



Índices de funcionalidad en las larvas del mosquito *Aedes aegypti* ante la acción del Fipronil: Una aproximación experimental

Functionality indices in *Aedes aegypti* mosquito larvae under the action of Fipronil: An experimental approach

AURORA DEL VALLE BARRIOS RUDAS*, MARCO ANTONIO ÁLVAREZ OCHOA^{1**}, ELIANA NAVARRO^{***}

Resumen

Las características morfofuncionales del estadio larvario de un invertebrado holometábolo como el mosquito *Aedes aegypti*, el principal vector de los arbovirus, han incentivado el uso de este organismo como un modelo alternativo no convencional para las investigaciones en el campo de la toxicología experimental. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de nado, la actividad cardíaca contráctil y el estado de óxido-reducción de las larvas del mosquito *Aedes aegypti* bajo la acción del Fipronil, un agente insecticida de actividad neurotóxica. Se determinó la concentración efectiva cincuenta a las 3 horas de tratamiento; $CE_{50} = 30 \pm 0,011 \mu\text{M}$ con la cual se pudo registrar un 50% de la población larvaria sobreviviente y con signos de intoxicación motora, cardíaca y metabólica. Se evaluó la respuesta larvaria en medio natural de cultivo, en cloroquina y en adrenalina, depresor y estimulante de la función cardíaca, respectivamente. Se realizaron video registros analizados en el programa Tracker Analysis, V5.1, con el programa GraphPad Prim. En cuanto a la intoxicación motora, se obtuvo el índice de variabilidad de la velocidad angular correspondiente al valor de $0,6 \pm 0,02$ con un IC 95% de 0,53 a 0,62 y $p=0,0006$. En cuanto a la intoxicación cardíaca, se obtuvieron los índices de variabilidad de la fuerza y de la energía cinética de la actividad cardíaca contráctil, $0,8124 \pm 0,0201$, IC 95% de 0,7430 a 0,8518, $***p<0,0001$ y de $0,6957 \pm 0,028$, IC 95% de 0,6395 a 0,7510 y $****p<0,0001$, respectivamente. En cuanto el estado metabólico se pudo determinar un avanzado estado de reducción en larvas tratadas con Fipronil. El bioensayo con Fipronil en el modelo larvario, no convencional, de *Aedes aegypti* permitió corroborar su acción sobre la actividad mitocondrial así como la caracterización de índices de variabilidad motora y cardíaca como posibles parámetros morfofuncionales para el diagnóstico de señales de intoxicación inducida por agentes con propiedades neurotóxicas como el Fipronil.

Palabras clave: Larvas del *Aedes aegypti*, Fipronil, índice de variabilidad del comportamiento de nado, índice de variabilidad de la actividad cardíaca contráctil

Abstract

The morphofunctional characteristics of the larval stage of a holometabolous invertebrate such as the *Aedes aegypti* mosquito, the main vector of arboviruses, have encouraged the use of this organism as an alternative non-conventional model for research in the field of experimental toxicology. The objective of the present work was to evaluate the swimming behavior, cardiac contractile activity, and the oxidation-reduction state of *Aedes aegypti* larvae under the action of Fipronil, an insecticidal agent with neurotoxic activity. The effective concentration of fifty at 3 hours of treatment was determined, $EC_{50} = 30 \pm 0.011 \mu\text{M}$ with which it was possible to register 50% of the surviving larval population with signs of motor, cardiac and metabolic intoxication. We tested larval response in natural culture medium, in chloroquine and adrenaline, depressant and stimulant of cardiac function respectively. Video records were made and analyzed in the Tracker Analysis program, V5.1, together with the GraphPad Prism program. Regarding motor intoxication, the angular velocity variability index corresponding to the value of 0.6 ± 0.02 with a 95% CI of 0.53 to 0.62 and $p=0.0006$ was obtained. Regarding cardiac intoxication, the variability indices of force and kinetic energy of cardiac contractile activity were obtained, 0.8124 ± 0.0201 , 95% CI from 0.7430 to 0.8518, $***p<0.0001$ and 0.6957 ± 0.028 , 95% CI from 0.6395 to 0.7510 and $****p<0.0001$, respectively. As soon as the metabolic state could be determined in larvae treated with Fipronil an advanced state of reduction. The bioassay with Fipronil in the unconventional larval model of *Aedes aegypti* allowed to corroborate its action on mitochondrial activity as well as the characterization of motor and cardiac variability indices as possible morphofunctional parameters for the diagnosis of signs of motor, cardiac and metabolic intoxication of agents with neurotoxic properties such as Fipronil.

Keywords: *Aedes aegypti* larvae, Fipronil, swimming behavior variability index, cardiac contractile activity variability index

Sección de Microscopía, Instituto Anatómico José Izquierdo, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. República Bolivariana de Venezuela. Caracas 1040, Distrito Capital. ¹Correspondencia: marco.alvarez@ucv.ve
Orcid: [0000-0002-4712-0793](https://orcid.org/0000-0002-4712-0793)* ; Orcid: [0000-0002-1781-4532](https://orcid.org/0000-0002-1781-4532)** ; Orcid: [0000-0002-4049-061X](https://orcid.org/0000-0002-4049-061X)***

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.10](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.10)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 11/05/2022

Aprobación: 18/05/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 100-110. 2022

Introducción

En los últimos años, los estudios experimentales realizados sobre las características morfofuncionales del estadio larvario de un invertebrado holometábolo como el mosquito *Aedes aegypti*, el principal vector de los arbovirus, han venido incentivado la promoción de este organismo como modelo alternativo no convencional para las investigaciones en el campo de la toxicología experimental (Álvarez y col., 2021a). Dentro de estas características morfofuncionales, medibles y cuantificables, se destacan, su patrón de nado caracterizado por movimientos serpenteantes, con fases de estiramiento y contorsión, que definen un comportamiento de nado (CN) con desplazamiento acuático zigzagueante circular (League y col., 2015). Cabe destacar que dicho movimiento es sensible a la luz ultravioleta (Álvarez y col., 2021b). Por otra parte, su actividad cardíaca se encuentra circunscrita a una estructura en forma de vaso ubicada a lo largo del abdomen y subdividida en la región de la aorta torácica, la cual no participa en la propulsión de la hemolinfa, mientras que la región del corazón abdominal, compuesta por músculo estriado con una visible actividad cardíaca contráctil (ACC) controla la circulación de la hemolinfa (Glenn y col., 2010; Andereck y col., 2010). La ACC ha sido reconocida como una contracción miogénica, sin desestimar que se encuentra regida parcialmente por al menos un componente de control neuronal, ya que responde a los péptidos cardio activos promotores de la disminución de la tasa de contracción y reguladores selectivos del ritmo cardíaco retrógrado en otras especies (Kasai y Cagan, 2010; Dulcis y col., 2001; Ejaz y Lange, 2008; Leódido y col., 2013; Neckameyer y Argue, 2013; Neckameyer y

col., 2000). Las características descritas, particularmente el CN y la ACC, sumadas a su rápida reproducción, su secuencia genómica en estudio (Nene y col., 2007), así como, los insignificantes costos para invertir en su obtención y mantenimiento, hacen de esté un organismo con gran potencial para estudios que profundicen sobre la propia fisiología larvaria, así como la valoración de un modelo experimental no convencional que cumple con el principio de las 3R para ser utilizado en la caracterización de productos químicos contaminantes con actividad tóxica poco valorada. El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar el CN y la ACC de las larvas del mosquito *Aedes aegypti* bajo la acción del Fipronil, un agente insecticida neurotóxico. El Fipronil ha sido considerado como un insecticida de amplio espectro, perteneciente a la familia de los fenilpirazoles que altera el funcionamiento del sistema nervioso central perturbando a las mitocondrias, lo que resulta en un estrés mitocondrial y en un desequilibrio redox, características del definido síndrome de agotamiento del ADN mitocondrial (Souders y col., 2021).

Materiales y Métodos

MODELO LARVARIO DEL *Aedes aegypti* Y FIPRONIL

Para el desarrollo del objetivo propuesto se hizo uso de larvas de *Aedes aegypti* en estadio cuatro (L4) (Figura 1a), obtenidas del reservorio que ha sido descrito en trabajos previos. Las mismas fueron seleccionadas al azar y colocadas en capsulas de 24 pozos a razón de 4 larvas/pozo. La sensibilidad a la luz UV fue evaluado en cada grupo larvario a través de la estimulación con un pulso de luz UV proveniente de un

dispositivo DP-323BE que emite una radiación con una longitud de onda superior a 350 nm. Una vez verificada la respuesta al estímulo, particularmente un incremento en el movimiento zigzagueante, se armaron cuatro grupos larvarios, incluyendo el grupo control, para ser incubados en 50, 100 y 150 μM de Fipronil (Figura 1b). Estas concentraciones fueron seleccionadas a partir de la revisión de los datos obtenido de los Modelos Cuantitativos de Relación Estructura-Actividad (QSAR), vinculados con la fisiología y la ecología del *Aedes aegypti* (Devillers y col., 2014). El grupo control se mantuvo en agua de cultivo. Un ensayo piloto permitió determinar, a través de observación y

monitoreo continuo, la respuesta motriz ante la luz UV, pre y postratamiento con Fipronil, pudiéndose evidenciar una elevada tasa de inmovilización larvaria a las 3 horas de tratamiento; un efecto además dependiente de la concentración y del tiempo de incubación (Figura 1c). Fue a la concentración de $30 \pm 0,011 \mu\text{M}$ donde se pudo registrar un 50% de la población larvaria sobreviviente y con signos de intoxicación, asumiéndose como la Concentración Efectiva Cincuenta a las 3 horas de tratamiento (CE_{50} 3hrs). Este dato fue obtenido con un Intervalo de Confianza (IC) de 95%. La pérdida de la respuesta motriz ante la luz UV fue considerada como un efecto subletal.

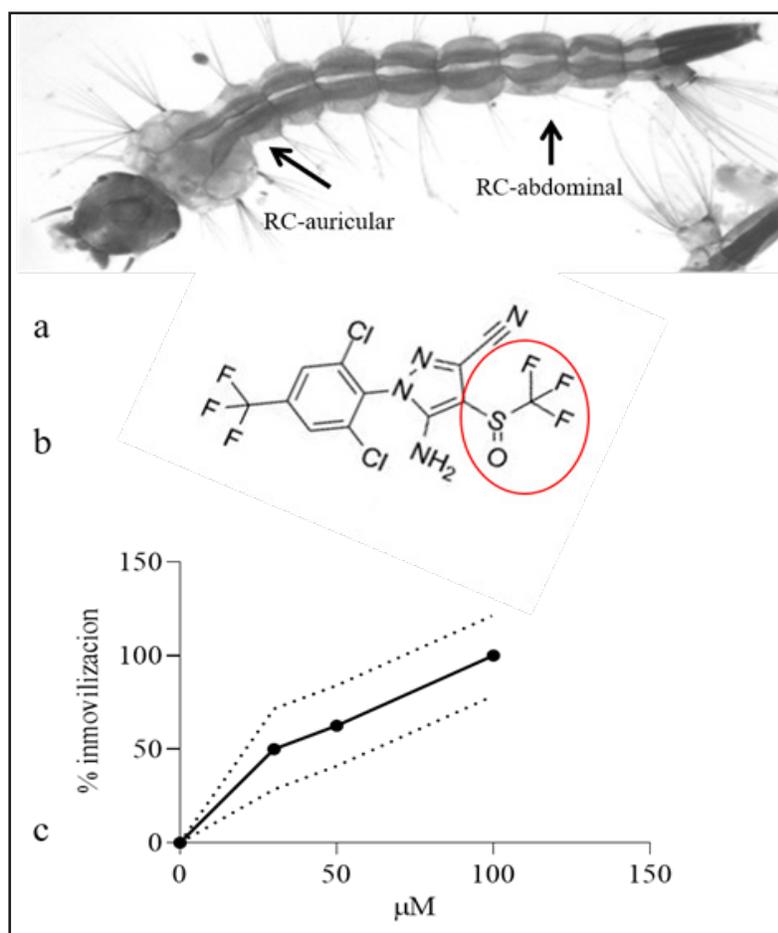


Figura 1. Larva L4 de *Aedes aegypti* (1a). Región Cardíaca (RC), auricular y abdominal. Estructura química de la molécula de Fipronil (1b). Pirazoles de segunda generación que contienen un sustituyente único llamado trifluorometilsulfinil como sitio activo de la molécula. Relación entre el porcentaje de inmovilización ante la luz UV y la concentración de Fipronil (1c). CE_{50} 3hrs = $30 \pm 0,011 \mu\text{M}$. IC95%. N = 4 larvas por concentración. CE: concentración efectiva 50; IC: Intervalo de confianza.

REGISTRO Y VALORACIÓN DE LA CONDUCTA DE NADO

Para el registro de la CN, se realizaron videos de la actividad motora antes de que las poblaciones larvarias fuesen tratadas con la CE_{50} de Fipronil, consideradas como las fases de pretratamiento o control y postratamiento, respectivamente. Para ello, se hizo uso de un portaobjeto con un espacio circunferencial definido por aro metálico colocado sobre el portaobjetos para circunscribir el campo de observación y el área de movimiento larvario. Las larvas seleccionadas al azar fueron colocadas en dicho espacio y observadas a través del lente objetivo de un microscopio estereoscópico Nikon SMZ800, con cámara Nikon adaptada e iluminación episcópica. Una vez enfocadas, se realizaron videos a razón de 15 cuadros/segundo, durante 30 segundos, teniendo cuidado de eliminar posibles fuentes de artefactos de movimiento, así como sombras, reflejos y cambios en la intensidad de la luz o deformaciones en la imagen como resultado de la curvatura de la lente. Para la valoración de la actividad motora, se tomaron en cuenta los ciclos de movimientos cóncavos-convexos considerados como periodos de relajación (larva estirada) y periodos de encogimiento (larva curvada). Dichos ciclos fueron seguidos por un punto de masa, entre la porción cefálica y caudal, a lo largo del video mediante el programa de análisis y construcción de modelos, Tracker (Conklin y col., 2015; Brown, 2007). Dicho procesamiento generó un Tacograma del perfil del movimiento larvario, así como un fichero de datos numéricos que fueron trasladados al Programa Estadístico GraphPad para la valoración de los parámetros angulares como: la velocidad, ω ($^{\circ}$ /seg), y la aceleración angular, α ($^{\circ}$ /seg²). Los valores obtenidos permitieron

establecer una relación de sensibilidad y especificidad para cada uno de ellos, así como, determinar el Valor del Área Bajo la Curva (ABC) o el Índice de Variabilidad del Comportamiento de Nado (IVCN).

REGISTRO Y VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD CARDIACA CONTRÁCTIL

Para el registro de la ACC, las larvas tratadas con la CE_{50} y con su respectivo registro de CN, fueron colocadas en una ranura de 1 mm², diseñada sobre una lámina porta objetos, para reducir la movilidad larvaria durante la realización del video registro de la ACC, como ha sido propuesto en protocolos diseñados por otros autores y modificado para nuestra experimentación (League y col., 2015). Bajo estas condiciones fue posible enfocar y visualizar el área cardiaca abdominal de las larvas a través del menor objetivo de aumento, 10X, de un microscopio de contraste de fase Olympus BX50, con cámara digital Nikon adaptada. Los respectivos videos fueron realizados a razón de 15 cuadros/segundos, durante 30 segundos. La valoración de la ACC se llevó a cabo a través del seguimiento de un punto de ACC circunscrito a un área rectangular de búsqueda definida sobre el área del corazón inmediatamente medial a los troncos traqueales longitudinales, con ayuda del programa de análisis de videos Tracker. Dicho punto de contracción era seguido a lo largo de la secuencia de frame de los respectivos videos. El registro de ACC generó un Tacograma del perfil de ACC, así como un fichero de datos numéricos de los picos (c) de contracción que fueron trasladados al Programa Estadístico GraphPad para la valoración de la frecuencia promedio de contracción (fpc) y del valor del intervalo de picos de contracción (c-c) en función

del tiempo expresado en segundos. Cabe destacar que el valor del intervalo c-c fue estimado de acuerdo con el cálculo utilizado para la obtención del tiempo de duración del intervalo R-R de un electrocardiograma (My EKG, 2022). El valor promedio de la desviación estándar de los intervalos c-c permitió definir la Variabilidad Total de la Actividad Cardíaca Contráctil (VACC-total), así como, el Índice de Variabilidad de la Actividad Cardíaca Contráctil (VACC-índice).

FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL

En un intento por entender la etiología de la variabilidad funcional de las larvas de *Aedes aegypti* tratadas con Fipronil, se realizó un ensayo para la evaluación de la función mitocondrial. Para ello, las larvas sobrevivientes e intoxicadas fueron incubadas en una solución 10 μ M de Verde Janus (VJ), a temperatura ambiente y con exposición a ciclos de luz-oscuridad de 48 hrs. El VJ o 8-[[4-(dimetilamina) fenil] diazenil]-N, N-dietil-10-fenilfenazin-10-io-2-amina es un colorante catiónico lipofílico supra vital que al igual que otros cationes lipofílicos, es captado solo por mitocondrias metabólicamente activas. En su forma oxidada, tiene un color azulado y absorbe al máximo a 595 nm. Tras la reducción por deshidrogenasas mitocondriales, el VJ se convierte en dietilsafranina que es de color rosa. La actividad alterada de la deshidrogenasa mitocondrial a menudo se asocia con daño y disfunción mitocondrial (Ahmad y col., 2018). Las imágenes obtenidas fueron analizadas a través del programa de análisis de imágenes ImageJ -Fiji (Schindelin y col., 2018).

Análisis estadístico

Los valores medios, pre y postratamiento, de las respectivas variables fueron tratados mediante un análisis de la prueba no pareada

y consideradas de manera independientes o no relacionados para determinar así la existencia de una diferencia significativa entre ambos valores medios. También fue realizado el análisis del Área Bajo la Curva ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic) para establecer los posibles índices de variabilidad de los respectivos parámetros. Esto fue realizado a través del programa GraphPad Prim.

Resultados

COMPORTAMIENTO DE NADO

El CN quedó representado a través de un Tacograma caracterizado por un patrón de trazos de movimientos activos (ma) cóncavos-convexos, con una fase de contracción y estiramiento (c-e), seguido de un patrón de trazos de las larvas en posición de estiramiento o inmovilidad (e) (Figura 2a). Luego de las 3 horas de tratamiento con Fipronil, hubo una reducción del patrón de trazos de movimientos activos cóncavo-convexo (ma) con fases de contracción y estiramiento (c-e), caracterizado por un patrón constante de trazos en fase de estiramiento (Figura 2b). La prevalencia de las larvas intoxicadas en la fase de estiramiento fue mayor respecto al estado inicial al tratamiento. Bajo esta condición no hubo respuesta al estímulo UV. Dicho efecto se tradujo en cambios en la velocidad angular (ω) y aceleración angular (α), al comparar la condición pre y postratamiento, se obtuvo una reducción significativa de la ω de 62 rad/seg a 10 rad/seg. De la comparación entre las distintas Áreas Bajo la Curva (ABC) de la relación Sensibilidad/Especificidad de los distintos parámetros angulares (ω y α), resultó de mayor significancia el ABC de la velocidad

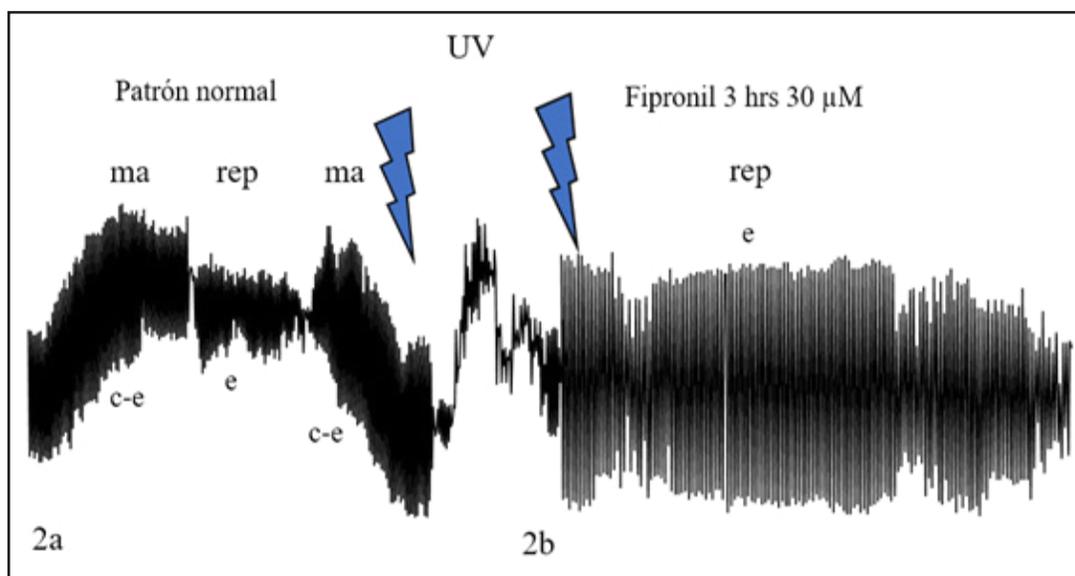


Figura 2. Trazos del patrón de movimiento larvario pretratamiento (2a) y postratamiento (2b) con Fipronil 30 μ M y bajo el estímulo de luz UV. Movimiento activo (ma) con fases de contracción-estiramiento (c-e) y el reposo (rep) en fase de estiramiento (e). Estímulo UV (rayo).

angular, particularmente $0,6 \pm 0,02$ con un IC 95% de 0,53 a 0,62 y $p=0,0006$, traducido en una probabilidad de 60% de seleccionar al azar larvas con reducción de velocidad angular en una población larvaria tratada con Fipronil respecto a la selección en una población control.

ACTIVIDAD CARDIACA CONTRÁCTIL

La ACC fue visualizada a través de un Tacograma que permitió determinar, a partir de las ondas de contracción, las respectivas frecuencias promedio de contracción (fpc), representadas en la condición inicial control (Figura 3a) como una serie de ondas contráctiles (c), con intervalos de tiempo c-c regulares y de amplitud entre -0,2 y 0,2 ms, registradas a largo del vaso dorsal y alternadas entre periodos de sístole y diástole, con un valor inicial de 109 ± 21 c/seg. En la condición de postratamiento con Fipronil (Figura 3b), la fpc quedó representada como una serie de ondas contráctiles (c) de amplitud e intervalos regulares, más, sin embargo,

con un retardo entre los intervalos de aparición de la sístole y la diástole, con un valor de fcp de $26,50 \pm 16$ c/seg y una diferencia significativa de $***p=0,04 < 0,05$. Una alteración similar fue registrada en el control cloroquina (Figura 3c) y no en el control adrenalina (Figura 3d) en donde el intervalo c-c permaneció similar al control. La reducción de la fpc permitió determinar la variabilidad total de los cambios en la fpc ($Vt-fpc$), correspondientes a 0,11 ms y 0,6 ms al comparar el pre y postratamiento con Fipronil, con una estadística significativa de $*p=0,02 < 0,05$, dando como resultado que la $Vt-fpc-Fipronil > Vt-fpc-control$. A mayor fpc menor variabilidad en el segmento c-c. Por otra parte, la relación sensibilidad/especificidad permitió determinar los índices de variabilidad de los parámetros cinéticos de la ACC, tales como la fuerza de contracción fc (c/seg^2) y la energía cinética de la contracción ($ecc-K(kg.mm^2/seg^2)$), particularmente $0,8124 \pm 0,0201$, IC 95% de 0,7430 a 0,8518 y $****p < 0,0001$ y de $0,6957 \pm 0,028$, IC 95% de 0,6395 a 0,7510

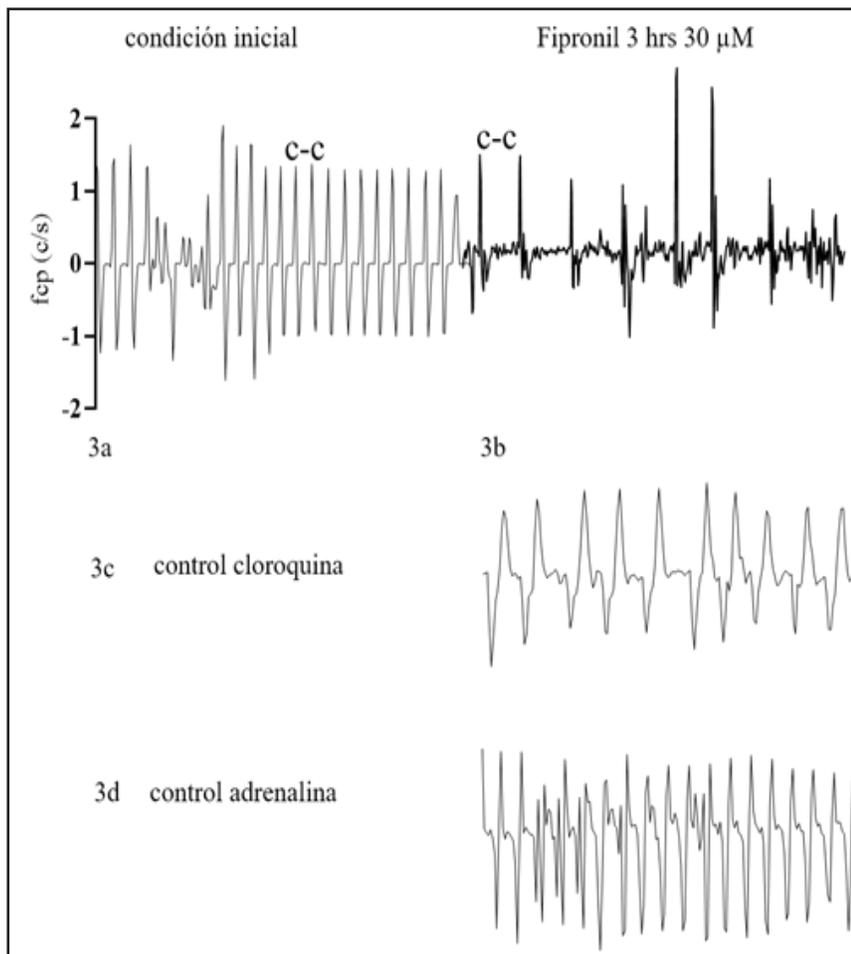


Figura 3. Actividad Cardíaca Contráctil (ACC) de larvas de *Aedes aegypti*. Pretratamiento (3a) y postratamiento con Fipronil CE_{50} luego de 3 horas (3b). Frecuencia promedio de contracción (fpc) expresada en onda contráctil/segundo. Controles cloroquina (3c) y adrenalina (3d). Se destaca el incremento en el intervalo de tiempo de contracción c-c.

y $****p < 0,0001$, respectivamente. Por lo que para el bioensayo de Fipronil se tendrá una probabilidad de 81,24 % en la selección de larvas afectadas en su energía cinética de la fpc así como una probabilidad de 69,57 % en la selección de larvas afectadas en su fuerza de contracción. Dos índices de intoxicación para la señal cardíaca con Fipronil.

FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL

Respecto a la actividad mitocondrial, cabe destacar que se pudo observar cambios en la coloración en las larvas control, tratadas y muertas al ser coloreadas

con el Verde Janus, respectivamente (Figura 4). Se logró apreciar que las larvas sobrevivientes e intoxicadas con Fipronil, respondieron emitiendo una coloración rosa, típico del estado de reducción del VJ, que nos indica un aparente daño celular y ausencia de oxígeno. Mientras que, las larvas control y las no sobrevivientes, no presentaron degradación oxidativa del VJ.

Discusión

Los resultados obtenidos junto con el apoyo de estrategias del análisis de imagen han permitido profundizar sobre

la fisiología de la larva del mosquito *Aedes aegypti*, particularmente alrededor de la fisiología de su comportamiento de nado (CN), su actividad cardíaca contráctil (ACC) y su actividad mitocondrial. Adicionalmente, permitieron ilustrar la actividad cardiotoxica del insecticida de amplio espectro, Fipronil, hasta el momento poco reconocida, vinculada muy probablemente con alteración mitocondrial. Respecto a la fisiología del comportamiento de nado (CN), encontramos que nuestros resultados coinciden con los reportados por otros autores para la mayoría de los insecticidas neurotóxicos (Chaton y col., 2001), en donde, la inmovilización larvaria se ha caracterizado como una respuesta subletal dependiente de la concentración y el tiempo. Sin embargo,

nuestra estimación de la CE_{50} del Fipronil, mostró que la inmovilización larvaria se presenta antes de las 24 horas, a diferencia de la inmovilización inducida por el Fipronil en otros modelos de experimentación, tales como los cladóceros, en donde la reducción en la velocidad de nado ha sido expresada después de las 48 horas (Rocha y col., 2015). Resulta evidente que la acción del Fipronil, además de tener un efecto concentración y tiempo dependiente, también varía de acuerdo con la especie. Además de las coincidencias con otros autores, nuestra investigación ha demostrado que la pérdida de actividad motora se encuentra vinculada con la pérdida de la sensibilidad larvaria caracterizada por una pérdida de la hiperquinesis inducida por el estímulo de la UV, sirviendo ello, para establecer un índice

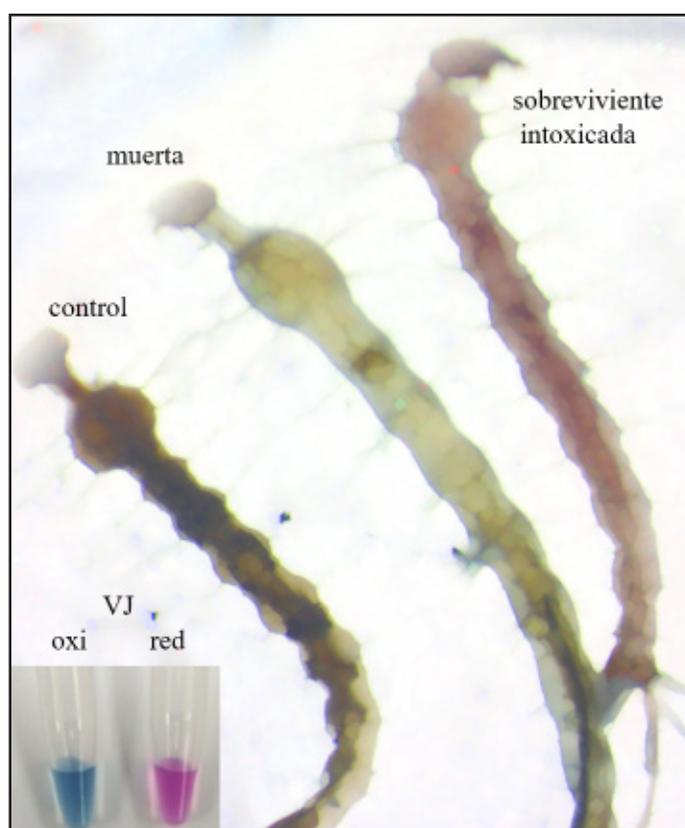


Figura 4. Respuesta larvaria al colorante vital Verde Janus. Las larvas sobrevivientes a Fipronil presenta una coloración rosa, estado reducido del colorante, a diferencia del control y las larvas sin síntomas vitales. Se muestra el estado óxido-reducción del colorante. Tomado de: Ahmad y col., 2018 y modificado para la presente investigación.

de variabilidad del comportamiento de nado (IVCN), un parámetro conductual hasta el momento no considerado. En cuanto a la insensibilidad de las larvas tratadas con Fipronil al estímulo UV, cabe destacar que las rodopsinas constituyen una de las familias de proteínas fotorreceptoras que conforman la retina de los mosquitos y que regulan la información visual subyacente al comportamiento de los mosquitos adultos, incluido el apareamiento, la búsqueda de huéspedes, el descanso y la puesta de huevos. Dentro de estas proteínas se encuentra la rodopsina ultravioleta (UV) Aaop8 que se expresa en las células R7 de la región central y ventral de la retina de la larva del *Aedes aegypti* (Bownik y Szabelak, 2021). Si bien nuestros resultados no contienen evidencias de la presencia de esta proteína en la población larvaria experimentada, resulta evidente la pérdida de sensibilidad debido a la UV en aquellas larvas tratadas con Fipronil. Dicho resultado, ha permitido establecer un vínculo causa-efecto que abre la posibilidad de generar nuevas investigaciones para su certificación. En tal sentido, el análisis de imagen ha permitido hacer uso de patrones vectoriales vinculados con el movimiento circular larvario tales como: velocidad angular (ω) y aceleración angular (α), para interpretar el movimiento de nado y así obtener posibles indicadores de la variabilidad del comportamiento como el IVCN, surgido desde la cuantificación de estas dimensiones angulares. Respecto a la fisiología cardiaca de las larvas del *Aedes aegypti* bajo el efecto del Fipronil, encontramos igualmente respuestas comunes como la reducción de la ACC, como se ha expresado en otros modelos de experimentación tratados con Fipronil. Así, en la especie *Daphnia magna*, un

crustáceo planctónico, el Fipronil promueve la reducción de las contracciones cardiacas de una manera tiempo y concentración dependiente. De igual manera, ha sido reportado que este insecticida afecta la actividad cardiaca de las abejas. Recientemente, ha sido reportado que el Fipronil promueve cardiotoxicidad en las larvas de pez cebra, con irregularidad de los latidos del corazón e interrupción de la formación de vasos sanguíneos (Reinwald y col., 2022). Algunos autores han vinculado dichas alteraciones con una inhibición la actividad mitocondrial, resultante del agotamiento de ATP. Sobre la base de los estudios mencionados se podría plantear la hipótesis de que la cardiotoxicidad promovida por el Fipronil, puesta en evidencia en nuestra investigación a través de la variabilidad de ACC, pudiera ser el resultado de disfunciones mitocondriales (Nicodemo y col., 2014). Esta hipótesis está confirmada en nuestra investigación a través del análisis del estado de oxidorreducción mediado por el Verde Janus, indicativo de la disfuncionalidad mitocondrial, que nos sugiere que la actividad cardiotóxica promovida por el Fipronil, podría estar dirigida por su acción sobre la cadena respiratoria. De todo lo anteriormente expuesto se concluye que el modelo larvario del mosquito *Aedes aegypti*, más allá de ser visto como un blanco a ser destruido para el requerido control de las muy peligrosas enfermedades transmisibles, podría también ser visto como un posible modelo invertebrado no convencional para la toxicología experimental, y que, además, se ve fortalecido con herramientas como el análisis de imagen para la caracterización de efectos tóxicos subletales como la cardiotoxicidad promovida por el Fipronil.

Referencias Bibliográficas

- Ahmad F, Alamoudi W, Haque S, Salahuddin M, Alsamman K. 2018. Simple, reliable, and time-efficient colorimetric method for the assessment of mitochondrial function and toxicity. *Bosn J Basic Med Sci* 18(4):367-374.
- Álvarez M, Hernández C, Barrios A. 2021b. Respuesta funcional y morfológica ante la luz UV emitida por larvas de *Aedes aegypti* tratadas bajo condiciones de oxidación avanzada: Un análisis morfométrico. RETEL. Disponible en: URL:<https://www.sertox.com.ar/es/respuesta-funcional-y-morfologica-ante-la-luz-uv-emitida-por-larvas-de-aedes-aegypti-tratadas-bajo-condiciones-de-oxidacion-avanzada-un-analisis-morfometrico/>
- Álvarez M, Hernández C, Morales E, Hernández F, Velásquez V, Zuleta G. 2021a. Respuestas morfofuncionales de larvas de mosquito *Aedes aegypti* a la Tetrametrina-Real-ZZ®. *Rev Toxicol* 38: 34-38.
- Andereck JW, King JG, Hillyer JF. 2010. Contraction of the ventral abdomen potentiates extracardiac retrograde hemolymph propulsion in the mosquito hemocoel. *PLoS One* 5(9): e12943.
- Bownik A, Szabelak A. 2021. Short-term effects of pesticide fipronil on behavioral and physiological endpoints of *Daphnia magna*. *Environ Sci Pollut Res Int* 28(25):33254-64.
- Brown D. 2007. Combining computational physics with video analysis in TrackerR. <https://physlets.org/tracker/trackerJS/>.
- Chaton PF, Ravanel P, Meyran JC, Tissut M. 2001. The Toxicological Effects and Bioaccumulation of Fipronil in Larvae of the Mosquito *Aedes aegypti* in Aqueous Medium. *Pesticide Biochem Physiol* 69: 183-188.
- Conklin EE, Lee KL, Schlabach SA, Woods IG. 2015. Video Hacking: Automated tracking and quantification of locomotor behavior with open-source software and off-the-shelf video equipment. *J Undergrad Neurosci Educ* 13(3): A120-A125.
- Devillers J, Lagneau C, Lattes A, Garrigues JC, Clémenté MM, Yébakima A. 2014. In silico models for predicting vector control chemicals targeting *Aedes aegypti*. *SAR QSAR Environ Res* 25(10):805-835.
- Dulcis D, Davis NT, Hildebrand JG. 2001. Neuronal control of heart reversal in the hawkmoth *Manduca sexta*. *J Comp Physiol A* 187(10):837-49.
- Ejaz A, Lange AB. 2008. Peptidergic control of the heart of the stick insect, *Baculum extrudentatum*. *Peptides* 29(2):214-25.
- Glenn JD, King JG, Hillyer JF. 2010. Structural mechanics of the mosquito heart and its function in bidirectional hemolymph transport. *J Exp Biol* 213:541-550.
- Kasai Y, Cagan R. 2010. *Drosophila* as a tool for personalized medicine: a primer. *Per Med* 7(6):621 – 632.
- League GP, Onuh OC, Hillyer JF. 2015. Comparative structural and functional analysis of the larval and adult dorsal vessel and its role in hemolymph circulation in the mosquito *Anopheles gambiae*. *J Exp Biol* 218(3):370-380.
- Leódidio ACM, Ramalho-Ortigão M, Martins GF. 2013. The ultrastructure of the *Aedes aegypti* heart. *Arthropod Struct Dev* 42(6):539-550.
- MyEKG. 2022. La web del Electrocardiogram. <https://www.my-ekg.com/formulas-calculos-ekg/calculadora-intervalo-rr>.
- Neckameyer W, Woodrome S, Holt B, Mayer A. 2000. Dopamine y senescence in *Drosophila melanogaster*. *Neurobiol Aging* 21: 145-152.
- Neckameyer WS, Argue KJ. 2013. Comparative approaches to the study of physiology: *Drosophila* as a physiological tool. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304 (3): R177-R188.
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B,C, Loftus B, Xi Z, et al. 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 316(5832):1718-1723.
- Nicodemo D, Maioli MA, Medeiros HC, Guelfi M, Balieira KV, De Jong D, Mingatto FE. 2014. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. *Environ Toxicol Chem* 33 (9):2070-2075.
- Reinwald H, Alvincz J, Salinas G, Schäfers C, Hollert H, Eilebrecht S. 2022. Toxicogenomic profiling after sublethal exposure to nerve- and muscle-targeting insecticides reveals cardiac and neuronal developmental effects in zebrafish embryos. *Chemosphere* 291(Pt 1):132746.
- Rocha M, Kimler KJ, Leming MT, Hu X, Whaley MA, O'Tousa JE. 2015. Expression and light-triggered movement of rhodopsins in the larval visual system of mosquitoes. *J Exp Biol* 218(Pt 9):1386-1392.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ,

Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological image analysis. *Nature Methods* (7): 676–682.

Souders li CL, Rushin A, Sanchez CL, Toth D, Adamovsky O, Martyniuk CJ. 2021. Disease network data for the pesticide fipronil in rat dopamine cells. *Data Brief* 38:107299.