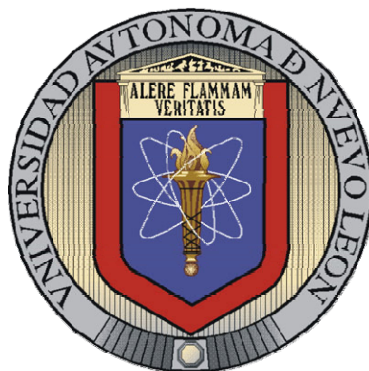


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**SUSCEPTIBILIDAD Y MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE  
RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN POBLACIONES DE *Aedes  
aegypti* (L), DE LOS ESTADOS DE NAYARIT, SINALOA Y  
VERACRUZ, MÉXICO.**

**Por**

**GILDA CAROLINA ALVAREZ CORONADO**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO  
EN CIENCIAS con Acentuación en Entomología Médica**

**Agosto , 2 0 0 8**

**SUSCEPTIBILIDAD Y MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE  
RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN POBLACIONES DE *Aedes*  
*aegypti* (L), DE LOS ESTADOS DE NAYARIT, SINALOA Y  
VERACRUZ, MÉXICO.**

**Comisión de Tesis**

---

**Dra. Adriana E. Flores Suárez**  
Director

---

**Dr. Gustavo Ponce García**  
Secretario

---

**Dr. Roberto Mercado Hernández**  
Vocal

**SUSCEPTIBILIDAD Y MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE  
RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN POBLACIONES DE *Aedes  
aegypti* (L), DE LOS ESTADOS DE NAYARIT, SINALOA Y  
VERACRUZ, MÉXICO.**

Comité Académico de Maestría

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**Dra. Diana Resendez Perez**

Subdirector de Estudios de Postgrado

Agradezco a CONACYT FOMIX Veracruz 68298,  
por el financiamiento otorgado para el desarrollo  
de una parte de esta investigación.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **Dra. Adriana E. Flores**

Agradezco la oportunidad de realizar este estudio. Su enseñanza, ejemplo, paciencia, apoyo, tiempo y confianza. Pero sobretodo su amistad.

### **Dr. Gustavo Ponce García**

Por su ayuda y asesoría en todo momento, su amistad y guía durante la realización de este trabajo.

### **Maestros**

Porque sin su enseñanza no habría logrado terminar este proyecto.

### **Papá y Mamá**

Gracias por enseñarme que la superación y la perseverancia me ayudarán a alcanzar el éxito, por su apoyo incondicional en todos los aspectos para poder cumplir con esta meta. Gracias por ayudarme con Leo.

### **Luis Rodolfo**

Por tu apoyo, y por alentarme a seguir en los tiempos adversos. Por el interés demostrado en mi trabajo.

### **A Leonardo**

Por tus sonrisas que me alegraban en los momentos mas difíciles.

### **A mis amigos**

Por echarme porras y decirme que todo saldría bien, que yo podía.

### **A mis compañeros**

Por su amistad, atinados consejos y su apoyo en el insectario y en el laboratorio.

## NOMENCLATURA

<b>AC</b>	acetilcolina
<b>ACE</b>	acetilcolinesterasa
<b>AchE</b>	acetilcolinesterasa
<b><math>\alpha</math></b>	alfa-esterasas
<b><math>\beta</math></b>	beta-esterasas
<b>BHC</b>	bifenil policlorinado
<b>C</b>	Cosoleacaque, Ver.
<b>CDC</b>	Center of Disease Control
<b>CENAVECE</b>	Centro Nacional de Vectores y Control de Enfermedades
<b>CUL</b>	Culiacán, Sin.
<b>COMP</b>	Compostela, Nay
<b>D</b>	Dobladero, Ver.
<b>DC</b>	dengue clásico
<b>DE</b>	desviación estándar
<b>DGE</b>	dengue
<b>DH</b>	dengue hemorrágico
<b>GABA</b>	ácido gama aminobutírico
<b>GST</b>	glutación s-transferasa
<b>I.A.</b>	ingrediente activo
<b>iAChE</b>	acetilcolinesterasa insensible

<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Investigación
<b>kdr</b>	knock down resistance
<b>K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de potasio
<b>M</b>	Minatitlán, Ver.
<b>Maz</b>	Mazatlán, Sin.
<b>MFO</b>	oxidasas de función múltiple
<b>ml</b>	mililitros
<b>MTZ</b>	Martinez de la Torre, Ver.
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>OP</b>	organofosforados
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PC</b>	Paseo del Cedro
<b>ppm</b>	partes por millón
<b>PS</b>	Palma Sola, Ver.
<b>RT</b>	Rodríguez Tejeda
<b>SA</b>	Sayula de Alemán, Ver.
<b>SSA</b>	Secretaría de Salud
<b>Tep</b>	Tepic, Nay.
<b>µl</b>	microlitros
$\bar{X}$	media
<b>Y</b>	Yaga, Ver.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	v
<b>NOMENCLATURA</b>	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xi
<b>LISTA DE TABLAS</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xv
<b>RESUMEN</b>	16
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	17
<b>2 HIPÓTESIS</b>	19
<b>3 OBJETIVOS</b>	20
3.1 Objetivo General	20
3.2 Objetivos Particulares	20
<b>4 ANTECEDENTES</b>	21
4.1 Clasificación de <i>Aedes aegypti</i> (L)	21
4.2 Ciclo de vida	22
4.2.1 Huevo	22
4.2.2 Larva	22
4.2.3 Pupa	24
4.2.4 Adulto	25
4.3 Distribución Geográfica.	26
4.4 ¿Por qué <i>Ae. aegypti</i> se reconoce como un vector eficiente?	27
4.4.1 Ciclo de transmisión de dengue	28
4.4.2 Descripción clínica de la enfermedad	31
	viii

4.5 Situación Epidemiológica de dengue en Nayarit, Sinaloa y Veracruz.	32
4.6 Resistencia	34
4.6.1 Resistencia en <i>Ae. aegypti</i>	36
4.7 Tipos de Resistencia	38
4.7.1 Resistencia por comportamiento.	38
4.7.2 Resistencia morfológica	38
4.7.3 Resistencia fisiológica	38
4.7.3.1 Mecanismos involucrados en la resistencia fisiológica	40
4.8 Métodos para detectar resistencia	41
4.9 Grupos toxicológicos de insecticidas	43
4.9.1 ORGANOCLORADOS	45
4.9.1.1 Subgrupos de los organoclorados.	46
4.9.1.2 DDT	46
4.9.1.3 Mecanismos de resistencia a DDT	46
4.9.1.4 Grupos del Benceno y Ciclodienos	48
4.9.2 ORGANOFOSFORADOS	48
4.9.2.1 Modo de acción	49
4.9.2.2 Mecanismos de resistencia	49
4.9.3 CARBAMATOS	50
4.9.3.1 Modo de acción	50
4.9.3.2 Mecanismos de resistencia	51
4.9.4 PIRETROIDES	52
4.9.4.1 Modo de acción	52
4.9.4.2 Mecanismos de resistencia	53
<b>5 MÉTODOS</b>	<b>54</b>
5.1 Área de Estudio	54
5.2 Obtención y manejo de material biológico	59
5.3 Dosis diagnóstico en mosquitos adultos	61
5.4 Bioensayos en mosquitos adultos	62

5.5 Pruebas bioquímicas en mosquitos adultos	63
5.6 Interpretación de resultados y análisis	65
5.7 Análisis de susceptibilidad en larvas	66
5.7.1 Línea de concentración-mortalidad larvaria	66
5.7.2 Bioensayos	67
<b>6 RESULTADOS</b>	<b>68</b>
6.1 Dosis diagnóstico	68
6.2 Umbral de tolerancia en cepa de referencia	69
6.3 Mecanismos asociados a la resistencia a permetrina	70
6.4 Actividad enzimática dentro de los grupos principales de enzimas detoxificativas	71
6.4.1 En mosquitos que sobrevivieron a la dosis diagnóstico	71
6.4.2 En mosquitos que no sobrevivieron a la dosis diagnóstico	74
6.4.3 En mosquitos que sobrevivieron y los que no sobrevivieron a la dosis diagnóstico	77
6.5 Susceptibilidad larvaria en diez poblaciones de Veracruz	84
6.5.1 temefos	85
6.5.2 malatión	87
6.5.3 permetrina	89
6.5.4 cipermetrina	91
6.5.5 bifetrina	92
<b>7 DISCUSIÓN</b>	<b>94</b>
<b>8 CONCLUSIONES</b>	<b>102</b>
<b>9 APÉNDICE</b>	<b>104</b>
<b>10 LITERATURA CITADA</b>	<b>111</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1 Mosquito adulto hembra <i>Aedes aegypti</i> (L)	21
2 Huevos de <i>Ae. aegypti</i>	22
3 Larva de <i>Ae. aegypti</i>	23
4 Pupa de <i>Ae. aegypti</i>	24
5 Adulto de <i>Ae. aegypti</i>	25
6 Distribución mundial de <i>Ae. aegypti</i>	26
7 Ciclo de transmisión del virus del dengue por <i>Ae. aegypti</i> al humano	29
8 Diagrama que muestra la primera parte del ciclo en la infección por dengue	29
9 Segunda etapa del ciclo de transmisión del dengue.	30
10 Estados de la República Mexicana que reportaron casos de dengue en el 2007	34
11 Localización geográfica de Nayarit indicando los sitios de colecta, Tepic y Compostela	56
12 El estado de Sinaloa con la ubicación de las localidades de colecta, Mazatlán y Culiacán.	57
13 Mapa correspondiente a las diez poblaciones del estado de Veracruz donde se realizaron las colectas	58
14 Sitio de ovitrampeo común en localidades de Veracruz	59
15 Charolas para el desarrollo de larvas y jaulas para la cría artificial de adultos de <i>Ae. aegypti</i>	61
16 Alimentación de hembras de <i>Ae. aegypti</i> con sangre humana	61
17 Jaula con el vaso para que las hembras depositen el huevo y el aspirador de mosquitos	62

<b>18</b>	Lector de placas Benchmark (biorad) y microplacas	<b>64</b>
<b>19</b>	Insecticidas utilizados para determinar susceptibilidad en larvas	<b>66</b>
<b>20</b>	Recipientes para el bioensayo en larvas	<b>67</b>
<b>21</b>	Curvas de tiempo mortalidad para el insecticida permetrina	<b>68</b>
<b>22</b>	Absorbancia (nm) promedio entre las cuatro poblaciones de mosquitos vivos y la cepa New Orleans para cada enzima	<b>73</b>
<b>23</b>	Absorbancia (nm) promedio entre las cuatro poblaciones de mosquitos muertos y la cepa New Orleans para cada enzima	<b>76</b>
<b>24</b>	Comparación del promedio de absorbancia para cada enzima en poblaciones de mosquitos vivos y muertos	<b>73</b>
<b>25</b>	Concentración de cada insecticida para determinar la línea de concentración-mortalidad de <i>Ae. aegypti</i> en diez poblaciones del Estado de Veracruz.	<b>84</b>
<b>26</b>	Respuesta larvaria de <i>Ae. aegypti</i> al insecticida temefos en diez poblaciones del Estado de Veracruz	<b>86</b>
<b>27</b>	Respuesta larvaria de <i>Ae. aegypti</i> a diferentes concentraciones de malatión en diez poblaciones del Estado de Veracruz	<b>88</b>
<b>28</b>	Respuesta larvaria de <i>Ae. aegypti</i> a diferentes concentraciones del insecticida permetrina en diez poblaciones del Estado de Veracruz	<b>90</b>
<b>29</b>	Respuesta larvaria de <i>Ae. aegypti</i> a diferentes concentraciones del insecticida cipermetrina en diez poblaciones del Estado de Veracruz	<b>92</b>
<b>30</b>	Respuesta larvaria de <i>Ae. aegypti</i> a diferentes concentraciones del insecticida bifentrina en diez poblaciones del Estado de Veracruz	<b>93</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>I</b>	Clasificación sistemática del mosquito <i>Aedes aegypti</i> (L)	<b>21</b>
<b>II</b>	Casos de dengue clásico (DC) y dengue hemorrágico (DH) por año, en los Estados de Nayarit y Sinaloa	<b>32</b>
<b>III</b>	Datos geográficos de las diez localidades del Estado de Veracruz	<b>58</b>
<b>IV</b>	Máximos valores de absorbancia obtenidos en nanómetros (nm), para cada enzima en la cepa de referencia New Orleans (NO)	<b>69</b>
<b>V</b>	Porcentaje de la población que sobrepasó el umbral de tolerancia en las cuatro poblaciones de adultos, en las categorías de vivos y muertos	<b>69</b>
<b>VI</b>	Media y desviación estándar de la cepa susceptible (NO) y las cuatro poblaciones de adultos vivos	<b>72</b>
<b>VII</b>	Media y desviación estándar de la cepa susceptible (NO) y las cuatro poblaciones de adultos muertos	<b>75</b>
<b>VIII</b>	Media y desviación estándar de $\alpha$ esterasa en mosquitos vivos y muertos	<b>77</b>
<b>IX</b>	Media y desviación estándar de $\beta$ esterasa en mosquitos vivos y muertos	<b>78</b>
<b>X</b>	Media y desviación estándar de MFO en mosquitos vivos y muertos	<b>79</b>
<b>XI</b>	Media y desviación estándar de GST en mosquitos vivos y muertos	<b>80</b>
<b>XII</b>	Media y desviación estándar de iAChE en mosquitos vivos y muertos	<b>81</b>
<b>XIII</b>	Rangos de concentración para determinar la línea de concentración-mortalidad en larvas de <i>Ae. aegypti</i> en diez localidades del Estado de Veracruz	<b>85</b>
<b>XIV</b>	Susceptibilidad larvaria de <i>Ae. aegypti</i> a diferentes concentraciones de temefos en diez poblaciones de Veracruz	<b>86</b>
<b>XV</b>	Susceptibilidad larvaria de <i>Ae. aegypti</i> a diferentes concentraciones de malatión en diez poblaciones de Veracruz	<b>88</b>

<b>XVI</b>	Susceptibilidad larvaria de <i>Ae. aegypti</i> a diferentes concentraciones de permetrina en diez poblaciones de Veracruz	<b>90</b>
<b>XVII</b>	Susceptibilidad larvaria de <i>Ae. aegypti</i> a diferentes concentraciones de cipermetrina en diez poblaciones de Veracruz	<b>91</b>
<b>XVIII</b>	Susceptibilidad larvaria de <i>Ae. aegypti</i> a diferentes concentraciones de bifentrina en diez poblaciones de Veracruz	<b>93</b>

## ABSTRACT

Since 1978 *Aedes aegypti* (L) is the main vector of dengue fever in Mexico. Due to the lack of a vaccine, the preventing program is focus on this mosquito. Mexico's Health Department (SSA) NOM-032-SSA2-2002, has used temephos 1% for more than 30 years and permethrin for more than eight years, even though the disease stills considered a threat. Potential insecticide-resistance mechanisms were studied with the use of biochemical assays in the head and thorax of *Ae. Aegypti*, collected from two populations from Sinaloa (Culiacán and Mazatlán) and Nayarit (Compostela and Tepic). The activities of  $\alpha$  and  $\beta$  esterases, mixed-function oxidases (MFO), glutathion-S-transferase (GST), acetylcholinesterase (AChE), and insensitive acetylcholinesterase (iAChE) were assayed in microplates. The New Orleans (NO) susceptible strain of *Ae. Aegypti* was used to establish a discriminating dose for permethrin and the threshold criteria for enzyme were the highest NO absorbance values. The susceptibility of larvae to common insecticides such as Organophosphates (temephos and malathion) and pyrethroids (cypermethrin, byphenthrin and permethrin), was studied in ten populations of the State of Veracruz. Significant difference ( $P < 0.05$ ) in the activity of  $\alpha$  and  $\beta$  esterases between dead and alive adult females of *Ae. aegypti* suggest potential insecticide-resistance mechanisms against permethrin, in the populations of Culiacán, Compostela, Mazatlán, and Tepic. Although MFO levels were elevated in the four populations, they did not reveal a clear pattern in relation to resistance. Mechanism involving iAChE and GST were not apparent. The maximum variation in the response of larvae populations based on  $LC_{50}$  and  $LC_{95}$  were observed on pyrethroids such cypermethrin, biphenethrin and permethrin. Even though a clear pattern of resistance to Organophosphates like temephos and malathion was not reveal, the results indicate a trend to develop larvae resistance to these ones.

## RESUMEN

*Aedes aegypti* (L), es el principal vector de Dengue en México desde su reintroducción en 1978. Debido a la ausencia de vacunas antivirales, la prevención de la enfermedad se basa en el control del vector. A pesar de que en México la Secretaría de Salud, según la Norma Oficial NOM-032-SSA2-2002 ha utilizado, temefos 1% por mas de 30 años y piretroides (permetrina) por mas de ocho años, el problema persiste pues continúan presentándose casos de dengue en nuestro país. Se comparó la susceptibilidad *Ae. aegypti* en base a  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  en diez poblaciones del Estado de Veracruz. En cuatro poblaciones de adultos (Culiacán, Mazatlán, Compostela y Tepic), se evaluaron 6 diferentes enzimas de resistencia: acetilcolinesterasa (AChE), acetilcolinesterasa insesible (iAChE),  $\beta$  y  $\alpha$  esterases, oxidasas de función múltiple (MFO) y glutatión S-transferasas (GST). Se obtuvo la Dosis Diagnóstico (DD) y se determinaron los mecanismos enzimáticos de resistencia a permetrina. La cepa susceptible New Orleans se utilizó, para establecer un umbral de tolerancia. Las poblaciones larvarias se analizaron para los insecticidas; temefos, malatión, bifentrina, cipermetrina y permetrina. La DD utilizada fue 172  $\mu\text{g/ml}$ . Se encontró que en las poblaciones de Culiacán, Mazatlán, Compostela y Tepic el mecanismo enzimático asociado a resistencia a permetrina fue  $\alpha$  esterases ya que se encontró diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre las poblaciones de mosquitos vivos y muertos. La máxima variación en la respuesta de las poblaciones larvarias en base a  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  se obtuvo para los insecticidas piretroides y dentro de estos para cipermetrina, seguido de bifentrina y permetrina. Aunque no podemos hablar de resistencia larvaria a los insecticidas organofosforados (temefos y malatión), los resultados obtenidos sugieren una tendencia hacia la resistencia.



## 1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 30 años, se han controlado gran cantidad de infecciones transmitidas por vectores, sin embargo, dentro de las enfermedades re-emergentes se encuentran algunas infecciones transmitidas por mosquitos, tal es el caso del dengue, siendo la especie responsable *Aedes aegypti* Linnaeus (1762). En nuestro país es el único vector reconocido de dicha enfermedad.

Varios factores han sido implicados como responsables del incremento en la transmisión del virus del dengue en las Américas. El fracaso en el control de las poblaciones de vectores, los cambios que ocurren en los ecosistemas por nuevos asentamientos humanos, la modificación en los ciclos biológicos de los patógenos, la introducción y diseminación de nuevas cepas del virus dentro de la región, además de la creación de condiciones ecológicas adecuadas que contribuyen a la coexistencia de múltiples serotipos del virus.

Los primeros casos de dengue que se reportaron en la república mexicana datan de 1984, en San Luis Potosí. Fue en el año de 1990 cuando se registraron casos de dengue en Nayarit y fue hasta 1995 que se reportaron casos de la enfermedad en Sinaloa. El dengue es considerado como la principal arbovirosis en el Estado de Veracruz, debido a la incidencia y prevalencia que año tras año se reportan de dicha infección. Dichos estados son considerados zonas de riesgo por la secretaría de salud (SSA).



Por lo anteriormente expuesto, el control de vectores es un elemento principal en todas las campañas del país, sin este componente, la reducción en el número de casos de dengue es imposible a corto plazo.

Uno de los principales problemas para la erradicación del mosquito vector del dengue basado en el uso de insecticidas, es la resistencia que las poblaciones pudieran desarrollar a los productos aplicados para su control. En México, la Secretaría de Salud, según la NOM-032-SSA2-2002 ha utilizado temefos 1% como larvicida por mas de 30 años y en los últimos ocho años permetrina para la fase adulta. Por otra parte, es importante considerar que el uso prolongado, intensivo, e irracional de insecticidas aumenta la posibilidad del desarrollo de poblaciones resistentes. Algunas de las razones por las cuáles las intervenciones basadas en el control químico han fallado pueden ser, una combinación de la baja cobertura de manejo debido a los costos, una inadecuada elección del insecticida o del método de aplicación, o la susceptibilidad en las poblaciones del vector.

Conocer la situación sobre la susceptibilidad larvaria a varios insecticidas, en el estado de Veracruz. Así como, el mecanismo bioquímico de detoxificación presente en los adultos de *Aedes aegypti* (L) en los estados de Nayarit y Sinaloa, Méx. Nos permitirá, incidir de una manera mas eficaz en la erradicación de la enfermedad.



## 2. HIPÓTESIS

Al ser la permetrina, el insecticida para mosquitos adultos de mayor uso en México para el control de *Ae. aegypti*, se espera que los mecanismos tales como; oxidasas de función múltiple (MFO),  $\alpha$  ,  $\beta$ -esterasas y glutatión s-transferasa (GST) estén presentes en las poblaciones de este vector, en las localidades de Compostela y Tepic en el Estado de Nayarit, y Mazatlán y Culiacán en Sinaloa, México.

La susceptibilidad larvaria de este vector en Veracruz, está en función de la historia en el uso de plaguicidas utilizados para su control



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Evaluar la susceptibilidad del mosquito vector adulto de dengue *Aedes aegypti* (L) al insecticida permetrina, en los estados de Nayarit y Sinaloa, Méx. en base a los mecanismos metabólicos asociados a la detoxificación de dicho compuesto. Y en etapa larvaria a insecticidas de uso común en 10 localidades de Veracruz.

#### 3.2 Objetivos Particulares

1.-Establecer la susceptibilidad en poblaciones adultas de *Aedes aegypti* (L) al insecticida permetrina en base a Dosis Diagnóstico, en Nayarit y Sinaloa.

2.-Determinar la susceptibilidad en poblaciones larvarias de *Ae. aegypti*, a los insecticidas temefos, malatión, cipermetrina, bifentrina y permetrina en 10 localidades de Estado de Veracruz.

3.- Indicar el nivel de resistencia en las poblaciones adultas en base a un umbral de tolerancia.

4.- Caracterizar los mecanismos enzimáticos asociados con la resistencia a permetrina, mediante la cuantificación de seis diferentes tipos de enzimas en las poblaciones de Nayarit y Sinaloa.

5.- Establecer la magnitud de resistencia en función de las enzimas caracterizadas.



## 4. ANTECEDENTES

Es fundamental conocer los principios de la ecología y biología de esta especie, para la aplicación de medidas de prevención y control. El termino binomía se utiliza para explicar las asociaciones que tiene la especie respecto a su etapa de vida, con el medio ambiente (figura 1).



**Figura 1** Mosquito adulto hembra de *Aedes aegypti* (L)

El orden Díptera es de los que contienen mayor número de especies. Dentro del suborden Nematocera se localiza la familia Culicidae, donde están todos los mosquitos, ver tabla I (Harwood, 1988).

### 4.1 Clasificación

**Tabla I**

Clasificación Sistemática del mosquito *Ae. aegypti*

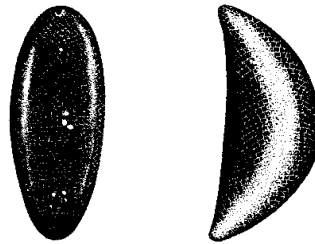
<b>Orden</b>	Díptera
<b>Suborden</b>	Nematocera
<b>Familia</b>	Culicidae
<b>Subfamilia</b>	Culicinae
<b>Tribus</b>	Culicini
<b>Género</b>	<i>Aedes</i>
<b>Subgénero</b>	Stegomyia
<b>Especie</b>	<i>aegypti</i>



## 4.2 Ciclo de vida

### 4.2.1 Huevo

La ovipostura se inicia cuando la hembra se posa sobre un criadero y uno a uno deposita los huevos (figura 2), en general se acepta un rango mínimo de 20 a un máximo de 120 huevos por ovipostura (Clements, 1992). En un lapso de 48 horas, éstos están listos para eclosionar o bien para permanecer viables hasta un período de hasta 2 años, en condiciones de deshidratación (Benenson, 1997). El mecanismo mas común para la eclosión es la disminución de oxígeno disuelto en el agua el cual se percibe por un sensor en la cabeza o tórax y que coincide con una máxima actividad del sistema nervioso central.



**Figura 2** Huevos de *Ae. aegypti*

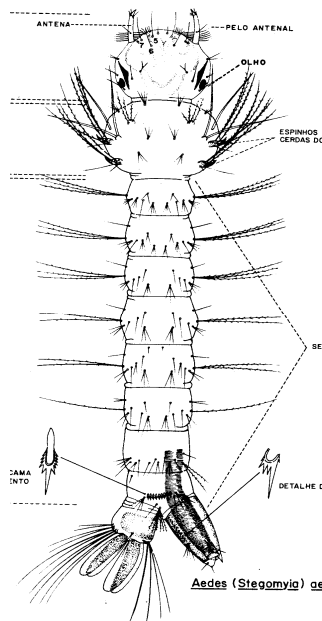
### 4.2.2. Larva

Puesto que la larva no tiene un esqueleto, la única forma de crecer es desechar la cubierta externa de todo su cuerpo. A la etapa entre muda y muda se le denomina instar (figura 3). La velocidad de crecimiento depende directamente de varios factores, entre los cuales se encuentra la temperatura del agua o la estación del año.



Por ejemplo, en temperaturas promedio de 25 °C, el último instar se alcanza en 72 hrs y en días mas frescos como en otoño e invierno, el desarrollo larval se retrasa y puede tardar hasta 15 días para llegar al adulto.

Las larvas dentro de un mismo criadero varían en instar, número y tamaño, esto es a causa de la calidad y cantidad de alimento disponible además del espacio, cabe mencionar que el tamaño de la hembra adulta esta relacionado con su vida larval y disponibilidad de alimento, entre mayor sea su talla puede ser potencialmente mejor transmisor del virus del dengue, pues en teoría ingerirá mas volumen de sangre al picar y su longevidad podrá ser mayor (Fernández Salas, 1999).

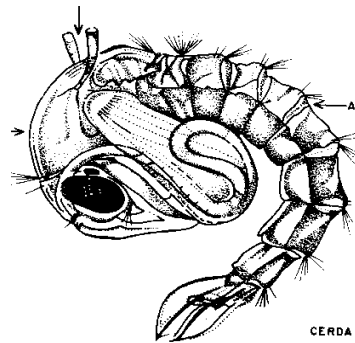


**Figura 3** Larva de *Ae. aegypti*



### **4.2.3 Pupa**

Después del cuarto instar la larva comienza a secretar una cubierta por todo su cuerpo quedando totalmente encerrada, a este último estadio del ciclo se le llama pupa (figura 4). La pupa tiene la característica de no alimentarse, solo flota y nada con sus aletas caudales. Dos trompetas respiratorias en su cabeza le permiten el intercambio gaseoso. Durante el estado pupal se llevan a cabo los cambios que le permitirán al mosquito invadir el ambiente aéreo; así como también cambiar su dieta de protozoarios a ingerir sangre rica en proteínas necesarias para formar sus huevos. Por un período de 24 a 48 horas, los tejidos del cuerpo larval desarrollan las alas en el tórax, tres pares de patas, un aparato bucal modificado para picar, ovarios, glándulas salivales y enzimas digestivas apropiadas para degradar la sangre.



**Figura 4** Pupa de *Ae. aegypti*



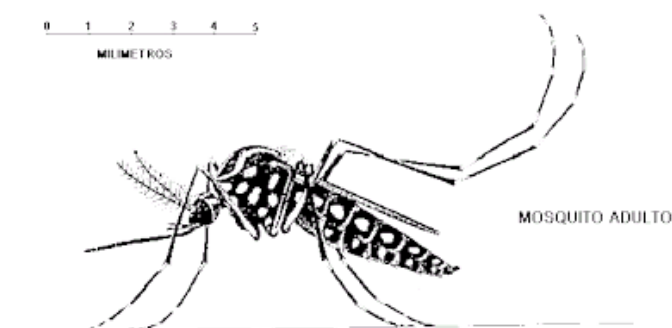
#### **4.2.4 Adulto**

Por lo general la emergencia del mosquito adulto es crepuscular; el mosquito emerge en cuestión de minutos por el cefalotórax y queda reposando sobre la película de agua (figura 5).

Su cuerpo está aún suave (estado teneral) y requiere aproximadamente 24 horas para su endurecimiento y poder volar; la proporción macho-hembra es de 1:1 (Fernández,1995).

El macho se diferencia de la hembra por sus antenas plumosas y requiere de un período de 24 horas después de la emergencia para el apareamiento (Beaty y Marquardt, 1996). La dieta del macho es de carbohidratos principalmente; por lo general el ciclo de vida del macho es de menor duración que el de la hembra.

La hembra para que produzca huevos debe alimentarse a repleción de sangre y por ser un especie sinantrópica se ha comprobado su alta hematofagia con un porcentaje mayor al 90%, completando su ciclo gonotrófico en 3 a 5 días dependiendo principalmente de la temperatura ambiente. Los insectos que presentan las cuatro fases de desarrollo durante su metamorfosis se denominan holometábolos (OMS 1992).



**Figura 5** Adulto de *Ae. aegypti*



### 4.3 Distribución geográfica

El origen de *Aedes aegypti* (L) probablemente fue el cinturón tropical de África, donde ocurren dos formas: una doméstica y una selvática (Harwood, 1988). En la región de las Américas solo se conoce la forma doméstica, y es el único vector transmisor del virus del dengue, aunque hay reportes de que la especie *Aedes albopictus*, ya ha invadido varios países entre ellos México; apenas recientemente se demostró su papel como vector (Méndez, 1992). La llegada de *Ae. aegypti* a las Américas probablemente fue en los barriles con agua en los barcos españoles durante el siglo XVI, también se le conoce como el “mosquito de la fiebre amarilla” por su papel como transmisor de esta devastadora arbovirosis durante muchos años.

Es una especie tropical y subtropical que se encuentra distribuida horizontalmente entre la franja geográfica del paralelo 35° al Norte y 35° al Sur (figura 6). Su ubicación vertical, usualmente se localiza a menos de 1,000 metros sobre el nivel del mar. Aunque se ha registrado por encima de esta elevación (OMS 1981).





**Figura 6** Distribución mundial de *Aedes aegypti* (L) Fuente OMS, 2007.

#### **4.4 ¿Por qué *Ae. aegypti* se reconoce como un vector eficiente?**

La hembra es hematófaga y presenta un fenómeno que se conoce como alimentación parcial múltiple, es decir que aún después de haber picado y haberse alimentado, lo intentara varias veces mas y que en términos de infección se traduce en mayor número de piquetes, al mismo o diferente huésped, es decir, casos de dengue potenciales. *Ae. aegypti* es una especie intra y peridomiciliar, se encuentra en zonas tanto urbanas como rurales. Dentro de las casas es común que la gente mantenga criaderos potenciales y que además tenga al alcance la sangre necesaria para vivir. Este fenómeno se conoce como eusinantropia, el cual es un nivel avanzado de dependencia por el hombre y su hábitat (Harwood, 1988).

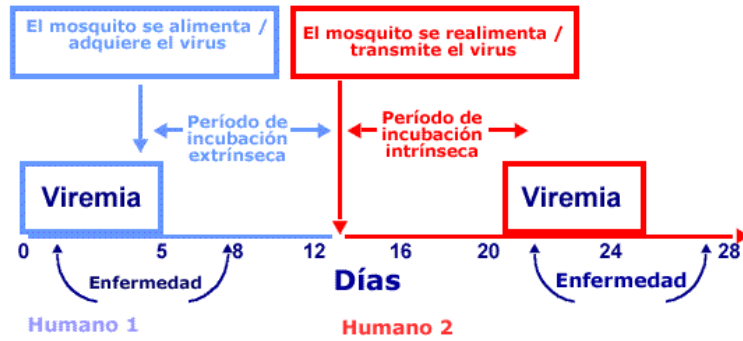


Tiene una característica morfológica denominada proboscis, la cual introduce directamente en los vasos sanguíneos lo que aumenta las probabilidades de infectar a través de la saliva característica conocida como solenofagia. Otro aspecto que hace que este mosquito sea muy buen vector es que durante el día presenta dos picos de picadura, se le considera bimodal, siendo el primero alrededor de las 7:00 a.m. y el segundo entre las 6 y 8:00 p.m.

#### **4.4.1 Ciclos de transmisión del dengue**

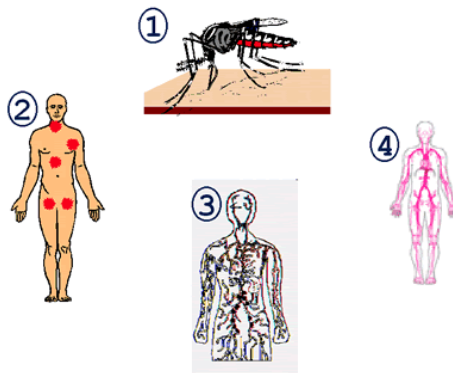
El ciclo de transmisión del virus del dengue (figura 7) comienza con una persona infectada, durante el período virémico, un mosquito *Aedes aegypti* (L) hembra pica a la persona e ingiere sangre que contiene el virus. El virus se replica durante un período de incubación extrínseco en el mosquito, el cual tiene de ocho a doce días de duración. El mosquito pica a una persona susceptible y le transmite el virus. El virus se replica en la segunda persona y produce síntomas que comienzan a aparecer en un promedio de cuatro a siete días después de la picadura del mosquito, éste es el período de incubación intrínseca, dentro de los seres humanos. Si bien el promedio de duración del período de incubación intrínseca es de cuatro a siete días, puede durar de tres a 14 días (Gluber, 1997).





**Figura 7** Ciclo de transmisión del virus de dengue, por *Ae. aegypti* al humano.

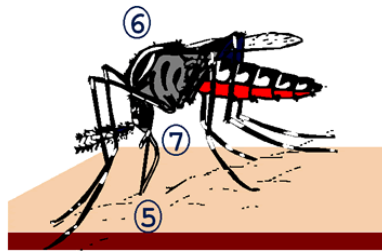
Dentro del ciclo de transmisión del dengue intervienen tanto el mosquito como el humano, los siguientes diagramas ilustran las partes participantes en dicha infección. La primer parte se da en el humano, la cual inicia con la picadura del mosquito infectado, la segunda parte se desarrolla en el mosquito infectado que al picar a otro ser humano le da continuidad al ciclo (figura 8)



**Figura 8** Primera parte del ciclo en la infección por dengue.



El virus se transmite al ser humano por medio de la saliva de un mosquito infectado (1) que al picar a una persona es transferido. Una vez dentro del cuerpo humano, el virus se ubica en diversos órganos por ejemplo, nódulos linfáticos e hígado y se replica (2). El virus se libera de estos tejidos y se difunde mediante la sangre para infectar los leucocitos y otros tejidos linfáticos (3) finalmente el virus se libera para circular en la sangre (4). La segunda parte del ciclo, que ocurre dentro del mosquito, sucede de la siguiente manera (figura 9)



**Figura 9** Segunda parte del ciclo de transmisión del dengue.

El mosquito ingiere sangre que contiene el virus, por la picadura a una persona infectada (5), el virus se replica en la zona embrionaria del tubo digestivo del mosquito, en los ovarios, el tejido nervioso y en el cuerpo graso, para después alojarse en la cavidad corporal y posteriormente infectar las glándulas salivales (6). El virus se replica en las glándulas salivales y cuando el mosquito pica a otro ser humano, el ciclo continúa (7).



#### 4.4.2 Descripción clínica de la enfermedad

El dengue es una enfermedad vírica febril y aguda, que se caracteriza por un comienzo repentino, fiebre que dura de tres a cuatro días, cefalea intensa, dolor retro-orbital (Chin, 2001). En cualquier momento durante la fase febril pueden aparecer fenómenos hemorrágicos de poca intensidad.

El Dengue Hemorrágico o Síndrome de Choque de Dengue, es una enfermedad vírica endémica grave, que se caracteriza por permeabilidad vascular anormal y anomalías en los mecanismos de coagulación sanguínea. Los virus del dengue son flavivirus e incluyen serotipos 1, 2, 3 y 4, los mismos que para dengue hemorrágico. Los cuatro serotipos son endémicos en África.

Desde 1977, en el Caribe, América Central y del Sur, se ha observado la circulación sucesiva de los cuatro serotipos. Desde finales de los años noventa, dos o más virus muestran periodicidad epidémica en México. Las epidemias pueden surgir en cualquier sitio en que exista el vector y se introduzca el virus, tanto en zonas urbanas como rurales. Los virus son perpetuados en ciclos que incluyen al ser humano y al mosquito, el modo de transmisión es por la picadura de moscos infectados. La hembra de *Ae. aegypti* es una especie hematófaga diurna, con mayor actividad de picadura dos horas después de la puesta del sol y varias horas antes del amanecer.



#### 4.5 Situación epidemiológica del dengue en Nayarit, Sinaloa y Veracruz.

De acuerdo a la Secretaría de Salud, México ocupa el cuarto lugar en la transmisión del dengue hemorrágico en América después de Brasil, Colombia, Venezuela y Honduras, que son los países mas afectados en los últimos años. Desde 1994 se han desarrollado brotes de dengue hemorrágico registrándose desde 30 hasta 2000 casos en el 2004, en diferentes estados del país. Actualmente la relación de casos de dengue hemorrágico es 1:4, a diferencia de hace 5 años que era 1:25. Solamente en el estado de Nayarit del 2002 al 2006 se registraron 2472 casos, de los cuales 2184 , es decir el 88.3% corresponden a dengue clásico y 11.7% (288 casos) a dengue hemorrágico, siendo el año 2002, considerado el mas problemático registrándose 1144 casos. En la tabla II podemos apreciar los datos proporcionados en los boletines epidemiológicos de morbilidad de la Secretaría de salud.

**Tabla II**

Casos de dengue por año en Nayarit y Sinaloa.

Estado	2004		2005		2006		2007	
	DC	DH	DC	DH	DC	DH	DC	DH
Nayarit	152	29	407	61	1063	60	2970	106
Sinaloa	123	21	617	20	874	4	1050	38

DC= dengue clásico, DH= dengue hemorrágico



El estado de Veracruz posee las condiciones ecológicas propicias para la transmisión de muchas enfermedades y de acuerdo con el número de notificaciones, es hasta la fecha una de las entidades considerada de alta endemicidad para dengue.

En Veracruz se mantiene la lucha permanente contra el mosquito transmisor de la enfermedad del dengue, implementándose sobre todo las medidas de prevención, encaminadas sobre todo a evitar que el vector se reproduzca, es decir controlando los posibles criaderos para evitar el inicio de su ciclo biológico y con ello su control. Siguiendo la estrategia de “Patio Limpio y Cuidado del Agua”, los Servicios de Salud de Veracruz están realizando una campaña permanente para involucrar a la población a que participe activamente en la eliminación de criaderos del mosquito. Para el estado de Veracruz, los casos reportados de dengue clásico en el 2005 fueron 11761, de los cuales 11128 fueron dengue clásico, la jurisdicción sanitaria que presenta el mayor número de casos fue Pánuco (33%), seguida por Tuxpan (14.1%), Coatzacoalcos (13.87%) y Veracruz (11%), sin embargo de los 633 casos de dengue hemorrágico, Coatzacoalcos presenta 235 (37%), Veracruz 150 (23.6 %) y Pánuco solamente 23 (0.04%), hasta la semana 33 (agosto) del 2006 se tenían registrados 3851 casos de dengue clásico y 361 de dengue hemorrágico, la jurisdicción sanitaria que presenta el mayor número de casos es Coatzacoalcos con 1213 (31.5 %) y Veracruz con 1111 (28.8 %), sin embargo Veracruz presenta el mayor número de casos de dengue hemorrágico 199 (55.12%), En cuanto a la Jurisdicción Sanitaria de Veracruz, los casos de dengue se sitúan en el Puerto de Veracruz, ya que para el 2005 representaban el 60.89% de casos de dengue clásico y el 61.33% de dengue hemorrágico (fuente: [www.cenave.gob.mx](http://www.cenave.gob.mx))



1. Baja California Sur
2. Campeche
3. Coahuila
4. Colima
5. Chiapas
6. Durango
7. Guerrero
8. Jalisco
9. Michoacán
10. Morelos
11. Nayarit
12. Nuevo León
13. Oaxaca
14. Puebla
15. Quintana Roo
16. Sinaloa
17. Sonora
18. Tabasco
19. Tamaulipas
20. Veracruz
21. Yucatán



**Figura 10** Estados de la República Mexicana que reportaron casos de dengue en el año 2007. Fuente: SSA/CENAVECE/DGE.

#### 4.6 Resistencia

En 1979 la FAO define la resistencia como la capacidad desarrollada por una población determinada de insectos, de no ser afectada por la aplicación de insecticidas. Técnicamente se define como la habilidad complementaria y hereditaria propia de un individuo o conjunto de ellos, que las capacita fisiológica y etológicamente, para bloquear la acción tóxica de un insecticida por medio de mecanismos metabólicos y no metabólicos y como consecuencia, sobrevivir a la exposición de dosis que para otros sería letal (Georghiou, 1991).



El primer dato formal sobre resistencia en insectos lo proporcionó Melander (1914), quién registró el fracaso del sulfuro de calcio al no controlar a *Aspidiotus perniciosus*. Para 1982 se tenían detectados 428 casos de resistencia de artrópodos que se consideran insectos nocivos a la agricultura o que están relacionados directa o indirectamente con el hombre (Georghiou, 1982). El DDT fue introducido para el control de mosquitos en 1946. En 1947 se registró el primer caso de resistencia a DDT en *Aedes taeniorhynchus* y *Ae. sollicitans* (Brown, 1987). Desde entonces, según la Organización mundial de la Salud (1992), más de 100 especies de mosquitos han sido reportadas como resistentes a uno o más insecticidas, y más del 50% son Anofelinos. El número de poblaciones de insectos vectores resistentes es dependiente del volumen y frecuencia de aplicación de insecticidas utilizados para su control, además de las características inherentes de las especies involucradas. La mosca tsé-tsé por ejemplo, fue controlada de manera exitosa con rociados de DDT por muchos años, sin embargo, nunca se desarrolló resistencia a este insecticida. Otro ejemplo de un insecto vector exhibiendo poca o nula resistencia a insecticidas es la chinche triatomina. En estos casos la explicación podría ser el ciclo de vida largo de las chinches y la producción de pocos juveniles de mosca tsé-tsé. En contraste, los mosquitos tienen todas las características requeridas para un rápido desarrollo de resistencia, incluyendo ciclos de vida corto y alta fecundidad (Hemingway, 2000).



#### 4.6.1 Resistencia en *Aedes aegypti*

En 1960, se reportaron los primeros casos de resistencia a insecticidas organofosforados y carbamatos en *Aedes aegypti* (L), (Rodríguez *et al.*, 1999). Mazzarri y Georghiou (1995), reportan que los principales insecticidas utilizados en Venezuela son los organofosfatos (OP), como el temefos para el control de larvas de mosquito y el malatión en rociados térmicos de ultra bajo volumen para el control de adultos.

Los piretroides han sido incorporados a dichos programas de control. Desafortunadamente, *Ae. aegypti* ha demostrado la habilidad para desarrollar resistencia a una amplia variedad de organoclorados, OP, carbamatos y piretroides. En Venezuela, este vector ha sido reportado resistente a insecticidas como el DDT, dieldrín/BHC, OP y carbamatos. Hemingway, también señala la resistencia a piretroides en *Ae. aegypti*, además de los organofosfatos y carbamatos.

Sin embargo, Rodríguez y colaboradores en el 2000, señalan que el amplio uso y distribución del malatión para el control de *Ae. aegypti* en América Latina ha generado resistencia en el control de *Culex quinquefasciatus* pero no en *Ae. aegypti*. Además realizaron un estudio para determinar los niveles de susceptibilidad y/o resistencia a insecticidas organofosforados y piretroides de una cepa de *Aedes aegypti*. Los resultados mostraron bajos niveles de resistencia a fentiión, malatión y deltametrina, niveles moderados para temefos, metil-pirimifos y cipermetrina y altos para clorpirifos.

En otra publicación de Rodríguez en el 2003, reporta que a pesar de que el malatión ha sido utilizado en la región del Caribe por mas de 25 años, solo moderados



niveles de resistencia han sido reportados a este insecticida en poblaciones de *Ae. aegypti*.

Una intensa campaña para el control de *Ae. aegypti* comenzó en Cuba en 1981 y malatión fue el insecticida utilizado como adulticida hasta 1986, en esta etapa *Ae. aegypti* fue exitosamente controlado, sin embargo, este fue reemplazado por piretroides en 1986 para control a otro vector *Culex quinquefasciatus*, que ocupaba los sitios de cría de *Ae. aegypti* en el ambiente urbano y que desarrollo resistencia a malatión. Esto no solo sucedió en Cuba, sino también en otros países de América Latina.

En cuanto al control del vector en su etapa larval el insecticida que mas efectividad ha probado contra *Ae. aegypti* es el temefos. Cinco formulaciones de temefos fueron biológicamente evaluadas para su efectividad residual contra *Ae. aegypti* en Savannah, Georgia, en 1965. Las dos preparaciones líquidas demostraron, mayor acción en contra de las formulaciones granulares. El líquido emulsificable combinado en un porcentaje de 45 partes de temefos con 45 partes de atolox-xileno produjeron una mortalidad total durante 19 semanas en dosis de 0.1, 1.25 y 1.0 ppm contra 3, 4 y 19 semanas en sus respectivas formulaciones. Los granos de arena fueron superiores bajo condiciones simuladas a las formulaciones con Celaton y bentoinita. A niveles de tratamiento de 0.1, 1.0 y 2.5 ppm, de temefos 1% sobre arena obtuvo 3, 14 y 19 semanas de mortalidad para las dosis respectivas. Por otra parte, celaton 2% y bentoinita 1% dieron mortalidades de 7, 13, 18 y 2, 17 y 19 semanas respectivamente ( Brookes *et al.*, 1966 ).



El efecto residual de los gránulos de arena de temefos 1% fue determinado usando muestras de agua obtenidas de tambos localizados en Chaguanas y D'Abaine, Trinidad.

Los bioensayos semanales contra las larvas de *Ae. aegypti* en los tratamientos de Chaguanas y de D'Abaidie mostraron una mortalidad sobre el 70% después de 4 y 6 semanas respectivamente (Chadee, 1984). Se demostró que la toxicidad de los piretroides en larvas de *Ae. aegypti* es de 1.33 a 3.63 veces mayor cuando están a 20 °C, que cuando se encuentran a 30 °C (Brusvine, 1980).

## **4.7 Tipos de Resistencia**

### **4.7.1 Resistencia por comportamiento**

Se refiere a patrones de comportamiento que contribuyen a la resistencia, estos pueden ser hábitos tales como la preferencia a descansar en áreas no tratadas con insecticidas en lugar de áreas tratadas o bien la detección de un insecticida y la tendencia de evitarlo antes de ponerse en contacto con el (Carrillo, 1984).

### **4.7.2 Resistencia morfológica**

Se presenta cuando alguna característica morfológica ocasiona la resistencia, por ejemplo, una menor área de exposición al tóxico (Lagunes Tejeda, 1999).



### 4.7.3 Resistencia fisiológica

Este es el tipo de resistencia mas importante, los insectos adquieren resistencia de dos formas. Por adición de un mecanismo de protección o bien por la insensibilidad en el sitio de acción. Los tipos de resistencia se reagrupan en mecanismos de resistencia metabólicos y no metabólicos.

Los primeros suceden cuando se involucran cambios enzimáticos y los segundos se refieren a cambios en sensibilidad del sitio activo, en la tasa de penetración, almacenamiento o excreción, así como en el comportamiento o la forma de los insectos. Dentro de la resistencia fisiológica se encuentran otros tipos de resistencia.

La resistencia cruzada, es el fenómeno por el cual los insectos sometidos a presión de selección con plaguicida adquieren resistencia a éste y a otros insecticidas relacionados toxicológicamente, que no han sido aplicados pero que presentan en su estructura al menos un sitio activo que puede ser afectado por un mecanismo de resistencia común (Georghiou, 1965).

La resistencia cruzada negativa, se presenta cuando una población que ha adquirido resistencia a un insecticida, regresa a una susceptibilidad cercana a la original, como consecuencia de la aplicación de otro insecticida que es toxicológicamente diferente (Lagunes, 1991).

La resistencia múltiple se determina cuando una población adquiere resistencia a varios insecticidas, tanto a aquellos que han sido aplicados, como a otros que no.



Esto como una consecuencia de la aplicación de insecticidas con moléculas en su estructura que pueden ser inhibidos por varios mecanismos de detoxificación, de esta manera la población posee varios mecanismos de resistencia de manera simultánea (Georghiou, 1963).

#### **4.7.3.1 Mecanismos metabólicos involucrados en la resistencia fisiológica.**

Las enzimas responsables para la detoxificación de xenobióticos en los organismos son transcritas por miembros de gran número de familias multigene de esterasas, oxidasas y glutatión transferasas (GST). Probablemente, el mecanismo de resistencia más común en insectos, son diferentes niveles o actividad de esterasas detoxificativas que metabolizan (hidrolizan enlaces éster) un amplio rango de insecticidas. Estas comprenden seis familias proteicas pertenecientes a la superfamilia de las alfa/beta hidrolasas (Cygler *et al.*, 1993). Las citocromo oxidasas P450 (también denominadas oxigenasas) metabolizan insecticidas a través de O-, S- e hidroxilación N-alquil, hidroxilaciones alifáticas y epoxidaciones, hidroxilaciones aromáticas, oxidación éster y oxidación nitrógeno y tio-éter (Wilkinson, 1976).

Las citocromo P450 pertenecen a una vasta superfamilia. De las 62 familias reconocidas de P450 en animales y plantas, al menos cuatro (familias 4,6,9,18) han sido aisladas de insectos.

Las insecto-oxidasas P450 responsables de resistencia pertenecen a la familia 6, la cuál, como las esterasas, están presentes en Díptera como un grupo de genes (Krogstad, 1996). Los miembros de este grupo se pueden expresar como alelos múltiples



(arriba de 5) (Tomita, *et al.* 1995). Los niveles de oxidasas en insectos resistentes resultan de una sobre-expresión constitutiva más que amplificación (Tomita *et al.*, 1995).

Los mecanismos de sobreproducción de oxidasas en resistencia están bajo investigación y parecen ser resultado de factores cis- y trans-, asociados al fenómeno de inducción (Cohen *et al.*, 1994).

La mayoría de los organismos poseen múltiples GST de dos o más clases (Hayes, 1995). Por ejemplo, las GST implicadas en la resistencia al DDT están presentes como grupos de genes que han sido mezclados a través del genoma por recombinación (Zhou, 1997). Se han caracterizado en vectores un número de genes resistentes, incluyendo múltiples formas en el mismo insecto.

#### **4.8 Métodos para detectar resistencia**

Convencionalmente se ha detectado la resistencia mediante pruebas de susceptibilidad a insecticidas, también llamados bioensayos (Roush, 1989).

Los bioensayos para la detección de resistencia en mosquitos esta basada en la recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1981). En la prueba original, los mosquitos susceptibles eran expuestos a una serie de papeletas impregnadas de dosis diferentes de insecticidas, por un tiempo definido y después los mosquitos eran mantenidos lejos del insecticida por 24 horas los datos eran sometidos a un análisis probit y se obtenía una gráfica de dosis-mortalidad, para un insecticida particular. La



prueba fue modificada y solo se manejan papeletas con una sola dosis, la cual fue la  $LC_{100}$ . (Brodgon, 1998a).

El método empleado por la OMS tenía sus fallas, el kit de dosis diagnóstico resultó caro, no se encontraban las papeletas de todos los insecticidas y las dosis diagnóstico no eran aplicables a todas las especies de vectores. Brodgon y MacAllister en 1998, describen una modificación realizada al método antes descrito por el uso de botellas wheeaton de vidrio de 250 ml, las cuales son impregnadas con diferentes dosis de insecticidas. Se ha utilizado esta técnica modificada para detectar resistencia en mosquitos y en otros dípteros.

Rodríguez y colaboradores en 1999, realizaron un estudio para determinar los niveles de susceptibilidad y/o resistencia a insecticidas organofosforados y piretroides de una cepa de *Ae. aegypti*. Los resultados mostraron bajos niveles de resistencia a fentiión, malatión y deltametrina, niveles moderados para temefos, metil-pirimifos y cipermetrina y altos para clorpirifos.

Si bien, la forma más exacta de detectar la resistencia es a través de bioensayos, un método indirecto como un análisis bioquímico es muy recomendable. Este es un método indirecto que correlaciona un alto nivel de una enzima o una reacción enzimática específica, con la resistencia comprobada de cierta colonia de insectos. Ya existen métodos específicos para diversas enzimas (Brodgon y McAllister, 1997)

Las técnicas de biología molecular proveen un acceso directo a los genes responsables de la resistencia, de tal modo que se puede dejar establecida su estructura y su organización (Lagunes-Villanueva, 1994).



## 4.9 Grupos toxicológicos de insecticidas

La resistencia se ha desarrollado a cada uno de los grupos toxicológicos de insecticidas, incluyendo microbiales y reguladores del desarrollo de los insectos. Una detallada descripción práctica de resistencia a insecticidas podría permitir que las estrategias de control sean ajustadas (Devonshire, 1990)

Se espera que la resistencia a insecticidas sea directamente afectada por la reemergencia de enfermedades infecciosas (Brogdon y McAllister, 1998b), y donde la resistencia no ha contribuido a la emergencia de enfermedades se espera que amenace el control de la enfermedad (OMS, 1992). Sin embargo, un cuidadoso análisis de la información reciente acerca de la resistencia de vectores (por ejemplo, la base de datos de la OMS y los registros de los programas de control de enfermedades) muestra que el efecto de la resistencia en los esfuerzos del control son aun desconocidos. Muchos reportes de resistencia de especies de vectores están basados en un punto geográfico de un País y por otra parte la información no es actualizada. La investigación en cada problema de resistencia y su aplicación en el control de vectores no es práctica. Las medidas de control han sido seleccionadas para usarse, con frecuencia en momentos de emergencia. Aunque las alternativas para el control de vectores con insecticidas están disponibles, los problemas de resistencia a drogas (por eje. Malaria) o bien la disponibilidad o el costo de una vacuna (por eje. Encefalitis japonesa) hacen del control de vectores una opción importante (Krogstad, 1996). La reducción en la disponibilidad



de insecticidas como resultado de resistencia se agrava por la eliminación del mercado de insecticidas no registrados para su uso en salud pública.

Especialmente en la época pasada, el costo de mantener ciertos compuestos en el mercado fue más alto que el recuperado por su uso. A esto hay que agregar que, el uso de insecticidas es también monitoreado y restringido por agencias reguladoras (Flores *et al.*, 2006). Los insecticidas juegan un papel central en el control de vectores de enfermedades tales como mosquitos, moscas, pulgas, piojos, chinches, etc.

En 1955 la OMS propuso la erradicación global de una de las enfermedades más prevalentes transmitidas por vectores, la malaria, con el uso de rociados residuales intradomiciliares de DDT.

Sin embargo la euforia por los insecticidas terminó pronto y en 1976 la OMS cambió su concepto de erradicación a control de la malaria. Los cambios en la política se debieron a la aparición de la resistencia al DDT en un gran número de mosquitos vectores. En 1975 la OMS reportó que una población de 256 millones de personas vivían en áreas donde la resistencia a DDT y/o los BHC (Bifenil Poli Clorinados) mermaron los esfuerzos para el control de la malaria. (Esto no incluyó a la región de África, en donde ocurren el 90% de los casos de Malaria y donde ya se había registrado resistencia de *Anopheles gambiae* al DDT, el principal vector de malaria.)

Los problemas de resistencia continuaron con la rotación a nuevos insecticidas, tales como los organofosforados, carbamatos y piretroides (Casida y Quistad, 1998). Operacionalmente, muchos programas de control han cambiado de rociado residual dentro de las casas al uso focal de pabellones impregnados. Esta medida está limitada para los piretroides debido a su velocidad de matar y seguridad para la gente.



En la actualidad la investigación se ha enfatizado en los mecanismos moleculares de la resistencia y su manejo racional, con la visión de controlar el desarrollo y la diseminación de poblaciones de vectores resistentes (Hemingway y Ranson, 2000).

#### **4.9.1 ORGANOCLORADOS**

Este grupo se caracteriza por la presencia de átomos de carbono, hidrógeno, cloro y ocasionalmente oxígeno, en su molécula. Contienen anillos cíclicos o heterocíclicos de carbono. Son apolares y lipofílicos, además muestran poca reactividad química.

Los compuestos organoclorados son altamente estables, característica que los hace valiosos por su acción residual contra insectos y a la vez peligrosos debido a su prolongado almacenamiento en la grasa de mamíferos. Dentro de este grupo se encuentran compuestos tan importantes como el DDT, BHC, clordano y dieldrín. Tienen un amplio espectro de acción y bajo costo, han sido muy usados para controlar plagas agrícolas y de importancia médica. Poseen baja toxicidad para mamíferos, sin embargo, sus residuos son de gran persistencia en el ambiente y presentan un alto grado de lipofilidad por lo cual se acumulan en los tejidos (Lagunes-Tejeda, 1994).



#### **4.9.1.1 Subgrupos dentro de los Organoclorados**

#### **4.9.1.2 DDT**

El DDT ejerce su acción neurotóxica modificando la función normal de los canales de sodio de la membrana neuronal, los cuales son altamente sensitivos a cambios en el voltaje, que alteran la transmisión del impulso nervioso (Hassall, 1969). En las membranas neuronales existe un equilibrio de los iones de sodio y potasio que sirven para transmitir el impulso nervioso.

El DDT como los piretroides, prolongan selectivamente la conductancia del sodio en tránsito, ocasionada por la activación de los canales de sodio dependientes del voltaje (Souderlund *et al.*, 1983), es decir hay un cambio en la permeabilidad de la membrana nerviosa a lo iones de sodio y potasio lo que trae consigo una disfunción con descargas repetitivas en la transmisión de los mensajes neuronales. El DDT afecta otras funciones ligadas a la membrana tales como la fosforilación oxidativa en las mitocondrias y la reacción de Hill en los cloroplastos.

#### **4.9.1.3 Mecanismos de resistencia al DDT**

Los mecanismos de resistencia a insecticidas tienen una base bioquímica. Las dos principales formas de resistencia bioquímica son: resistencia en el sitio blanco, la cual ocurre cuando el insecticida no se enlaza al sitio de acción.



Las enzimas detoxificativas, las cuales por sus niveles elevados o modificados previenen que el insecticida alcance su sitio de acción (esterasas, oxidasas o glutatión-transferasas –GST-) Un mecanismo adicional está basado en la respuesta térmica al estrés, pero aún no se ha determinado su importancia (Patil *et al.*, 1996).

Son las enzimas DDT-asa y las Oxidasas de Función Múltiple los principales mecanismos metabólicos de resistencia. Comúnmente se observa un aumento en la capacidad de detoxificación mediado por mono-oxigenasas, dependientes del citocromo microsomal P450 “monoxigenasas P450” u oxidasas de función múltiple (MFO). El citocromo microsomal P450 esta presente en casi todos los organismos aeróbicos, tal es el caso de hongos, plantas, insectos, aves y mamíferos.

Es un sistema metabólico de gran importancia, ya que destoxifica sustancias xenobióticas (agentes extraños al cuerpo) tales como drogas, plaguicidas y toxinas de plantas; además interviene en la regulación de compuestos endógenos, como sería el caso de las hormonas, ácidos grasos y esteroides (Scott *et al.*, 1993).

Otro mecanismo de resistencia no metabólico es el llamado *kdr* (knock-down resístanse o resistencia al derribo). El *kdr* esta relacionado con alteraciones en las propiedades de los canales de sodio, esto se ha interpretado como una reducción en el número y la densidad de sitios activos en la membrana neuronal. Se ha demostrado que la resistencia al derribo esta relacionado con modificaciones selectivas de sólo algunas propiedades del reconocimiento de las neurotoxinas en los canales de sodio. También se puede relacionar con cambios en la composición de los lípidos en la membrana nerviosa tipo *kdr* (Soderlund *et al.*, 1989).



#### **4.9.1.4 Grupos del Benceno y Ciclodienos**

Recientemente varios estudios realizados mediante preparaciones subcelulares de tejidos nerviosos de insectos y mamíferos, han proporcionado evidencia de que los derivados del benceno, ciclodienos y avermectinas ejercen su efecto neurotóxico mediante el bloqueo del flujo clorinado GABA- dependiente en el complejo acarreador de iones del receptor clorinado de GABA. El ácido gamma aminobutírico (GABA ) es el encargado de realizar la transmisión nerviosa entre la célula nerviosa activadora y los músculos receptores de la orden de contracción, es decir, el bloqueo sucede a nivel neuromuscular (Wilkinson, 1983).

#### **4.9.2 ORGANOFOSFORADOS**

El desarrollo de estos insectos data de la Segunda Guerra Mundial, cuando los técnicos alemanes encargados del estudio de materiales que podrían ser empleados en la guerra química descubrieron y sintetizaron una gran cantidad de compuestos orgánicos del fósforo. Tienen dos características básicas: Son mas tóxicos para vertebrados que los compuestos organoclorados. No son persistentes en el medio, principal causa que motivó la sustitución en el uso de los Organoclorados por los Organofosforados. Entre los organofosforados existe un intervalo muy amplio de toxicidad, lo cual se puede apreciar en la amplia gama de usos de este grupo de insecticidas (Bisset *et al.*, 1999).



#### **4.9.2.1 Modo de acción de los organofosforados**

La toxicidad de los Organofosforados en insectos y mamíferos, está asociada con la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (ACE). Esta esterasa cataliza la hidrólisis de la acetilcolina (AC, transmisor químico sináptico) a colina y ácido acético, a gran velocidad. Existen varios transmisores químicos, pero en el caso de insectos se trata de la acetilcolina. Tan pronto como la acetilcolina ejerce su efecto en la membrana postsináptica, debe ser destruida por la acetilcolinesterasa (ACE) formándose como residuos colina y ácido acético. Esta degradación es de crítica importancia ya que si la AC no fuera destruida, produciría una actividad continua entre las neuronas, con pérdida de coordinación nerviosa (Devonshire *et al.*, 1984b).

#### **4.9.2.2 Mecanismos de resistencia a organofosforados**

Los organofosforados, por ser ésteres, pueden ser metabolizados por sus esterasas respectivas. Esta acción metabólica constituye el principal mecanismo de resistencia de los insectos a los organofosforados, de modo que al ser aplicado un insecticida de este tipo, se eliminan los individuos de la población que presenten pocas esterasas, es decir, se seleccionan a los que tienen mayor cantidad de dichas enzimas.

Los organofosforados también pueden ser afectados por oxidasas, este tipo de reacción ocurre con más frecuencia que la producida por esterasas.



### **4.9.3 CARBAMATOS**

En los años 60 apareció un tercer grupo de insecticidas conocidos como carbamatos. Éstos presentan una persistencia y toxicidad intermedia entre los organoclorados y los organofosforados, tienen varios usos principalmente como insecticidas, herbicidas y funguicidas (Chandre *et al.*, 1997).

#### **4.9.3.1 Modo de acción de carbamatos**

Los carbamatos son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (ACE), se comportan de manera semejante a los insecticidas organofosforados cuando actúan en sistemas biológicos (Fukuto, 1974).

Si se toma en cuenta la toxicidad aguda de los carbamatos, por lo general resultan ser más tóxicos que los organofosforados. Sin embargo, los organofosforados son más peligrosos porque la inhibición de la enzima es más larga. En cambio cuando la ACE es inhibida por la acción de un carbamato se recupera espontáneamente, debido a que existe una correlación positiva entre la toxicidad de los carbamatos y la semejanza que presentan con la AC. Es decir, entre más parecido existe entre el carbamato y la AC, se espera mayor toxicidad; pero en los carbamatos el proceso es aparentemente reversible (Devonshire *et al.*, 1984a).



#### 4.9.3.2 Mecanismos de resistencia a carbamatos

El principal mecanismo de resistencia metabólica a carbamatos, son las oxidasas de función múltiple (FOM). De los no metabólicos se presenta la ACE insensitiva, una penetración reducida y una mayor excreción.

La alteración de aminoácidos responsables para el anclaje del insecticida en un sitio específico ocasiona que éste sea menos efectivo o aún que no funcione. Por ejemplo, el blanco para los organofosforados y carbamatos es en sinapsis nerviosas colinérgicas, y el blanco para el DDT y piretroides sintéticos son los canales de sodio a nivel axónico. La resistencia cruzada entre DDT y piretroides puede producirse por un simple cambio en algún aminoácido (uno o ambos de los dos sitios conocidos) en el sitio de anclaje del insecticida en el canal sodio del axón (Miyazaki *et al.*, 1996).

Esta resistencia cruzada parece producir un cambio en la curva de activación del transporte de sodio lo que ocasiona una baja sensibilidad a piretroides (Vais *et al.*, 1997). De manera similar, la resistencia a ciclodienos (dieldrin) es conferida por cambios en un simple nucleótido en el mismo codon del gen para receptores de ac. Gama-aminobutírico (GABA) (French *et al.*, 1993). Se han identificado al menos cinco sitios mutados en el sitio de acción de la acetil-colinesterasa. Además se sabe que estos ocasionan una gradación en la sensibilidad a organofosforados y carbamatos (Sawicki, 1987).



#### 4.9.4 PIRETROIDES

A partir de los años 80, el grupo de los piretroides ha recibido mucha atención debido a su baja toxicidad para mamíferos, casi nula acumulación en el medio ambiente y gran utilidad como alternativa en el combate de plagas agrícolas. Desafortunadamente a pesar de que solo se ha autorizado un número reducido de piretroides, ya se han registrados casos de resistencia en campo y laboratorio. El piretro es un insecticida de contacto obtenido de las flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Compositae).

El piretro debe su importancia a su inmediata acción de derribo sobre insectos voladores, además a su baja toxicidad para animales de sangre caliente. A diferencia del DDT, no persiste en el medio ambiente y sus residuos son de vida corta.

##### 4.9.4.1 Modo de acción de piretroides

Los piretroides afectan tanto al sistema nervioso central como al periférico de los insectos tratados, lo que ocasiona descargas repetitivas, seguidas de convulsiones. En insectos la parálisis nerviosa se debe a cambios que se producen en la membrana. Al ser bloqueados los canales de sodio, alteran la conductividad del ión en tránsito, causada por la activación de estos canales dependientes del voltaje. Además se ha observado que las piretrinas no afectan a la colinesterasa (Soderlund *et al.*, 1989).



#### 4.9.4.2 Mecanismos de resistencia a piretroides

Los principales mecanismos de resistencia a piretroides son un mayor metabolismo del insecticida por oxidasas de función múltiple (FOM) y esterasas. También la insensibilidad en el sitio de acción, también llamado *kdr* (Soderlund *et al.*, 1983).



## 5. MÉTODOS

### 5.1 Área de Estudio

La colecta de material biológico se realizó en dos estados del Occidente de México, en Nayarit y Sinaloa, así como en la costa este en Veracruz donde se visitaron 10 localidades, iniciando en el centro y continuando hacia el sur del estado (tabla III).

El estado de Nayarit, tiene 27 621 km<sup>2</sup> de extensión territorial y 950 mil habitantes que representa el 0.9% de los habitantes totales de los Estados Unidos Mexicanos. Se localiza en las coordenadas, al norte 23°05', al sur 20° 36' de latitud norte y al oeste 103° 43', al oeste 105° 46' longitud oeste (figura 11). Sinaloa esta ubicado entre las coordenadas al norte 27° 02', al sur 22° 29' de latitud norte. Al este 105° 23', al oeste 109° 28' de longitud oeste. Tiene 58 092 km<sup>2</sup> y 2,608 442 hab los cuales constituyen un 2.5% de la población total del país (figura 12). Veracruz tiene 72 815 km<sup>2</sup> y 7 110 000 habitantes, siendo capital Jalapa (figura 13). (Fuente: INEGI, 2005).

En el caso de Nayarit el clima que predomina en el 60.21 % de la superficie territorial es el cálido subhúmedo con lluvias en verano y en segundo lugar el clima semicálido subhúmedo con lluvias en verano, cubriendo el 30.93 % de la superficie estatal. Tepic es la capital del estado, la cual esta dividida en 20 municipios. Se encuentra a 920 metros sobre el nivel de mar.



La temperatura promedio de los años 1977 a 1999 fue de 21.2 °C, el año mas frío en los registros del INEGI fue 1977 con una temperatura promedio de 20.1°C y el año con la temperatura promedio mas alta fue en 1996 con 22.2 °C.

El tipo de clima que predomina en Sinaloa es cálido subhúmedo con lluvias en verano, cubriendo el 36.10% de la superficie total del estado. Le sigue el clima semiseco muy cálido y cálido cubriendo el 20.92% de su superficie. Según datos del INEGI 1999, la precipitación media anual en Mazatlán entre los años 1986-1999 fueron 857.5 mm. Siendo el año más seco 1994 que se registraron 370.5 mm. Y el año más lluvioso 1998 con 1, 169.8 mm. Durante los meses Junio y Julio se registran las temperaturas mas altas en Mazatlán, alrededor de los 28° C, en promedio mensual.

En Culiacán las temperaturas promedio en los meses de junio y julio fueron las mismas que para Mazatlán en el año de 1999. La precipitación pluvial media anual entre 1986-1999 en Culiacán, fue de 670.9 mm. En el año más seco, 1999 se registraron 452.5 mm. Y en el mas lluvioso 1994, 895.4 mm. Los meses mas lluviosos son Julio y Agosto.





**De Tepic a:**

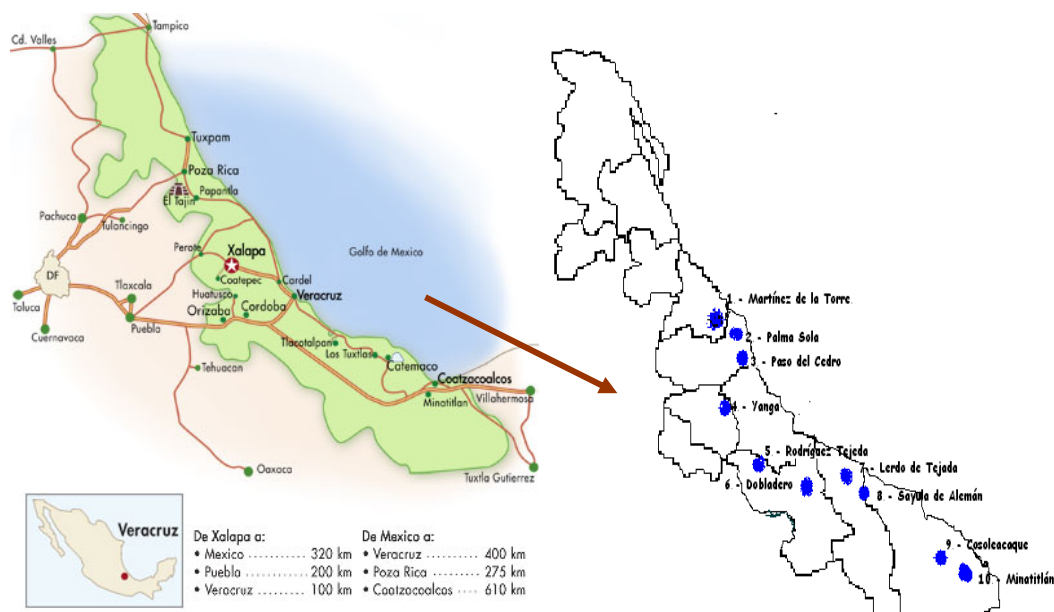
- Guadalajara ..... 215 km ..... 134 miles
- Puerto Vallarta ..... 160 km ..... 100 miles
- Mazatlan ..... 285 km ..... 178 miles

**Figura 11-** Localización geográfica de Nayarit, indicando los sitios de colecta, Tepic y Compostela.





**Figura 12-** El estado de Sinaloa con la ubicación de las localidades de colecta Mazatlán y Culiacán.



**Figura 13** Mapas correspondientes a las 10 localidades del estado de Veracruz, en donde se realizaron colectas.

**Tabla III**

Datos geográficos de 10 localidades del Estado de Veracruz.

POBLACIONES	Latitud	Latitud	Nivel el mar	Temp. anual media °C
	Norte	Sur		
1.- Mtz. de la Torre	20°04'	97°04'	80	24.3
2.- Palma Sola	20°00'	96°15'	10	24.3
3.- Paso del Cedro	19°45'	96°45'	20	26
4.- Yanga	18°50'	96°48'	520	24
5.- Rodriguez Tejeda	18°27'	96°21'	60	30
6.- Dobladero	18°04'	95°42'	10	28
7.- Lerdo de Tejeda	19°38'	95°31'	10	25
8.- Sayula de Alemán	17°53'	94°57'	80	28
9.- Cosoleacaque	18°00'	94°38'	50	34
10.- Minatitlán	17°59'	94°33'	20	34



## 5.2 Obtención y manejo de material biológico

Se colectaron larvas en bolsas “wheel-pack”, en panteones y vulcanizadoras ya que en estos sitios se encuentra criaderos naturales y accidentales de *Ae. aegypti* así como, en casas particulares en colonias con problemas de agua y donde la gente acostumbra a almacenar agua. En las 10 localidades de Veracruz se colectaron larvas por medio de ovitrampas (figura 14), una vez obtenidas las larvas se colocaron en pequeñas cámaras de emergencia donde se les proporcionó alimento y espacio hasta llegar al insectario del laboratorio de Entomología Médica en unidad B de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



**Figura 14** Sitio común de ovitrampeo en las poblaciones de Veracruz.

Al llegar al laboratorio se identificó a la especie *Aedes aegypti*. Después se establecieron colonias de adultos y larvas para obtener el número de individuos requerido para las pruebas respectivas, el tamaño de muestra requerido para el estudio de adultos en Nayarit y Sinaloa fue de 4000 mosquitos, 1000 por cada localidad siendo 500 moscos vivos y 500 moscos muertos. Y para Veracruz fueron 300 larvas para cada insecticida analizado.

Los huevecillos fueron colocados en charolas de plástico para su eclosión (figura 15) una vez obtenidas las larvas, éstas se alimentaron con hojuelas de alimento para peces, cada tercer día y las pupas se colocaron en jaulas, dentro del insectario del mismo laboratorio, aquí las hembras depositaban sus huevos en vasos de plástico revestidos con papel filtro humedecido y se alimentaron de la siguiente manera: los machos con una solución azucarada 1:10 y las hembras con sangre humana (figura 16) y de roedor, para lo cual se mantuvo un criadero de ratones.

Los huevos una vez depositados en el papel filtro, eran retirados cada tercer día y se ponían a secar, de esta manera se conservaron viables por un largo período. El insectario se mantuvo a una temperatura promedio de 28 °C, con una humedad relativa fluctuante entre 70 y 80 % con un fotoperiodo de 12:12 luz-oscuridad. Este procedimiento se repitió hasta obtener un número suficiente de huevecillos para la realización de los bioensayos correspondientes. De la misma manera se trató la cría de la cepa susceptible New Orleans, la cual se utilizó para establecer un umbral de tolerancia en las poblaciones de adultos.





**Figura 15** Charolas para el desarrollo de larvas y jaulas para cría artificial de adultos de *Aedes aegypti* (L)



**Figura 16** Alimentación de hembras de *Ae. aegypti* con sangre humana.

### **5.3 Dosis Diagnóstico en mosquitos adultos**

Se obtuvo la dosis diagnóstico para permetrina, con el método para determinar tiempo-mortalidad en botella, basados en el método de la botella propuesto por la OMS y actualizado por Brogdon y MacAllister en 1998, esta técnica es la que se utiliza en el Center of Disease Control (CDC) de Atlanta.



Se seleccionaban alrededor de 30-40 hembras adultas entre 1 a 3 días de edad y sin alimentación previa de sangre, se utilizó un aspirador de plástico para sacarlos de la jaula y transferirlos a la botella de bioensayo (figura17). Una vez obtenida la curva para la dosis diagnóstico se realizaron los bioensayos.



**Figura 17** Jaula con el vaso para ovipostura y el aspirador para transferir los mosquitos a la botella de bioensayo y botella wheaton de 250ml.

#### **5.4 Bioensayos en mosquitos adultos**

Se utilizaron botellas wheaton de 250 ml. Se obtuvo el insecticida permetrina de una solución stock con el ingrediente activo (I.A.) y se prepararon las diluciones correspondientes para probar las dosis de 21.5, 43, 86 y 172  $\mu\text{g}$  de I.A. por botella. Se utilizó 1.0 ml de acetona como vehículo. Tanto la acetona como el I.A. se vertieron en la botella y ésta se rotó de manera vigorosa para que se impregnara completamente, después se colocó en una gaveta con la rosca semi cerrada para que finalmente se evaporara la acetona y quedaran los residuos de permetrina, se preparó un control con 3



repeticiones, para cada concentración a prueba. El control fue la botella con 1.0 ml de acetona.

Una vez colocados los mosquitos dentro de las botellas con las diferentes dosis y en el control, con un cronómetro se realizó el conteo de mosquitos muertos y se llevó un registro en intervalos fijos de tiempo hasta obtener el 100% de mortalidad o bien completar una hora de registro. Con estos datos se generaron curvas de mortalidad dependientes del tiempo y se determinó la dosis diagnóstica (DD) que fue la  $CL_{100}$ .

Ya establecida la DD se sometieron un total de 4000 mosquitos al bioensayo, fueron separados en categoría muerto o vivo y se numeraron, finalmente se colocaron en el congelador para análisis posterior.

### **5.5 Pruebas bioquímicas en mosquitos adultos**

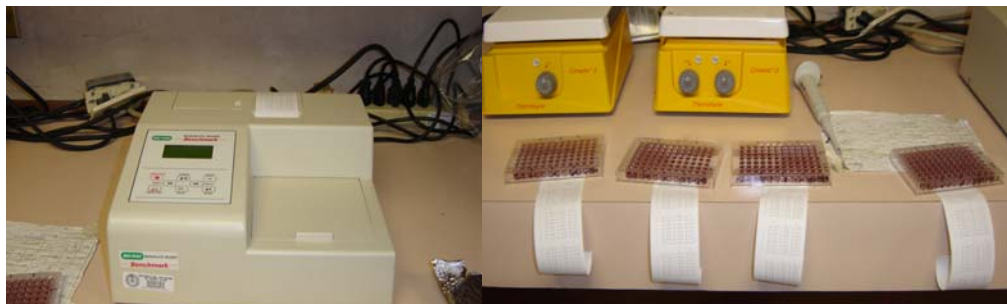
El procedimiento de las técnicas utilizadas en este estudio bioquímico fueron las utilizadas por el CDC en Atlanta, Georgia en Estados Unidos. Primero se realizó la preparación del mosco, para esto se requiere un buffer ( $K_3PO_4$ ) ver anexo para la preparación, se homogenizó a cada mosco y se le agregó 900  $\mu$ l del buffer, aproximadamente.

Se prepararon los reactivos para el análisis de 6 enzimas involucradas en la detoxificación de insecticidas, en los anexos se muestra el material, la preparación y las cantidades utilizadas específicamente de cada reactivo, para cada una de las enzimas.

Se tomaron alíquotas de 100  $\mu$ l del homogenato y se transfirieron a pocillos de una microplaca.



Mil hembras adultas fueron analizadas. Se evaluaron 6 diferentes enzimas de resistencia para cada mosquito: acetilcolinesterasa (AChE), acetilcolinesterasa insensible (iAChE),  $\alpha$  y  $\beta$  esterases, oxidasas de función múltiple (MFO) y glutatión S-transferasas (GST). Se utilizó un control positivo y negativo por placa de acuerdo a la prueba enzimática. Se registraron los valores de absorbancia en un lector de placas marca Benchmark (Biorad), ver figura 18, seleccionando el filtro específico para la lectura de cada enzima, ver anexo I.



**Figura 18** Lector de placas Benchmark (Biorad) y microplacas con papeletas de resultados

## 5.6 Interpretación de resultados y análisis estadístico

Los datos de absorbancia se capturaron en una base de datos en el programa excel, posteriormente se realizó una comparación en el nivel de actividad para cada una de las enzimas entre organismos vivos y muertos. La cepa susceptible New Orleans se utilizó como estándar de referencia.

Esta población al igual que las demás fue sometida a la dosis diagnóstico obtenida de permetrina y se le aplicó el mismo procedimiento.

El valor máximo de absorbancia resultante para cada una de las pruebas se utilizó como **umbral de tolerancia**. Con este umbral se obtuvo el porcentaje de la población que sobrepasó este umbral y que podría indicar que la población esta seleccionando un mecanismo enzimático de detoxificación específico. Esto se realizó tanto en los mosquitos vivos como muertos. Con el paquete estadístico SPSS, se realizó un análisis de ANOVA con una significancia de  $P \leq 0.05$  y una comparación múltiple de medias (prueba de Tukey), para comparar la actividad enzimática entre las cuatro poblaciones de hembras adultas y la cepa susceptible New Orleans, de esta manera poder concluir si existe algún mecanismo enzimático de resistencia seleccionado en dichas poblaciones.



## 5.7 Análisis de susceptibilidad en larvas

### 5.7.1 Determinación de la línea concentración-mortalidad en larvas.

Se utilizaron las siguientes formulaciones:

malatión al 50% ( líquido ) presentación comercial.

temefos al 50 % ( líquido ) presentación comercial.

bifentrina grado técnico (cristales)

cipermetrina grado técnico ( sólido )

permetrina grado técnico ( sólido )



**Figura 19** Insecticidas utilizados.

Las diferentes formulaciones fueron evaluadas sobre larvas de 3er estadio tardío y 4to. temprano, las cuales fueron colocadas en vasos de plástico desechables con capacidad para 120 ml ; los cuales contenían 100 ml de agua de clorada. Para determinar cada una de las concentraciones de los diferentes insecticidas, se formuló una solución al 1 % como solución stock, para posteriormente obtener el rango de concentraciones



apropiado para cada uno de los bioensayos. Las formulaciones comerciales se prepararon en agua y los insecticidas grado técnico en acetona.

Cada bioensayo se constituyó de 6 concentraciones diferentes y tres repeticiones cada una, además de un testigo por cada una de las diferentes concentraciones. Cada bioensayo se repitió en tres ocasiones registrándose la mortalidad cada 24 hrs. Se llevaron a cabo los bioensayos para la obtención de las concentraciones que presentaran resultados de mortalidad entre el 10 y 90 %, los resultados de mortalidad, se sometieron a un análisis de regresión log-Probit método de máxima verosimilitud Finney (1977), y en caso de mortalidad en el testigo se empleó la fórmula de Abbott (1925).

### 5.7.2 Establecimiento de los bioensayos

Un total de 5 bioensayos se realizaron con un número variable de concentraciones de los diferentes insecticidas (malatión, temefos, bifentrina, cipermetrina y permetrina.) fueron realizados con tres repeticiones y 25 individuos por repetición en cada ocasión.



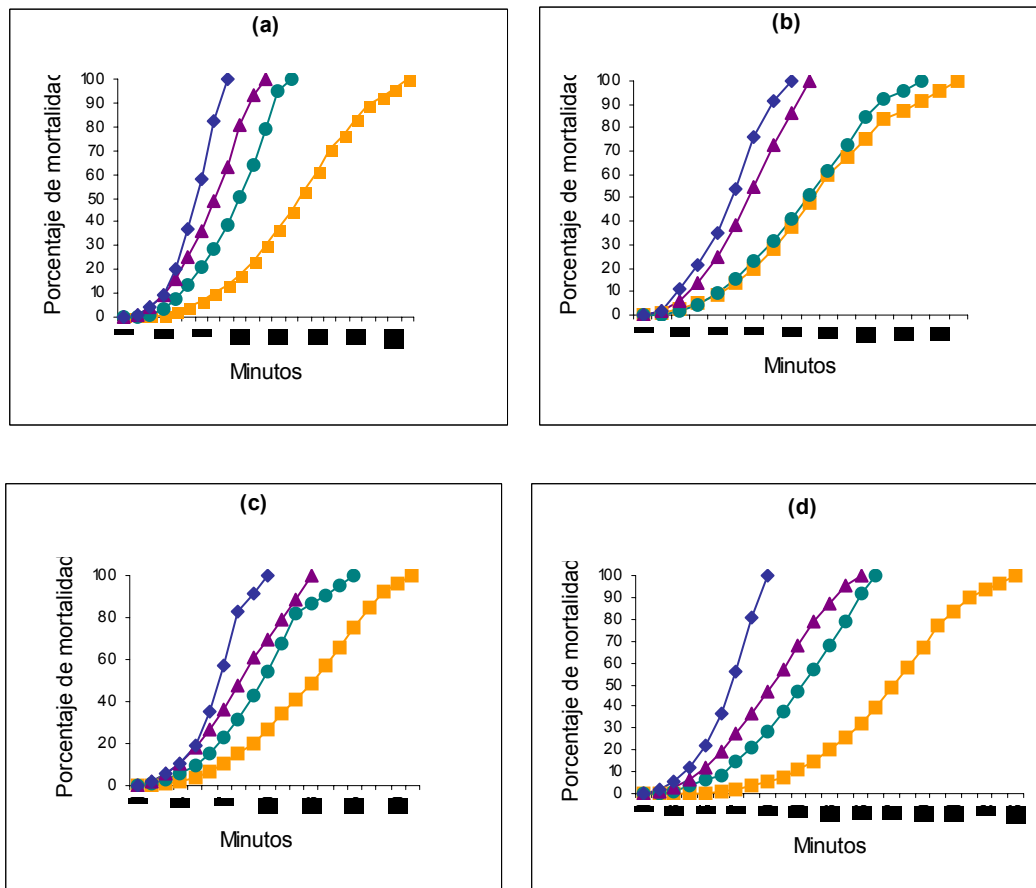
**Figura 20** Recipientes de bioensayos en larvas de *Ae. aegypti*.



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Dosis diagnóstico

La concentración que mató al 100 % de los mosquitos en el menor tiempo fue 172  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Esta se estableció como la DD a la cual se sometieron los mosquitos de las cuatro poblaciones.



**Figura 21** Curvas de tiempo-mortalidad para permetrina. Se observan las dosis de prueba para la dosis diagnóstico (DD) en las poblaciones: (a)Culiacán, (b)Mazatlán, (c)Compostela y (d)Tepic. + 21.5  $\mu\text{L}$ ; ● 43  $\mu\text{L}$ ; ▲ 86  $\mu\text{L}$ ; ◊ 172  $\mu\text{L}$ .



## 6.2 Umbral de tolerancia en la cepa de referencia

En la siguiente tabla se observan los niveles máximos de absorbancia obtenidos para la cepa de referencia New Orleans.

**Tabla IV**

Máximos valores de absorbancia obtenidos en mosquitos adultos vivos y muertos para cada enzima.

<b>Enzima</b>	<b>Vivos</b>	<b>Muertos</b>
<b><math>\alpha</math> esterasas</b>	0.489	0.621
<b><math>\beta</math> esterasas</b>	0.993	0.628
<b>GST-asas</b>	0.052	0.065
<b>MOF</b>	0.141	0.182
<b>AChE</b>	0.29	0.23
<b>iAChE</b>	0.011	0.031

**Tabla V**

Porcentaje de la población de mosquitos que sobrepasó el umbral de tolerancia.

<b>Enzima (%)</b>	<b>Culiacán</b>		<b>Mazatlán</b>		<b>Compostela</b>		<b>Tepic</b>	
	<b>V</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	<b>M</b>
<b><math>\alpha</math> esterasas</b>	98.6	46.6	84.2	34.2	97.4	7.6	97.6	47.2
<b><math>\beta</math> esterasas</b>	99.2	63.6	14.2	98.2	81.4	90.2	53.8	97.2
<b>GST-asas</b>	42	23.8	35	28.2	28.2	29.8	57	39
<b>FOM</b>	71.8	22.2	76	16.6	67.6	19.4	67	29.4
<b>AChE</b>	7.2	8.6	0.8	27.8	2.8	17.4	5.2	2.6
<b>iAChE</b>	87.4	4.2	67.4	22	26.4	17.8	17.8	23.4

V= mosquitos vivos, M= mosquitos muertos



### 6.3 Mecanismos asociados a la resistencia de permetrina

En la tabla V, se observan los porcentajes de cada población que sobrepasó el umbral de tolerancia establecido con la cepa susceptible de referencia, New Orleans (NO). En la población de Culiacán se encontró que el mecanismo mas importante de detoxificación de permetrina es acetilcolinesterasa insensible (iAChE) ya que el 87.4% de la población en moscos adultos vivos se ubicó por encima del umbral de tolerancia (0.011nm) y sólo el 4.2% en adultos muertos. Otro mecanismo importante fue  $\alpha$  esterases con el 98.6% de los moscos sobrevivientes a la dosis de 172  $\mu$ l, ubicándose por arriba del umbral de tolerancia (0.489 nm) y el 40.6% de los moscos muertos. Cabe mencionar que el mecanismo de AChE (Acetilcolinesterasa) presentó el porcentaje mas bajo en el análisis de moscos sobrevivientes, únicamente el 7.2% pasó el umbral de tolerancia (0.29 nm) y en moscos muertos el 8.6% de la población sobrepasó el umbral (0.23 nm). En la población de mosquitos en Mazatlán las  $\alpha$  esterases son el mecanismo mas importante en la detoxificación de permetrina ya que el 84.2% de los mosquitos sobrevivientes pasaron el umbral de tolerancia (0.993 nm) y sólo el 34.2% de los mosquitos muertos se localizaron en niveles mas altos de absorbancia. Aquí al igual que en la población de Culiacán la iAChE es el mecanismo de menor porcentaje dentro de la población tanto de mosquitos vivos (0.8%) como muertos (27.8%).



Se considera que las Oxidasas de Función Múltiple (MFO) contribuyen ampliamente en la detoxificación de permetrina en esta población, debido a que el 76% de los mosquitos sobrevivientes pasó el umbral de 0.141 nm y en los mosquitos muertos solo el 16.6% sobrepasó niveles de absorbancia mas altos que 0.182 nm. En la población de mosquitos de Compostela las  $\alpha$  esterasas son el mecanismo con el mas alto porcentaje de sobrevivientes (97.4%) al umbral de tolerancia (0.489nm). Solamente el 7.6% de los mosquitos muertos sobrepasaron el umbral (0.621nm). La iAChE presentó los porcentajes mas bajos de la población que sobrepasaron los umbrales anteriormente mencionados siendo el 2.8% en mosquitos sobrevivientes y 17.4% en mosquitos muertos. En la población de Tepic, las  $\alpha$  esterasas fue el mecanismo con el mas alto porcentaje (97.6%) de la población que sobrepasó el umbral de tolerancia, en comparación con el 47.2% de los mosquitos muertos. Al igual que en las poblaciones anteriores la iAChE presentó los porcentajes mas bajos de la población que sobrepasó el umbral de tolerancia 5.2% y 2.6% para mosquitos vivos y muertos respectivamente.

#### **6.4 Actividad enzimática dentro de los grupos principales de enzimas detoxificativas.**

##### **6.4.1 En mosquitos que sobrevivieron a la dosis diagnóstico de permetrina**

En la tabla siguiente se muestra la media y desviación estándar, así como la prueba Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Se compara la actividad enzimática en mosquitos adultos vivos en las cuatro poblaciones, además la cepa de referencia New Orleans.



**Tabla VI**

Media y desviación estándar de cada mecanismo asociado con la resistencia a insecticidas en las cuatro poblaciones de mosquitos vivos.

Población	$\alpha$ Esterasas		$\beta$ Esterasas		MFO		GST		iAChE	
	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE
N O	0.39034e	0.05050	0.90868d	0.05275	0.0847 e	0.018379	0.0264b	0.016527	0.00232a	0.003008
Cul	0.92826a	0.08057	1.23513a	0.09888	0.18174b	0.071395	0.0413b	0.071173	0.00832b	0.027509
Maz	0.53000d	0.07415	0.77724e	0.13744	0.17237d	0.056379	0.0324b	0.053308	0.0200 b	0.034747
Comp	0.58930c	0.08510	1.08171b	0.15360	0.18934a	0.083489	0.0107b	0.095529	-0.025 b	0.047965
Tep	0.82687b	0.36777	0.96356c	0.15805	0.17738c	0.076722	0.061a	0.15530	0.0189 b	0.11373

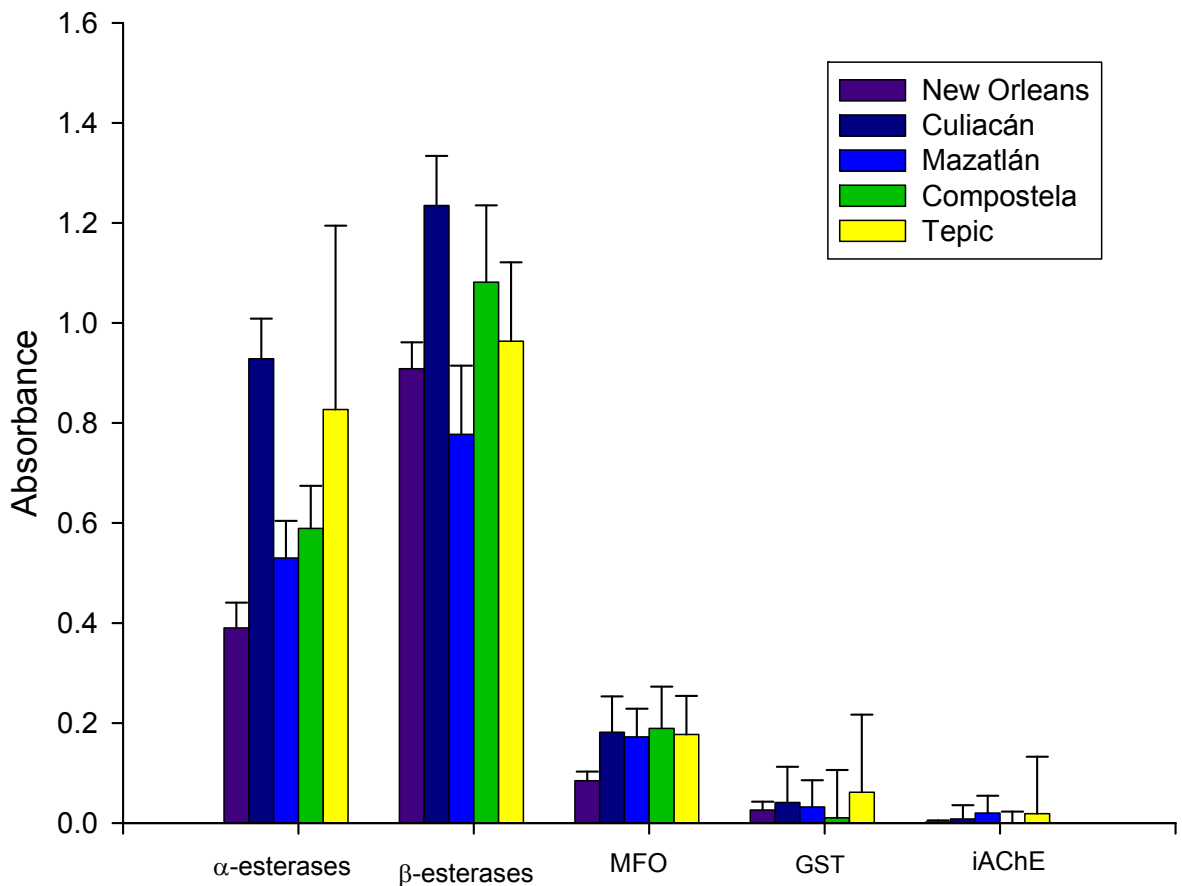
NO= New Orleans, Cul= Culiacán, Maz= Mazatlán, Comp= Compostela, Tep= Tepic.

**Nota:** Letras diferentes indican diferencia significativa.  
( $P \leq 0.05$ )



Como se puede observar en la tabla anterior (tabla VI), las enzimas  $\alpha$ ,  $\beta$  esterasas y las oxidasas de función múltiple (MFO) muestran diferencia significativa en todas las poblaciones expuestas a permetrina con respecto a la cepa de referencia (NO). En relación a la enzima glutatión s-transferasas (GST) la población de Tepic fue la única que tuvo diferencia significativa mientras que la enzima acetilcolinesterasa insensible (iAChE) la cepa de referencia fue la que mostró esta característica.

Los valores de absorbancia promedio para el mecanismo de  $\alpha$  esterasas se muestran en la siguiente figura.



**Figura 22** Absorbancia (nm) promedio entre las cuatro poblaciones de adultos vivos y la cepa New Orleans, de cada una de las enzimas analizadas.



Se puede apreciar que el valor de absorbancia promedio para la enzima  $\beta$  esterasa fue menor en la población de Mazatlán con respecto a todas las demás. En las enzimas oxidasas de función múltiple (MFO) y la acetilcolinesterasa insensible (iAChE) en la población de referencia (NO) se obtuvo un promedio menor de absorbancia en comparación con el resto de las poblaciones. Para la enzima de glutatión s-transferasa (GST), a diferencia de las anteriores, fue la población de Compostela la que mostró el promedio de menor absorbancia.

#### **6.4.2 En mosquitos que no sobrevivieron a la dosis diagnóstico de permetrina**

En la tabla VII podemos observar la media y desviación estándar obtenida para las poblaciones de mosquitos muertos. Aquí podemos notar que el mecanismo de  $\alpha$  esterasas en las poblaciones de Tepic y Culiacán tuvieron diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ), en relación con las otras poblaciones. Para la enzima  $\beta$  esterasa todas las poblaciones tienen diferencia significativa. En las poblaciones de Compostela y Tepic, el mecanismo de oxidasas de función múltiple, también mostraron diferencia significativa, lo cual que no se observa entre las poblaciones de NO, Culiacán y Mazatlán. No hubo diferencia significativa entre ninguna de las poblaciones para los mecanismos de las enzimas glutatión s-transferasa y acetilcolinesterasa insensible.





**Tabla VII**

Media y desviación estándar de cada mecanismo asociado con la resistencia a insecticidas en las cuatro poblaciones de mosquitos muertos.

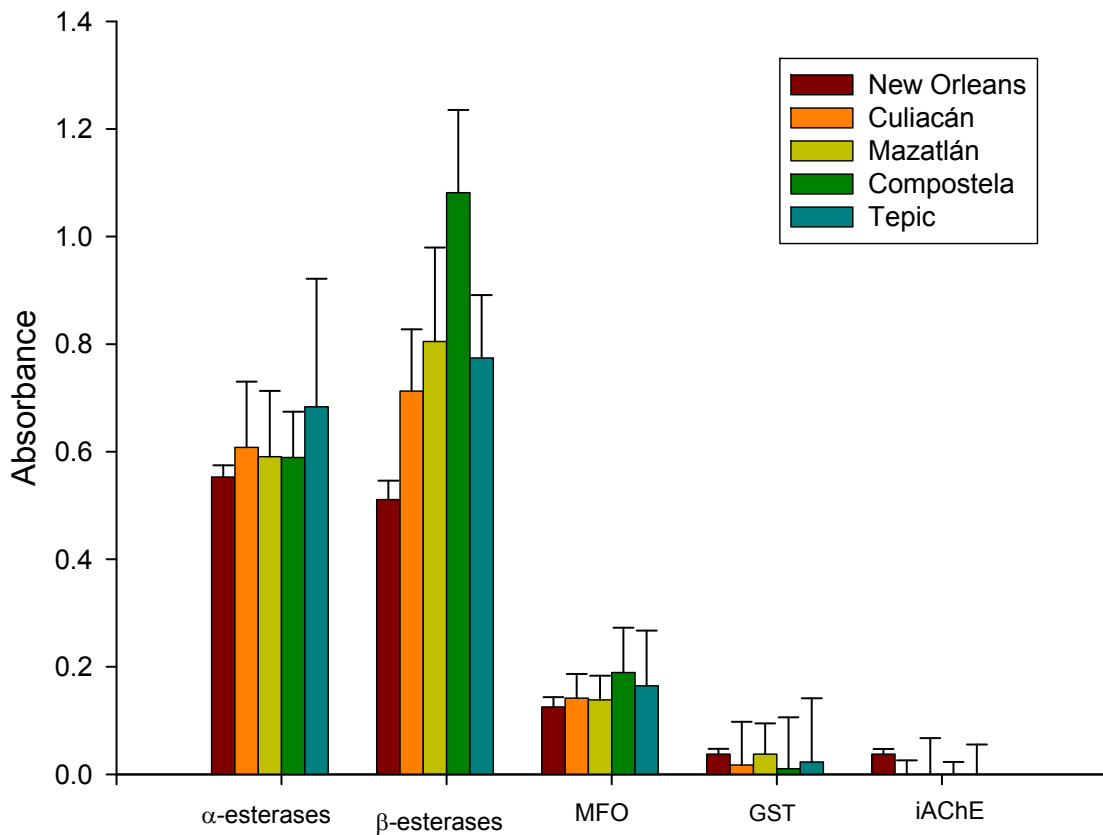
Población	α Esterasas		β Esterasas		MFO		GST		iAChE	
	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE	$\bar{X}$	DE
NO	0.55283	0.021879	0.51084e	0.035267	0.12559c	0.018152	0.0378a	0.009676	0.0375 b	0.009765
Cul	0.6079 b	0.12236	0.71274d	0.11497	0.14172c	0.044963	0.0173a	0.08047	-0.002 d	0.028058
Maz	0.59061c	0.15013	0.80500a	0.17477	0.13835 c	0.045124	0.0376a	0.05717	0.00128e	0.066169
Comp	0.52391c	0.056466	0.72628c	0.14311	0.014994a	0.072556	0.0107a	0.095562	-0.0212c	0.047855
Tep	0.68332a	0.23814	0.77431b	0.11676	0.16468b	0.10265	0.0231a	0.11736	-0.059 a	0.11439

NO= New Orleans, Cul= Culiacán, Maz= Mazatlán, Comp= Compostela, Tep= Tepic.

**Nota:** Letras diferentes indican poblaciones que presentan una diferencia significativa. (P<=0.05)



En la figura 23 se muestra la absorbancia promedio obtenida para cada enzima por población. Aquí vemos que en las  $\alpha$  esterasas,  $\beta$  esterasas y las oxidasas de función múltiple (MFO) es mayor en Culiacán, Mazatlán Compostela y Tepic que en la cepa de referencia (NO); ocurriendo lo contrario para las glutatión s-transferasas y las acetilcolinesterasa insensible.



**Figura 23** Absorbancia (nm) promedio entre las cuatro poblaciones de adultos muertos y la cepa New Orleans, de cada una de las enzimas analizadas.



### 6.4.3 Comparación entre mosquitos que sobrevivieron a la dosis diagnóstico de permetrina y mosquitos que no sobrevivieron.

A continuación se muestran las tablas y figuras de la comparación entre poblaciones de mosquitos hembras adultas que sobrevivieron y que no sobrevivieron, incluyendo los cinco principales mecanismos detoxificativos asociados a insecticidas.

**Tabla VIII**  
Media y desviación estándar de  $\alpha$  esterasas en mosquitos vivos y muertos de todas las poblaciones.

<b><math>\alpha</math> Esterasas</b>		
<b>Población</b>	<b><math>\bar{X}</math></b>	<b>DE</b>
<b>1</b> NO vivos	0.39034 g	0.050508
<b>2</b> NO muertos	0.55283 e	0.021879
<b>3</b> Cul vivos	0.92826 a	0.080578
<b>4</b> Cul muertos	0.60793d	0.12236
<b>5</b> Maz vivos	0.53000 f	0.074155
<b>6</b> Maz muertos	0.59061 de	0.15013
<b>7</b> Comp vivos	0.58930 de	0.085103
<b>8</b> Comp muertos	0.52391 f	0.056466
<b>9</b> Tep vivos	0.82687 b	0.36777
<b>10</b> Tep muertos	0.68332 c	0.23814

NO= New Orleans, Cul= Culiacán, Maz= Mazatlán, Comp= Compostela, Tep= Tepic.

Como se puede apreciar en la tabla previa existe diferencia significativa entre NO vivos (G) y NO muertos (E), lo mismo que entre los grupos de Culiacán vivos (A) y Culiacán muertos (D), así mismo hubo dicha diferencia también entre los grupos de Mazatlán vivos (F) y Mazatlán muertos (D) (E) al igual que entre los grupos de Compostela vivos (D) (E) y Compostela muertos (F) y entre Tepic vivos (B) y Tepic muertos (C).



**Tabla IX**

Media y desviación estándar de  $\beta$  esterases en mosquitos vivos y muertos de todas las poblaciones.

<b><math>\beta</math> Esterasas</b>		
<b>Población</b>	<b><math>\bar{X}</math></b>	<b>DE</b>
<b>1</b> NO vivos	0.90868 d	0.052753
<b>2</b> NO muertos	0.51084 g	0.035267
<b>3</b> Cul vivos	1.23513 a	0.098883
<b>4</b> Cul muertos	0.71274 f	0.11497
<b>5</b> Maz vivos	0.77724 e	0.13497
<b>6</b> Maz muertos	0.80500 e	0.17477
<b>7</b> Comp vivos	1.08171 b	0.15360
<b>8</b> Comp muertos	0.72628 f	0.14311
<b>9</b> Tep vivos	0.96356 c	0.15805
<b>10</b> Tep muertos	0.77431 e	0.11676

NO= New Orleans, Cul= Culiacán, Maz= Mazatlán, Comp= Compostela, Tep= Tepic.

En relación con la enzima  $\beta$  esterasa se puede apreciar en la tabla correspondiente que existe diferencia significativa entre los grupos de vivos y muertos de las poblaciones NO, Culiacán, Compostela y Tepic, no encontrándose diferencia significativa entre los grupos de Mazatlán vivos (E) y Mazatlán muertos (E).



**Tabla X**

Media y desviación estándar de oxidasas de función múltiple (MFO) en mosquitos vivos y muertos de todas las poblaciones.

Población	MFO	
	$\bar{X}$	DE
<b>1</b> NO vivos	0.0847 f	0.018379
<b>2</b> NO muertos	0.12559 e	0.018152
<b>3</b> Cul vivos	0.18174 ab	0.071395
<b>4</b> Cul muertos	0.14172 d	0.044963
<b>5</b> Maz vivos	0.17237 ab	0.056379
<b>6</b> Maz muertos	0.13835 e	0.045124
<b>7</b> Comp vivos	0.18934 a	0.083489
<b>8</b> Comp muertos	0.14994 c	0.092506
<b>9</b> Tep vivos	0.17735 ab	0.076722
<b>10</b> Tep muertos	0.16468 c	0.10265

NO= New Orleans, Cul= Culiacán, Maz= Mazatlán, Comp= Compostela, Tep= Tepic.

En la tabla del mecanismo de oxidasas de función múltiple puede apreciarse diferencia significativa entre los grupos de NO vivos (F) y NO muertos (E), Culiacán vivos (A) (B) y Culiacán muertos (D), Mazatlán vivos (A) (B) y Mazatlán muertos (E), Compostela vivos (A) y Compostela muertos (C), así como entre Tepic vivos (A) (B) y Tepic muertos (C).



**Tabla XI**

Media y desviación estándar de glutatión s-transferasas (GST) en mosquitos vivos y muertos de todas las poblaciones.

Población	GST-asas	
	$\bar{X}$	DE
1 NO vivos	0.0264 b	0.016527
2 NO muertos	0.0378 a	0.009676
3 Cul vivos	0.0413 cd	0.071173
4 Cul muertos	0.0173 de	0.080476
5 Maz vivos	0.0324 d	0.053308
6 Maz muertos	0.0376 cd	0.057173
7 Comp vivos	0.0058 f	0.087542
8 Comp muertos	0.0107 e	0.095529
9 Tep vivos	0.0617 c	0.15530
10 Tep muertos	0.0231 de	0.11836

NO= New Orleans, Cul= Culiacán, Maz= Mazatlán, Comp= Compostela, Tep= Tepic.

El mecanismo de glutatión s-transferasas (GST) tuvo una diferencia significativa entre las poblaciones de mosquitos vivos y muertos en la población de New Orleans (NO) (A) y (B) respectivamente; entre Compostela vivos (F) y Compostela muertos (E) al igual que entre Tepic vivos (C) y Tepic Muertos (D) (E). No hubo diferencia significativa entre los grupos de Culiacán vivos y Culiacán muertos ni entre Mazatlán vivos y Mazatlán muertos.



**Tabla XII**

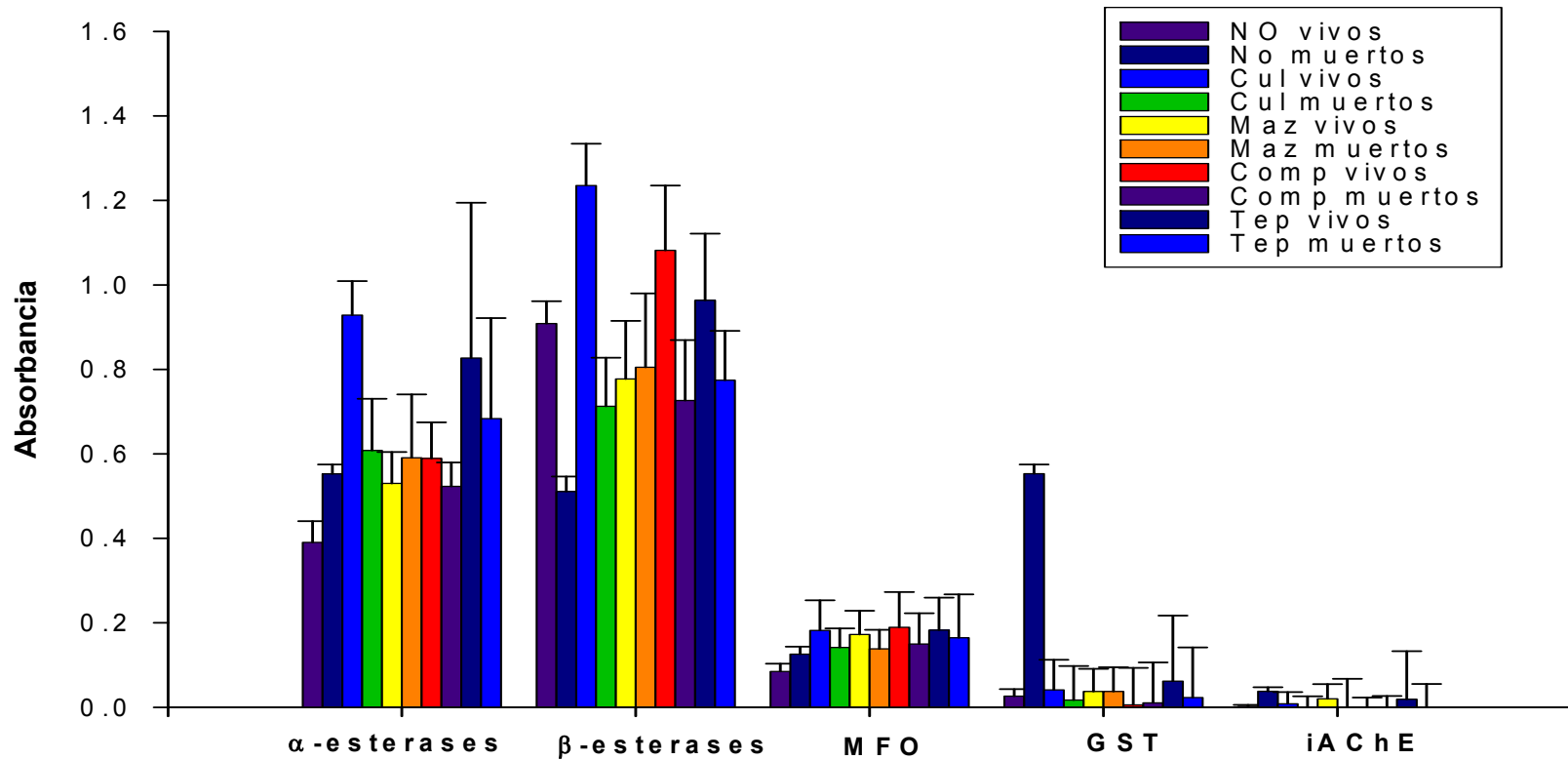
Media y desviación estándar de acetil colinesterasa insensible (iAChE) en mosquitos vivos y muertos de todas las poblaciones.

Población	iAChE	
	$\bar{x}$	DE
<b>1</b> NO vivos	0.00232 bc	0.0033008
<b>2</b> NO muertos	0.0378 a	0.0096767
<b>3</b> Cul vivos	0.00832 bc	0.027509
<b>4</b> Cul muertos	-0.0020 d	0.028058
<b>5</b> Maz vivos	0.0200 ab	0.034747
<b>6</b> Maz muertos	0.00128 cd	0.066169
<b>7</b> Comp vivos	-0.025 e	0.047965
<b>8</b> Comp muertos	-0.0212 e	0.047855
<b>9</b> Tep vivos	0.0189 bc	0.11373
<b>10</b> Tep muertos	-0.059 f	0.11439

NO= New Orleans, Cul= Culiacán, Maz= Mazatlán, Comp= Compostela, Tep= Tepic.

En la tabla de la enzima acetilcolinesterasa insensible podemos observar que hay diferencia significativa entre las poblaciones de vivos y muertos de NO, Culiacán, Mazatlán y Tepic. No existe diferencia significativa entre las poblaciones de Compostela vivos (E) y Compostela muertos (E).





**Figura 24** Comparación de mosquitos vivos y muertos entre todas las poblaciones, se muestran los cinco principales mecanismos enzimáticos.



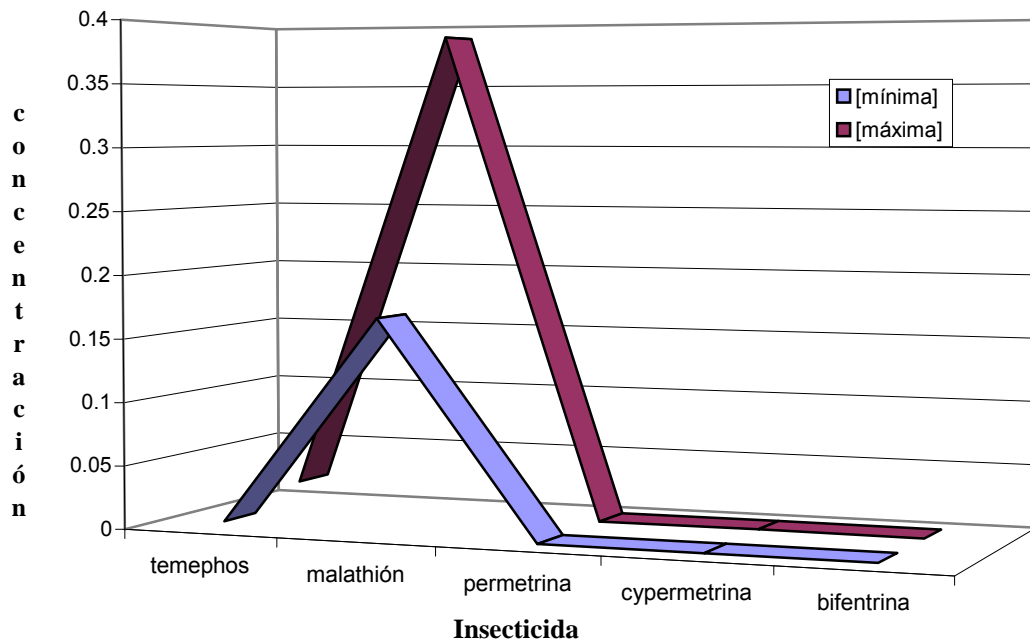
Como se observa en la figura 24, para la enzima  $\alpha$  esterasa las poblaciones de NO muertos y Mazatlán muertos mostraron un mayor promedio de absorbancia con respecto a sus contrapartes de mosquitos vivos. Por el contrario las poblaciones de Culiacán, Compostela y Tepic mostraron mayor promedio de absorbancia en sus poblaciones de mosquitos vivos. El promedio de absorbancia obtenido para la enzima  $\beta$  esterasa fue mayor en todas las poblaciones de mosquitos vivos, excepto en Mazatlán, donde fue mas alto en la población de mosquitos muertos. El promedio de absorbancia obtenido para las enzimas oxidasas de función múltiple (MFO), en todas las poblaciones de mosquitos vivos, fue mayor excepto en la de NO. El promedio de absorbancia obtenido para glutathion s-transferasas resultó mayor en las poblaciones de mosquitos muertos de NO y Compostela, siendo muy acentuada esta diferencia en la primera. Ocurre lo contrario en las poblaciones de Culiacán y Tepic en donde el promedio de absorbancia mayor se obtuvo en las poblaciones de mosquitos vivos. No se observó una diferencia clara en el promedio de absorbancia de GST, entre las poblaciones de mosquitos vivos y muertos de Mazatlán. El promedio de absorbancia obtenido para la enzima acetilcolinesterasa insensible fue mayor en las poblaciones de mosquitos vivos de Culiacán, Mazatlán y Tepic con respecto a sus poblaciones de mosquitos muertos. Por el contrario el promedio mayor de absorbancia para dicha enzima en la población de NO se obtuvo en los mosquitos muertos. No se aprecia diferencia en el promedio de absorbancia de AChE, entre las poblaciones de mosquitos vivos y muertos de Compostela.



### 6.5 Susceptibilidad larvaria en 10 poblaciones de Veracruz

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la línea concentración-mortalidad para cada uno de los insecticidas probados (temefos, malati6n, permetrina, cipermetrina y bifentrina) por localidad.

Se determinaron los rangos de concentraci6n m6nimos y m6ximos en los cuales se obtuvieran resultados de mortalidad de por lo menos 10 al 90 % con la finalidad de hacer un an6lisis y as6 determinar las l6neas de concentraci6n-mortalidad para larvas de *Ae. aegypti* para los insecticidas antes mencionados en las 10 localidades del Estado de Veracruz (figura 25 y tabla XIII).



**Figura 25** Concentraci6n (ppm) de cada insecticida para determinar l6nea de concentraci6n-mortalidad de *Ae. aegypti* en 10 poblaciones del Estado de Veracruz.



**Tabla XIII**

Rangos de concentración de cada insecticida para determinar la línea concentración-mortalidad en larvas.

INSECTICIDA	Rango de concentración		
	(ppm)	INDIVIDUOS	Repeticiones
Temefos	0.001-0.008	300	12
Malatión	0.10 – 0.25	300	12
Permetrina	0.00001-0.00003	300	12
Cipermetrina	0.0000009 – 0.00006	300	12
Bifentrina	0.000008 - 0.0001	300	12

### 6.5.1 Temefos

Los resultados de  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  se presentan en la tabla XIV, figura 26. Los valores de  $CL_{50}$  para temefos (del mayor al menor) de las 10 poblaciones de *Ae. aegypti* se comportaron de la siguiente manera: MTZ>PC=Y=LT>PS=D>C>RT=SA>M. Aunque se presentaron diferencias en los valores numéricos de la  $CL_{50}$  la diferencia no fue significativa ( $p \leq 0.05$ ), debido a que hubo traslape en todos los valores de intervalo de confianza obtenidos para cada localidad. Los valores de mayor  $CL_{95}$  se registran para Dobladero seguido por Lerdo de Tejada, Cosoleacaque, Minatitlán, Sayula para el cual se obtuvo el mismo valor que para Rodríguez Tejada, seguido de Martínez de la Torre, Yanga, Paso del Cedro y el menor valor para Palma Sola. Al igual que para la  $CL_{50}$  aunque diferencia numérica, ésta no fue significativa ( $p \leq 0.05$ ).

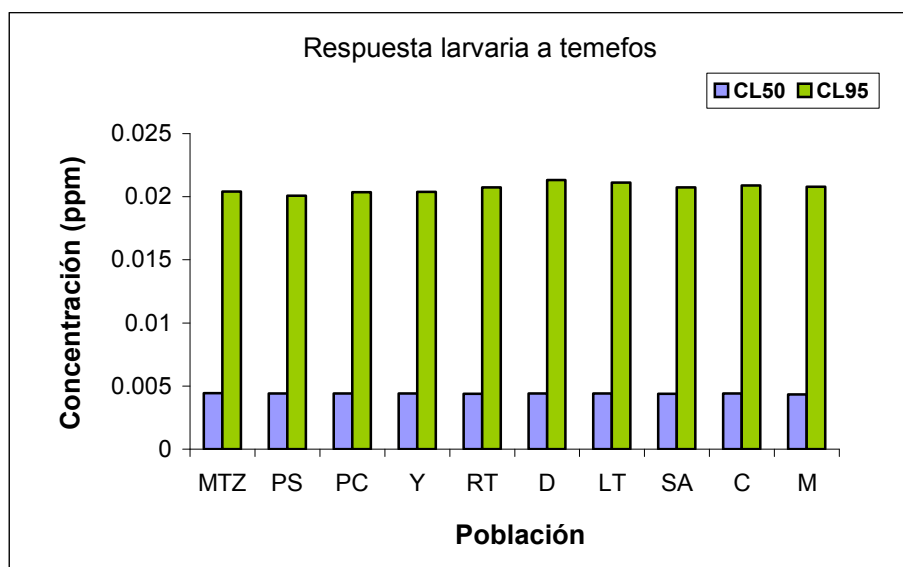


**Tabla XIV**

Susceptibilidad larvaria de *Ae. aegypti* a diferentes concentraciones de **temefos** el Estado de Veracruz .

LOCALIDADES	CL <sub>50</sub> (ppm)	Límite Inf.- Límite Sup. (50%CL)	CL <sub>95</sub> (ppm)	Límite Inf.- Límite Sup. (95%CL)
MTZ	0.00444	(0.00419-0.00471)	0.02042	(0.01730-0.02506)
PS	0.00441	(0.00416-0.00467)	0.02007	(0.01705-0.02456)
PC	0.00442	(0.00416-0.00468)	0.02037	(0.01726-0.02499)
Y	0.00442	(0.00417-0.00468)	0.02039	(0.01728-0.02502)
RT	0.00439	(0.00414-0.00466)	0.02073	(0.01752-0.02553)
D	0.00441	(0.00416-0.00469)	0.02132	(0.01795-0.02641)
LT	0.00442	(0.00417-0.00470)	0.02113	(0.01781-0.02612)
SA	0.00439	(0.00414-0.00466)	0.02073	(0.01752-0.02553)
C	0.00440	(0.00415-0.00468)	0.02090	(0.01764-0.02578)
M	0.00434	(0.00409-0.00461)	0.02080	(0.01756-0.02564)

MTZ= Martínez de la Torre, PS= Palma Sola, PC= Paso del Cedro, Y = Yanga, RT= Rodríguez Tejada, D= Dobladero, LT= Lerdo de Tejada, SA= Sayula de Alemán, C= Cosoleacaque, M= Minatitlán.



**Figura 26** Respuesta larvaria de *Ae. aegypti* a diferentes concentraciones de **temefos** el Estado de Veracruz .



### 6.5.2 Malatión

Los resultados de  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$  se presentan en la tabla XV, figura 27. Los valores de  $CL_{50}$  para malatión (del mayor al menor) de las 10 poblaciones de *Ae. aegypti* se comportaron de la siguiente manera:  $Y > MTZ > RT > PS = PC = D = LT = SA = C = M$ . Aunque se presentaron diferencias en los valores numéricos de la  $CL_{50}$  entre las localidades de Yanga, Martínez de la Torre y Rodríguez Tejada, entre ellas mismas y entre éstas y el resto, las diferencias no fueron significativas (de acuerdo a que hubo traslape en todos los valores de intervalo de confianza obtenidos para cada localidad) ( $p < 0.05$ ).

Los valores de mayor  $CL_{95}$  se registran para Martínez de la Torre seguido por Palma Sola y este último registrando el mismo valor que para Paso del Cedro, Dobladero, Lerdo de Tejada, Sayula de Alemán, Cosoleacaque y Minatitlán y estos a su vez registran mayor valor que Yanga, seguido por Rodríguez Tejada, quién registra un valor menor de  $CL_{95}$ . Al igual que para la  $CL_{50}$  aunque diferencia numérica, ésta no fue significativa ( $p \leq 0.05$ ).

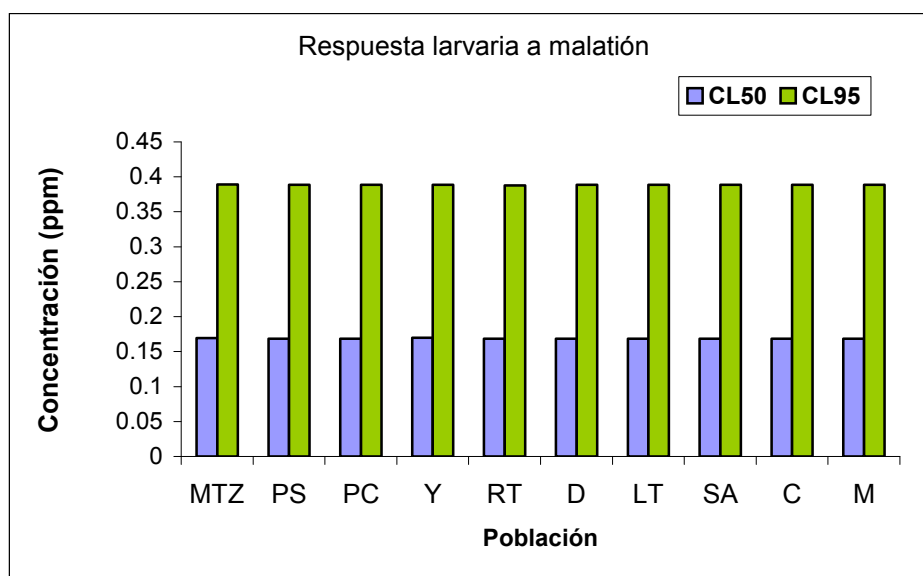


**Tabla XV**

Susceptibilidad larvaria de *Ae. aegypti* a diferentes concentraciones de **malatión** en el Estado de Veracruz

LOCALIDADES	CL <sub>50</sub> (ppm)	Límite Inf. Límite Sup. (50%CL)	CL <sub>95</sub> (ppm)	Límite Inf. –Límite Sup.(95%CL)
MTZ	0.16936	(0.16404-0.17480)	0.38934	(0.35917-0.42916)
PS	0.16833	(0.16301-0.17376)	0.38863	(0.35843-0.42853)
PC	0.16833	(0.16301-0.17376)	0.38863	(0.35843-0.42853)
Y	0.16962	(0.16432-0.17505)	0.38843	(0.35851-0.42788)
RT	0.16863	(0.16332-0.17404)	0.38781	(0.35784-0.42735)
D	0.16833	(0.16301-0.17376)	0.38863	(0.35843-0.42853)
LT	0.16833	(0.16301-0.17376)	0.38863	(0.35843-0.42853)
SA	0.16833	(0.16301-0.17376)	0.38863	(0.35843-0.42853)
C	0.16833	(0.16301-0.17376)	0.38863	(0.35843-0.42853)
M	0.16833	(0.16301-0.17376)	0.38863	(0.35843-0.42853)

MTZ= Martínez de la Torre, PS= Palma Sola, PC= Paso del Cedro, Y = Yanga, RT= Rodríguez Tejeda, D= Dobladero, LT= Lerdo de Tejada, SA= Sayula de Alemán, C= Cosoleacaque, M= Minatitlán.



**Figura 27** Respuesta larvaria de *Ae. aegypti* a diferentes concentraciones de **malatión** en el Estado de Veracruz.



En el caso de malatión, tanto para la CL<sub>50</sub> como CL<sub>95</sub> prácticamente el 70% de las localidades presentaron el mismo valor. Esto a diferencia de temefos en donde se encontró mayor variación en la respuesta.

### 6.5.3 Permetrina

La población más susceptible en base a CL<sub>50</sub> resultó ser la fue Palma Sola, seguido por el grupo formado por Martínez de la Torre, Paso del Cedro, Yanga, Rodríguez Tejeda, Sayula de Alemán, Cosoleacaque y Minatitlán y los mayores valores para Lerdo de Tejada y Dobladero, respectivamente. En este caso también se obtuvo el mismo valor para el 70% de las localidades (tabla XVI, figura 28). No se encontró diferencia significativa debido al traslape de los intervalos de confianza ( $p \leq 0.05$ ).

En el caso de la CL<sub>95</sub> las poblaciones presentaron mayor variación en su respuesta, los valores de mayor a menor fueron: C>D>M>LT>SA>RT=PC>MTZ>Y>PS coincidiendo Palma Sola con la mayor susceptibilidad a permetrina en base a CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub>, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

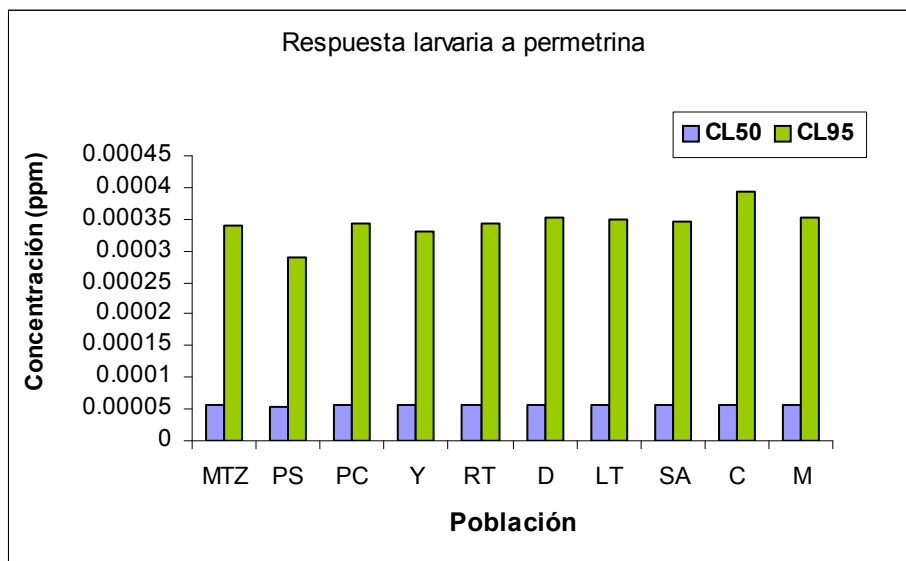


**Tabla XVI**

Susceptibilidad larvaria de *Ae. aegypti* a diferentes concentraciones de **permetrina** en el Estado de Veracruz

LOCALIDADES	CL <sub>50</sub> (ppm)	Límite Inf. – Límite Sup. (50%CL)	CL <sub>95</sub> (ppm)	Límite Inf. – Límite Sup. (95%CL)
MTZ	0.000056	(0.000052-0.000060)	0.000340	(0.000289-0.000410)
PS	0.000054	(0.000051-0.000058)	0.000290	(0.000251-0.000344)
PC	0.000056	(0.000052-0.000060)	0.000342	(0.000291-0.000413)
Y	0.000056	(0.000053-0.000061)	0.000329	(0.000281-0.000394)
RT	0.000056	(0.000052-0.000060)	0.000342	(0.000292-0.000413)
D	0.000057	(0.000053-0.000061)	0.000352	(0.000300-0.000426)
LT	0.000057	(0.000053-0.000061)	0.000348	(0.000296-0.000420)
SA	0.000056	(0.000052-0.000061)	0.000345	(0.000294-0.000417)
C	0.000056	(0.000052-0.000060)	0.000393	(0.000277-0.000387)
M	0.000056	(0.000052-0.000061)	0.000351	(0.000298-0.000424)

MTZ= Martínez de la Torre, PS= Palma Sola, PC= Paso del Cedro, Y = Yanga, RT= Rodríguez Tejada, D= Dobladero, LT= Lerdo de Tejada, SA= Sayula de Alemán, C= Cosoleacaque, M= Minatitlán.



**Figura 28** Respuesta larvaria de *Ae. aegypti* a diferentes concentraciones de **permetrina** en el Estado de Veracruz.



### 6.5.4 Cipermetrina

Para cipermetrina (tabla XVII, figura 29) tenemos que la población menos susceptible en base a la CL<sub>50</sub> fue MTZ>PS=PC=Y=D=LT=C>SA>RT=M, en este caso el 60% de las localidades presentaron la misma respuesta al insecticida. Para el caso de la CL<sub>95</sub> al igual que para temefos, malatión y permetrina, se presentó la mayor variación en las poblaciones de *Ae. aegypti* estudiadas. Los valores de CL<sub>95</sub> de mayor a menor fueron: LT>PC>D>PS>Y>RT>SA>C>M>MTZ. Las diferencias registradas en los valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> no fueron significativas (hay traslape en los valores de intervalo de confianza al 95%).

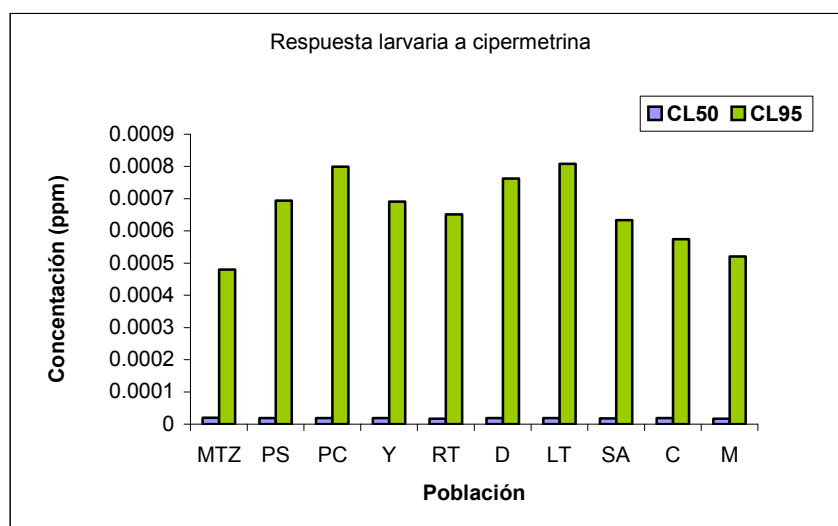
**Tabla XVII**

Susceptibilidad larvaria de *Ae. aegypti* a diferentes concentraciones de **cipermetrina** en el Estado de Veracruz

LOCALIDADES	CL <sub>50</sub> (ppm)	Límite Inf. – Límite Sup. (50%CL)	CL <sub>95</sub> (ppm)	Límite Inf. – Límite Sup. (95%CL)
MTZ	0.000020	0.000017-0.000022	0.000480	0.000336-0.000746
PS	0.000019	0.000016-0.000022	0.000694	0.000456-0.001173
PC	0.000019	0.000017-0.000023	0.000799	0.000514-0.001393
Y	0.000019	0.000016-0.000022	0.000691	0.000455-0.001166
RT	0.000017	0.000015-0.000020	0.000651	0.000426-0.001110
D	0.000019	0.000016-0.000022	0.000763	0.000494-0.001321
LT	0.000019	0.000016-0.000022	0.000808	0.000518-0.001417
SA	0.000018	0.000016-0.000021	0.000633	0.000422-0.001050
C	0.000019	0.000016-0.000022	0.000574	0.000389-0.000929
M	0.000017	0.000014-0.000019	0.000521	0.000357-0.000831

MTZ= Martínez de la Torre, PS= Palma Sola, PC= Paso del Cedro, Y= Yanga, RT= Rodríguez Tejada, D= Dobladero, LT= Lerdo de Tejada, SA= Sayula de Alemán, C= Cosoleacaque, M= Minatitlán





**Figura 29** Respuesta larvaria de *Ae. aegypti* a diferentes concentraciones de cipermetrina, en el Estado de Veracruz.

### 6.5.5 Bifentrina

Los resultados se presentan en tabla XVIII y figura 30. En base a los valores de CL<sub>50</sub> la población larvaria menos susceptible fue la de PC, siendo mayor que LT y SA, estas últimas mayores a MTZ, Y, RT, D, C y M, siendo menos susceptibles a PS. La población larvaria del 60% de las localidades registró la misma respuesta a bifentrina. Los valores de CL<sub>95</sub> indican mayor variación en la respuesta de las poblaciones larvarias de *Ae. aegypti*, encontrando mayores para: PC > D > LT > SA > M > RT > Y > C > PS > MTZ. En ninguno de los casos se registra diferencia significativa en la susceptibilidad de *Ae. aegypti* a la bifentrina ( $p \leq 0.05$ ). Cabe señalar que este insecticida no ha tenido historia de uso en México para el control de este vector.

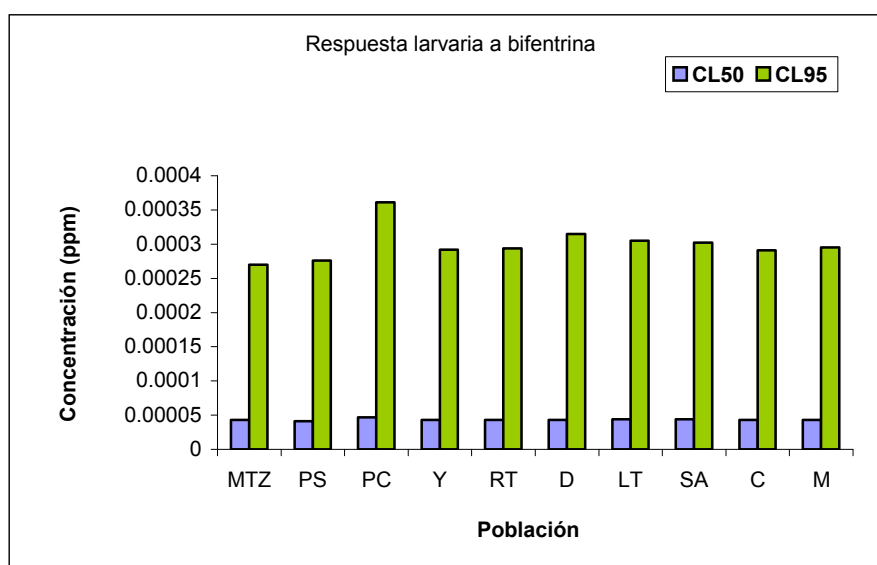


**Tabla XVIII**

Susceptibilidad larvaria de *Ae. aegypti* a diferentes concentraciones de **bifentrina** en el Estado de Veracruz.

LOCALIDADES	CL <sub>50</sub> (ppm)	Límite Inf. - Límite Sup. (50%CL)	CL <sub>95</sub> (ppm)	Límite Inf. - Límite Sup. (95%CL)
MTZ	0.000043	(0.000040-0.000046)	0.000270	(0.000228-0.000330)
PS	0.000041	(0.000038-0.000044)	0.000276	(0.000230-0.000341)
PC	0.000047	(0.000043-0.000051)	0.000361	(0.000294-0.000461)
Y	0.000043	(0.000040-0.000047)	0.000292	(0.000244-0.000361)
RT	0.000043	(0.000040-0.000047)	0.000294	(0.000246-0.000364)
D	0.000043	(0.000040-0.000047)	0.000315	(0.000260-0.000394)
LT	0.000044	(0.000040-0.000047)	0.000305	(0.000253-0.000380)
SA	0.000044	(0.000040-0.000047)	0.000302	(0.000252-0.000376)
C	0.000043	(0.000040-0.000047)	0.000291	(0.000243-0.000359)
M	0.000043	(0.000040-0.000047)	0.000295	(0.000246-0.000366)

MTZ= Martínez de la Torre, PS= Palma Sola, PC= Paso del Cedro, Y = Yanga, RT= Rodríguez Tejada, D= Dobladero, LT= Lerdo de Tejada, SA= Sayula de Alemán, C= Cosoleacaque, M= Minatitlán



**Figura 30** Respuesta larvaria de *Ae. aegypti* a diferentes concentraciones de **bifentrina** en el Estado de Veracruz



## 7. DISCUSIÓN

La dosis diagnóstico en mosquitos adultos obtenida por Flores y colaboradores en el 2005, para el Estado de Baja California fue 172  $\mu\text{g/ml}$ , al igual que para las poblaciones de Nayarit y Sinaloa. Fue la mas alta concentración probada , siendo la menor 21.5  $\mu\text{g/ ml}$ , a pesar de esto la presión ejercida sobre la población expuesta no fue suficiente para revelar resultados claros, lo que sugiere que se pueden probar dosis con mayor concentración del ingrediente activo.

En relación con los mecanismos asociados a la resistencia a permetrina, otros autores (Mazzari y Georghiou, 1995), realizaron un estudio con 3 poblaciones de *Aedes aegypti* (L), para analizar la resistencia a temefos, malatión y proporxur, se realizaron pruebas con el sinergista piperonil butóxido (un inhibidor de oxidasas). Las pruebas bioquímicas mostraron cantidades significativas en la actividad de esterasas, mientras que la acetilcolinesterasa insensible no mostró estar involucrada en la resistencia a organofosforados o carbamatos. En contraste, en la población de Culiacán se encontró que la acetilcolinesterasa insensible es un mecanismo muy importante para la detoxificación de piretroides, en específico permetrina. Sin embargo no existe evidencia clara de que este sea el mecanismo único seleccionado debido a que otras enzimas como oxidasas de función múltiple y  $\alpha$  esterasas mostraron una alta actividad en las pruebas bioquímicas.



Algunos autores sugieren que las glutatión s-transferasas no tienen un papel primordial en la detoxificación de permetrina (Vulule *et al.*, 1996), en apoyo a esto los resultados del presente estudio mostraron porcentajes de la población en mosquitos sobrevivientes ligeramente mas altos que en los moscos muertos, lo que indica que esta enzima no esta siendo un mecanismo seleccionado para detoxificar permetrina en ninguna de las cuatro poblaciones estudiadas.

Otro estudio con *Aedes aegypti* (L) en el Estado de Baja California México, para probar bioquímicamente enzimas relacionadas con la resistencia mostró una alta proporción en la actividad de  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas así como, glutatión s-transferasas, sin embargo no reveló un patrón claro de resistencia a permetrina para dicho Estado (Flores *et al.*, 2005). A pesar de esto, en la localidad de Compostela se presentó una actividad muy alta de  $\alpha$  esterasas en la población de mosquitos sobrevivientes, lo que indica que este mecanismo es primordial para detoxificar permetrina, al menos para esta zona en particular, ya que la diferencia en el porcentaje de los mosquitos vivos y muertos que sobrepasaron el umbral de tolerancia no es muy alta.

Un estudio en Kenia (Vulule *et al.*, 1999), sobre la tolerancia a permetrina en el mosquito *Anopheles gambiae* midió la actividad de oxidasas en dos poblaciones, de las cuales una estaba expuesta a redes impregnadas de dicho insecticida y la otra no. Se encontró que la población expuesta presentaba niveles mas altos en la actividad de oxidasas en comparación con la población no expuesta.



Posteriormente se realizaron pruebas con un inhibidor de la actividad de oxidasas (piperonil-butóxido), lo que provocó alta mortalidad de los mosquitos sometidos a estas pruebas, indicando que el mecanismo de oxidasas de función múltiple (MFO) es seleccionado para metabolizar permetrina. Es importante subrayar que a diferencia de lo encontrado en el estudio previamente citado nosotros obtuvimos mayor actividad de otras enzimas, como por ejemplo las  $\alpha$  esterasas en todas las poblaciones analizadas, aunque se trata de una especie diferente de mosquito, a pesar de que se trató con el mismo insecticida. Así en el Estado de Sinaloa y en el de Nayarit, encontramos que la  $\alpha$  esterasa fue uno de los mecanismos de resistencia mas evidentes en las poblaciones de mosquitos vivos. En cambio la enzima acetilcolinesterasa no fue un mecanismo relevante en el desarrollo de la resistencia a permetrina. Los resultados sugieren que las poblaciones de mosquitos en estos estados presentan un incremento en la participación de las oxidasas de función múltiple en la adquisición de resistencia a permetrina.

Conviene hacer hincapié, que en la población de mosquitos vivos las  $\alpha$  esterasas, las  $\beta$  esterasas y las oxidasas de función múltiple tuvieron diferencia significativa con respecto a la cepa de referencia y entre todas las poblaciones de Sinaloa y Nayarit. La enzima acetilcolinesterasa, por el contrario solo mostró diferencia significativa con respecto a la cepa New Orleans pero no obtuvo diferencia significativa con los demás poblaciones.

Es importante destacar que en nuestro estudio las  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas son los mecanismos asociados a resistencia a permetrina mas importantes coincidiendo con los resultados encontrados por Flores en el 2006 en Quintana Roo, donde las  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas fueron los mecanismos de detoxificación en los mosquitos hembras.



De manera general podemos decir que en los Estados de Nayarit y Sinaloa no hay un mecanismo único y exclusivo de detoxificación de permetrina, sin embargo destaca el mecanismo de  $\alpha$  esterasas en ambos casos. La diferencia significativa entre las poblaciones de vivos y muertos para este grupo de enzimas lo corroboran, sin embargo, también se encontró diferencia significativa entre poblaciones con otros tipos de enzimas asociadas a la resistencia, por ejemplo oxidasas de función múltiple. Estos resultados son similares a los encontrados en el Estado de Quintana Roo (Flores *et al.*, 2006), dónde se cuantificaron los mismos mecanismos enzimáticos de detoxificación también para el insecticida permetrina, y dónde a pesar de que no se reveló un mecanismo único de detoxificación, el nivel de actividad de  $\alpha$  esterasas también fue mayor. La resistencia a organofosforados en *Culex sp.*, *Anopheles sp* e incluyendo a *Aedes sp.*, se han relacionado a altos niveles de esterasas, las cuales actúan haciendo lento el metabolismo del insecticida. Se sabe que las esterasas tienen diversas funciones en insectos entre las cuales se encuentran proteólisis, funcionamiento del sistema nervioso, metabolismo hormonal y metabolismo de xenobióticos. Diversos estudios en insectos indican una relevancia específica de las esterasas en el metabolismo de xenobióticos incluyendo *Ae. aegypti*. La resistencia en este vector indica que este es uno de los factores mas importantes en los programas de control de dengue (Flores *et al.*, 2006).

En las dos poblaciones del Estado de Sinaloa (Culiacán y Mazatlán), la enzima glutatión s-transferasa no mostró diferencia significativa, lo que puede indicar que este mecanismo no participa de manera importante para detoxificar al piretroide permetrina, en dicho Estado.



La enzima  $\beta$  esterasa mostró diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre todas las poblaciones de mosquitos vivos y muertos excepto en la población de Mazatlán, además de que la absorbancia promedio para dicha enzima en la población de mosquitos muertos es ligeramente mayor que en los mosquitos vivos. Sucedió lo mismo en el Estado de Baja California entre las poblaciones de Tijuana y Loreto, dónde tampoco se obtuvo diferencia significativa entre ellas y los valores de absorbancia promedio también fueron muy similares (Flores *et al.*, 2005). Los valores promedio que se obtuvieron para el Estado de Quintana Roo también fueron muy parecidos entre las poblaciones de mosquitos de Isla Mujeres y Solidaridad y en las cuales tampoco se observó diferencia significativa (Flores *et al.*, 2006). Tanto en el análisis realizado en Quintana Roo como en Baja California, los valores de absorbancia promedio de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y la enzima acetilcolinesterasa insensible (iAChE), fueron menores que la cepa de referencia New Orleans (NO), que es igual a lo obtenido en las poblaciones de Sinaloa y Nayarit. Estos resultados sugieren que AChE y iAChE no son mecanismos importantes de detoxificación de permetrina, en el vector *Aedes aegypti* (L), en los tres Estados antes mencionados.

Otro aspecto que no permite definir un mecanismo único de detoxificación de permetrina en Sinaloa y Nayarit es que se observan valores promedio de absorbancia mayores en algunas poblaciones de mosquitos muertos, como es el caso de  $\alpha$  esterasas en las poblaciones de New Orleans y Mazatlán. Esta característica está más marcada en las GST en la población de referencia New Orleans.



Sin embargo para la mayor parte de las poblaciones los mosquitos vivos obtuvieron los valores promedio mas altos, en cada enzima probada.

En relación con la susceptibilidad larvaria en Veracruz, algunos autores establecen que el número de poblaciones de insectos vectores resistentes es dependiente del volumen y frecuencia de aplicación de insecticidas utilizados para su control, además de las características inherentes de las especies involucradas. En el caso particular de *Ae. aegypti* en Veracruz, el uso de insecticidas tales como temefos, larvicida y malatión como adulticida (ahora substituido por Aqueslin<sup>®</sup> Super, I.A. permetrina) han sido la herramienta de control más utilizada contra este vector, situación general en todo México. Es de suponerse que las poblaciones se verán afectadas de manera variable dependiendo de la historia de aplicación. Los resultados de susceptibilidad de *Ae. aegypti*, basados en CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> nos muestran una homogeneidad en la respuesta (mortalidad) a través de las diferentes localidades estudiadas y en cada uno de los insecticidas probados. Esto es más evidente en la susceptibilidad a temefos y malathión. En el caso particular de piretroides existe una variación en la susceptibilidad más marcada y siendo más evidente para el caso de la CL<sub>95</sub>.

Si comparamos los resultados de susceptibilidad a temefos en *Ae. aegypti* con los resultados obtenidos por Rodríguez y colaboradores en 1999 en una población de Santiago de Cuba, podríamos concluir que las poblaciones de Veracruz son más susceptibles a dicho larvicida. En este caso no podríamos hablar de niveles de resistencia ya que en la presente investigación no se estableció la respuesta de una población susceptible del mosquito.



Los resultados presentados aquí nos demuestran una parte inicial de un estudio integral para la detección de resistencia de las poblaciones del vector en campo. Un estudio más completo incluiría bioensayos con adultos y posteriormente pruebas bioquímicas y herramientas moleculares. Sin embargo, los estudios de susceptibilidad utilizando la técnica de bioensayo son una herramienta primordial para establecer un panorama general sobre la efectividad, no comprobada, que los plaguicidas podrían estar teniendo o no en el campo.

Los bioensayos han sido utilizados tradicionalmente, en el estudio de la resistencia a insecticidas, pero estos requieren de un gran número de mosquitos para producir una base de datos minuciosa. Estos métodos permiten cuantificar el nivel de resistencia a insecticidas, pero no detectan los mecanismos responsables de esta. Los métodos de detección de los mecanismos de resistencia permiten conocer los fenotipos multirresistentes mediante el uso de ensayos replicados, además proveen más información por insecto sobre el estado de la resistencia a insecticidas en una población de mosquitos y sus patrones de resistencia cruzada y detectan con precisión el nivel genotípico. Esto diferencia los individuos resistentes homocigóticos de los heterocigóticos. Por consiguiente en estos ensayos bioquímicos se puede evaluar el efecto de un tratamiento con plaguicidas en el campo, al medir la frecuencia de genes de los mecanismos de resistencia específicos, y la posible disminución de la frecuencia de estos genes en ausencia de presión selectiva con plaguicidas. Toda esta información es importante a la hora de tomar decisiones sobre la política de uso de insecticidas en los programas de control de *Ae. aegypti* (Rodríguez *et al.*, 2001).



Una de las estrategias para evitar la aparición de resistencia serían las rotaciones o mosaicos de insecticidas. Se han aplicado modelos matemáticos para estimar como utilizar estas herramientas de manera óptima, sin embargo, raramente se han probado en campo (Hemingway y Ranson 2000).

En este caso las técnicas bioquímicas y moleculares para la estimación de frecuencia de genes de resistencia, las estrategias de manejo de resistencia en campo serían más prácticas.



## 8. CONCLUSIONES

La dosis diagnóstico obtenida en poblaciones adultas de *Aedes aegypti* (L) al insecticida permetrina fue 172 µg/ml en los Estados de Nayarit y Sinaloa, México.

La máxima variación en la respuesta de las poblaciones larvarias en base a CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> se obtuvo para los insecticidas piretroides y dentro de estos para cypermetrina, seguido de bifentrina y permetrina.

Las poblaciones larvarias de Yanga y Minatitlán, respecto a los valores mínimos y máximos de CL<sub>95</sub> fueron las menos susceptibles al insecticida malatión. Para el insecticida temefos la población de Dobladero fue menos susceptible que Palma Sola, que mostró menos susceptibilidad que Martínez de la Torre, resultando ser la menos susceptible Minatitlán. Para los insecticidas permetrina, cipermetrina y bifentrina las poblaciones larvarias mostraron una alta susceptibilidad.

La heterogeneidad en la respuesta a estos insecticidas es explicada por la historia reciente de uso de los piretroides en el Estado de Veracruz. Esto a su vez explica la homogeneidad en la respuesta a temefos y malatión. Sin embargo, aunque no podemos hablar de resistencia a estos insecticidas organofosforados, los resultados obtenidos sugieren un estrechamiento en la curva de distribución de susceptibilidad de *Ae. aegypti*, lo que resultaría en pendientes de la línea dosis-mortalidad mayores y a su vez una tendencia hacia resistencia.



Hay diversos mecanismos que determinan el nivel de resistencia a permetrina en las poblaciones de adultos, los mas destacados son  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas.

Cabe señalar que en otros mecanismos como oxidasas de función múltiple los porcentajes de los mosquitos vivos que sobrepasaron el umbral de tolerancia muestran una tendencia a la participación de dichas enzimas en la detoxificación de permetrina sobretodo en la población de Mazatlán.

De los mecanismos enzimáticos asociados a la resistencia a permetrina se puede concluir por su cuantificación que el orden de mayor a menor en los poblaciones del Estado de Sinaloa es el siguiente  $\alpha$  esterasas,  $\beta$  esterasas, acetilcolinesterasa insensible (iAChE), oxidasas de función múltiple (MFO), glutatión s-transferasas y acetilcolinesterasa (AChE). En las poblaciones del Estado de Nayarit es  $\alpha$  esterasas, oxidasas de función múltiple (MFO).

En lo referente a los mecanismos enzimáticos de GST y la acetilcolinesterasa insensible (iAChE) no se encontraron resultados concluyentes.

Tanto en las poblaciones del Estado de Sinaloa como en las poblaciones del Estado de Nayarit el mecanismo de menor participación es la enzima acetilcolinesterasa (AChE).



## 9. APÉNDICE



### Equipo para Bioensayo

Botellas de vidrio (Wheaton) 250 ml de capacidad.

Recipientes desechables con capacidad 250/500mL)

Jaulas

Charolas de plástico

Alimento para peces para larvas

Ratones para alimentar mosquitos adultos

Aspirador de mosquitos



### Material para pruebas bioquímicas

Micropipetas

Microplacas

Lector de placas



### Reactivos

Stock de Permetrina

Temefos Ingrediente Activo

$\beta$  naftil acetato

$\alpha$  naftil acetato

O- dianizidina

3 , 3, 5, 5 Tetrametil- Benzidina

Dihidrocloride (TMBZ)

Acetilcolina (ATCh) iodizada

Ácido dithio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB)

Propoxur

Buffer  $K_3PO_4$

Metanol

Buffer acetato de Na





## Preparación de reactivos

- **Buffer de fosfato de potasio ( $K_3PO_4$ )**

Mezclar: 6.6 gr de fosfato de potasio dibásico

1.7 gr de fosfato de potasio monobásico

1000 mL de agua bi-destilada

Ajustar el pH a 7.2

Este buffer se utilizará en varias pruebas y se puede almacenar por tiempo indefinido a temperatura ambiente.

- **Buffer acetato de sodio  $NaC_2H_3O_2$**

Mezclar: 83 mL de acetato de sodio 3 M con 900 mL de agua vi destilada

Ajustar el pH a 5 con ácido acético glacial

Ajustar el volumen final a 1 L.

Este buffer será utilizado en los ensayos de oxidasas y puede ser almacenado indefinidamente a temperatura ambiente.

El  $NaC_2H_3O_2$  3 M puede prepararse disolviendo 408.1 g de  $NaC_2H_3O_2$  en 800 mL de agua; ajustando el volumen final a 1 L.



- **Ensayo de esterasas (no específicas)**

Preparar  $\beta$ -naftil acetato:

Disolver: 56mg de  $\beta$ -naftil acetato

20ml de acetona

Añadir: 80 ml de  $K_3PO_4$

Conservar a 4 °C

Preparar dianisidina y almacenar a 4 °C en ausencia de luz. El color suele ser amarillo pálido. Pesar 100mg de 0-dianisidina tetrazoide. Adherir 100 mL de agua bi-destilada Colocar 100 $\mu$ L del homogenato del mosquito en cada pozo.

- Añadir 100  $\mu$ L  $\beta$ -naftil acetato en cada pozo
- Mantener 10 min a temperatura ambiente.
- Agregar 100  $\mu$ L de dianisidina en cada pozo
- Incubar 2 min y leer usando filtro de 540 nanómetros

control positivo:  $\beta$ -naftil

control negativo: Buffer ( $K_3PO_4$ )

- **Glutation S-transferasas (GST)**

Se emplea para medir el nivel de glutatión S –transferasas

Preparar glutatión reducido:

Mezclar: 61 mg de glutatión reducido  
100 mL del buffer de  $K_3PO_4$

Puede ser viable hasta 4 días a temperatura de 4 °C

### **Preparación CDNB**

Disolver: 20 mg 1-cloro-2-4'-dinitrobenceno  
10 mL Acetona  
90 mL del buffer  $K_3PO_4$

Su caducidad es de 3 o 4 días a 4 °C

- Colocar 100µL del homogenato del mosquito en cada pozo
- Agregar 100µL de glutatión reducido
- Agregar 100µL cDNB
- Leer la placa To a 340nm
- Volver a leer la placa a los 5 min

Obtener diferencia entre To al T<sub>5</sub>

Control : vacío

- **Reacción de oxidasas (MFO)**

Mide los niveles de peroxidasas

### **Preparar TMBZ**

50 mg 3,3', 5,5'-tetrametil-benzidina

Dihidrocloride TMBZ

25 mL de metanol



Añadir: 75 mL de 0.25M del buffer acetato de Na

Se puede almacenar por pocos días y se debe desechar cuando la coloración se torne azul pálido.

- Verter 100  $\mu$ L del homogenato
- Añadir 100  $\mu$ L de TMBZ
- Agregar 1 gota (25  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno al 3%)
- Incubar por 5 min. leer la micro placa usando el filtro de 620 nm
- El pH del buffer acetato de sodio debe ser 5, ajustar el pH con ácido acético.

Control positivo = Citocromo C

Control negativo = Buffer ( $K_3PO_4$ )

- **Acetil colinesterasa (AChE)**

Mide la cantidad de acetil colinesterasa.

### **Preparar ATCH**

Disolver: 75mg de acetilcolina iodide (ATCH) iodizada

10mL de acetona

Agregar: 90mL del buffer  $K_3PO_4$

Se mantiene viable alrededor de 3 o 4 días a 4 °C

### **Preparar DNTB**

13mg de ácido dithio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB)

100mL del buffer  $K_3PO_4$

Se mantiene viable aproximadamente 4 días a 4 °C



- Colocar 100  $\mu$ L del homogenato del mosquito
- Agregar 100  $\mu$ L de ATCH en cada pozo
- Agregar 100  $\mu$ L de DNTB en cada pozo
- Leer la placa inmediatamente ( $T_0$ ) a 414nm
- Leer la placa a los 5 min ( $T_5$ ) a 414nm

Encontrar la diferencia entre los tiempos de lectura

Control negativo: buffer  $K_3PO_4$ .

- **Acetil Colinesterasa insensible (iAChE)**

Determinar si esta presente la acetil colinesterasa

**Preparar ATCH**

Disolver: 75mg de acetilcolina iodide (ATCH) iodizada  
 21 mg de propoxur  
 10mL de acetona

Añadir: 90mL del buffer  $K_3PO_4$

Este es bueno por 3 o 4 días a 4°C

**Preparar DNTB**

13mg de ácido dithio-bis-2-nitrobenzoico  
 100mL del buffer  $K_3PO_4$

A 4 °C es viable por 4 días.

- Colocar 100  $\mu$ L del homogenato
- Agregar 100  $\mu$ L de ATCH en cada pozo



- Agregar 100  $\mu\text{L}$  de DNTB en cada pozo
- Leer la placa en tiempo inicial ( $T_0$ ) a 414nm
- Leer la placa a los 10 min ( $T_{10}$ ) a 414nm

Restar la lectura del  $T_0$  al  $T_{10}$

Control negativo: buffer  $\text{K}_3\text{PO}_4$ .



## 10. LITERATURA CITADA

Benenson A. S. 1997. Manual para el Control de las enfermedades transmisibles.

Décimo sexta edición. OPS. Pp. 68-69

Bregues C., Hawkes N. J., Chandre F., McCarroll L., Duchon S., Guillet P., Manguin S., Morgan J. C., Heminway 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 W.G. 1984. Mosquito protein microassay. Protein determination from small portions of single mosquito homogenates. *Comp Biochem. Physiol.* 79B: 457-460. 1984.

Brogdon W.G., McAllister J. C. 1998a. Insecticide resistance and vector control, CDC, Atlanta, GA, USA. 4(4) pp. 12.

Brogdon W.G., McAllister J. C. 1998b. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in bottles, *Journal of Mosquito Control Association.* 14(2) 159-164.

Brogdon, W. G., McAllister J. C. 1997. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 13: 233-237.

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



Brookes C.P., Loxdale H.D. 1987. Survey of enzyme Variation in British populations of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) on crops and Weed Hosts. Bull. Ent. Res. 77:83-89.

Brown A.W. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. J. Am. Mosq. Control Assoc.2: 123-140.

Brown T. M., and Brodgon W.G. 1987. Improved Detection of Insecticide Resistance Through Conventional and Molecular Techniques. Ann. Rev. Entomol. 32:145-162.

Brusvine J. R. 1980. Recommended Methods for Measurement of Pest Resistance to Pesticides. FAO. Plant Production and Protection Paper 21. FAO. Rome pp.91-102.

Carino F.A., Koener J.F., Plapp F.W., Feyereisen R. 1994. Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene Cyp6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. Insect Biochemistry and Molecular Biology 24: 411-418.

Carrillo R. H. 1984. Análisis de Acción Conjunta de Insecticidas en *Heliothis* ssp. (Lepidoptera: Noctuidae) del Sur de Tamaulipas, México. Agrociencia (México), 57:127-143.

Casida J.E., Quistad GB. 1998. Golden age of insecticide Research: Past, Present or Future? Annual Rev. Entomol. 43:1-16

Chadee D. D. 1988. Landing periodicity of the mosquito *Aedes aegypti* in Trinidad in relation to the timing of insecticidal space-spraying. Med. Vet. Entomol. 2: 189-192.

Chandre F.F., Darriet J.M., Doannio F., Riviere N., Pasteur G. P. 1997. Distribution of organophosphate and Carbamate resistance in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in West Africa. J. Med. Entomol. 34 (6): 664-671.

Chin J. 2001. El control de las enfermedades transmisibles 17ª edición. Washington DC: OPS © Publicación Científica y Técnica No. 581. 77 pp.

Cohen M.B., Koener J.F., Feyereisen R. 1994. Structure and chromosomal localization of Cyp6A1, a cytochrome P450-encoding gene from the house fly. Gene. 146: 267-272.

Clementes A. N. 1992. The Biology of mosquitoes. Volume 1. evelopment, Nutrition and Reproduction. Champan & Hall, Boundary Row. London pp. 235-240.

Cygler M., Schrag J.D., Sussman J.L., Harel M., Silman I., Gentry M.K. 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. Protein Sci. 2: 366-382.

Dauterman W.C. 1985. Insecto metabolism: extramicrosomal. Comprehensive insecti physiology biochemistry and pharmacology. Vol 12. Pergamin, Oxford G.A. Kerkut and L. I. Gilbert (eds) pp 713-730.

Devonshire A.L. 1977. The Properties of Carboxylesterase From Peach- Potato Aphid, *Myzus persicae* (Sulz.) and its Role in Conferring Insecticide Resistance. Biochem. J. 167:675-683.

Devonshire A.L., Moores G.D. 1984a. Characterication of insecticide-insensitive acetylcholinesterase: microcomputer-based analysis of enzyme inhibition in



homogenates of individual house fly (*Musca domestica*) heads. *Pest. Biochem. Physiol.* 21:341-348.

Devonshire A. L., Moores G. D. 1984b. Different forms of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant house flies (*Musca domestica*). *Pest. Biochem. Physiol.* 21:336-340.

FAO, 1979. Recommended methods for detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. *FAO Plant Protection Bull.* 27:29-32.

Fernández S. I., 1995. El papel del vector *Aedes aegypti* en la epidemiología del Dengue en México. *Rev. Sal. Publ.* 37:45-51

Fernández S. I., 1999. *Biología y Control de Aedes aegypti*. manual de Operaciones. Editorial UANL. ISBN 968-780 -88-8 Monterrey, México.

Flores A. E., Walter, A. V., Fernández S. I., Badii M. H., Loaiza B. H., Ponce G. G., Fuentes S. L., Brodgon, W. G., Black IV, W. C. and Beaty B. 2005. Elevated  $\alpha$ -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L) from Baja California, México. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 82 (2005) pp 66-78.

Flores A. E., Salomón J. G., Fernández S. I., Ponce G. G., Loaiza B. H., Fuentes S. L., Brodgon W. G., Black IV, W. C., and Beaty B. 2006. Mechanisms of insecticide in field populations of *Aedes aegypti* (L), from Quintana Roo, Southern México. *Journal of American Mosquito Control Association*, 22(4): 672-677.

French-Constant R.H., Steichen J., Rocheleau T.A., Aronstein K., Roush R.T. 1993. A single amino acid substitution in a beta-aminobutyric acid subtype A receptor locus

associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 1957-1961.

Fukuto T. R. 1974. Effect of Structure on the Interaction of Organophosphorus and Carbamate Esters with Acetylcholinesterase. In Narahashi, T. (ed). Neurotoxicology of Insecticides and academy of Sciences. 160(1):97-111.

Georghiu G. P. 1963. Comparative Susceptibility to Insecticides of two Green Peach Aphid Populations, Collected 16 years apart. J. Econ. Entomol. 56 (5):655-657.

Georghiu G. P. 1965. Genetic Studies on Insecticide Resistance. Adv. Pest Control Res. 6:171.

Georghiu G. P., Pateur N., y Hawley M. K. 1980. Linkage relationships between Organophosphate resistance and a highly active esterase-B in *Cules quinquefasciatus* from California. J. Econ. Entomol. 73:301-305.

Georghiu G. P., Lagunes-Tejeda A. 1991. The Occurrence of Resistance to Pesticides in Arthropods. An Index of Cases reported through 1989. FAO. Rome 318 pp.

Georghiu G.P., Mellon R. B. 1982. Pesticide resistance in time and space. En Georghiu G. P., and T. Saito. (eds). Pest Resistance to Pesticides. Plenum Press. New York. pp 1-15.

Gubler D. J., Kuno G. 1997. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. CAB International, New York. ISBN 0 85199 134 3.

Harwood R. F., James M. T. 1988. Entomología Médica y Veterinaria. Ed. LIMUSA. México. D. F. pp 615



Hassall K. A., 1969. World Crop Protection: Pesticides. Vol 2. Iiiffe Books LTD, Londres. Pp.138

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

Hawley W. A., 1988. The biology of *Aedes albopictus* J. Am. Mosquito ctrl. Assoc. 4 (suplement)

Hemingway J.C., Smith K.G., Jayawardena P.R., Herat. 1986. Field and laboratory detection of the altered acetylcholinesterase resistance genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes (Diptera:Culicidae) *Bull.Entomol.Res.* 76:559-565.

Hemingway J., Karunaratne S.P. 1998. Mosquito carboxylesterase: Overview of the molecular biology and biochesmitry of a mayor insecticide resistance mechanism. *Med. Vet. Entomol.* 12:1-12

Hemingway J., Penilla R.P., Rodriguez A.D., James B.M., Edge W. 1997. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. A large scale trial in Southern Mexico. *Pest. Sci.* 51: 375-382.

Hemingway J. H., Ranson. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Ann. Rev. Entomol.* 45: 371-391.

Krogstad D.J., 1996. Malaria as a reemerging disease. *Epidemiol. Rev.* 18: 77-89.

Lagunes T. A., Villanueva J. 1994. Toxicología y Manejo de Insecticidas. Colegio de Posgraduados, México.pp.205



Lagunes T. A., Rodríguez J. C. 1989. Grupos Toxicológicos de Insecticidas y Acaricidas. Los mecanismos de resistencia como base para el manejo de insecticidas y acaricidas. 2ª edición. Centro de Entomología y Acarología. 30 Aniversario Colegio de Postgraduados. Chapingo-Montecillo, México pp. 228

Lagunes T. A. 1991. Notas del Curso de Toxicología y Manejo de Insecticidas Centro de Entomología y Acarología. 30 Aniversario Colegio de Postgraduados. Chapingo-Montecillo, México pp.195

Lengeler C., Snow R.W. 1996. From efficacy to effectiveness: insecticide-treated bednets in Africa. Bull World Health Organ. 74: 325-332.

Melander A. L. 1914. Can Insects Become Resistant to Sprays? J. Econ. Entomol. 7:167-172

Martinez-Torres F., Chandre M. S., Williamson F., Darriet J. B., Bergé A. L., Devonshire P., Guillet N., Pasteur D., Pauron. 1998. Insect Molecular Biology, 7(2) 179-184

Méndez G. J. 1992. Manual para la prevención y control del Dengue en México. Secretaría de Salud, Dir. Gen. Epidemiología, México, pp 86.

Miyazaki M., Ohyama K., Dunlap D.Y., Matsumura F. 1996. Cloning and sequencing of the para-types sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). Mol. Gen. Genet. 252: 61-68.

Mullin C. A., Scott J. G. 1991. Biomolecular Basis for resistance, Classification and Comparisons. American Chemical Society. Washington, DC. 1-13

OMS 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitos to organophosphate and carbamate insecticides-diagnostic test. WHO/VCB/81.806.

OMS 1992. Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the expert committee on vector biology and control. In WHO Tech. Rep. Ser. 818: 1-55.

Patil N.S., Lole K.S., Deobagkar D.N. 1996. Adaptive larval thermotolerance and induced cross-tolerance to propoxur insecticides in mosquitoes *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. Med. Vet. Entomol. 10: 277-282.

Penilla R.P., Rodríguez A.D., Hemingway J. L., Torres J. I., Arredondo-Jimenez, Rodríguez M.H. 1998. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in México. Med. Vet. Entomol. 12: 217-233.

Rivet Y., Raymond M., Rioux J.A., Delalbre A., Pasteur N. 1994. Resistance monitoring in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from central-eastern France. J. Med. Entomol. 31: 231-239.

Rodríguez M. M., Bisset A. J., Mila L. H., Calvo E., Soca L. A. 2001. Niveles de resistencia y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. Rev. Cubana Med. Trop. 51(2):83-88 pp.

Roush R. T. 1989. Designing resistance management programmes: how can you choose? Pestic. Sci. 26: 423-42.

Sawicki R. M. 1987. Definition, detection and documentation of insecticide resistance; combating resistance to xenobiotics; biological and chemical approaches. M. G. Ford, D. W. Holloman, BPS. Khambay and R.M. Sawicki (eds). Ellis Horwood, Chichester, England. 105-117 pp.

Scott T. W., Chow E., Strickman D., Kittayapong P., Wirtz R., Lorenz L. H. 1993. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural village. *J. Med Entomol.* 5:922-927 pp.

Soderlund D.M., Sanborn J.R., Lee P.W. 1983. Metabolism of pyrethrins and pyrethroids in insects, in: D. Hutson, T.R. Roberts (Eds.), *Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, New York. pp. 401-435.

Soderlund D. M., Bloomquist J. R., Wong F., Pyne L.L., Knipple D. C. 1989. Molecular Neurobiology: Implications for Insecticide action and Resistance. *Pestic. Sci.* 26:359-374 pp.

Tabashnik B.E. 1989. Managing resistance with multiple pesticide tactics: theory, evidence and recommendation. *J. Econ. Entomol.* 82: 1263-1269.

Tomita T., Liu N., Smith F.F., Shridhar P., Scott J.G. 1995. Molecular mechanisms involved in increased expression of a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in the housefly, *Musca domestica*. *Insect. Mol. Biol.* 4: 135-140.

Vais H., Williamson M.S., Hick C.A., Eldursi N., Devonshire A.L., Usherwood P.N. 1997. Functional analysis of a rat sodium channel carrying a mutation for insect knock-down resistance (kdr) to pyrethroids. *FEBS Lett.* 413: 427-332.

Vulule J.M., Beach R.F., Atieli F.K., Mount D.L., Roberts J.M., Mwangi R.W. 1996. Long-term use of permethrin-impregnated nets does not increase *Anopheles gambiae* permethrin tolerance. *Med. Vet. Entomol.* 10: 71-79.



WHO, 1992. Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the expert committee on vector biology and control. In WHO Tech. Rep. Ser. 818: 1-55 pp.

Wilkinson C.F. 1976. Insecticide biochemistry and physiology. New York: Plenum Press, p. 768.

Williamson M.S., Martinez-Torres D., Hick C.A., Devonshire A.L. 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 252: 51-60.

Zhou Z-H., Syvanen M.A. 1997. A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*. *Mol. Gen. Genet.* 256: 187-194.

