia de los IGRs a dosis recomendadas 23
Determinación de los parámetros de toxicidad 23
DISCUSIÓN 28
CONCLUSIONES 32
BIBLIOGRAFÍA 34
ANEXOS 44

INTRODUCCIÓN

Los mosquitos representan los insectos más conocidos como transmisores de enfermedades alrededor del mundo. Entre las especies de mosquitos de mayor trascendencia, dada la distribución y el número de patologías que transmiten, se destacan las del género *Aedes*, en particular *Ae. Aegypti* (Eldridge, 2004). En la actualidad se ha documentado la presencia de estos insectos en diversos países de América, en donde *Ae*. *Aegypti* es el principal vector del Virus del Dengue (DENV), Virus de la Fiebre Amarilla (YFV), Virus Chikungunya (CHIKV) y Virus del Zika (ZIKV) (Gubler & Trent, 1993; Roth et al., 2014).

El mosquito *Ae. Aegypti* es una especie urbana que se alimenta casi exclusivamente de humanos. Su ciclo de vida incluye una fase acuática -huevo, cuatro estadios larvales y pupa- y una de vida libre -adultos-. El tiempo requerido desde la eclosión de los huevos hasta la aparición de los adultos puede ser de 15 a 20 días (Nelson, 1986; Eldridge, 2004).

Actualmente, la fiebre por dengue es considerada de mayor trascendencia en la salud pública de diversos países por ser una enfermedad infecciosa aguda, de etiología viral, con cinco serotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 y DEN-5, el quinto serotipo DEN-5 se ha aislado en octubre de 2013, este serotipo sigue el ciclo selvático a diferencia de los otros cuatro serotipos que siguen el ciclo humano (Gubler, 2002; World Health Organization [WHO], 2009; Normile, 2013; Mustafa, Rasotgi, Jain & Gupta, 2015). La infección en humanos surge por la picadura de hembras de *Ae. Aegypti* infectadas con dicho virus, que, con base en el serotipo, puede manifestarse solamente como Fiebre por Dengue (FD), verse acompañado por hemorragias (Fiebre Hemorrágica por Dengue) o presentarse en su forma más grave como Síndrome de Choque por Dengue (SCD) (WHO, 2009). Debido a su alta morbilidad y rápida expansión, la WHO ha estimado alrededor de 50 millones de infecciones debidas a dengue anualmente en el mundo, y se calcula que 2.500 millones de personas se encuentran en riesgo de ser infectadas por esta enfermedad (WHO, 2009,2012).

A partir del año 1999, surgió la preocupación por el restablecimiento del dengue en Argentina, debido a factores como las altas densidades del vector, la presencia endémica del virus en los países vecinos y el deterioro de las condiciones de salubridad, sumado al clima subtropical de la regiones norte y central del país, que favorecen las condiciones para la reemergencia de la enfermedad (Zambrini, 2011).

En Argentina se evidenció la circulación del DENV en diversas regiones del país: en 1998, el DENV-2 fue detectado en el noroeste; en el 2000, se produjo un brote provocado por DENV-1 en el noreste del; entre los meses de diciembre de 1999 y marzo del año 2000, se detectaron y trataron en Buenos Aires 38 casos importados desde Paraguay, que en ese mismo periodo reportó 42.000 casos; posteriormente, en 2004, un nuevo brote se registró en Tartagal, con un total de 487 casos sospechosos de dengue. En los años 2007 y 2008, se presentaron casos de dengue localizándose en las provincias de Salta, Corrientes y Formosa, donde se confirmaron 53 casos de DENV 1, 2 y 3 (Zambrini, 2011).

En Argentina, cerca del 87% de la población vive en ámbito urbano, de manera que la gran mayoría de la población habita en lugares donde el mosquito encontraría condiciones favorables para su desarrollo. Desde el punto de vista temporal el riesgo sería máximo en los meses de enero, febrero y marzo, con riesgo medio en los meses siguientes y casi nulo entre junio y septiembre, los meses fríos. Además, los meses de mayor infestación coinciden con la época de vacaciones en el país, cuando los turistas regresan con el virus en su sangre e incrementan la posibilidad de brotes epidémicos (Zambrini, 2011).

En Rosario, la humedad y la temperatura del medio ambiente, así como, la densidad de población humana y la disponibilidad de reservorios de agua para oviposición, constituyen factores que ayudaron a la proliferación del *Ae. Aegypti*. Las mayores tasas de oviposición del mosquito guardan correlación con la época de precipitaciones, en verano.

En los meses finales del año 2008, se desarrolló en Bolivia una epidemia de dengue. En abril se detectaron los primeros casos en Buenos Aires y en mayo ya se confirmaban más de 24.000 casos autóctonos y cinco muertes por el dengue. A mediados del mes de junio se daba por finalizada la epidemia de dengue con más de 26.000 infectados y seis fallecidos oficiales (Zambrini, 2011).

PROBLEMÁTICA

Con respecto a las virosis transmitidas por *Ae. Aegypti*, el dengue, zika y chikungunya han tenido una rápida propagación en varias regiones del mundo en las últimas décadas, en especial en zonas tropicales y subtropicales húmedas, donde se encuentra el mosquito vector. Aún no existen tratamientos de eficacia comprobada para detener estas infecciones. La continua expansión del vector está facilitada por varios factores: la resistencia a insecticidas usados para su control, las lluvias e inundaciones y el desarrollo urbano no controlado con extensas áreas de pobreza. El dengue ha aumentado 30 veces su incidencia mundial en los últimos 50 años, y actualmente ya es endémico en más de 100 países. Cada año ocurren unos 390 millones de infecciones, de las que unos 96 millones presentan manifestaciones clínicas (Bhatt et al., 2013).

Por su parte, la ciudad de Rosario fue considerada de "mediano riesgo", en función de factores socioambientales como presencia de puerto, elevada densidad poblacional y temperaturas y humedad relativas elevadas favorables para el desarrollo del mosquito. En esta ciudad se registra la presencia de *Ae. Aegypti* desde el año 1997 mediante la colocación de ovitrampas en diferentes sitios, dirigidas por el Sistema Municipal de Epidemiología (Brote de Dengue en la ciudad de Rosario durante el año 2009, 2009).

Si bien se han realizado esfuerzos para prevenir y controlar la transmisión del dengue a través de campañas para disminuir la abundancia del vector dentro de los hogares y sus alrededores (Lacey & Lacey, 1990; Rodríguez, 2002), esto no ha sido suficiente ya que la transmisión del DENV se ha presentado con periodicidad (Kyle & Harris 2008; WHO, 2009, 2012).

Dada la envergadura del problema, el control de *Ae. Aegypti* es clave para mitigar la propagación del dengue, mientras continúa el desarrollo de una vacuna recomendada para los que ya han sido infectados en ciertos países, y se producen avances en un tratamiento antiviral específico (Noble et al., 2010; WHO, 2017). En este contexto, actualmente el control del insecto se enmarca en el denominado Manejo Integrado de Vectores (MIV), en donde es necesaria la colaboración de la comunidad local y otros sectores públicos y privados, a través de la concientización social, gestión ambiental, vigilancia epidemiológica de la enfermedad y vigilancia entomológica del mosquito, así como varias estrategias de control químico y

biológico del mismo, que permitan mejorar la eficacia, costo-efectividad y el nivel de impacto ambiental del control de los mosquitos (Becker et al., 2010; WHO, 2012; Johnson et al., 2018).

Los Reguladores de Crecimiento de Insectos (IGRs), son los grupos de compuestos químicos sintéticos eficaces contra estados inmaduros del *Ae. Aegypti* y poseen un buen margen de seguridad para los organismos no blanco (Mulla, 1995). Esta seguridad y facilidad en el manejo constituyen una ventaja para su uso regular como larvicidas alternos en un programa de control del dengue (WHO, 2012).

En este trabajo final para carrera de grado se propone evaluar, mediante ensayos toxicológicos de laboratorio, la susceptibilidad a dos IGRs comerciales -conteniendo piriproxifen y triflumuron como principio activo- en una cepa de *Ae. Aegypti* recolectada en la ciudad de Rosario. El tema de investigación resulta novedoso y de interés sanitario, ya que a la fecha son limitados los reportes públicos que evalúen la eficacia de formulados comerciales de IGRs en cepas de mosquitos autóctonas. Se espera que los resultados contribuyan a una selección adecuada y racional de los insecticidas, optimizando las concentraciones y combinaciones que maximicen su acción contra el mosquito vector del dengue.

MARCO TEÓRICO

Mosquito

El interés científico sobre los mosquitos del género *Aedes* comenzó a finales del siglo XIX, debido a su papel como vectores en la transmisión de la fiebre amarilla (Harbach & Kitching, 1998). Este género agrupa dos especies relacionadas con la transmisión de la fiebre del dengue al humano: *Ae. Albopictus* (Skuse) y *Ae. Aegypti*. Son mosquitos urbanos que comparten hábitat con el ser humano y prefieren ambientes con agua estancada para su reproducción y crecimiento. En períodos de epidemia, los humanos sirven como reservorio de las enfermedades para que los mosquitos las transmitan a otros humanos mediante su picadura. Fuera de situaciones de epidemia, monos, aves y otros vertebrados sirven como reservorio para el mosquito (Ng & Hapuarachchi, 2010). *Ae. Albopictus*, conocido como "el tigre asiático", es originario del sudeste asiático. Entró al continente americano en 1985, desembarcando en Brasil, desde donde comenzó su dispersión. En 1998 se detectó por primera vez en nuestro territorio de Misiones. Mientras que son especies urbanas, *Ae. Albopictus* es también de ambientes silvestres, motivo por el cual su irrupción en nuestro medio podría servir de nexo entre ambos ambientes y favorecer así la circulación viral (Rossi & Almirón, 2004).

La característica más llamativa de los artrópodos es su exoesqueleto, secretado por la epidermis subyacente. Este esqueleto externo es protector, impermeable y brinda puntos de inserción a los músculos. El exoesqueleto no crece, por lo tanto, a medida que el animal progresa y se desarrolla debe descartarlo y volver a formarlo, proceso conocido como muda; el exoesqueleto descartado se lo denomina exuvia. Los mosquitos pertenecen a la Familia Culicidae, dentro del Orden Diptera -insectos con un par de alas funcionales, es decir, que le sirven para el vuelo; el otro par está muy reducido y constituye el balance que actúa como órgano para el equilibrio durante el vuelo-. Como todos los dípteros, los mosquitos pasan por cuatro estados durante su ciclo biológico: huevo, larva, pupa y adulto. Los estados inmaduros -huevo, larva y pupa- son acuáticos, en tanto que el adulto es de vida terrestre. Se denomina criadero a todo ambiente acuático donde viven y se desarrollan las formas inmaduras de mosquitos (Rossi & Almirón, 2004).

Huevo

Rara vez ha sido posible observar la oviposición de los mosquitos en condiciones naturales. Sin embargo, las hembras eligen la noche para oviponer. El tamaño de los huevos en general no alcanza el milímetro de longitud. Los huevos se colocan individualmente en lugares húmedos, fuera del medio líquido y eclosionan cuando el agua los cubre. Las hembras evitan poner los huevos en piletas o colecciones de agua en el suelo, donde los bordes son de barro o tierra; prefieren oviponer en lugares resguardados, especialmente donde los huevos pueden adherirse a alguna pared. Nunca colocan los huevos sobre una superficie seca y prefieren hacerlo sobre una superficie húmeda a ponerlos directamente en el agua. Además, estos huevos resisten la desecación, pudiendo permanecer de 7 a 12 meses en criaderos secos. Las cubiertas de vehículos son importantes sitios de cría para esta especie, seguidos por recipientes de formas cilíndricas y abiertas, prefiriendo las formas grandes a medianas, descartándose aquellos de boca angosta. El período de desarrollo embrionario varía de acuerdo a ciertos factores externos, entre los cuales la temperatura tiene gran importancia. En épocas cálidas, el período de incubación es corto, generalmente dos o tres días (Rossi & Almirón, 2004).

Larva

El estado de larva es esencialmente acuático y dotado de gran movilidad. La alimentación se basa en microorganismos y detritus orgánicos que se encuentran en el agua, y que la larva puede llevar hacia la boca gracias al movimiento de sus cepillos bucales. Las larvas se dirigen periódicamente a la superficie del agua para respirar, pero cuando están sumergidas el proceso continúa a través del tegumento. El abdomen posee un par de espiráculos (orificios respiratorios) en el extremo posterior, situados en el extremo del sifón dorsal. Son fotofóbicas, es decir, prefieren lugares sombreados. En líneas generales, la duración del período larval de los mosquitos varía entre ocho y diez días cuando las condiciones ambientales son favorables. Numerosos factores influyen sobre el crecimiento, algunos inherentes a la propia especie y otros dependientes del ambiente, como temperatura, disponibilidad de elementos nutritivos, densidad larval y presencia de depredadores. A medida que las larvas crecen y se desarrollan deben mudar su exoesqueleto tres veces, pasando en consecuencia por cuatro estadios larvales. Las larvas de primer estadio -las que emergen del huevo- son pequeñas, pero a medida que pasan por los sucesivos estadios

larvales van aumentando de tamaño, hasta alcanzar en el cuarto estadio aproximadamente 1 cm. La larva de cuarto estadio muda al estado de pupa (Rossi & Almirón, 2004).

Pupa

El estado de pupa es un período de transición en el que ocurren profundas transformaciones que llevan a la formación del adulto y al cambio del hábitat acuático por el terrestre. Durante este estado el individuo no se alimenta, por lo que los cambios que ocurren son posibles gracias a la energía acumulada durante el estado larval. La cabeza y el tórax constituyen una estructura única, llamada cefalotórax, en la que se destacan las trompetas respiratorias -estructuras tubulares para la respiración-. Los movimientos de la pupa están limitados al abdomen, siendo éstos muy enérgicos y activos, aunque tienden a permanecer inmóviles, colocando la abertura de las trompetas respiratorias en contacto con la superficie del agua para respirar. Al final del estado de pupa, y en preparación para la emergencia del adulto, las pupas extienden el abdomen casi paralelo a la superficie del agua. En general, la duración del estado pupa es de alrededor de dos días en condiciones favorables (Rossi & Almirón, 2004).

Adulto

Los adultos presentan una apariencia general de insectos pequeños, de porte delgado y patas largas. Los machos son generalmente de menor tamaño que las hembras y se reconocen a simple vista por sus antenas mucho más pilosas, como un cepillo. El largo del cuerpo de las hembras oscila alrededor de 1 cm. Luego de la emergencia, los mosquitos adultos generalmente buscan lugares húmedos y sin corrientes de aire en los que permanecer en reposo. Los machos se alimentan de sustancias azucaradas como néctar y frutos, a partir de las cuales obtienen la energía que necesitan para volar hasta encontrarse con las hembras de su especie y aparearse. Las hembras también ingieren sustancias azucaradas, pero en general necesitan ingerir sangre -hematofagia- para poder desarrollar los huevos. Cuando un mosquito hembra pica al hospedador buscando una fuente de sangre, primero inyecta saliva en el lugar de la picadura. Ésta tiene efecto anestésico, anticoagulante e histamínico, de modo que el hospedador no perciba al mosquito mientras pica, la sangre no coagule como producto de la lesión ocasionada, y mucha sangre llegue rápidamente a la zona para que el mosquito esté el menor tiempo posible en contacto con el hospedador. Pican a las primeras horas de la

mañana y al final de la tarde, especialmente en los tobillos. Luego de ingerir sangre, buscan un refugio donde descansar y así ciertas especies tienden a permanecer en las habitaciones. Como ocurre con otros animales, los mosquitos pueden ser clasificados de acuerdo al período en que se muestran activos en diurnos y nocturnos. El *Ae. Aegypti* es un mosquito de actividad diurna a diferencia del mosquito común de las habitaciones -*Culex Pipiens Quinquefasciatus*- que es nocturno. La longevidad de los mosquitos adultos está sujeta a condiciones climáticas y también está relacionada con el sexo, siendo las hembras más longevas que los machos. Cuando aumentan las precipitaciones aumenta el número de criaderos y por lo tanto el tamaño de la población de adultos. El *Ae. Aegypti* vive en promedio un mes. Las principales funciones del estado adulto son la reproducción y la dispersión. En general, se considera que una hembra puede poner entre 100 y 300 huevos luego de una comida sanguínea. A partir de la sangre ingerida, la hembra formará las reservas nutritivas de los huevos que permitirán el desarrollo de los embriones. Cabe recordar que, a lo largo de su vida, una hembra puede alimentarse varias veces con sangre y en consecuencia puede depositar una cantidad importante de huevos. Se han registrado hasta 750 huevos colocados por una hembra. La dispersión tiene gran importancia para el conocimiento epidemiológico de las enfermedades; puede ser activa, efectuada con esfuerzo propio del mosquito, o pasiva, debida a factores independientes del mosquito como corrientes de aire. El vuelo de un mosquito depende de varios factores tales como la presencia de criaderos, condiciones de humedad y temperatura, dirección y velocidad de los vientos, como también de la existencia de fuentes para la provisión de sangre y lugares de refugio. La dispersión espontánea o activa de las hembras alcanza los 100 m, por lo que durante su vida visitan pocas residencias, tendiendo a permanecer próximas al lugar donde se desarrollaron hasta adulto. Sin embargo, la disponibilidad de recipientes de cría condiciona la dispersión, de modo que cuando éstos resultan escasos, el rango de dispersión puede extenderse hasta los 800 m. Por otro lado, la dispersión a través de distintos medios de transporte, como autos, trenes, barcos o aviones, es uno de los factores más importantes de diseminación de estos mosquitos y de los virus dengue de una región a otra (Rossi & Almirón, 2004).

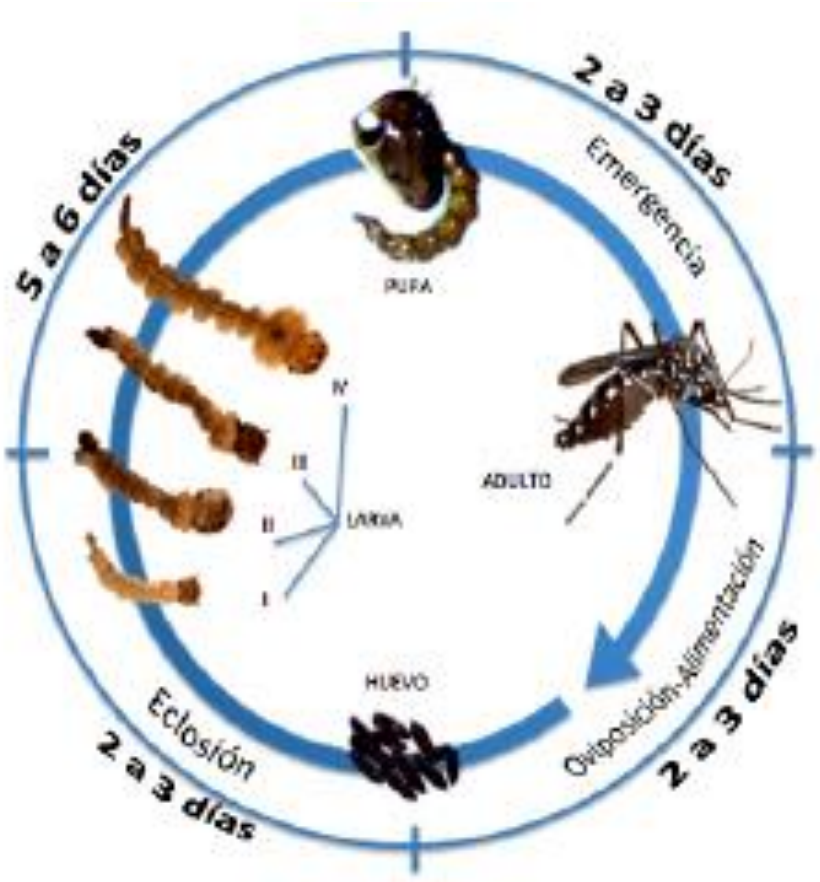


Figura 1. Ciclo de vida del mosquito *Aedes Aegypti* (Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades, 2014).

Bases fisiológicas del crecimiento

El exoesqueleto confiere al insecto una estructura determinada, pero que le impide aumentar de tamaño de forma continuada. Por este motivo, para desarrollarse y alcanzar el estado de adulto, el insecto debe liberarse de su exoesqueleto, mediante la muda o ecdisis y el acto por el que los insectos cambian elementos de su exoesqueleto durante su crecimiento postembrionario. En el control de la muda intervienen células neurosecretoras de ecdisotropina -neurohormona- y glándulas secretoras. Aparecen dos tipos de glándulas, que son los cuerpos alados, que liberan neotenina -hormona juvenil-, y las glándulas ecdisiales, que sintetizan ecdisona, que es la hormona responsable de la muda. El estímulo que dispara el proceso de la muda es la presión que ejercen los tejidos sobre la pared del cuerpo cuando se alcanza la máxima capacidad del exoesqueleto. Los estímulos son recibidos por el cerebro. Las células neurosecretoras, que allí se encuentran, liberan ecdisotropina a la hemolinfa. Esta neurohormona actúa sobre las glándulas. Durante el estadio larvario, las glándulas de los cuerpos alados liberan neotenina y así se mantienen las características larvarias. Al desencadenar el proceso de la muda, la ecdisotropina inhibe la liberación de neotenina y posteriormente, estimula la producción de ecdisona por las glándulas ecdisiales. Estos cambios hormonales provocan la muda y el desprendimiento del exoesqueleto. La síntesis y arreglo de la quitina en el exoesqueleto de los insectos es regulado por las hormonas de la muda o ecdisonas y se realiza con la intervención de numerosas enzimas que catalizan las reacciones orgánicas a partir de la glucosa para terminar en la quitina. La quitina sintetasa es la enzima más importante del proceso. Durante el proceso de la muda el endoesqueleto es digerido por quitinasa (Villareal, 2012).

Reguladores del crecimiento de insectos (IGRs)

Los IGRs, entre los que se destacan el piriproxifeno y el triflumuron, difieren notablemente de otros insecticidas, ya que ejercen su efecto a través de su acción sobre el desarrollo, la metamorfosis y la reproducción de los insectos, perturbando la actividad normal del sistema endócrino (Pener & Dhadialla, 2012). Se encuentran dentro de la categoría de larvicidas, separándose de los adulticidas, como algunos compuestos organofosforados -COFA-. Recientemente, formulados comerciales de IGR, conteniendo piriproxifeno o triflumuron, han sido evaluados en cepas de *Ae. Aegypti* mediante ensayo de laboratorio y pruebas a campo con resultados alentadores (Vythilingam, Luz, Hanni, Beng & Huat, 2005; Martins,

Belinato, Lima & Valle, 2008; Al-Azab, Al-ghamdi, Shaheen & Zaituon, 2013; Oo et al., 2018). Sin embargo, la eficacia de los IGRs puede variar debido a la formulación, dosis empleadas y las cepas de los mosquitos, entre otros factores (Mulla et al., 2003; Seccacini et al., 2008a; Parashar & Prakash, 2010; Pener & Dhadialla, 2012)**.** Por lo tanto, evaluar la eficacia de los formulados comerciales es fundamental para promocionar el uso de estos productos como herramientas para el control del insecto (Belinato et al., 2009; Al-Azab et al., 2013)**.**

Debido a las limitaciones de los tratamientos disponibles para la mayoría de las enfermedades transmitidas por mosquitos, el control vectorial mediante el uso de agentes químicos, biológicos y métodos físicos sigue siendo la principal forma de prevención (WHO, 2012). El empleo de insecticidas químicos es un método preventivo que ha sido de gran importancia en los últimos 40 años principalmente para el control de formas inmaduras del mosquito -larvas y pupas- (Becker et al., 2010). Entre los insecticidas, el temefos -un COFA- es uno de los más utilizado a nivel mundial en campañas de salud pública. A pesar de su eficacia probada, en los últimos años se ha detectado la aparición de resistencia a este compuesto en poblaciones de *Ae. Aegypti* en distintos países de América latina incluyendo la Argentina (Braga et al., 2004; Rodríguez, Bisset & Fernández, 2007; Seccacini, Lucia, Zerba, Licastro & Masuh, 2008; Llinás, Seccacini, Gardenal & Licastro, 2009; Lima et al., 2011; Conde et al., 2015). En este contexto, en los últimos 20 años se ha avanzado en la búsqueda de insecticidas más seguros, con modos de acción más selectivos y menor riesgo para los organismos no blanco -incluyendo los humanos- y el medio ambiente (Becker et al., 2010; Licastro et al., 2010). Dentro los insecticidas sintéticos desarrollados que cumplen con estas características encontramos a los IGRs (Invest & Lucas, 2008). La seguridad y facilidad en el manejo de los IGRs constituyen una ventaja para su uso regular como insecticidas alternos en un programa de control del dengue y además de tener el aval de la WHO, tienen registro World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES) (WHO, 2001).

Se reconocen dos grupos de IGR: los miméticos de hormonas juveniles y los inhibidores de la biosíntesis de la quitina. En los insectos ocurre la metamorfosis desde huevo a adulto regulada por un sistema hormonal complejo en el que intervienen principalmente la ecdisona y la neotenina. Las concentraciones relativas de estas hormonas del insecto son muy importantes para determinar la muda a adulto (Villareal, 2012).

Piriproxifeno

El piriproxifeno es una hormona juvenil, que interfiere en la transformación de la pupa al estado de adulto; consecuentemente actúan durante un corto periodo en el estado larvario. Es un regulador del crecimiento de insectos que afecta a la fisiología de la morfogénesis, reproducción y embriogénesis de los insectos. El efecto morfogenético del piriproxifeno se observa principalmente durante la transformación de larva a pupa. Por lo tanto, la muerte se produce en la fase de pupa y los mosquitos adultos no emergen. Presenta un alto nivel de actividad frente a la emergencia de adultos del mosquito en la inhibición de las larvas a muy bajas dosis (Mulder & Gijswijt, 1973).

La toxicidad del piriproxifeno fue evaluada por la FAO/WHO y por la Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR) y se concluyó que la toxicidad oral aguda, dérmica y por inhalación es baja. El piriproxifeno no representa un riesgo carcinogénico para los humanos, no es genotóxico en una gama adecuada de las pruebas de mutagenicidad in vitro e in vivo y no es teratogénico. El piriproxifeno tiene un bajo impacto ambiental y es adecuado para el control de larvas de mosquitos (WHOPES, 2001). Se emplea en contenedores de agua potable para *Ae. Aegypti* a concentraciones de 0,05 ppm, es decir, 10 g de producto formulado al 0.05% en 1000 litros de agua (Villareal, 2012).

Triflumuron

El triflumuron no regula el crecimiento de los insectos, sino que inhibe el proceso de la disposición de la quitina en el insecto. Esto ocurre en todos los estadios larvales y basado en su modo de acción, es adecuado clasificarlo como un inhibidor de síntesis de quitina. Los productos que interfieren en el proceso de la biosíntesis de la quitina solo actúan durante la muda. El triflumuron pertenece a la familia de las benzoilureas. Al tratar las larvas con el triflumuron, estas pierden la capacidad de mudar (Mulder & Gijswijt, 1973) y son incapaces de escapar de las exuvias y con frecuencia mueren al dañar el exoesqueleto nuevo (WHOPES, 2001). Los efectos letales por triflumuron generalmente no se producen antes de la muda, sino posteriormente, cuando el exoesqueleto de los sucesivos estadios se encuentra seriamente debilitado por la falta de quitina, lo que resulta en la muerte durante la muda o poco después. Este es el resultado de la perturbación de la disposición de quitina en las nuevas

capas cuticulares, que cada vez dificulta la locomoción y la alimentación adecuada de la larva. Como consecuencia de su modo de acción, las benzoilureas no son de acción rápida. A diferencia de la hormona juvenil, las benzoilureas están presentes en todos los estadios larvales, aunque en general la eficacia disminuye con la edad. Con base en estas dos propiedades, el triflumuron debe aplicarse preferentemente en una fase temprana del ciclo de vida del insecto, especialmente en la fase larvaria (Mulder & Gijswijt, 1973). La toxicidad de este IGR fue evaluada por la FAO/WHO y estableció que el triflumuron es un producto con bajas probabilidades de riesgo de intoxicación, en el uso normal en los depósitos de agua de uso en la vivienda. (WHOPES, 2001).

Dengue

Se reconoce dentro del grupo arbovirus a los virus que son transmitidos por artrópodos, dentro de este grupo se encuentra de la familia Flaviviridae el DENV. Típicamente, los individuos infectados por el dengue son asintomáticos (80%). En las formas sintomáticas, después de un período de incubación de una semana aparece un cuadro caracterizado por fiebre, dolores de cabeza, dolor detrás de los ojos, dolor intenso en las articulaciones y músculos -fiebre rompehuesos- y erupciones en la piel puntiformes de color rojo brillante. La forma más grave de la enfermedad, el Síndrome de Choque por Dengue, en el que hay una disfunción capilar que permite el traspaso de sangre por fuera del compartimento vascular, ocurre con mayor frecuencia ante una reinfección al exponerse la persona a un serotipo diferente del virus al que fue sensibilizado previamente. El mecanismo exacto que está detrás no está del todo claro (Whitehorn & Farrar, 2010; Reiter, 2010). Una vacuna para prevenir el dengue (Dengvaxia®) ha sido autorizada y está disponible en algunos países para las personas de entre 9 y 45 años. La WHO recomienda que la vacuna solo se administre a las personas que hayan tenido una infección anterior por el virus del dengue confirmada. El fabricante de la vacuna, Sanofi Pasteur, anunció en el 2017 que las personas que reciban la vacuna y no hayan estado infectadas por el virus del dengue anteriormente podrían estar en riesgo de presentar dengue grave, si contraen el dengue después de ser vacunadas (Centers for Disease Control and Prevention, 2019).

Fiebre amarilla

El YFV, también flavivirus dentro del grupo arbovirus, tiene un tiempo de incubación de cinco días, después del cual se distinguen dos formas clínicas de fiebre amarilla. La forma leve típica en situaciones de epidemia, en la que hay fiebre elevada, escalofríos y dolor de cabeza asociados con dolores musculares y vómitos. La forma grave incluye inicialmente sangrado nasal y de las encías con temporal remisión de la fiebre, para luego reaparecer con ictericia -piel amarillenta- insuficiencia hepática y/o renal y agravamiento de las hemorragias llegando a causar vómitos negros de sangre coagulada -hematemesis-. Se destaca la presencia de una vacuna efectiva para esta patología debido a la ausencia de un tratamiento específico (Tolle, 2009).

Zika

El ZIKV, otro flavivirus del grupo arbovirus, es de difícil diagnóstico clínico porque sus síntomas pueden llegar a confundirse con el dengue. En un 80% de los casos son asintomáticos y cuando se desarrolla la enfermedad hay una erupción cutánea maculopapular acompañada de fiebre, dolores articulares y musculares, dolor de cabeza y conjuntivitis no purulenta en los ojos. La relación de este virus con el desarrollo de microcefalia en bebés de mujeres que se encontraban embarazadas al momento de la infección continúa en investigación (Duffy et al., 2009; Oliveira Melo et al., 2016).

Chikungunya

El CHIKV, de la familia Togaviridae dentro del grupo arbovirus, se caracteriza por una fuerte fiebre, a menudo superior a 40ºC, de unos tres días de evolución seguido por erupciones cutáneas maculopapulares e importantes dolores articulares durante cinco días que pueden reaparecer hasta varios meses después de la primera crisis. Puede estar asociado a dolores de cabeza, conjuntivitis, vómitos y diarrea (Thiberville et al., 2013).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Se propone como objetivo general de este trabajo final para carrera de grado evaluar la susceptibilidad, mediante ensayos de laboratorio, de una cepa del mosquito *Ae. Aegypti* recolectada en la ciudad de Rosario a dos formulados comerciales de insecticidas reguladores del crecimiento (IGRs).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En relación a lo enunciado en el objetivo general, para este trabajo final para carrera de grado se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la susceptibilidad en larvas y pupas de *Ae. Aegypti* a diferentes concentraciones de dos IGRs conteniendo piriproxifen y triflumuron como principio activo.

- Determinar el grado de toxicidad de los insecticidas mediante el cálculo de la concentración de inhibición del desarrollo del estadio adulto ($IE_{50, 90}$).

- Analizar y comparar los datos entre ambos IGRs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedencia de los mosquitos

Los mosquitos utilizados en los ensayos procedieron de una colonia de *Ae. Aegypti* mantenida en el insectario de la UAI. La colonia fue desarrollada 12 meses antes de los procedimientos de laboratorio. Se inició a partir de huevos colectados en la ciudad de Rosario mediante el uso de trampas de oviposición colocadas en diferentes puntos de la ciudad. Los muestreos fueron efectuados por la Dirección de control de Vectores de la Municipalidad de Rosario. Las larvas fueron criadas utilizando una dieta estandarizada a base de levadura en la que se proveyó 0,5-1 mg/larva/día. La crianza de los mosquitos se llevó a cabo a 25 ± 1ºC, 80 ± 5% de humedad relativa y un ciclo constante de 12h/12h de fotoperíodo. Para los experimentos se emplearon lotes de huevos provenientes de hembras alimentadas con una solución de sacarosa al 10% (100 g/L de azúcar en agua desionizada) ad libitum y sangre humana. Los huevos fueron sumergidos en vasos plásticos de 250ml conteniendo 50ml de agua declorada y levadura en polvo disecada como alimento hasta la obtención de los estadios inmaduros (larvas y pupas).



Figura 2. *Insectario de la UAI.*



Figura 3. *Larvas y pupas en medio de desarrollo.*

Insecticidas

Se realizaron experimentos utilizando los siguientes insecticidas: *Dragon*® (Chemotecnica S.A., Argentina; (2% ingrediente activo PPF, [4- Fenoxifenil (R/S)-2-(2-piridiloxi) propil eter] solvente y emulsificador quantum satis) y *Starycide*® (triflumuron, 40%. [Bayer, S.A.]). Los insecticidas fueron disueltos por separado en agua destilada para obtener una solución madre de 10 mg/L y 12 mg/L para *Dragon*® y *Starycide*® respectivamente. Estas soluciones fueron sujetas a diluciones seriadas para alcanzar las concentraciones finales de 0,002-100 ug/L en agua corriente. Para los respectivos cálculos las concentraciones de insecticidas fueron convertidas a ppb (partes por billón), equivalente a ug/L (microgramos por litro)



Figura 4. *Procedimiento de dilución de los formulados.*

Bioensayos de toxicidad

Los experimentos se efectuaron en larvas y pupas de *Ae*. *Aegypti* en base a protocolos preestablecidos (Bisset et al., 2005). Como grupo control se emplearon larvas y pupas crecidas en los mismos medios excepto por los larvicidas.



Figura 5. *Preparación del bioensayo de toxicidad.*

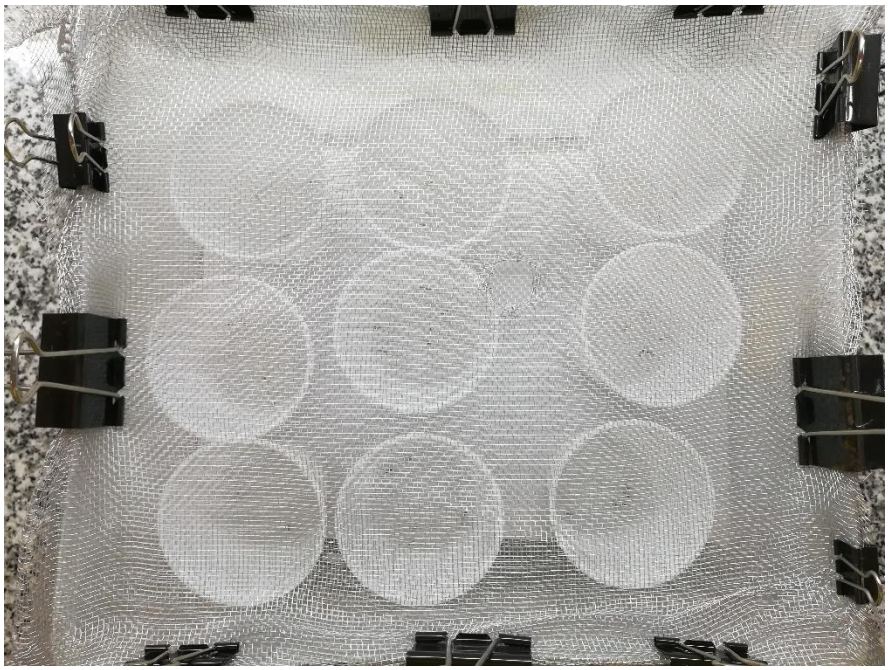


Figura 6. *Box con las muestras ya separadas y listas para su crecimiento.*

La eficacia del insecticida a dosis recomendadas

Se realizó el experimento siguiendo los métodos preestablecidos (Seccacini et al., 2008a; Su, Cheng, Melgoza & Thieme, 2014) y con leve modificación de acuerdo a nuestras capacidades. Dos estadios inmaduros, larvas en cuarto estadio y pupas melanizadas (6-15 horas de formación), fueron evaluadas simultáneamente en ensayos separados. Entre 5 y 8 especímenes fueron colocados en vasos que contenían 40 mL de agua declorada y 3 concentraciones de insecticida (1, 10 y 100 ug/L) de acuerdo a concentraciones utilizadas en campo (Belinato et al., 2009; Al-Azab et al., 2013; Rubio, Cardo, Junges, Carbajo & Vezzani, 2018; Fonseca et al., 2019). Se colocó la comida de las larvas en cada vaso en intervalos de 2 días. Tres y cuatro réplicas fueron usadas para cada concentración. Todos los vasos fueron examinados diariamente para detectar cualquier muerte de larva, pupa o adulto, y la mortalidad acumulada fue registrada al finalizar la evaluación cuando el desarrollo del estadio adulto fue completado en los vasos de control y ninguna larva o pupa quedaron vivas. El desarrollo exitoso del estadio adulto fue reconocido contando las exuvias libres de las pupas en los vasos. Los bioensayos fueron llevados a cabo en el insectario de la UAI con temperatura y fotoperíodos descritos anteriormente. Todas las pruebas fueron replicadas 3 veces.

La eficacia de los insecticidas fue valorada como el porcentaje de inhibición de desarrollo del estadio adulto (IE %) y ajustado con cualquier mortalidad de larva o pupa en los correspondientes controles con la fórmula (Mulla, et al., 1974):

IE % = 100 - 100(T/C)

T: Porcentaje de desarrollo de estadio adulto en vasos expuestos al larvicida

C: Porcentaje de desarrollo de estadio adulto en vasos controles.



Figura 7. *Larvas muertas para su recuento.*

Evaluación del grado de Toxicidad de los insecticidas

Para determinar el grado de toxicidad de los insecticidas fueron estimados los valores de inhibición de emergencia 50 y 90(IE_{50-95}) y sus respectivos errores estándares en larvas de cuarto estadio empleando concentraciones de los insecticidas entre 0,01 y 10 ug/L (Seccacini et al., 2008a). Se propuso un método de regresión logística para analizar la relación entre las dos variables (IE % y Concentraciones de insecticida) (Seefeldt, Jensen & Fuerst, 1995). El Gráfico 1 muestra una curva teórica de la regresión logística. De acuerdo al modelo, la relación entre IE % (Y) y concentración de insecticida (X) viene dada por la ecuación:

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$$

cuyos parámetros representan:

a: Valor mínimo de IE % que se puede obtener (0%)

b: Pendiente de la curva en el punto de inflexión

c: Concentración que causa IE $\%_{50}$

d: Valor máximo de IE % que se puede obtener (100%)

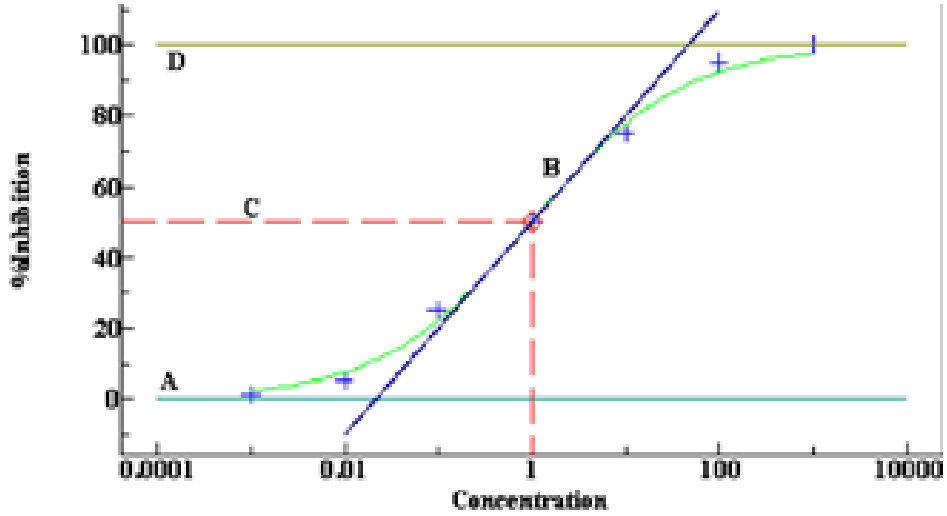


Gráfico 1. *Ilustración teórica de la función de regresión logística(con los respectivos parámetros) empleada para determinar la concentración d insecticida que causa la* IE_{50}.

Los valores de los parámetros fueron estimados usando el método de máxima verosimilitud (Ritz, Baty, Streibig & Gerhard, 2015). Adicionalmente, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para determinar si la curva obtenida se ajusta a los datos de los experimentos. La totalidad de los datos fueron analizados utilizando el software R, Versión 3.4.0.

RESULTADOS

Eficacia de los IGRs a dosis recomendadas

Los resultados mostraron una diferencia en la susceptibilidad a los insecticidas entre larvas y pupas de *Ae Aegypti* en las diferentes concentraciones evaluadas (tabla 1 y 2). En las larvas, concentraciones iguales y mayores a 10 ppb (dosis recomendadas para el uso a campo) se reportan valores de IE del 100% (93% de las larvas llegaron a su estadio adulto en los controles). Para dosis de 1 ppb se observa una disminución de la IE del orden del 5%. En los experimentos, la mayoría de las larvas murieron como pupas o preadultos deformados, mientras que algunos pocos murieron en el estadio de larva, particularmente en las concentraciones más elevadas. Por su parte, los ensayos efectuados con pupas muestran una elevada tolerancia de este estadio a ambos insecticidas. Se observa que prácticamente el 95% de las pupas expuestas a los insecticidas pudieron convertirse en mosquito adulto (tabla 1 y 2).

Determinación de los parámetros de toxicidad

Los datos en la Tabla 3 muestran los valores IE_{50-90} para los insecticidas probados con sus respectivos errores estándares asociados. Para la formulación comercial *Dragon*®, se determinaron concentraciones de IE_{50-90} de 0,175 y 0,919 ppb respectivamente. Por su parte, en larvas expuestas al insecticida *Starycide*® se determinaron concentraciones de IE_{50-90} de 0,037 y 0,914 ppb.

Basado en los parámetros estimados por la logística de regresión, se obtuvieron las curvas de concentración-respuesta para cada insecticida. Se observa que las gráficas predicen un ajuste razonable a los datos (gráficos 2 y 3). En tabla 4 se describen los parámetros del modelo y su correspondiente nivel de significancia($p<0,05$). Adicionalmente usando el *F-test* de falta de ajuste evaluamos si la curva describe los datos satisfactoriamente (tabla 5). El F-test estadístico no es significante ($p>0,05$), entendiéndose que los parámetros determinados en el modelo de regresión logística proveen de una aceptable descripción de la variabilidad de los datos y pueden usarse para predecir las concentraciones que causan el 50 y 90% de IE (Seefeldt et al., 1995).

Tabla 1. *Porcentajes de Inhibición de Emergencia de Adultos (IE %) para larvas y pupas de mosquitos expuestos a diferentes concentraciones de piriproxifeno.*

Piriproxifeno (ppb)*	**Larvas**	**Pupas**
100	100%	<5 %
10	100%	<5 %
1	91,28 ± 15,40 %	<5 %

* Concentración del ingrediente activo del formulado.

Tabla 2. *Porcentajes de Inhibición de Emergencia de Adultos (IE %) para larvas y pupas de mosquitos expuestos a diferentes concentraciones de triflumuron.*

Triflumuron (ppb)	**Larvas**	**Pupas**
100	100%	<5 %
10	100%	<5 %
1	86,48 ± 16,33 %	<5 %

Tabla 3. *Determinación de parámetros de toxicidad de los insecticidas en Ae. Aegypti.*

Insecticida	***IE_{50} ppb***	***IE_{95} ppb***
Piriproxifeno	0,175 ± 0,024	0,919 ± 0,288
Triflumuron	0,037 ± 0,010	0,914 ± 0,66

Tabla 4. *Parámetros estimados por el modelo de regresión logística y sus correspondientes niveles de significancia.*

Insecticida	**Parámetro**	**Valor**	**Error**	**P**
Piriproxifeno	pendiente	-1.326	0.211	1.905e-08
Piriproxifeno	IE 50	0.175	0.024	5.328e-10
Triflumuron	pendiente	-0.68	0.140	2.844e-05
Triflumuron	IE 50	0.037	0.010	0.001166

Tabla 5. *F-Test de falta de ajuste para ambos insecticidas.*

	Grados de libertad	***F***	***P***
Piriproxifeno	*81*	*0,24*	*0,86*
Triflumuron	*40*	*0,28*	*0,75*

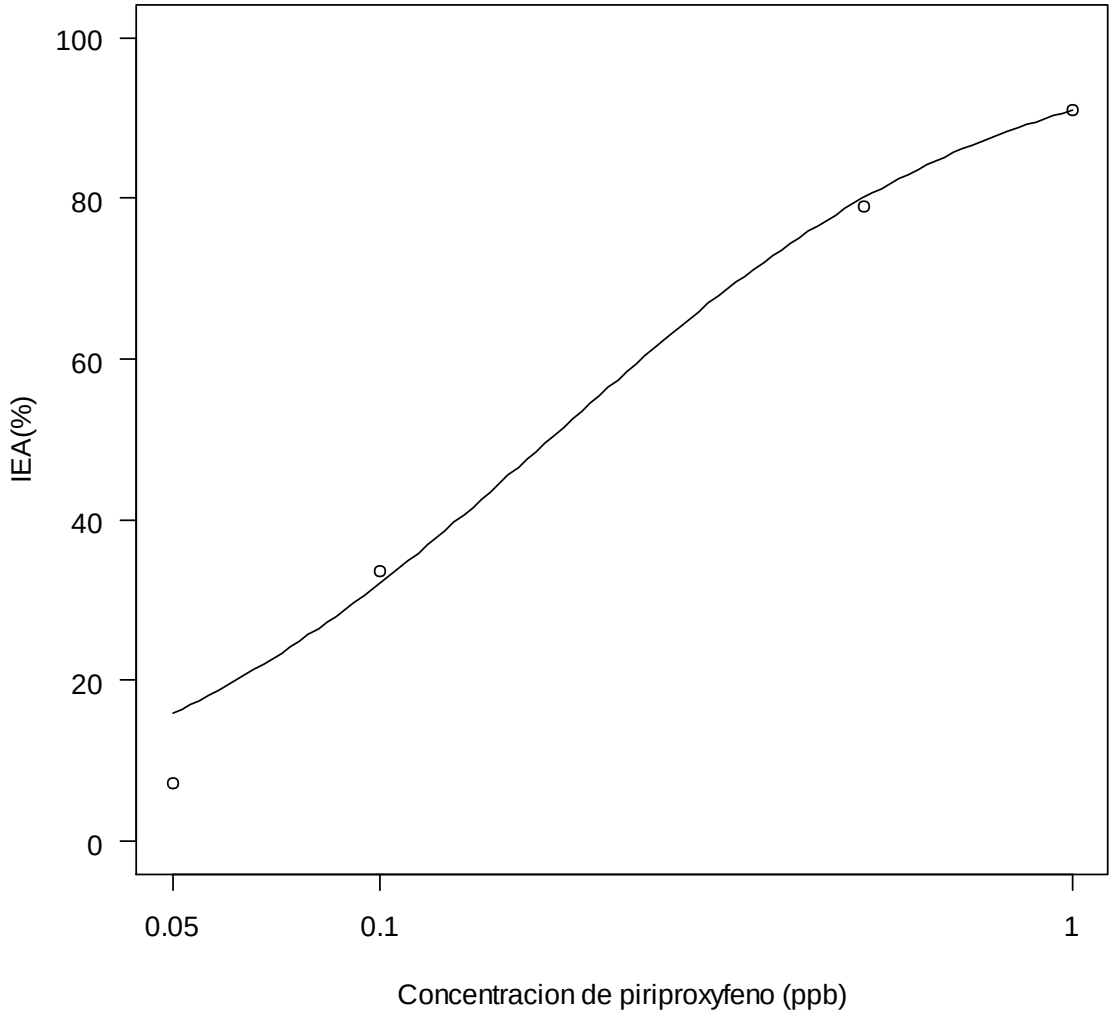


Gráfico 2. Curva dosis (ppb) - respuesta (IE %) para el insecticida piriproxifeno. Los círculos representan los valores medios para cada concentración evaluada.

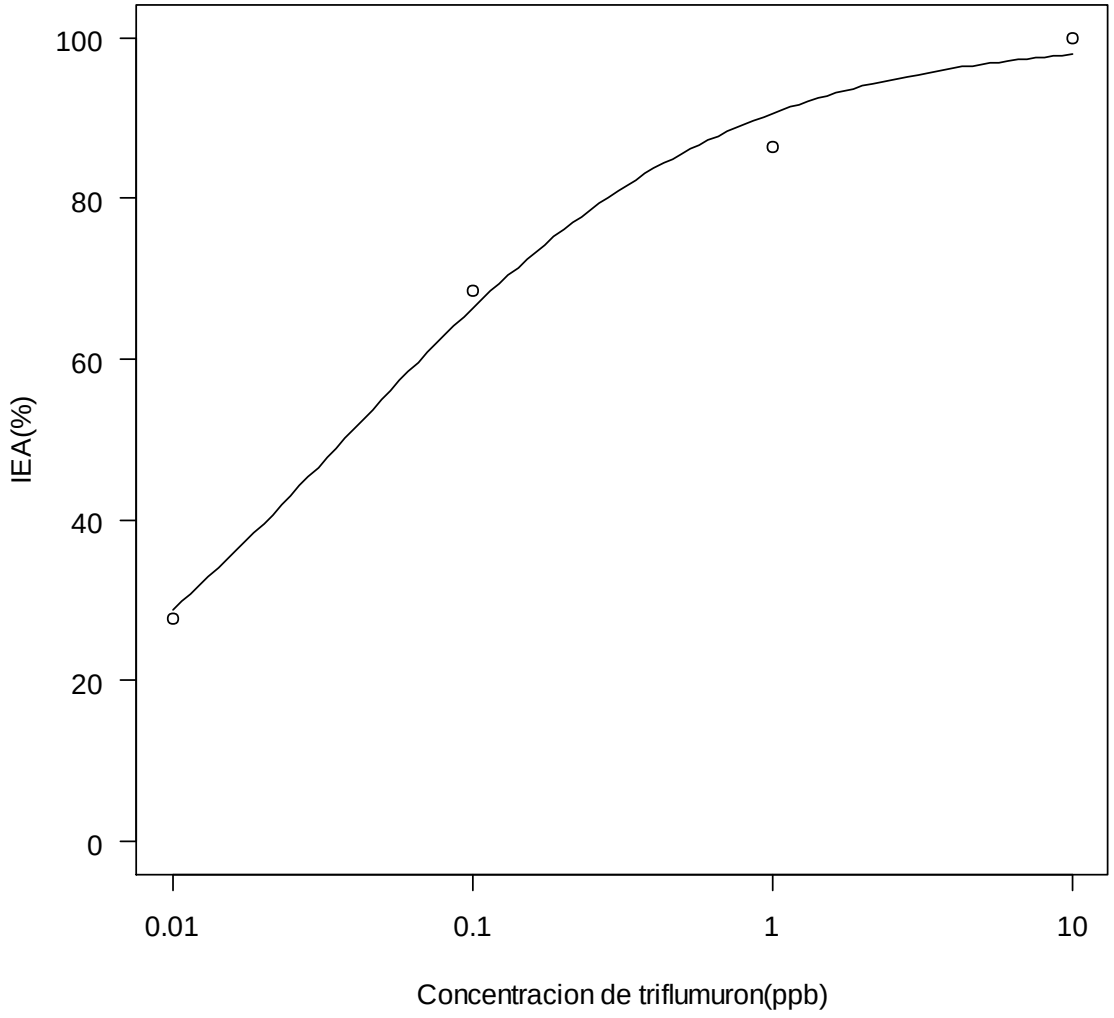


Gráfico 3. Curva dosis (ppb) – respuesta (IE %) para el insecticida triflumuron. Los círculos representan los valores medios para cada concentración evaluada.

DISCUSIÓN

Aedes Aegypti es vector de virosis tales como dengue, zika, chikungunya, fiebre amarilla. Dichas enfermedades impactan directamente sobre los seres humanos debido a que el ciclo biológico de este insecto se desarrolla principalmente en áreas urbanas. Según la Organización Panamericana de la Salud (PAHO), en el continente americano durante los años 2017 y 2018 se registraron respectivamente: 483.208 casos de dengue con 253 muertes (PAHO/WHO, 2017a), 123.087 casos de chikungunya con 107 muertes (PAHO/WHO, 2017 b), y 223.336 casos de Zika con 20 muertes y 3.720 casos confirmados de síndromes congénitos asociados a la infección del Zika durante el embarazo, como microcefalia y síndrome de Guillain-Barré (PAHO/WHO, 2018). En este contexto la PAHO instó a los países de la región a que impulsen la investigación científica sobre nuevas herramientas técnicas y ejecuten evaluaciones permanentes de las existentes para lograr el mayor impacto en el control vectorial (PAHO/WHO, 2018).

El control de estadios acuáticos -larvas y pupas- del mosquito es una de las estrategias elegidas para mitigar el impacto de las enfermedades que transmiten. El insecticida más usado en los últimos 40 años ha sido el COFA temefos. Sin embargo, ha sido reportado que este insecticida implica una seria amenaza al ambiente al matar especies no blanco y atacando la biodiversidad (Becker et al., 2010).

Los IGRs son una nueva clase de insecticidas que alteran el balance hormonal en los estadios inmaduros de los insectos, afectando el crecimiento y desarrollo (Pener & Dhadialla, 2012). Además, se ha determinado que estos compuestos tienen un bajo impacto ambiental y en organismos no blanco. En general, los IGRs han mostrado un buen margen de seguridad para el personal que los aplica y para los organismos no blanco, incluyendo peces y aves (Miura & Takahashi, 1973, 1975). Estos atributos de los IGRs aumentan el potencial de ser usados más frecuentemente para el control de vectores, especialmente del mosquito (Mulla, 1995)

Piriproxifeno y triflumuron son dos IGRs muy efectivos disponibles para el control de las larvas de mosquito, pero no se han reportado demasiados datos comparativos para sus diferentes formulaciones (Licastro et al., 2010). Para contribuir al control de los estadios inmaduros de los mosquitos utilizando métodos con bajo impacto ambiental, evaluamos, bajo condiciones de laboratorio, la eficacia comercial de dos formulados IGRs en una población colonizada de *Ae*. *Aegypti* provenientes de huevos recolectados de la ciudad de Rosario.

En bioensayos, el estadio larval del mosquito mostró una alta susceptibilidad a los dos insecticidas, incluso a dosis 10 veces menores a las recomendadas para su uso a campo (WHO, 2012). Hay una fuerte evidencia que tanto el piriproxifeno como el triflumuron compuestos inhiben la emergencia de los mosquitos adultos cuando las larvas son expuestas a concentraciones menores a 10 ug/L (Belinato, Martins, Lima & Valle, 2013; Maoz et al., 2017). No obstante, los efectos no suelen ser los mismo cuando otros estadios del mosquito son expuestos a los IGRs. En nuestro experimento, las pupas expuestas hasta 100ug/L no mostraron mortalidad alguna en ellas o en el estadio adulto siguiente. Resultados similares fueron reportados en pupas de otras especies de mosquitos mantenida en diferentes concentraciones de IGR. Se ha sugerido que la tolerancia observada en pupas no estaría relacionada con cambios estructurales de sus cutículas (esclerotización) sino que podría estar influenciada principalmente por una disminución de la sensibilidad celular (Kono, Iwabuchi & Takahashi, 1997; Lan & Grier, 2004).

Los IGRs se comercializan en formulados que, además del compuesto activo, presentan el agregado de otras sustancias con el fin de mejorar su eficacia. El grado de toxicidad de los formulados se determina calculando las concentraciones IE_{50-90} de acuerdo a protocolos establecidos. De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestros experimentos el formulado *Starycide*® resulto más potente (menor valor de IE_{50}) para la cepa de *Ae Aegypti* provista por el municipio que la formulación *Dragon*® (tabla 3). Es importante recalcar que, si bien estos parámetros (IE_{50-90} %) son útiles para comparar la eficacia de los productos, es conocido que las concentraciones de campo utilizadas para las estrategias de control son más altas que los valores de IE_{50} obtenidos en el laboratorio (Paul, Harrington & Scott, 2006).

Respecto al piriproxifeno, la mayoría de los experimentos reportados en la bibliografía se llevan a cabo empleando el ingrediente activo puro o en formulado sólido (gránulos). A la fecha, son limitados los estudios que examinan la eficacia del piriproxifeno sobre mosquitos utilizando las formulaciones líquidas (Maoz et al., 2017).

En esta tesis evaluamos la eficacia de un concentrado emulsionable (líquido) desarrollado en Argentina (*Dragon*®, piriproxifeno 2%). Los ensayos de toxicidad arrojaron un valor de IE_{50} = 0.17ppb. Dicha concentración resultó menor a la reportada con otras formulaciones de piriproxifeno comúnmente usadas para el control de mosquitos. Por ejemplo, Marina et al. (2018), utilizando la formulación comercial *Knack CE*, (11.2% piriproxifeno) obtuvieron una IE_{50} de 20 ppb en una cepa de *Aedes* recolectada en la ciudad de México y colonizada durante

6 meses en insectario. Por su parte, Berti, Manzo, Ramos & Guerra (2013) evaluaron la eficacia del producto *Sumilarv G* de formulación granulada con el 0,5% de piriproxifeno contra una cepa de Aedes colonizada durante 5 años obteniendo IE superiores al 90% con una concentración de 2ppb. Así mismo, Al-Azab et al. (2013), empleando el mismo producto reportaron una IE_{50} de 3ppb en cepas de *Aedes* recolectadas en la ciudad de Yeda (Arabia Saudita). Por el contrario, Sihuincha et al. (2005), reportaron una extrema efectividad de *Sumilary G* en una población local de *Ae. Aegypti* (IE_{50} = 0.012ppb). Respecto a la formulación de piriproxifeno empleada en esta tesis (*Dragon®)*, a la fecha no hay reportes sobre su eficacia en cepas de *Ae. Aegypti*. La IE_{50} determinada en nuestros experimentos sugiere una alta efectividad del producto, no obstante, debemos considerar que el grado de susceptibilidad al piriproxifeno puede variar entre diferentes poblaciones de una misma especie de mosquito (Andrighetti, Cerone, Rigueti, Galvani & Macoris, 2008).

En relación a los efectos fisiológicos que el piriproxifeno ejerce sobre el mosquito, se ha sugerido que podría actuar como un análogo de la hormona juvenil (HJ) (Pener & Dhadialla, 2012). En los insectos, las mudas tienen lugar de un estadio larval al otro, en presencia de altos valores de las hormonas HJ y ecdisona (otra hormona implicada en el desarrollo). Un exceso de ecdisona causa la muda. En cambio, valores muy altos de HJ mantienen al mosquito en su estado larval. Cuando el insecto alcanza el punto crítico de su metamorfosis para pasar de larva a la fase pupa, los valores de la HJ bajan. En larvas del cuarto estadio, que presentan niveles bajos de HJ, el insecticida interfiere en la metamorfosis mediada por ecdisona y por consiguiente en el desarrollo, lo que resulta en la inhibición del desarrollo del adulto (Invest & Lucas, 2008).

Los procesos bioquímicos implicados en la muda de un insecto requieren de una óptima biosíntesis y degradación de la quitina, uno de los componentes principales de la cutícula. Dado que la cutícula cumple funciones claves en el intercambio de gases y nutrientes una falla en su estructura resulta en la muerte del insecto (Reynolds, 1987). El triflumuron es un tipo de IGR que interfiere con la síntesis de quitina alterando la formación de la nueva cutícula (Pener & Dhadialla, 2012). Adicionalmente, se ha comprobado que la exposición de larvas a dosis subletales de triflumuron afectan la viabilidad y capacidad reproductiva del mosquito adulto, sugiriendo múltiples efectos del triflumuron (Belinato et al., 2009).

Starycide® *SC* 480 es un formulado comercial de IGR con elevada concentración de triflumuron (48%) recomendado para el control de mosquitos (WHO, 2009). La dosis sugerida por el fabricante está en el orden de los 0.12 g/L (Bayer CropScience, 2016). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el producto resultó altamente efectivo contra la cepa de *Ae Aegypti* colonizada en nuestro laboratorio (IE_{50} = 0.037ppb ± 0.010). La elevada susceptibilidad de *Ae. Aegypti* al *Starycide*® reportada en esta tesis podría estar determinada por factores genéticos o epigenéticos asociados a la cepa. Investigaciones efectuadas en diferentes cepas de *Ae. Aegypti* con el mismo producto comercial reportaron valores de IE_{50} % sensiblemente más altos. Por ejemplo, Martins, Belinato, Lima & Valle (2008), determinaron una IE_{50} del orden de 0.8 ppb en una cepa de referencia mantenida continuamente en laboratorio. Por su parte, Batra, Mittal, Adak & Ansari (2005) trabajando con otra cepa demostraron que dosis de 4ppb inhiben completamente la emergencia del mosquito.

CONCLUSIONES

En Argentina, desde la gran epidemia de dengue del 2009 (Zambrini, 2011; Tarragona et al., 2012), las acciones para controlar al mosquito han sido intensificadas por el Ministerio de Salud de la Nación (MSN) en casi todas las provincias del centro y norte del país. Actualmente, el Programa de Control de Vectores recomienda el uso de dos diferentes larvicidas para controlar las poblaciones de mosquitos: temefos y Bacillus Thuringiensis var. Israelensis (MSN, 2015). Sin embargo, resistencia al temefos ha sido reportada en Clorinda y en Iguazú, Argentina, así como en países limítrofes (Lima et al., 2003; Macoris et al., 2003; Braga et al., 2004; Biber et al., 2006; Seccacini et al., 2008b). En este contexto, las evaluaciones de formulaciones IGRs en poblaciones de mosquito de campo es esencial para proveer herramientas de bajo impacto ambiental para los programas de control de vectores ayudando a reducir el uso convencional de insecticidas por las autoridades de salud pública (Seccacini et al., 2008a).

Ae. Aegypti es una especie que no respeta fronteras y que puede ser encontrado en los mismos contenedores de área urbana y periurbana. Información sobre la susceptibilidad de los IGRs podría ayudar a mejorar futuras actividades de control y a generar una línea base de susceptibilidad que permita monitorear la resistencia a estos insecticidas (Seccacini et al., 2008a). En Rosario la presencia del *Ae. Aegypti* se registra desde 1997. Las condiciones climáticas y socioeconómicas son propicias para la proliferación del mosquito. Considerando esto, la ciudad se considera de mediano riesgo para la propagación del virus del dengue (Brote de Dengue en la ciudad de Rosario durante el año 2009, 2009).

En el presente experimento demostramos la buena efectividad de dos formulados comerciales IGRs contra una cepa de *Ae. Aegypti* recolectada a campo a dosis menores que las recomendadas. Si bien, estos productos podrían considerarse una alternativa para el control de mosquitos en la ciudad, es importante recalcar que los resultados provienen de experimentos realizados en laboratorio y, por este motivo, no pueden utilizarse para predecir la eficacia de las formulaciones en condiciones reales ya que la exposición a factores ambientales no controlables como la luz solar, temperatura, humedad y concentraciones de materia orgánica pueden reducir la acción de los insecticidas. En este sentido, se sugiere la necesidad de una prueba de campo a gran escala para determinar la eficacia de los productos

y garantizar su correcto uso en programas de control, priorizando su empleo en cúmulos de aguas urbanas de plazas y parques de la ciudad.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Azab, A. M., Al-ghamdi, K. M., Shaheen, M. A., & Zaituon, A. A. (2013). The Biological Effects of Sumilarv and Flubex on Dengue Fever Vector Aedes aegypti in Jeddah Governorate Saudi Arabia. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, *10*(1), 235-40.

Andrighetti, M. T. M., Cerone, F., Rigueti, M., Galvani, K. C., & Macoris, M. D. L. D. G. (2008). Effect of pyriproxyfen in Aedes aegypti populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos.

Batra, C. P., Mittal, P. K., Adak, T., & Ansari, M. A. (2005). Efficacy of IGR compound Starycide 480 SC (Triflumuron) against mosquito larvae in clear and polluted water. *Journal of vector borne diseases*, *42*(3), 109.

Bayer CropScience. (2016). Recuperado de https://www.saudeanimal.bayer.com.br/pt/produtos/visualizar.php?codProduto=starycide-sc-480

Becker, N., Petrić, D., Boase, C., Lane, J., Zgomba, M., Dahl, C., & Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and their control* (Vol. 2). Heidelberg: Springer.

Belinato, T. A., Martins, A. J., Lima, J. B. P., Lima-Camara, T. N. D., Peixoto, A. A., & Valle, D. (2009). Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of Aedes aegypti. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*(1), 43-47.

Belinato, T. A., Martins, A. J., Lima, J. B. P., & Valle, D. (2013). Effect of triflumuron, a chitin synthesis inhibitor, on Aedes aegypti, Aedes albopictus and Culex quinquefasciatus under laboratory conditions. Parasites & vectors, 6(1), 83.

Berti, J., Manzo, D., Ramos, M., & Guerra, L. A. (2013). Eficacia y actividad residual del regulador de crecimiento pyriproxyfen sobre larvas de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. Boletín de Malariología y Salud Ambiental, 53(1), 56-64.

Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., ... & Myers, M. F. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, *496*(7446), 504.

Bisset, J., Blanco, S., Braga, I., Coto, H., Masuh, H., Moncayo, A., ... & Zerba, E. (2005). Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie Aedes aegypti [Protocol to evaluate the susceptibility or resistance to insecticides by Aedes aegypti mosquitoes]. *Available from the Latin American Network for Vector Control (RELCOV), Fundación Mundo Sano, Buenos Aires, Argentina [accessed September 29, 2008], http://www.mundosano.org/publicaciones/publicaciones3.php*.

Braga, I. A., Lima, J. B. P., Soares, S. D. S., & Valle, D. (2004). Aedes aegypti resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *99*(2), 199-203.

Brote de Dengue en la ciudad de Rosario durante el año 2009. (2009). [ebook] Rosario. Available at: https://www.rosario.gob.ar/mr/epidemiologia/publicaciones-sime/articulos-sime/brote-de-dengue-en-la-ciudad-de-rosario-durante-el-ano-2009 [Accessed 13 Apr. 2019].

Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. (2014). Vector. [Figura]. Recuperado de http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue/vector.html

Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Dengue Vaccine. Recuperado de https://www.cdc.gov/dengue/es/prevention/dengue-vaccine.html

Conde, M., Orjuela, L. I., Castellanos, C. A., Herrera-Varela, M., Licastro, S., & Quiñones, M. L. (2015). Evaluación de la sensibilidad a insecticidas en poblaciones de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) del departamento de Caldas, Colombia, en 2007 y 2011. *Biomédica*, *35*(1).

Duffy, M. R., Chen, T. H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., ... & Guillaumot, L. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, *360*(24), 2536-2543.

Eldridge, B. F. 2004. Mosquitoes, the Culicidae. In Biology of Disease Vectors (2nd ed). Ed. Marquardt, W., B. Kondratieff, G. Moore, J. Freier, H. Hagedorn, W. eds. Biology of disease vectors. 2nd ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press. pp. 95–111.

Fonseca, E. O. L., Macoris, M. D. L. D. G., Santos, R. F. D., Morato, D. G., Isabel, M. D. S. S., Cerqueira, N. A., & Monte-Alegre, A. F. (2019). Experimental study on the action of larvicides in Aedes aegypti populations collected in the Brazilian municipality of Itabuna, Bahia, under simulated field conditions. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, *28*(1).

Gubler, D. J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in microbiology*, *10*(2), 100-103.

Gubler, D. J., & Trent, D. W. (1993). Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infectious agents and disease*, 2(6), 383-393.

Harbach, R. E., & Kitching, I. J. (1998). Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Systematic Entomology*, *23*(4), 327-370.

Invest, J. F., & Lucas, J. R. (2008). Pyriproxyfen as a mosquito larvicide. In *Proceedings of the Sixth International Conference on Urban Pests* (pp. 239-245).

Johnson, B. J., Brosch, D., Christiansen, A., Wells, E., Wells, M., Bhandoola, A. F., ... & Fonseca, D. M. (2018). Neighbors help neighbors control urban mosquitoes. *Scientific reports*, *8*(1), 15797.

Kono, Y., Iwabuchi, K., & Takahashi, M. (1997). Changes in susceptibility to pyriproxyfen, a JH mimic, during late larval and early pupal stages of Culex pipiens molestus. Medical Entomology and Zoology,48(2), 85-89.

Kyle, J. L., & Harris, E. (2008). Global spread and persistence of dengue. *Annu. Rev. Microbiol.*, *62*, 71-92.

Lacey, L. A., & Lacey, C. M. (1990). The medical importance of riceland mosquitoes and their control using alternatives to chemical insecticides. *Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement*, *2*, 1-93.

Lan, Q., & Grier, C. A. (2004). Critical period for pupal commitment in the yellow fever mosquito, Aedes aegypti. *Journal of Insect Physiology*, *50*(7), 667-676.

Licastro, S., Masuh, H., Seccacini, E., Harburguer L., Lucia, A. & Zerba, E. (2010). Innovación en herramientas de control del mosquito Aedes aegypti (Diptera: Culicidae), transmisor del dengue en Argentina. *Ciencia e Investigación*, [online] (Tomo 60 Nº 4), pp.49-57. Available at: http://aargentinapciencias.org/wp-content/uploads/2017/11/revista_cei60-4.pdf [Accessed 13 Apr. 2019].

Lima, E. P., Paiva, M. H. S., de Araújo, A. P., da Silva, É. V. G., da Silva, U. M., de Oliveira, L. N., ... & Wilding, C. S. (2011). Insecticide resistance in Aedes aegypti populations from Ceará, Brazil. *Parasites & vectors*, *4*(1), 5.

Llinás, G. A., Seccacini, E., Gardenal, C. N., & Licastro, S. (2010). Current resistance status to temephos in Aedes aegypti from different regions of Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *105*(1), 113-116.

Maoz, D., Ward, T., Samuel, M., Müller, P., Runge-Ranzinger, S., Toledo, J., ... & Horstick, O. (2017). Community effectiveness of pyriproxyfen as a dengue vector control method: A systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, *11*(7), e0005651.

Marina, C. F., Bond, J. G., Muñoz, J., Valle, J., Quiroz-Martínez, H., Torres-Monzón, J. A., & Williams, T. (2018). Efficacy of larvicides for the control of dengue, Zika, and chikungunya vectors in an urban cemetery in southern Mexico. Parasitology research, 117(6), 1941-1952.

Martins, A. J., Belinato, T. A., Lima, J. B. P., & Valle, D. (2008). Chitin synthesis inhibitor effect on Aedes aegypti populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, *64*(6), 676-680.

Ministerio de Salud de la Nación. (2015). Plaguicidas. Salud del Trabajador. Recuperado de http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000001020cnt-19-plaguicidas_salud_del_trabajador.pdf

Miura, T., & Takahashi, R. M. (1973). Insect developmental inhibitors. 3. Effects on nontarget aquatic organisms. *Journal of economic entomology*, *66*(4), 917-922.

Miura, T., & Takahashi, R. M. (1975). Effects of the IGR, TH6040, on nontarget organisms when utilized as a mosquito control agent. *Mosq. News*, *35*(15), 1-l.

Mulder, R., & Gijswijt, M. J. (1973). The laboratory evaluation of two promising new insecticides which interfere with cuticle deposition. *Pesticide Science*, *4*(5), 737-745.

Mulla, M. S. (1995). The future of insect growth regulators in vector control. *Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News*, *11*(2), 269-273.

Mulla, M. S., Thavara, U., Tawatsin, A., Chompoosri, J., Zaim, M., & Su, T. (2003). Laboratory and field evaluation of novaluron, a new acylurea insect growth regulator, against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*, *28*, 241-254.

Mustafa, M. S., Rasotgi, V., Jain, S., & Gupta, V. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*, *71*(1), 67-70.

Nelson, M. J. (1986). Aedes aegypti: biología y ecología.

Ng, L. C., & Hapuarachchi, H. C. (2010). Tracing the path of Chikungunya virus—evolution and adaptation. *Infection, Genetics and Evolution*, *10*(7), 876-885.

Noble, C. G., Chen, Y. L., Dong, H., Gu, F., Lim, S. P., Schul, W., ... & Shi, P. Y. (2010). Strategies for development of dengue virus inhibitors. *Antiviral research*, *85*(3), 450-462.

Normile, D. (2013). Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. DOI: 10.1126/science.342.6157.415

Oliveira Melo, A. S., Malinger, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P. O., Alves Sampaio, S., & Bispo de Filippis, A. M. (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, *47*(1), 6-7.

Oo, S. Z. M., Thaung, S., Maung, Y. N. M., Aye, K. M., Aung, Z. Z., Thu, H. M., ... & Minakawa, N. (2018). Effectiveness of a novel long-lasting pyriproxyfen larvicide (SumiLarv® 2MR) against Aedes mosquitoes in schools in Yangon, Myanmar. *Parasites & vectors*, *11*(1), 16.

Pan American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO) (2017a). Reported cases of Dengue Fever in the Americas by Country or Territory. Update 27th October 2017, EW 41. Washington, D.C. Descargado de

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=3273&lang=en

Pan American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO) (2017b). Number of Reported cases of Chikungunya Fever in the Americas by Country or Territory. Update 22nd December 2017, EW 51. Washington, D.C. Descargado de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=5927&item=chikungunya &type=statistics&Itemid=40931&lang=en

Pan American Health Organization/World Health Organization (PAHO/WHO) (2018). Zika suspected and confirmed cases reported by countries and territories in the Americas Cumulative cases, 2015-2018. Update 4th January 2018. Washington, D.C. Descargado de https://docs.google.com/viewer?url=https%3A%2F%2Fwww.paho.org%2Fhq%2Findex.php%3Foption%3Dcom_docman%26view%3Ddownload%26category_slug%3Dcasos-acumulados-xls8935%26alias%3D43299-casos-acumulados-zika-4-enero-2018

Parashar, D. S. B., & Prakash, S. (2010). Efficacy of Various Insect Growth Regulators on Organophosphate Resistant Immatures of Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) from Different Geographical Areas of India. *Journal o Γ Entomology*, *7*(1), 33-43.

Paul, A., Harrington, L. C., & Scott, J. G. (2006). Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, *43*(1), 55-60.

Pener, M. P., & Dhadialla, T. S. (2012). An overview of insect growth disruptors; applied aspects. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 43, pp. 1-162). Academic Press.

Pyriproxyfen in Drinking-water. (2004). [ebook] Geneva: World Health Organization. Available at: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/pyriproxyfen.pdf [Accessed 13 Apr. 2019].

Raymond, M. (1985). Presentation d'un programme basic d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah. ORSTOM Ser. Entomol. Med. Parasitol*, *23*, 117-121.

Reiter, P. (2010). Yellow fever and dengue: a threat to Europe? *Eurosurveillance*, *15*(10), 19509.

Reynolds, S. E. (1987). The cuticle, growth and moulting in insects: the essential background to the action of acylurea insecticides. *Pesticide Science*, *20*(2), 131-146.

Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-response analysis using R. *PloS one*, *10*(12), e0146021.

Rodríguez Cruz, R. (2002). Estrategias para el control del dengue y del Aedes aegypti en las Américas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, *54*(3), 189-201.

Rodríguez, M. M., Bisset, J. A., & Fernández, D. (2007). Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in Aedes aegypti from some Latin American countries. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *23*(4), 420-430.

Rossi, G. C., & Almirón, W. R. (2004). Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina. *Buenos Aires: Fundación Mundo Sano*.

Roth, A., Mercier, A., Lepers, C., Hoy, D., Duituturaga, S., Benyon, E., ... & Souares, Y. (2014). Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections–an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveillance*, *19*(41), 20929.

Rubio, A., Cardo, M. V., Junges, M. T., Carbajo, A. E., & Vezzani, D. (2018). Field efficacy of triflumuron against Aedes and Culex mosquitoes in temperate Argentina. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *21*(1), 150-155.

Seccacini, E., Lucia, A., Harburguer, L., Zerba, E., Licastro, S., & Masuh, H. (2008a). Effectiveness of pyriproxyfen and diflubenzuron formulations as larvicides against Aedes aegypti. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *24*(3), 398-404.

Seccacini, E., Lucia, A., Zerba, E., Licastro, S., & Masuh, H. (2008b). Aedes aegypti resistance to temephos in Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *24*(4), 608-610.

Seefeldt, S. S., Jensen, J. E., & Fuerst, E. P. (1995). Log-logistic analysis of herbicide dose-response relationships. *Weed technology*, *9*(2), 218-227.

Sihuincha, M., Zamora-Perea, E., Orellana-Rios, W., Stancil, J. D., Lopez-Sifuentes, V., Vidal-Ore, C., & Devine, G. J. (2005). Potential use of pyriproxyfen for control of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Peru. *Journal of Medical Entomology*, *42*(4), 620-630.

Su, T., Cheng, M. L., Melgoza, A., & Thieme, J. (2014). Laboratory and Field Evaluations of Mosquiron® 0.12 CRD, a New Formulation of Novaluron, Against Culex Mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *30*(4), 284-291

Thiberville, S. D., Moyen, N., Dupuis-Maguiraga, L., Nougairede, A., Gould, E. A., Roques, P., & de Lamballerie, X. (2013). Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral research*, *99*(3), 345-370.

Tolle, M. A. (2009). Mosquito-borne diseases. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, *39*(4), 97-140.

Villarreal Salazar, L. I. (2012). *Determinación de las concentraciones diagnósticas de los reguladores de crecimiento de insectos piriproxifen y diflubenzurón para Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) cepa Rockefeller y el estado de la resistencia de seis poblaciones de campo en Colombia* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

Vythilingam, I., Luz, B. M., Hanni, R., Beng, T. S., & Huat, T. C. (2005). Laboratory and field evaluation of the insect growth regulator pyriproxyfen (Sumilarv 0.5 G) against dengue vectors. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *21*(3), 296-301.

Whitehorn, J., & Farrar, J. (2010). Dengue. *British medical bulletin*.

World Health Organization. (2001). Report of the fourth WHOPES working group meeting. In *WHOPES working group meeting, 4th*. WHO.

World Health Organization, Special Programme for Research, Training in Tropical Diseases, World Health Organization. Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization. Epidemic, & Pandemic Alert. (2009). *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. World Health Organization.

World Health Organization. (2012). Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020.

World Health Organization. (2017). Dengue vaccine: WHO position paper, July 2016–recommendations. *Vaccine*, *35*(9), 1200-1201.

Zambrini, D. A. B. (2011). Lecciones desatendidas entorno a la epidemia de dengue en Argentina, 2009. *Revista de Saúde Pública*, *45*, 428-431.

ANEXOS

Rosario, 25 de octubre de 2019

Universidad Abierta Interamericana

Sede regional Rosario

Sr. Director de la carrera de Medicina

Dr. Weisburd Guillermo

S / D

De mi mayor consideración quien suscribe, Dr. Lic. Forlani Lucas, declara por medio de la presente hacerse cargo de la tutoría del trabajo final de la carrera de medicina titulado "Susceptibilidad a insecticidas comerciales reguladores del crecimiento en larvas y pupas del mosquito *Aedes Aegypti*", cuyo autor es el alumno Torrano Juan Martin del sexto año de medicina, habiendo supervisado el plan de trabajo correspondiente. Autorizo su presentación para la evaluación y me comprometo a acompañarlo en el acto de defensa.
Sin otra particularidad, saludo atentamente.

Dr. Lic. Lucas Forlani

Juan Martin Torrano

Rosario, 25 de octubre de 2019

Universidad Abierta Interamericana

Sede regional Rosario

Sr. Director de la carrera de Medicina

Dr. Weisbard Guillermo

S / D

De mi mayor consideración quien suscribe, Dra. Travella Cecilia, declara por medio de la presente hacerse cargo de la co-tutoría del trabajo final de la carrera de medicina titulado "Susceptibilidad a insecticidas comerciales reguladores del crecimiento en larvas y pupas del mosquito *Aedes Aegypti*", cuyo autor es el alumno Torrano Juan Martín del sexto año de medicina, habiendo supervisado el plan de trabajo correspondiente. Autorizo su presentación para la evaluación y me comprometo a acompañarlo en el acto de defensa.
Sin otra particularidad, saludo atentamente.

Mg. Cecilia Travella
Toxicóloga
M. 11771- R.G. 51010

Dra Cecilia Travella

Juan Martín Torrano

Rosario, 12 de abril de 2019

Universidad Abierta Interamericana

Centro de Altos Estudios en Ciencias Humanas y de la Salud

Sra. Directora

Dra. Agostini Marcela

S / D

De mi mayor consideración por medio de la presente, me dirijo a Ud. A fin de solicitar su autorización para realizar mi trabajo final en el Bioterio de la Universidad Abierta Interamericana, titulado "Susceptibilidad a insecticidas comerciales reguladores del crecimiento en larvas y pupas del mosquito *Aedes Aegypti*", bajo la supervisión del Dr. Lucas Forlani, quien está a cargo de la tutoría.

Sin otra particularidad, saludo atentamente.

Dra. Marcela Agostini

Torrano Juan Martín