

Control biorracional de Triatominos con hongos entomopatógenos: experiencia del laboratorio de entomología, parasitología y medicina tropical (LEPAMET).

(Biorational control of Triatomines with entomopathogenic fungi: laboratory experience of entomology, parasitology and tropical medicine. (LEPAMET))

Dalmiro J. Cazorla Perfetti

Laboratorio de Entomología, Parasitología y Medicina Tropical (L.E.P.A.M.E.T.), Centro de Investigaciones Biomédicas (C.I.B.), Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda" (UNEFM),

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, control biológico, enfermedad de Chagas, triatominos, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma maculata*.

Key Words: *Beauveria bassiana*, biological control, Chagas disease, triatomine, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma maculata*.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana se encuentra entre una de las más temibles enfermedades metaxénicas del continente americano. Los recientes hallazgos epidémicos de numerosos casos de la protozoosis en la Gran Caracas, confirma que esta enfermedad metaxénica está lejos de ser eliminada y, dada su condición de enzootia, mucho menos erradicada. En virtud de la elevada toxicidad de las drogas en uso (i.e, Nifurtimox® y Benznidazole®), y de que aún no se ha desarrollado una vacuna efectiva, la única medida profiláctica actual de control que evita la adquisición del *Trypanosoma cruzi*, es mediante la aplicación de insecticidas de origen químico contra las poblaciones triatominas involucradas en el ciclo doméstico de transmisión del hemoflagelado, siendo impráctica y poco viable esta medida contra las poblaciones de vectores de hábitos peridomésticos y selváticos. No obstante, el uso de insecticidas de origen químico posee los inconvenientes de que muchas veces los insectos adquieren resistencia hacia ellos, además de que generan problemas de toxicidad aguda y crónica para el humano, sus animales y el ecosistema en general. Como parte de un proyecto global para seleccionar potenciales micoinsecticidas altamente virulentos, y adaptados a las condiciones ambientales del medio venezolano, para futuros programas integrados de control biorracional contra triatominos vectores de la enfermedad

de Chagas, en la presente disertación se dan detalles de las experiencias que durante más de 10 años ha venido realizando el LEPAMET en esta área de investigación. En una primera fase se ha logrado ubicar 13 aislamientos nativos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Ascomycota), y se han coleccionado muestras de suelos de varios estados del territorio nacional para continuar incrementado nuestra micoteca. Posteriormente, se ha iniciado la caracterización "in Vitro" (medio sólido) tanto morfológica como fisiológica (germinación) de los 13 aislamientos nativos de *B. bassiana*, evaluándose así mismo su acción entomocida sobre ninfas y/o adultos de *Rhodnius prolixus* y/o *Triatoma maculata*, importantes vectores de la enfermedad de Chagas en Venezuela, y sobre la ultraestructura e histopatología de la relación íntima hongo-hospedador en la dinámica y modo de infección del hiphomiceto hacia los triatominos. Por último, se ha ensayado sobre ratones albinos, incluyendo un grupo inmunosuprimido (dexametasona), la toxicidad aguda y crónica y patogenicidad del aislamiento LF14 por vías oral, dérmica e inhalatoria. La morfología macroscópica y microscópica confirmaron que aunque presentaron variaciones intraespecíficas, no obstante, efectivamente todos los aislamientos pertenecen a la especie *B. bassiana*; sin embargo, se debe señalar que aún se necesita realizar los patrones de ADN (caracterización molecular) para tener una caracterización definitiva y válida de los 13 aislamientos fúngicos. La temperatura posee un efecto altamente significativo ($P < 0,0000$) sobre el proceso germinativo de las conidias de los 13 aislamientos fúngicos ensayados. Con excepción de los 6 y 40 °C, los conidios germinaron en las restantes temperaturas probadas (9-38°C). En promedio los porcentajes de germinación se incrementaron significativamente ($P < 0,0000$) desde los 9, 12 y 15 °C hasta 18-30°C, alcanzándose en la mayoría de los aislamientos porcentajes promedios de germinación >90% en el rango 18-30°C. A pesar de lo descrito, se detectaron diferencias estadísticamente significativas

E- mail: lutzomyia@hotmail.com; cdalmiro@gmail.com.

Recibido: 13 - 05 - 2010

Aceptado: 08 - 07 - 2010

On line: <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/talleres/index>
<http://talleresulajwt.blogspot.com>

($P < 0,0000$) entre los aislamientos a lo largo del gradiente térmico. De una manera general se observa que la germinación de los 13 aislamientos decreció significativamente ($P < 0,0000$) con el incremento de la [NaCl], y se inhibió completamente a la [NaCl] del 5% v/v. Sin embargo, cuando se hace el análisis comparativo de las diferencias entre aislamientos se detectan diferencias significativas ($P < 0,0000$). En el rango de pH entre 5 y 11,86, los 13 aislamientos mostraron porcentajes elevados de germinación (72-100%), inhibiéndose significativamente ($P < 0,0000$) el proceso a partir del pH 4 (0,88-41,1%), hasta que a los pH 2 y 3 no se observó germinación de los conidios. Cuando se hace el análisis comparativo entre los distintos aislamientos del hipfomiceto, también se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,0000$). El análisis reveló que la tasa de germinación de los 13 aislamientos ensayados decreció significativamente ($P < 0,0000$) con el incremento de la [H₂O₂], y se inhibió completamente a partir de la [H₂O₂] del 0,14%. Asimismo, se observó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos aislamientos del hipfomiceto ($P < 0,0000$). Cuando se hace el análisis tanto en las formulaciones fúngicas hechas en soluciones acuosas (control) como aquellas obtenidas de base aceitosa, incluyendo las de origen orgánico (maíz, soya, girasol, canola, oliva) o mineral, los porcentajes de germinación fueron elevados (>99%) para todos los aislamientos ensayados del hongo, no obteniéndose diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de aceites ni entre aislamientos ($P > 0,05$). Se observó un efecto altamente significativo de los surfactantes (Tween 20, 80), su concentración y de los diferentes aislamientos sobre los porcentajes promedio de germinación ($P < 0,0000$). El efecto inhibitorio más pronunciado se observó en los aislamientos LF02 y LF03 con la exposición al surfactante Tween 20, a partir de la [10%], obteniéndose porcentajes promedios de germinación de 15,1-46,5% y 12,6-19,9%, respectivamente, siendo mayor el efecto inhibitorio a la [25%]. El tiempo de exposición a la radiaciones UVC y solar afectó significativamente ($P < 0,0000$), cuando se compara con los cultivos controles no expuestos, el proceso de germinación de las conidias, bastando con 1 hora de exposición para inhibirlo completamente, independientemente del aislamiento y de la sustancia natural agregada a las conidias (aceite de soya o leche descremada) ($P > 0,05$). La composición del medio de cultivo posee un efecto significativo ($P < 0,0000$) sobre la tasa de germinación de las conidias de los 13 aislamientos de *B. bassiana* evaluados. En los medios Agar-sabouraud, A-lactrimel, A-auyama, A-lactrisomil, A-isomil, A-ocumo blanco y A-arroz se obtuvieron porcentajes de germinación entre 90- 100, para los 13 aislamientos fúngicos. Los % más bajos de germinación conidial se pre-

sentaron en Medio- Mínimo (3,8 -38,5%). En los restantes medios se observa que los porcentajes de germinación entre los distintos aislamientos fue significativamente variable ($P < 0,0000$). Los insecticidas químicos afectan significativamente ($P < 0,0000$) la germinación "In Vitro" de los 13 aislamientos ensayados, los cuales similarmente muestran un comportamiento diferencial significativo ($P < 0,0000$). La Cipermetrina manifestó un comportamiento esporocida sobre todos los 13 aislamientos. El porcentaje promedio de germinación fue afectado en >90%, especialmente a las dosis más altas, en todos los aislamientos, con respecto al testigo (control), por Malatión (92,8- 99,9%) y Fenitrotrión (93,6- 100%), y en >80% (83,2-100%) por Deltametrina. Con respecto a Amitraz, el efecto perjudicial sobre la germinación de los conidios se manifestó en un amplio rango dependiendo del aislamiento, teniéndose promedios desde 0% hasta 96,7%. Cuando se analiza el efecto dosis, de una manera global se observa una disminución significativa ($P < 0,0000$) sobre la germinación conidial. Los análisis de supervivencia (Kaplan-Meier y prueba de Gehan- Wilkinson) mostraron que a pesar de que en todas las dosis probadas (1 x 10⁵: 1; 3 x 10⁵: 2; 1 x 10⁶: 3; 3 x 10⁶: 4; 1 x 10⁷: 5; 3 x 10⁷) del aislamiento LF14 de *B. bassiana*, las tasas de mortalidad fueron tácitamente elevadas en todos los estadios de desarrollo de *R. prolixus*, no obstante, la susceptibilidad aparece incrementándose con la edad: I y II < III, IV, V y los adultos, con % de eficacia menores y LT50, CL50 y CL90 mayores. De una manera general se observó en todos los estadios de *R. prolixus*, un efecto "Dosis dependiente", al tenerse mayores porcentajes de mortalidad y de eficacia y un menor LT50 con el aumento de la concentración de conidias. Cuando se hace el análisis de los porcentajes de conidiación, se tiene que los cadáveres de cualquier estadio de *R. prolixus* expuestos previamente a cualquier concentración de conidias del hipfomiceto, exhibieron esporulación por encima del 94%. El aislamiento LF14 de *B. bassiana* probado a dosis de 1 x 10⁷ conidias/ml sobre ninfas y adultos de *R. prolixus* a HR del 55%, indujo porcentajes de mortalidad acumulada >80%, incrementándose la susceptibilidad diferencial con la edad de los insectos. Los porcentajes de conidiación acumulada fueron elevados: 95,95-100%. Cuando se hace la comparación entre los estadios de desarrollo de *R. prolixus* en los ensayos hechos a HR elevada (>90%) y baja HR (55%), se tiene que a la HR cercana a la saturación la acción del aislamiento LF14 de *B. bassiana* a la dosis de 1 x 10⁷ conidias/ml y 26°C es más eficiente, tal como lo demuestra el hecho de obtenerse mayores % de mortalidad acumulada y eficacia en ninfas I, II, III, y TL50 más bajos que a 55%HR. En el rango térmico de 15-30°C, aun a la temperatura

de 15°C la acción del aislamiento LF14 de *B. bassiana* (1 x 10⁷ conidias/ml) sobre ninfas IV de *R. prolixus* indujo un porcentaje de mortalidad acumulada de 91,25% y eficacia de 90,28%, aunque el TL50 resultó elevado (13 días). A 35 y 40°C se presentó una mortalidad acumulada del 100%, similar comportamiento exhibieron las ninfas no expuestas (i.e., controles) a la acción del hifomiceto, lo que aparece como un efecto mortal de las elevadas temperaturas; Los porcentajes de conidiación acumulada se mostraron >85% en el rango térmico 15-30°C. Al determinarse la acción biocontroladora de los 13 aislamientos de *B. bassiana* (1 x 10⁷ conidias/ml) sobre las ninfas IV de *R. prolixus*, se encontró que los mayores % de mortalidad acumulada, eficacia y menores TL50 los causaron los aislamientos LF14 y LF13 (100, 100 y 3; 96,25, 96,25 y 5, respectivamente). Por contraste, los aislamientos LF03 y LF02 alcanzaron guarismos menos eficientes para los dos primeros parámetros mencionados: 13,75, 13,75; 47,5, 47,5, respectivamente, sin siquiera alcanzar 50% de mortalidad en los insectos. Los % acumulados de esporulación en los cadáveres de las ninfas fueron elevados (>85%) cuando los insectos se expusieron a todos los aislamientos. El análisis de la acción entomocida de los 13 aislamientos de *B. bassiana* aplicados con mezcla de aceite de soya al 50% sobre las ninfas IV de *R. prolixus*, indica que los aislamientos LF03 y LF01 fueron los menos eficientes en relación con % de mortalidad acumulada y eficacia al obtenerse valores significativamente menores (72,5 y 72,5%; 73,75 y 73,75%, respectivamente). Se alcanzaron porcentajes de conidiación >92% en los cadáveres de las ninfas con la aplicación de todos los aislamientos. Cuando se hace la comparación entre las formulaciones acuosas de los 13 aislamientos y las de base aceitosa, se tiene que globalmente hubo una mejora con la adición del aceite, en lo que se refiere al incremento de los % de mortalidad y eficacia, y en la reducción del TL50. Similar comportamiento se observó en ninfas IV de *T. maculata* expuestas a soluciones aceitosas del aislamiento LF14. Los estudios histopatológicos y ultraestructurales confirmaron que las conidias de *B. bassiana* penetran vía tegumento y de las traqueolas a sus triatominos-hospedadores. Los insectos tardan

entre 2-7 días en morir, ocurriendo un cambio en la coloración del tegumento al pasar de su característico color marrón-parduzco cuando se encuentran vivos, a un estado de coloración negruzco o ennegrecido en los cadáveres. El proceso de adherencia, germinación y penetración de las conidias al tegumento se logró captar con los cortes histológicos en las primeras horas de la aplicación del hifomiceto, aunque la adherencia no pareciera tener un sitio específico; la germinación de las conidias sobre la superficie de la cutícula del insecto dura entre las 12 y 18 horas después de la infección. La penetración vía tegumento ocurre entre las 18 y 48 horas después de la infección; las hifas del hongo invaden masivamente el hemocele de los triatominos, logrando infectar y desintegrar la gran mayoría de los tejidos hasta que finalmente ocurre su deceso. Las hifas emergieron a través de las aberturas de la cutícula, empezando por las coxas y tórax, y formaron una capa blanquecina micelial sobre la superficie de los cadáveres alrededor de 5 días post-inoculación, hasta que finalmente ocurrió la esporulación total cuando emergieron las conidias. Las electronegrafías revelaron que las hifas invaden todos los tejidos (músculos, sistema digestivo), hasta colapsar y fenecer el insecto, detectándose una región electrontransparente en el sitio donde penetran las hifas, lo que sugiere una acción de exoenzimas degradando los tejidos. Como parte de la respuesta inmune celular, los hemocitos fagocitan, encapsulan y melanizan, hasta finalmente fenecer, las esporas del hongo hifomiceto. Los ensayos de toxicidad y patogenicidad en ratones albinos mostraron que ocurrió 100% de supervivencia, sin lesiones externas ni cambios en la conducta, y con un aumento de peso corporal en todos los grupos evaluados. Se detectaron conidias viables a nivel del sistema digestivo, pulmones y piel, indicando que no hubo germinación. Asimismo, no se observaron lesiones titulares, por lo que el aislamiento *B. bassiana* LF14 aparece como seguro para este modelo de vertebrado. Los aislamientos nativos de *B. bassiana*, especialmente LF13 y LF14, aparecen como buenos candidatos a ser ensayados en futuros programas de MIP de la enfermedad de Chagas en Venezuela.