

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**MUTACIONES ASOCIADAS A ESTERASAS RELACIONADAS CON LA
RESISTENCIA A INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN
Aedes aegypti (L.)**

POR

SELENE MARLEN GUTIÉRREZ RODRÍGUEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA**

OCTUBRE, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



TESIS

**MUTACIONES ASOCIADAS A ESTERASAS RELACIONADAS CON LA
RESISTENCIA A INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN
Aedes aegypti (L.)**

POR

SELENE MARLEN GUTIÉRREZ RODRÍGUEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA EN
CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA**

OCTUBRE, 2016

**MUTACIONES ACE 1 Y EST3421 ASOCIADAS CON LAS
RESISTENCIA AL ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFOS EN
Aedes aegypti (L).**

Comité de Tesis

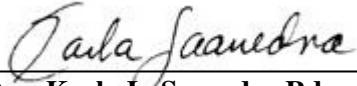
Dra. Adriana E. Flores Suárez
Director de Tesis

Dra. Beatriz López Monroy
Secretario

Dr. Gustavo Ponce García
Vocal

Dra. Susana Favela Lara
Vocal

Dr. Humberto Quiroz Martínez
Vocal

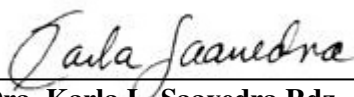

Dra. Karla L. Saavedra Rdz.
Director externo

**MUTACIONES ACE 1 Y EST3421 ASOC
IADAS CON LAS
RESISTENCIA AL ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFOS EN
Aedes aegypti (L).**

Dirección de Tesis

Dra. Adriana E. Flores Suárez

Director



Dra. Karla L. Saavedra Rdz.

Director externo

AGRADECIMIENTOS

Esta página está dedicada a todas aquellas personas que de un modo u otro hicieron posible la realización de esta tesis.

De forma muy especial a la Dra. Adriana E. Flores Suarez por su apoyo, paciencia y dedicación en mi carrera y en mi persona, mil gracias por todo.

A la Dra. Beatriz López Monroy por su apoyo incondicional y sus sabios consejos dentro y fuera de mi vida profesional.

Al Dr. Gustavo Ponce por ser miembro del comité de tesis y por sus consejos para la realización de la tesis.

A la Dra. Susana Favela por las evaluaciones tutoriales y ser miembro del comité de tesis.

Al Dr. Humberto Quiroz Martínez por formar parte del comité de tesis.

A la Dra. Karla Saavedra por ser la directora externa de la tesis, por sus consejos y colaboración de gran importancia para la realización de dicho proyecto.

A la Dra. Karina Villanueva por ser una excelente guía, amiga, consejera, gracias por toda tu ayuda.

Al Biol. Franco Morales gracias por siempre apoyarme en todo, por ser un gran amigo.

A los integrantes del laboratorio de Fisiología y Toxicología de Insectos: Esteban Mora, Jesús Dávila, Yamili Contreras, Martha López, Gerardo Trujillo, Aaron, Cecy, Jade y Villegas

A esas personas que siempre han estado ahí cuando más los necesito: Juan González, Mabel, Vero, Magdis, Arge, Tiffy y Leslie Álvarez.

A Edgar Hernández gracias por apoyarme y siempre sacarme una sonrisa cuando ando muy estresada.

A todos ustedes muchas gracias.

DEDICATORIA

Quisiera agradecer en primer lugar a mi madre Marlen Rodríguez que siempre ha depositado todo su amor y confianza en mí, sobre todo en los momentos difíciles a lo largo de mi carrera. Te amo.

A mis hermanos Felipe, Naty, Karly y Jozeth por su cariño que siempre me han brindado

A mis sobrinos que hacen que mis días sean mejores los amo Esteban y Tadeo.

A mi cuñado Carlos Moreno.

A mis abuelas que siempre están ahí para consentirme y amarme Elvira y Lenchita.

Gracias Dios por permitirme culminar esta tesis.

INDICE

Sección	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Bionomía de <i>Aedes aegypti</i> (L).....	3
2.2 <i>Aedes aegypti</i> (L) como vector.....	5
2.2.1 Dengue.....	5
2.2.2 Chikungunya.....	7
2.2.3 Zika.....	8
2.2.4 Insecticidas aprobados en México.....	10
2.3 Insecticidas Organofosforados.....	10
2.4 Susceptibilidad/Resistencia.....	12
2.5 Mecanismos de Resistencia.....	12
2.6 Resistencia Metabólica.....	13
2.6.1 Carboxyl-Esterasas.....	13
2.6.2 Acetilcolinesterasa.....	14
2.7 Resistencia a Organofosforados.....	15
2.8 Resistencia por insensibilidad en esterasas.....	24
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPOTESIS	28
5. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo Principal.....	29
5.2 Objetivos Particulares.....	29
6 MATERIALES Y METODOS	30
6.1 Área de estudio.....	30
6.1.1 Características de las localidades de recolecta.....	30
6.1.1.1 Nuevo León.....	30
6.1.1.2 Nayarit.....	31
6.1.1.3 Yucatán.....	32
6.1.1.4 Veracruz.....	33
6.2 Material biológico.....	33
6.3 Bioensayo de susceptibilidad.....	35
6.4 Enzimas.....	39
6.4.1 Curvas estándar.....	40
6.4.1.1 Alfa esterasas.....	40
6.4.1.2 Beta esterasas.....	41

6.4.1.3 Oxidasas de función múltiple.....	42
6.4.1.4 Proteínas.....	43
6.4.2 Alfa y beta esterasas.....	43
6.4.3 Oxidasas de función múltiple.....	44
6.4.4 Glutación S transferasa (GST).....	44
6.4.5 Acetil colinesterasa.....	44
6.4.6 Acetil colinesterasa insensible.....	45
6.4.7 Proteínas.....	45
6.5 Extracción de ADN.....	45
6.6 qPCR ensayos preliminares.....	46
6.7 PCR para secuenciación.....	48
6.8 Análisis de resultados.....	49
6.8.1 Análisis dosis- mortalidad.....	49
6.8.2 Análisis de enzimas.....	49
6.8.2.1 Proteínas totales (PTN).....	49
6.8.2.2 Alfa y Beta esterasas.....	50
6.8.2.3 Oxidasas de función múltiple.....	51
6.8.2.4 Acetil colinesterasa.....	51
6.8.2.5 Glutación S transferasa (GST).....	52
6.8.3 Cálculo de frecuencias alélicas.....	53
6.8.4 Asociación de las mutaciones ACE 1 y Est6421 con la resistencia a clorpirifos.....	54
7 RESULTADOS.....	55
7.1 Susceptibilidad a clorpirifos.....	55
7.2 Ensayos enzimáticos.....	57
7.2.1 Curvas estándar.....	57
7.2.2 Perfil enzimático.....	60
7.2.3 Actividad enzimática.....	63
7.3 Mutaciones, ensayos preliminares.....	65
7.4 Mutaciones ACE1, 2, Esterasas y CCE.....	65
7.5 Frecuencia de la mutación ACE 1.....	67
7.6 Frecuencia de la mutación EST6421.....	69
7.7 Co-ocurrencia de mutaciones ACE1 y EST6421 las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	71
7.8 Correlación de las mutaciones ACE 1 y Est6421 con los niveles de resistencia a clorpirifos.....	73
8. DISCUSIONES.....	74
9. CONCLUSIONES.....	78
10. BIBLIOGRAFÍA.....	79
11. RESUMEN BIBLIOGRAFICO.....	95

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Adulticidas: Tratamientos espaciales UBV en exteriores adultos.....	11
2. Ejemplo sobre cómo realizar la selección de volumen del stock para impregnar las botellas.....	37
3. Cuadro de concentraciones para la curva de calibración de alfa esterasas.....	41
4. Cuadro de concentraciones para la curva de calibración de beta esterasas.....	41
5. Cuadro de concentraciones para la curva de calibración de oxidasas de función múltiple.....	42
6. Cuadro de concentraciones para la curva de calibración de proteínas.....	43
7. Secuencia de oligonucleótidos específicos para PCR.....	47
8. Secuencia de oligonucleótidos para secuenciación.....	48
9. Toxicidad de clorpirifos (CL ₅₀) y factor de resistencia (FR) en 7 poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de México.....	56
10. Actividad enzimática de α y β esterasas, MFO, GST y iAChE de poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de México con diferentes niveles de resistencia a clorpirifos.....	64
11. Genotipos y Frecuencia alélica para la mutación ACE 1 en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	

12. Frecuencia alélica y genotípica para la mutación Est6421 en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	69
13. Co-ocurrencia de las mutaciones ACE1 y EST6421 en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de México. Número de individuos que presentaron el genotipo indicado para cada mutación	71

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida del mosquito <i>Ae. aegypti</i>	4
2	Distribución de dengue en las Américas y el Caribe.....	6
3	Incidencia de casos de dengue 2016 (Hasta la Sem 35).....	7
4	Casos reportados de fiebre Chikungunya en las Américas 2015.....	8
5	Países y territorios con casos autóctonos confirmados de Zika (transmisión vectorial) 2015-2016.....	9
6	Historia de los organofosforados en México.....	10
7	Esquema de la sinapsis colinérgica.....	14
8	Sitios de colecta de <i>Ae. aegypti</i> en los estados de México.....	30
9	Charola para la cría de larvas.....	34
10	Papeletas con huevos.....	35
11	Botellas Wheaton.....	36
12	Material utilizado para impregnar botellas.....	36
13	Cámaras de recuperación.....	38
14	Programa IRMA (Regresión logística).....	38
15	Homogenatos.....	39
16	Placa de curva de calibración de proteína.....	40
17	Termociclador tiempo real (ECO TM Ilumina).....	46
18	Reacción de PCR en tiempo real por placa.....	47
19	Valores de CL ₅₀ a clorpirifos en 7 poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de México, se incluye la cepa susceptible.....	55
20	Factor de resistencia FR _{CL50} de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> por comparación con la cepa susceptible New Orleans.....	57

21	Curvas de calibración de alfa esterasas.....	58
22	Curvas de calibración de beta esterasas.....	58
23	Curvas de calibración de oxidasas de función múltiple.....	59
24	Curvas de calibración de proteínas.....	60
25	Perfil de actividad enzimática de α -esterasas en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> con diferentes niveles de resistencia a clorpirifos.....	60
26	Perfil de actividad enzimática de β -esterasas en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> con diferentes niveles de resistencia a clorpirifos.....	61
27	Perfil de actividad enzimática de oxidasas (CytP450) en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> con diferentes niveles de resistencia a clorpirifos.....	61
28	Perfil de actividad enzimática de GST en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> con diferentes niveles de resistencia a clorpirifos.....	62
29	Perfil remanente de acetil colinesterasa en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> con diferentes niveles de resistencia a clorpirifos.....	62
30	Gel de agarosa 2% para visualización de los productos de PCR. ACE1 carriles A6, A18 y A23 y EST6421 carriles E6, E18 y E23 mediante PCR con oligonucleótidos específicos, carril (-) es una muestra negativo y el carril M es el marcador.....	65
31	A) Fragmento de ACE1 B) PCR virtual.....	66
32	A) Fragmento de EST6421 B) PCR virtual.....	66
33	Curvas de desnaturalización de los controles para la mutación ACE 1.....	68
34	Curvas de desnaturalización de los controles para la mutación Est 6421..	68

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

AA	Homocigoto mutado
ACE	Acetilcolinesterasa
AchE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>Ae</i>	<i>Aedes</i>
AG	Heterocigoto
Arg	Arginina
C	Centígrados
CASAFE	Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes
CDC	Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
CENAPRECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
CL ₅₀	Concentración Letal Cincuenta
Cm	Centímetros
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
<i>Cx</i>	<i>Culex</i>
d	Días
DDT	DicloroDifenilTricloroetano
DEF	S,S,S tributil fosforotritioato
DL ₅₀	Dosis Letal Cincuenta
EST	Esterasa
ETV	Enfermedades Transmitidas por Vectores
F	Generación
FAO	Food and Agriculture Organization
Fis	Coefficiente de Wright
FR	Factor de Resistencia
GG	Silvestre
GR	Grado de Resistencia
Gly	Glicina

GST	Glutación S Transferasa
H	Hora
iAcheE	Acetilcolinesterasa insensible
IC	Intervalos de Confianza
INAFED	Instituto para el Federalismo y el Desarrollo Municipal.
IOP	Insecticidas Organofosforados
KD ₅₀	Knock Down Cincuenta
Kg	Kilogramos
Km	Kilometro
mL	Mililitros
Mg	Microgramos
Min	Minutos
μl	Microlitros
MFO	Oxidasas de función múltiple
Mg	Miligramos
Mm	Milímetro
N	Tamaño de muestra
NaCl	Cloruro de Sodio
NO	Cepa susceptible New Orleans
nmol	Nanomol
OMS	Organización Mundial de la Salud
OP	Organofosforados
OPS	Organización Panamericana de Salud
P	Probabilidad
p99	Percentil 99
Pb	Pares de bases
PBO	Butóxido de piperonilo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTN	Proteínas Totales
RR	Razón de Resistencia
Sem	Semana

Ser	Serina
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SSA	Secretaría de Salud
T	Tiempo
UBV	Ultra Bajo Volumen
ULV	Ultra-Low Volume
Var	Variación
®	Marca registrada

RESUMEN

La presencia de la mutación Gly12Ser en el gen que codifica para la acetilcolinesterasa (ACE1) y Gly6421ARG en el gen que codifica para una esterasa fueron determinados y relacionados con la resistencia a clorpirifos en 7 poblaciones de *Aedes aegypti* (L.) de diferentes regiones de México. El nivel de resistencia de las poblaciones se determinó mediante la técnica de “bioensayo de botella”, con el insecticida clorpirifos y se calculó la razón de resistencia (RR) basado en la CL_{50} de las poblaciones silvestres por comparación con la cepa susceptible New Orleans. Adicionalmente se llevaron a cabo ensayos bioquímicos para relacionar la actividad de enzimas degradativas como mecanismos adicionales a la resistencia al clorpirifos. Las poblaciones de *Ae. aegypti* de Nuevo León (Guadalupe, Monterrey y San Nicolás) mostraron resistencia baja al insecticida con valores de FR de 3 a 5X. La población de Veracruz resultó con resistencia media con un FR ~7, similar a la población de Nayarit con una RR ~8. Alta resistencia se registró en dos poblaciones del estado de Yucatán, Mérida con FR ~ 11 y Progreso con FR ~ 9. Solo las enzimas oxidasas de función múltiple (MFO) y glutatión s-transferasas (GST) se mostraron sobre-expresadas en la población de Mérida. Los niveles de resistencia a clorpirifos correlacionaron significativamente con los genotipos homocigotos resistentes para cada mutación; de igual manera correlacionaron cuando se consideraron ambos genotipos, por lo que consideramos que la presencia de ambas mutaciones actúa de manera sinérgica en la resistencia a clorpirifos en las poblaciones de *Ae. aegypti* de México. Este representa el primer estudio en donde se incrimina la participación de dos mutaciones en la resistencia a clorpirifos, insecticida organofosforado de amplio uso en México para el control de insectos vectores de enfermedades.

ABSTRACT

The presence of the mutation Gly12Ser in the gene encoding acetylcholinesterase (ACE1) and Gly6421ARG in the gene coding for an esterase were determined and related resistance to chlorpyrifos in seven populations of *Aedes aegypti* (L.) from different geographical regions from Mexico. The resistance level was determined using the "bottle bioassay" technique with chlorpyrifos, based on the resistance frequency (RF) using the LC₅₀ of field populations in comparison with the LC₅₀ of the susceptible New Orleans strain. Additionally biochemical assays were conducted to relate the activity of degradative enzymes as additional mechanisms of resistance to chlorpyrifos. The populations of *Ae. aegypti* from Nuevo Leon state (Guadalupe, Monterrey and San Nicholas) showed low resistance values with FR 3 to 5X. The population from Veracruz was showed moderate resistance with FR ~ 7, similar to the population of Nayarit with FR ~ 8. Higher resistance levels were recorded in two populations from the state of Yucatan, Merida FR ~ 11 and Progress with FR ~ 9 . Multi-function oxidases (MFO) and glutathione s transferases (GST) were overexpressed in the population of Merida. The levels of resistance to chlorpyrifos correlated significantly with homozygous resistant genotypes for each mutation; equally they correlated when both genotypes were considered, and we believe that the presence of both mutations acts synergistically on chlorpyrifos resistance in populations of *Ae. aegypti* from Mexico. This represents the first study proving the presence of two mutations conferring resistance to chlorpyrifos in *Ae. aegypti* .

INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Vectores (ETV) representan un importante problema de salud pública en México, se estima que cerca de 60% del territorio nacional presenta condiciones que favorecen la transmisión de dichas enfermedades (CENAPRECE, 2016). Dentro de las ETV, la más importante en México es el dengue, para la cual, el principal vector es *Aedes aegypti* (L), sin embargo también transmite otras enfermedades tales como, fiebre Chikungunya y Zika.

El control de estas enfermedades ha sido difícil ya que no se cuenta con vacunas o medicamentos antivirales para fiebre Chikungunya y Zika. Para dengue hay 6 vacunas en desarrollo clínico, pero hasta la fecha sólo la vacuna de Sanofi-Pasteur, Dengvaxia ha completado la fase III, la cual tiene una eficacia del 64.7% (IC 95%) en América Latina, sin embargo una de las desventajas hasta el momento es que es menos eficaz en pacientes con menos de 10 años (Schwartz *et al.*, 2015), por lo que la principal estrategia de control recae en el control del vector. Dentro de las acciones están el control mecánico (la eliminación de los criaderos) y el control biológico (uso de las formulaciones a base de bacterias entomopatógenas o bien manteniendo los depredadores naturales); pero la mayoría de los programas de control siguen dependiendo en gran medida del uso de insecticidas químicos, lo que ha constituido la herramienta más poderosa y de uso más extendido a nivel mundial. No obstante, la aplicación sistemática e indiscriminada de plaguicidas y el deterioro de los programas de control, influye en gran medida en la resistencia que los vectores exhiben a los mismos. Por lo tanto, esta presión de selección sobre las poblaciones de *Ae. aegypti* y la subsecuente aparición de resistencia, pueden eventualmente hacer infectivo el control químico.

El uso de insecticidas para el control de vectores en México está regulado por la norma NOM-032-SSA-2014 (DOF 2015) la cual establece las características con las que éstos deben contar como serían las autorizaciones sanitarias emitidas por la COFEPRIS y que las poblaciones del vector a controlar no exhiban resistencia en laboratorio y en campo de acuerdo a los protocolos establecidos por la OMS.

También, se cuenta con la lista de insecticidas aprobados por el CENAPRECE en el 2016 donde se especifican los insecticidas a utilizar, entre los que destacan son piretroides, combinaciones de piretroides con sinergistas y organofosforados (CENAPRECE, 2016).

En muchas especies de insectos, la resistencia a los organofosforados es causada por sustituciones de aminoácidos en las enzimas acetilcolinesterasas (ACE-1) y en esterasas (EST 6), reduciendo la sensibilidad de éstas al insecticida.

Una de las primeras sustituciones reportadas por ACE 1, fue en mosquitos del género *Culex* la cual se produce en el residuo 119 de la enzima, donde la glicina es sustituida por serina (Weill, *et al.*, 2004). A pesar de los numerosos reportes de resistencia a temefos en *Ae. aegypti* en América, solo se tiene un registro de ACE insensible en *Cx pipiens* (Gullemaud, *et al.*, 1997), y más aun no existen antecedentes de mutaciones reportadas relacionadas a la resistencia a organofosforados.

Las carboxilesterasas se han asociado con la resistencia a insecticidas en mosquitos de *Culex sp* y *Ae aegypti*, estas enzimas rompen los enlaces éster presentes en los organofosforados, carbamatos y posiblemente en moléculas piretroides. Recientemente, unos 49 genes de esterasa (CCE) se han identificado en el genoma de *Ae. aegypti*. Sin embargo, las esterasas han sido caracterizadas por electroforesis en gelesy en sustratos específicos. En uno de estos estudios se identificó la esterasa 6 en *Ae. aegypti*, encontrando una alta correlación entre las intensidades de la banda de esterasa 6 y el tiempo letal cincuenta (TL₅₀) en un mosquito de 3 días de emergido (Field y Hitchen, 1984).

De acuerdo con lo anterior, la importancia del presente estudio estriba en la determinación de mutaciones y frecuencias de las mismas en genes que codifican para enzimas esterasas a fin de relacionarlas con la resistencia a organofosforados y principalmente al clorpirifos, uno de los adulticidas de mayor uso en México en aplicaciones espaciales para el control de adultos.

ANTECEDENTES

2.1 Bionomía *Aedes aegypti* (L.)

Ae. aegypti (Linnaeus, 1762) es un mosquito perteneciente al orden Diptera, familia Culicidae y subfamilia Culicinae, cuyo origen se ubica biogeográficamente en la Región Etiópica (África), donde se encuentran la mayor cantidad de especies del subgénero *Stegomyia* (Theobald, 1901). Se conocen tres variedades principales: *Ae. aegypti* var. *aegypti*, *Ae. aegypti* var. *formosus* y *Ae. aegypti* var. *queenslandensis*. La variante *aegypti* es la más distribuida en el mundo y en México (Harwood y James, 1998).

El ciclo de vida de *Ae. aegypti* comprende el huevo, cuatro estadios larvales, un estadio de pupa y el adulto (Fig. 1). Los huevos son de color negro, ovoides y con una longitud no mayor a 1 mm. En condiciones óptimas, la eclosión ocurre en un par de días, sin embargo pueden mantener su viabilidad hasta por un año dependiendo de la fuente de reservas y las condiciones ambientales (Gordon, 1988), siendo la etapa de huevo la más resistente del biociclo de *Ae. aegypti*.

Los estadios larvarios se desarrollan en hábitats acuáticos, donde la principal fuente de alimento consiste en microbiota filtrada por las partes bucales de la larva. La duración del desarrollo larvario depende de la temperatura del agua, disponibilidad del alimento y densidad larvaria, variando entre 5 y 14 días. Después de este periodo, una segunda metamorfosis ocurre en la fase acuática para entrar a la fase de pupa. La alimentación se detiene en la fase de pupa y después de uno a dos días emerge el adulto (Eldrigde, 2005).

La duración del desarrollo larval depende de la temperatura, la disponibilidad de alimento y la densidad de las larvas en el recipiente. En condiciones óptimas, el período larval desde la eclosión hasta la pupación puede ser de tan solo 5 días, pero comúnmente

dura de 7 a 14 d. Las larvas y las pupas de los machos se desarrollan más rápidamente que las hembras (Nelson, 1986).

Las pupas no se alimentan, su función es la metamorfosis del estadio larval al adulto. Las pupas de los mosquitos son diferentes a las de otros insectos holometábolos por presentar reacciones inmediatas a estímulos externos tales como vibraciones y cambios en la intensidad de la luz, desplazándose activamente por todo el criadero. Cuando están inactivas flotan en la superficie, esta propiedad facilita la emergencia del adulto. El estadio de pupa dura aproximadamente dos o tres días, emergiendo alrededor del 88% de los adultos en cuestión de 48 horas (Méndez *et al.*, 1996).

El adulto de *Ae. aegypti* es la fase reproductiva del insecto. En la mayoría de los insectos voladores, el adulto también representa la importante fase de la dispersión. Sin embargo, para *Ae. aegypti* el transporte pasivo de huevos y larvas en recipientes ha tenido mayor trascendencia en su distribución (Nelson, 1986), en la que el hombre ha participado en forma determinante en comparación con la dispersión activa propia de la especie.

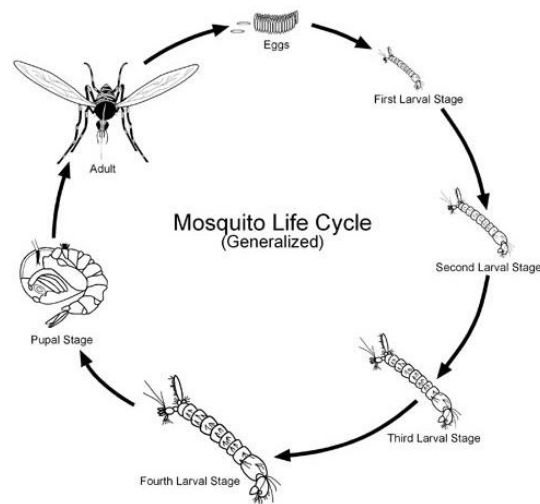


Fig.1 Ciclo de vida del mosquito *Ae. aegypti*

La hembra del mosquito, recién emergida, se aparea con el macho por primera y única vez, terminada la cópula, la hembra puede permanecer fértil por el resto de su

vida. Posteriormente, se alimenta de sangre a fin de obtener los nutrientes necesarios para el desarrollo de los huevos. La alimentación sanguínea y la postura se llevan a cabo principalmente durante el día, especialmente durante las primeras horas o a la media mañana y a media tarde o al anochecer. Durante el transcurso de su vida, una hembra puede llegar a poner de 300 a 450 huevos, los cuales distribuye en grupos de 25 a 100 en cada ovipostura (Nelson, 1986; Kettle, 1993).

Las hembras se alimentan de la sangre de la mayoría de los vertebrados, pero muestran una marcada preferencia por el hombre. Ellas vuelan en sentido contrario al viento, desplazándose mediante lentas corrientes de aire, siguiendo los olores y gases emitidos por el huésped. Cuando están cerca utilizan estímulos visuales para localizar al huésped mientras sus receptores táctiles y térmicos las guían hacia el sitio de alimentación. La hematofagia (alimentación con sangre) favorece a la transmisión del virus del dengue, la cual requiere de 8-10 d para alojarse en las glándulas salivales y así cada picadura será infectiva ya que la hembra porta el virus el resto de su vida (Clements *et al.*, 1999)

Las partes bucales del macho no están adaptadas para la hematofagia; en cambio, ellos se alimentan de carbohidratos, obtenidos a partir del néctar de las plantas para suplir sus requerimientos energéticos (Fernández-Salas, 1999).

2.2 *Aedes aegypti* (L) como vector

Ae. aegypti (L), es considerado el vector más importante en la transmisión de fiebre amarilla, dengue, fiebre de Chikungunya y virus del Zika en las Américas, se distribuye usualmente entre las latitudes de 35° Sur y 45° Norte; pero ha sido encontrado hasta una latitud de 55° N (Bisset, 2002). Por lo que se le considera una especie tropical y subtropical.

2.2.1 Dengue

El virus de dengue pertenece a la familia *Flaviviridae*, enfermedad vírica transmitida por mosquitos que más rápidamente se propaga en el mundo. A diferencia de otros mosquitos, *Ae. aegypti*, pica durante el día y puede sobrevivir en regiones más

frías. Existen cuatro serotipos del virus, estrechamente relacionados entre sí, que provocan el dengue y la inmunidad permanente después de la infección (OMS, 2016)

En las últimas décadas ha aumentado enormemente la incidencia de dengue en el mundo. El número real de casos de dengue está insuficientemente notificado y muchos casos están mal clasificados. Según una estimación reciente, se producen 390 millones de infecciones por dengue cada año (intervalo creíble del 95%: 284 a 528 millones), de los cuales 96 millones (67 a 136 millones) se manifiestan clínicamente (cualquiera que sea la gravedad de la enfermedad) (Bhatt *et al.*, 2013). En otro estudio sobre la prevalencia del dengue se estima que 3900 millones de personas, de 128 países, están en riesgo de infección por los virus del dengue. (Brady *et al.*, 2013)(Fig. 2).



Fig. 2 Distribución de dengue en las Américas y el Caribe (Fuente: CDC, 2016).

De acuerdo con datos de la Secretaría de Salud en México se reportaron más de 27,178 casos de dengue en el año 2015. Mientras en lo que va del 2016 se ha registrado 8,314 casos, distinguiéndose Guerrero con un total de 1,863 de casos confirmados y con una tasa de incidencia de 51.92 (Boletín SSA Sem 35) (Fig. 3)

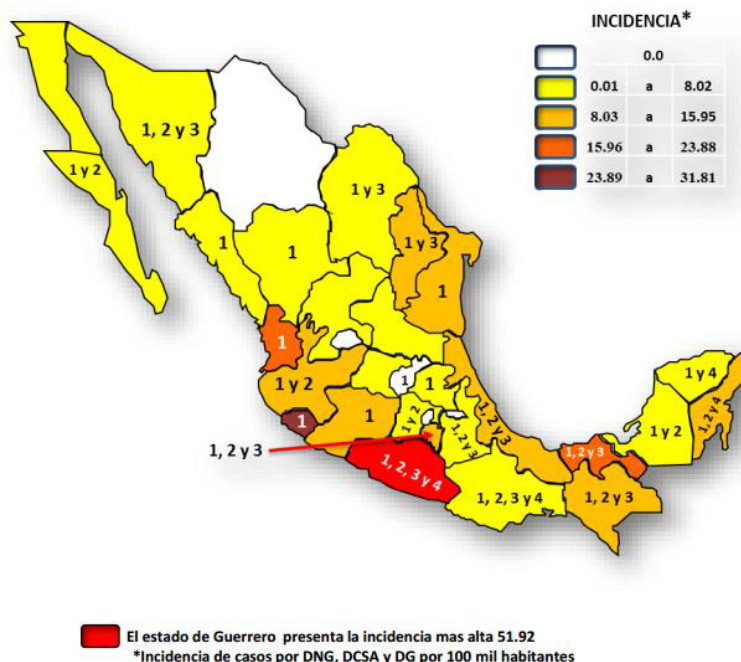


Fig. 3 Incidencia de casos de dengue 2016 (Hasta la Sem 35) (Fuente: SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue).

2.2.2 Chikungunya

La fiebre Chikungunya es una enfermedad tropical cuyo agente causal pertenece a la familia *Togaviridae*, transmitida también por el mosquito *Ae. aegypti* y es relativamente inusual. La enfermedad se ha detectado en África y Asia, y también en islas del Caribe, el Índico y el Pacífico.

Los síntomas característicos son de enfermedad aguda con fiebre, erupción cutánea y dolores articulares incapacitantes que pueden durar varias semanas. Esto último diferencia a la fiebre Chikungunya del dengue, que tiene el mismo vector, síntomas y distribución geográfica.

En las Américas, en 2016 se notificaron a la Organización Panamericana de la Salud (OPS) un total de 31,000 casos hasta el 18 de marzo, es decir, cinco veces menos que en el mismo periodo del 2015 (OMS, 2016) (Fig. 4).



Fig. 4 Casos reportados de fiebre Chikungunya en las Américas 2016 (Fuente: OMS, 2016).

Con respecto a los casos confirmados de fiebre Chikungunya a la semana 35 del 2016, México tiene un total de 436 siendo el estado con mayor número Veracruz con 138 casos, siguiéndole los estados de Tamaulipas, Nayarit, Guerrero y Baja California Sur oscilando de 39 a 26 casos (Boletín SSA Sem 35).

2.2.3 ZIKA

Es una enfermedad causada por el virus Zika (ZIKAV), un arbovirus del género flavivirus (familia Flaviviridae), muy cercano filogenéticamente a virus como el dengue, fiebre amarilla, la encefalitis japonesa, o el virus del Nilo Occidental (OMS, 2015).

Recientemente, en el Brasil, las autoridades sanitarias locales han observado un aumento de las infecciones por este virus en la población general y, coincidiendo con él, un aumento de los casos de síndrome de Guillain-Barré y de los recién nacidos con microcefalia en el noreste del país. Una cantidad considerable de nuevas investigaciones

han reforzado la asociación entre la infección por este virus y la aparición de malformaciones fetales y trastornos neurológicos. No obstante, son necesarias más investigaciones para entender mejor esa relación (OMS, 2016).

Los primeros brotes de enfermedad por el virus de Zika se describieron en el Pacífico en 2007 y 2013 (Yap y Polinesia francesa, respectivamente), y en las Américas (Brasil y Colombia) y África (Cabo Verde) en 2015. Desde el 1 de enero de 2007, se ha notificado la transmisión del virus en 64 países y territorios.

En las Américas desde 2015 y hasta la fecha, 47 países/territorios de las Américas confirmaron casos autóctonos por transmisión vectorial del virus del Zika y cinco países notificaron casos de Zika transmitidos sexualmente. Desde la Actualización Epidemiológica del 8 de septiembre de 2016, Saint Kitts y Nevis es el nuevo país que confirmó transmisión vectorial autóctona (Fig. 5)

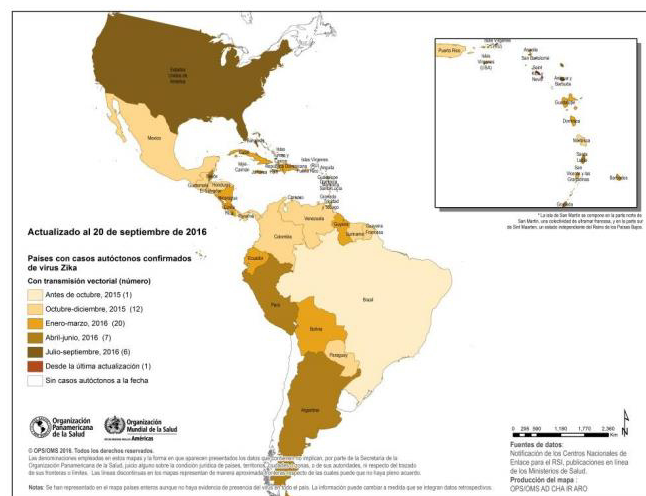


Fig. 5 Países y territorios con casos autóctonos confirmados de Zika (transmisión vectorial) 2015-2016 (Fuente: OMS, 2016)

Con respecto a los casos confirmados autóctonos de enfermedad por virus del Zika a la semana 35 del 2016, México tiene un total de 2,767 casos, siendo el estado con mayor número Veracruz con 680 casos, siguiéndole los estados de Chiapas, Oaxaca y Guerrero con más de 500 casos (Boletín SSA Sem 35).

2.2.4 Insecticidas aprobados en México.

La aplicación de los insecticidas organofosforados en México no es nada nuevo, en 1950 se introdujo por primera vez el DDT (Fig. 6).

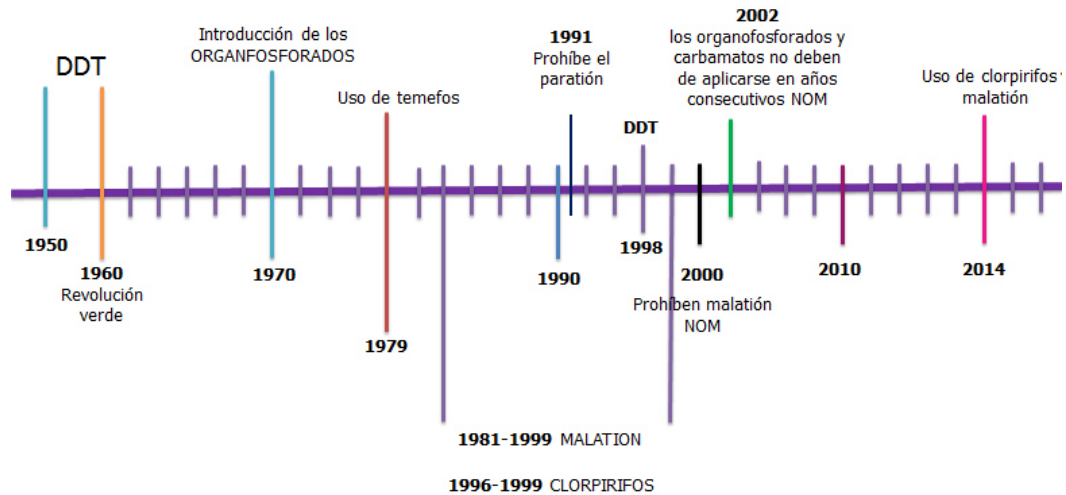


Fig. 6 Historia del uso de los organofosforados en México.

En 2016 el CENAPRECE aprobó una lista de productos (Tabla 1) recomendados para el combate de insectos vectores de enfermedades, en tratamientos espaciales en exteriores; donde incluyen piretroides, combinación de piretroides con sinergistas y organofosforados.

2.3 Insecticidas Organofosforados

Se denominan insecticidas organofosforados (IOP) a las sustancias orgánicas derivadas de la molécula del ácido fosfórico, forman parte de los insecticidas “de contacto” al absorberse por intermedio de los lípidos de la cutícula de los insectos. El conocimiento acerca de la química del fósforo se remonta a comienzos del siglo XIX, pero las investigaciones que describieron por primera vez los efectos nocivos de los IOP sobre los seres vivos datan de 1932 siendo el alemán Schrader uno de los científicos que más información ha aportado al respecto (Baños y Bosch, 1992).

Tabla 1: Adulticidas: Tratamientos espaciales UBV en exteriores

Insecticidas	Registro COFEPRIS	Vigencia	Formulación	Usos aprobados
d-fenotrina + butóxido de piperonilo 2%	RSCO-URB-29-2015	20/11/2020	Solución oleosa	Tratamientos Espaciales
d-fenotrina+ praletrina + butóxido de piperonilo 5%	RSCO-USP-4-2015	20/12/2020	Solución oleosa	Tratamientos Espaciales
Fenotrina 10%	RSCO-USP-2-2015	20/11/2020	Solución oleosa	Tratamientos Espaciales
Pirimifos – metil 49%	RSCO-USP-13-2015	20/11/2020	Concentrado emulsionable	Tratamientos Espaciales
Bifentrina 9%	RSCO-USP-6-2015	20/11/2020	Microemulsión	Tratamientos Espaciales
Bifentrina 1.5%	RSCO-USP-7-2015	20/11/2020	Insecticida Líquido	Tratamientos Espaciales
Clopirifós-etil 13.62%	RSCO-USP-31-2015	20/11/2020	Solución oleosa	Tratamientos Espaciales
Deltametrina 2%	RSCO-USP-9-2015	20/11/2020	Emulsión en agua	Tratamientos Espaciales
Malatión 40%	RSCO-USP-23-2015	20/11/2020	Emulsión en agua	Tratamientos Espaciales
Malatión 41%	RSCO-USP-30-2015	20/11/2020	Microemulsión	Tratamientos Espaciales

Elaboración propia con datos del CENAPRECE

UBV: Ultra Bajo Volumen

El primer organofosforado sistémico que se conoció fue el schradán, poco después también se reconoció esta característica para el dimefox. El schradán es muy tóxico para mamíferos (DL₅₀ oral en rata, 8 mg/kg) por lo que no es utilizado. Los compuestos organofosforados son generalmente más tóxicos en términos de toxicidad aguda, pero son degradados más rápidamente (Bull y Hathaway, 1986).

Debido a la falta de investigaciones adecuadas hay una tendencia a asumir que la presencia de compuestos organofosforados tiene menor consecuencia en los sistemas acuáticos. Sin embargo, muchos estudios han demostrado la persistencia y acumulación del insecticida organofosforado fenitrothion, especialmente en plantas acuáticas. El clorpirifos (0,0- dietilfosforotioato de 0-3,5,6- tricloro-2-piridilo) es uno de los insecticidas organofosforados más empleado en las actividades agrícolas. El sitio de acción primaria de este insecticida en los animales, al igual que de otros insecticidas

organofosforados, es la enzima colinesterasa, a la cual inactivan por fosforilación (CASAFE, 1999).

De acuerdo a su toxicidad los insecticidas organofosforados se han dividido en: de toxicidad muy alta como metamidofos y paration, de toxicidad moderada como clorpirifos, dimetoato y fention y por ultimo de toxicidad baja como malatión (Fernández *et al.*, 2010).

2.4 Susceptibilidad/Resistencia

El concepto de resistencia a insecticidas es complejo y controvertido, ya que es un fenómeno muy relativo (Brattsten, 1989). Brown (1941) definió la resistencia como el desarrollo de una habilidad adicional en una raza de insectos de tolerar dosis de tóxicos que son letales para la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie. Se debe tomar en cuenta que la resistencia adquirida, no es específica para el producto usado, sino que generalmente se extiende a productos similares.

La FAO (1979) define la resistencia, como la capacidad desarrollada por una población determinada de insectos, a no ser afectada por la aplicación de insecticidas.

2.5 Mecanismos de resistencia

La resistencia surge a causa de cambios genéticos que modifican los pasos tóxico cinéticos o tóxico dinámicos de la interacción insecto-insecticida,: a) por disminución en la penetración cuticular, b) aumento del metabolismo de los insecticidas, c) disminución de la afinidad del sitio de acción d) aumento en la excreción o e) cambios en el comportamiento (Brown y Abedi, 1960). De estos los mejor estudiados y que suelen producir altos grados de resistencia, son el aumento del metabolismo y la disminución de la afinidad en el sitio blanco.

2.6 Resistencia Metabólica

La resistencia metabólica es un proceso dinámico, que implica la regulación del sistema de desintoxicación de mosquitos con el fin de contrarrestar la agresión química causada por insecticidas. La resistencia metabólica consiste en niveles elevados o el incremento de la actividad de las enzimas sobre el insecticida, resultando en una proporción suficiente de moléculas de insecticidas que está siendo metabolizada antes de alcanzar su objetivo el sistema nervioso de los mosquitos (Brooke *et al.*, 2010).

Las enzimas de desintoxicación generalmente ligadas a la resistencia a insecticidas se componen de 3 grandes familias de genes, las monooxigenasas dependientes de citocromo P450 (CYP) o P450s, las carboxil esterasas/colina (CCE) y los glutatión-s transferasas (GSTs), pero otras familias de enzimas también pueden estar involucrados como UDP glucosyl - transferasas (UGT) (Hemingway *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007).

2.6.1 Carboxil-esterasas

Estas enzimas son codificadas por un grupo de genes sobre el mismo cromosoma, donde cada uno de sus miembros puede sufrir modificaciones que confieren resistencia (Hemingway y Ranson 2000):

- Cambios de aminoácidos que alteren la especificidad del sustrato.
- Presencia de múltiples copias génicas amplificadas en insectos resistentes.
- Mutaciones puntuales.
- Sobreproducción constitutiva.
- Modificaciones estructurales que facilitan la hidrólisis del insecticida.

Los insectos poseen entre 30 y 60 distintos miembros de la familia de genes que codifican para la carboxilesterasa. Alrededor de tres cuartas partes de estos son

catalíticamente activos y comprenden a la mayoría de las isoenzimas esterazas que pueden ser visualizadas en gel de poliacrilamida (Oakeshott *et al.*, 2005).

2.6.2 Acetilcolinesterasa

El papel principal de la acetilcolinesterasa (ACE) es la finalización de la transmisión del impulso nervioso en las sinapsis colinérgica, debida a la rápida hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACE; Rosenberry, 1975). En la terminal presináptica la acetilcolina transferasa (CAT) se sintetiza a la acetilcolina (ACE) a partir de colina y acetil coenzima A. La ACE se acumula en las vesículas y se libera por la acción de potenciales de acción. La ACE se une con receptores muscarínicos (M1 y M2) en la terminal postsináptica, los que transducen la señal a través de vías que involucran la adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y al inositol trifosfato (IP3). La ACE se hidroliza por la acetilcolinesterasa (AChE) soluble o anclada a la membrana pre- y postsináptica. La colina se recaptura por un transporte de alta afinidad presente en la presinapsis (Fig.7). Como es requerido por su función biológica, ACE es una enzima muy eficiente, funcionan a una velocidad de cerca del límite de difusión (Quinn 1987; Silman y Sussman 2005). ACE es el objetivo de agentes nerviosos (Millard *et al.*, 1999), fármacos anti-Alzheimer (Greenblatt *et al.*, 2003), e insecticidas (Smitsaert 1964) y de hecho se ha incorporado en biosensores para ambos insecticidas y agentes nerviosos (Marty *et al.*, 1992).

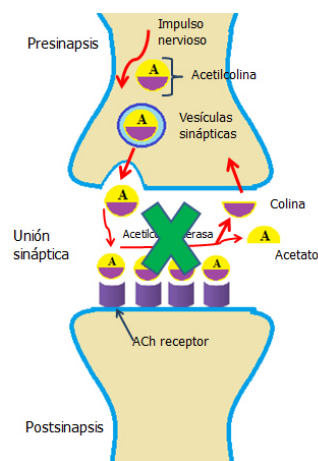


Fig.7 Esquema de la sinapsis colinérgica (Fuente: Modificado de Hurtado y Gutiérrez, 2005).

AChE1 y AChE2, codificada por los genes *as-1* y *as-2*, respectivamente, se han identificado en diferentes especies de mosquitos, pero sólo AChE1 ha sido implicado en la resistencia a los insecticidas OP y carbamatos (Alout *et al.*, 2008; Weill *et al.*, 2002, 2003).

2.7 Resistencia a organofosforados

El principal problema en los programas de control de vectores de enfermedades es el desarrollo de la resistencia a los insecticidas usados. El primer caso reportado de insectos resistentes a insecticidas sintéticos fue en 1946 cuando se detectó resistencia a DDT en moscas domésticas de Suiza y Dinamarca (Picollo, 2006), a partir de entonces, según la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente el 40% de los 506 artrópodos de importancia médica presentan algún grado de resistencia a insecticidas, de estas especies, alrededor del 50% son especies de mosquitos vectores de malaria, dengue, fiebre amarilla y filariasis (Fonseca *et al.*, 2005).

Los insecticidas utilizados en las campañas contra plagas se han incluido a los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. La resistencia a organofosforados ha sido documentada en vectores importantes como *Anopheles culicifacies*, *An. stephensi*, *An. albimanus*, *An. arabiensis* y *An. sacharovi*; así como el género *Culex* (Hemingway y Ranson 2000).

En México, como en la mayoría de los países, se han utilizado diversos insecticidas para el control del vector, por ejemplo el DDT, el cual fue usado intensivamente en los 60's para el control de la malaria, eventualmente se siguieron utilizando insecticidas organofosforados como el malatión (adulticida) y temefos (larvicida). El malatión se utilizó en aplicaciones espaciales de tipo ultra bajo volumen mientras que temefos en gránulos sobre contenedores de agua que podrían ser criaderos de larvas de *Ae. aegypti* (L) (Fernández 1999). De manera similar, a partir de 1981 se ha llevado la aplicación intensiva de temefos como larvicida al 1%. Esto trae a la sospecha de que puede estar presente la resistencia a este organofosforado.

En 1964 se reporta el primer estudio en donde se establece un cambio en la acetilcolinesterasa en el ácaro *Tetranychus urticae* (Koch), mejor conocido como araña roja. La colinesterasa de este ácaro fue estudiada *in vitro* en una cepa resistente a varios organofosforados, y se demostró la ausencia de inhibición de la enzima (Smitsaert 1964).

Por otro lado, ya han estudiado la susceptibilidad a los organofosforados en diferentes mosquitos y en diferentes estadios. Mekurian *et al.*, (1991) en un estudio de evaluación durante cuatro años, trabajó con *Ae. aegypti* determinó la susceptibilidad a malatión, temefos y fention en larvas. En las pruebas que se realizaron sobre adultos se utilizó DDT, malatión, resmetrina, propoxur, y deltametrina usando el método de la OMS. Los resultados obtenidos mostraron que las concentraciones de los insecticidas empleadas eran inicialmente eficientes mostrando porcentajes de mortalidad altos, sin embargo, éstas se mostraron menos eficientes al final de los cuatro años de estudio (1987-1990), disminuyendo hasta la mitad del porcentaje de mortalidad inicial, utilizando las mismas poblaciones.

Mazzarri y Georghiou (1995) determinaron la resistencia a otros organofosforados (OP), tales como: temefos, malatión, metil-pirifos y clorpirifos; y al carbamato propoxur en 3 poblaciones de *Ae. aegypti* de los estados de Falcon y Aragua, Venezuela. En ambos estados la resistencia fue baja (<5 veces con respecto a una cepa susceptible) excepto para clorpirifos que presentó una resistencia moderada de 7 veces y las pruebas bioquímicas demostraron la presencia elevada de esterasas.

Sames *et al.* (1996) realizó ensayos en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* del Valle del Rio Grande Texas y México usando malatión, clorpirifos, resmetrina y permetrina. Los resultados obtenidos de resistencia a malatión para *Ae. aegypti* de Texas y México fueron de FR (Factor de Resistencia) 4 y 4.75 respectivamente. *Ae. albopictus* se mostró 5.38 veces más resistente en las poblaciones de Texas y para México se determinó un valor de 5.92. En los experimentos con piretroides las dos especies no mostraron resistencia significativa.

Rodríguez *et al.*, (1997) estudió el comportamiento de resistencia a diferentes insecticidas, entre estos el malatión, clorpirifos y pirimifos-metil en poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de 2 municipios de Santiago de Cuba. El mayor factor de resistencia (FR), calculado a partir de la CL₅₀ y CL₉₀, se obtuvo para malatión, con un valor de 61.0X-104.8X en Santiago de Cuba y 38.2X-93.3X en San Luis, se evidenció que aún persiste la resistencia a este insecticida era persistente debido a su extensivo uso durante 6 años; seguido de clorpirifos con 23.0X-14.3X y 19.2X-19.3X. No se detectó resistencia para pirimifos metil en alguno de estos 2 municipios.

Rodríguez *et al.*, (1998) trabajaron con *Cx. quinquefasciatus* de Cuba, colectando una cepa de *Ae. aegypti*, con el objetivo de poder utilizarla como cepa de referencia en el laboratorio para determinar la resistencia cruzada con otras clases de insecticidas. Se obtuvo una cepa resistente a lambdacialotrina después de 6 generaciones de presión de selección, sin embargo se observó baja resistencia cruzada a otros piretroides, a carbamatos y a los organofosforados, clorpirifos y pirimifos-metil, por el contrario presentó alta resistencia cruzada a malatión.

Se determinó el estado de resistencia de *Cx. quinquefasciatus* procedente de Colombia a 5 insecticidas organofosforados (malatión, pirimifos-metil, clorpirifos, temefos y fention), 4 piretroides (cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambdacialotrina) y un carbamato (propoxur). *Cx. quinquefasciatus* se mostró resistente a todos los insecticidas organofosforados, aunque con valores relativamente menores para metil-pirimifos y fention. No se encontró resistencia a los piretroides lambdacialotrina y cipermetrina ni al carbamato propoxur. Mediante el uso del sinergista PBO se demostró que las oxidasas de función múltiple desempeñaron una función importante en la resistencia a los insecticidas organofosforados y piretroides (Bisset *et al.*, 1998)

Wirth y Georghiou (1999) reportaron resistencia a temefos en *Ae. aegypti* en las Islas Vírgenes con un alto nivel de resistencia (46.8 veces en la concentración letal 95%

[CL₉₅]). Esta población fue seleccionada en el laboratorio por 13 generaciones con temefos observando que la resistencia aumentó a 180.6 (CL₉₅), mientras que en ausencia de presión de selección la proporción de resistencia se redujo a 8.5. También se observaron niveles relativamente bajos de la resistencia o resistencia cruzada a otros insecticidas organofosforados y carbamatos, y un alto nivel de resistencia a los piretroides.

Rodríguez *et al.*, (1999) debido a un brote de dengue en el municipio Santiago de Cuba estudiaron una cepa de *Ae. aegypti*, para determinar los niveles de susceptibilidad a insecticidas organofosforados y piretroides. Los resultados de los bioensayos mostraron bajos niveles de resistencia a fentión, malatión y deltametrina, se obtuvieron moderados para temefos, metilpirimifos y cipermetrina, y altos para clorpirifos. Con el uso del sinergista S,S,S tributil fosforotritioato, se demostró que las enzimas esterasas juegan una función importante en la resistencia a temefos y clorpirifos. Utilizando el sinergista butóxido de piperonilo se demostró que las enzimas oxidasas de función múltiple no intervienen en la resistencia a ninguno de los insecticidas evaluados. Se realizaron las técnicas bioquímicas para la detección de los mecanismos de resistencia mediado por enzimas esterasas y GST, las cuáles han sido reportadas que intervienen en la resistencia a insecticidas, sin embargo no se encontraron cambios en la AChE..

Bisset *et al.*, (2001), evaluaron 5 cepas de *Ae. aegypti*, proveniente de Cuba y 4 de Venezuela, para determinar los niveles de resistencia a insecticidas organofosforados (temefos, clorpirifos y pirimifos metil). En las cepas venezolanas se encontró resistencia a temefos, solo en la cepa Apure. En las cepas de Tachira y Miranda se observaron moderados valores de resistencia (FR₅₀ entre 5 y 10 X) para clorpirifos, y altos niveles de resistencia (FR 10X) fueron obtenidos para este insecticida en la cepa de Aragua. Todas las cepas venezolanas mostraron elevados niveles de resistencia a pirimifos metil. La cepa cubana, colectada en Santiago de Cuba, mostró niveles moderados de resistencia a temefos y pirimifos metil, y altos niveles para clorpirifos. Los resultados de las pruebas bioquímicas demostraron la presencia de los mecanismos de esterasas y glutatión-s-transferasa, con elevada frecuencia en casi todas las cepas. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de proteínas se observó una banda fuertemente

teñida en todas las cepas, la cual fue esterasa A4, y no se observó en la cepa de referencia susceptible a insecticidas. El significado de esta esterasa en la resistencia a insecticidas organofosforados está aún por demostrar.

Díaz *et al.*, (2003), realizó un estudio de los niveles de resistencia a 10 insecticidas: 4 compuestos organofosforados (malatión, clorpirifos, pirimifos metil y diazinon), 2 carbamatos (propoxur y bendiocarb) y 4 piretroides (cipermetrina, deltametrina, lambdacialotrina y ciflutrina) en 5 cepas de *Blattella germanica* (Linnaeus, 1767) procedentes de la ciudad de Pinar del Río, Cuba. Se detectaron altos niveles de resistencia a los insecticidas: bendiocarb (FR >25), cipermetrina (FR 8.4 a 21.6) y deltametrina (FR >20); bajo nivel de resistencia a diazinon (FR 4 a 6); moderada a alta a pirimifos metil (FR 6.6); así como, susceptibilidad a un insecticida de cada grupo en estudio: clorpirifos (organofosforado) (FR 0.15 a 0.4), propoxur (carbamato) (FR 0.2 a 1) y ciflutrina (piretroide) (FR 1 a 3.8). Solo una cepa presentó baja resistencia a malation (FR 0.6 a 7) y a lambdacialotrina (FR 3.5 a 5.6). Se evidenció resistencia cruzada cipermetrina-deltametrina, que no afectó la susceptibilidad a los piretroides lambdacialotrina y ciflutrina.

Bisset *et al.*, (2003), determinaron los niveles de susceptibilidad a insecticidas, en larvas y adultos de *Ae. aegypti* procedentes de 2 localidades de Panamá utilizando la técnica de la OMS. La acción de 2 sinergistas, S,S,S tributil fosforotritioato (DEF) y butóxido de piperonilo (PBO) fueron investigados, exponiendo las larvas de cuarto estadio a 0.008 mg/l de DEF ó 5 mg/l de PBO durante 4 h previo a la adición de la solución del insecticida. En los bioensayos los mosquitos adultos fueron expuestos a papeles impregnados con insecticidas. En larvas, se encontró resistencia a pirimifosmetil en las 2 poblaciones analizadas, sin embargo, resultaron susceptibles al resto de los insecticidas organofosforados (temefos, malation, fention, fenitroion y clorpirifos) y a los piretroides (deltametrina, lambdacialotrina, cipermetrina y ciflutrina).

Rodríguez *et al.*, (2003) en su estudio sobre la resistencia cruzada de temefos con otros insecticidas organofosforados y piretroides como: malatión y lambdacialotrina en poblaciones de *Ae. aegypti* (L) de Cuba, observaron una resistencia cruzada negativa

para temefos con malatión, sin embargo no fue así para lambdacialotrina, para la cual las poblaciones aumentaron su FR 8.10 antes de ser seleccionada bajo presión con temefos, hasta 283.75 veces en comparación con la cepa susceptible Rockefeller, para la CL₅₀.

Bisset *et al.*, (2004), determinaron los niveles de susceptibilidad a insecticidas en larvas de *Ae. aegypti*, colectadas del municipio Playa, durante la etapa intensiva de la campaña contra el mosquito *Ae. aegypti* en Ciudad de La Habana. En larvas, se encontró alta resistencia a los insecticidas organofosforados fenitro y temefos y moderada a fenitro, también se detectó alta resistencia al carbamato propoxur. Las larvas resultaron susceptibles a clorpirifos, malation y pirimifos metil. Los resultados a través del uso de sinergistas indicaron que las esterasas desempeñan un papel importante en la resistencia detectada a los insecticidas organofosforados, pero no en la resistencia a propoxur, sin embargo, las monooxigenasas intervienen solamente en la resistencia a fenitro. Se confirmó el papel de las esterasas en la resistencia a temefos mediante ensayos de inhibición en gel de poliacrilamida.

Bisset *et al.*, (2006) encontraron una cepa de *Ae. aegypti* (L.) de Santiago de Cuba, con un alto nivel de resistencia a propoxur en comparación con la cepa susceptible de referencia Rockefeller (12.60 × a la concentración letal 50% [CL₅₀] y 18.08 a la concentración letal 90% [CL₉₀]), con una frecuencia de 4.3% de la frecuencia insensible acetilcolinesterasa (AChE), se sometió a selección propoxur durante 13 generaciones sucesivas para aumentar la frecuencia de este mecanismo de resistencia en *Ae. aegypti*. La alta resistencia a propoxur se desarrolló durante esta selección (41.73 veces), y la frecuencia de mecanismo de AChE insensible se incrementó 13.25 veces. No se detectaron otros mecanismos (esterasas, glutatión-s- transferasas, monooxigenasas) en la cepa propoxur-seleccionada.

Álvarez *et al.*, (2006) seleccionó cinco cepas de *Ae. aegypti* de cuatro estados Venezolanos: Trujillo (PTO y SM), Zulia (Z), Falcón (F) y Táchira (TB), para determinar los niveles de resistencia al temefos. Los bioensayos se realizaron con larvas de IV estadio probando cinco concentraciones del insecticida, siguiendo la metodología

de la OMS. Al determinar los rangos de resistencia, las cepas TB, Z, F y SM resultaron ser susceptibles con valores de FR_{50} menores a 5. La cepa PTO resultó resistente (6.3 X) Los resultados sugieren que estas poblaciones deben monitorearse continuamente para observar cualquier cambio en los niveles de resistencia al temefos.

Vargas *et al.*, (2006) determinaron los niveles de resistencia a temefos y deltametrina en cinco poblaciones naturales de *Ae. aegypti* del norte de Perú (La Libertad y Piura), dos cepas de *An. albimanus* (Sullana y Tambogrande) y una cepa de *Lutzomyia spp* (Santiago de Chuco, La Libertad). Las poblaciones de *Ae. aegypti* de Sullana y Tambogrande (Piura) presentaron factores de resistencia (FR) a temefos de 6.84 con un KT_{50} (tiempo de derribo) 160.42 min y 70% de mortalidad a las 24 h; en tanto en la población de Tambogrande se observó un FR (Factor de resistencia) de 5.60, KT_{50} 107.20 y 80% de mortalidad, a diferencia de las cepas de La Esperanza, El Porvenir y Florencia de Mora (La Libertad) que fueron susceptibles. Se identificó resistencia en las poblaciones de *Ae. aegypti* y *An. albimanus* procedentes de Piura (Tambogrande y Sullana) para deltametrina, a diferencia de las poblaciones de *Ae. aegypti* y *Lutzomyia spp* de La Libertad que fueron susceptibles. Se identificó la esterasa B₂ en larvas de tercer estadio o cuarto temprano, en geles de poliacrilamida de proteínas.

Bisset *et al.*, (2007) realizaron un estudio de la resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Ae. aegypti* de 2 provincias del Perú: Trujillo y Tumbes. Los bioensayos en larvas revelaron susceptibilidad al insecticida organofosforado malation (FR 5X) en la cepa Trujillo, moderada a fenitrothion y fenitrothion (FR50 entre 5 y 10) y alta resistencia (FR 10X) a clorpirifos y temefos, sin embargo en la cepa Tumbes se observó susceptibilidad para los organofosforados evaluados, excepto para fenitrothion, para el cual se encontró tolerancia. Para el estadio adulto a la dosis recomendada en la población de Trujillo se observó resistencia al organoclorado DDT y a los piretroides lambda-cialotrina y ciflutrina, la cepa Tumbes fue resistente a DDT y a todos los piretroides evaluados. Ninguna de las 2 cepas mostró resistencia a clorpirifos. Los resultados, con el uso de sinergistas demostraron que las enzimas esterasas y monooxigenasas desempeñaron un

papel importante en la resistencia observada a organofosforados en larvas de la provincia Trujillo. A través de ensayos bioquímicos se encontró una actividad incrementada de esterasas en la cepa de Trujillo, al igual que la glutatión S transferasas (GST) y la acetilcolinesterasa modificada (iAChE). Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida se observó en la cepa de Trujillo, la presencia de la esterasa A4.

Valderrama, *et al.*, (2008) realizaron un estudio sobre la susceptibilidad de cuatro poblaciones del Valle del Cauca de Colombia a un insecticida organofosforado (malation) y un piretroide (deltametrina) utilizando las técnicas de bioensayos con papeles y botellas impregnadas. Las dosis diagnóstico, establecidas para bioensayos con botellas fueron de 470 µg/mL para malation y 5 µg/mL para deltametrina, los cuales produjeron mortalidades mayores al 98% para las cepas de campo después de 70 min de exposición. Con las dosis diagnóstico de la OMS con papeles impregnados, se obtuvieron mortalidades superiores al 95% en las cepas de las cuatro localidades al utilizar deltametrina y mortalidades en un rango del 82 al 100% con malation. Con ambos tipos de bioensayos, las cuatro poblaciones estudiadas resultaron susceptibles a los dos tipos de insecticidas probados.

Pérez y Molina (2009) determinaron los niveles de resistencia a insecticidas en larvas de *Ae. aegypti* de tres municipios del estado Aragua de Venezuela (Girardot, Mario Briceño Iragorri y Urdaneta), en comparación con una cepa susceptible (Rockefeller), a través de la técnica de inmersión de la OMS. Se evaluaron los insecticidas organofosforados (malatión, pirimifos metil y temefos) y el carbamato (propoxur). Se encontró resistencia al malatión en las tres cepas, con valores de FR de 69.50X, 150.6X y 113.52X; para las cepas Girardot, Mario Briceño Iragorri y Urdaneta, respectivamente; sugiriendo esta diferencia en los niveles de resistencia a este insecticida como un fenómeno que se da de manera local por la presión de selección que han sufrido las poblaciones. Todas las cepas resultaron susceptibles a los organofosforados pirimifos metil y temefos, y al carbamato propoxur. Estudios con sinergistas PBO y DEF demostraron que las enzimas del grupo oxidasas de función múltiple están implicadas en la resistencia al malatión.

Flores *et al.*, (2009) determinaron la dosis diagnóstico, (DD) y enzimas de desintoxicación al piretroide permetrina en poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes del norte de México (Coahuila, Sonora y Tamaulipas). Los resultados dejaron en claro que la población de Coahuila mostró iAChE elevada (100.00%) (DD= 86 µg/botella) en comparación con la cepa de referencia New Orleans, su presencia en niveles tan elevados sugirió resistencia a organofosforados y carbamatos. En la población de Sonora las oxidasas estuvieron presentes, siendo el mecanismo principal de resistencia a permetrina.

Chaverra *et al.*, (2012) evaluaron durante siete generaciones el efecto de la selección con lambda-cialotrina sobre *Ae. aegypti* en el desarrollo de la resistencia a este piretroide y sus consecuencias en la aparición de resistencia cruzada a los insecticidas temefos, malatión y permetrina en condiciones de laboratorio. Se obtuvieron adultos a partir de larvas colectadas en campo en Cúcuta (Colombia) y sus descendientes fueron expuestos a concentraciones del insecticida incrementadas gradualmente cada generación. El desarrollo de la resistencia fue confirmado usando bioensayos en larvas y adultos. La selección incrementó el factor de resistencia (FR) en cada generación (1.25X promedio). La población de la generación F₇ fue altamente resistente a lambda-cialotrina en adultos (F₁ 100% mortalidad disminuyó a F₇ 35% de mortalidad) y larvas (GR₅₀F₁ = 24.22X hasta GR₅₀F₇ = 61.52X). La cepa resistente a lambda-cialotrina no presentó resistencia cruzada con temefos y malatión (organofosforados), pero sí a permetrina (piretroide).

Álvarez *et al.*, (2013) determinaron la susceptibilidad a deltametrina y malation en cuatro poblaciones de campo de *Ae. aegypti* del oeste de Venezuela durante los años 2008 y 2010, así como las enzimas asociadas en la resistencia. La resistencia al derribo a deltametrina fue moderada en la mayoría de las poblaciones en 2008 (RR_{KC50} valores fueron de entre 5 y 10 veces), y sólo una población mostró una alta resistencia en 2010 (RR_{KC} 10 veces). Se observó resistencia post recuperación moderada y alta a deltametrina en la mayoría de las poblaciones para 2008 y 2010, respectivamente. No se aumentó significativamente la expresión de la glutatión-S-transferasas y MFO función mixta. Todas las poblaciones mostraron una baja resistencia al malatión en 2008 y 2010,

con niveles significativamente más altos de α -esterasas para 2008 y 2010 y β -esterasas para 2008.

López *et al.*, (2014) determinaron la susceptibilidad a clorpirifos en seis cepas de *Ae. aegypti* (L.) de Veracruz, México. Los resultados mostraron que la población de Cosoleacaque fue altamente resistente al clorpirifos (15X), dos poblaciones tolerantes Poza Rica (8X) y Martínez de la Torre (5X) y como susceptibles Coatzacoalcos (4X), Tantoyuca (2X) y Veracruz (1X). Además, los altos niveles enzimáticos de α y β -esterasa en las poblaciones fueron correlacionados con la resistencia, lo que sugirió que las esterasas pueden ser el mecanismo que ocasionó la resistencia al clorpirifos.

2.8 Resistencia por insensibilidad en esterasas

La esterasas han sido objeto de estudio por más de 50 años, siendo considerado como uno de los mecanismos de resistencia enzimática más importantes. Estas enzimas son consideradas el principal componente de defensa de los insectos a los xenobióticos. Adicionalmente, el estudio la enzima acetilcolinesterasas (ACE) fue el blanco de estudio considerando el modo de acción de los organofosforados y carbamatos (Oakeshott *et al.*, 2005)

Severini *et al.*, (1994) logró identificar por RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphism) un gen que codificó para esterasas B en un locus de DNA de *Cx. pipiens* en Italia. Por su parte Chandree *et al.* (1997) en África occidental mapeo la distribución geográfica de un gen (AceR) logrando identificar un gen que codifica para esterasas. Posteriormente estudios realizados en Cuba demostraron la presencia del gen AchE, en *Ae. aegypti*, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, donde se observó una banda, la cual nombraron A4 (Rodríguez *et al.* 1999). En esta línea de estudio posteriormente determinaron la presencia de 3 fenotipos de esterasas B1, A6 y B6 los cuales aparecen como mecanismo de resistencia en *Cx. quinquefasciatus* en Cuba (Bisset *et al.*, 1999).

Es evidente que a la fecha no existe un estudio que muestre la frecuencia y distribución de genes de resistencia con potencial como marcadores moleculares para organofosforados, se tiene referencia de técnicas para determinar la actividad elevada de enzimas esterasas y AchE modificada donde se sugiere, la AchE alterada confiere un mayor valor adaptativo (Dieguez *et al.*, 1999).

Aunque se han reportado varias mutaciones relacionadas con el desarrollo de resistencia a los insecticidas en otras especies de insectos. Dos mutaciones del sitio activo de AchE1 en los mosquitos resultan en la insensibilidad o reducción de la sensibilidad en respuesta a organofosforados y carbamatos. La sustitución de G119S se ha reportado en varias especies de mosquitos incluyendo *An.gambiae* , *An. albimanus*, *Cx vishnui* , *Cx pipiens* , y *Cx. quinquefasciatus* (Alout *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2005; Weill *et al.*, 2002, 2003; Engdahl *et al.*, 2015; Liebman *et al.*, 2015)

Hay otras mutaciones donde hay una sustitución de aminoácidos de Phe455Trp, este estudio lo realizó Oh *et al.*, (2005) en *Cx. tritaeniorhynchus* donde esta sustitución de aminoácidos, está acompañada por la insensibilidad a varios organofosforados.

No es nada nuevo el estudio sobre la genética de las esterasas, ya que hay diversos reportes *Drosophila* spp. (Beckman and Johnson *et al.*, 1964; Wright, 1963; Johnson *et al.*, 1968) y *Musca* spp. (Velthius *et al.*, 1963, Ogita, 1962, Menzel *et al.*, 1963)

En 1969 estudiaron las isoenzimas de esterasas en *Ae. aegypti* por Townson; años más tarde Freyvogel *et al.*, (1968) describió los zymogramas (actividad enzimática) de 14 especies de mosquitos en la familia Culicidae.

Unos 49 genes que codifican para carboxil-colin-esterasas (CCE) se han identificado en el genoma de *Ae. aegypti*. Sin embargo, las esterasas han sido solamente caracterizadas en electroforesis en gel. La esterasa 6 se identificó en *Ae. aegypti*, encontrando una alta correlación entre las intensidades de la banda de esterasa 6 y el

tiempo letal cincuenta (TL₅₀) en un mosquito de 3 días de emergido (Field y Hitchen, 1984).

Recientemente se asoció la actividad elevada de CCE con la resistencia a temefos en varias poblaciones de *Ae. aegypti* (Paeporn *et al.*, 2003; Saelim *et al.*, 2005; Marcombe *et al.*, 2009; Bisset *et al.*, 2011; Strode *et al.*, 2012).

JUSTIFICACIÓN

El método más comúnmente utilizado para el control de mosquitos vectores se ha basado principalmente en la aplicación de insecticidas. Sin embargo, el uso indiscriminado de éstos, ha provocado la selección de poblaciones genéticamente capaces de resistir los efectos de los compuestos químicos utilizados actualmente. Esta resistencia se ha presentado en todos los grupos de insecticidas incluyendo los organofosforados. Uno de estos mecanismos es la insensibilidad del sitio activo debida a mutaciones en la acetilcolinesterasa (ACE), enzima clave en la transmisión del impulso nervioso en insectos al hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina.

Por lo anterior, la importancia del presente proyecto estriba en establecer la presencia y analizar la frecuencia de las mutaciones asociadas a las enzimas esterases, buscando correlacionarlas con la resistencia al organofosforado clorpirifos, uno de los adulticidas de mayor uso en México. La caracterización y detección de estas mutaciones es vital ya que al relacionarlas con la resistencia a los organofosforados pueden usarse como marcadores de resistencia; además de contribuir al diseño de programas más eficientes para el control del principal vector del dengue, Zika y fiebre Chikungunya en México.

HIPÓTESIS.

La mutaciones asociadas a esterasas ACE 1 y Est6421 están relacionadas con la resistencia al organofosforado clorpirifos en poblaciones de *Aedes aegypti* (L) de México.

OBJETIVO

5.1 Objetivo Principal

Determinar la presencia y frecuencia de las mutaciones en esterasas ACE 1 y Est6421 y su correlación con la resistencia a clorpirifos en 7 poblaciones de *Ae. aegypti* de México.

5.2 Objetivos Particulares

- Determinar la susceptibilidad con base en CL₅₀ al insecticida clorpirifos en poblaciones de *Ae. aegypti* y establecer el nivel de resistencia por comparación con la cepa susceptible New Orleans.
- Determinar la actividad de enzimas: esterasas alfa y beta, oxidasas de función múltiple (MFO), glutatión S-transferasa (GST) y acetilcolinesterasa insensible iAChE por medio de ensayos bioquímicos y determinar su asociación con la resistencia a clorpirifos.
- Determinar la presencia y frecuencia de las mutaciones ACE 1 y Est6421 en poblaciones de *Ae. aegypti*.
- Correlacionar la frecuencia de las mutaciones con la resistencia a clorpirifos.

MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Área de estudio

El área de estudio estuvo comprendida por los estados de Nuevo León, Nayarit, Yucatán y Veracruz (Fig. 8).

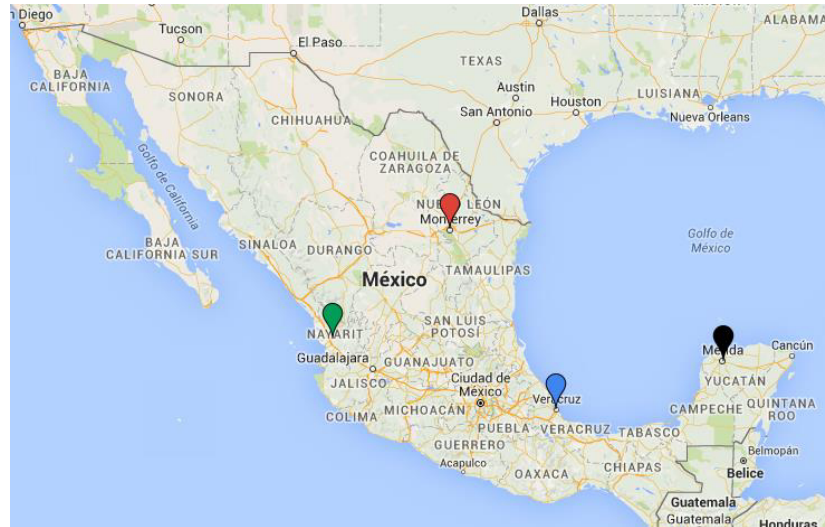


Fig.8 Sitios de re-colecta de *Ae. aegypti* en diferentes localidades de México

6.1.1 Características de las localidades de recolecta

6.1.1.1 Nuevo León

Del estado de Nuevo León se incluyeron 3 poblaciones de parte de la zona metropolitana de Monterrey N.L; siendo éstas Monterrey, San Nicolás y Guadalupe. El estado de Nuevo León está situado en el extremo noreste de la República Mexicana. Se localiza entre los paralelos $23^{\circ}10'00''$ y $27^{\circ}47'30''$ de latitud norte, y entre los $0^{\circ}42'16''$ al oriente y $2^{\circ}5'5''$ al poniente del meridiano que pasa por la cruz este de la Catedral de México, o sea los $98^{\circ}24'38''$ y $101^{\circ}12'9''$ de longitud oeste del Meridiano de Greenwich. Limita al norte con el estado de Coahuila, los Estados Unidos de América, en la angosta zona fronteriza del municipio de Colombia y con el estado de Tamaulipas; hacia el oeste limita con Coahuila, San Luis Potosí y con Zacatecas (en el vértice de los límites de los

cuatro estados); al sur comparte todo su límite oriental con San Luis Potosí y Tamaulipas.

El clima de Nuevo León es muy variable debido a las grandes regiones que forman la Sierra Madre; predominan los climas semisecos extremosos. La precipitación pluvial es bastante escasa, aunque cuenta con regiones que registran lluvias anuales mayores de 800 milímetros; la media general del estado oscila entre 300 y 600 milímetros.

En la región de la Gran Llanura de Norteamérica se distribuyen principalmente los climas seco y semiseco. En los meses de enero, marzo y diciembre se observa la menor incidencia de lluvias con una precipitación pluvial entre 10 y 15 milímetros la mayor precipitación pluvial ocurre en septiembre con un valor entre 110 y 120 milímetros.

La temperatura media anual es mayor a 22°C; la media mensual más alta se registra en julio y oscila entre 28° y 29°C y la mínima en enero con 14° y 15°C.

Al estado de Nuevo León lo comprenden tres zonas fisiográficas; la Gran llanura de Norteamérica, la llanura Costera del Golfo y la Sierra Madre Oriental. Mismas que, basadas en estudios del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), a continuación se describen (INAFED, 2010).

6.1.1.2 Nayarit

Del estado de Nayarit se incluyó una sola población de la ciudad de Nayarit. El estado está ubicado en el occidente de la República, entre las siguientes coordenadas geográficas extremas: al norte 23°05', al sur 20°36' de latitud norte; al este 103°43', al oeste 105°46' de longitud oeste. Limita al norte con los Estados de Durango y Sinaloa, al este con los Estados de Jalisco, Durango y Zacatecas, al sur con Jalisco y el Océano Pacífico y al oeste con el Océano Pacífico.

Nayarit tiene una superficie de 27, 864.8 kilómetros cuadrados (Km²) que representan el 1.4% del territorio nacional. Se considera una entidad de mediana extensión territorial, aun cuando ocupa el lugar 23 a nivel del país (incluidos el archipiélago de las Islas Marías e Isabel).

El clima, condición determinante para algunas actividades, entre ellas la agricultura, en Yucatán es muy variado: el cálido subhúmedo con lluvias en verano predomina en el 60% de la superficie estatal; el semicálido subhúmedo en el 32% y; el templado con lluvias en verano, en el 6% de la superficie. En el 2% restante del territorio, el clima varía entre el cálido húmedo, el semiseco muy cálido y el seco muy cálido. De 1980 al 2000 la temperatura media fue de 22.6° centígrados; la temperatura más baja fue de 19.2° y la más alta de 26.6° centígrados (INEGI, 2015).

6.1.1.3 Yucatán

De este estado se obtuvieron 2 poblaciones, Progreso y Mérida, están localizadas a menos de 50 km del Golfo de México en la parte noroeste del Estado de Yucatán, que ocupa la parte del norte de la Península de Yucatán, sus coordenadas son 20° 58' 04" N, 89° 37' 18" O. Al este colinda con el Estado de Quintana Roo, al oeste con el Estado de Campeche y al norte con Golfo de México. Yucatán tiene una topografía muy plana y está situado muy cerca del nivel de mar.

El clima de Mérida y en general de la península de Yucatán es caliente y húmedo. La extensión de lluvias es larga y va desde mayo hasta enero aunque no es raro que llueva durante los llamados meses secos como febrero, marzo y abril. Los meses más calurosos son abril y mayo, subiendo a veces la temperatura hasta 40°C. Los meteorólogos clasifican el clima como de tipo "Awo" (cálido subhúmedo con lluvias durante el verano). Cuenta con una temperatura promedio de 26.61°C.

Por su parte Progreso, se encuentra en la costa norte del estado de Yucatán, en la denominada Región 6 Influencia Metropolitana debido a su cercanía con la capital del estado Mérida, sus coordenadas extremas son 21° 10' - 21° 19' de latitud norte y 89° 34' - 89° 57' de longitud oeste, limita con los municipios de Chicxulub Pueblo, Hunucmá, Ixil, Mérida y Uucú.

Predomina el clima cálido subhúmedo con lluvias regulares en verano. La temperatura media anual es de 25,6 °C, siendo la máxima 36°C se registra en el mes de mayo y la mínima se registra en enero. Calman los calores las brisas marinas y los

vientos del sur y del oeste. Las lluvias orientales caen en la época de junio a octubre y son aprovechadas por los campesinos, ya que ellas riegan sus milpas. Lo mismo, cuando soplan los nortes caen aguaceros y constantes lluvias (INAFED, 2010).

6.1.1.4 Veracruz

De este estado se incluyó una población de la ciudad de Cardel, Veracruz, que de ahora en adelante la llamaremos solo Cardel.

Se encuentra ubicado entre la Sierra Madre Oriental y el Golfo de México, en las coordenadas 17° 03' 18" y los 22° 27' 18" de latitud norte y los 93° 36' 13" y los 98° 36' 00" de longitud oeste. Limita al norte con el Estado de Tamaulipas, al este con el Golfo de México, al sureste con los Estados de Tabasco y Chiapas, al sur y suroeste con el Estado de Oaxaca, al oeste con el Estado de Puebla, al noroeste con los Estados de San Luis Potosí e Hidalgo.

El Estado de Veracruz por estar situado en la zona tórrida, su clima es Cálido en toda la costa; pero debido al relieve de su suelo tan variado resulta de diferentes climas. En general, puede decirse que el Estado de Veracruz tiene los siguientes climas: clima cálidos húmedos y subhúmedos, climas semicálidos húmedos, climas Templados, climas semifríos y fríos y clima semiseco.

Dentro de los tipos de vegetación que se desarrollan en el Estado, en orden decreciente de abundancia se encuentran: selva alta perennifolia, baja caducifolia y mediana subperennifolia; bosques mesófilo, manglar, sabana, bosques de pino, encino, tular, palmar, vegetación de dunas costeras y matorral con izotes (INAFED, 2010).

6.2 Material biológico

Se realizó un muestreo dirigido, recolectando las fases larvarias del mosquito en criaderos temporales donde se conoce que el vector se reproduce (agua limpia almacenada o estancada), mediante el uso de caladores estándares, aspiradores manuales y eléctricos.

Posteriormente el material fue transportado en bolsas WHIRL-PACK debidamente etiquetadas, las cuales fueron resguardadas en termos y transportados al insectario del área de Fisiología y Toxicología de Insectos del Laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas “Unidad B”, UANL.

Las larvas se colocaron en charolas de plástico (Fig.9) identificadas con el nombre de cada localidad conteniendo agua de clorada a una temperatura de 26 a 27°C (Fig. 9) y se alimentaron con proteína de hígado bovino en polvo (Liver powder MP Biomedicals, LLC) al 50% diluido en agua. Una vez que las larvas pasaron al estadio de pupa se transfirieron a cámaras de emergencia.



Fig.9 Charola para la cría de larvas

Los mosquitos macho se alimentaron con agua azucarada al 10% (fuente de carbohidratos) sobre algodones impregnados y las hembras con sangre de rata (*Rattus norvegicus*) para la producción de huevos (Fig. 10). Dentro de las jaulas se colocaron vasos de plástico con agua de clorada y papel filtro como sustrato para la ovoposición. Después de que las hembras depositaron los huevos se dejaron las papeletas de 2 a 3 días para la embrionación de los mismos.



Fig.10 Papeletas con huevos

Las papeletas se colocaron en charolas con agua deionada a una temperatura de 26 a 27°C y se le agregó una pizca de levadura de cerveza (Nevada, USA), después de eclosionar los huevos, las larvas se alimentaron con proteína de hígado y este procedimiento se repitió hasta obtener la generación filial deseada.

Además, se obtuvieron huevos directamente de campo recolectados de ovitrampas intencionalmente colocadas para este fin.

6.3 Bioensayos de susceptibilidad.

La susceptibilidad de las poblaciones de *Ae. aegypti* se determinó mediante el “bioensayo de botella” (método CDC), (Brogdon y McAllister 1989) ante diferentes dosis del insecticida clorpirifos (O, dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato) (98% pureza) calidad reactivo (ChemService, PA, USA.). Las dosis empleadas para el insecticida variaron según la respuesta obtenida en los mosquitos de cada una de las poblaciones.

El insecticida clorpirifos se resuspendió en 1 mL de acetona (CTR scientific), con el fin de obtener las soluciones stock con concentraciones finales de 1000 µg/µL, 500 µg/µL y 100 µg/µL respectivamente. A partir de estas soluciones se realizaron diluciones en tubos eppendorf de 2mL con la finalidad de obtener concentraciones que ocasionaran entre 2% y 98% de mortalidad en los especímenes evaluados. Estas soluciones fueron etiquetadas, resguardadas de la luz con papel aluminio y almacenadas en refrigeración.

Se utilizaron botellas de vidrio Wheaton de boca angosta (3 cm) y 250 mL de capacidad, con tapón de rosca (Fig.11), stocks del insecticida de 1000, 100 y 10 ppm y acetona (como solución acarreadora) (CTR scientific), así como micropipetas de 1000, 200 y 20 μ L.



Fig.11 Botellas Wheaton

Para impregnar las botellas, primero se les agregó 1 mL de acetona (CTR scientific) inmediatamente, después se vertió el volumen de la solución stock que nos dio la concentración en μ g/botella (Tabla 2), se colocó la tapa y se agitó la mezcla suavemente y rotó la botella en varias direcciones para que la superficie interna de la botella (base, paredes y tapa) se impregnaran con la solución. Posteriormente, se colocó en una rotadora de botellas (WHEATON Bench Top Roller) durante algunos segundos para la evaporación del solvente, finalmente se resguardaron en un lugar oscuro a temperatura ambiente. Las botellas se utilizaron después de 24 a 48 h de impregnación.



Fig.12 Material utilizado para impregnar botellas

Para todos los bioensayos se preparó un control, en este caso los controles fueron botellas impregnadas con un mL de acetona (CTR scientific).

Tabla. 2. Ejemplo sobre cómo realizar la selección de volumen del stock para impregnar las botellas.

Concentración de la solución stock	Cantidad de stock adicionada a la botella *	Concentración final por botella
1000 ppm	1 μ l	1 μ g
100 ppm	10 μ l	1 μ g
10 ppm	100 μ l	1 μ g

*Más el ml de acetona, a 1ppm = 1 μ g/mL

Para los bioensayos se usaron hembras adultas de 1 a 3 días de edad sin alimentación sanguínea. Se usaron hembras provenientes de los huevos de campo (generación de campo) o las hembras provenientes de la primera generación (F₁) obtenida en el laboratorio de las larvas recolectadas de campo (generación parental).

Se colocaron de 15 a 20 hembras, con la ayuda de un aspirador bucal y se transfirieron a las botellas impregnadas con el insecticida, las cuales se taparon rápidamente, para impedir el escape de los mosquitos y se examinaron para verificar si estaban en perfecto estado. Las hembras que se encontraban dañadas se eliminaban del conteo.

Una vez que los mosquitos fueron expuestos a la dosis de insecticida se inició el conteo, y se realizaron observaciones cada 10 min, hasta completar 1 h. Se registró la cantidad de mosquitos volteados (patas arriba) o muertos, teniendo el registro a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min. Una vez completada la hora de exposición, todos los mosquitos (volteados o no) fueron transferidos a cámaras de recuperación (Fig.13), las cuales consisten en vasos desechables con una tapa de gasa, a los que se les colocaron en la parte superior un algodón humedecido con una solución de sacarosa al 10% para su alimentación y luego de 1, 2, 4, 6, 8 y 24h se registró la mortalidad final.



Fig.13 Cámaras de recuperación

Con estos datos se determinó el porcentaje de mortalidad a las 24 h, buscándose porcentajes entre el 8% al 90 % de mortalidad, adecuados para realizar los análisis estadísticos pertinentes. Todos los bioensayos fueron realizados por triplicado para cada dosis de insecticida, se incluyó un testigo solo con acetona.

Los datos obtenidos fueron analizados en el programa IRMA (Regresión logística) (Lozano *et al*, 2012) (Fig.14), el cual nos calcula la concentración letal 50 (CL₅₀), concentración letal 90 (CL₉₀), los intervalos de confianza con una P=0.05 y la pendiente de la regresión y desviación estándar.

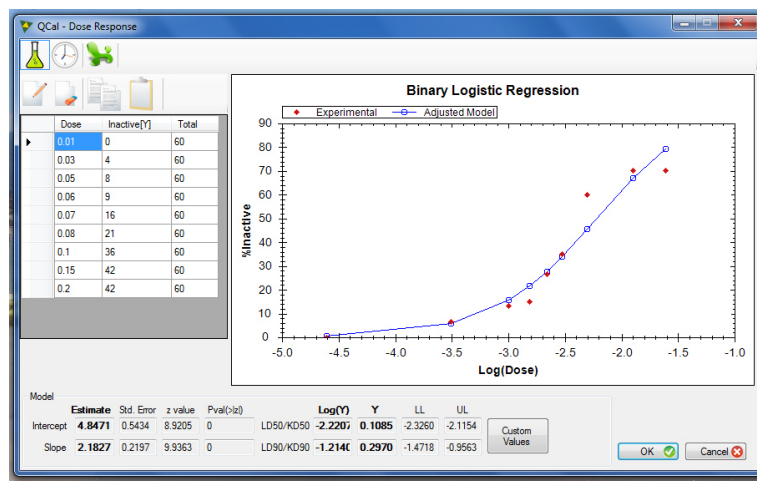


Fig.14 Programa IRMA (Regresión logística)

Todos los bioensayos se realizaron tanto para las poblaciones de campo al mismo tiempo la cepa susceptible de referencia New Orleans (proporcionada por el CDC de Atlanta).

6.4 Enzimas

Para la determinación de la actividad de enzimas degradativas de insecticidas relacionadas con la resistencia a los mismos se homogenizaron hembras (Fig.15) individualmente en 100 μ l de 0.01M pH 7.2 de buffer fosfato de potasio (Jalmek) y posteriormente se resuspendieron con el mismo buffer hasta tener un volumen de 2mL. Se tomaron alícuotas de 100 μ l del homogenato y se transfirieron en pocillos de una microplaca (Corning, USA); los individuos fueron analizados por triplicados. Se evaluaron 6 diferentes enzimas de resistencia para cada mosquito: acetilcolinesterasa (AChE), acetilcolinesterasa insensible (iAChE), α y β esterasas, oxidasas de función múltiple (MFO) y glutatión transferasas (GST), también se evaluó la cantidad de proteínas de cada individuo según lo describe Brogdon y McAllister (1998, 1997), Brogdon y Barber (1990), Brogdon (1989) y Brogdon *et al.*, (1988a, b) usando como referencia la cepa NO. las absorbancias fueron medidas con un espectrofotómetro (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria).

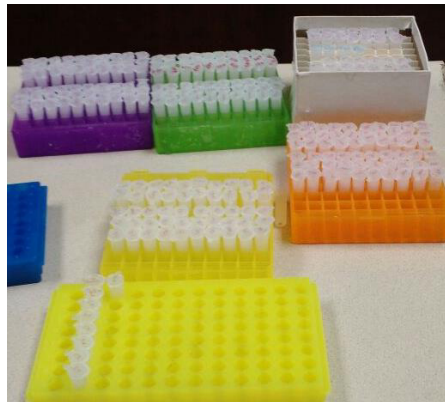


Fig.15 Homogenatos

6.4.1 Curvas estándar

Para obtener las curvas de calibración se prepararon soluciones para las enzimas α y β esterasas, oxidasas y proteínas (Fig. 16), empleando la técnica con algunas modificaciones de acuerdo a lo establecido por Valles *et al.*, (2006) del Ministerio de Salud de Brasil Fundación Oswaldo Cruz a concentraciones apropiadas para la obtención de las concentraciones decrecientes que permitieran construir la curva de calibración de cada estándar, de modo que las absorbancias sean adecuadas y representativas de la concentración.

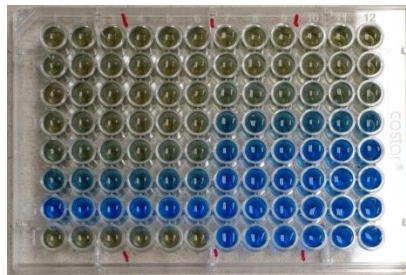


Fig.16 Placa de curva de calibración de proteína

6.4.1.1 Alfa Esterasas

Para la curva estándar de alfa esterasas se utilizó el reactivo alfa naftol (SIGMA-ALDRICH) su concentración inicial es de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. En la tabla 3 se sintetizan las concentraciones utilizadas para la calibración:

Cada concentración se colocó por triplicado en una microplaca y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente se adicionó 100 μl de dianisidina tetrazotizada (SIGMA-ALDRICH), se incubó durante 2 minutos y se realizaron las lecturas usando un filtro de 540 nm. Las absorbancias obtenidas se registraron para generar la curva estándar.

Tabla 3. Cuadro de concentraciones para la curva de calibración de alfa esterasas.

Concentración de alfa naftol µg	alfa naftol µl	µl Buffer fosfato de potasio
0	-	100
0.3	0.6	99.4
0.5	1	99
0.7	1.4	98.6
1.2	2.4	97.6
1.6	3.2	96.8
2	4	96
2.5	5	95
3	6	94
3.2	6.4	93.6
3.7	7.4	92.6
4.2	8.4	91.6
4.7	9.4	90.6
5	10	90

6.4.1.2 Beta Esterasas

Para la curva estándar de beta esterasas se utilizó el reactivo beta naftol (SIGMA-ALDRICH) su concentración inicial es de 0.5 µg/µl. En la tabla 4 se sintetizan las concentraciones utilizadas para la calibración:

Tabla 4. Cuadro de concentraciones para la curva de calibración de beta esterasas.

Concentración de beta naftol µg	beta naftol µl	µl Buffer fosfato de potasio
0	-	100
0.5	1	99
1	2	98
1.5	3	97
2	4	96
2.5	5	95
3.5	7	93
4	8	92

Cada concentración de beta naftol se colocó en una microplaca por triplicado y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente se adicionó 100 µl de dianisidina tetrazotizada (SIGMA-ALDRICH), se incubó durante 2 minutos y se realizaron las lecturas usando un filtro de 540 nm. Las absorbancias obtenidas se registraron para generar la curva estándar.

6.4.1.3 Oxidasas de función múltiple

Para la curva estándar de esta enzima se utilizó el reactivo citocromo C bovine heart (SIGMA-ALDRICH) su concentración inicial es de 0.01 µg/µl. En la tabla 5 se sintetizan las concentraciones utilizadas para la calibración:

Tabla 5. Cuadro de concentraciones para la curva de calibración de oxidasas de función múltiple.

Concentración de µg/µl citocromo C	Citocromo C µl	µl Buffer fosfato de potasio
0	-	100
0.002	0.2	99.8
0.07	7	93
0.15	15	85
0.2	20	80
0.25	25	75
0.3	30	70
0.5	50	50
0.55	55	45
0.6	60	40
0.65	65	35

Cada concentración del citocromo C se colocó en una microplaca por triplicado, se agregó 200 µl 3,3,5,5-tetrametil-benzidina dihidroclorada (SIGMA-ALDRICH) (disuelta en metanol (Jalmek) y buffer acetato 0.25 M pH 5) en cada pozo y se añadió 25 µl de peróxido de hidrógeno a 3% (Jalmek). Se incubó por 10 minutos y se leyó con un filtro de 620nm.

6.4.1.4 Proteínas

Para la curva estándar de proteínas se utilizó el reactivo BSA (BIO-RAD) su concentración inicial es de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. En la tabla 6 se sintetizan las concentraciones utilizadas para la calibración de la curva estándar.

Tabla 6. Cuadro de concentraciones para la curva de calibración de proteínas

Concentración de μg BSA	BSA μl	μl Buffer fosfato de potasio
0	-	20
0.1	0.1	19.1
0.7	0.7	19.3
1.5	1.5	18.5
2.2	2.2	17.8
3.3	3.3	16.7
4.3	4.3	15.7
4.7	4.7	15.3
5.3	5.3	14.7
6.0	6	14
6.5	6.5	13.5

Cada concentración de BSA se colocó en una microplaca por triplicado, 200 μl de colorante de proteína (protein dye) (BIO-RAD) concentrado. Posteriormente se realizaron las lecturas a 620 nm inmediatamente (T_0).

Con la curva de calibración de proteínas se hicieron las correcciones de las absorbancias y se obtuvo la actividad enzimática correspondiente a cada enzima analizada.

6.4.2 Alfa y beta-esterasas

Se colocaron 100 μL del homogenato por triplicado en una microplaca, se le añadió 100 μL de α o β naftilacetato (SIGMA-ALDRICH) (disuelto en acetona (CTR

Scientific) y buffer fosfato) y se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente se adicionó 100 µl de dianisidina tetrazotizada (SIGMA-ALDRICH), se incubó durante 4 minutos y se realizaron las lecturas usando un filtro de 540 nm. Alfa o beta naftil fueron utilizados como controles positivos.

6.4.3 Oxidasas de función múltiple (MFO)

Se colocaron 100µL del homogenato por triplicado en una microplaca, se agregó 200 µl 3,3,5,5-tetrametil-benzidina dihidroclorada (SIGMA-ALDRICH) (disuelta en metanol (Jalmek) y buffer acetato 0.25 M pH 5) en cada pozo y se añadió 25 µl de peróxido de hidrógeno (Jalmek) a 3%. Se incubó por 10 minutos y se leyó con un filtro de 620nm. Se utilizó Citocromo C (SIGMA-ALDRICH) como control positivo.

6.4.4 Glutación S transferasas (GST)

Se colocaron 100µL del homogenato por triplicado en una microplaca, se agregó 100 µl de glutatión reducido (SIGMA-ALDRICH) y 100 µl 1cloro-2,4 dinitrobenzeno (cDNB) (SIGMA-ALDRICH) en cada pozo de microplaca y se realizaron lecturas a una longitud de onda de 340 nm inmediatamente y luego de 10 minutos. La lectura inicial T0 se restó a la lectura realizada a los 10 min (T10).

6.4.5 Acetil colinesterasa (ACE)

Se colocaron 100µL del homogenato por triplicado en una microplaca se agregó 100 µl acetilcolina yodada (ACTH) (SIGMA-ALDRICH) y 100 µl de ácido ditio-bis-2nitrobenzoico (DTNB) (SIGMA-ALDRICH). Posteriormente se realizaron las lecturas a 414 nm inmediatamente (T0) y luego de 20 min de incubación a temperatura ambiente (T20). Se restaron los T0 a los T20.

6.4.6 Acetil colinesterasa insensible (iAChE)

Se colocaron 100µL del homogenato por triplicado en una microplaca se agregó 100 µl acetilcolina yodada (ACTH) (SIGMA-ALDRICH)-propoxur (Chem Service) y 100 µl de ácido ditio-bis-2nitrobenzoico (DTNB) (SIGMA-ALDRICH). Posteriormente se realizaron las lecturas a 414 nm inmediatamente (T0) y luego de 20 min de incubación a temperatura ambiente (T20). Se restaron los valores obtenidos al T0 y T20.

6.4.7 Proteínas.

Se colocaron 20µL del homogenato por triplicado en una microplaca se agregó 80 µl de buffer fosfato y 200 µl de colorante de proteína (protein dye) concentrado (BioRad). Posteriormente se realizaron las lecturas a 620 nm inmediatamente (T0).

6.5 Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído de cada mosquito siguiendo la técnica de extracción de sales (Coen, *et al.*, 1982). Los mosquitos fueron macerados individualmente en 100 µL de buffer de homogenización (0.1M NaCl (Research Organics), 0.2M sacarosa (Research Organics), 0.1 Tris-HCl pH 9.1, 0.005M EDTA (Research Organics) y 0.5% dodecilsulfato de sodio-SDS) (Research Organics) utilizando pistilos Kontex en tubos eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente se mezclaron, se centrifugaron por 2 min a 14.000 y se incubaron a 65°C por 30 min en una plancha caliente (Lab-Line). Después de este periodo se adicionaron 15 µL de acetato de potasio, se mezclaron, se colocaron a -20°C por al menos 30 min para precipitar el SDS y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min. Los sobrenadantes fueron transferidos individualmente a nuevos tubos eppendorf estériles de 1.5 mL, se adicionaron 200 µL de etanol (Jalmek) al 100% y se incubaron 10 min a temperatura ambiente para precipitar los ácidos nucleicos. El ADN fue centrifugado durante 15 min a 14.000 rpm y se removió el etanol cuidadosamente. Posteriormente 200 µL de etanol al 70% fueron agregados al pellet formado, se centrifugo a 14.000 rpm por 5 min para remover el

exceso de sales, y se desechó el sobrenadante cuidadosamente para no perder el pellet. Un segundo lavado fue realizado añadiendo 200 μL de etanol al 100%, se centrifugo a 14.000 rpm durante 5 min y se extrajo todo el alcohol. El pellet de ADN se secó usando una plancha caliente (Lab-Line) y luego se resuspendió en 50 μL de buffer TE (0.05M Tris-HCL, 0.05 EDTA, pH 8). La concentración y la calidad cada ADN extraído fueron medidos con un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc). Todos los viales conteniendo el ADN extraído de cada mosquito fueron almacenados a -20°C .

6.6 qPCR ensayos preliminares

La amplificación de los fragmentos para ACE1 y 2, CCE y EST6421, se llevó a cabo en un termociclador en tiempo real (EcoTM, Ilumina, San Diego, CA, USA)(Fig. 17) usando los iniciadores para esterases (Tabla 7) para determinar los genotipos, por análisis de las curvas de desnaturalización, basándonos en los protocolos descritos por Saavedra-Rodríguez *et al.*, (2007).



Fig 17. Termociclador tiempo real (ECOTM Ilumina)

Las reacciones de PCR se realizaron en microplacas de policarbonato de 96 pocillos (Ilumina, San Diego CA, USA). La mezcla de reacción para la PCR consistió de 10 μL de iQ Syber Green Supermix (Bio-Rad 170-8880), 0,05 μL de cada oligonucleótido (500 mM) y 0.5 μL de DNA. Cada placa fue colocada en el termociclador y la reacción fue sometida en 95°C durante 2 min (etapa de activación), seguido de 40 ciclos a 95°C durante 10 s, 60°C durante 10 s, 72°C durante 30 s, y una etapa de extensión final de 10 s en 95°C (Fig.18).

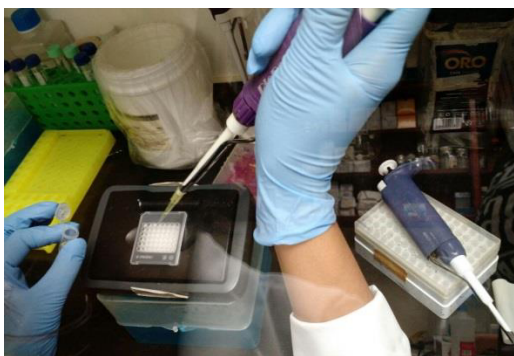


Fig.18 Reacción de PCR en tiempo real por placa

Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos específicos para PCR

Mutación	Oligonucleótido	Secuencia
ACE 1	Gly 12+ Ser 12+ 12-	GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCGCTAATAACCCGATTGCCAAG GCGGGCGCCTAATAACCCGATTGCGAA TTCCAAACTGCACAGTATCA
ACE 2	1 (+) C (-) T (-)	GTT CCA CGG CGC ATC AGT GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCA ATC TTT GTT CAG CAC TGG ATC GTC GCG GGC AAT CTT TGT TCA GCA CTG GAT CAT T
EST	6421G+ 6421C+ 6421r	GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCATGTTTGGCGGAAAGAGTTTTTATG GCGGGCATGTTTGGCGGAAAGAGTTTTTCTC AAACGGTAGTTGATGGTAA
CCE	CCEae1D231rA CCEae1D23RG CCEae1DF	GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG CCT TCA CRT TTT CCG TTC GTC AA GCG GGC TTC ACR TTT TCC GTT CGT TAG AAA GCC ACC CCA GAA GAT A

Para verificar los cambios de nucleótidos en las esterasas se corrieron controles positivos. Estos controles fueron donados por la Universidad de Colorado en EUA. Se realizó una PCR punto final para identificar el tamaño de los fragmentos de las enzimas (Tabla 8).

Tabla 8. Secuencia de oligonucleótidos para secuenciación

Mutación	Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del fragmento
ACE 1 y 2	Exon 1f	5' - CTG GAA TTA AGG CAC AAT G - 3'	446 pb
	Exon 1r	5' - AAG CAG AAA ACT GGA AAC A - 3'	
EST	EST 6 2f	5' -GAA CAA GGA CCA GAG TGC- 3'	431 pb
	EST 6 2R	5' -CGT GAC ATT GGC GAT AGG- 3'	
CCE	CCEae2D f	5' -CGAGCGATTGTTATGTCTGG- 3'	344 pb
	CCEae2D r	5' -AGCCCTTCTTCCGAGTTTC - 3'	

6.7 PCR para secuenciación

Posteriormente se realizó un qPCR con los iniciadores para ACE1, 2, EST y CCE (Tabla 8). Esta PCR se realizó con volúmenes finales de 25 µL, la mezcla de reacción para la PCR consistió de 10 µL de iQ Syber Green Supermix (Bio-Rad 170-8880), 0,05 µL de cada oligonucleótido (500 mM) (Tabla 7) y 0.5 µL de DNA. La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador (EcoTM, Illumina, San Diego, CA, USA).

Para estandarizar la reacción de amplificación, se utilizaron gradientes de temperatura a partir de las temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos empleados anteriormente buscando la banda de amplificación.

Los productos amplificados obtenidos fueron preparados de la siguiente manera: 5 µL del producto amplificado fueron mezclados con 4 µL buffer de carga [(Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%), 1 µL de gel “Red nucleic acid stain” 10000X in DMSO (Biotium, Hayward, CA, USA) de jugo azul 6X] y el marcador de peso molecular (25-500pb HyperLadderTMV, Bio-Line). La mezcla fue colocada en un gel de agarosa al 2% y se realizó la electroforesis a 120 V por aproximadamente 40 min. Los geles fueron observados en un fotodocumentador (Uvitec, Cambridge, United Kingdom).

Los productos amplificados fueron secuenciados en la compañía MacroGen USA. Los datos obtenidos de la secuenciación fueron analizados GeneStudio (Profesional Edition, Version 2.2.0.0, genestudio.com).

6.8 Análisis de resultados

6.8.1 Análisis dosis- mortalidad

Con base en los resultados obtenidos se calcularon los parámetros de CL_{50} (concentración letal media) a las 24 h post-exposición y se estimaron los límites de confianza con el software IRMA (<http://sourceforge.net/projects/irmaproj/files/>) utilizando una regresión logística. Se registraron los parámetros de susceptibilidad además de los intervalos de confianza ($p < 0.05$), la pendiente de regresión y la desviación estándar. Así mismo, se determinó la diferencia en los parámetros de susceptibilidad entre las poblaciones estudiadas con base en el traslape de los intervalos de confianza (IC) ($p < 0.05$).

Los niveles de resistencia, “factor de resistencia” (FR) se calcularon dividiendo los valores de CL_{50} obtenidos de las poblaciones de campo entre la CL_{50} obtenida de la cepa de referencia New Orleans. El estado de resistencia se determinó con base a los criterios de Mazzarri y Georghiou (1995) como: resistencia baja ($FR < 5X$), media (FR entre 5 y $10X$) y alta ($FR > 10X$).

6.8.2 Análisis de enzimas

Obtenidos los datos de absorbancia para cada enzima, se creó una base de datos en Microsoft® Excel® 2010 .

Para expresar los valores en función de actividad enzimática los valores de absorbancia para cada enzima se hicieron los ajustes pertinentes (Valles *et al.*, 2006).

6.8.2.1 Proteínas Totales (PTN)

La cantidad de proteínas totales de cada mosquito es un paso necesario para corregir los valores de actividad obtenidos para las enzimas (MFO y esterasas α - β). Para calcular la cantidad total de proteína en cada uno de los mosquitos, los valores de

absorbancia obtenidos de la cantidad de homogenato que se tomó para cada repetición obtenido de alícuotas de 20µl:

Primero se corrigió por el volumen total del homogenato (2000µl): multiplicando los valores de absorbancia por un factor de 100.

A) Este factor se obtiene dividiendo el total del homogenato entre el volumen de la alícuota que se usó por repetición.

Por último se transformó en µg la proteína. Con el fin de hacer esto, fue necesario:

B) Dividir por el factor de conversión y este valor se obtuvo de las curvas estándar que se utilizaron para obtener la ecuación lineal de regresión de la misma ($y = ax + b$) (y = absorbancia, x = la concentración del sustrato en la curva estándar en microgramos, b = absorbancia en la ausencia de la proteína “blanco”). La conversión del factor (a) es la pendiente de la línea y es obtenida por la fórmula:

$$a = \frac{\Delta y - b}{\Delta x}$$

Dónde:

Δy = diferencia entre valores de absorbancia de dos puntos.

Δx = diferencia entre los valores de proteína (sustrato) de los puntos

b = valor de absorbancia en ausencia del sustrato (blanco)

6.8.2.2 Alfa y beta- esterasas (α - β est)

Los resultados obtenidos con estas enzimas se representan como nmol / mg ptn / min. Los valores de las absorbancias con alícuotas de 100µl de mosquitos:

Se corrigió la absorbancia por el volumen total homogeneizado (2000µl) multiplicado por un factor de 20 (A), se transformaron en nmoles de sustrato. Con el fin de hacer esto, es necesario dividir por los factores de conversión (B).

C) Por último se corrigió por las proteínas totales. Cada valor obtenido anteriormente se divide por el contenido total de proteína del mosquito correspondiente. El resultado es la cantidad de sustrato (en nmol) consumida por mg de proteína de cada mosquito en el tiempo total de reacción.

D) Para calcular la actividad de la enzima por minuto, es suficiente al dividir el valor obtenido por 20 (20 minutos de reacción del naftil) (OMS 1998).

6.8.2.3 Oxidasas de función mixta (MFO)

La curva estándar se realizó con el reactivo citocromo C, que contiene el grupo hemo. Los resultados de este ensayo se representan como citocromo μg o nmoles presentes para la proteína total de cada mosquito, en miligramos (μg cit/mg ptn o nmoles cit/mg ptn).

Para calcular la concentración citocromo/mg proteína en cada mosquito, la absorbancia obtenida en los $100\mu\text{l}$:

Se corrigió por el volumen del homogenato total ($2000\mu\text{l}$) multiplicado por la absorbancia por un factor de 20 (A), se transformó en μg (o nmoles) el citocromo. Con el fin de hacer esto, fue necesario dividir por el factor de conversión (B). Para corregir por la proteína total (C)

6.8.2.4 Acetilcolinesterasa (ACE)

Los resultados de acetilcolinesterasa son expresados como el porcentaje de actividad restante o remanente después de la adición del inhibidor. La diferencia entre la actividad en la presencia y ausencia del inhibidor propoxur es calculado:

$$\% \text{ actividad remanente: } \frac{\text{AChI} \times 100}{\text{AChE}}$$

Si los valores de absorbancia de la placa que tiene el reactivo propoxur es igual o ligeramente superior a los valores de absorbancia del blanco se eliminan.

Alternativamente el resultado se puede expresar como la inhibición de la Acetilcolinesterasa:

$$\% \text{ inhibición: } \frac{(AChE - AChI) \times 100}{AChE}$$

En el caso de la ACE es innecesario corregir los valores de acuerdo al total de proteína con el volumen de homogenización de cada mosquito.

6.8.2.5 Glutation-S-transferasas (GST)

Para esta enzima no hay un sustrato estándar, por esta razón no es posible realizar una curva estándar. Sin embargo, en este caso es posible calcular la cantidad de sustrato utilizado en la reacción. Utilizando los siguientes parámetros: el valor del coeficiente de extinción del producto de reacción del glutatión y la medida de el volumen de la reacción en el pozo de la microplaca (en nuestro caso, 0.86 cm (Corning, USA) fondo plano).

Estos parámetros se utilizaron para transformar los valores de absorbancia (ABS) en mmoles/mosquito /minuto, de acuerdo con la fórmula:

$$\text{mmol/mosq/min} = \frac{(Abs_{10} - ABS_0) \times 20}{4.39 \times 0.89}$$

Dónde:

Abs10 = Valor de absorbancia obtenido después de 10 minutos de reacción

Abs0 = Valor de absorbancia obtenido después de 0 minutos de reacción

20 en el dividendo = factor de dilución (100µl de la alícuota del homogenato, de 2000µl de homogeneizado)

10 en el divisor = minutos de reacción

4.39 = coeficiente de extinción del producto de reacción

longitud 0.89 = ruta (= altura de la solución en el pocillo de la microplaca, en cm)

Con el fin de corregir los valores de absorbancia por actividad por las proteínas totales, el valor anterior se divide por el total de proteínas del mosquito correspondiente.

Después de la corrección por mg de proteína, el resultado final de este ensayo se expresa como mmoles / mg PTN / min, correspondiente a la cantidad, en mmoles, del producto de reacción generado por minuto, por mg de proteína.

Una vez obtenidos los valores de la actividad enzimática para cada una de las enzimas se realizó un análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$) y comparación múltiple de medias por Tukey ($p < 0.05$), previa verificación de normalidad de varianza por la prueba de Bartlett. La finalidad fue la de establecer diferencia significativa en la actividad media de cada enzima con respecto a la cepa susceptible en principio y entre las poblaciones estudiadas. Para los análisis referidos se utilizó el paquete GraphPadPrism (GraphPad Software, Inc, Versión 6.01, La Jolla, CA, USA. graphpad.com).

Para determinar el porcentaje de actividad enzimática de cada población bajo estudio que superó a la cepa de referencia se calculó el percentil 99%, basándonos en el máximo valor de actividad para cada enzima obtenido en la cepa de referencia. Se utilizó el criterio de Montella et al., (2000) para categorizar la alteración de la actividad enzimática clasificándola como no alterada (NA) si el porcentaje de individuos de las poblaciones bajo estudio no excedía el percentil 99, al menor en un 15% (NA). Incipientemente alterado (IA), si al menos entre 15 y 50% de los individuos excedía el percentil 99 para cada sistema enzimático y alterado (A) cuando este porcentaje excedía el 50%.

6.8.3 Cálculo de frecuencias alélicas

Las frecuencias alélicas, se calcularon dividiendo el número de mosquitos del genotipo a calcular entre el número total de mosquitos analizados (Saavedra-Rodríguez *et al.*, 2007):

$$\text{Frecuencia alélica} = \frac{1 (n \text{ heterocigotos}) + 2 (n \text{ homocigotos})}{2 (n \text{ mosquitos analizados})}$$

Se determinaron los genotipos para cada mutación en las poblaciones de *Ae. aegypti*. Las frecuencias alélicas se estimaron con un intervalo de confianza del 95%. El coeficiente de endogamia F_{IS} de Wright se estimó para probar el equilibrio Hardy-Weinberg entre los genotipos.

$F_{IS} = 1 - (\text{heterocigotos observados/heterocigotos esperados})$.

Si existe un exceso de heterocigotos entonces el valor de F_{IS} será <0 , si por el contrario existe un exceso de homocigotos el valor de F_{IS} >0 . Una análisis de X^2 se usó para probar la hipótesis nula de que $F_{IS} = 0$

Adicionalmente se analizó la co-ocurrencia de ambas mutaciones en las poblaciones de mosquitos analizadas.

6.8.4. Asociación de las mutaciones ACE 1 y Est6421 con la resistencia a clorpirifos.

Se realizó un análisis de regresión lineal con los valores de CL_{50} , y frecuencias alélicas para ambas mutaciones. Una valor de correlación significativo ($p < 0.05$) estableció la correlación de ambas variables.

De igual manera se correlacionaron las frecuencias alélicas de los homocigotos mutados para ambas mutaciones, con la finalidad de establecer la relación entre ambas mutaciones y determinar su impacto cuando ambas están presentes en la resistencia al clorpirifos.

RESULTADOS

7.1 Susceptibilidad a clorpirifos

Los valores de CL_{50} , intervalos de confianza, pendiente de la recta y factor de resistencia (FR) para las poblaciones estudiadas se muestran en la Tabla 9. En esta se puede observar que los valores de CL_{50} , oscilaron entre $0.1731\mu\text{g}/\text{botella}$ y $1.8712\mu\text{g}/\text{botella}$. Todos los valores de la CL_{50} son mayores significativamente a la cepa susceptible NO ($p < 0.05$) (Fig. 19).

La población de *Ae. aegypti* de Monterrey mostró una mayor susceptibilidad a clorpirifos con una CL_{50} de $0.6001\mu\text{g}/\text{mL}$. En contraste, el máximo valor de CL_{50} se registró en la población de Mérida con $1.8712\mu\text{g}/\text{mL}$.

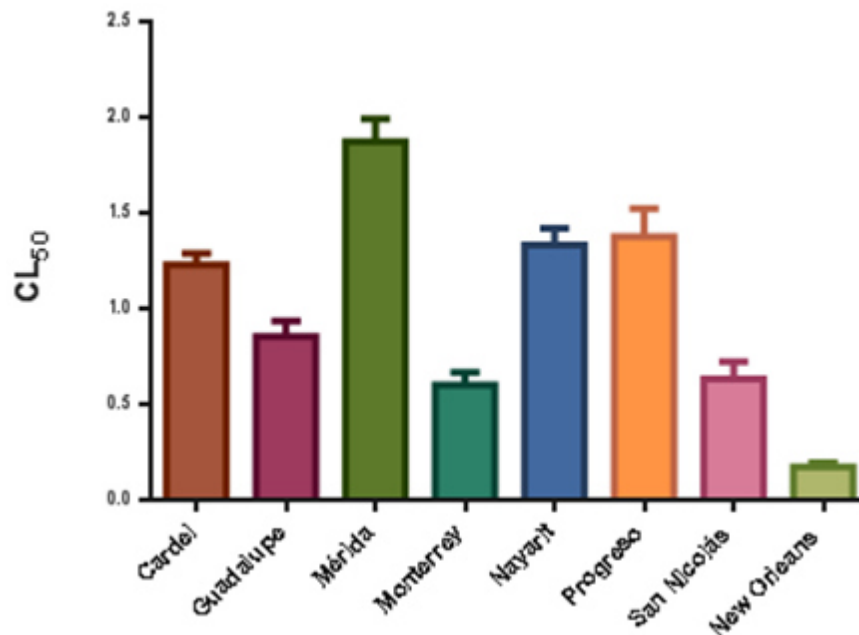


Fig 19. Valores de CL_{50} a clorpirifos en 7 poblaciones de *Ae. aegypti* de México, se incluye la cepa susceptible.

Tabla 9. Toxicidad de clorpirifos (CL₅₀) y factor de resistencia (FR) en 7 poblaciones de *Ae. aegypti* de México.

Población	CL₅₀ (95% IC)	FR	CL₉₀ (95% IC)	b ± DE²	N³
Cardel F ₂ ¹	1.2282 (0.1701-1.2890)	7.09	1.9283 (1.7482-2.1267)	4.8708 (0.5400)	484
Guadalupe F ₀	0.8546 (0.7812-0.9347)	4.93	2.0604 (1.7571-2.4157)	2.4968 (0.2105)	540
Mérida F ₀	1.8712 (1.7582-1.9913)	10.80	3.5769 (3.1692-4.0369)	3.3912 (0.2790)	538
Monterrey F ₀	0.6001 (0.5388-0.6683)	3.46	1.8292 (1.4298-2.3145)	1.9812 (0.1995)	540
Nayarit F ₀	1.3320 (1.2489-1.4204)	7.69	2.2602 (2.0364-2.5082)	4.1552 (0.3656)	420
Progreso F ₁	1.3751 (1.2420-1.5224)	7.94	3.2374 (2.7505-3.8102)	2.5662 (0.2226)	421
San Nicolás F ₀	0.6325 (0.5527-0.7236)	3.65	1.9873 (1.5536-2.5418)	1.9191 (0.1913)	408
New Orleans	0.1731 (0.1536-0.1950)	-----	0.4718 (0.3826-0.5817)	2.1909 (0.1927)	419

¹ Generación filial con la que se realizaron los bioensayos

² Pendiente de la regresión ± Desviación estándar

³ Número de hembras sometidas a bioensayo

Al aplicar el criterio de Mazzarri y Georghiou (1995) se encontró que las poblaciones del estado de Nuevo León: Monterrey, San Nicolás y Guadalupe presentaron resistencia baja, los valores de FR_{CL50} oscilaron de 3.65 a 4.93. Las poblaciones que mostraron una resistencia media fueron Cardel, Nayarit y Progreso con FR_{CL50} de ~ 7, 7.7 y 8, respectivamente y por último la población que mostró resistencia alta fue la de Mérida con FR_{CL50} de ~ 11 (Tabla 9 y Fig. 20).

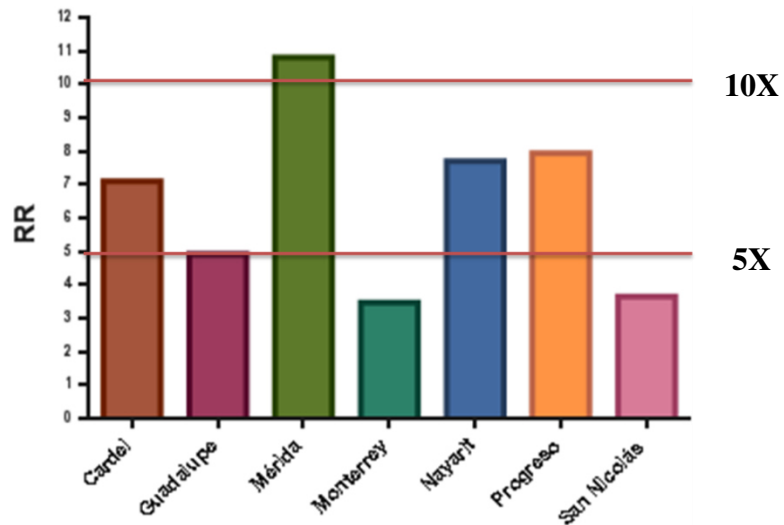


Fig 20. Factor de resistencia FR_{CL50} de las poblaciones de *Ae. aegypti* por comparación con la cepa susceptible New Orleans.

7.2 Ensayos enzimáticos

7.2.1 Curvas estándar

Para medir la actividad enzimática de cada población se realizaron curvas estándar para alfa y beta esterasas, oxidasas y proteínas.

Para alfa esterasas la curva partió de una concentración inicial de 0.05 mg/ μ l. Podemos observar que las concentraciones para alfa esterasas oscilaron de 0.3 a 5 μ g/ μ l con una absorbancia de 0.338 a 0.933 (Figura 21).

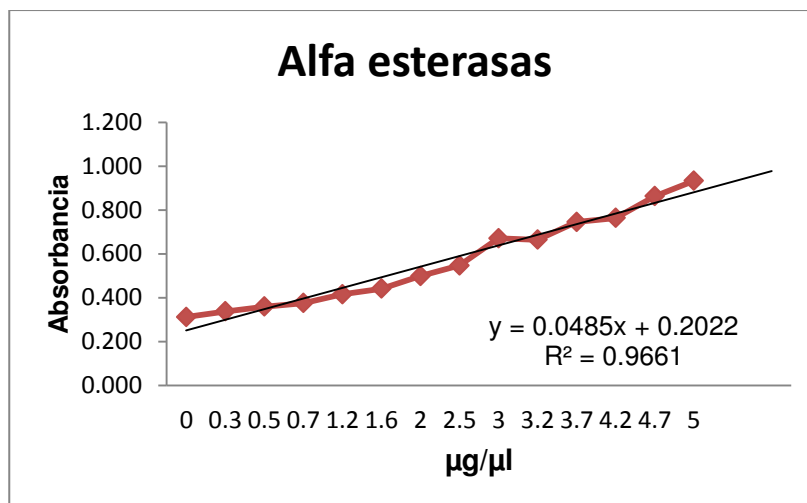


Fig 21. Curva de calibración de Alfa esterazas

Mediante el análisis de regresión lineal de las concentraciones de las absorbancias de alfa esterazas empleadas para el trazado de la curva de la calibración, se observa linealidad cercana a 1 ($R^2 = 0.9661$) lo que indica la precisión en la preparación y dilución utilizados en esta curva indican confiabilidad.

Para beta esterazas la curva partió de una concentración inicial de 0.05 mg/µl, las concentraciones variaron de 0.5 a 4 µg/µl con una absorbancia menor de 0.55 y la mayor de 1.536 (Figura 22).

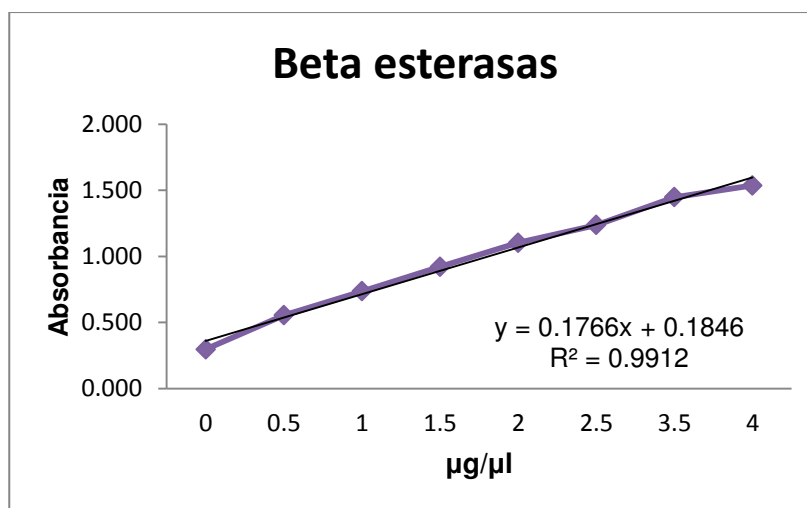


Fig 22. Curva de calibración de Beta esterazas

La fuerza de regresión representada por la R^2 fue de 0.9912.

Para oxidasas la concentración inicial fue de 0.01 mg/μl, las concentraciones fueron menores que los de esterasas con una concentración mínima de 0.02 μg/μl y máxima de 0.65 μg/μl y las absorbancias oscilaron de 0.076 a 2.784. Los resultados se sometieron al análisis de regresión lineal simple para la obtención de la ecuación de regresión (Fig.23).

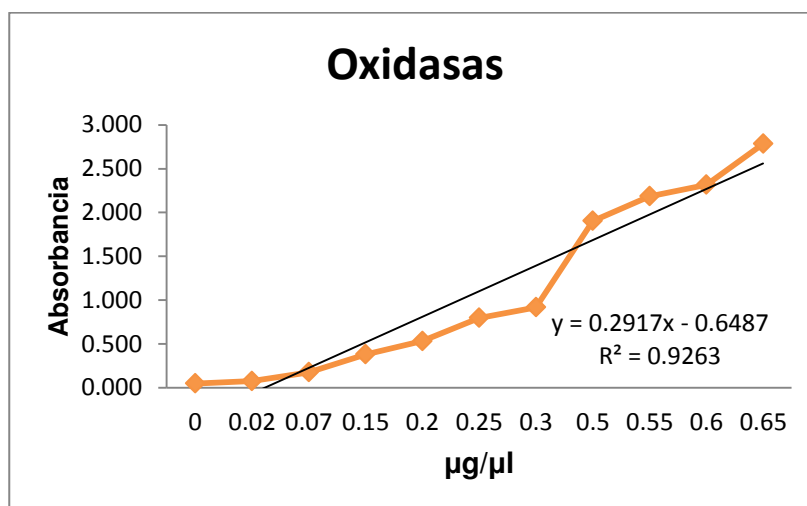


Fig 23. Curva de calibración de oxidasas de función múltiple.

La fuerza de la regresión representada por R^2 fue de 0.9263.

Para proteínas la concentración inicial fue de 1 mg/μl, las concentraciones fueron de 0.1 a 6.5 μg/μl con unas absorbancias que oscilaron de 0.543 a 1.367 Las absorbancias obtenidas se registraron para generar la siguiente gráfica (Fig.24).

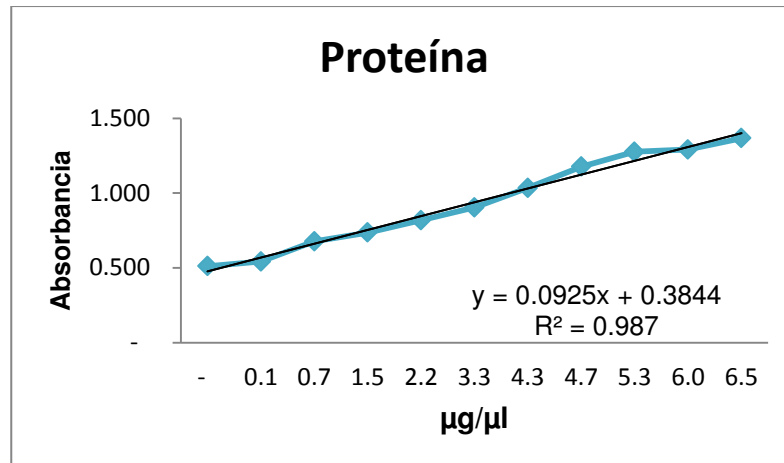


Fig 24. Curva de calibración de proteínas.

La R^2 fue de 0.987 cercana a 1, lo que nos indica confiabilidad y precisión en las diluciones y absorbancias.

7.2.2. Perfil enzimático

Al comparar las poblaciones con la cepa susceptible New Orleans no se obtuvieron niveles sobre-expresados de alfa esterasa significativamente ($p < 0.05$) (Fig. 25).

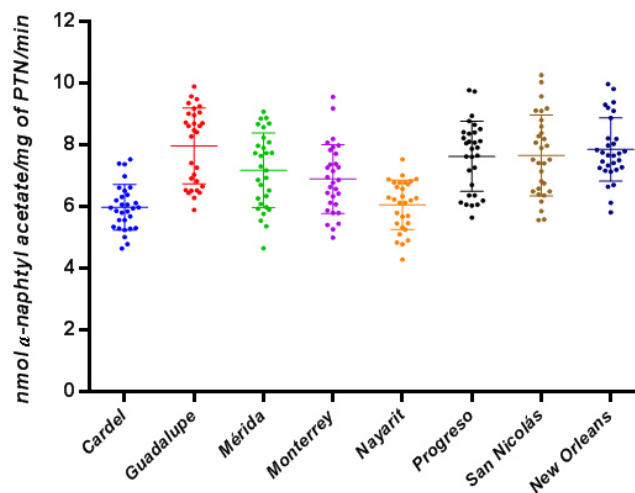


Fig 25. Perfil de actividad enzimática de α -esterasas en poblaciones de *Ae. aegypti* con diferentes niveles de resistencia a clorpirifos, se incluye la cepa susceptible de referencia.

Para β -esterasas la población con una mayor expresión significativa ($p < 0.05$) en comparación con la cepa susceptible fue la población de Guadalupe; mientras que las poblaciones de Cardel y Monterrey mostraron tener una actividad menor en promedio a la población New Orleans (Fig. 26).

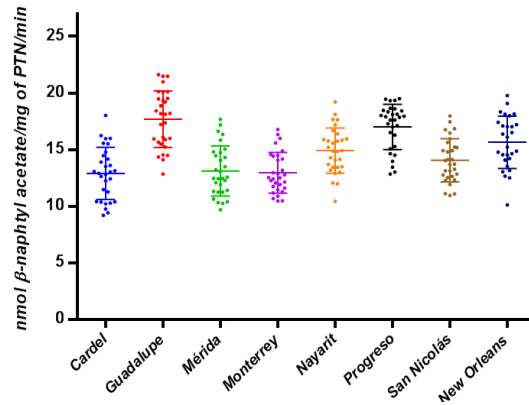


Fig 26. Perfil de actividad enzimática de β -esterasas en poblaciones de *Ae. aegypti* con diferentes niveles de resistencia a clorpirifos.

Para las enzimas oxidasas (CytP450) las poblaciones que mostraron niveles sobre-expresados en comparación con la cepa susceptibles fueron Mérida y Guadalupe ($p < 0.05$), con una sobre-expresión mayor para la población de Guadalupe (Fig. 27).

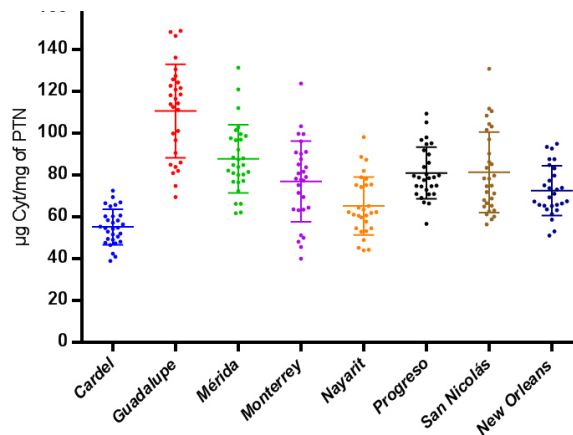


Fig 27. Perfil de actividad enzimática de oxidasas (CytP450) en poblaciones de *Ae. aegypti* con diferentes niveles de resistencia a clorpirifos.

Las poblaciones de Progreso, San Nicolás y Mérida mostraron tener un nivel de sobre-expresión mayor significativamente ($p < 0.05$) en comparación con la cepa susceptible New Orleans para le enzima de Glutation S- transferasa (Fig. 28).

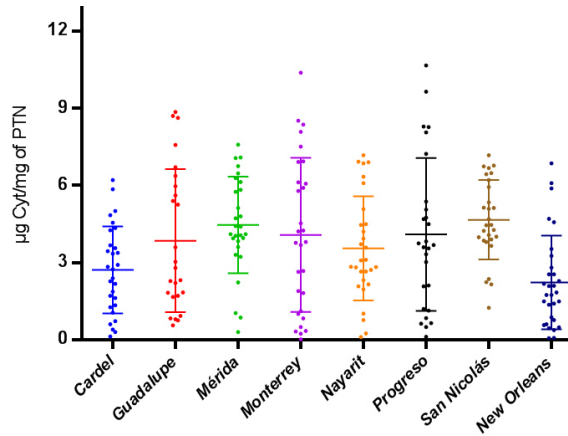


Fig 28. Perfil de actividad enzimática de GST en poblaciones de *Ae. aegypti* con diferentes niveles de resistencia a clorpirifos.

La población que mostro un porcentaje mayor significativamente de acetilcolinesterasa remanente fue Progreso comparada con la población susceptible New Orleans ($p < 0.05$) (Fig. 29).

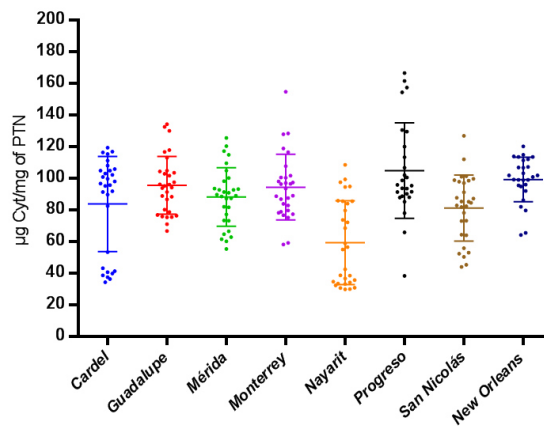


Fig 29. Perfil de acetilcolinesterasa remanente en poblaciones de *Ae. aegypti* con diferentes niveles de resistencia a clorpirifos.

7.2.3 Actividad enzimática

En la Tabla 10 se muestran los promedios de la actividad enzimática y la desviación estándar para cada enzima de las poblaciones analizadas

Se calculó el percentil 99 como el umbral de resistencia que correspondió a la máxima actividad enzimática en los especímenes de la cepa NO para cada enzima (Tabla 10), el cual se comparó con las poblaciones bajo estudio.

Se aplicó el criterio de Montella *et al.*, (2007) con base en el porcentaje de individuos que sobrepasaron el percentil 99 de la cepa de referencia New Orleans. De acuerdo a este criterio ninguna enzima de alguna de las poblaciones se mostró alterada significativamente con respecto a la cepa susceptible. Para el caso de alfaesterasas las poblaciones que se mostraron incipientemente alteradas fueron Guadalupe, Progreso, Mérida y San Nicolás. Para el caso de beta esterasas las poblaciones de Guadalupe, Nayarit, Progreso y San Nicolás también se mostraron incipientemente alteradas; al igual que poblaciones de Guadalupe, Mérida, Monterrey, Progreso y San Nicolás para las oxidasas (CytP450). Y en el caso de glutathion S transferasas todas las poblaciones se mostraron incipientemente alteradas. Para el caso de acetilcolineserasa insensible la cual fue medida en función de actividad remanente de la enzima, en todos los casos el valor fue menor de 30% por lo que de acuerdo a la OMS (1998), este valor debería superar el 30% para considerar a la población resistente.

Tabla 10. Actividad enzimática de α y β -esterasas, MFO, GST y iAChE de poblaciones de *Ae. aegypti* de México con diferentes niveles de resistencia a clorpirifos.

Población	α -esterasas (nmol/mg ptn/min)			β -esterasas (nmol/mg ptn/min)			MFO (nmol cit/mg ptn)			GST (nmol/mg ptn/min)			iAChE (% remanente)		
	N ^a	Promedio ^b	p99 ^c	N	Promedio	p99	N	Promedio	p99	N	Promedio	p99	N	Promedio	p99
New Orleans	30	7.852	7.275	28	15.64	13.182	28	72.49	66.684	30	2.222	1.029	27	99.14	69.134
Población	N	Promedio	%p99 ^d	N	Promedio	%p99	N	Promedio	%p99	N	Promedio	%p99	N	Promedio	%p99
Cardel	30	5.978	3	30	12.880	12	30	55.070	2	29	2.714	24	30	83.72	21
Guadalupe	30	7.969	18	30	17.670	29	29	111.50	29	25	3.843	24	30	95.45	29
Mérida	30	7.172	15	30	13.110	13	30	87.650	26	28	4.460	27	30	88.07	24
Monterrey	30	6.890	14	30	12.950	10	29	76.880	24	29	4.071	22	29	94.30	27
Nayarit	30	6.054	1	30	14.910	24	29	65.110	10	29	3.550	25	30	59.27	12
Progreso	30	7.630	20	30	17.000	28	29	80.900	28	27	4.089	23	26	104.7	24
San Nicolás	30	7.653	18	30	14.050	18	30	81.200	21	28	4.655	29	29	81.11	21

^aNúmero de mosquitos analizados,

^bValor promedio de actividad para cada enzima,

^c99th Percentil de la cepa de referencia New Orleans,

^dPorcentaje de mosquitos que sobrepasan el percentil 99th de la cepa de referencia New Orleans

7.3 Mutaciones, ensayos preliminares

Se realizaron ensayos preliminares de qPCR con mosquitos de una cepa de campo (Mérida) y la cepa susceptible (New Orleans), para observar los picos de desnaturalización a las temperaturas de amplificación. Los productos de qPCR se corroboraron visualizando las bandas en un gel de agarosa al 2% (Fig. 30) con oligonucleótidos específicos y un marcador de 25pb (HyperLadder, Bioline USA) (Tabla 7).

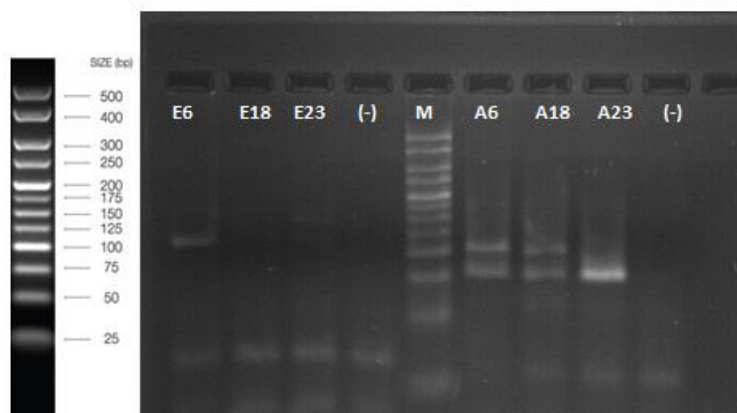


Fig.30. Gel de agarosa 2% para visualización de los productos de PCR. ACE1 carriles A6, A18 y A23 y EST6421 carriles E6, E18 y E23 mediante PCR con oligonucleótidos específicos, carril (-) es una muestra negativo y el carril M es el marcador.

7.4 Mutaciones ACE1, 2, Esterasas y CCE

Para demostrar la presencia de las mutaciones, se realizó una segunda qPCR como ya fue descrito en métodos. Para tal efecto se utilizaron los iniciadores de la tabla 8 para las 4 mutaciones. Los productos de PCR fueron secuenciados y analizados. Como resultado se obtuvo que para ACE1 el tamaño del fragmento fue de 446pb (Fig. 31A). Los oligonucleótidos se basaron en la secuencia reportada para *Aedes aegypti* en el GenBank. El fragmento esperado con base a la PCR virtual es de 69pb (Fig. 31B), al comparar las secuencias se observó un cambio en la posición 12 de Glicina a Serina, siendo entonces el fragmento normal de Glicina de 89pb, mientras que para el fragmento mutado es de 69pb correspondiendo a Serina.

A

Exón1

CTGGAATTAAGGCACAATGTTGACGTTGGATAGCTATTTCCATTTTATTTGT
 AATTGAATTGAGGAAAAACACTTAAACATTCAAAACATAACGATGCACA
 AACATTCCTTTTCGATTGCAGATTTCTCCAAGCCATGGAGATCCGAGGCCT
AATAACCCGATTGCTAGGTCCATGTCACATCCGACATC**TGATACTGTGCAGT**
TTGGGAATATACTCCATCCTGGTGCAGTCGGTCCATTGCCGGCATCATGACA
 TCGGTA**GTTCCACGGCGCATCAGT**TAGGCTCGAAGTACTCACAGTCATCCTC
 GTTATCGTCATCCTCGCAATCGTCATCATCGTTAGTC**GAAGATCCAGTGCCTG**
AACAAAGATTCAGGTAATTACCAATTAACACTGGTTCAATTACGGTCTTTTTTT
 CTCTACCGGC**TGTTTCCAGTTTCTGCTT**

B

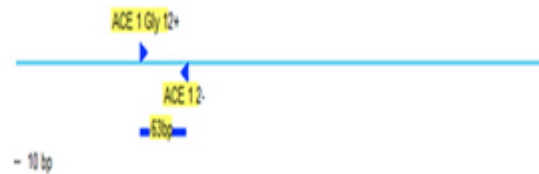


Fig.31. A) Fragmento de ACE1 B) PCR virtual.

Para EST6421 el tamaño del fragmento es de 431pb (Fig. 32A).

A

ATGGTACAATCTTTTCGCTT CGCGGT TTGTAATTGCGTATTCGTTACTT CAITGGTCGCGGCGAAT GCTG
 AGGATAAT TTTGTGGTTGTT CAAAGT GGAAATGGTCCAATAAGAGGAAT CAATCGCGGTGCGTATTATGC
 GTTCGAAGGGATACCTATGCCAAGGCTCCAGTIGGAGAGCTCAGATTAGCAGCTCCGGTACTCAACGAC
 GACAGTGGGATGAACCGAGAGATGCTCTG**SARCRAGSACCRAGSTG**ATGCAATGGAGCCATTTTGTGG
 AGGTTGAAGATCGCACACRGGCGAAGAGGATTGTCTATTTTGAACATCTATACGACTTCGTTGGACAA
 TACGGATCCACTGCCAOCATCTTCTTCATCCATGGGGGAGCATT**RTGTTTGGCGSAAAGATTTTAT**
GGCCTGATAACATGATGAAGAGTCCATTGGTGTGG**TACCATCACTACCGTIT**GGAGCCTACTAGGTT
 TCCTCAGTACGGAAGATGACATAITTCAGGAAATTTCCGTTTGAAGGATCAAGCCACGGCTCTCAAGTG
 GGTCCGGCAGAACATTATGAACCTTCGGTGGCCATCCAGATAGTATTACATTTCCGGATCTCAGCAGGG
 TCTGCCAGTGTCAACTGCATTA**CTATCGGCRAATGT CAGG**GGGGTTGTCAAGAATGGTATTGGT CACA

B

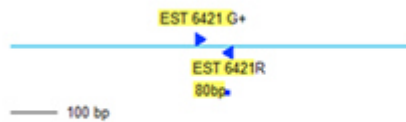


Fig.32. A) Fragmento de EST6421 B) PCR virtual.

Los oligonucleótidos específicos para esta EST6421, fueron diseñados por Saavedra-Rodriguez (resultados no publicados), basándose en una secuencia parcial del mensajero reportada para *Aedes aegypti* en el GenBank. El fragmento esperado con PCR virtual es de 80pb (Fig. 32B), al comparar las secuencias se observó un cambio de Glicina a Arginina en la posición 6421, considerando que este es una secuencia parcial del mensajero. Se encontró el fragmento normal del Glicina de 106pb, mientras que el fragmento mutado que corresponde a Arginina es de 86pb.

Para las mutaciones ACE2 y CCE no se encontró algún cambio de nucleótidos en las muestras secuenciadas.

7.5 Frecuencia de la mutación ACE 1

La qPCR de alelos específicos se llevó a cabo en un termociclador en tiempo real (Eco™, Illumina, San Diego, CA, USA). Las temperaturas de alineación fueron modificadas en este paso, con respecto a lo descrito en métodos.

En el caso de la mutación ACE 1 las curvas de desnaturalización se establecieron de 65 a 95 °C, con un aumento de 0.2 °C cada 10 s, en donde un pico sencillo a 81.4 °C corresponde al mutante homocigoto, dos picos a 81.4 y 86.1 °C corresponde al heterocigoto y un solo pico a 86.1 °C corresponde al tipo salvaje homocigoto como se observa en la Fig. 33.

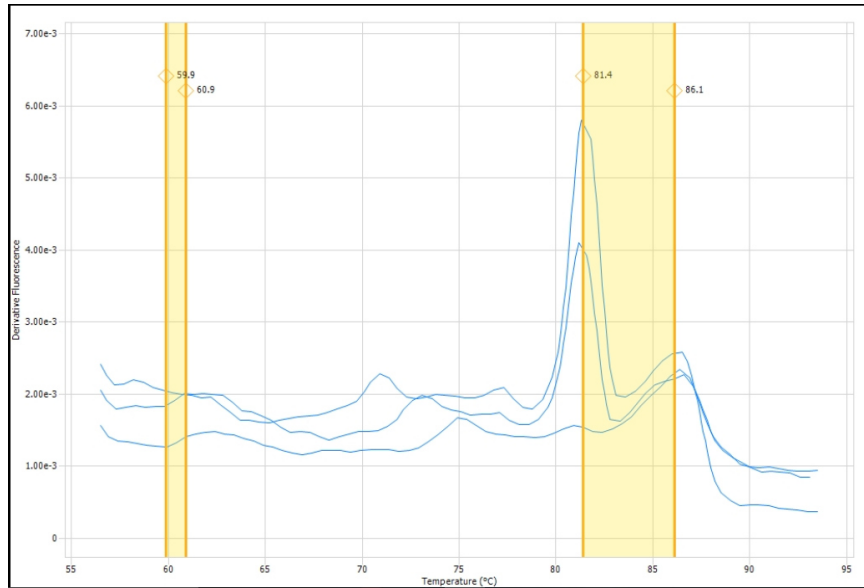


Fig 33. Curvas de desnaturalización de los controles para la mutación ACE 1

La población que obtuvo mayor número de alelos mutantes fue la población de Mérida y en la que no apareció correspondió la población de San Nicolás. En todas las poblaciones se presentaron heterocigotos y homocigotos. En la Tabla 11 se muestran los valores de las frecuencias alélicas para la mutación ACE 1, registrándose la mayor frecuencia en la población de Mérida con un valor de 0.75, seguida por Progreso con 0.53, Guadalupe 0.42, Cardel 0.31, Nayarit 0.29, San Nicolás 0.18 y Monterrey con 0.13.

Tabla 11. Genotipos y Frecuencia alélica para la mutación ACE 1 en poblaciones de *Ae. aegypti*.

Poblaciones	AA ^a	AG ^b	GG ^c	n ^d	Frecuencia alélica	F _{is}	P
Mérida	23	2	7	32	0.75	0.83	0.00002
Nayarit	6	11	23	40	0.29	0.33	0.038
Cardel	7	11	22	40	0.31	0.36	0.023
Progreso	13	8	11	32	0.53	0.50	0.005
Guadalupe	11	3	16	30	0.42	0.79	0.00001
Monterrey	3	2	25	30	0.13	0.71	0.00009
San Nicolás	0	11	19	30	0.18	-0.22	0.21

^aAA: Homocigoto mutado, ^bAG: Heterocigoto, ^cGG: Silvestre

^dn: Tamaño de muestra

En la Tabla 11 se presentan los valores del coeficiente de endogamia F_{IS} para cada una de las poblaciones. Se encontró que en todas las poblaciones el $F_{IS} > 0$ significativamente, dando como resultado que hay un exceso de homocigotos, sin embargo, en la población de San Nicolás se obtuvo un resultado negativo, el cual el F_{IS} es < 0 el cual no es significativamente.

7.6 Frecuencia de la mutación Est6421

En la mutación EST6421 las curvas de desnaturalización se establecieron de 65 a 95 °C, con un aumento de 0.2 °C cada 10 s, en donde un pico sencillo a 81.2 °C corresponderá al mutante homocigoto, dos picos a 81.2 y 84.1 °C corresponderá al heterocigoto y un solo pico a 84.1 °C corresponderá al tipo salvaje homocigoto como se observa en la Fig.34.

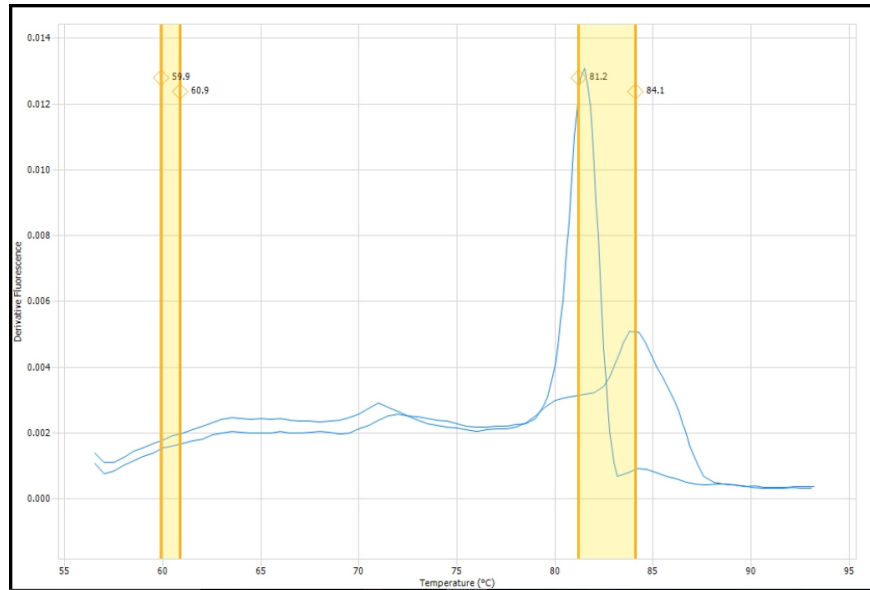


Fig 34. Curvas de desnaturalización de los controles para la mutación Est 6421.

La población que obtuvo mayor número de alelos mutantes fue la población de Mérida y la que no presentó el alelo mutante fue la población de Guadalupe. En todas las demás poblaciones se presentaron heterocigotos y homocigotos. En la Tabla 12 se muestran los valores de las frecuencias alélicas para la mutación Est6421 registrándose la mayor frecuencia en la población de Mérida con un valor de 0.77, seguida por Progreso con 0.64 Cardel 0.19, San Nicolás 0.15, Nayarit 0.09, Monterrey con 0.08 y la población de Guadalupe no presentó el alelo mutante.

Tabla 12. Frecuencia alélica y genotípica para la mutación Est6421 en poblaciones de *Ae. aegypti*.

Poblaciones	AA ^a	AG ^b	GG ^c	n ^d	Frecuencia alélica	F _{IS}	P
Mérida	24	1	7	32	0.77	0.91	0.000002
Nayarit	2	3	35	40	0.09	0.53	0.00007
Cardel	7	1	32	40	0.19	0.92	6.41e-09
Progreso	20	1	11	32	0.64	0.93	1.34e-07
Guadalupe	0	0	30	30	0.00	0.00	-
Monterrey	2	1	27	30	0.08	0.78	1.85e-05
San Nicolás	4	1	25	30	0.15	0.87	1.92e-06

^aAA: Homocigoto mutado, ^bAG: Heterocigoto, ^cGG: Silvestre

^dn: Tamaño de muestra

Al observar los resultados obtenidos de F_{IS} se rechaza la hipótesis nula, ya que las poblaciones estudiadas resultaron ser homocigotos, ya que el valor de $F_{IS} > 0$ para todas las poblaciones.

7.7. Co-ocurrencia de mutaciones ACE1 y Est6421 las poblaciones de *Ae. aegypti*

Al analizar la presencia de ambas mutaciones en los individuos analizados de las diferentes poblaciones, solo para las poblaciones de Mérida, Cardel y Progreso se presentaron ambos genotipos resistentes; siendo la mayor frecuencia para la población de Mérida con ~ 56%, seguido por Progreso con ~ 22% y Cardel con ~ 2.5% (Tabla 13).

Tabla 13. Co-ocurrencia de las mutaciones ACE1 y EST6421 en poblaciones de *Aedes aegypti* de México. Número de individuos que presentaron el genotipo indicado para cada mutación

Población	AA1/AA2	AA1/AG2	AA1/GG2	AG1/AA2	AG1/AG2	AG1/GG2	GG1/GG2	GG1/AA2	GG1/AG2	Total
Mérida	18	1	4	0	0	2	1	6	0	32
Nayarit	0	0	6	1	2	8	21	1	1	40
Cardel	1	0	6	3	0	8	18	3	1	40
Progreso	7	1	5	6	0	2	4	7	0	32
Guadalupe	0	0	11	0	0	3	16	0	0	30
Monterrey	0	0	2	0	0	3	22	2	1	30
San Nicolás	0	0	0	1	0	9	16	3	1	30

AA1/AA2: Homocigoto resistente ACE1/homocigoto resistente EST6421

AA1/AG1: Homocigoto resistente ACE1/heterocigoto EST6421

AA1/GG1: Homocigoto resistente ACE1/homocigoto susceptible para EST6421

AG1/AA2: Heterocigoto ACE1/homocigoto resistente EST6421

AG1/AG2: Heterocigotos para ambos

AG1/GG2: Heterocigoto para ACE1/ homocigoto susceptible para EST6421

GG1/GG2: Homocigoto susceptible para ambos

GG1/AA2: Homocigoto susceptible para ACE1/homocigoto resistente EST6421

GG1/AG2: Homocigoto susceptible para ACE1/heterocigoto EST6421

7.8 Correlación de las mutaciones ACE1 y Est6421 con los niveles de resistencia a clorpirifos

Se correlacionaron (R de Pearson, $p < 0.05$) con el programa GraphPadPrism, los valores de CL_{50} con las frecuencias alélicas para ambas mutaciones por separado y se obtuvo para la mutación de ACE 1 un valor de R 0.8578 ($p = 0.0068$), mientras que para la de Est6421 se obtuvo un valor de R de 0.7826, $p = 0.0188$, por lo que se comprueba la correlación de cada mutación con la resistencia al organofosforado clorpirifos en las poblaciones de *Ae. aegypti* analizadas.

Al analizar las poblaciones con ambos genotipos homocigotos resistentes con respecto a los valores de CL_{50} del insecticida clorpirifos se encontró correlación significativa (R 0.83, $p < 0.05$). Lo que indica que ambas mutaciones pueden actuar de manera sinérgica al conferir resistencia al clorpirifos. Esto fue confirmado al correlacionar la frecuencia genotípica de los homocigotos resistentes para ambas mutaciones obteniendo un valor de R 0.81, $p < 0.05$.

DISCUSIONES

En México se han utilizado los insecticidas organofosforados para el control de larvas y adultos. El uso de temefos data desde 1979. El malation como adulticida se utilizó en rociados espaciales para el control de vectores desde 1981. Para 1989, un nuevo proyecto de Norma, la cual fue publicada finalmente en el 2002, estableció el cambio del adulticida malatión por piretroides. La principal justificación para dicho cambio fue el que temefos y malatión pertenecen al mismo grupo toxicológico. A partir de 1989 entonces se utilizó la permetrina en una formulación acuosa con varios agentes como un sinergista. Sin embargo, la evidente resistencia a los piretroides en las poblaciones de *Ae. aegypti* en México motivó a una nueva modificación en la NOM-032-SSA2 y en el 2011 se establecen las directrices para la selección de insecticidas en el control de vectores en México. Es en este año es cuándo se considera el uso de organofosforados en aplicaciones espaciales, encabezando la lista el clorpirifos aunque se tiene el registro de que entre los años 1996-1999 se utilizó como adulticida en México. Posteriormente en el 2012 se aprobó el malatión para su uso exclusivo en barreras en áreas rurales. Fue en el 2014 que se aprobó el malatión para rociados espaciales en áreas en dónde se encontrara resistencia a piretroides.

Son pocos los estudios en México relacionados con la resistencia a insecticidas organofosforados en general en vectores de enfermedades y particularmente en *Ae. aegypti*. Uno de los pocos estudios recientes, López *et al.* (2014) donde determinaron la resistencia de 6 poblaciones de *Ae. aegypti* del estado de Veracruz al organofosforado clorpirifosdo. Los niveles de resistencia encontrados fluctuaron entre alta resistencia, para el caso de la población de Cosoleacaque (15X), dos poblaciones resultaron tolerantes Poza Rica (8X) y Martínez de la Torre (5X) y otras analizadas como Coatzacoalcos (4X), Tantoyuca (2X) y Veracruz (1X) resultaron susceptibles. Al comparar nuestros resultados de resistencia de igual manera a clorpirifos con el estudio de López *et al.* (2014) encontramos sólo una población con alta resistencia correspondiendo a la recolectada en el estado de Yucatán, Mérida (11X). Tres poblaciones resultaron con resistencia media con FR ~ 7, siendo las recolectadas en las ciudades de Cardel de Veracruz, Progreso de Yucatán y Nayarit, Nay. Solo las

poblaciones de Nuevo León (Monterrey, Guadalupe y San Nicolás) resultaron con resistencia baja.

Dentro de los mecanismos de resistencia de gran relevancia a los organofosforados se encuentra la participación de mecanismos degradativos tales como las carboxil-esterasas. Estas son un grupo amplio de enzimas capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos mediante la hidrolización de los enlaces éster en presencia de agua. Las esterasas pueden clasificarse con base en su preferencia por los sustratos α o β naftol (α NA y β NA), a sus patrones electroforéticos o bien, por su secuencia nucleotídica. Muchos insecticidas contienen enlaces éster, por lo cual, es esperado encontrar que el principal mecanismo de resistencia en cepas de insectos resistentes se deba a la actividad intensificada o sobreproducción de esterasas. En forma general, los insecticidas organofosforados y metil-carbamatos actúan como inhibidores de esterasas, ya que tienen una alta afinidad por las enzimas pero son sustratos pobres. En los insectos resistentes, existe una mayor frecuencia de la interacción esterasa-insecticida, evitando que el insecticida alcance su sitio blanco (la acetilcolinesterasa). Cuando las esterasas están presentes en la misma proporción molar que el insecticida, estas son capaces de secuestrar efectivamente a los insecticidas e hidrolizarlos lentamente (Scott, 1995). La sobreproducción de esterasas es una respuesta evolutiva contra la presión de selección por insecticidas organofosforados y carbamatos, su presencia se ha documentado en numerosas especies de artrópodos, incluyendo mosquitos, garrapatas, áfidos y cucarachas. La principal causa de la excesiva síntesis de esterasas en insectos resistentes, se debe a la amplificación de genes dentro del genoma, aunque también la transcripción sobre-regulada y expresión genética alterada han sido documentadas. El mecanismo de resistencia metabólica estudiado con más detalle en vectores de enfermedades, es el sistema de esterasas elevadas en *Culex* spp. Pocos estudios han documentado el papel de estas enzimas en la desintoxicación de insecticidas en *Ae. aegypti*. En nuestro estudio aunque algunas de las poblaciones analizadas mostraron niveles de esterasas α y β elevados significativamente con respecto a cepa de referencia., no se encontró relación de estas enzimas en la degradación del clorpirifos. Estudios similares como el de Álvarez *et al.* (2013) quienes determinaron los mecanismos de resistencia al insecticida organofosforado malatión en poblaciones de *Ae. aegypti* de

Venezuela, encontraron niveles elevados de α - y β esterasas y GST sin embargo, al igual que en nuestro estudio su actividad fue clasificada como incipientemente alterada, por lo que no se consideraron implicadas en la degradación del malatión.

Por otra parte, el modo de acción del clorpirifos al igual que todos los organofosforados y carbamatos es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (ACE), enzima vital para el cese de la transmisión del impulso nervioso. La ACE hidroliza al neurotransmisor excitatorio acetilcolina en la membrana post-sináptica del nervio. La ACE de los insectos tiene una especificidad de sustrato intermedio entre la ACE de los vertebrados y la butiril-colinesterasa. La forma molecular predominante de ACE en insectos es un dímero globular anfifílico que se une a la membrana mediante una ancla glipofílica. Alteraciones en la ACE en insectos resistentes a organofosforados y carbamatos resulta en una reducción o inhibición en la sensibilidad de la enzima por estos insecticidas. En *Cx. pipiens*, la ACE-1 y ACE-2 difieren en su especificidad de sustrato, sensibilidad inhibitoria y el patrón de migración electroforético. Solo la ACE-1 parece conferir resistencia a insecticidas (Raymond *et al.*, 1986). Hasta la fecha, se han identificado dos genes ACE con esta actividad. La única acetil-colinesterasa clonada en *C. pipiens* es la ACE2, la cual no está involucrada en la resistencia a insecticidas y además se encuentra ligada al sexo. Por otro lado, el gen para ACE2 es autosómico y confiere resistencia a insecticidas (Malcolm *et al.*, 1995). Los vertebrados tienen dos tipos de colinesterasas: acetil-colinesterasa y butiril-colinesterasa. En *D. melanogaster* solo un gen para ACE que codifica una colinesterasa ha sido clonada. Distintas substituciones de aminoácidos en los genes ACE de *Drosophila* y *M. domestica* podrían causar resistencia, siempre y cuando los residuos asociados a la resistencia se localicen cerca o dentro del sitio activo de la acetil-colinesterasa.

Hasta ahora el análisis detallado del perfil de inhibición de la acetilcolinesterasas de *Ae. aegypti* sugiere que existe un solo locus ACE en esta especie. En este caso, la resistencia basada en alteraciones de la acetil-colinesterasa podría estar ligada al sexo. Los genes ACE han sido clonados en los mosquitos *Ae. aegypti* y *An. stephensi*, aunque ambos genes están ligados al sexo (Anthony *et al.*, 1995).

Cinco mutaciones puntuales asociadas con la resistencia a organofosforados y carbamatos han sido identificadas en el gen de la ACE en *D. melanogaster* (Mutero *et al.*, 1994) y estudios dirigidos por mutagénesis del ACE ligado al sexo de *Ae. aegypti*, han demostrado que estas mutaciones también confieren resistencia en mosquitos (Vaughan *et al.*, 1997). Sin embargo las mutaciones no fueron relacionadas con la resistencia a organofosforados en poblaciones silvestres en *Ae. aegypti*.

Al no existir otro trabajo en donde se incrimine alguna mutación con la resistencia a organofosforados, nuestro estudio adquiere relevancia siendo el primero en donde se evidencia la asociación de la frecuencia de las mutaciones en ACE 1 (Gly12Ser) y Est6421 (Gly6421Arg) con la resistencia a clorpirifos en poblaciones de *Ae. aegypti* de México. En este estudio demostramos el aumento en la frecuencia de los individuos mutados con el nivel de resistencia a clorpirifos, cuando las mutaciones se analizaron por separado y en conjunto. La co-ocurrencia de ambas mutaciones parece tener un efecto aditivo en la resistencia al clorpirifos. Sin embargo, sería de gran importancia en un estudio espacio-temporal establecer la dinámica de la selección de ambas mutaciones en las poblaciones de *Ae. aegypti*. Lo anterior con la finalidad de establecer cuál de las dos mutaciones es seleccionada más rápido o bien si existe una secuencia en la selección. Lo anterior debido a que se ha demostrado que las alteraciones en ACE tienen un costo de viabilidad muy severo en poblaciones en otras especies como *Cx. pipiens*, probablemente causado por la reducción en la actividad de la enzima mutada comparada al tipo silvestre. Sin embargo, en *Drosophila* sp se ha propuesto que la presencia de múltiples mutaciones que confieren bajos niveles de resistencia podría ser una respuesta a la selección de mutaciones con mayor viabilidad en esta enzima (Ming *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

Las poblaciones de *Aedes aegypti* (L.) de diferentes zonas geográficas de México presentaron diferentes niveles de resistencia al clorpirifos. Las poblaciones del sur de México, siendo éstas del estado de Yucatán fueron más resistentes al organofosforado, en comparación a las poblaciones de la costa este representada por Veracruz, costa oeste por Nayarit y el noreste de México por poblaciones del estado Nuevo León.

La actividad de oxidasas de función múltiple (MFO) y glutatión transferasas (GST) sugiere su participación en la degradación del clorpirifos en la población de *Ae. aegypti* con mayor grado de resistencia al insecticida (Mérida).

Se incrimina por primera vez las mutaciones ACE1 y EST6421 en relación a la resistencia a clorpirifos en *Ae. aegypti*, demostrando que ambas actúan de manera sinergista confiriendo resistencia al insecticida.

La caracterización y detección oportuna de las mutaciones es de vital importancia, ya que al relacionarlas con la resistencia a los organofosforados aporta información valiosa que debe ser considerada en el diseño de programas más eficientes para el control de este vector, así como de otros vectores de interés en salud pública en México.

BIBLIOGRAFÍA

Agresti A, Coull BA. 1998. Approximate is better than “exact” for interval estimation of binominal proportions. *American Statistician* 52: 119-126.

Anthony N., Rocheleau T., Mocelin G., Lee Hwa-Jung, R. French-Constant. 1995. Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *FEBS Letters* 368:461-465

Alout H, Berthomieu A, Cui F, Tan Y, Berticat C, Qiao CH, Weill M. 2007. Different Amino-Acid Substitutions Confer Insecticide Resistance Through Acetylcholinesterase 1 Insensitivity in *Culex vishnui* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) from China. *Journal of Medical Entomology* 44(3): 463-469.

Alout H, Djogbénou L, Berticat C, Chandre F, Weill M. 2008. Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetylcholinesterase 1 biochemical properties. *Comp. Biochem. Physiol. Biol* 150: 271–77.

Alvarez L, Briceno A, Oviedo M. 2006. Resistencia a Temefos en poblaciones de *Aedes aegypti*(Diptera: Culicidae) del occidente de Venezuela. *Rev. Colomb. Entomol.* [online]. 32 (2): 172-175.

Alvarez L, Ponce G, Oviedo M, López B, Flores AE. 2013. Resistance to Malathion and Deltamethrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) From Western Venezuela. *Journal of Medical Entomology*. 50(5): 1031-1039.

Baños JE, Bosch F. Aspectos históricos de los organofosforados. *Med Clin (Barc)* 1992; 99: 718-9

Beckman, L. and E. M. Johnson. 1964. Esterase variations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 48:787-801.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF; George DB, Jaenisch T, Wint GRW, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013 Apr 25; 496(7446): 504–507.

Bisset, Juan; Rodriguez, María Magdalena; Diaz, Cristina y Soca, Alain. 1998. Estudio de la resistencia en una cepa de *Culex quinquefasciatus*, procedente de Medellín, Colombia. *Rev Cubana Med Trop*. Vol.50, n.2, pp. 133-137. ISSN 1561-3054.

Bisset J, Rodríguez M, Diaz C, Soca L. 1999. Caracterización de la Resistencia a insecticidas organofosforados, carbamates y piretroides en *Culex quinquefasciatus* del estado de Miranda, Venezuela. *Rev. Cubana Med. Trop.*, 51 (2): 89-94

Bisset J, Rodríguez M, Molina D, Díaz C, Soca L. 2001. Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. *Rev. Cubana Med Trop*. 53(1): 37-43.

Bisset JA. 2002. Uso correcto de insecticidas: Control de resistencia. *Revista Cubana Medicina Tropical* 54(3): 202-219.

Bisset J, Rodríguez M, Cáceres L. 2003. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en 2 cepas de *Aedes aegypti* de Panamá. *Rev. Cubana Med. Trop*. 55 (3): 191-195.

Bisset, JA, Rodríguez MM, Fernández D, Pérez O. 2004. Estado de la resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en larvas del municipio Playa, colectadas durante la etapa intensiva contra el *Aedes aegypti* en Ciudad de La Habana, 2001-2002. *Rev. Cuba. Med. Trop*; 56(1): 61-66.

Bisset J, Rodriguez M, Fernandez D. 2006. Selection of Insensitive Acetylcholinesterase as a Resistance Mechanism in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Santiago de Cuba. *Journal of Medical Entomology* 43(6): 1185-1189.

Bisset J, Rodriguez M, Fernandez D, Palomino M. 2007. Resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de 2 provincias del Perú. *Rev Cubana Med Trop.* 59 (3): 202-208.

Bisset J, Rodríguez M, Ricardo, Ranson H, Pérez O, *et al.* 2011. Temephos resistance and esterase activity in the mosquito *Aedes aegypti* in Havana, Cuba increased dramatically between 2006 and 2008. *Medical and Veterinary Entomology.* 25: 233–239.

Black W, Munsterman LM. 1996. Molecular Taxonomy and Systematic of Arthropod vectors. *Biology Disease Vector.* W.C. Marquardt y beaty. University Press of Colorado, Boulder, CO. pp: 438-470.

Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG *et al.* Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1760. doi:10.1371/journal.pntd.0001760.

Brattsten, L.B. 1989. Insecticide Resistance: Research and Management. *Pestic. Sci* 26: 329- 332.

Brogdon W. G., Beach R. F., Stewart J. M. and Castanaza L. (1988a) Microplate assay analysis of the distribution of organophosphate and carbamate resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Bull. WHO* 66, 339.

Brogdon W. G., Hobbs J. H., St Jean Y., Jacques J. R. and Charles L. B. (1988b) Microplate assay analysis of reduced fenitrothion susceptibility in Haitian *Anopheles*

albimanus. J. Am. Mosq. Cont. Assoc. 4, 152. Brown T. M. and Brogdon W. G. (1987)
Improved

Brogdon W. G. (1989) Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay.
Parasitol. Today 5, 56-60.

Brogdon, W. G., and A. M. Barber. 1990. Microplate assay of glutathione S-transferase
activity for resistance detection in single mosquito triturates. Comp. Biochem. Physiol.
96: 339-342.

Brogdon WG, McAllister JC, Vulule J. Heme peroxidase activity measured in single
mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide
resistance. J Am Mosq Control Assoc. 1997;13:233-7.

Brogdon WG, McAllister JC. 1998. Insecticide resistance and Vector Control. Emerg.
Infect. Dis. 4: 605-613.

Brogdon WG, McAllister JC. 1998b. Simplification of adult mosquito bioassay through
use of time mortality determinations in glass bottles. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 14(2):
159-164.

Bull D, Hathaway D. 1986. Pragmas e venenos: Agrotóxicos no Brasil e no Terceiro
Mundo. Ed. Vozes/Oxfam/Fase, 235.

Bustamante ME. 1958. La fiebre Amarilla en México y su origen en América. Instituto
de Salubridad y enfermedades Tropicales, México D.F. 2: 1-217.

Brooke BD, Koekemoer LL. 2010. Major effect genes or loose confederations? The
development of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*.
Parasites & Vectors. 3: 74.

Brown AW, Abedi ZH. 1960. Cross-resistance characteristic of malathion-tolerant strain developed in *Aedes aegypti*. Mosq. News. 20:118-124.

CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes). 1999. Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina. 6ta Ed. Argentina, 1600.

CENAPRECE – SSA. Enfermedades transmitidas por vector. 2016. México, D.F. [En línea] Disponible en: www.cenaprece.salud.gob.mx [Consulta 20 de abril del 2016].

CENAPRECE – SSA. Lista de productos recomendados por el CENAPRECE para el combate de insectos de vectores de enfermedades a partir del 2016. 2015. México, D.F. [En línea] Disponible en: www.cenaprece.salud.gob.mx [Consulta 20 de abril del 2016].

Chandree FF, Darriet J, Doannio MC, Riviere F, Pasteur N, Guillet P. 1997. Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens* (Díptera: Culicidae) in West Africa. J. Med. Entomol. 34 (6): 664-671.

Chaverra RD, Ocampo JN, Gonzalez FI. 2012. Selección artificial de resistencia a lambda-cialotrina en *Aedes aegypti* y resistencia cruzada a otros insecticidas. Rev. Colomb. Entomol. 38 (1): 100-107.

Clements A. 1999. The biology of mosquitoes. Sensory and Behavior. CABI Publishing Oxford, Inglaterra. 2.

Coen E., Strachan T., Dover G. 1982. Dynamics of Concerted Evolution of Ribosomal DNA and Histone Gene Families in the melanogaster Species Subgroup of *Drosophila*. Department of Genetics, University of Cambridge. J. Mol. Biol. 158, 17-35

Díaz C, Enríquez D, Bisset. 2003. Estado de la resistencia a insecticidas en cepas de terreno de la especie *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) procedentes del municipio Pinar del Río. Rev. Cubana Med Trop 55 (3): 196-202.

Dieguez F, Bisset J, Rodriguez M, González T, Diaz C, Vázquez R. 1999. Análisis comparativo de la resistencia a insecticidas en cepas de *Culex quinquefasciatus*, provenientes de Camagüey. Rev. Cubana Med. Tropical, 51(1):26-32.

Eldridge B. 2005. Mosquitoes, the Culicidae. en *Biology of Disease Vectors* (2nd ed) editado por W. C. Marquardt *et al.*. Elsevier Academic Press. 95-11.

FAO. 1979. Recommended Methods for the Detection and Measurement of Resistance of Agricultural Pests to Pesticides. FAO Plant Protection Bulletin. 27:29-32

Fernández A., Daniel G; Mancipe G., Liliana C. and Diana C. 2010. Intoxicación por Organofosforados. Rev.Fac.Med, vol.18, n.1, pp.84-92. ISSN 0121-5256.

Field WN, Hitchen JM, Rees AT. 1984. Esterase activity in strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) tolerant and susceptible to the organophosphate insecticide malathion. J Med Entomol 21:412-418.

Finney J. 1971. Probit Analysis (3 ra ed.) Cambridge University Press. Cambridge 50-80.

Flores A, Albeldaño V, Fernández S, Badii M, Loaiza B, Ponce G, Lozano F, Brogdon W, Black IV WC, Beaty B. 2005. Elevated alfa-esterases levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. Pesticide Biochemistry and Physiology 82(1): 66-78.

Flores AE, Reyes G, Fernández SI, Sanchez FJ, Ponce GG. 2009. Resistance to permethrin in *Aedes aegypti* (L.) in northern Mexico. Southwestern Entomologist 34(2) 167-177

Freyvogel T. A., Hunter A. R. and Smith E. M. 1968. Nonspecific esterases in mosquitoes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 16: 765-789.

Georghiou, G.P. 1971. Resistance of Insects and Mites to Insecticides and Acaricides and the Future of Pesticide Chemicals. En: Swift, J:E:(ed.) Agricultural Chemicals Harmony or Discord for Food People and Environment. Univ. California Div. Agr. Sci. 151.

Georghiou. GP, Nelson. 1982. Pesticide Resistance in Time and Space. Press. New York. pp: 1-19.

Gordon J. 1988. Health Education Research: Mixed strategies in health education and community participation: an evolution of dengue control in the Dominican Republic. Oxford University Press 3(4): 399-419.

Greenblatt HM, Dvir H, Silman I, Sussman JL (2003) Acetylcholinesterase: a multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer's disease. J Mol Neurosci 20: 369–383

Gubler D. 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Semin Pediatr Infect Dis; 8:3-9.

Gullemaud T, Makate N, Raymond M, Hirst B, Callaghan A. 1997. Esterase gene amplification in *Culex pipiens*. Insect Molecular Biology 6: 319–327.

Harwood RF, James MT. 1988. Entomología Médica y Veterinaria, Ed. UMUSA, México, D.F.

Hayes J, Pulfrid D. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit Rev. Biochem. Mol. Biol. 30:445-600.

Hemingway J, Hawkes N, Prapanthadara L, Jayawardenal KG, Ranson H. 1998. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 353:1695–1699.

Hemingway J, Hawkes N, McCarroll L, Ranson H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol* 2004. 34:653–665.

Hurtado Clavijo C. M. & Gutiérrez S. M. 2005. Enfoque del paciente con intoxicación aguda por plaguicidas organos fosforados. *Revista de la Facultad de Medicina*, 53(4), 244-258.

Ibáñez-Bernal S, Gómez Dantés H. 1995. Los vectores del dengue en México: una revisión crítica. *Salud Pública México*; 37: 53-63.

INAFED. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. 2010. [En línea] Disponible en: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia> [Consulta 26 de Septiembre del 2016].

Johnson, F. M, Richardson R. H and Kambyssellis M. P. 1968. Isozyme variability in species of the genus *Drosophila* III *mulleri*. Qualitative comparison of the esterases of *D. aldrich* and *D. mulleri*. *Biochemical Genetics* 1: 239-247.

Kettle DS. 1993. *Medical and Veterinary Entomology*. Cab International. UK: 125-131, 451-471

Lagunes TA, Villanueva JAiménez. 1994. *Toxicología y manejo de insecticidas*. Colegio de Postgraduados. México. 264 pp.

Liu H, Xu Qiang, Zhang Lee, Liu N. 2005. Chlorpyrifos Resistance in Mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Medical Entomology*. 42 (5) 815-820

Lopez B, Ponce G, Gonzalez JA, Gutiérrez SM, Villanueva OK, Gonzalez G, Bobadilla C, Rodriguez IP, Black IV WC, Flores AE. 2014. Susceptibility to Chlorpyrifos in Pyrethroid-Resistant Populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico. *J Med Entomol*. 51(3):644-9.

Lozano FS, Saavedra RK, Black IV W, Eisen L. 2012. QCAL: A software application for the calculation of dose-response curves in insecticide resistance bioassays. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 28(1):59-91

Malcolm C. A., Bourguet D., Ascolillo A., Rooker S. J., Garvey C. F., Hall L. M. C., Pasteur N. and M. Raymond. 1995. A sex-linked Ace gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Molecular Biology* 7(2): 107-120

Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, *et al.* 2009. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *Bmc Genomics* 10:494

Marty J, Sode K, Karube I (1992) Biosensor for detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Electroanalysis* 4:249–252

Mazzari M, Georghiou G. 1995 Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field population of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11(3):315-322.

Mekurian Y, Gwinn D, Tidwell M. 1991. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* from Santo Domingo. Dominican Republic. *J Am Mosq Control Assoc.* 7(1):69-72.

Méndez G, Rivas M, Nájera M, Inette MG, Canto SB, Sabido F. 1996. Proyecto de prevención y control del dengue 1995 – 1996. In Secretaría de Salud. Taller sobre avances recientes en el control de *Aedes aegypti* basado en la comunidad: México y Honduras. Mérida, Yucatán, México. 22 – 24 de agosto de 1996: 32 – 8.

Menzel D. B., Craig R. and Hoskins W. M. 1963. Electrophoretic properties of esterases from susceptible and resistant strains of housefly, *Musca domestica* L.

Milatovic, D.; Moretto, A.; Osman, K. A.; Lotti, M. 1997. Phenyl valerate esterases other than neuropathy target esterase and the promotion of organo-phosphate polyneuropathy. *Chemical Research in Toxicology* 10(9): 1045-1048.

Millard C, Kryger G, Ordentlich A, Greenblatt HM, Harel M, Raves ML, Segall Y, Barak D, Shafferman A, Silman I, Sussman JL. 1999. Crystal structures of aged phosphonylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level. *Biochemistry* 38: 7032–7039

Ming M, Obata F, Kuranaga E, Miura M. 2014. Persephone/Spätzle pathogen sensors mediate the activation of Toll receptor signaling in response to endogenous danger signals in apoptosis-deficient *Drosophila*. *J Biol Chem.* 2014 Mar 14;289(11):7558-68. doi: 10.1074/jbc.M113.543884.

Montella I, Martins A, Fernández V, Pereira J, Braga I, Valle D. 2007. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77: 467-477.

Mutero, A.; Pralavorio, M.; Bride, J. M.; Fournier, D. 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:5922-5926.

Nelson M. 1986. *Aedes aegypti*: Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud. REF: PNSP/86-93. Washington, D.C: 50

Oakeshott J, Van E, Boyce T, Healy M, Russell R. 1993. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica.* 90:239-268.

Ogita Z. 1962. Genetic-biochemical analysis on the enzyme activities in the housefly by agar gel electrophoresis. *Japanese Journal of Genetics.* 31:518-521.

Oh S, Kozaki T, Mizuno H, Tomita T, Kono Y. 2006. Expression of Ace-paralogous acetylcholinesterase of *Culex tritaeniorhynchus* with an amino acid substitution conferring insecticide insensitivity in baculovirus-insect cell system. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 85 (1): 46-51.

OMS 1998. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual). Geneva, Switzerland.

OMS. Alerta Epidemiológica. Infección por virus Zika. 7 de Mayo de 2015 [En línea] Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=&gid=30076&lang=es [Consulta 14 de Junio del 2016].

OMS. Número de casos reportados de Chikungunya en países o territorios de las Américas 2016. Semana Epidemiológica/SE 23. [En línea] Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=8380&Itemid=40931&lang=es [Consulta 13 de Junio del 2016].

OMS. Enfermedades transmitidas por vectores. 2016. [En línea] Disponible en: <http://apps.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/index2.html> [Consulta 9 de Junio del 2016].

OMS. Enfermedad por el virus de Zika. 15 de Abril del 2016 [En línea] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/es/> [Consulta 14 de Junio del 2016].

Oppenoorth FJ. 1985. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. G. A. Kerkut L. I. Gilbert *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. 12.: 731-773.

OPS. 1997. Resurgimiento del dengue en las Américas. *Boletín Epidemiológico/OPS*, 18 (2): 1-6

Quinn DM. 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition-states. *Chem Rev.* 87: 955–979

Paeporn P, Komalamisra N, Deesin V, Rongsriyam Y, Eshita Y, *et al.* 2003. Temephos resistance in two forms of *Aedes aegypti* and its significance for the resistance mechanism. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 34: 786–792.

Pasteur N, Raymond M. 1996. Insecticide resistance genes in mosquitoes their mutations, migration, and selection in field populations. *J. Hered.* 87:444–449.

Perez E, Darjaniva M. 2009. Resistencia focal a insecticidas organosintéticos en *Aedes aegypti* (Linneaus, 1762) (Díptera: Culicidae) de diferentes municipios del estado Aragua, Venezuela. *Boletín de malariología y salud ambiental.* 49 (1).

Ranson, H, Claudianos C, Orтели F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science (Wash. DC).* 298:179–181.

Raymond M. 1985. Presentation d' un programme d'analyse log-probit pour microordinateur cahiers Orstrom Ser. Entomo. Med. Parasitol 23 (2): 117-121.

Raymond, M., Fournier, D., Bride, J.-M., Cuany, A., Berge, J., Magnin, M., and Pasteur, N. 1986. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culcidae) from southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Journal of Economic Entomology* 79: 1452-1458.

Rodriguez M, Bisset J, Rodriguez I, Diaz C. 1997. Determinación de la resistencia a insecticidas y sus mecanismos bioquímicos en 2 cepas de *Culex quinquefasciatus* procedentes de Santiago de Cuba. *Rev Cub Med Tropical.* 1997;49(3):209-14

Rodríguez M, Bisset J, Díaz C y Soca A. 1998. Selección de una cepa de *Culex quinquefasciatus* resistente a lambdacialotrina y su espectro de resistencia cruzada a otros insecticidas. *Rev Cubana Med Trop* 1998. 50(2).

Rodriguez M, Bisset J, Mila L, Calvo E, Díaz C, Soca LA. 1999. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. *Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"*. 51(2):83-8

Rosenberry T. 1975. Acetylcholinesterase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 43: 103–218

Russell R, Claudianos C., Campbell PM, Horne I, Sutherland TD, Oakeshott J G. 2004. Two major classes of target site insensitivity mutations confer resistance to organophosphate and carbamate insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 79:84–93.

Saelim V, Brogdon WG, Rojanapremsuk J, Suvannadabba S, Pandii W, *et al.* 2005. Bottle and biochemical assays on temephos resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 36: 417–425.

Sames W, Bueno R, Hayes J, Olson JK. 1996. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Lower Río Grande Valley of Texas and Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 12: 487 – 490.

Saavedra R, Urdaneta M, Rajatileka S, Moulton M, Flóres AE, Fernández-Salas I, Bisset J, Rodríguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway H, Black W IV. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 16: 785–798.

Scott J. A. 1995. The molecular Genetics of Resistance: Resistance as a Response to Stress. *Florida Entomologist.* 78 (3): 399-414.

Secretaría de Salud. Programa de Acción Específico 2007-2012 Dengue [monografía en internet]. México: Secretaría de Salud, 2008 Disponible en: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/dengue.pdf>

Secretaría de Salud. Guía de Participación Comunitaria para la prevención y control del dengue, [monografía en internet]. México: Secretaría de Salud, 2015 Disponible en: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/guia_patio_limpio.pdf

Severini C, Marinucci M, Raymond M. 1994. Insecticide resistance in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Italy: esterase B locus at DNA level. J. Med. Entomol. 31(3): 496-499.

Schwartz LM, Halloran ME, Durbin AP, Longini IM Jr. The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. Vaccine. 2015 Jun 26; 33(29):3293–3298.

Silman I, Sussman JL. 2005. Acetylcholinesterase: ‘classical’ and ‘non-classical’ functions and pharmacology. Curr Opin Pharmacol 5: 293–302.

SINAVE/DGE/Secretaría de Salud/información al 8 de enero de 2015/Panorama epidemiológico de fiebre por dengue y fiebre hemorrágica por dengue.

Smissaert H. 1964. Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. Science 143: 129–131

Strode C, de Melo-Santos M, Magalhaes T, Araujo A, Ayres C. 2012. Expression profile of genes during resistance reversal in a temephos selected strain of the dengue vector, *Aedes aegypti*. 7: 39439.

Torres MA. 1963. Breve Ensayo histórico sobre *Aedes aegypti* en relación con México. Bol. Epidemid, 27 (3): 144-149.

Townson H. 1939. Esterase isozymes of individual *Ae. aegypti*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 63: 413-418.

Oakeshott J, Claudianos C, Campbell PM, Newcomb RD, Russell RJ. 2005. *Biochemical Genetics and Genomics of Insect Esterases*. Elsevier. 309-361.

Valderrama E, González O, Jaramillo GI. 2008. Evaluación de la susceptibilidad de *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae) a un insecticida Organofosforado y un Piretroide en cuatro poblaciones del Valle del Cauca, mediante dos tipos de bioensayos. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle* 9(2): 1-11.

Vargas V, Córdova P, Alvarado A. 2006. Determinación de la Resistencia a Insecticidas en *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Lutzomyia peruensis* procedentes del Norte Peruano. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 23(4).

Vaughan, A., Rocheleau, T. and French-Constant, R. 1997. Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. *Exper Parasit* 87: 237-244.

Velthuis H.H.W and Von Asperen K. 1963. Occurrence and inheritance of esterases in *Musca domestica*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 6: 79-87.

Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, et al. 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the *ace* gene in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 269:2007-16

Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Fort P, Raymond M. 2003. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature (Lond.)*. 423:136-137.

Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, et al. 2004. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology* 13: 1–7.

Weill M, Berthomieu A, Berticat C, Lutfalla G, Negre V, et al. 2004. Insecticide resistance: a silent base prediction. *Current biology*. 14: 552–553.

Wirth MC, Georghiou GP. 1999. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* 15: 315-320.

Wright, T. R. F. 1963. The genetics of an esterase in *Drosophila melanogaster* *Genetics* 48: 787-801.

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Selene Marlen Gutiérrez Rodríguez

Candidato para el Grado de
Maestro en Ciencias Biológicas.

Tesis: MUTACIONES ASOCIADAS A ESTERASAS RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN *Aedes aegypti* (L.).

Campo de Estudio: Entomología Médica

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 22 de Diciembre de 1984, hija de Marlen Rodríguez LLanes y Cornelio Gutiérrez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2007.

Experiencia Profesional:

Técnico en el proyecto: Estrategia de control del mosquito vector del dengue *Aedes aegypti* (L.) en base a su resistencia a insecticidas en el estado de Veracruz CONACYT FOMIX Veracruz 68298, 2007-2011

Técnico en el proyecto: Innovative Vector Control Consortium. Sub-Grant G-5716-1 financiado por Bill and Melissa Gates Foundation en colaboración con Colorado State University, USA. 2008-2009

Investigador Asociado. Sustainable control of *Aedes aegypti* and epidemic dengue en colaboración con Universidad Autónoma de Yucatán y Colorado State University. National Institute of Health, USA. A1068847-01 Sub Award. G-7539-2. Agosto 2010-2015.