

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**INTENSIDAD DE LA RESISTENCIA A PIRETROIDES Y MUTACIONES  
KDR (V1016I, F1534C) EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.) (Diptera:  
Culicidae) DEL ESTE DE MÉXICO**

**POR**

**Biólogo FRANCO MORALES FORCADA**

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

**ABRIL, 2018**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**TESIS**

**INTENSIDAD DE LA RESISTENCIA A PIRETROIDES Y MUTACIONES  
KDR (V1016I, F1534C) EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.) (Diptera:  
Culicidae) DEL ESTE DE MÉXICO**

**POR**

**Biólogo FRANCO MORALES FORCADA**

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

**ABRIL, 2018**

INTENSIDAD DE LA RESISTENCIA A PIRETROIDES Y MUTACIONES KDR  
(V1016I, F1534C) EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) DEL ESTE  
DE MÉXICO

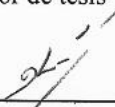
**Comité de tesis**



---

Dra. Beatriz López Monroy

Director de tesis



---

Dr. Gustavo Ponce García

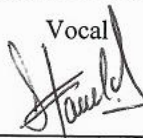
Secretario



---

Dra. Adriana E. Flores Suárez

Vocal



---

Dra. Susana Favela Lara

Vocal



---

Dr. Roberto Mercado Hernández

Vocal

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia en primera instancia por apoyarme en cada paso que di y sigo dando, en cada momento que aunque no sea el mejor están ahí conmigo, la Dra. Beatriz que me brindó su amistad y conocimientos durante estos años y sigue haciendo, me ayudó en este camino y a pesar de alguna manera se pudo lograr el cometido, a la Dra. Adriana que por sus consejos y ayuda en todo lo que llevo de tiempo en el laboratorio me han abierto puertas que creía incansables, a la M.C. Selene por su amistad, apoyo que en estos años de conocernos siempre me supo sacar una sonrisa, a la Dra. Karina que cada que tenía una duda supo cómo despejarla y tener una cara amable para mí; Aarón, Esteban y Gisela, con ustedes el tiempo fue tan agradable y en verdad me ayudaron tanto en los momentos difíciles que mucho necesite y no me dejaron caer son de los mejores amigos y de alguna manera familia que doy gracias el tener, a Úrsula Contreras que me apoyó desde Lic. hasta el momento, gracias por el apoyo y palabras de ánimo que me brindaste todos estos años, en verdad muchas gracias a todos y cada uno que hizo que estos dos años de trabajo dieran frutos.

## **DEDICATORIA**

Tal vez no les he podido dar mucho de lo que ustedes me han dado, tal vez no soy lo mejor esperaban en su vida, pero en verdad me esforcé día con día para obtener cosas buenas, sé que no soy lo mejor del mundo pero al menos luché y sigo luchando por obtener algo bueno en mi vida, gracias a ustedes papá y mamá por creer en mí y no solo a ustedes si no a alguien que ya no está conmigo, abue espero no haberte decepcionado como siento que he hecho con otras personas, este trabajo de alguna manera es para ti, para que sepas y estés orgulloso de mi, de lo que eh logrado y quiero seguir logrando, día con día solo resuena tu recuerdo en mi corazón y quisiera que no solo fuera así si no en mi presente, este trabajo está dedicado a mis familiares, amigos y aquellas personas que habitan mi corazón que sin ellos, esto no pudo haber sido posible, gracias a todos.

## ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINAS
RESUMEN	
1.-INTRODUCCIÓN	1
2.-ANTECEDENTES	4
2.1 Bionomía de <i>Aedes aegypti</i> .	4
2.1.1 Biología y ciclo de vida de <i>Ae. aegypti</i> .	4
2.1.2 Ciclo de desarrollo.	7
2.2 <i>Ae. aegypti</i> como vector de enfermedades arbovirales.	9
2.3 Control de <i>Ae. aegypti</i> .	11
2.4 Piretroides dentro de los programas de control.	11
2.5 Resistencia a insecticidas.	13
2.5.1 Definición.	13
2.5.2 Tipos de resistencia.	14
2.5.3 Resistencia al derribo, mutaciones kdr.	15
2.5.4 Monitoreo de resistencia.	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	21
5.1 Objetivo general.	21
5.2 Objetivos particulares.	21
6. MATERIAL Y MÉTODO	22
6.1 Área de estudio.	22
6.2 Material biológico.	23
6.3 Bioensayos en botella por el método CDC (2010).	24
6.3.1 Insecticidas.	24
6.3.2 Preparación de las botellas.	25
6.3.3 Manipulación de mosquitos.	25

6.3.4 Interpretación de resultados.	.....	26
6.4 Genotipificación de mutaciones kdr en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> .	.....	27
6.4.1 Extracción de ADN.	.....	27
6.4.2 Amplificación de las mutaciones kdr por PCR.	.....	28
6.4.3 Análisis de genotipificación, mutaciones kdr y su correlación con resultados de ensayos en botella.	.....	30
7. RESULTADOS	.....	31
7.1 Frecuencia de resistencia a permetrina en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de las localidades de estudio.	.....	31
7.1.1 Intensidad de resistencia a permetrina en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de las localidades de estudio.	.....	32
7.2 Frecuencia de resistencia a bifentrina en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de las localidades de estudio.	.....	33
7.2.1 Intensidad de resistencia a bifentrina en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de las localidades de estudio.	.....	33
7.3 Frecuencia de resistencia de d-(cis-trans)-fenotrina en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de las localidades de estudio.	.....	34
7.3.1 Intensidad de resistencia de d-(cis-trans)-fenotrina en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de las localidades de estudio.	.....	35
7.4 Distribución geográfica de las mutaciones kdr en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> en el Este de México.	.....	36

7.5 Relación entre frecuencia de las mutaciones kdr y nivel de resistencia en poblaciones de <i>Ae.</i> <i>aegypti</i> de México. ....	42
8. DISCUSIONES .....	45
9. CONCLUSIONES .....	49
10. LITERATURA CONSULTADA .....	50

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Pag</b>
1.	Huevos de <i>Ae. aegypti</i> .	5
2.	Larva de <i>Ae. aegypti</i> .	5
3.	Pupa de <i>Ae. aegypti</i> .	6
4.	Mosquito adulto <i>Ae. aegypti</i> .	7
5.	Ciclo de vida del mosquito <i>Ae. aegypti</i> .	8
6.	Estadios del ciclo de desarrollo de <i>Ae. aegypti</i> .	8
7.	Estados donde se realizó la recolección de huevos de <i>Ae. aegypti</i> .	22
8.	Cámara de emergencia.	23
9.	Jaulas para adultos que se expondrán a los bioensayos.	24
10.	Insecticidas empleados para los ensayos biológicos dosis diagnóstico (Bifentrina, permetrina y d-(cis-trans)-fenotrina.	24
11.	Botellas Wheaton rotuladas e impregnadas.	25
12.	Selección de 25 mosquitos hembra de la misma cohorte para exponer a botellas impregnadas con insecticida.	26
13.	Interpretación de resultados de pruebas de resistencia e intensidad de resistencia.	27
14.	Electroforesis en gel de agarosa 3% de los productos de PCR de la mutación V1016I.	37
15.	Electroforesis en gel de agarosa 4% de los productos de PCR de la mutación F1534C.	37
16.	Mapa con distribución espacial de las mutaciones V1016I y F1534C de poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> del Este de México.	40
17.	Mapa con distribución espacial de las mutaciones F1534C de poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> del Este de México.	41
18.	Relación de porcentaje de mortalidad ante frecuencia de mutaciones kdr en <i>Ae. aegypti</i> del Este de México para permetrina.	42
19.	Relación de porcentaje de mortalidad ante frecuencia de mutaciones kdr en <i>Ae. aegypti</i> del Este de México para bifentrina.	43

20. Relación de porcentaje de mortalidad ante frecuencia de mutaciones kdr en *Ae. aegypti* del Este de México para d-(cis-trans)-fenotrina. 43

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Pag.</b>
1.	Secuencia de primers para las mutaciones V1016I y F1534C.	29
2.	Porcentajes de mortalidad de <i>Ae. aegypti</i> expuestas a DD de en un TD de 30 min.	31
3.	Porcentajes de mortalidad de <i>Ae. aegypti</i> expuestas a 1, 2, 5 y 10 veces la Dosis Diagnóstico de permetrina.	32
4.	Porcentajes de mortalidad de <i>Ae. aegypti</i> expuestas a DD de bifentrina en un TD de 30 min.	33
5.	Porcentajes de mortalidad de <i>Ae. aegypti</i> expuestas a 1, 2, 5 y 10 veces la Dosis Diagnóstico de bifentrina.	34
6.	Porcentajes de mortalidad de <i>Ae. aegypti</i> expuestas a la DD de d-(cis-trans)-fenotrina en un TD de 30 min.	35
7.	Porcentajes de mortalidad de <i>Ae. aegypti</i> expuestas a 1, 2, 5 y 10 veces la Dosis Diagnóstico de d-(cis-trans)-fenotrina.	36
8.	Frecuencia alélica de V1016I en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> .	38
9.	Frecuencia alélica de F1534C en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> .	38
10.	Co-ocurrencia de las mutaciones V1016I y F1534C en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> .	39
11.	Coefficientes de determinación ( $R^2$ ) obtenidos a partir del análisis de correlación entre la frecuencia de I1016 y la intensidad de resistencia en <i>Ae. aegypti</i> del Este de México.	44
12.	Coefficientes de determinación ( $R^2$ ) obtenidos a partir del análisis de correlación entre la frecuencia de C1534 y la intensidad de resistencia en <i>Ae. aegypti</i> del Este de México.	44
13.	Coefficientes de determinación ( $R^2$ ) obtenidos a partir del análisis de correlación entre la co-ocurrencia de las mutaciones V1016I y F1534C (genotipos resistentes) y la intensidad de resistencia en <i>Ae. aegypti</i> del Este de México.	44

## RESUMEN

*Aedes aegypti* es considerado vector primario de las enfermedades arbovirales dengue, Chikungunya, Zika y fiebre amarilla. Tales enfermedades se han convertido en una emergencia global y al no existir una vacuna o tratamiento específico, las principales estrategias para su control se centran en el manejo integrado del vector. Dentro de estas estrategias, entre otras, se encuentran la remoción mecánica de criaderos potenciales para los estadios inmaduros y el control químico. El uso continuo de insecticidas a nivel mundial ha conducido a una falla en el control, siendo uno de los factores más importantes la resistencia que los vectores exhiben a los mismos. En el presente estudio se realizaron ensayos biológicos con el fin de establecer la frecuencia de la resistencia a los insecticidas piretroides permetrina, bifentrina y d-(cis-trans)-fenotrina través del F-RDT (Resistance Frequency Rapid Diagnostic Test), así como la evaluación de intensidad de la misma (I-RDT) siguiendo los protocolos establecidos por el CDC de Atlanta, EUA, en poblaciones *Ae. aegypti* de los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán, México. De igual forma, se determinaron las frecuencias de mutaciones *kdr* (V1016I y F1534C) en las poblaciones bajo estudio buscando relacionarlas con los resultados de los ensayos biológicos.

De acuerdo con los resultados se encontró que las poblaciones de *Ae. aegypti* proveniente del este de México son resistentes al exponerse a la DD de los 3 insecticidas piretroides evaluados, lo anterior de acuerdo con el criterio propuesto por la Organización Mundial de la Salud (mortalidad  $\leq 98\%$ ). A través de los ensayos de intensidad de resistencia se catalogó a las poblaciones bajo estudio con moderada intensidad de resistencia al exponerse hasta 10X la DD de permetrina y bifentrina, mientras que con alta intensidad de resistencia después de la exposición a 10X la DD de d-(cis-trans)-fenotrina. Se encontró que todas las poblaciones del este de México bajo estudio poseen las mutaciones *kdr* V1016I y F1534C a frecuencias de 0.68 a 0.87 y 0.40 a 1 respectivamente, existiendo además la co-ocurrencia de los genotipos homocigotos mutantes en las mismas. Tales frecuencias se relacionan con la alta intensidad de resistencia encontrada a los insecticidas permetrina y d-(cis-trans)-fenotrina confirmando la participación que tienen las mutaciones *kdr* en la resistencia a insecticidas piretroides.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* is considered the main vector of the arboviruses dengue, Chikungunya, Zika and yellow fever which have become a global emergency due to the absence of a specific vaccine or treatment. The main strategies for these arboviral diseases control are focused on the integrated vector management. Among these strategies, are the mechanical removal of potential breeding sites for immature stages and chemical control. The continuous use of insecticides worldwide has led to a failure in control, being one of the most important factors the insecticide resistance. In the present study, biological tests were carried out to establish resistance frequency to pyrethroid insecticides: permethrin, bifenthrin and d- (cis-trans) -fenothrin through the F-RDT (Resistance Frequency Rapid Diagnostic Test). Moreover, intensity of resistance (I-RDT) was evaluated following the protocols according to CDC (Atlanta, USA) in populations *Ae. aegypti* from the states of Nuevo Leon, Tamaulipas, Veracruz and Yucatan, Mexico. Similarly, frequencies of kdr mutations (V1016I and F1534C) were determined in the populations under study, seeking to relate them to biological assays results.

We found that *Ae. aegypti* populations from eastern Mexico are resistant to exposure to the DD of the 3 pyrethroid insecticides evaluated, according to World Health Organization criteria (mortality  $\leq 98\%$ ). Resistance intensity tests were used to classify the populations under study with moderate intensity resistance when exposing up to 10X the DD of permethrin and bifenthrin, while with high intensity resistance after exposure to 10X the DD of d- (cis-trans) -fenothrin. It was found that all the populations of eastern Mexico under study possess the mutations kdr V1016I and F1534C at frequencies of 0.68 to 0.87 and 0.40 to 1 respectively, there is also the co-occurrence of homozygous mutant genotypes in them. Such frequencies are related to the high intensity of resistance found to the insecticides permethrin and d- (cis-trans) -fenothrin, confirming the participation of kdr mutations in pyrethroid resistance.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Aedes aegypti* L. se ha encontrado principalmente en zonas tropicales y subtropicales comprendidas entre los 45° de latitud norte y 35° de latitud sur, sin embargo, actualmente también en zonas isotermales intermedias a los 20°C (Gadelha, 1985). Se encuentra comúnmente en zonas mayores a 1,700m e incluso por encima de esta altitud hasta 2,130m y se ha concluido que los parámetros climáticos son factores más determinantes para la presencia del vector incluso por encima de los factores socioeconómicos (Lozano *et al.*, 2012).

Este mosquito es el vector principal de enfermedades arbovirales como dengue, fiebre amarilla, Chikungunya y recientemente asociado a la transmisión del virus Zika, por lo que es considerado de gran importancia. Lo anterior se ve reflejado en el gran número de casos que se presentan a nivel mundial. En lo que respecta a las Américas, se reportaron 475,218 casos clínicos de dengue, esto para la semana epidemiológica 40 siendo confirmados 59,449. En el caso de Chikungunya, se han reportado 60,308 casos clínicos de los cuáles 122,951 fueron confirmados por laboratorio para la semana epidemiológica 42. Para Zika se reportan 581,557 clínicos de los cuales se confirmaron 221,874 por laboratorio hasta la semana epidemiológica 32 (OMS 2017). En México, se presentaron 9,241 casos de dengue hasta la semana epidemiológica 41, en el caso de Chikungunya son 29 casos para la misma semana y 2,063 casos de Zika (SUIVE/DGE, 2017).

El gran número de casos de las enfermedades arbovirales transmitidas por este mosquito, ha convertido el control del vector como la estrategia más significativa para la prevención de dichas enfermedades; donde los insecticidas son los componentes más importantes. En este escenario destacan los piretroides, los cuales son extensamente usados por su eficacia (Chang *et al.*, 2009), ocasionando en el insecto un efecto “knock down” o de derribo.

Un uso continuo de los insecticidas ha generado resistencia, permitiendo a los insectos sobrevivir a dosis de insecticida que para otros de su misma especie sería letal. Lo anterior, puede demostrarse mediante ensayos biológicos, los cuales son considerados como el “estándar de oro” para cuantificar la resistencia de acuerdo con Flores (2014), y consisten en someter a organismos a diferentes dosis de insecticida, a fin de detectar cambios en la respuesta de una población de vectores al insecticida. Uno de los métodos de bioensayo

utilizados para tal fin son los ensayos de botella del CDC con la Dosis Diagnóstico, la cual consiste en la dosis de insecticida que mata el 100% de mosquitos considerados susceptibles en un tiempo diagnóstico, indicando resistencia si la población sometida a estas condiciones sobrevive a tal exposición en el tiempo diagnóstico, además de esto, se implementó el IRDT que es un adendum de la técnica original del CDC, consistiendo en aumentar 5 y 10X la DD del insecticida al que son expuestos evaluando así el porcentaje de mortalidad de los individuos en un TD.

Como ya se mencionó los piretroides son los insecticidas que se emplean con mayor frecuencia para control a nivel mundial debido al efecto rápido de derribo, el cual se debe a una apertura prolongada del canal induciendo a nivel celular una perturbación de la función nerviosa, causando descargas repetitivas, despolarización de la membrana y alteración sináptica (Narahashi 1996, 2002; Soderlund 2012). Sin embargo, el uso intensivo de los piretroides ha generado resistencia a los mismos por distintos mecanismos, uno de mayor importancia en *Ae. aegypti* es conocido como resistencia knockdown (kdr), el cual consiste en reducir la sensibilidad neuronal a estos insecticidas (Soderlund 2012) por medio de mutaciones en el sitio blanco, disminuyendo así la unión del piretroide al canal de sodio; así mismo, las mutaciones *kdr* se asocian con una gama de mutaciones no sinónimas dentro del gen *para*, el cual codifica para los canales de sodio (Saavedra *et al.*, 2007).

En el 2007 Saavedra *et al.* encontraron dos mutaciones las cuales consistían en una transición en la primera posición del codón 1011 que codifica a un reemplazo de valina, mientras que una transición en la primera posición del codón 1016 codifica para un reemplazo de isoleucina confiriendo también, resistencia a piretroides. Yanola *et al.* (2010) reportaron una nueva mutación en el codón 1534, que consistió en una única sustitución de pares de bases que resulta en el cambio de fenilalanina por cisteína en el tercer dominio del canal de sodio. Estas mutaciones han sido relacionadas con la resistencia a permetrina/DDT, de la misma manera se han vinculado con resistencia a piretroides, mutaciones súper *kdr* como V1023G y D1794Y que se sugiere confieren altos niveles de resistencia a poblaciones de *Ae. aegypti* a permetrina. Debido a lo mencionado anteriormente, se determinó sistemáticamente la variabilidad de las frecuencias de las

mutaciones V1016I y F1534C además del nivel de resistencia de las poblaciones expuestas a DD e IRDT de tres insecticidas piretroides de segunda, tercera y cuarta generación siendo estos d-(cis-trans)-fenotrina, permetrina y bifentrina respectivamente, pudiendo correlacionar los resultados tanto moleculares como de los ensayos biológicos para determinar la relación con el nivel de resistencia a estos xenobióticos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Bionomía de *Ae. aegypti*.

*Ae. aegypti* L. (Díptera: Culicidae) tiene su origen en el continente africano y es considerado una especie de regiones tropicales y subtropicales, encontrándose generalmente por las latitudes 45°N y 35°S, sin embargo, se ha encontrado en sitios más fríos y altos de los inicialmente reconocidos (Nelson, 1986). Por sus hábitos adaptados se considera doméstico, ya que se encuentra en una estrecha relación con el humano, encontrándose en áreas urbanas y suburbanas. Los recipientes como cubetas, floreros, neumáticos son los más comunes para el desarrollo de los estadios acuáticos en el ámbito urbano (Thiri6n 2002).

#### 2.1.1. Biología y ciclo de vida de *Ae. aegypti*.

Este mosquito es holometábolo, es decir posee una metamorfosis completa, constanding de huevo, larva (en cuatro estadios), pupa y adulto.

#### HUEVO

Los huevos del culícido miden menos de 1 mm de longitud y tienen forma ovoide, inicialmente su coloración es blanca, pero al paso de las horas su coloración cambia a negro, por el fenómeno de endurecimiento natural del corion (Nelson, 1986).

La ovoposición ocurre durante la tarde y los huevos en el caso de *Ae. aegypti* son depositados individualmente en paredes de sustratos húmedos, los cuales son sometidos a inundación, generalmente en criaderos artificiales con una baja concentración de materia orgánica y sales disueltas (Figura 1). En el período de la ovoposición, el embri6n inicia su formación, por lo que para un desarrollo total necesita de 2-3 días con gran cantidad de humedad, una vez que el embri6n madura dentro del huevo puede resistir sequías y bajas temperaturas, permaneciendo viable hasta por un año (Eldridge 2005). En el caso de que las condiciones sean las adecuadas, se proporciona un estímulo al huevo ocasionando que se rompa ocurriendo así la eclosión emergiendo la larva.



Figura 1. Huevos de *Aedes aegypti*. <http://fmel.ifas.ufl.edu/kits/Mkit.shtml>

## LARVA

Su desarrollo es en ambientes acuáticos, esta fase es crítica para determinar el tamaño del organismo, ya que se debe alimentar en grandes cantidades para asegurar supervivencia y un tamaño adecuado en fase adulta, empleando sus sedas bucales en forma de abanico (Nelson, 1986).

Las larvas están constituidas de espículas torácicas laterales quitinizadas, un sifón que destaca por coloración negra, cabeza, tórax y abdomen (Figura 2).

La duración de este estadio y de sus cuatro fases, se encuentra en función de temperatura, disponibilidad de alimento y hacinamiento larval, sin embargo, los primeros tres ocurren rápidamente, mientras que el cuarto es más lento debido a que el organismo se prepara para transformarse en pupa.



Figura 2. Larva de *Ae. aegypti*.

## PUPA

En esta fase el organismo no se alimenta, por lo que no puede ser controlado por métodos químicos hasta su fase adulta, su función principal es completar la metamorfosis a fase adulta, en el estadio mencionado los organismos responden a estímulos externos como luz o vibraciones, lo que da como respuesta un movimiento acelerado de la pupa como mecanismo de supervivencia (Nelson, 1986); durante la emergencia del adulto el organismo se mantiene en la superficie por flotabilidad (Figura 3), donde su cabeza y tórax se abren emergiendo el imago.

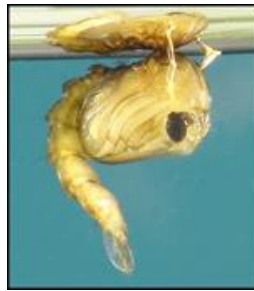


Figura 3. Pupa de *Ae. aegypti*. [http://www.laindustrialsh.com.ar/informacion\\_de\\_utilidad](http://www.laindustrialsh.com.ar/informacion_de_utilidad)

## ADULTO

El adulto recién emergido posee una coloración blanca que con el tiempo cambiará a negro por melanización (Figura 4), posee un abdomen agudo, franjas blancas en la base de los segmentos tarsales, clípeo con escamas color blanco y un diseño característico en forma de lira en el mesonoto formado por las escamas, los machos se distinguen principalmente de las hembras por sus antenas plumosas además de la terminación de su abdomen (Nelson, 1986).

Los machos se alimentan de sustancias azucaradas como néctar, obteniendo así los carbohidratos esenciales para sobrevivir y reproducirse, por otro lado, las hembras se alimentan de hematófagas para poder desarrollar los huevos, sin embargo, también llegan a alimentarse de carbohidratos durante sus primeros días de vida, la alimentación sanguínea ocurre principalmente durante las primeras horas de la mañana y a media tarde o al anochecer siendo antropofágicos.



Figura 4. Mosquito adulto *Ae. aegypti* tomado de: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/es/geral/noticia/2015-12/brasil-volvio-asustarse-con-el-aedes-aegypti-en-2015>

### 2.1.2. Ciclo de desarrollo.

El huevo es depositado para su eclosión en ambientes acuáticos, al tener el contacto con el agua y disminuir el suministro de oxígeno atmosférico, se activa y eclosiona, iniciando con el primero de cuatro estadios larvales, seguidos de una fase de pupa y finalmente el adulto (Figura 5). Los estadios larvales crecen de 1-7 mm después de 3 mudas, su cuerpo se distingue en cabeza, tórax y abdomen y se alimentan mayormente de materia orgánica resuspendida o adherida a las paredes del recipiente, ayudados de sus cerdas bucales en forma de abanico, atrapando partículas y microorganismos que encuentran en el agua, por lo que se les considera omnívoras (Colvard 1978). Las larvas se dirigen periódicamente a la superficie del agua para respirar, aunque mientras están sumergidas, el proceso continúa mediante el tegumento. El abdomen posee un par de espiráculos situados dorsalmente en el octavo segmento o bien en el extremo del sifón dorsal; el estadio de pupa es considerado como un periodo de transición en el que ocurren profundas transformaciones que llevan a la formación del adulto y al cambio de hábitat acuático por terrestre, en este estadio el pre-imago no se alimenta, por lo que la metamorfosis como insecto holometábolo ocurre gracias a su energía acumulada durante sus estadios larvales (Figura 6); una vez que llega al estado adulto adopta un color negro, con un diseño característico color blanco plateado en forma de lira sobre el mesonoto y bandas blancas en las patas. El dimorfismo sexual se lleva a cabo mediante el tamaño, ya que los machos tienden a ser más pequeños y poseer antenas plumosas.

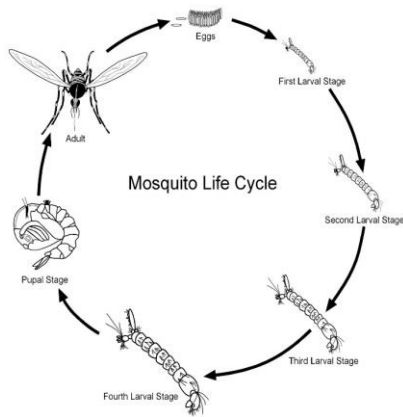


Figura 5. Ciclo de vida del mosquito *Ae. aegypti*.  
Tomado de: Hopp and Foley, 2001.

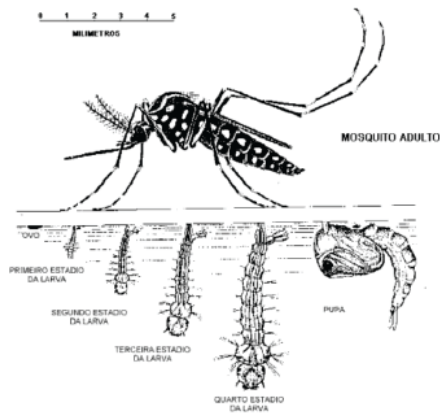


Figura 6. Estadios del ciclo de desarrollo de *Ae. aegypti*.  
Tomado de <http://hospitalcubara.gov.co/como-prevenir-y-controlar-el-dengue/>

Los machos tienden a consumir sustancias azucaradas como néctar y exudados de frutos, las hembras ingieren también sustancias azucaradas, aunque son consideradas mayormente hematófagas para poder desarrollar los huevos. La hembra hematófaga posee hábitos de alimentación diurnos en cercanías de los domicilios humanos, comenzando la búsqueda de su alimento por medio de fuentes de atracción como son los rastros de dióxido de carbono y ácido láctico que serán emanados del organismo del cual se alimentarán, sus horas más activas de alimentación se encuentran entre 6:00-8:00 am y 4:00-7:00 pm (Fernández-Salas, 1999).

La longevidad depende de las condiciones a las que se encuentre expuesto como temperatura, humedad y disponibilidad de alimento, aunque la mayor protección para asegurar un ciclo de vida largo suele ocurrir en las viviendas humanas, puesto que es ahí donde los mosquitos pasan prácticamente inadvertidos de las inclemencias del tiempo, esto ocurre debido a los hábitos de descuido que el humano ha tenido durante años, fomentando la presencia del vector.

## 2.2 *Ae. aegypti* como vector de enfermedades arbovirales.

El dengue, una de las arbovirosis transmitidas por este vector, es de carácter endémico-epidémico (Guzmán *et al.*, 2004; Kindhauser 2003) con diferente forma de expresión

clínica, partiendo de fiebre indiferenciada con una duración de 2-7 días y fiebre con cefalea, malestar general, dolores osteomioarticulares, leucopenia y sangrado, en sus formas atípicas, resulta la afectación intensa de un órgano o sistema: encefalopatía, miocardiopatía o hepatopatía (Martínez 1995, 1997).

Las primeras epidemias de dengue se registraron de 1779-1780 en Asia, África y América del Norte, indicando que el mosquito se encontraba ampliamente distribuido en áreas tropicales durante más de 200 años. Posteriormente, en la segunda guerra mundial comenzó una pandemia de dengue en el Sureste Asiático que desde entonces se propagó por el mundo, y para 1970, solo nueve países habían sufrido epidemias, cifra que para 1995 se había cuadruplicado (OPS, 1995).

Actualmente, la enfermedad es considerada endémica en más de 100 países de África, las Américas, Mediterráneo Oriental, Asia sudoriental y Pacífico occidental; a medida que el dengue se propaga a nuevas zonas, no solo aumenta el número de casos si no que genera brotes explosivos, calculándose 500,000 casos de hospitalizaciones anuales, lo que corresponde una gran porción a niños (Fajardo-Dolci *et al.*, 2012). En las Américas, para el año 2017 se presentaron 59,449 casos confirmados por laboratorio (Pan American Health Organization, 2017) y en la situación actual de México a la semana epidemiológica 41 del presente año se presentaron 9,241 casos confirmados (SUIVE/DGE, 2017).

El virus Chikungunya fue descrito por primera vez en 1952 al Sur de Tanzania (OMS, 2014) por lo que es considerada una enfermedad tropical; desde su aparición en África se han presentado casos en Asia, Europa, Oceanía. En India en 1978 se presentó una epidemia masiva (Padbidri *et al.*, 1978), en 1990 una reemergencia en Tailandia (Thaikruea *et al.*, 1997), y desde finales del 2013 se identificaron casos en las Américas, específicamente en el Caribe (CDC, 2015).

Después de la picadura del mosquito (rango de 3-7 días), el virus ocasiona una enfermedad febril asociada con artralgia, dolor de espalda y cefalea. Se presenta también dolor de articulaciones como en la rodilla, hombro y columna vertebral, además de artritis

migratoria con efusiones en cerca de 70% de los casos. En México para la semana epidemiológica 41 se han reportado 29 casos (SUIVE/DGE, 2017).

El virus Zika fue aislado en 1947 en los bosques de Zika (Uganda), de un mono *Rhesus* sp durante un estudio sobre la transmisión de la fiebre amarilla, aunque no fue hasta 1952 que la infección se demostró en seres humanos por medio de estudios serológicos. En el 2007 tuvo lugar el primer brote importante de infección por Zika en la Micronesia en el cual se notificaron 185 casos sospechosos, de los cuáles 49 se confirmaron y 59 se consideraron probables (el brote se prolongó durante 13 semanas). La sintomatología característica por la infección por Zika se caracteriza por fiebre igual o mayor a 38.5°C, artralgia y conjuntivitis no purulenta, acompañado de cefalea, mialgia, astenia, edema en miembros inferiores, y dolor retro-orbitario (Sánchez-Gonzales et al., 2016), en algunos casos se desarrolla microcefalia en niños cuyas madres habían tenido infección por virus Zika durante el embarazo (Schuler-Faccini, 2015), así mismo se ha observado un aumento considerable en casos de síndrome de Guillain Barré en zonas de transmisión del virus, dicho hallazgo fue reportado en la Polinesia Francesa (Oehler E *et al.*, 2014) y se ha repetido en distintos países.

En febrero del 2014, las autoridades de Chile confirmaron un caso de transmisión autóctona en la Isla de Pascua coincidiendo también con un brote en Nueva Caledonia e Islas Cook (Lormeau *et al.*, 2014), para inicios del 2015, las autoridades brasileñas investigaron un brote de erupciones en la piel que afectaba a seis estados en la región noreste del país, lo que despertó la alerta de la presencia del virus, presente ahora en toda América. Para diciembre de ese mismo año se estimó que habían ocurrido más de 440,000 casos de Zika en Brasil y para marzo del 2016 casos de transmisión en la zona habían sido reportados a la OPS en Puerto Rico y otros 30 países pertenecientes a las Américas. Para el caso de México se reportaron 2,063 casos para la semana epidemiológica 41 (SUIVE/DGE, 2017).

### **2.3 Control de *Ae. aegypti*.**

El control del vector se ha considerado un problema a nivel mundial, esto debido a que en muchos países los programas de control se han desmantelado y carecen de objetivos claros, presupuestos adecuados o personal calificado en entomología y control de vectores; sin embargo, en aquellos existentes, el concepto de manejo integrado de vectores (MIV) es considerada la estrategia más importante que se debe de tener a la hora de decidir o ejecutar las acciones de control vectorial, donde los principales métodos de control son: el saneamiento ambiental, destrucción de depósitos artificiales pudiendo eliminar o transformar físicamente los criaderos y erradicación de huevos.

El control por saneamiento del ambiente intra y peri domiciliario, evita tener depósitos de agua en cualquier lugar del domicilio siendo de gran ayuda para evitar la proliferación del vector; estos métodos tienen la ventaja de hacer un aporte de bienestar social y evitar los efectos del control químico, sin embargo, este último ha sido ampliamente empleado debido al efecto casi inmediato que se tiene en los organismos a controlar.

En México la aplicación de insecticidas como adulticidas, particularmente piretroides se han establecido en la NOM-032-SSA2-2014 aplicando insecticidas no residuales a volumen ultra bajo o ultra reducido, con gotas de entre 1-50 micras (Reiter y Nathan, 2001), por medio de máquina pesada montada en vehículo, de esta manera se busca prevenir y controlar la transmisión de distintas enfermedades arbovirales.

### **2.4 Piretroides dentro de los programas de control.**

Los piretroides son un grupo de insecticidas sintetizados a partir de las piretrinas naturales, con las que comparten características toxicológicas. Este grupo se derivó del piretro, el cuál es un insecticida de contacto obtenido de las flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Remontándose su uso como insecticida al año 400 A.C. Su alta efectividad radica en la inmediata acción de derribo sobre insectos voladores (solo unos segundos), además de poseer poca residualidad.

Debido a la inestabilidad en el ambiente, en la década de los años 40 se relegó el estudio de las piretrinas, sin embargo, en 1945 se sintetizó la retrolona a partir de la piretrina I al eliminar la doble ligadura de la parte alcohol, siendo el primer piretroide sintético, pero sin la suficiente estabilidad para fines agrícolas. Posteriormente y tratando de dar mayor estabilidad a la parte alcohol de la molécula, se sintetizó la fenotrina, que es considerado un piretroide tipo I de segunda generación, con un alcohol 3-fenoxibencil. Sin embargo, la parte ácida de la fenotrina puede ser afectada por oxidaciones, por lo que no es lo suficientemente estable y para evitar dicha oxidación los grupos metil fueron reemplazados por cloro, dando origen así a la permetrina, que sigue siendo un piretroide tipo I, pero de tercera generación. En 1984 se otorgó el primer registro de la bifentrina, caracterizado por tener afinidad lipofílica y baja toxicidad en humanos, además de pertenecer al mismo tipo, pero en la cuarta generación.

Debido a sus características de baja toxicidad en mamíferos, rápida acción, alta actividad insecticida y nula acumulación en el ambiente se ha recibido mucha atención hacia los piretroides para el control del mosquito *Ae. aegypti*, por lo que son utilizados ampliamente a nivel mundial, no solo para el control del mosquito sino también para el control de otros artrópodos.

Para los piretroides su blanco principal es el canal de sodio dependiente de voltaje (Narahashi 2002; Soderlund 2012), dicho canal forma un poro en la membrana que es altamente selectiva a los iones sodio, abriendo y cerrando el canal que es regulado por dos procesos, activación e inactivación. Cuando la membrana de una neurona está despolarizada, los canales de sodio se encuentran activados o abiertos, pero en cuestión de milisegundos después de que el canal de sodio se abre se inactiva rápidamente.

Afectan tanto el sistema nervioso central como el periférico, interrumpiendo la función nerviosa, causando repetidas descargas de impulsos nerviosos, es decir, cuando normalmente se envía un solo impulso el piretroide manda descargas continuas de impulsos bloqueando así el movimiento de iones sodio dentro de la célula (Zerva 1988), esto conlleva a una paralización del cuerpo y en aplicación de concentraciones mayores da

como resultado un bloqueo total de la transmisión así como despolarización de membrana (Narahashi 1996, 2000; Soderlund 2012).

Los piretroides tipo I, que son carentes del grupo alfa-ciano-3-fenoxibencilo, causan lo que se denomina síndrome T y actúan sobre los canales de sodio, prolongando la conductividad del sodio y reduciendo como consecuencia así la del potasio, lo cual resulta en descargas repetitivas de los nervios del organismo afectado durante 10 o 100, lo que resulta en mala coordinación e hiperactividad, seguido de prostración y parálisis, además de ser buenos agentes knock down (Davies *et al.*, 2007); los piretroides tipo II si poseen el grupo alfa-ciano-3-fenoxibencilo y aunque actúan de igual manera sobre los canales de sodio solo que duran 1-2 segundos, estos despolarizan la membrana de las neuronas y el efecto es irreversible, por lo que se le considera un mejor agente letal (Bloomquist, 1996)

En México el control del vector se basó en el uso de malatión a volumen ultra bajo en áreas amplias (NOM-032-SSA) durante los años de 1981-1989, pero la Secretaría de Salud cambió a piretroides después de 1989 para el control de adultos (Flores *et al.*, 2006), donde debido al uso de dichos insecticidas en lo que respecta a salud pública hasta la fecha ha propiciado el desarrollo de resistencia.

## **2.5 Resistencia a insecticidas.**

### **2.5.1. Definición.**

La resistencia se define como “la habilidad adquirida de ciertos individuos de tolerar dosis de un tóxico el cual podría ser letal para la mayoría de los individuos de una población normal del mismo organismo” (WHO, 1957). Actualmente, tal condición, es un problema que se presenta en todos los grupos de insectos, incluyendo a aquellos considerados vectores de enfermedades (Hemingway y Ranson, 2000), esto es debido al uso continuo de los insecticidas además de la incorrecta aplicación de los mismos debido a una mala capacitación del uso de estos y no seguir las recomendaciones de los proveedores, afectando así la efectividad de los programas de control de vectores, por lo que la selección

de un insecticida es muy importante tomando en cuenta el tipo de resistencia que posee el organismo a controlar, además de los mecanismos implicados en esta.

### **2.5.2. Tipos de resistencia.**

Existen distintos tipos de resistencia según lo marcan diferentes autores, sin embargo, Miller (1988) los clasificó principalmente en cuatro categorías:

- 1.- Resistencia por comportamiento: el insecto no entra en contacto con la superficie con insecticida
- 2.- Resistencia por penetración reducida: la composición del exoesqueleto llega a ser modificada inhibiendo la penetración del insecticida
- 3.- Metabólica: la vía metabólica del insecto llega a ser modificada detoxificándose el insecticida o negando el metabolismo del compuesto aplicado en su forma tóxica.
- 4.- Insensibilidad al sitio de acción: el sitio químico de acción para el insecticida se modifica, reduciendo la sensibilidad a la forma activa del xenobiótico.

Partiendo de estos tipos de resistencia se encuentran además subtipos, que se caracterizan en general por el comportamiento de los insectos a los insecticidas dividiéndose en dos categorías que son: irritabilidad y repelencia (Davidson 1953; Lockwood et al. 1984; Roberts and Andre 1994; Chareonviriyaphap et al. 1997, 2001; Rutledge et al.1999).

La irritabilidad se define como la acción de un insecto de alejarse de una superficie tratada con insecticida, posterior a un contacto físico con el químico residual; mientras que la repelencia es una función estricta de un insecticida que actúa a distancia e incluso diversos insectos se apartan de la superficie tratada aun sin tener un contacto físico con el químico (Roberts et al. 1997)

Además de los tipos de resistencia mencionados se despliega la resistencia al derribo conocida por sus siglas en inglés como kdr (knock-down resistance), la cual consiste en una mutación puntual que genera un cambio en la activación del canal de sodio causando baja sensibilidad del insecticida (Vais *et al.*, 1997).

### 2.5.3 Resistencia al derribo, mutaciones kdr.

El término conocido como resistencia *knock-down* se emplea para describir casos de resistencia a DDT e insecticidas piretroides tanto en insectos, como otros artrópodos y es considerado un término genérico que se utiliza para designar a uno de los dos tipos de resistencia mayormente expresados en lo que respecta a resistencia a piretroides (Soderlund y Bloomquist 1990; Soderlund y Knipple, 1999), la primera mutación kdr fue caracterizada originalmente en *Drosophila melanogaster* (Loughney *et al.*, 1989) y dicha resistencia es causada por la reducción de sensibilidad del canal de sodio, el cual es el encargado de la fase de despolarización del potencial de acción en las membranas de las neuronas y la mayoría de las células excitables eléctricamente (Catterall, 2000).

El canal de sodio es considerado como una puerta dentro de la membrana que separa las neuronas del flujo extracelular y cuando la membrana celular es despolarizada el canal de sodio se abre y cierra en cuestión de milisegundos, la entrada de iones sodio a través del canal despolariza la membrana iniciando así la fase ascendente del potencial de acción, la cual se inactiva completamente en milisegundos, causando una rápida despolarización de los potenciales de acción (Liu *et al.*, 2004). Kdr usualmente limita en diversos grados la efectividad de los piretroides, dependiendo de que el insecticida contenga piretroides de tipo I o tipo II, esto se dedujo de los estudios previos realizados en *Drosophila melanogaster*, utilizando los productos del gen *para*, pudiendo de esta manera diseñar sondas moleculares para aislar los segmentos de los genes del canal de sodio de otras especies de artrópodos (Loughney *et al.*, 1989), además de esto, kdr no es afectado por sinergistas que inhiben esterasas y monooxigenasas, en vez de eso kdr se da por mutaciones no sinónima en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje, reduciendo de esta manera su unión con los piretroides.

La resistencia a piretroides en mosquitos *Ae. aegypti* se ha presentado en distintas poblaciones a nivel mundial como lo describe Brengues *et al.* (2003), el cual encontró resistencia a DDT y piretroides en 13 localidades en cepas de *Ae. aegypti* de Semarang en Java Central, Belem en Brasil y Long Hoa en Vietnam de las cuales se obtuvieron las

secuencias de la región del gen que codifica para el segmento hidrofóbico 6 del segundo dominio del canal de sodio dependiente de voltaje, donde se analizaron los exones 19-21 que codifican para el residuo de aminoácidos 908-1036. El exón 19 contiene los aminoácidos asociados con la resistencia súper-kdr que incluye a metionina en la posición 918, leucina en la posición 925, treonina en 929 y leucina 932 (Soderlund y Knipple 2003). Por otro lado, Saavedra *et al.* (2007) descubrieron mutaciones en los codones 1011 y 1016, donde una transición A/G en la primera posición 1011 codifica para un reemplazo (Val1011) y una transición A/G en la primera posición de 1016 codifica a un reemplazo de isoleucina (Ile1016). En el mismo estudio se mostró un rápido incremento en la frecuencia del alelo Ile1016, aunque decreció la frecuencia alélica de Met1011 y Val1011. En Latinoamérica para *Ae. aegypti* se presentan distintas mutaciones como V1016I en el segmento 6 del segundo dominio también reportada por Saavedra *et al.* (2007) específicamente en México, en el 2009 una segunda mutación, F1534C en el sexto segmento del tercer dominio también se asocia con la resistencia a piretroides (Yanola et al., 2010). Además de las mutaciones mencionadas se registran otras, denominadas súper-kdr que en combinación con kdr coexisten, confiriendo una elevada resistencia a piretroides en *Ae. aegypti*, como es el caso particular de las mutaciones V1016G + D1763Y Chang *et al.*, (2009) en el segundo y tercer dominio mostrando que la alta frecuencia y coexistencia de las dos mutaciones sugieren un efecto sinergista el cual provee resistencia knockdown a permetrina y V1016G + S989P (Srisawat *et al.*, 2010) en el segmento seis del tercer dominio que se identificaron como resistentes a deltametrina en poblaciones de Khu Bua, Tailandia, de *Ae. aegypti* debido a que se encuentran dentro del giro IIS5-S6 y cerca del sitio de unión. En el 2015, Kushwah y colaboradores encontraron resistencia a DDT, deltametrina y permetrina en dos mutaciones, F1534C Yanola et al., (2010) y una nueva T1520I (Kushwah *et al.*, 2015) las cuales fueron identificadas en poblaciones de Delhi y representan el primer reporte de mutaciones kdr presentes en India, denotando que la mutación T1520I se encontró en individuos que poseen el alelo 1534C, pero nunca con el tipo silvestre F1534, por lo que se infirió que 1520I estaba relacionada a 1534C.

#### **2.5.4 Monitoreo de resistencia.**

Se han estandarizado distintos métodos para el monitoreo de resistencia, como los bioensayos, que permiten la detección y caracterización de la resistencia a insecticidas en las poblaciones de vectores.

De los ensayos más utilizados se encuentran las pruebas de susceptibilidad de la OMS (2016) que consisten en papeletas impregnadas con insecticida de la Universidad de Malasia.

De forma complementaria se utilizan los ensayos de botella, método CDC. En contraste con el bioensayo de la OMS que mide la tasa de mortalidad en los mosquitos expuestos a una alta concentración de insecticida por un período fijo de tiempo, el ensayo de botella del CDC (2010) toma como medida el tiempo que se necesita para matar a una muestra de mosquitos adultos expuestos a una concentración conocida de insecticida. Al igual que el bioensayo de la OMS, la prueba puede ser estandarizada para la determinación de las dosis diagnóstico (DD) y tiempos de exposición para insecticidas individuales y cada especie de vector usando cepa o población susceptible.

La DD es la dosis de insecticida que mata el 100% de mosquitos susceptibles en un tiempo dado. El tiempo esperado para que el insecticida cumpla este objetivo (100% de mortalidad) es llamado tiempo diagnóstico TD. Estos parámetros se usan como puntos de referencia. Se asume que existe resistencia en una población si una proporción significativa de esta sobrevive a la dosis diagnóstica en el tiempo diagnóstico.

La DD y TD deben ser definidos para cada insecticida, cada región geográfica a estudiar y cada especie de vector que se va a evaluar. Ambos parámetros deben ser validados usando una población susceptible. Una vez que se han determinado la dosis diagnóstico y el tiempo diagnóstico para una especie, estos parámetros serán utilizados para realizar pruebas con la población de vectores de una región en particular; sin embargo puede partirse de dosis diagnóstico y tiempo diagnóstico reportados por el CDC para *Aedes spp.*

Aunado a lo anterior el CDC ha realizado una adición al bioensayo en botella denominada prueba de diagnóstico rápido de intensidad de resistencia (I-RDT); que consiste en exponer las poblaciones de vectores a 1x, 2x, 5x y 10x DD para un DT previamente establecido. Este protocolo está diseñado para permitir el monitoreo de la resistencia en un número máximo de sitios al menor costo, de modo que las decisiones se basen en un conocimiento más completo de la importancia de la resistencia a diferentes frecuencias e intensidades, expresando indirectamente los mecanismos de resistencia involucrados.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Dengue, Chikungunya y Zika representan actualmente las enfermedades arbovirales más relevantes en México y Latinoamérica y aunque existe vacuna para el dengue de reciente aprobación en nuestro País, aun no existe información documentada acerca de su efectividad. Por tal razón, las medidas de prevención y control del vector siguen siendo punto focal en el control de las tres enfermedades. Este se basa principalmente en el uso de insecticidas de diferentes grupos toxicológicos, y aunque el uso de piretroides en aplicaciones espaciales ha disminuido en nuestro País, algunos de ellos permanecen en la lista de insecticidas aprobados por el CENAPRECE para el control de vectores. No solamente para aplicaciones espaciales, sino además para uso residual dentro de las viviendas y en materiales impregnados como los pabellones o cortinas impregnadas. Debido al uso extendido de los piretroides en México a partir de 1989, siendo la permetrina usada por más de 10 años, además de otros piretroides, las poblaciones del mosquito *Ae. aegypti* han exhibido resistencia que ha sido ampliamente documentada. Uno de los mecanismos principales es la insensibilidad en el sitio activo de piretroides, mutaciones puntuales en el canal de sodio de los insectos resistentes que evitan el efecto de derribo que este grupo toxicológico causa a los mismos. En México existe evidencia documentada sobre la co-ocurrencia de dos mutaciones en las poblaciones del vector, V1016I y F1534C. Es por ello que la importancia de este estudio radicó en el monitoreo de resistencia e intensidad de la misma por medio de los ensayos biológicos en botellas del CDC, además de la versión modificada de los mismos (IRDT), correlacionando estos resultados con las mutaciones *kdr* reportadas en México obtenidas de las poblaciones de estudio, evaluando así el nivel de resistencia de las poblaciones. La información resultante puede ser utilizada en la toma de decisiones operacionales en lo que respecta a la selección de los insecticidas que podrán considerarse en los programas de control del vector, tomando en cuenta que no exhiba resistencia documentada a los mismos.

#### **4. HIPÓTESIS**

La alta intensidad de resistencia a piretroides en las poblaciones de *Ae. aegypti* del Este de México se debe a la alta frecuencia de las mutaciones *kdr* V1016I y F1534C.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General.

Determinar la frecuencia e intensidad de resistencia a insecticidas piretroides en poblaciones de *Ae. aegypti* de México y establecer su relación con la frecuencia de las mutaciones *kdr* (V1016I, F1534C) en el gen *para* del canal de sodio.

### 5.2 Objetivos Particulares.

1. Determinar la frecuencia de resistencia a insecticidas piretroides (d-(cis-trans)-fenotrina, permetrina, bifentrina) en poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes del Este de México.
2. Determinar la intensidad de resistencia a insecticidas piretroides (d-(cis-trans)-fenotrina, permetrina, bifentrina) en poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes del Este de México.
3. Estimar la frecuencia de V1016I y F1534C en poblaciones de *Ae. aegypti* del Este de México.
4. Analizar la relación entre la frecuencia de las mutaciones *kdr* y la intensidad de resistencia en poblaciones de *Ae. aegypti* del Este de México.

## 6. MATERIAL Y MÉTODO

### 6.1 Área de estudio.

El área de estudio comprendió localidades de 4 estados de México, siendo estos Nuevo León con las localidades de San Nicolás de Los Garza (latitud 25°44'16.02"N, longitud 100°19'7.70"O) y Apodaca (latitud 25°48'50.74"N, longitud 100°14'26.81"O) , Tamaulipas con la localidad de Ciudad Madero (latitud 22°16'32.30"N, longitud 97°50'15.63"O), Veracruz con Minatitlán (latitud 17°59'32.16"N, longitud 94°33'33.25"O), Poza Rica (latitud 20°31'48.79"N, longitud 97°27'11.10"O) y Coatzacoalcos (latitud 18°8'20.03"N, longitud 94°25'30.99"O), y Yucatán con Itzincab (latitud 20°54'47"N longitud 89°41'30"O) (Figura 7).

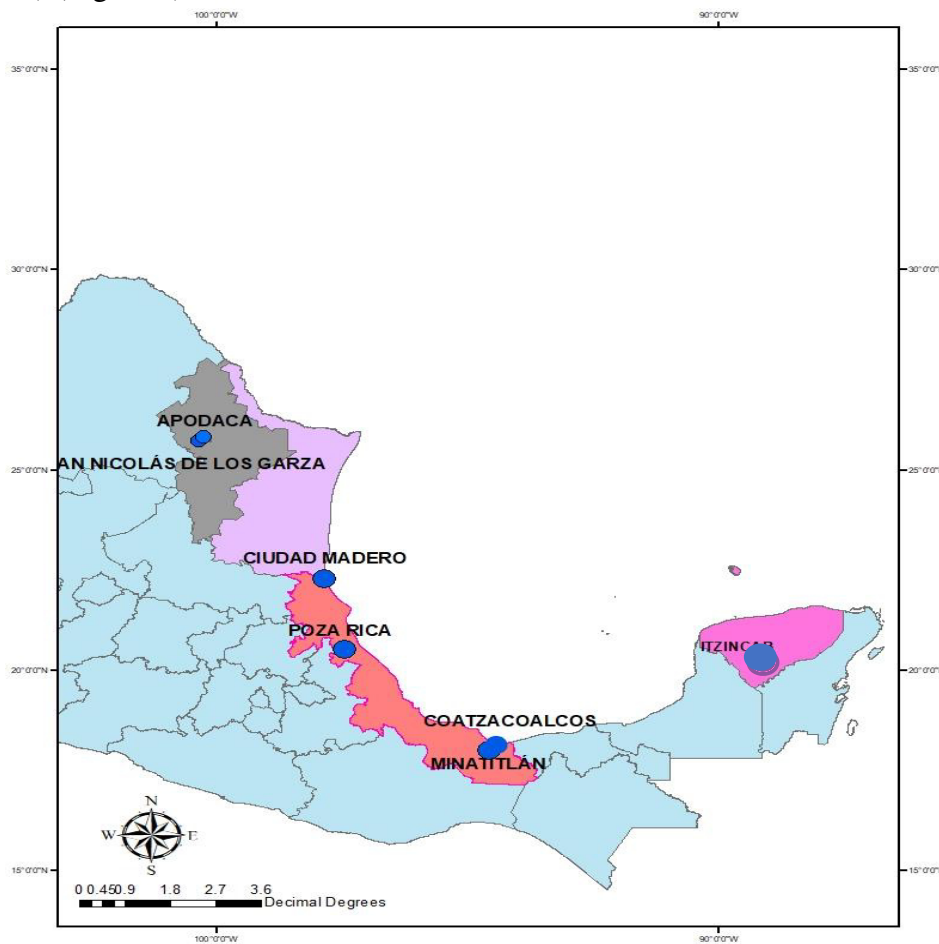


Figura 7. Estados donde se realizó la recolección de huevos de *Ae. aegypti*.

## 6.2 Material biológico.

Las poblaciones de *Ae. aegypti* se obtuvieron de los estados mencionados mediante ovitrampas, las cuales se colocaron en las distintas localidades de estudio donde las hembras una vez grávidas realizaron la oviposición en papeletas que contenían estos recipientes.

Posteriormente las papeletas con huevos se transportaron al laboratorio de Entomología Médica en el área de Fisiología y Toxicología de insectos en la Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L., donde se colocaron en charolas con agua declorada y bajo condiciones controladas de temperatura y humedad ( $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 70% HR y 12:12 fotoperiodo) para su eclosión. Las larvas se alimentaron con proteína de hígado. Las pupas se trasladaron a cámaras de emergencia (Figura 8) y posterior a la salida el imago dichos organismos se traspasaron a jaulas (Figura 9) y alimentaron con una fuente azucarada al 10% tanto hembras como machos.

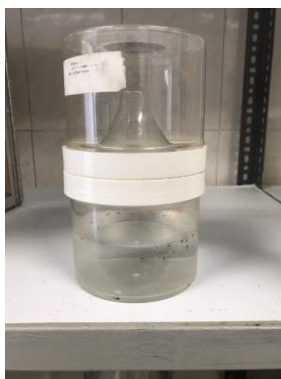


Figura 8. Cámara de emergencia.

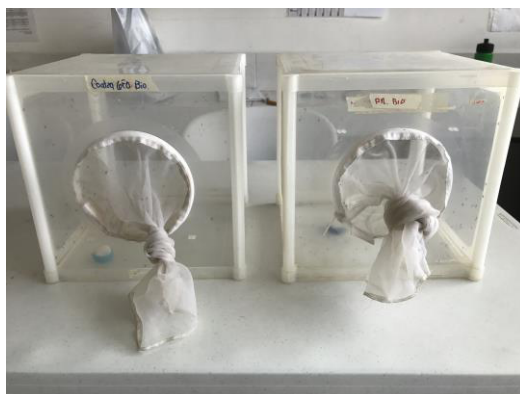


Figura 9. Jaulas para adultos que se expondrán a los bioensayos.

Para lograr la ovipostura de la hembra se les proporcionó sangre introduciendo un ejemplar de *Rattus norvegicus* en cada jaula. Se proveyeron superficies de ovoposición y una vez recuperados los huevos, los cuáles corresponde a la F<sub>1</sub>, se almacenaron para su uso posterior en bioensayos y las pruebas moleculares.

### 6.3 Bioensayos en botella por el método CDC (2010)

#### 6.3.1 Insecticidas.

Se utilizaron los ingredientes activos de los insecticidas, bifentrina (99%), d-(cis-trans)-fenotrina y permetrina (99.5%) (ChemService, West Chester) (Figura 10).



Figura 10. Insecticidas empleados para los ensayos biológicos dosis diagnóstico (Bifentrina, permetrina y d-(cis-trans)-fenotrina).

### 6.3.2 Preparación de las botellas.

Se emplearon botellas Wheaton de 250 ml (Figura 11), las cuales se rotularon correctamente dependiendo de la dosis a utilizar, en el caso de permetrina se utilizó la DD de 15µg/ml según lo establecido por el CDC (Brogdon, 2010). Para la dosis y tiempo diagnóstico de bifentrina y fenotrina se emplearon los valores de DD 1 y 3 µg/ml respectivamente. Dichas dosis fueron determinadas en laboratorio utilizando como cepa de referencia a la New Orleans (Lopez *et al.* 2018).



Figura 11. Botellas Wheaton rotuladas e impregnadas.

Se realizaron los ensayos biológicos agregando el volumen establecido de la solución del insecticida, considerando la DD a cada botella, junto con 1 ml de acetona como acarreador. Las botellas se taparon inmediatamente y se colocaron en un rotador de botellas (Wheaton Bench Top Roller), hasta que se cubrió el interior de la botella uniformemente. Las botellas se guardaron en un lugar oscuro, destapadas, para favorecer la evaporación de la acetona y evitar la humedad durante 24 hrs. De igual forma, se impregnaron botellas control sólo con 1 ml de acetona sin insecticida.

### 6.3.3 Manipulación de mosquitos.

Se empleó un aspirador con el cual se introdujeron un total de 25 mosquitos hembra en cada botella impregnada con la DD de cada piretroide y de igual manera en el control (Figura 12). Se utilizaron 4 botellas por insecticida y 1 control para completar un total de

125 mosquitos por insecticida/control. Se examinaron las botellas en tiempo 0 y se registró la cantidad de mosquitos caídos después de 30 minutos, se empleó como criterio de mortalidad aquellos individuos patas arriba, sin capacidad de incorporarse o vuelo errático.



Figura 12. Selección de 25 mosquitos hembra de la misma cohorte para exponer a botellas impregnadas con insecticida.

#### **6.3.4 Interpretación de resultados.**

Se calculó el porcentaje de mortalidad y se utilizó el criterio propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016) para determinar el grado de resistencia, el cual establece que una mortalidad del 98%-100% en los mosquitos expuestos a la DD en el TD la población se considera susceptible. Si la mortalidad es entre 90%-97% se sugiere la posibilidad de resistencia que debe ser confirmada. La confirmación de resistencia se obtiene mediante una repetición adicional de los bioensayos con el mismo insecticida al que se expuso en la misma población o en la progenie de algún mosquito sobreviviente y por medio de pruebas moleculares para conocer los mecanismos de resistencia. Si las pruebas adicionales muestran una mortalidad menor a 98%, la resistencia es confirmada. Si la mortalidad es menor de 90%, la población se considera resistente y esto confirma la existencia de genes que confieren resistencia en las poblaciones sometidas a bioensayos.

Para los ensayos biológicos de intensidad de resistencia se tomó como criterio el establecido por la OMS (2016), que establece a intensidad de 5x la Dosis Diagnóstico si existe una mortalidad de entre 98-100% se considerará que la población de mosquitos posee una baja intensidad de resistencia, si es <98% como moderada-alta intensidad de resistencia, para evaluar 10x la Dosis Diagnóstico del insecticida empleado, mortalidades mayores a 98% se consideran como de intensidad de resistencia moderada y aquellas menores a 98% como de intensidad de resistencia alta (Figura 13).

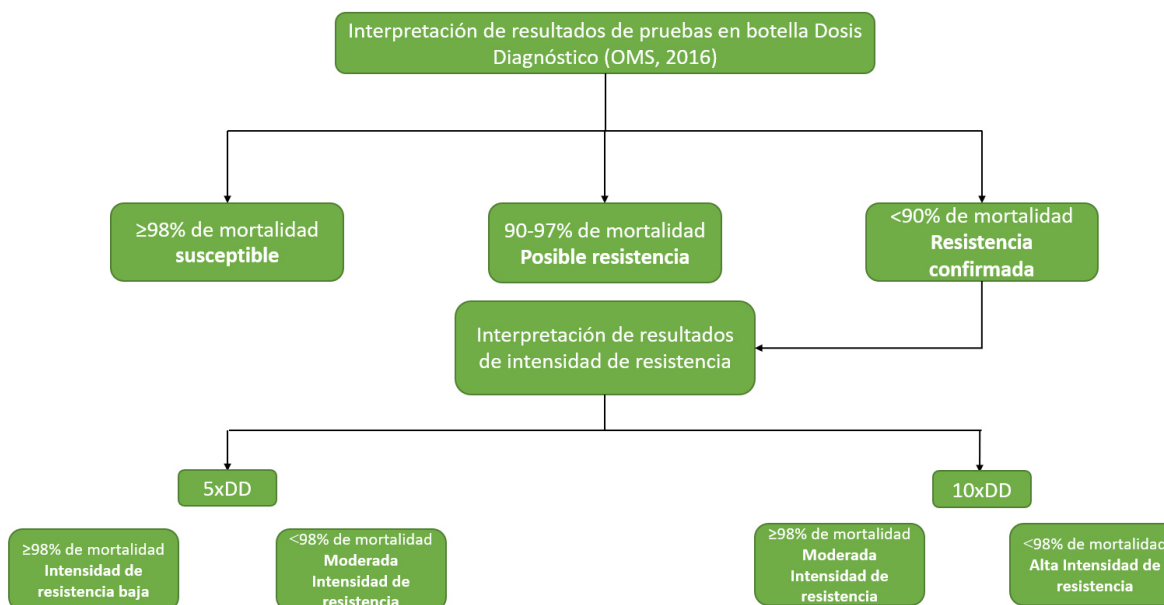


Figura 13. Interpretación de resultados de pruebas de resistencia e intensidad de resistencia.

Elaboración propia basada en OMS (2016).

## 6.4 Genotipificación de mutaciones kdr en las poblaciones de *Ae. aegypti*

### 6.4.1 Extracción de ADN.

El ADN se extrajo de 30 mosquitos *Ae. aegypti* hembra de cada población bajo estudio, mediante la técnica modificada de extracción de sales (Coen *et al.*, 1982). Se colocaron los mosquitos individualmente en tubos de 1.5ml, se agregaron 50µl de buffer de extracción, se

maceraron con un pistilo estéril (1 pistilo por tubo), posteriormente, se le adicionó otros 50µl de buffer al tubo limpiando el pistilo, los tubos se pasaron por vórtex y se centrifugaron mediante 1 minuto a 13.000 rpm, habiendo realizado estos pasos, los tubos se incubaron a 65°C durante 30 minutos, se centrifugaron durante 1 minuto a 13,000 rpm y se agregaron 15 µl de acetato de potasio y posteriormente incubaron a una temperatura de -20°C durante 40 minutos. Concluido el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 minutos, y se transfirieron 80µl del sobrenadante de cada tubo a tubos nuevos correctamente rotulados; se adicionaron a los 80 µl, 200 µl por tubo, de etanol al 100% pasando por un periodo de incubación de 10 minutos a una temperatura de -20°C, posteriormente se removió el alcohol y realizaron los lavados de las muestras con etanol al 70%. Realizados los lavados, se decantó el sobrenadante y el pellet, el cual una vez seco se resuspendió en 30 µl de H<sub>2</sub>O grado molecular, se cuantificó la concentración del ADN en un equipo NanoDrop y se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

#### **6.4.2 Amplificación de las mutaciones kdr por PCR.**

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) para las dos mutaciones ya establecidas se realizó en un termociclador BioRad T100. Los oligonucleótidos que se emplearon para estas reacciones fueron sintetizados de acuerdo con Saavedra *et al.*, (2007) y Yanola *et al.*, (2010) para V1016I y F1534C respectivamente (Tabla 1).

Para la mutación V1016I se llevaron a cabo reacciones de 15µl donde se les agregó por reacción 2.14µl de dH<sub>2</sub>O, 10µl de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega), 20µM de cada uno de los oligonucleótidos y 100 ng de ADN del mosquito (Tabla 1). Las reacciones de PCR se sometieron a las siguientes condiciones en el termociclador: temperatura inicial de 95°C por 5 minutos para la separación inicial, seguida de 39 ciclos de 1 minutos a 95°C, 60°C durante 1 minuto y una extensión final de 72°C durante 10 minutos.

Para la amplificación de F1534C (Yanola et al., 2010) se llevaron a cabo reacciones de 15µl a las cuales se les agregó 3.775µl de dH<sub>2</sub>O, 10µl de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega), 2.5µM de cada uno de los oligonucleótidos y 100ng de ADN del mosquito (Tabla 1). Las reacciones se sometieron a las siguientes condiciones en termociclador: temperatura inicial de 95°C durante 4 minutos para una separación inicial, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C durante 4 minutos.

Tabla 1. Secuencia de primers para las mutaciones V1016I y F1534C.

Mutación	Nombre del primer	Secuencia (5' - 3')
V1016I	Val1016F	GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCACAAATTGT TTCCCACCCGCACCGG
	Ile1016F	GCGGGCACAAATTGTTCCCACCCGCACTGA
	Ile1016R	TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC
F1534C	C1534F	GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCTCTACTTTGT GTTCTTCATCATGTG
	F1534F	GCGGGCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATATT
	F1534R	TCTGCTCGTTGAAGTTGTCGAT

Además de lo ya mencionado, se incluyeron controles negativos, los cuales contenían todos los elementos de la reacción con excepción de ADN. De igual forma, se utilizaron controles positivos para cada una de las mutaciones analizadas, los cuales consistieron en muestras de la cepa New Orleans como homocigotos susceptibles (V1016/V1016 y F1534/F1534), muestras de una cepa resistente de Isla Mujeres como homocigoto resistente para la mutación I1016 (I1016/I1016) y una muestra *de Ae. aegypti* homocigoto resistente para C1534 donada por Saavedra-Rodríguez (C1534/C1534).

Los productos de PCR para las mutaciones V1016I y F1534C se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 3% y 4% respectivamente, empleando un marcador de peso molecular de 25pb, posteriormente se corrió la electroforesis a 100V durante 1 hora empleando Buffer SB 1X y como agente intercalante gel red. Como último paso, el gel se observó bajo luz UV en un fotodocumentador UVTec Cambridge y fotografiado para la posterior genotipificación.

### **6.4.3 Análisis de genotipificación, mutaciones kdr y su correlación con resultados de ensayos en botella.**

Las frecuencias genotípicas de las mutaciones V1016I y F1534C se calcularon dividiendo el número de mosquitos con el genotipo a calcular entre el total de mosquitos analizados, además de esto, las frecuencias alélicas para ambas mutaciones (V1016I y F1534C) se calcularon a partir de la suma de dos veces el número de homocigotos y el número de heterocigotos, dividido entre  $2n$ , donde “n” corresponde al tamaño de muestra.

Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson ( $P < 0.05$ ) entre las frecuencias de las mutaciones y los resultados de los ensayos biológicos realizados con piretroides para poder medir el grado de relación entre ambas variables, para obtener estos valores se utilizó la hoja de cálculo Microsoft Excel y el programa estadístico GraphPad Prism 7.

Además de esto se analizó la co-ocurrencia genotípica de ambas mutaciones para detectar la presencia de los homocigotos silvestres y mutantes; para este fin se empleó Microsoft Excel.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Frecuencia de resistencia a permetrina en las poblaciones de *Ae. aegypti* de las localidades de estudio.

Para cada uno de los insecticidas empleados en este trabajo se utilizaron las dosis diagnósticas correspondientes para *Ae. aegypti*. Para el insecticida permetrina (Tabla 2) se emplearon 15µg por botella, de acuerdo a lo establecido por el CDC para el género *Aedes* (CDC, 2010), obteniendo de entre 0-51% de mortalidad en las poblaciones estudiadas. Las poblaciones con los menores porcentajes de mortalidad fueron Madero, Tamaulipas, seguida de San Nicolás, Nuevo León, Coahuila de Zaragoza y Poza Rica, Veracruz e Itzincab, Yucatán con 0, 1.96, 2, 3.8 y 9% respectivamente. La población con el porcentaje de mortalidad mayor fue Minatitlán, Veracruz con 51%, aunque de acuerdo al criterio utilizado (OMS, 2016), todas las poblaciones son resistentes (Porcentaje de mortalidad  $\leq 90\%$ ).

Tabla 2. Porcentajes de mortalidad de *Ae. aegypti* expuestos a DD de permetrina en un TD de 30 min.

Poblaciones	DD (15 µg/ml)	Estado
Apodaca, NL	19%	R
San Nicolás de Los Garza, NL	1.96%	R
Madero, Tamps	0%	R
Poza Rica, Ver	3.8%	R
Coahuila de Zaragoza, Ver	2%	R
Minatitlán, Ver	51%	R
Itzincab, Yuc	9%	R

R: resistente

### 7.1.1 Intensidad de resistencia a permetrina en las poblaciones de *Ae. aegypti* de las localidades de estudio.

Las poblaciones en estudio fueron sometidas a 2, 5 y 10x la dosis diagnóstico en un Tiempo Diagnóstico de 30 minutos (Tabla 3), donde los valores para todas las poblaciones fueron menores a 93% de mortalidad en 5x la DD mostrando 40, 53 y 67% como las menores para las poblaciones de Poza Rica, Veracruz; Madero, Tamaulipas; y Apodaca, Nuevo León respectivamente, y mayores para Coatzacoalcos, Veracruz e Itzincab, Yucatán ambas con 89% de mortalidad; Minatitlán, Veracruz con 86% y San Nicolás, Nuevo León con 92%, considerándose así estas poblaciones como de moderada intensidad de resistencia al insecticida en cuestión. Para 10x la DD, la mayoría de las poblaciones resultaron con 100% de mortalidad, a diferencia de San Nicolás, Nuevo León que presentó un 99% entrando aun así en la clasificación nuevamente de intensidad de resistencia moderada (MIR) según lo establece el manual para procedimientos de prueba para la vigilancia de la resistencia a insecticidas en los mosquitos vectores de malaria (OMS, 2016).

Tabla 3. Porcentajes de mortalidad de *Ae. aegypti* expuestos a 1, 2, 5 y 10 veces la Dosis Diagnóstico de permetrina.

Poblaciones	1xDD	Estado	2XDD	Estado	5XDD	Estado	10XDD	Estado
Apodaca, NL	19%	R	68%	R	92%	MIR	100%	MIR
San Nicolás de Los Garza, NL	1.96%	R	84%	R	92%	MIR	99%	MIR
Madero, Tamps	0%	R	6%	R	53%	MIR	100%	MIR
Poza Rica, Ver	3.8%	R	13%	R	40%	MIR	100%	MIR
Coatzacoalcos, Ver	2%	R	5%	R	89%	MIR	100%	MIR
Minatitlán, Ver	51%	R	55%	R	86%	MIR	100%	MIR
Itzincab, Yuc	9%	R	73.5%	R	89%	MIR	100%	MIR

R: resistente

MIR: Intensidad de Resistencia Moderada

## 7.2. Frecuencia de resistencia a bifentrina en las poblaciones de *Ae. aegypti* de las localidades de estudio.

Para bifentrina, la dosis diagnóstico correspondiente para *Ae. aegypti* fue de 1 µg por botella, los resultados de los ensayos fluctuaron de 6% a 49% (Tabla 4). La población que mostró un menor porcentaje de mortalidad fue Poza Rica, Veracruz con un 6%, seguida de Apodaca, Nuevo León; Itzincab, Yucatán; Madero, Tamaulipas; Coatzacoalcos, Veracruz y Minatitlán, Veracruz con 23, 25, 37, 38 y 47% respectivamente, mientras que aquella que presentó una mortalidad mayor fue San Nicolás, Nuevo León con 49%. Sin embargo, y como ocurrió con permetrina, todas las poblaciones bajo estudio son resistentes a bifentrina (Porcentaje de mortalidad ≤90%).

Tabla 4. Porcentajes de mortalidad de *Ae. aegypti* expuestas a DD de bifentrina en un TD de 30 min.

Poblaciones	DD (1µg/ml)	Estado
Apodaca, NL	23%	R
San Nicolás de Los Garza, NL	49%	R
Madero, Tamps	37%	R
Poza Rica, Ver	6%	R
Coatzacoalcos, Ver	38%	R
Minatitlán, Ver	47%	R
Itzincab, Yuc	25%	R

R: resistente

### 7.2.1 Intensidad de resistencia a bifentrina en las poblaciones de *Ae. aegypti* de las localidades de estudio.

Al haber sido sometidas las poblaciones bajo estudio a 1, 2, 5 y 10x la dosis diagnóstico en un tiempo diagnóstico de 30 minutos (tabla 5) , los resultados establecieron el estatus de las poblaciones con base en lo reportado por la OMS; donde las poblaciones expuestas a 5XDD se clasificaron con MIR, ya que los valores se encuentran por debajo del 98% de mortalidad, mostrando mortalidad mínima en la población de Apodaca, Nuevo León con 68% y Poza Rica, Veracruz con 79%; mientras que las poblaciones que mostraron una mayor mortalidad para esta intensidad correspondió a Coatzacoalcos, Veracruz y San

Nicolás, Nuevo León con 90 y 92% de mortalidad respectivamente, sin embargo, aun así, se consideraron como estatus de MIR, por último, en 10XDD en su mayoría las poblaciones presentaron 100% de mortalidad y aun cuando la población de San Nicolás, Nuevo León mostró 99%, se clasificó como estatus de MIR de acuerdo al manual para procedimientos de prueba para la vigilancia de la resistencia a insecticidas en los mosquitos vectores de malaria (2016).

Tabla 5. Porcentajes de mortalidad de *Ae. aegypti* expuestas a 1, 2, 5 y 10 veces la Dosis Diagnóstico de bifentrina.

Poblaciones	1xDD	Estado	2xDD	Estado	5xDD	Estado	10xDD	Estado
Apodaca, NL	23%	R	27%	R	68%	MIR	99%	MIR
San Nicolás de Los Garza, NL	49%	R	64%	R	92%	MIR	100%	MIR
Madero, Tamps	37%	R	54%	R	89%	MIR	100%	MIR
Poza Rica, Ver	6%	R	34%	R	79%	MIR	100%	MIR
Coatzacoalcos, Ver	38%	R	50%	R	90%	MIR	100%	MIR
Minatitlán, Ver	47%	R	60%	R	88%	MIR	100%	MIR
Itzincab, Yuc	25%	R	31%	R	80%	MIR	100%	MIR

R: resistente

MIR: Intensidad de Resistencia Moderada

### 7.3 Frecuencia de resistencia de d-(cis-trans)-fenotrina en las poblaciones de *Ae. aegypti* de las localidades de estudio.

Para el insecticida d-(cis-trans)-fenotrina, la dosis diagnóstico correspondiente para la especie *Ae. aegypti* es de 3 µg por botella, donde los valores de mortalidad para este insecticida fluctuaron entre 0% y 19% (Tabla 6), lo que en comparación con los insecticidas piretroides anteriores es aún menor. Las poblaciones presentaron un porcentaje nulo de mortalidad corresponden a San Nicolás de los Garza, NL y Madero, Tamps. ambas con 0%, lo que en comparación con permetrina presenta un diferencia de 1.96%, sin embargo con respecto a bifentrina se mostró casi un 50% de diferencia en la mortalidad; las poblaciones con mayor mortalidad fueron Apodaca con 19% e Itzincab con 8%, lo que

nuevamente al compararse con las poblaciones expuestas a otros insecticidas los resultados de mortalidad son menores, además ser consideradas como poblaciones de estatus resistente, de acuerdo con lo establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para evaluar el significado de los valores de resistencia detectado.

Tabla 6. Porcentajes de mortalidad de *Ae. aegypti* expuestas a la DD de d-(cis-trans)-fenotrina en un TD de 30 min.

Poblaciones	DD (1µg/ml)	Estado
Apodaca, NL	19%	R
San Nicolás de Los Garza, NL	0%	R
Madero, Tamps	0%	R
Poza Rica, Ver	4%	R
Coatzacoalcos, Ver	1%	R
Minatitlán, Ver	5%	R
Itzincab, Yuc	8%	R

R: resistente

### 7.3.1 Intensidad de resistencia de d-(cis-trans)-fenotrina en las poblaciones de *Ae. aegypti* de las localidades de estudio.

Posterior a la exposición de las poblaciones de *Ae. aegypti* al insecticida 1, 2, 5 y 10x la dosis diagnóstico en el tiempo diagnóstico de 30 minutos (Tabla 7), los resultados de las distintas exposiciones denotaron que las poblaciones en su totalidad eran consideradas como de moderada intensidad de resistencia a 5x la dosis diagnóstico; con valores que fluctuaron de 37% a 51%, mientras que para 10x dicha dosis se mostró una mortalidad de entre 54% a 68% valores muy por debajo de los que se obtuvieron en los ensayos con los otros dos insecticidas trabajados, por lo que la población se clasificó como de alta intensidad de resistencia, lo que indica con base en el manual para procedimientos de prueba para la vigilancia de la resistencia a insecticidas en mosquitos vectores de malaria de la OMS que debido a los niveles de resistencia que se presentan en las poblaciones existe una falla operacional en el control del organismo y se requiere urgentemente desarrollar una estrategia apropiada para el manejo de resistencia, no solo para este

insecticida, sino, también para los anteriores, puesto que los valores obtenidos y evaluados con base en el manual de la OMS indican una intensidad de resistencia moderada.

Tabla 7. Porcentajes de mortalidad de *Ae. aegypti* expuestas a 1, 2, 5 y 10 veces la Dosis Diagnóstico de d-(cis-trans)-fenotrina.

Poblaciones	1xDD	Estado	2xDD	Estado	5xDD	Estado	10xDD	Estado
Apodaca, NL	19%	R	39%	R	43%	MIR	57%	AIR
San Nicolás de Los Garza, NL	0%	R	28%	R	42%	MIR	63%	AIR
Madero, Tamps	0%	R	29%	R	44%	MIR	55%	AIR
Poza Rica, Ver	4%	R	10%	R	37%	MIR	58%	AIR
Coatzacoalcos, Ver	1%	R	3%	R	49%	MIR	68%	AIR
Minatitlán, Ver	5%	R	38%	R	51%	MIR	57%	AIR
Itzincab, Yuc	8%	R	19%	R	47%	MIR	54%	AIR

R: resistente

MRI: Intensidad de Resistencia Moderada

AIR: Alta Intensidad de Resistencia

#### 7.4 Distribución geográfica de las mutaciones *kdr* en poblaciones de *Ae. aegypti* en el este de México.

Se emplearon 30 ejemplares de cada una de las poblaciones de estudio, pudiendo detectar las mutaciones V1016I y F1534C (Tabla 6 y 7), así como sus frecuencias. Los genotipos resultantes fueron: homocigoto mutante I1016/I1016 (fragmento en el gel de agarosa 68pb), homocigotos silvestres V1016/V1016 (fragmento en gel de agarosa 85pb) y heterocigotos con la presencia de ambos alelos, además de esto se muestra el marcador molecular con un peso de 25pb (Figura 14).

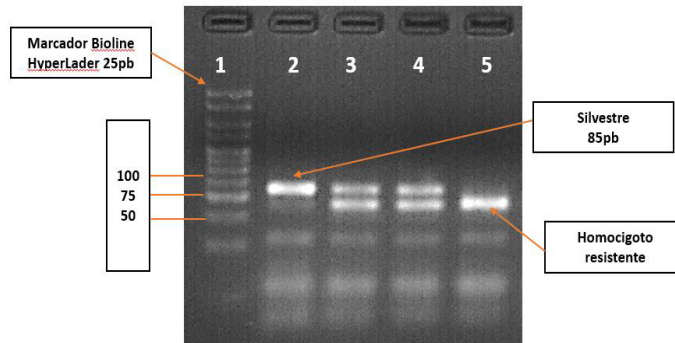


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 3% de los productos de PCR de la mutación V1016I (Marcador HyperLadder Bioline 25pb carril 1, homocigoto silvestre carril 2, heterocigotos carril 3 y 4, homocigoto resistente carril 5).

Para la mutación F1534C, los genotipos resultantes fueron: homocigoto mutante C1534/C1534 (fragmento en gel de agarosa con 113pb), homocigotos silvestres F1534/F1534 (fragmento en gel de agarosa de 93pb), y heterocigoto con la presencia de ambas bandas, además del marcador molecular de 25 pb (Figura 15).

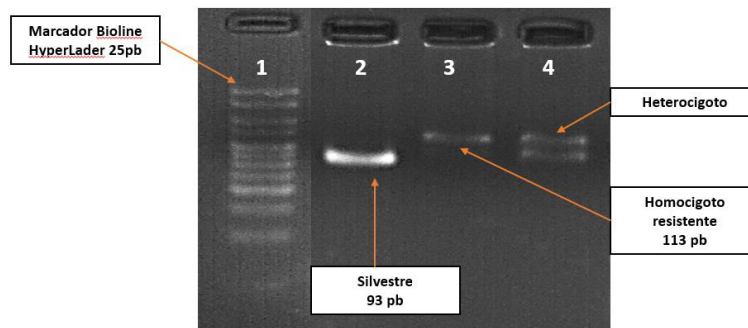


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 4% de los productos de PCR de la mutación F1534C (Marcador HyperLadder Bioline 25pb carril1, homocigoto silvestre carril 2, homocigoto resistente carril 3, heterocigoto carril 4).

De acuerdo con los resultados obtenidos, en todas las poblaciones de estudio se encontraron presentes ambas mutaciones, con valores fluctuantes de 0.68-0.87 para la mutación V1016I que al compararse con la mutación F1534C fueron menores ya que se presentaron valores de 0.92-1.00, con la única diferencia de la población de Madero la cual se mostró con mayor frecuencia en I1016 con un valor de 0.72 al compararlo con C1534 que obtuvo 0.48, a pesar de esto, se demuestra que la mutación F1534C es la dominante debido a su alta frecuencia en comparación con V1016I.

Tabla 8. Frecuencia alélica de V1016I en poblaciones de *Ae. aegypti*.

Poblaciones	n	AA	AG	GG	Frecuencia del alelo mutado	95% CI
Apodaca, NL	30	14	13	3	0.68	0.50-0.82
San Nicolás de Los Garza, NL	30	17	10	3	0.73	0.55-0.86
Madero, Tamps	30	15	13	2	0.72	0.54-0.85
Poza Rica, Ver	30	16	11	3	0.72	0.54-0.85
Coatzacoalcos, Ver	30	22	8	0	0.87	0.70-0.95
Minatitlán, Ver	30	18	12	0	0.80	0.62-0.91
Itzincab, Yuc	30	15	12	3	0.70	0.52-0.83

AA: homocigoto mutante AG: heterocigoto GG: wild type

Tabla 9. Frecuencia alélica de F1534C en poblaciones de *Ae. aegypti*.

Poblaciones	n	GG	GT	TT	Frecuencia del alelo mutado	95% CI
Apodaca, NL	30	30	0	0	1.00	0.86-1.02
San Nicolás de Los Garza, NL	30	30	0	0	1.00	0.86-1.02
Madero, Tamps	29	5	18	6	0.48	0.31-0.66
Poza Rica, Ver	30	25	5	0	0.92	0.75-0.98
Coatzacoalcos, Ver	29	29	0	0	1.00	0.86-1.02
Minatitlán, Ver	30	30	0	0	1.00	0.86-1.02
Itzincab, Yuc	27	23	4	0	0.93	0.75-0.99

GG: homocigoto mutante GT: heterocigoto TT: wild type

Al realizar el análisis de las co-ocurrencia de ambas mutaciones se detectó que la población de Madero, Tamaulipas fue la única que mostró individuos homocigotos silvestres, ya que el resto de las poblaciones analizadas mostraron individuos mutados para V1016 y C1534, con el mayor porcentaje la población de Coatzacoalcos con 21% seguido por las poblaciones de San Nicolás de los Garza y Apodaca, Nuevo León ambas con 18%.

Tabla 10. Co-ocurrencia de las mutaciones V1016I y F1534C en poblaciones de *Ae. aegypti*.

Poblaciones	GG/TT	GG/TG	GG/GG	GA/TT	GA/TG	GA/GG	AA/TT	AA/TG	AA/GG
Apodaca, NL	0	0	0	0	0	12(40%)	0	0	18(60%)
San Nicolás, NL	0	0	3(10%)	0	0	9(30%)	0	0	18(60%)
Madero, Tam	1(3.44%)	1(3.44%)	0	2(6.89%)	8(27.5%)	2(6.89%)	3(10%)	9(31.034%)	3(10%)
Poza Rica, Ver	0	0	3(10%)	0	0	11(37%)	0	5(16.6%)	11(36.6%)
Coatzacoalcos, Ver	0	0	0	0	0	8(28%)	0	0	21(72.4%)
Minatitlán, Ver	0	0	0	0	0	12(40%)	0	0	18(60%)
Itzincab, Yuc	0	0	2(7%)	0	4(14.81%)	7(26%)	0	0	14(51.85%)

GG/TT= homocigoto V1016 (wild type)/homocigoto F1534 (wild type)

GG/TG= homocigoto V1016 (wild type)/heterocigoto F1534-C1534

GG/GG= homocigoto V1016 (wild type)/homocigoto C1534 (mutante)

GA/TT= heterocigoto V1016-I1016/ homocigoto F1534 (wild type)

GA/TG= heterocigoto V1016-I1016/heterocigoto F1534-C1534

GA/GG= heterocigoto V1016-I1016/homocigoto C1534 (mutante)

AA/GG= homocigoto I1016 (mutante)/homocigoto C1534 (mutante)

AA/GT= homocigoto I1016 (mutante)/heterocigoto F1534-C1534

AA/TT= homocigoto I1016 (mutante)/ homocigoto F1534 (wild type)

Las frecuencias obtenidas de la mutación V1016I (Figura 16) y F1534C (Figura 17) se presentan a continuación, así mismo, la población que presentó la frecuencia más alta para ambas mutaciones correspondió a Coatzacoalcos con 0.87 para I1016 y 1.00 para C1534.

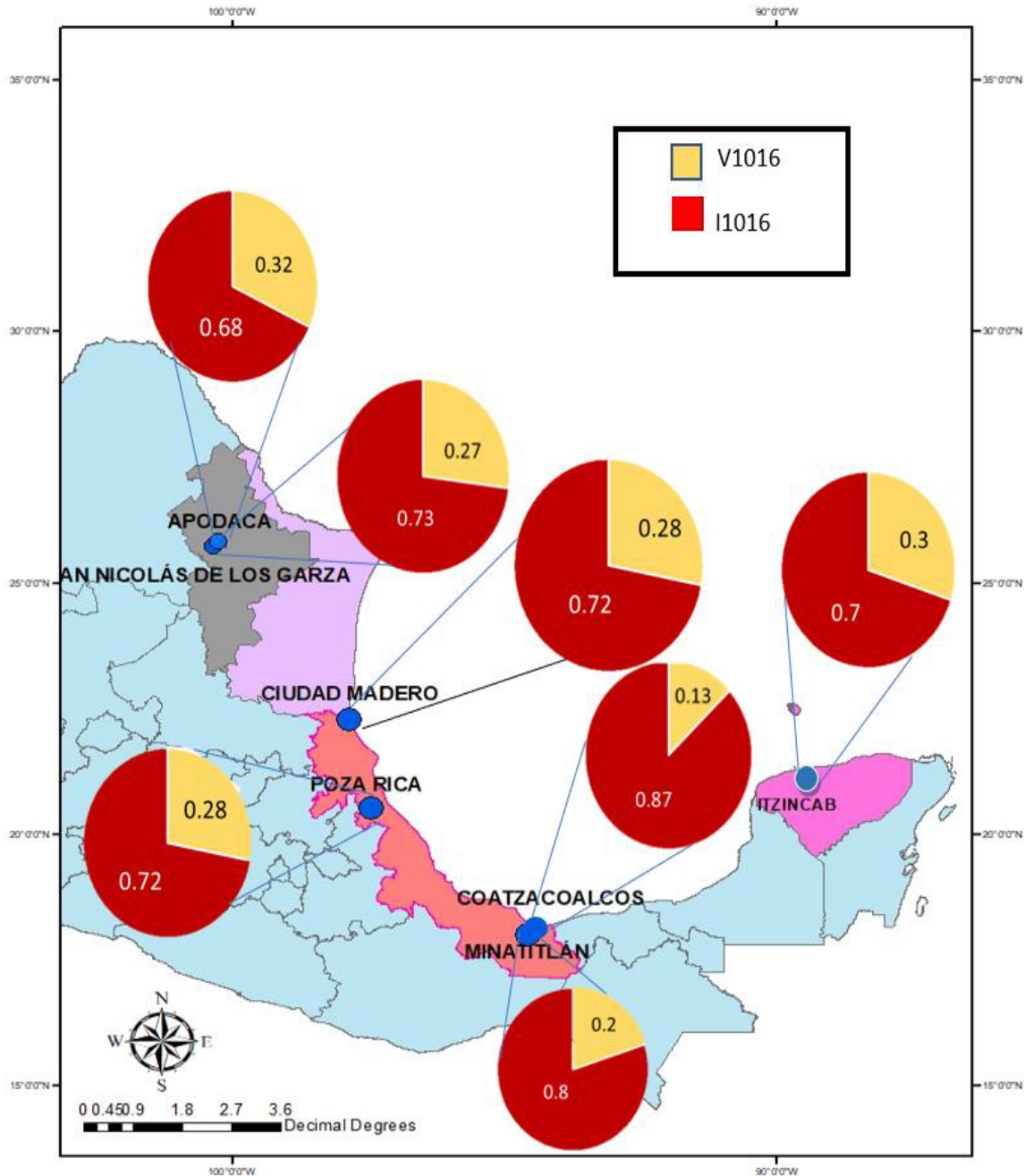


Figura 16. Mapa con distribución geográfica de la mutación V1016I en poblaciones de *Ae. aegypti* del Este de México.

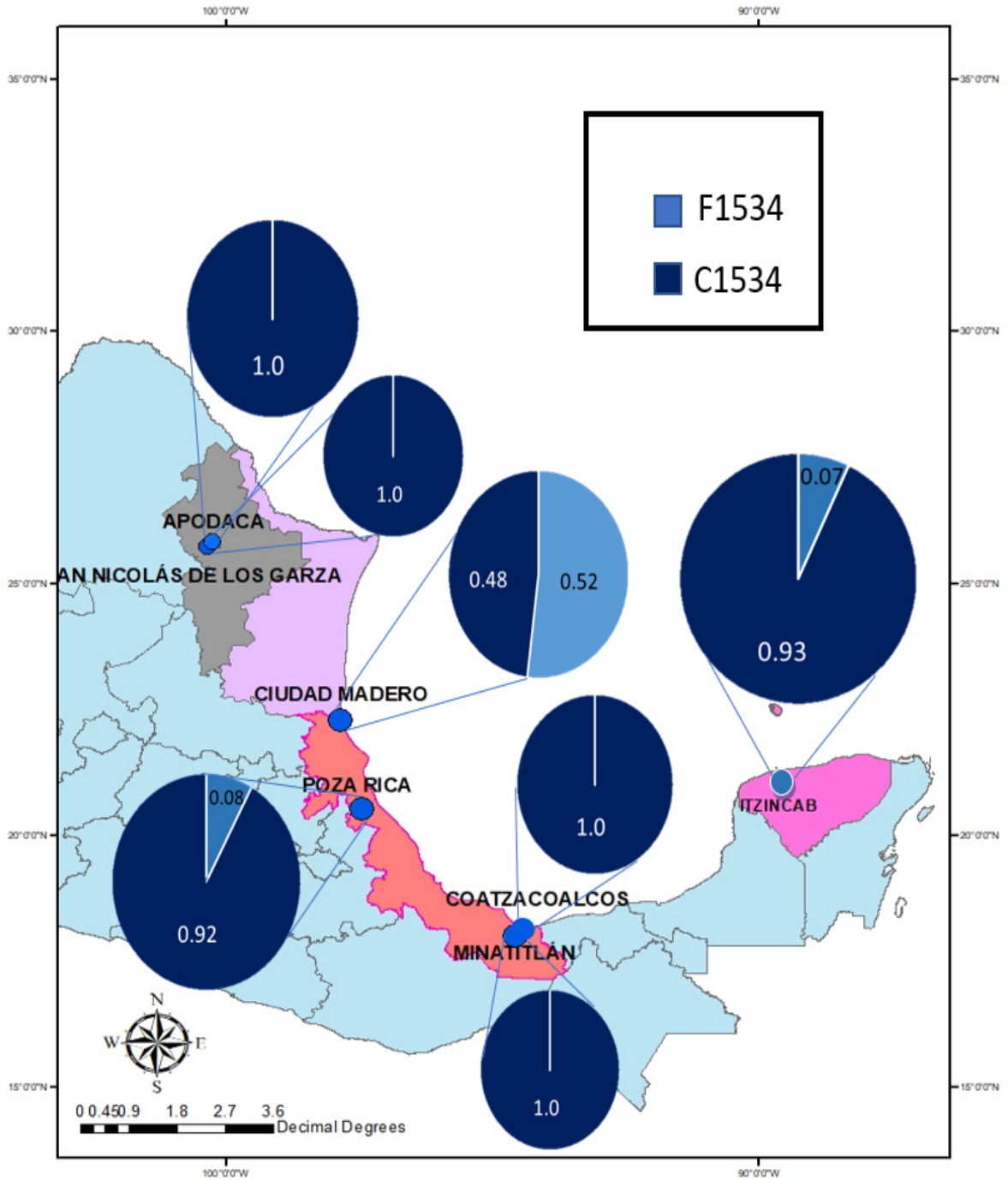


Figura 17. Mapa con distribución geográfica de la mutación F1534C en poblaciones de *Ae. aegypti* del Este de México.

### 7.5. Relación entre frecuencia de las mutaciones kdr y nivel de resistencia en poblaciones de *Ae. aegypti* de México.

De acuerdo con los análisis de correlación realizados entre las frecuencias de los genotipos homocigotos resistentes para cada una de las mutaciones y los resultados de intensidad de resistencia (Tablas 11 y 12) se encontró que existe una relación entre el genotipo homocigoto para I1016 y la intensidad de resistencia que presentaron las poblaciones al ser expuestas 10X la DD de d-(cis-trans)-fenotrina ( $R^2= 0.69$ ,  $p\leq 0.05$ ). Por otro lado, y al analizar la co-ocurrencia de homocigotos recesivos (fenotipo resistente) para ambas mutaciones kdr se encontró que existe una relación estadísticamente significativa entre la presencia de tales homocigotos y la intensidad de resistencia encontrada al exponer las poblaciones a 5X la DD de permetrina ( $R^2= 0.61$ ,  $p\leq 0.05$ ). Las figuras 17, 18 y 19 muestran los porcentajes de mortalidad obtenidos en los ensayos de intensidad de resistencia a permetrina, bifentrina d (cis-trans)-fenotrina y la frecuencia de los alelos mutados I1016 y C1534 en las poblaciones de *Ae. aegypti* del este de México.

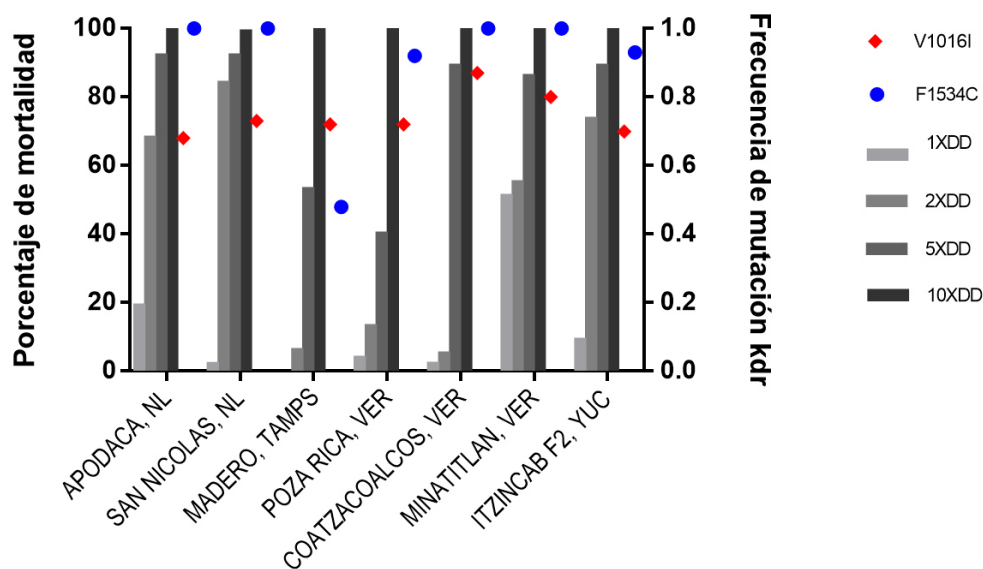


Figura 18. Relación de porcentaje de mortalidad ante frecuencia de mutaciones kdr en *Ae. aegypti* del Este de México para permetrina.

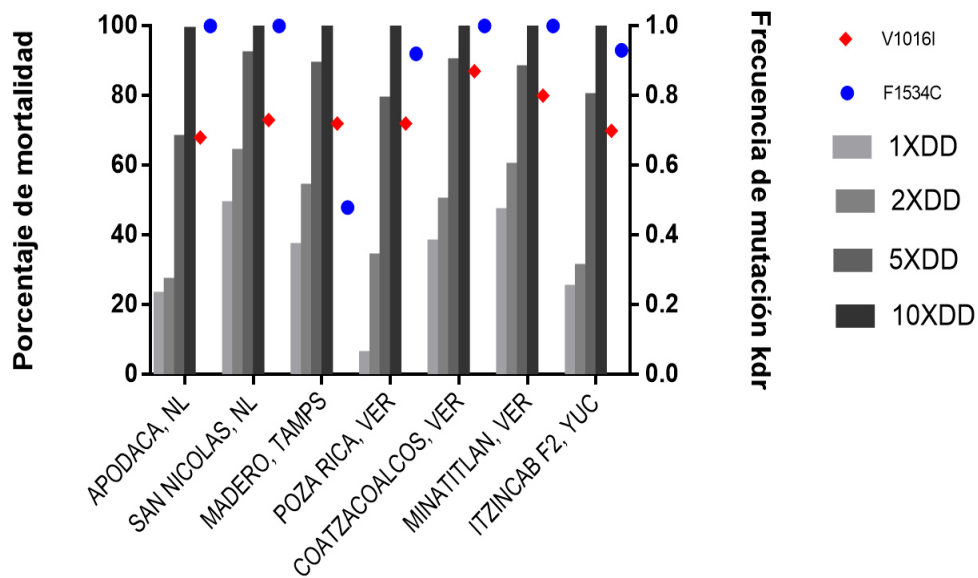


Figura 19. Relación de porcentaje de mortalidad ante frecuencia de mutaciones kdr en *Ae. aegypti* del Este de México para bifentrina.

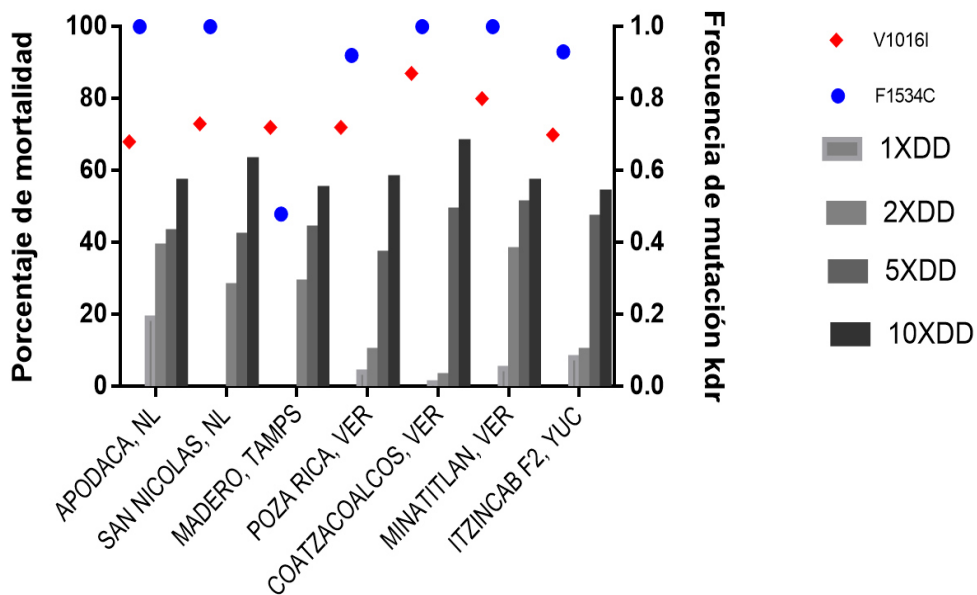


Figura 20. Relación de porcentaje de mortalidad ante frecuencia de mutaciones kdr en *Ae. aegypti* del Este de México para d-(cis-trans)-fenotrina.

Tabla 11. Coeficientes de determinación ( $R^2$ ) obtenidos a partir del análisis de correlación entre la frecuencia de I1016 y la intensidad de resistencia en *Ae. aegypti* del Este de México.

I1016				
Insecticida	1XDD	2XDD	5XDD	10XDD
<b>permetrina</b>	0.001 (p=0.9444)	0.1499 (p=0.3909)	0.0562 (p=0.6087)	0.0007 (p=0.9524)
<b>bifentrina</b>	0.1757 (p=0.3492)	0.2376 (p=0.2672)	0.3862 (p=0.1363)	0.2144 (p=0.2954)
<b>d-(cis-trans)-fenotrina</b>	0.2804 (p=0.2216)	0.3096 (p=0.1946)	0.2573 (p=0.2453)	0.6902 (p=0.0206)

Correlación estadísticamente significativa se muestra en gris  $p \leq 0.05$

Tabla 12. Coeficientes de determinación ( $R^2$ ) obtenidos a partir del análisis de correlación entre la frecuencia de C1534 y la intensidad de resistencia en *Ae. aegypti* del Este de México.

C1534				
Insecticida	1XDD	2XDD	5XDD	10XDD
<b>permetrina</b>	0.1488 (p=0.3927)	0.2901 (p=0.2123)	0.3933 (p=0.1317)	0.0620 (p=0.5902)
<b>bifentrina</b>	0.0019 (p=0.9263)	0.0117 (p=0.8174)	0.0459 (p=0.6445)	0.0620 (p=0.5902)
<b>d-(cis-trans)-fenotrina</b>	0.1304 (p=0.4262)	0.0005 (p=0.9610)	0.0264 (p=0.7275)	0.1731 (p=0.3533)

Tabla 13. Coeficientes de determinación ( $R^2$ ) obtenidos a partir del análisis de correlación entre la co-ocurrencia de las mutaciones V1016I y F1534C (genotipos resistentes) y la intensidad de resistencia en *Ae. aegypti* del Este de México.

I1016/C1534				
Insecticida	1XDD	2XDD	5XDD	10XDD
<b>permetrina</b>	0.1166 (p=0.4534)	0.1851 (p=0.3353)	0.6070 (p=0.0389)	0.0556 (p=0.6107)
<b>bifentrina</b>	0.0761 (p=0.5492)	0.0024 (p=0.9165)	0.0018 (p=0.9271)	0.0556 (p=0.6107)
<b>d-(cis-trans)-fenotrina</b>	0.0687 (p=0.5700)	0.0028 (p=0.9101)	0.1571 (p=0.3788)	0.3736 (p=0.1448)

Correlación estadísticamente significativa se muestra en gris  $p \leq 0.05$

## 8. DISCUSIONES

La unión de los piretroides al canal de sodio dependiente de voltaje en los insectos, interrumpen el potencial de acción en el axón, dando como resultado descargas repetitivas que pueden, dependiendo del tipo de piretroide, paralizar o derribar al insecto (Ponce-García, 2016), por lo que el organismo ha desarrollado distintas maneras de evitar ser afectado por estos insecticidas, modificando así, la estructura donde dichos xenobióticos se unen dando como resultado una reducción o nula unión del piretroide al canal de sodio (Narahashi 1988, 2000). A partir de que en el 2006 la mutación V1016I en el S6 dominio II (Saavedra et al. 2007) se descubrió y asoció con resistencia a piretroides en poblaciones de *Ae. aegypti* de México. Además, se ha reportado que la frecuencia de dicha mutación al igual que F1534C, descubierta en el 2010, igualmente en el S6, pero del dominio III (Vera-Maloof et al. 2015) han mostrado aumento de su frecuencia alélica por el paso de los años. En este trabajo las poblaciones de estudio fueron expuestas a dosis diagnóstico de tres piretroides Tipo I de distintas generaciones en un tiempo diagnóstico (30 min), clasificándose, con base en lo reportado por la OMS, como poblaciones resistentes para los tres piretroides fenotrina, permetrina y bifentrina. Los porcentajes de mortalidad resultantes fluctuaron en 0-51% para permetrina, 6-49% para bifentrina y 0-19% para fenotrina, siendo este el insecticida que presentó menores valores de mortalidad en todas las poblaciones, principalmente las de San Nicolás de los Garza, Nuevo León y Madero, Tamaulipas con valores de 0%.

Con respecto a la intensidad de resistencia en las poblaciones de *Ae. aegypti*, para permetrina los valores de mortalidad a 5x la dosis diagnóstico se mostraron entre 40-92%, para bifentrina entre 68-92% y fenotrina entre 37-51% , por lo que las poblaciones expuestas se clasifican con moderada intensidad de resistencia (MIR); destacando la población de Poza Rica, Veracruz con los valores más bajos de mortalidad arrojando 40% y 37% para permetrina y fenotrina respectivamente, mientras que para bifentrina, la población de Apodaca, Nuevo León obtuvo el menor porcentaje de mortalidad con 68%.

En cuanto a 10x la dosis diagnóstico de permetrina, todas las poblaciones se categorizaron como MIR, ya que en su mayoría presentaron ~100% de mortalidad. Para bifentrina, la población de Apodaca fue la única que presentó el valor de mortalidad de 99%, por otro lado, para fenotrina los valores se encontraron muy por debajo de lo observado en los xenobióticos anteriores, ya que se mostraron en un rango de 54%-68% de mortalidad, lo que coloca a este insecticida como la última opción para el control del vector.

De acuerdo con lo estipulado por CENAPRECE en su lista de productos recomendados para el combate de insectos vectores de enfermedades del 2018, tres de los insecticidas que se encuentran aprobados, se evaluaron en este estudio, sin embargo, de acuerdo con nuestro resultado tales insecticidas no se consideran aptos para utilizarse en los programas de control del vector en los sitios de estudio. Particularmente, fenotrina fue el xenobiótico ante el cual se presentaron los menores porcentajes de mortalidad, por lo que, se debe considerar que este grupo químico sea restringido en algunas áreas del país o se siga permitiendo su uso controlado.

Los resultados de las pruebas realizadas denotan la diferencia entre cada generación de insecticidas donde independientemente de que no posean el grupo ciano, la estabilidad de ambos insecticidas es crucial para alcanzar el objetivo de controlar al vector, sugiriendo así que bifentrina es un mejor insecticida para el control del mismo en las localidades donde fueron colectados los organismos de estudio, por otro lado, para el insecticida fenotrina que actualmente se está empleando, los resultados de mortalidad son mínimos en comparación con los demás insecticidas, además de lo anterior, de acuerdo con la OMS (2016) en su manual de procedimientos para el monitoreo de resistencia a insecticidas en vectores de malaria se menciona que dichos vectores han aumentado la resistencia a insecticidas, sobre todo los piretroides, por lo que se debe implementar un monitoreo intensivo de resistencia a insecticidas, especialmente en lo que respecta a la parte operativa e importancia epidemiológica de la resistencia donde se llegue a presentar.

Todas las poblaciones bajo estudio mostraron la presencia de las mutaciones V1016I y F1534C; las frecuencias de los alelos mutantes fluctuaron entre 0.68-0.87 y 0.40-1 respectivamente, nuestros resultados son coincidentes con lo que otros autores han publicado al mencionar que ambas mutaciones se encuentran en México y en frecuencias altas (Ponce et al., 2009; Siller et al., 2011; Aponte et al., 2013; Vera et al., 2015).

Particularmente Vera y colaboradores (2015) reportan que las poblaciones de *Ae. aegypti* de Poza Rica, Veracruz no mostraba la presencia de ambas mutaciones en el 2002, y no fue sino hasta el 2003 que exhibieron valores de 0.030 y 0.190 para V1016I y F1534C respectivamente, incrementándose a 0.670 y 0.760 en el 2008, en el 2012 de 0.800 y 0.960. Nuestro estudio muestra que para el año 2016 la frecuencia de ambas mutaciones bajó a 0.72 y 0.92 respectivamente, mostrando que en una diferencia de 4 años la frecuencia del alelo mutado descendió en 0.08 para Ile1016 y 0.04 para C1534. Para la población de Minatitlán, Veracruz Vera-Maloof et al (2015) reporta que en el 2002 las poblaciones mostraron frecuencia de 0.040 y 0.060 disminuyendo a 0.00 y 0.020 para el año siguiente; en nuestro trabajo, para el 2016 las frecuencias fluctuaron de 0.80 y 1.00 lo que indica un claro aumento en las frecuencias alélicas de las mutaciones, posiblemente por el uso continuo de insecticidas para contención de brotes o flujo genético por individuos resistentes. En el año 2002 y de acuerdo con datos publicados por Vera-Maloof y colaboradores (2015), las mutaciones V1016I y F1534C en Coatzacoalcos, Veracruz se encontraban presentes, sin embargo, la frecuencia del alelo mutado era de 0.02. Tales frecuencias se incrementaron para el 2012, habiéndose reportado 0.57 para el alelo mutado I1016 y 0.97 para el alelo C1534. En nuestro estudio se observa un incremento en las frecuencias de V1016I y F1534C con frecuencias del alelo mutado de 0.87 y 1 respectivamente. En Tamaulipas se mostró un valor de 0.72 para Ile1016 y 0.48 para Cys1534, lo que es considerado como un primer reporte de dichas mutaciones en esa localidad en particular, además de considerar los ya mencionados resultados como frecuencias altas.

Estas mutaciones no solo se han reportado para América Latina, si no, también en el Sureste de Asia donde la coexistencia de ambas mutaciones confiere resistencia a piretroides (Bregues et al, 2003; Yanola et al, 2010; Martins et al, 2009; Lima et al., 2011), sin embargo, en un estudio realizado por Kushwah (2015), se hace mención que F1534C provee protección hacia el insecticida de tipo 2 deltametrina pero no así, al tipo I permetrina, a diferencia de lo que se reporta por Harris (2010), que dice esta mutación si es de importancia en la resistencia a permetrina.

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de los análisis de correlación entre las frecuencias de las mutaciones kdr (V1016I y F1534C) y los resultados de intensidad de

resistencia, se demostró la relación que existe entre la presencia de los homocigotos para I1016 y la alta intensidad de resistencia encontrada después de la exposición de las poblaciones bajo estudio a 10X la DD de d(cis-trans)-fenotrina ( $R^2= 0.69$ ,  $p\leq 0.05$ ). Así mismo, y al analizar la co-ocurrencia de los homocigotos para ambos alelos mutados (I1016 y C1534) se encontró que existe una relación estadísticamente significativa entre la presencia de tales homocigotos y la moderada intensidad de resistencia encontrada al exponer las poblaciones bajo estudio a 5X la DD de permetrina ( $R^2= 0.61$ ,  $p\leq 0.05$ ). Lo anterior, confirma lo reportado por Vera-Maloof y colaboradores (2015) quienes a partir de su estudio sobre los alelos I1016 y C1534 en colectas de *Ae. aegypti* de México de los años 2000 a 2012 encontraron una asociación estadísticamente significativa entre las mutaciones V1016I and F1534C en poblaciones naturales. En dicho estudio se establece que la resistencia a piretroides en el gen *para* del canal de sodio dependiente de voltaje requiere de la evolución secuencial de las mutaciones ya mencionadas. Sus resultados indican que los haplotipos I1016/C1534 tienen una baja adecuación biológica incluso cuando los piretroides han sido aplicados, lo que hace poco probable que la mutación V1016I haya evolucionado independientemente, a diferencia de la mutación F1534C, que evolucionaría primero, aunque confiriendo un bajo nivel de resistencia.

## 9. CONCLUSIONES

Se determinó la frecuencia de resistencia a los piretroides d-(cis-trans)-fenotrina, permetrina y bifentrina en *Ae. aegypti* del Este de México encontrándose a las poblaciones bajo estudio como resistentes al exponerse a la DD de los insecticidas ya mencionados, lo anterior de acuerdo con el criterio propuesto por la Organización Mundial de la Salud (mortalidad  $\leq 98\%$ ).

En los ensayos de intensidad de resistencia se catalogó a las poblaciones bajo estudio con moderada intensidad de resistencia al exponerse hasta 10X la DD de permetrina y bifentrina, mientras que con alta intensidad de resistencia después de la exposición a 10X la DD de d-(cis-trans)-fenotrina.

Se encontró que todas las poblaciones del este de México bajo estudio poseen las mutaciones kdr V1016I y F1534C en altas frecuencias (0.68-0.87 y 0.40-1 respectivamente), existiendo además la co-ocurrencia de los genotipos homocigotos mutantes en las mismas. Tales frecuencias se relacionan con la alta intensidad de resistencia encontrada a los insecticidas permetrina y d-(cis-trans)-fenotrina confirmando la participación que tienen las mutaciones kdr en la resistencia a insecticidas piretroides.

## 10. LITERATURA CONSULTADA

- Aponte, H. A., Penilla, R. P., Dzul-Manzanilla, F., Che-Mendoza, A., López, A. D., Solís, F.,... & Rodríguez, A. D. (2013). The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107: 226-234.
- Bagi, J., Grisales, N., Corkill, R., Morgan, J. C., N'Falé, S., Brogdon, W. G., & Ranson, H. (2015). When a discriminating dose assay is not enough: measuring the intensity of insecticide resistance in malaria vectors. *Malaria journal*, 14(1), 210.
- Besnard, M., Lastere, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V. M., & Musso, D. 2014. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February (2014). *Euro Surveill*, 19: 1-4.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., & Myers, M. F.(2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496: 504-507.
- Bloomquist, J. R. (1996) Ion channels as targets for insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 41, 163 – 190.
- Brengues, C., Hawkes, N. J., Chandre, F., McCarroll, L., Duchon, S., Guillet, P., & Hemingway, J. (2003). Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and veterinary entomology*, 17: 87-94.

Brogdon GW and Janet McAllister. (1998). Insecticide Resistance and Vector Control. *Emerging Infectious Diseases*. 4:605-613.

Brogdon W., Chan A. (2010). Instrucciones para la Evaluación de la Resistencia a insecticidas en Vectores mediante el ensayo Biológico en botella del CDC, Centro para el control y Prevención de Enfermedades (Center of Disease Control and Prevention, CDC).

Cao-Lormeau, V. M., & Musso, D. (2014). Emerging arboviruses in the Pacific. *The Lancet*, 384: 1571-1572.

Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annual review of cell and developmental biology*, 16: 521-555.

CDC. (2010). Guideline for evaluating insecticide resistance in arthropod vectors using the CDC bottle bioassay. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA..

(CDC)/Center of Diseases Control. Geographic Distribution. Where has Chikungunya Virus Been Found (2015). Disponible en <http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>.

Chang, C., Shen, W. K., Wang, T. T., Lin, Y. H., Hsu, E. L., & Dai, S. M. (2009). A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown

resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 39: 272-278.

Chareonviriyaphap, T., A. Prabaripai, and M. J. Bangs. (2004). Excito-repellency of deltamethrin on the malaria vectors, *Anopheles minimus*, *Anopheles dirus*, *Anopheles swadiwongporni*, and *Anopheles maculatus*, in Thailand. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 20: 45-54.

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*. *Journal of molecular biology*, 158: 17-35.

Colvard, J. (1978). El comportamiento alimentario de los mosquitos. *Investigación y Ciencia. Edición en español Scientific American*, 23: 86-93.

Davidson, G. (1953). Experiments on the effect of residual insecticides in houses against *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Bull. Entomol. Res.* 44: 231-255.

Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R., & Williamson, M. S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB life*, 59(3), 151-162.

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

Eldridge, B. F. (2005). Mosquitoes, the culicidae. *Biology of disease vectors*, 95-112.

Fajardo-Dolci, G., Meljem-Moctezuma, J., Vicente-González, E., Venegas-Páez, F. V., Mazón-González, B., & Aguirre-Gas, H. G. (2012). El dengue en México Conocer para mejorar la calidad de la atención. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 50, 631-639.

Fernández, S. I. (1999). *Biología y control de Aedes aegypti*. Manual de operaciones. Editorial UANL. ISBN 968-7808-88-8. Monterrey, México.

Flores, A. E., Grajales, J. S., Salas, I. F., Garcia, G. P., Becerra, M. H. L., Lozano, S.,... & Beaty, B. (2006). Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22: 672-677.

Fukunaga, T. O. S. H. I. H. I. K. O., Rojanasuphot, S. U. N. T. H. A. R. E. E., Pisuthipornkul, S. O. M. B. O. O. N., Wungkorbkiat, S. O. M. K. I. A. T., & Thammanichanon, A. R. E. E. S. R. (1974). Seroepidemiologic study of arbovirus infections in the north-east and south of Thailand. *Biken journal*, 17: 169-182.

Gadelha, D. P., & Toda, A. T. (1985). Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. *Rev. bras. malariol. doenças trop*, 37: 29-36.

Guzmán, M. G., & Kourí, G. (2004). Dengue diagnosis, advances and challenges. *International journal of infectious diseases*, 8: 69-80.

Harris, A. F., Rajatileka, S., & Ranson, H. (2010). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 83: 277-284.

Hemingway, J. and Ranson, H. (2000) Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45, 371-392.

Hladish, T. J., Pearson, C. A., Chao, D. L., Rojas, D. P., Recchia, G. L., Gómez Dantés, H., ... & Longini, I. M. (2016). Projected Impact of Dengue Vaccination in Yucatán, Mexico. *PLOS Negl Trop Dis*, 10: e0004661.

Jirakanjanakit, N., Rongnoparut, P., Saengtharatip, S., Chareonviriyaphap, T., Duchon, S., Bellec, C., & Yoksan, S. (2007). Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003–2005. *Journal of Economic Entomology*, 100: 545-550.

Kindhauser, M. K. (2003). Dengue y fiebre hemorrágica dengue. *Defensa Global ante la amenaza de Enfermedades Infecciosas*, 140-3.

- Kushwah, R. B. S., Dykes, C. L., Kapoor, N., Adak, T., & Singh, O. P. (2015). Pyrethroid-resistance and presence of two knockdown resistance (kdr) mutations, F1534C and a novel mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis, 9: e3332.
- Liu, H., Cupp, E. W., Guo, A., & Liu, N. (2004). Insecticide resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus*. Journal of medical entomology, 41: 946-952.
- Lima EP, Paiva MHS, Araújo AP, Silva EVG, Silva UM, et al. (2011) Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceara', Brazil. Parasit Vectors, 4: 5
- Lockwood, J. A., T. C. Sparks, and R. N. Story. (1984). Evolution of insect resistance to insecticide: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. Bull. Entomol. Soc. Am. 30: 41-51.
- Lormeau, V. M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J.,... & Vial, A. L. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. The Lancet, 387: 1531-1539.
- Loughney, K., Kreber, R., & Ganetzky, B. (1989). Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. Cell, 58: 1143-1154.
- Martínez-Torres, E. (1995). Dengue y dengue hemorrágico: aspectos clínicos. Salud pública de México, 37.

Martínez Torres, E. (2008). Dengue. *Estudios avanzados*, 22: 33-52.

Martins AJ, Lima JB, Peixoto AA, Valle D (2009) Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Trop Med Int Health* 14: 1351–1355.

Mazine, C. A., Macoris, M. D. L. D. G., Andrighetti, M. T. M., Yasumaro, S., Silva, M. E., Nelson, M. J., & Winch, P. J. (1996). Disposable containers as larval habitats for *Aedes aegypti* in a city with regular refuse collection: a study in Marilia, Sao Paulo State, Brazil. *Acta tropica*, 62: 1-13.

Méndez, J., & Fernández, E. A. (1996). Taller sobre avances recientes en el control del *Aedes aegypti* basado en la comunidad: Honduras y México. Mérida, Yucatán, México, DF: Secretaría de Salud de México. 32-81.

Narahashi, T. (1988). Molecular and cellular approaches to neurotoxicology: Past, present and future, pp. 563–582. In G. G. Lunt (ed.), *Neurotox molecular basis of drug and pesticide action*. Elsevier; New York.

Narahashi, T. (1996). Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology & toxicology*, 79: 1-14.

Narahashi, T. (2000). Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: Past, present and future. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294: 1–26.

Narahashi, T. (2002). Nerve membrane ion channels as the target site of insecticides. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2: 419-432.

Nelson, M. J. (1986). *Aedes aegypti: biología y ecología*. Organización Panamericana de la Salud Washington, 1-50

Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastère S, Valour F, *et al* . Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome –case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* (2014);19:pii=20720. <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720>

OMS. Número de casos reportados de Dengue, Chikungunya y Zika en países o territorios de las Américas (2016), SE 22. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=readall&cid=3274&Itemid=40734&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=3274&Itemid=40734&lang=es)

OPS (1995). *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control*. Scientific Publication #584. (Publicado en 1995 con el título *Dengue y Dengue Hemorrágico en Las Américas: Guías para su Prevención y Control*).

Padbidri, V. S., & Gnaneswar, T. T. (1978). Epidemiological investigations of chikungunya epidemic at Barsi, Maharashtra state, India. *Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology*, 23:445-451.

Pan American Health Organization. (2016). Numer of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=270&gid=36294&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=36294&lang=es)

Ponce-García, G., Del Río-Galvan, S., Barrera, R., Saavedra-Rodriguez, K., Villanueva-Segura, K., Felix, G., ... & Flores, A. E. (2016). Knockdown Resistance Mutations in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) From Puerto Rico. *Journal of medical entomology*, 53(6), 1410-1414.

Powell, J. R., & Tabachnick, W. J. (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-A Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108:11-17.

Roberts, D. R., and R. G. Andre. (1994). Insecticide resistance issues in vector-borne disease control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50: 21Ð34.

Roberts, D. R., T. Chareonviriyaphap, H. H. Harlan, and P. Hshieh. (1997). Methods for testing and analyzing excito-repellency responses of malaria vectors to insecticides. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 13: 13Ð17

- Rutledge, L. C., N. M. Echana, and R. K. Gupta. (1999). Responses of male and female mosquitoes to repellents in the World Health Organization insecticide irritability test system. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15: 60-64.
- Saavedra-Rodriguez, K., Urdaneta-Marquez, L., Rajatileka, S., Moulton, M., Flores, A. E., Fernandez-Salas, I., ... & Ranson, H. (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.
- Sánchez-González, J. M., Ramos-Remus, C., Jácome-Sánchez, B., García-Ortiz, R., Flores-Ramos, J., & Hernández, F. S. (2016). Virus Zika en México. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 63: 4-12.
- Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IML, Horovitz DDG, Cavalcanti DP, Pessoa A, *et al.* Possible association between Zika virus infection and microcephaly – Brazil (2015). *Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65:59-62. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e2>
- Siller, Q., Ponce, G., Lozano, S., & Flores, A. E. (2011). Update on the frequency of Ile 1016 mutation in voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27(4), 357-362.
- Soderlund, D. M., & Bloomquist, J. R. (1990). Molecular mechanisms of insecticide resistance. In *Pesticide resistance in arthropods*. Springer US. 58-96.

Soderlund, D. M., & Knipple, D. C. (1999). Knockdown resistance to DDT and pyrethroids in the house fly (Diptera: Muscidae): from genetic trait to molecular mechanism. *Annals of the Entomological Society of America*, 92: 909-915.

Soderlund, D. M., & Knipple, D. C. (2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect biochemistry and molecular biology*, 33: 563-577.

Soderlund, D. M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of toxicology*, 86: 165-181.

Srisawat, R., Komalamisra, N., Eshita, Y., Zheng, M., Ono, K., Itoh, T. Q., ... & Rongsriyam, Y. (2010). Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Applied Entomology and Zoology*, 45: 275-282.

SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/información al 4 de junio del 2016/ Panorama epidemiológico de fiebre por Dengue y fiebre hemorrágica por Dengue. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE22.pdf>

SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/información al 4 de junio del 2016/ Panorama epidemiológico de virus Zika. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE22.pdf>

SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/información al 4 de junio del 2016/ Panorama epidemiológico de virus Chikungunya. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE22.pdf>

Thaikruea, L., Charoensook, O., Reanphumkamkit, S., Dissomboon, P., Phonjan, R., Ratchbud, S.,... & Buranapiyawong, D. (1997). Chikungunya in Thailand: a re-emerging disease. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 28: 359-364.

Thiri6n j. I. (2002). *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) como transmisor del dengue en M6xico. Tesis UNAM Facultad de Ciencias: 134.

Vera-Maloof, F. Z., Saavedra-Rodr6guez, K., Elizondo-Quiroga, A. E., Lozano-Fuentes, S., & Black IV, W. C. (2015). Coevolution of the Ile1, 016 and Cys1, 534 mutations in the voltage gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(12), e0004263.

World Health Organization (1957) Expert Committee on Insecticides. World Health Organization Technology Report Series 7th Report.

World Health Organization. (2016). Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes

Yaicharoen, R., Kiatfuengfoo, R., Chareonviriyaphap, T., & Rongnoparut, P. (2005). Characterization of deltamethrin resistance in field populations of *Aedes aegypti* in Thailand. *Journal of Vector Ecology*, 30: 144.

Yanola, J., Somboon, P., Walton, C., Nachaiwieng, W., Somwang, P., & Prapanthadara, L. A. (2011). High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Tropical Medicine & International Health*, 16: 501-509.

Zerva E. Insecticidal activity of pyrethroids in insect of medical importance. *Parasitol Today* (1988); 4:53-57.