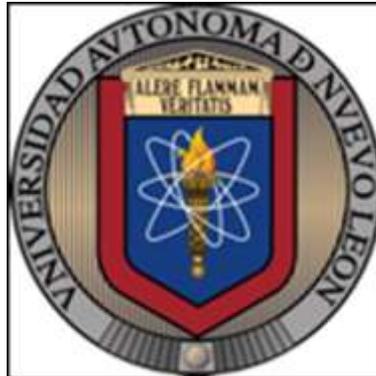


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



MECANISMOS DE RESISTENCIA ENZIMÁTICA EN SIETE SUB-POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.) A INSECTICIDAS COMUNES Y ALTERNATIVOS PARA SU CONTROL EN EL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO.

Por

BRENDA GUADALUPE SILVA SALINAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA

Septiembre, 2010

MECANISMOS DE RESISTENCIA ENZIMÁTICA EN SIETE SUB-POBLACIONES
DE *Aedes aegypti* (L.) A INSECTICIDAS COMUNES Y ALTERNATIVOS PARA SU
CONTROL EN EL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO.

Comité de Tesis

Director: Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez

Secretario: Dr. Gustavo Ponce García

Vocal: Dr. Humberto Quiroz Martínez

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE TABLAS	viii
AGRADECIMIENTOS	xi
DEDICATORIA	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCION	15
2. HIPOTESIS.....	17
3. OBJETIVOS	18
4. ANTECEDENTES.....	20
4.1. <i>Aedes aegypti</i> : Ciclo Biológico, Importancia como Vector y Control	20
4.2. Insecticidas.....	23
4.2.1. Mecanismos de Acción de los Insecticidas.....	24
4.2.2. Insecticidas Piretroides.....	25
4.3. Resistencia a Insecticidas en Vectores.....	30
4.4. Detección de la Resistencia en una Población: Bioensayos	32
4.5. Mecanismos de Resistencia a Insecticidas.....	34
4.5.1. Resistencia Metabólica.....	36
4.5.1.1. Carboxil-Esterasas	36
4.5.1.2. Monoxidasas del citocromo-P450.....	39
4.5.1.3. Glutación-s-Transferasas	40
4.5.2. Resistencia por Sitio Blanco	41
4.5.2.1. Acetilcolinesterasa Insensitiva.....	41
4.5.2.2. Receptores GABA.....	43
4.5.2.3. Canales de Sodio.....	44
4.6. Situación Edidemiologica del dengue en el estado de Veracruz	46
5. METODOLOGIA	48
5.1. Área de Estudio.....	48
5.2. Material biológico.....	50
5.2.1. Establecimiento de colonias en laboratorio.....	50
5.3. Procedimiento para determinar susceptibilidad y/o resistencia en larvas de <i>Ae. aegypti</i> al organofosforado temefos	52
5.4. Procedimiento para determinar susceptibilidad y/o resistencia en mosquitos adultos de <i>Ae. aegypti</i> a piretroides	54
5.4.1. Metodología para la preparación de la botella (Método CDC).....	57

5.5. Separación del material biológico para la realización de pruebas bioquímicas	58
5.6. Determinación de Mecanismos de Resistencia	59
5.6.1. Prueba de α y β -esterasas	59
5.6.2. Prueba de hemoperoxidasas	59
5.6.3. Prueba glutatións-transferasas	60
5.6.4. Prueba de acetilcolinesterasa insensible	60
5.7. Análisis de Resultados	60
6. RESULTADOS	61
6.1. Determinación de la susceptibilidad y/o resistencia al organofosforado temefos	61
6.2. Mecanismos enzimáticos y umbral de tolerancia de la cepa de referencia	62
6.3. Mecanismos enzimáticos y umbral de tolerancia en sub-poblaciones larvarias del estado de Veracruz	64
6.4. Análisis y Comparaciones de medias de absorbancia obtenidas entre las sub-poblaciones larvarias de <i>Ae.aegypti</i> del estado de Veracruz expuestas al organofosforado temefos	65
6.4.1. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en sub-poblaciones larvarias de <i>Ae.aegypti</i> del estado de Veracruz expuestas al organofosforado temefos	68
6.5. Análisis y comparaciones de medias de absorbancia obtenidas entre sub-poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> del estado de Veracruz que no fueron expuestas al organofosforado temefos	69
6.5.1. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en sub-poblaciones larvarias de <i>Ae. aegypti</i> del estado de Veracruz sin haber sido expuestas al organofosforado temefos	71
6.6. Determinación de la susceptibilidad y/o resistencia a insecticidas piretroides	72
6.7. Mecanismos enzimáticos y umbral de tolerancia de la cepa de referencia	77
6.8. Mecanismos enzimáticos y umbral de tolerancia en sub-poblaciones de <i>Ae.aegypti (L.)</i> de Veracruz, México	79
6.9. Análisis y comparaciones de medias de absorbancia obtenidas entre las sub-poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> del estado de Veracruz que fueron expuestas a piretroides	85
6.9.1. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos <i>Ae. aegypti (L.)</i> del estado de Veracruz expuesto a fenotrina	99
6.9.2. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos <i>Ae. aegypti</i> del estado de Veracruz expuesto a permetrina	100
6.9.3. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos <i>Ae. aegypti</i> del estado de Veracruz expuesto a deltametrina	101
6.9.4. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos <i>Ae. aegypti</i> del estado de Veracruz expuesto a cipermetrina	102
6.9.5. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos <i>Ae. aegypti</i> del estado de Veracruz expuesto a z-cipermetrina	103

6.9.6. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos <i>Ae. aegypti</i> del estado de Veracruz expuesto a alfa-cipermetrina.....	104
6.9.7. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos <i>Ae. aegypti</i> del estado de Veracruz expuesto a lambdacialotrina	105
6.9.8. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos <i>Ae. aegypti</i> del estado de Veracruz expuesto a bifentrina.....	106
6.9.9. Análisis y comparaciones de medias de absorbancia obtenidas entre las sub-poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> (<i>L.</i>) del estado de Veracruz que no fueron expuestas a piretroides.	107
6.9.10. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos <i>Ae. aegypti</i> (<i>L.</i>) del estado de Veracruz que no fueron expuestos a piretroides.	109
7. DISCUSIONES.....	110
8. CONCLUSIONES	113
APENDICES.....	115
9. LITERATURA CITADA.....	199
RESUMEN BIOGRAFICO	211

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de la permetrina.	28
2. Mapa del Estado de Veracruz	48
3. Acondicionamiento de larvas colectadas en el insectario.....	58
4. Distribución de larvas en charolas por sub-población.	58
5. Cámaras de emergencia y jaulas para mosquitos.....	51
6. Alimentación de mosquitos con naranja y sangre de rata	51
7. Vasos con papeletas dentro de la jaula para la ovoposición de huevecillos.	52
8. Charola con papeletas para eclosionar huevecillos.....	52
9. Recipientes con 99ml de agua de clorada correctamente etiquetados para la realización de bioensayos en larvas.	53
10. Mosquitos aspirados y transferidos a las botellas.	55
11. Cámaras de recuperación utilizadas.	56
12. Material necesario para impregnar las botellas.....	58
13 Valores medios de absorbancia en larvas <i>Ae. aegypti</i> (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de temefos obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.	67
14. Valores medios de absorbancia en larvas <i>Ae. aegypti</i> (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que no fueron expuestas al organofosforado temefos obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.	70
15. Resistencia Knockdown en sub-poblaciones del estado de Veracruz.....	75
16. Resistencia dosis letal media DL ₅₀ en sub-poblaciones del estado de Veracruz	76

17. Valores medios de absorbancia de hembras <i>Ae. aegypti</i> (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de fenotrina obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas	91
18. Valores medios de absorbancia de hembras <i>Ae. aegypti</i> (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de permetrina obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.	92
19. Valores medios de absorbancia de hembras <i>Ae. aegypti</i> (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de deltametrina obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.....	93
20. Valores medios de absorbancia de hembras <i>Ae. aegypti</i> (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de cipermetrina obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.....	94
21. Valores medios de absorbancia de hembras <i>Ae. aegypti</i> (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de z-cipermetrina obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.....	95
22. Valores medios de absorbancia de hembras <i>Ae. aegypti</i> (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de alfa-cipermetrina obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.	96
23. Valores medios de absorbancia de hembras <i>Ae. aegypti</i> (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de lambdacialotrina obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.....	97
24. Valores medios de absorbancia de hembras <i>Ae. aegypti</i> (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de bifentrina obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.....	98
25. Valores medios de absorbancia de hembras <i>Ae. aegypti</i> (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que no tuvieron exposición a piretroides obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.	108

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Casos de Dengue período 2007-2009 a nivel nacional y en el estado de Veracruz, México.....	47
2. Insecticidas empleados para la determinación de susceptibilidad.....	54
3. Ejemplo sobre cómo realizar la selección de volumen del stock para impregnar las botellas.....	58
4. Toxicidad (CL_{50}) y razón de resistencia (RR50) de larvas <i>Ae aegypti</i> (L.) de las subpoblaciones del estado de Veracruz, México expuestas a temefos.....	62
5. Valores máximos de absorbancia (umbral de tolerancia) obtenidos a partir de la cepa de referencia New Orleans expuesta al organofosforado temefos.....	63
6. Valores máximos de absorbancia (umbral de tolerancia) obtenidos a partir de la cepa de referencia New Orleans no expuesta al organofosforado temefos.....	63
7. Porcentaje de individuos <i>Ae.aegypti</i> que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans al ser seleccionados con temefos.....	64
8. Porcentaje de individuos <i>Ae.aegypti</i> que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans sin tener selección previa con temefos.....	65
9. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas en larvas <i>Ae. aegypti</i> (L.) que fueron expuestas al organofosforado temefos y comparación de medias respecto a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$).....	66

10. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas larvas <i>Ae. aegypti</i> (L.) que no fueron expuestos al organofosforado temefos y comparación de medias respecto a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey).....	69
11. Susceptibilidad en mosquitos adultos de <i>Ae. aegypti</i> (L.) del estado Veracruz, México a insecticidas piretroides a 1 h de exposición (KD ₅₀) y 24 h postrecuperación(DL ₅₀)	74
12. Valores máximos de absorbancia (umbral de tolerancia) obtenidos a partir de la cepa de referencia New Orleans la cual no tuvo exposición a insecticidas piretroides.....	77
13. Valores máximos de absorbancia (umbral de tolerancia) obtenidos a partir de la cepa de referencia New Orleans que sobrevivieron a la exposición de piretroides.....	78
14. Porcentaje de individuos <i>Ae. aegypti</i> (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con fenotrina que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans	80
15. Porcentaje de individuos <i>Ae. aegypti</i> (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con permetrina que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans	80
16. Porcentaje de individuos <i>Ae. aegypti</i> (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con deltametrina que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans	81
17. Porcentaje de individuos <i>Ae. aegypti</i> (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con cipermetrina que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans	81
18. Porcentaje de individuos <i>Ae. aegypti</i> (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con alfa-cipermetrina que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans	82
19. Porcentaje de individuos <i>Ae. aegypti</i> (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con z-cipermetrina que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans	82

20. Porcentaje de individuos <i>Ae. aegypti</i> (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con lambdacialotrina que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans	83
21. Porcentaje de individuos <i>Ae. aegypti</i> (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con bifentrina que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans	83
22. Porcentaje de individuos <i>Ae.aegypti</i> (L.) que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans sin tener selección previa con piretroides.....	84
23. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas en mosquitos <i>Ae. aegypti</i> (L.) que sobrevivieron a la exposición de ocho piretroides y comparación de medias en base a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$) correspondientes al ensayo de α -esterasa.....	86
24. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas en mosquitos <i>Ae. aegypti</i> (L.) que sobrevivieron a la exposición de ocho piretroides y comparación de medias en base a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$) correspondientes al ensayo de β -esterasa.....	87
25. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas en mosquitos <i>Ae. aegypti</i> (L.) que sobrevivieron a la exposición de ocho piretroides y comparación de medias en base a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$) correspondientes al ensayo de oxidasas.....	88
26. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas en mosquitos <i>Ae. aegypti</i> (L.) que sobrevivieron a la exposición de ocho piretroides y comparación de medias en base a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$) correspondientes al ensayo de glutatión s-transferasa (GST).....	89
27. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas en mosquitos <i>Ae. aegypti</i> (L.) que sobrevivieron a la exposición de ocho piretroides y comparación de medias en base a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$) correspondientes al ensayo de acetilcolinesterasa insensible (iAChE).....	90
28. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas en mosquitos hembras <i>Ae. aegypti</i> (L.) que no fueron expuestos a los ocho piretroides y comparación de medias respecto a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey($p \leq 0.05$))	107

AGRADECIMIENTOS

A FOMIX-CONACYT, Veracruz por el financiamiento económico brindado para la realización de este trabajo de tesis de maestría.

A la Dra. Adriana E. Flores Suárez el haber compartido sus conocimientos y enseñanzas que la vida le ha brindado en lo profesional y personal pero principalmente agradezco la Fé y Confianza depositada en mí y el haberme permitido ser una Amiga y brindarme su Amistad y Cariño. Dra se le quiere, admira y respeta. Gracias por todo!!!!

Al Dr. Gustavo Ponce por el apoyo brindado en las colectas del material biológico, parte primordial para el desarrollo de este trabajo y ser parte del comité de tesis.

Al Dr. Humberto Quiroz por aceptar y ser parte del comité de tesis

Al M.C. Alfonso Flores por el apoyo incondicional brindado durante la maestría

A la Q.B.P Selene Marlen Gutierrez Rodriguez por compartir y estar conmigo en todos los esfuerzos maratónicos realizados para la culminación de este trabajo pero principalmente por su Amistad.

A mis compañeros del laboratorio (Bety, Gaby, Leslie, Quetzaly, Derek) por compartir, ayudarme y sugerencias brindadas durante la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A Dios por poner en mi camino personas que me han ayudado a crecer y madurar

A mis padres (Bertha Salinas Vázquez y Alfredo Silva Hinojosa), hermano (Alfredo Silva Salinas) por estar conmigo en los momentos buenos y difíciles y por hacer también suyos esos esfuerzos que se realizaron para la culminación de este trabajo. FAMILIA LOS AMO!!!!

A la Dra. Graciela Williams por estar siempre conmigo en los momentos difíciles y buenos pero principalmente por ser mi GUÍA ESPIRITUAL en esta vida. GRACIAS!!!!

RESUMEN

La detección e inspección de la resistencia temprana nos alerta sobre los cambios en la frecuencia de los individuos resistentes permitiendo a su vez estimar la eficacia de las medidas tomadas en el manejo de la resistencia. Caracterizar la resistencia bioquímica en siete sub-poblaciones de *Aedes aegypti* (L.) procedentes del estado de Veracruz: Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque y cepa susceptible New Orleans en individuos expuestos y sin exponer al organofosforado temefos en la fase larvaria y a ocho piretroides en la fase adulta (permetrina, cipermetrina, z-cipermetrina, α -cipermetrina, lambdacialotrina, bifentrina, deltametrina y fenotrina) después del previo conocimiento de susceptibilidad en el estado de Veracruz fue el objetivo de este trabajo. Altos niveles de resistencia se detectaron al piretroide alfa-cipermetrina ya que el 100% de las sub-poblaciones superaron $RR_{kD50} > 10$, con valores en la mayoría por encima a 100X. Resistencia moderada se observó para el piretroide fenotrina, dos de las siete sub-poblaciones mostraron resistencia (Poza Rica (18X) y Martínez de la Torre (12X)). Niveles bajos de resistencia se observaron para los piretroides lambda-cialotrina, permetrina y cipermetrina. Para los piretroides z-cipermetrina y bifentrina únicamente una de las siete sub-poblaciones mostraron resistencia Knockdown (RR_{kD50}) con valores de 10X y 21X respectivamente. Para deltametrina ninguna de las sub-poblaciones mostró resistencia Knockdown ($RR_{kD50} > 10$), solo e tres sub-poblaciones mostraron resistencia moderada (Coatzacoalcos (8X), Veracruz (7X) y Poza Rica (7x)) por lo que el resto de las sub-poblaciones fueron susceptibles. Resultados de mortalidad a las 24hrs demuestran que para la mayoría de los piretroides se presenta recuperación excepto fenotrina, para el cual el número de sub-poblaciones con resistencia Knockdown decreció de 5 a 4 al evaluar la resistencia a las 24hrs (RR_{DL50}) disminuyendo en magnitud los valores de resistencia. Para las sub-poblaciones larvarias de Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre y Veracruz se obtuvieron CL_{50} de 0.008, 0.01, 0.045, 0.03 y 0.02 $\mu\text{g/ml}$ para el organofosforado temefos. La realización de ensayos bioquímicos en microplaca (esterasas, oxidasas, glutatión s-transferasas (GST), acetilcolinesterasa insensible (iAChE)), lecturas de absorbancia obtenidas en cada prueba enzimática y comparaciones entre los valores medios de absorbancia de cada sub-poblaciones y cepa de referencia por insecticida y localidad mediante el software computacional SPSS 10 así mismo la determinación del umbral de tolerancia de acuerdo a la cepa de referencia permitieron la caracterización enzimática en las sub-poblaciones veracruzanas encontrando en sub-poblaciones larvarias del estado los mecanismos α y β -esterasas sugiriendo resistencia cruzada entre piretroides y organofosforados (temefos). Mecanismos enzimáticos GST y α -esterasa se encontraron ante la exposición del piretroide bifentrina, β -esterasas, GST, oxidasas para el piretroide z-cipermetrina. Las esterasas (α , β) fueron los principales mecanismos al seleccionar con los piretroides lambdacialotrina, alfa-cipermetrina, cipermetrina y deltametrina. Las enzimas GST y oxidasas se manifestaron ante la exposición del piretroide permetrina, oxidasas, iAChE y α -esterasa fueron los principales mecanismos para el piretroide fenotrina.

ABSTRACT

The detection and inspection of the early resistance alert to us about the changes in the frequency of the resistant individuals allowing to consider the effectiveness of the measures taken in the handling of the resistance. Characterizing the biochemical resistance in seven under-populations of *Aedes aegypti* (L.) coming from the state of Veracruz: Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos and Cosoleacaque and susceptible stock New Orleans in exposed individuals and without exposition to the organophosphate temephos in the larvaria phase and to eight pyrethroids in the adult phase (permethrin, cypermethrin, z- cypermethrin, alpha-cypermethrin, lambda-cyhalotrin, bifenthrin, deltamethrin and phenothrin) after the previous knowledge of susceptibility in the state of Veracruz, was the objective of this research. High levels of resistance were detected to the alpha- cypermethrin pyrethroid since the 100% of under-populations surpassed $RR_{kD50} > 10$, with values in the majority superficially to 100X. Moderate resistance was observed for the phenothrin pyrethroid, two of seven under-populations showed resistance (Poza Rica (18X) and Martínez de la Torre (12X)). Low levels of resistance were observed for the pyrethroids lambda-cyhalotrin, permethrin and cypermethrin. For the pyrethroids z- cypermethrin, and bifenthrin, only one of seven under-populations showed Knockdown resistance (RR_{kD50}) with values of 10X and 21X respectively. For deltamethrin none of under-populations showed resistance Knockdown ($RR_{kD50} > 10$), and only in three under-populations was showed moderate resistance (Coatzacoalcos (8X), Veracruz (7X) and Poza Rica (7x)) reason why the rest of under-populations was susceptible. Results of mortality to 24 hours demonstrate that for the majority of the pyrethroids recovery appears except phenothrin, for which the number of under-populations with Knockdown resistance decreased from 5 to 4 when was the resistance evaluated to 24hrs (RR_{DL50}) diminishing in magnitude the values of resistance. For larvarias under-populations of Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre and Veracruz it was obtained CL_{50} of 0.008, 0.01, 0.045, 0.03 and 0.02 $\mu\text{g/ml}$ for the organophosphate temephos. The accomplishment of biochemical tests in microplate esterases, mixed-function oxidases (MFO), glutathione-S-transferase (GST), insensitive acetylcholinesterase (iAChE), readings of absorbance obtained in each enzymatic test and comparisons between the average values of absorbance of each under-population and stock of reference by insecticide and locality by computer software SPSS 10; also, the determination of the tolerance threshold, according to the reference stock, it was allowed the enzymatic characterization in the under-populations of Veracruz finding in larvarias under-populations of the state, the mechanisms α and β -esterases, which suggests resistance crossed between pyrethroids and organophosphate (temephos). Enzymatic mechanisms GST and α - esterase were found before the bifenthrin pyrethroid exposition, β -esterases, GST, MFO for the z- cypermethrin pyrethroid. The esterases (α , β) were main present mechanisms select with the lambda-cyhalotrin, alpha- cypermethrin, cypermethrin and deltamethrin. The GST enzymes and MFO appeared before the permethrin pyrethroid exposition, MFO, iAChE and α – esterases were the main mechanisms for the phenothrin pyrethroid.

1.-INTRODUCCIÓN

El Dengue es una enfermedad presente desde hace más de 200 años en las Américas y en la actualidad afecta a la mayoría de los países del continente y el Caribe (Gubler 1997). Desde 1978 el Dengue se reintrodujo a México y para antes de 2 años ya había alcanzado incluso los Estados del Noreste de México (Méndez 1992). Desde entonces la enfermedad se ha mantenido año tras año, con brotes epidémicos en algunos años explicado tanto por patrones de precipitaciones abundantes como por introducción de alguno de sus cuatro serotipos en población humano completamente susceptible. El control de la enfermedad, debido a la ausencia de vacunas antivirales, se basa en gran medida en el control del vector, siendo el principal en México *Aedes aegypti* (L.). Uno de los principales problemas para la erradicación del mosquito basado en el uso de insecticidas es la resistencia que las poblaciones del mosquito pudieran exhibir a los productos aplicados para su control. La norma oficial mexicana para la vigilancia y control de vectores, NOM-032-SSA2-2002 establecía el uso del insecticida temefos (Abate® granulos) a concentración de 1ppm para el control del estadio larvario del mosquito y una formulación a base de permetrina para el control de la fase adulta del vector, siendo ésta última usada en el país por más de 8 años (1999-2008) consecutivos. El 8 de septiembre del 2008 se publicó una norma emergente (NOM-EM-003-SSA2-2008) que establece las características que deben tener los insecticidas para el control de vectores en México incluyendo *Ae. aegypti* (L.) sin especificar que moléculas deben usarse estableciendo que dependerá de la probada efectividad, no resistencia y características de seguridad relacionadas con la exposición (Diario Oficial de la Federación, México 2008). Considerando un uso tan prolongado, intensivo e irracional la posibilidad de poblaciones de *Aedes aegypti* (L.) con resistencia bioquímico-genética son muy amplias. A pesar de que los programas de control de vectores de la SSA han cambiado en los últimos 4 años a piretroides (permetrina) solo para la fase adulta el

problema sigue siendo latente debido a las cifras de casos de dengue se manifiestan año tras año. Acción de los insecticidas, ha generado la selección de poblaciones de mosquitos con resistencia cruzada y/o resistencia múltiple.

La resistencia a insecticidas es una de las mayores problemáticas a los que se enfrenta los programas de control de *Aedes aegypti* (L.) en Veracruz y el resto del País, por lo que la detección de resistencia a un determinado grupo toxicológico nos permitiría establecer un programa eficaz en control de vectores, ya que esta nos capacita para hacer un manejo racional de la resistencia basado en la rotación de insecticidas con énfasis en mantener poblaciones susceptibles.

2.-HIPÓTESIS

Debido a la presión de selección ejercida en las poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz con temefos para el control de larvas y permetrina para el control de adultos, se han seleccionado mecanismos enzimáticos de resistencia y/o resistencia cruzada en el mosquito vector del dengue haciendo inefectivo su control.

3.-OBJETIVOS

3.1.- General

Caracterización de la resistencia bioquímica en siete sub-poblaciones de *Ae aegypti* (L.) procedentes del estado de Veracruz: Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque al larvicida temefos y 8 adulticidas piretroides

3.2.- Particulares

1. Determinar susceptibilidad a temefos en larvas de III y IV instar de *Ae. aegypti* del estado de Veracruz (Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque).
2. Determinar susceptibilidad a ocho piretroides (fenotrina, permetrina, deltametrina, cipermetrina, z-cipermetrina, alfa-cipermetrina, lambdacialotrina y bifentrina) en mosquitos adultos de Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque.

3. Caracterización de la resistencia bioquímica en siete sub-poblaciones larvarias y adultas de *Ae. aegypti* del estado de Veracruz (Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque) sin selección previa a insecticidas.

4. Caracterización de la resistencia bioquímica en siete sub-poblaciones larvarias y adultas de *Ae. aegypti* del estado de Veracruz (Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque) con selección previa a insecticidas.

4.-ANTECEDENTES

4.1.- *Aedes aegypti* (L.): CICLO BIOLÓGICO, IMPORTANCIA COMO VECTOR Y CONTROL.

Aedes aegypti (L.) es un mosquito perteneciente al orden Díptera, familia Culicidae y subfamilia Culicinae. Se distribuye ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales del globo, entre los 35° latitud Norte y 35° latitud Sur. *Ae. aegypti* (L.) es un insecto con metamorfosis completa, su ciclo biológico consiste en cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. Los huevos son depositados individualmente en sustratos húmedos que son sujetos a inundación, preferentemente recipientes artificiales domiciliarios y peridomiciliarios (Gordon, 1988). En condiciones ideales, la eclosión ocurre en un par de días, sin embargo, los huevos pueden mantener su viabilidad hasta por más de un año, dependiendo de la fuente de reservas y las condiciones ambientales (Eldridge, 2005).

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

La etapa adulta consiste en un insecto volador pequeño. Las hembras poseen una probóscis larga, adaptada para succionar sangre a través de la piel. Los machos, por otro lado, presentan una probóscis larga adaptada para succionar jugos de plantas y otras fuentes de azúcar. En forma general ambos requieren carbohidratos como principal fuente de energía, sin embargo, las hembras dependen de sangre para obtener la energía necesaria para la producción de huevos. Las hembras comienzan la búsqueda de sangre y la principal fuente de atracción son las trazas de dióxido de carbono y ácido láctico

emanadas por el hospedero. Las horas con mayor actividad alimenticia, ocurren entre las 6:00 am a 8:00 am y de 4:00 pm a 7:00 pm (Fernández-Salas, 1999).

Durante la alimentación, las hembras producen anticoagulantes, antihistamínicos y analgésicos que le permiten ingerir sangre a repleción. Después de la alimentación, las hembras entran en un periodo de reposo y las ovariolas comienzan un proceso de ovogénesis que después de 3 a 4 días culmina en la oviposición de 50 a 120 huevos.

Como la mayoría de los insectos hematófagos, *Ae. aegypti* (L.) es capaz de ingerir, incubar y transmitir distintos patógenos después de una alimentación de sangre infectada. En el año 1900, *Ae. aegypti* (L.) fue implicado biológicamente en la transmisión del virus de la fiebre amarilla y en 1903 en la transmisión del virus del dengue (Philip y Rozenboom, 1973).

En forma general, el virus del dengue debe cruzar la barrera del intestino medio del insecto y posteriormente dispersarse a otros órganos, entre ellos las glándulas salivales. Este proceso de incubación toma de 10 a 14 días. Una vez que el virus alcanza las glándulas salivales, el mosquito es considerado infectivo y es capaz de transmitir el virus por el resto de su vida. La permisividad de un mosquito a infectarse y/o transmitir el virus, es conocido como competencia vectorial (Hardy, 1988). Las poblaciones de *Ae. aegypti* de México, varían en la susceptibilidad a infectarse con el virus del dengue tipo-2 (Bennett *et al*, 2002).

Actualmente, *Ae. aegypti* (L.) es considerado el principal vector del virus del dengue a nivel mundial, esto se debe a su amplia distribución geográfica, su alto grado de susceptibilidad a infectarse con el virus, así como su cercana asociación con las habitaciones humanas. Este mosquito es considerado completamente antropofílico, mas aún, el hábito de tomar mas de una alimentación de sangre durante su ciclo gonotrófico incrementa su capacidad vectorial dramáticamente (Platt *et al*, 1997). La transmisión del dengue ocurre en forma particular durante los meses del año con más lluvia y altas temperaturas, lo que propicia condiciones necesarias para el desarrollo larval en los hábitats donde se almacena agua (Gubler y Trent, 1994).

El aumento en la actividad de epidemias por dengue, el desarrollo de hiper-endemicidad y la emergencia de epidemias por dengue hemorrágico, han sido generados por diversos factores, entre ellos, cambios demográficos y sociales, reducción de

recursos para prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores, así como cambios en las estrategias de salud pública (Gubler, 1998a).

La prevención y control del dengue, depende en controlar al mosquito vector *Ae. aegypti* (L.) dentro y alrededor de los hogares donde ocurre la mayoría de la transmisión. En los últimos 25 años, se ha puesto mucho énfasis en la aspersión espacial de insecticidas (ULV) con el objetivo de eliminar a la etapa adulta, sin embargo, al menos que sean aplicados dentro de los hogares, estos usualmente son inefectivos (WHO, 1997; Gubler, 1989). Al parecer, la medida más efectiva para controlar al mosquito transmisor del dengue es a través de la reducción de criaderos de larvas, ya sea vía eliminación de contenedores que almacenan agua o bien mediante el uso de larvicidas.

En las décadas de los 50's y 60's, varias campañas para la erradicación de vectores de enfermedades fueron implementadas a nivel mundial, entre éstas, la erradicación del mosquito *Ae. aegypti* (L.). Desafortunadamente, todos estos programas han carecido de sustentabilidad, y una vez que el mosquito y la enfermedad fueron controlados, los limitados recursos para salud fueron transferidos a otros programas competentes. Como consecuencia, las poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) reinfestaron e incluso invadieron nuevas regiones, al grado de que la ocurrencia de transmisión de dengue tiene ahora un nivel epidémico (Gubler, 1998b).

Actualmente, las campañas de control de *Ae. aegypti* (L.) consisten en la eliminación de criaderos de estadios larvarios y en casos de brotes de dengue, la aplicación espacial de insecticidas. Usualmente, la eliminación de pequeños utensilios que tienden a acumular agua en los patios de las casas, así como el tratamiento de larvicidas en los contenedores de agua necesarios para las actividades diarias, son realizados durante las campañas de prevención. En México, el principal insecticida utilizado para controlar a los estadios larvarios es el organofosforado temefós (Abate®).

La medida de emergencia durante brotes o epidemias de dengue, consiste en la aplicación de insecticidas en nubes de gotas de ultrabajo-volumen (ULV). Los principales insecticidas utilizados para esta finalidad son el organofosforado malatión y varios piretroides, entre ellos, deltametrina, permetrina y lambda-cialotrina.

En México, en los últimos 6 años, los principales insecticidas utilizados para control del mosquito *Ae. aegypti*(L.), han sido el larvicida organofosforado temefós (Abate®) y

el adulticida permetrina junto con el sinergista piperonil butóxido (Aquareslin ®) (Norma Oficial Mexicana, S.S.A,1999).

La nueva tendencia en los programas de control es proveer de sustentabilidad a los programas mediante el uso de estrategias de reducción larvaria basadas en la comunidad. La razón consiste en que el control de *Ae. aegypti* (L.) solo puede lograrse por la gente que vive en las casas donde la problemática ocurre y por la gente que crea los hábitats larvarios debido a sus estilos de vida. Estos programas de participación comunitaria requieren de un programa de educación para la salud extensivo. Desafortunadamente, esta medida resulta muy lenta, por lo cual se ha propuesto una combinación de estrategias, una que permita un éxito inmediato y otra que permita proveer de sustentabilidad. La efectividad de dichos programas aun no ha sido probado en campo, siendo un área de oportunidad para las programas de control de vectores.

4.2.- INSECTICIDAS

Los primeros insecticidas consistieron en sustancias químicas inorgánicas, tales como sulfuro (1000 A.C), arsénico (900 D.C), arsenato de plomo, cloruro de mercurio, ácido bórico y algunos jabones. Estas sustancias fueron clasificadas como venenos generales, usualmente se requerían grandes cantidades y se utilizaban principalmente para control marginal de plagas.

El siguiente grupo utilizado se clasificó como insecticidas botánicos, incluyendo a la nicotina, rotenona y piretrinas. Este grupo presentaba mayor complejidad estructural, mayor potencial y más selectividad. La disponibilidad de los insecticidas botánicos fue limitada y su alto costo y su fotosensibilidad evitó que tuvieran un mayor impacto en plagas, hasta la fecha, las piretrinas han sido el botánico mas utilizado en los últimos dos siglos.

El verdadero desarrollo científico de los insecticidas comenzó en 1867 con la formulación y uso del arsénical “Verde de París”. Para la década de 1920, ya se habían dado a conocer muchas de las estructuras de los insecticidas botánicos usados desde 1800. Para 1930, la principal meta fue el descubrimiento de insecticidas orgánicos

sintéticos. En esta época se optimizaron los sistemas de síntesis, identificación, búsqueda y la metodología para probar su actividad biológica.

En 1939, Müller descubrió la propiedad insecticida del primer insecticida sintético, el DDT (dicloro difenil tricloroetano). Después de éste hallazgo, hubo un rápido aumento en el número de insecticidas descubiertos, la lista incluye otros insecticidas organoclorados con modos de acción similares o distintos al DDT (ejemplo hexacloruro de benceno). En 1945, el primer organofosforado (OFs) fue descubierto, seguido en 1953, por los carbamatos y una década después por los piretroides (Casida y Quistad, 1998).

Estos cuatro grupos de insecticidas aun constituyen el 90 % del mercado en salud pública. Otros insecticidas se han adjuntado, tales como insecticidas bacterianos *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) y reguladores de crecimiento, sin embargo, el uso de dichos compuestos es limitado para muchos vectores de enfermedades debido a su alto costo y a que su modo de acción es específica para larvas.

Entre los insecticidas botánicos, la rotenona, rianodina, veratidina y azardiquina son utilizados como los ingredientes activos de cubé, riania, sabadilla y neem respectivamente, recientemente se han promovido intesivamente los programas de desarrollo y usos de los extractos de semillas del neem (Murray, 2006).

4.2.1. Mecanismos de acción de los insecticidas

Los cuatro principales grupos de insecticidas actúan a nivel del sistema nervioso de los insectos. Los insecticidas organoclorados actúan como basuras en los canales de sodio de las neuronas de los insectos, resultando altamente específicos y tóxicos para insectos. Aunado a esto, tienen una larga residualidad (~15 - 30 años) y su costo de producción es muy bajo, desafortunadamente, su bio-acumulación en tejidos grasos de mamíferos y sus efectos dañinos a la fauna silvestre, ocasionaron su restricción y veta en los Estados Unidos a partir de 1972. Actualmente, el lindano, endosulfán y DDT son utilizados en forma importante para salud pública en ciertas partes del mundo.

Los organofosforados y metil-carbamatos actúan mimetizando a la acetilcolina en las uniones sinápticas. Los organofosforados son convertidos en sus análogos *oxon*

mediante la acción de monooxidasas antes de que actúen como inhibidores de la AchE. Estos insecticidas carecen de especificidad, resultando moderadamente tóxicos para mamíferos, sin embargo, la carencia de residualidad y bio-acumulación se convirtieron en las principales razones para incrementar su uso agrícola y en salud pública. Actualmente, 10 de los 20 insecticidas más utilizados en mercado, son organofosforados y carbamatos. Los insecticidas más utilizados para salud pública son los larvicidas temefós (OFs), propoxur (MCs) y el adulticida malatión (OFs).

Los insecticidas piretroides tienen un modo de acción similar a los organoclorados, sin embargo, los piretroides ganaron popularidad por su baja toxicidad para mamíferos, por su rápido efecto aniquilante en insectos y su residualidad intermedia (2-6 meses). Una gran variedad de moléculas de piretroides fueron introducidas en el mercado en 1970 y 1980, actualmente constituyen el 25% de la producción mundial de insecticidas. Para el mercado de salud pública son utilizados desde rociados residuales intradomiciliares, tratamiento de pabellones, cortinas, mosquiteros así como en sprays, carboncillos, etc (Hemingway *et al*, 2004).

Un reducido número de nuevas clases de insecticidas podrían utilizarse para control de vectores, sin embargo, el alto costo del desarrollo y registro de nuevos insecticidas, significa que los insecticidas deben ser desarrollados inicialmente por el mercado de la agricultura y después ser utilizados para el control de vectores. En el mercado de salud pública, las actividades, perfil de seguridad del insecticida y su forma de aplicación deberán ser apropiados, además, el mercado debe ser lo suficientemente grande como para garantizar los costos de registro para su uso en salud pública.

4.2.2. Insecticidas Piretroides

En 1945 se sintetizó el primer piretroide, la retrolona. Los piretroides son compuestos sintéticos derivados estructuralmente de la piretrina I (uno de los seis compuestos del piretro) y se encuentra entre los insecticidas más potentes. La mayor estabilidad de los nuevos piretroides en condiciones de campo le ha abierto grandes posibilidades de uso como insecticidas agrícolas y con fines de salud pública,

anteriormente sus ventajas se veían contrarrestadas por su escasa persistencia y alto costo

Los insecticidas piretroides son de amplio espectro y actúan principalmente por contacto, de modo que pueden usarse para controlar una gran variedad de insectos plaga en diferentes cultivos, en ganado y en campañas de salud pública. Actúan sobre las fases larvarias y adultas de lepidópteros, coléopteros, dípteros (como *Ae. aegypti* (L.)) y homópteros. No son fitotóxicos en dosis correctas. Son adecuados para regiones de clima templado a frío, poseen un coeficiente térmico invertido (como el DDT): son mucho más efectivos a temperaturas bajas. Es importante mencionar que tiene una toxicidad aguda relativamente baja para los mamíferos, resultando un control de plagas más selectivo y seguro que los organofosforados y carbámicos. Una de sus desventajas es su alta toxicidad para la vida acuática. Aun cuando son más estables que las piretrinas, son menos persistentes que los insecticidas organoclorados.

El uso de los piretroides a crecido debido a su alta actividad insecticida (requiriéndose dosis bajas para controlar plagas), y por su baja toxicidad para los mamíferos.

Los primeros piretroides con actividad insecticida adecuada eran la resmetrina y cismetrina, sin embargo eran inestables en el ambiente. En la década de 1970 se logró la síntesis de otros piretroides, entre ellos: la fenotrina, permetrina y deltametrina.

Los piretroides son compuestos lipofílicos, insolubles en agua, de estabilidad variable ante la luz o calor, son degradables fácilmente por los microorganismos. Por la variedad de sus estructuras, los piretroides pueden variar considerablemente en sus propiedades (Albert *et al.* 1990).

Los piretroides para su clasificación han sido colocados en cuatro categorías o generaciones.

La primera generación contiene solo un piretroide: la aletrina. Comercialmente disponible en 1949, marcó el comienzo de una era de síntesis complejas, involucrando más de 22 reacciones químicas para producir un insecticida; la aletrina es meramente un duplicado de la cinerina I (un componente del piretro), con un lado en la cadena más estable y más persistente que el piretro. Igualmente efectivo contra moscas y mosquitos, pero menos efectivo contra cucarachas y otros insectos.

La segunda generación incluye tetrametina. La cual apareció en 1965; esta poseía una fuerza más grande de derribo que la aletrina y era fácilmente sinergizada. La resmetrina apareció en 1967, es aproximadamente 20 veces más efectiva que el piretro en cuanto al derribo en mosca casera, y no era sinergizado por ningún sinergista. La bioresmetrina también descrita en 1967, es 50 veces más efectiva que el piretro contra moscas caseras normales (susceptibles a insecticidas) y no era sinergizado con sinergistas del piretro. La resmetrina y la bioresmetrina eran más estables que el piretro, pero se descomponían rápidamente al exponerlos al aire y a la luz solar, lo cual explica el porqué nunca se desarrollaron para uso agrícola. La resmetrina fue el insecticida de segunda generación más utilizado en forma de aerosoles para el control de insectos voladores y rastreros en interiores de casas. La bioaletrina (d-trans-aletrina) fue introducida en 1969, es más potente que la aletrina y fácilmente sinergizada, pero no es tan efectiva como la resmetrina. El último insecticida de este periodo fue la fenotrina, introducida en 1973, también es intermedia en cuanto a calidad y ligeramente incrementado por sinergistas.

La tercera generación incluye fenvalerato y permetrina, los cuales aparecieron en 1972 y 1973, respectivamente. Estos se convirtieron en los primeros piretroides agrícolas debido a su actividad insecticida excepcional y su fotoestabilidad. Al parecer no son afectados por la luz solar y son residuales de 4-7 días sobre las hojas de los cultivos.

La permetrina pertenece al grupo de los piretroides. Los insecticidas piretroides son ésteres del ácido crisantémico con un alto grado de lipofilia. Los compuestos originales de esta serie fueron las piretrinas naturales, las cuales fueron aisladas de las flores del crisantemo. La química de los piretroides y su modo de acción son clasificadas como de Tipo-1 ó Tipo-2, dependiendo del alcohol substitutivo.

La permetrina pertenece al grupo del Tipo-1. En forma general este grupo incluye a los piretroides que contienen desciano-3-fenoxibencil u otros alcoholes en su estructura química. Muchos de los antiguos compuestos de Tipo-1 carecientes del fenoxibencil, resultan inestables en condiciones ambientales, impidiendo su uso en cultivos de campo (por ejemplo, piretrinas, aletrina, tetrametrina). Sin embargo, la introducción del fenoxibencil en la permetrina mejoró la estabilidad química y permitió el uso de los piretroides en el campo (Bloomquist, 1999).

El nombre científico de la permetrina es 3-fenoxibenzil (1*RS*)-*cis-trans*-3-(2,2-dichlorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato. Es un insecticida no sistémico con acción de contacto, estomacal y con un poco de efecto repelente. La dosis oral aguda LD₅₀ para ratas es de 4000 y 6000 mg/kg para mezclas de isómeros *cis*: *trans* de 40:60 y 20:80 respectivamente (LD₅₀ aguda percutánea para ratas es >4000 mg/kg) (Shafer *et al*, 2005). La permetrina es tóxica para peces y abejas. En mamíferos ocurre la hidrólisis de enlaces éster y el compuesto es eliminado como un conjugado glicosilado.

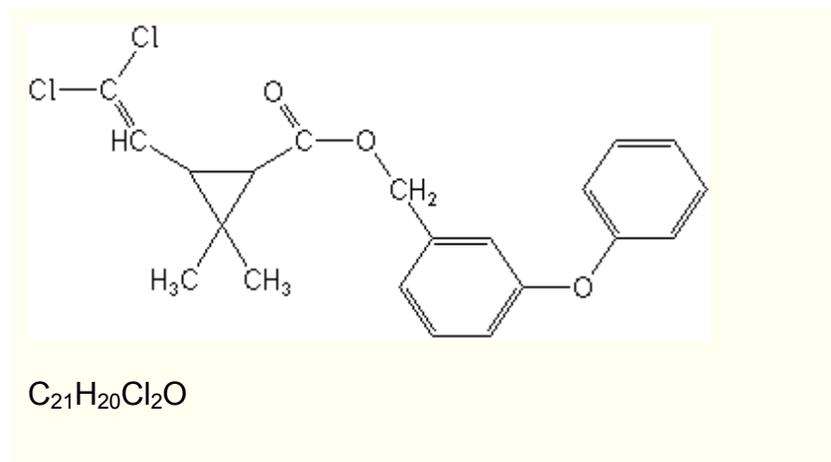


Figura 1. Estructura química de la permetrina.

Los signos típicos de intoxicación por los piretroides del Tipo-1 incluyen hiperexcitabilidad y convulsiones en insectos. En insectos, los efectos de los piretroides (especialmente los del Tipo-1) pueden desarrollarse en 1 a 2 minutos después del tratamiento y pueden resultar en el derribe, es decir, la pérdida de la postura normal y de la locomoción. La exposición de humanos a cualquiera de los dos tipos de piretroides puede causar parestesia, una sensación de quemazón o picazón de la piel, pero este efecto es más intenso con los compuestos del Tipo-2 (Bloomquist, 1999).

La cuarta generación aún sigue en desarrollo y registro, en esta generación los porcentajes de aplicación se han reducido en comparación a la generación anterior. Ejemplos de insecticidas piretroides de cuarta generación son la cipermetrina,

fenopropatrina, flucitrinato, fluvalinato y decametrina. Todos estos insecticidas son fotoestables y proveen efectividad residual en el campo (Bowman *et al.* 2004).

La intoxicación con piretroides resulta de sus potentes efectos sobre la generación de impulsos nerviosos en el sistema nervioso central y periférico. En condiciones normales, las neuronas poseen un voltaje que traspasa las membranas, de unos -60 mV, en el lado interno. El impulso nervioso o potencial de acción consiste en una despolarización transitoria (onda positiva) cuya onda de ascenso es impulsada por un influjo de iones Na⁺, seguidos por un descenso del flujo hacia afuera de iones K⁺.

Estos flujos de iones ocurren debido a la apertura y cierre de canales iónicos de proteínas que están empotradas dentro de la membrana nerviosa (canales de sodio dependiente de voltaje). El potencial de acción se propaga a lo largo del axón hasta llegar a las terminales nerviosas, donde estimula la liberación de los transmisores químicos. Los compuestos del Tipo-1 inducen picos múltiples de las descargas en los nervios sensoriales periféricos, nervios motores y en las neuronas dentro del sistema nervioso central (SNC). Todos estos efectos ocurren por la forma en que los piretroides se unen al canal de sodio, prolongando la corriente que fluye por los canales de sodio al hacer más lento o impedir el cierre de los canales (Soderlund y Knipple, 2003).

La duración de las corrientes de sodio modificadas por los compuestos del Tipo-1 dura décimas o centésimas de milisegundos, mientras que las del Tipo-2 duran algunos minutos o aún más. Estos efectos sobre la corriente de sodio también causan un profundo incremento en la liberación de neurotransmisores de las terminales nerviosas. La sinápsis neuromuscular de los insectos es un blanco especialmente importante para los piretroides, como también para otros insecticidas. (Bloomquist, 1996).

La forma de aplicación de la permetrina y otros piretroides utilizados en el control del dengue, es mediante aerosoles espaciales de gota de ultra bajo volumen (ULV). Para que esta aplicación sea efectiva, las gotas de permetrina deben hacer contacto con los mosquitos en vuelo o en sitios de reposo, desafortunadamente, esta medida ha demostrado ser inefectiva en muchos casos (Gubler, 1989; WHO, 2002). Ultimamente, se ha generado gran interés en nuevas formas de aplicación residual de piretroides en cortinas, paredes y otras superficies de reposo del mosquito *Ae. aegypti* (Kroeger *et al.*, 2006; Karch *et al.*, 1995) Estas medidas, como ha sido demostrado en el control de

Anopheles, son más focalizadas, eficientizando el uso de insecticidas económica y ambientalmente.

4.3. RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN VECTORES

Los programas de control de vectores han dependido principalmente del uso de insecticidas y muchos de los esfuerzos de control resultaron exitosos durante varias décadas. El primer insecticida utilizado para control de mosquitos fue el DDT, en 1955, la Organización Mundial de la Salud (WHO) llamó a la erradicación global de la malaria a través del uso de éste insecticida. El uso de rociados de casas con DDT en programas de amplia escala, redujo dramáticamente la prevalencia de malaria en Asia (Phillips, 1983). Por otro lado, los programas de aspersión aérea de temefós en los programas de control de la oncocercosis en Africa, casi eliminaron la ceguera de los ríos durante las décadas de los 70's y 80's (Curtis, 1989).

En 1946, la Organización Panamericana de la Salud (OPS), armada con DDT inició una campaña de erradicación de *Ae aegypti*. Solo un año después, ocurrieron los primeros casos de resistencia en especies de este mosquito (Brown, 1986). Para 1972, *Aedes aegypti* ya había sido erradicado del 73% del territorio y de 19 países (Gubler, 1989), sin embargo, en el mismo año, la resistencia al DDT fue reconocida como un problema serio y la campaña terminó antes que la meta de erradicación fuera alcanzada (Brown y Pal, 1971).

Los problemas de resistencia han continuado a pesar del uso de nuevos grupos de insecticidas. Alrededor de cien especies de mosquitos han generado resistencia a uno o más insecticidas (Hemingway y Ranson, 2000). El control de la malaria y dengue, han incluido algunos organoclorados (hexacloruro de benceno, DDT), organofosforados (meti-paratión, temefós, malatión y clorpirifos), carbamatos (propoxur y carbosulfán) y piretroides (resmetrina, permetrina, fenotrina) (Ayesa *et al*, 2006).

A pesar de que el uso del BHC y dieldrín fue restringido desde hace muchos años, la resistencia a estos insecticidas sigue dispersada en poblaciones de insectos. El uso del DDT en algunos países ha sido restringido o vetado, sin embargo, la resistencia al DDT en muchas especies de mosquitos vectores es persistente (WHO, 1992). Actualmente, existe un debate sobre la continuación del uso de este insecticida, la presión pública debida a los efectos adversos del DDT hacia el ambiente, exigen su retiro del mercado

en salud pública. Por otro lado, el retiro del DDT en las campañas de control de vectores en países del tercer mundo, ha sido relacionado con el aumento en la incidencia de la malaria en países de Africa. (Roberts *et al*, 1997). Ambos puntos de vista estan siendo cautelosamente evaluados, antes de tomar una desición definitiva sobre el uso de este insecticida.

Diversas especies de insectos vectores han desarrollado resistencia a los organofosforados. La resistencia de amplio espectro a organofosforados, o la resistencia específica para malatión están presentes en las principales especies vectoras del género *Anopheles* (Hemingway y Ranson, 2000), *Culex* (Hemingway y Karunaratne, 1998) y también en *Aedes aegypti* (L.) (Georghiou *et al*, 1987; Vaughan y ffrench-Constant, 1998; Rawlins, 1998; Bisset *et al*, 2006). Los organofosforados y carbamatos tienen el mismo modo de acción y una vez que una población de insectos es resistente a alguno de los dos insecticidas, es muy probable que ocurra un fenómeno de resistencia cruzada (Villani y Hemingway, 1987).

La resistencia a varios grupos de piretroides se ha dispersado ampliamente en culícidos y anofelinos (Chandre *et al*, 1999; Chandre *et al* 1998). La resistencia cruzada entre piretroides y DDT en *Anopheles gambiae* ha generado una gran preocupación, ya que los piretroides son el único grupo disponible para la implementación de la estrategia más eficaz para controlar la malaria: la impregnación de pabellones.

Por último, la resistencia a piretroides ocurre en diversas poblaciones del mosquito *Ae. aegypti* (L.), ya sea debida a la resistencia cruzada con el DDT (Hemingway *et al*, 1989; Brengues *et al*, 2003), ó bien, mediante mecanismos metabólicos relacionados con la resistencia a organofosforados y carbamatos (Rodriguez *et al* 2002; Flores *et al*, 2003).

4.4. DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA EN UNA POBLACIÓN: BIOENSAYOS

La Organización Mundial de la Salud define la resistencia como “el desarrollo de una habilidad en una cepa de algún organismo a tolerar una dosis de un tóxico que probaría ser letal para la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie”. La resistencia es una característica genética heredable cuya frecuencia incrementa en la población como un resultado directo a los efectos selectivos de un insecticida.

Para entender la evolución de la resistencia a insecticidas es necesario conocer los procesos que ocurren y son seleccionados en los individuos resistentes. La variación genética y fenotípica que afecta la resistencia se presenta en algunos individuos de la población como resultado de mutación o duplicación genética, modificando algún aspecto fisiológico, morfológico o de comportamiento en el fenotipo normal. Estos cambios en el fenotipo usualmente aumentan el proceso de detoxificación, reducen la sensibilidad del sistema nervioso o bien, incrementan la capacidad de los insectos de evadir el contacto con el tóxico. Cuando el insecticida es aplicado, los individuos con dichas mutaciones tienen una ventaja considerable sobre los individuos más susceptibles en la población, teniendo mayor probabilidad de sobrevivir al tratamiento con insecticidas, y en promedio, contribuyen con más descendencia en la siguiente generación. Como resultado, la frecuencia del gen que confiere resistencia aumentará en la población al paso del tiempo (Hemingway y Ranson, 2005).

La resistencia a insecticidas puede ser investigada en muchos ámbitos, desde la caracterización molecular de los genes y los productos bioquímicos que confieren resistencia; el rol de éstos productos en las reacciones detoxificativas, e incluso el estudio de las fuerzas ecológicas y evolutivas que afectan la dinámica de estos genes en la población.

Los métodos que miden los mecanismos de resistencia varían en su sofisticación. Los bioensayos usando un rango de concentraciones de insecticidas de distintas clases pueden ayudar a establecer la resistencia y resistencia cruzada de una cepa resistente. De

la misma forma, bioensayos con insecticidas que envuelven la pre-exposición a sinergistas son utilizados para determinar si algún tipo de resistencia específico es bloqueado.

En los bioensayos *dosis-respuesta* a insecticidas, muestras de insectos son expuestas a un rango de dosis de insecticidas, produciendo un rango de mortalidades en la muestra tratada. Al graficar los datos de mortalidad contra la dosis, una curva sigmoide es obtenida. Esta curva es transformada en una línea de respuesta recta, al transformar el logaritmo de la dosis y la mortalidad en escala probit (Hemingway y Ranson, 2005).

La gráfica dosis-respuesta permite al investigador establecer la dosis requerida para matar a un porcentaje dado de individuos tratados. Las cepas usualmente son caracterizadas por la dosis letal que mata al 50% (LD50) ó 95% (LD95) de los individuos. Por otro lado, cuando la dosis exacta que entra al organismo no se conoce, se puede calcular la concentración letal (ejemplo, LC50 ó LC95).

La pendiente de la línea de respuesta es una medida de la variabilidad de la población, una línea con mayor inclinación de la pendiente indica la presencia de una cepa más homogénea. Cuando una cepa de campo genéticamente heterogénea es expuesta a este tipo de bioensayos, la línea resultante debe tener poca pendiente. Una vez que la selección con insecticidas incrementa, la pendiente se vuelve más inclinada, debido a que los insectos son cada vez más homogéneos en sus niveles de resistencia.

Los niveles de resistencia de distintas poblaciones pueden ser comparados usando esta metodología mediante el cálculo de la proporción de la resistencia (RR: resistance ratio). La RR corresponde a la dosis LD50 de la cepa “investigada” dividida entre la dosis LD50 de la cepa susceptible. La proporción de resistencia puede ser calculada en cualquiera de los valores LD50 o LD95. Varias cepas susceptibles han sido desarrolladas para ser utilizadas como referencia, la cepa susceptible mas antigua es denominada “Rockefeller” y una cepa mas reciente “New Orleans” han sido mantenidas en laboratorio, sin exposición a insecticidas.

Los bioensayos *dosis-diagnóstico* fueron una respuesta a la necesidad de evaluar poblaciones en campo, donde usualmente no se tiene un alto número de especímenes. Para este objetivo, se han calculado dosis diagnóstico predeterminadas para algunas

especies de insectos. Estas dosis se determinan en base a su letalidad para la mayoría de los individuos susceptibles de varias poblaciones de una especie.

La Organización Mundial de la Salud ha establecido una lista de dosis diagnóstico recomendadas para insectos vectores de enfermedades, así como kits estándar para evaluar la resistencia a varios insecticidas (WHO, 1981). El uso de las dosis diagnóstico proveen una medida aproximada de la cantidad de resistencia en una población, sin embargo, el traslape de las líneas de mortalidad de los insectos susceptibles y resistentes, ocasiona que usualmente se subestime el verdadero alcance de la resistencia.

Por otro lado, están disponibles algunos ensayos bioquímicos simples para detectar la actividad elevada de los tres sistemas de enzimas (esterasas, glutatión-s-transferasas y monooxigenasas) envueltas en el metabolismo de insecticidas (WHO, 1998; Brogdon, 1989). Otras pruebas bioquímicas y métodos moleculares basados en PCR han sido desarrollados para detectar alteraciones del sitio blanco del insecticida para algunos insectos vectores de enfermedades (Hemingway *et al*, 2004).

4.5.- MECANISMOS DE RESISTENCIA A INSECTICIDAS

La resistencia a insecticidas es el resultado de cambios genéticos que alteran atributos fisiológicos, morfológicos o de comportamiento en las especies. Los mecanismos de resistencia se dividen en cuatro categorías: penetración reducida, comportamiento, metabolismo elevado e insensitividad del sitio blanco. Por lo general, estos mecanismos no son específicos y confieren resistencia cruzada a otros tóxicos de estructura similar y en muchos casos, a compuestos químicamente no relacionados (Soderlund y Bloomquist, 1990).

La penetración reducida es el mecanismo de resistencia menos entendido. La mayoría de los formulados de insecticidas han sido diseñados para penetrar el insecto a través de la cutícula. Algunos insectos han desarrollado cutículas más gruesas o cutículas alteradas que reducen el grado de penetración de los insecticidas (Apperson y Georghiou, 1975).

Por si sola, la penetración reducida confiere un bajo nivel de resistencia, sin embargo, en combinación con otros mecanismos de resistencia, puede potencializar la resistencia

en forma no aditiva. Por otro lado, al disminuir el grado en el cual el insecticida alcanza su sitio blanco, permite que otro mecanismo pueda detoxificar más efectivamente al insecticida.

Un mecanismo de resistencia por comportamiento fue identificado en moscas que evaden cebos tratados con malatión. Por otro lado, los insecticidas como el DDT y la permetrina influyen cambios de comportamiento en los insectos, por ejemplo reducen la proporción de entrada de mosquitos hacia las casas, incrementan la proporción de escape o salida de las casas o bien, inducen un cambio en los tiempos de picadura (Lines *et al*, 1987; Mbogo *et al*, 1996). Aun se desconoce si estas respuestas pueden ser consideradas como resistencia, ya que muchos otros factores pueden estar afectando al comportamiento de los insectos.

La resistencia metabólica es el resultado del incremento en la expresión de genes codificadores de enzimas que metabolizan a los principales xenobióticos. Tres familias de enzimas han sido involucradas en la resistencia a los cuatro grupos de insecticidas (OCs, OFs, MCs y piretroides), sin embargo, su rol exacto aun no ha sido determinado.

Las monoxidasas del citocromo-P450, glutatión-s-transferasas (GST) y carboxil-esterasas son familias de enzimas que catalizan un gran rango de reacciones de detoxificación. Estas constituyen la primera defensa enzimática contra los xenobióticos, son responsables de retirar muchos productos de deshecho del metabolismo, juegan roles esenciales en rutas biosintéticas y están envueltas en la comunicación química (Scott, 1995).

La actividad elevada de las enzimas detoxificativas ha sido asociada con la resistencia a insecticidas en un gran rango de especies de insectos plaga. Las esterasas usualmente están envueltas en la resistencia a organofosforados, carbamatos y en menor proporción a piretroides. Las monoxidasas están involucradas en el metabolismo de piretroides y en la activación o detoxificación de insecticidas organofosforados y en menor proporción de metil-carbamatos. La DDT-dehidroclorinasa fue reconocida recientemente como una glutatión-s-transferasa en la mosca doméstica *Musca domestica*, posteriormente fue demostrado que esta enzima tiene un rol común en anofelinos y mosquitos *Aedes* (Hemingway *et al*, 2004).

La resistencia por insensibilidad del sitio blanco se debe a mutaciones sencillas no silenciosas en genes estructurales. Para que ocurra la selección de mutaciones, el aminoácido resultante debe reducir la unión del insecticida, sin causar una pérdida de la función primaria del sitio blanco. Por lo tanto, el número de sustituciones probables de aminoácidos resulta muy limitada y comúnmente pueden encontrarse las mismas mutaciones asociadas a la resistencia en taxas muy divergentes. El grado en que se afecta la función debida a la mutación resistente, puede reflejarse en la viabilidad de los individuos resistentes en la ausencia de selección. Este costo en la viabilidad tiene importantes implicaciones en la persistencia de la resistencia en el campo.

Los genes de los principales sitio blancos: canales de sodio (*para*), receptores del ácido amino-butírico (GABA) y acetilcolinesterasa (AChE), han sido clonados y sus secuencias han sido comparadas entre insectos resistentes y susceptibles. Algunas mutaciones han sido asociadas con resistencia a insecticidas, aunque en muchos casos no se ha elucidado el mecanismo de resistencia a nivel molecular.

4.5.1. Resistencia metabólica

4.5.1.1. Carboxil-Esterasas

Las carboxil-esterasas son un grupo amplio de enzimas capaces de metabolizar una gran variedad de sustratos mediante la hidrolización de los enlaces éster en presencia de agua. Las esterasas pueden clasificarse en base a su preferencia por los sustratos α o β naftol (α NA y β NA), a sus patrones electroforéticos o bien, por su secuencia nucleotídica.

Muchos insecticidas contienen enlaces éster, por lo cual, es esperado encontrar que el principal mecanismo de resistencia en cepas de insectos resistentes se deba a la actividad intensificada o sobreproducción de esterasas. En forma general, los insecticidas organofosforados y metil-carbamatos actúan como inhibidores de esterasas, ya que tienen una alta afinidad por las enzimas pero son sustratos pobres.

En los insectos resistentes, existe una mayor frecuencia de la interacción esterasa-insecticida, evitando que el insecticida alcance su sitio blanco (la acetilcolinesterasa). Cuando las esterasas están presentes en la misma proporción molar que el insecticida,

estas son capaces de secuestrar efectivamente a los insecticidas e hidrolizarlos lentamente (Scott, 1995).

El papel de las esterasas como mecanismo de resistencia puede ser inferido mediante tres formas: 1) detección de niveles elevados de productos de la hidrólisis de insecticidas en estudios de metabolismo en insectos resistentes; 2) sinergismo de la toxicidad del insecticida en insectos resistentes mediante el uso de inhibidores de esterasas no tóxicos, tales como TPP (0,0,0-trifenil fosfato), DEF (S,S,S-tributil fosforotritioato) o IBP (0,0-bis(1-metiletil)s-fenilmetil posforotioato); 3) detección de niveles altos de actividad de esterasas generales (Brogdon, 1989), usando substratos simples y ensayos espectrofotométricos de homogenizados o tejidos de insectos, o bien, por electroforesis y tinción de geles (Hemingway y Karunaratne, 1998).

La sobreproducción de esterasas es una respuesta evolutiva contra la presión de selección por insecticidas organofosforados y carbamatos, su presencia se ha documentado en numerosas especies de artrópodos, incluyendo mosquitos, garrapatas, áfidos y cucarachas.

El papel de las esterasas en la detoxificación de los piretroides ha sido poco estudiado, existen varios reportes de la actividad intensificada de esterasas en poblaciones de mosquitos resistentes, entre éstas *An. gambiae*, *An. albimanus* y *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* (Rodríguez *et al*, 2001; Flores *et al*, 2005; Flores *et al*, 2006), sin embargo, los genes involucrados aún son desconocidos. Algunos estudios han demostrado que las esterasas tienen baja actividad catalítica sobre algunos piretroides, sugiriendo que los elevados niveles de esterasas presentes en cepas resistentes a piretroides, podría deberse a una pre-selección con organofosforados (Rodríguez *et al*, 2002; Flores *et al*, 2006).

La principal causa de la excesiva síntesis de esterasas en insectos resistentes, se debe a la amplificación de genes dentro del genoma, aunque también la transcripción sobre-regulada y expresión genética alterada han sido documentadas. El mecanismo de resistencia metabólica estudiado con más detalle en vectores de enfermedades, es el sistema de esterasas elevadas en *Culex*.

En este mosquito, la sobreproducción de enzimas se debe a la amplificación de uno o más genes de esterasas, variando entre 20 a 250 copias en el genoma (Mouches *et al*,

1990; Callaghan *et al*, 1998). Existen varios alelos de esterasas asociados con la resistencia, sin embargo, el genotipo más común es la co-amplificación de dos genes de esterasas: *est α* y *est β* . Alrededor del 90% de las poblaciones resistentes de *Culex* presentan un genotipo *est α 2/est β 2* (Coleman *et al*, 2002) aunque otras combinaciones han sido identificadas, por ejemplo la cepa Cyprus tiene entre 40 a 60 copias de los genes *est α -5* y *est β -5*, mientras que la cepa TEM-R de California solo presenta amplificación en el locus *est β -1*. Se ha encontrado muy poca variación en la cinética de inhibición entre los distintos alelos de esterasas, por lo cual la ventaja selectiva del genotipo *est- α 2/est- β 2* podría estar ligada a un tercer gen (aldehído oxidasa) que se co-eleva solamente con este fenotipo (Hemingway *et al*, 2000b).

Los genes homólogos a las esterasas amplificadas en el mosquito *Culex*, han sido identificados en la misma proximidad y orientación en *An. gambiae*, pero se desconoce si están involucrados en la resistencia a piretroides, ya que las esterasas son inefectivas contra los piretroides en este mosquito (Ranson *et al*, 2000).

Los elevados niveles de esterasas no siempre son el resultado de la amplificación genética. La sobre-expresión de la *est α -1* en la cepa Barriol de *Cx. pipiens* del Sur de Francia, se podría deber a cambios en algún elemento regulatorio no identificado y no a la amplificación del gen *est α -1*. Las esterasas amplificadas pueden también ser expresadas en diferentes niveles, por ejemplo, existe cuatro veces más *est β* que *est α* en *Cx. quinquefasciatus* resistente, a pesar de que los genes están presentes en una proporción 1:1. Aun así, estos mecanismos no han sido identificados a nivel genético o molecular en poblaciones naturales de mosquitos (Hemingway *et al*, 2000a)

Por otro lado, algunas especies de *Anopheles* tienen un mecanismo que confiere resistencia específica al malatión e involucra a carboxilesterasas con alta actividad hidrolítica (Hemingway, 1982). En *An. stephensi*, tres esterasas con actividad carboxil-esterasa contra malatión han sido aisladas y caracterizadas, sin embargo, la alteración genética que genera estos cambios cualitativos no han sido identificados en poblaciones de mosquitos de campo. Datos de otros artrópodos resistentes al malatión, sugieren que una o dos mutaciones de aminoácidos en estas enzimas podrían ser responsables de este tipo de resistencia (Hemingway, 1983).

4.5.1.2. Monoxidasas del citocromo-P450

Las monoxidasas del citocromo-P450 son una familia de enzimas encontrada en la mayoría de organismos, incluyendo a los insectos. Estas enzimas actúan en el metabolismo de xenobióticos y tienen un rol en el metabolismo endógeno. Las enzimas P450 se unen al oxígeno molecular y reciben electrones del NADPH para introducir una molécula de oxígeno en el sustrato. Las monoxidasas tienen un amplio rango de sustratos, pero en general, estas enzimas metabolizan sustratos lipofílicos para producir moléculas con mayor solubilidad en agua, o bien con grupos funcionales que permiten las reacciones de conjugación, promoviendo la excreción (Berge *et al*, 1998).

Las monoxidasas P450 están envueltas en el metabolismo de todos los insecticidas, permitiendo la detoxificación a través de la hidroxilación alifática del DDT, deshidroxilación aromática del carbaryl y propoxur, y la epoxidación de ciclodienos, o bien, permitiendo la activación de los organofosforados a través de reacciones de oxidación. La gran diversidad de monoxidasas se debe a la existencia de múltiples isoformas de P450, varios patrones de expresión y un amplio espectro de sustratos (Scott, 1995).

La elevada actividad de las monoxidasas ha sido asociada con la resistencia a piretroides en *An. stephensi*, *An. subpictus*, *An. gambiae* y *Cx. quinquefasciatus* (Brogdon, *et al* 1999; Vulule *et al*, 1999). El principal método para identificar este mecanismo de resistencia se basa en bioensayos con insecticidas utilizando inhibidores de las monoxidasas del citocromo-P450 (piperonil butóxido PBO). La reducción en la magnitud de la resistencia observada constituye la primera pista de la presencia de este mecanismo de resistencia. La confirmación de este mecanismo requiere de estudios bioquímicos comparando cepas resistentes y susceptibles. Este tipo de ensayos ha sido estandarizado para múltiples especies de mosquitos vectores.

En la mayoría de los casos donde se ha correlacionado la actividad elevada de las monoxidasas-P450 con la resistencia a insecticidas, se ha identificado el rol de los genes *Cyp* pertenecientes a la familia *Cyp6*. La enzima CYP6D se sobreproduce en una cepa de *M. domestica* resistente a piretroides debido a la transcripción regulada, por otro lado,

la CYP6A se ha asociado con la resistencia a organofosforados en la misma especie (Feyereisen *et al*, 1995).

En *An. gambiae* y *Cx. quinquefasciatus* se han identificado la sobre-expresión de uno o varios genes pertenecientes a la familia *CYP6* asociados con la resistencia a piretroides (Nikou *et al*, 2003; Gong *et al*, 2005). Otros genes pertenecientes a las familias *CYP4*, *CYP12* y *CYP9* han sido observados en cepas resistentes a insecticidas en diferentes especies de insectos. Recientemente, diecisiete cDNAs que codifican oxidasas *CYP4* han sido identificadas en *An. albimanus* y 111 genes P450 han sido identificados en *An. gambiae*, sin embargo, aun se desconoce si estas familias de oxidasas juegan algún rol en la resistencia del mosquito (Ranson *et al*, 2002).

4.5.1.3. Glutación-s-Transferasas

Las glutatión-s-transferasas (GSTs) son enzimas dimericas multifuncionales que juegan un rol en la detoxificación de un gran rango de xenobióticos. Las enzimas catalizan el ataque nucleofílico del glutatión reducido (GSH), en los centros electrofílicos de los compuestos lipofílicos. Múltiples formas de estas enzimas han sido reportadas en mosquitos, mosca doméstica, drosófilidos y mosca de las ovejas. Se sugiere que las GSTs juegan un rol en la resistencia, ya que muchos estudios han mostrado que los homogenizados de insectos resistentes a insecticidas presentan altos niveles de actividad de éstas enzimas.

El principal rol de las GSTs en la resistencia a insecticidas en mosquitos, es el metabolismo del DDT a productos no tóxicos (DDE), aunque también tienen un rol secundario en la resistencia a organofosforados. La resistencia al DDT basada en GSTs es muy común en varias especies de anofelinos, reflejando el fuerte uso de éste insecticida para el control de la malaria durante varias décadas.

Las glutatión-s-transferasas pertenecientes a las clases Delta y Epsilon han sido identificadas en insectos y se han asociado con la resistencia a insecticidas en mosquitos y otras especies. En *Ae. aegypti* al menos dos grupos de GSTs se encuentran en altos niveles en insectos resistentes al DDT (Lumjuan *et al*, 2005), mientras que en *An.*

gambiae un gran número de GSTs se encuentran elevadas y algunas de ellas pertenecen a la clase-1 de GSTs (Ranson *et al*, 1997).

Las GSTs en *Ae. aegypti* (L.) y *An. gambiae* de insectos resistentes se sobre-expresan en forma constitutiva . Las GSTs-2 de *Ae. aegypti* (L.) se sobre-expresan en todos los tejidos a excepción de los ovarios de los insectos resistentes. La secuencia de la clase II de GSTs de *An. gambiae* ha sido publicada y las principales clases de GST II en *Ae. aegypti* (L.) se ha clonado y secuenciado. En esta última especie, GST-2 es sobre-expresada en la cepa GG resistente a DDT, y se piensa que la mutación resistente ocasiona la interrupción de un represor, esta mutación evita la función normal del represor llevando a elevados niveles de la enzima GST-2 en mosquitos resistentes (Ranson *et al*, 2002).

Las GSTs de la clase I son codificadas por una extensa familia de genes en *An gambiae*, *M. domestica* y *D. melanogaster*. La organización genómica en estas tres especies es sorprendentemente diferente. En *D. melanogaster* ocho genes divergentes sin intrones se encuentran en un segmento de DNA de 14 kb.

En *An. gambiae*, múltiples genes de la clase GST-1 se encuentran agrupados en un solo sitio genómico (cluster). La mayoría de los genes contienen uno o mas intrones, uno de estos genes, *aggst-1 α* , tiene un empalme alternativo produciendo cuatro transcritos distintos de mRNA. La organización de la familia de genes GST-1 es muy similar en insectos resistentes y susceptibles en *An. gambiae*, sugiriendo que el mecanismo de resistencia basado en GSTs es probablemente causado por un regulador cis-trans (Ding *et al*, 2003). Los productos de estos genes difieren en su habilidad para metabolizar al DDT y algunos de estos genes son regulados para activar el metabolismo en mosquitos resistentes (Enayati *et al*, 2005).

4.5.2. Resistencia por Sitio Blanco

4.5.2.1. Acetilcolinesterasa insensible

Los organofosforados y carbamatos tienen su sitio blanco en la acetilcolinesterasa (AChE). La AChE hidroliza al neurotransmisor excitatorio acetilcolina en la membrana

post-sináptica del nervio. La AChE de los insectos tiene una especificidad de sustrato intermedio entre la AChE de los vertebrados y la butiril-colinesterasa.

La forma molecular predominante en insectos es un dímero globular anfifílico que se une a la membrana mediante una ancla glipofílica. Alteraciones en la AChE en insectos resistentes a organofosforados y carbamatos resulta en una reducción o inhibición en la sensibilidad de la enzima por estos insecticidas. En *Cx. pipiens*, la AChE-1 y AChE-2 difieren en su especificidad de sustrato, sensibilidad inhibitoria y el patrón de migración electroforético. Solo la AChE-1 parece conferir resistencia a insecticidas (Raymond *et al*, 1986).

Hasta la fecha, se han identificado dos genes *Ace* con esta actividad. La única acetilcolinesterasa clonada en *C. pipiens* es la *Ace2*, la cual no está involucrada en la resistencia a insecticidas y además se encuentra ligada al sexo. Por otro lado, el gen *Ace1* es autosómico y confiere resistencia a insecticidas (Malcolm *et al*, 1995).

Los vertebrados tienen dos tipos de colinesterasas: acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa. En *D. melanogaster* solo un gen *Ace* que codifica una colinesterasa ha sido clonada. Distintas substituciones de aminoácidos en los genes *Ace* de *Drosophila* y *M. domestica* podrían causar resistencia, siempre y cuando los residuos asociados a la resistencia se localicen cerca o dentro del sitio activo de la acetilcolinesterasa.

Hasta ahora, no ha sido registrada la resistencia basada en AChE en *An stephensi*, y debido a que ninguno de los casos de resistencia registrada han estado ligados al sexo, se sugiere que estos genes no representan el sitio blanco del insecticida. El análisis detallado del perfil de inhibición de la acetilcolinesterasas de *Ae. aegypti* sugiere que existe un solo locus AChE en esta especie. En este caso, la resistencia basada en alteraciones de la acetilcolinesterasa podría estar ligada al sexo. Los genes AChE han sido clonados en los mosquitos *Ae. aegypti* y *An. stephensi*, aunque ambos genes están ligados al sexo (Anthony *et al*, 1995).

Cinco mutaciones puntuales asociadas con la resistencia a organofosforados y carbamatos han sido identificadas en el gen de la acetilcolinesterasa en *D. melanogaster* (Mutero *et al*, 1994) y estudios dirigidos por mutagénesis del AChE ligado al sexo de *Ae. aegypti*, han demostrado que estas mutaciones también confieren resistencia en

mosquitos (Vaughan *et al*, 1997). Sin embargo, ninguna de estas mutaciones ha sido identificada en mosquitos colectados en campo o seleccionados en laboratorio.

Las alteraciones en la AChE tienen un costo de viabilidad muy severo en las poblaciones de *Cx. pipiens* en el sur de Francia, probablemente causado por la reducción en la actividad de AChE de la enzima mutada comparada al tipo silvestre. Sin embargo, en *Drosophila* se ha propuesto que la presencia de múltiples mutaciones que confieren bajos niveles de resistencia podría ser una respuesta a la selección de mutaciones con mayor viabilidad en esta enzima (Ming *et al*, 2004).

4.5.2.2. Receptores GABA

La resistencia a dieldrín fue registrada en 1950, sin embargo, la participación de los receptores GABA en este tipo de resistencia fue elucidada hasta 1990. El receptor GABA en los insectos es un canal de iones de cloro heteromultimérico, con función de inhibir la neurotransmisión en el sistema nervioso central del insecto y en uniones neuromusculares. El receptor GABA de los insectos está implicado como un sitio de acción para piretroides, ivermectinas y ciclodienos. Algunos estudios muestran que los insectos resistentes a ciclodienos son resistentes a los insecticidas picrotoxina y fenilpirazole y que el efecto de la ivermectina en neuronas cultivadas puede revertirse con el pre-tratamiento con picrotoxina, sugiriendo que estos insecticidas interactúan con el ionóforo de cloro asociado con el receptor GABA de insectos.

Los receptores GABA pertenecen a una superfamilia de receptores de neurotransmisores que incluyen a los receptores nicotínicos de la acetilcolina. Estos receptores están formados por oligomerización de cinco subunidades alrededor del canal central de iones de sodio. Cinco distintas subunidades han sido clonadas a partir de vertebrados. Hasta la fecha solo tres subunidades han sido clonadas en *D. melanogaster*, pero estas no entran en la clasificación de subunidades GABA de los vertebrados (French-Constant *et al*, 1993).

Se ha encontrado que una substitución de alanina a serina en el dominio que envuelve al canal del receptor GABA, confiere resistencia a ciclodienos tales como el dieldrín. La mutación fue identificada por primera vez en *Drosophila*, y desde entonces ha mostrado

estar en un amplio rango de insectos resistentes a dieldrín, incluyendo *Ae. aegypti* (L.) (French-Constant *et al*, 1994). La única variación en insectos resistentes es que el residuo substituido cambia a glicina en vez de serina. A pesar de que se ha detenido el uso de insecticidas ciclodienos para agricultura y salud pública, los alelos resistentes pueden ser encontrados en relativamente altas frecuencias en poblaciones de insectos en campo.

4.5.2.3. Canales de sodio

El rápido efecto de derribe que caracteriza a los insecticidas DDT y piretroides, es ocasionado por la activación persistente de los canales de sodio. Esta activación se debe a la forma en que los insecticidas se unen al poro del canal, prolongando el mecanismo de inactivación dependiente de voltaje. La reducción en la sensibilidad del canal de sodio dependiente de voltaje a la unión de los insecticidas es la causa del fenotipo resistente conocido como “*kdr*” presente en varias especies de insectos.

Debido a que el canal de sodio es el sitio blanco del DDT y piretroides, muchos estudios en la década de los 80 y 90s se enfocaron en esta proteína. El canal de sodio dependiente de voltaje de los insectos, es una proteína transmembranal que contiene alrededor de 2108 aminoácidos plegados en cuatro dominios homólogos e hidrofóbicos (dominio I, II, III y IV), separados por uniones hidrofílicas. Cada dominio se compone de seis segmentos transmembranales (s1-s6).

Diversas especies de insectos resistentes al DDT y piretroides presentan alteraciones en el gen del canal de sodio. La asociación entre la resistencia *kdr* con modificaciones en el canal de sodio fue confirmada mediante estudios de unión de neurotoxinas (Bloomquist y Miller, 1986) y mediante estudios de mapeo genético. En estos últimos, se identificó una sola mutación en el dominio II segmento transmembranal 6 (DIIS6), asociada con la resistencia tipo *kdr* en *Musca domestica* (Williamson *et al*, 1993).

La mutación *kdr* consistió en un cambio de nucleótidos de adenina a timina en el residuo *Leucina*1014, confiriendo un cambio de aminoácidos de leucina (*Leu*) a fenilalanina (*Phe*). Posteriormente, la misma mutación fue identificada en varias

especies de mosquitos, tales como *An. gambiae*, *An. stephensi*, *An. sacharovi* y *Culex pipiens* (Martínez-Torres *et al*, 1998; Enayati *et al*, 2003; Martínez-Torres *et al*, 1999; Luleyap *et al*, 2002).

Otras mutaciones en el segmento DIIS6 han sido identificadas. Una nueva mutación en T→A en el residuo *Leu1014* de *An. gambiae* y *Cx. pipiens* (Ranson *et al*, 2000b; Luleyap *et al*, 2002) confiere una substitución a serina, sin embargo, estas cepas fueron mas resistentes al DDT que a los piretroides.

Por otro lado, algunos insectos dípteros (múscidos) con el fenotipo “*super kdr*”, además de contener la mutación *Leu1014Phe*, presentaron una segunda mutación (*Met918Thr*) que ocurre en el puente de unión de los segmentos transmembranales 4 y 5, del dominio II (Williamson *et al*, 1996; Guerrero *et al*, 1997). Se ha sugerido que la segunda mutación intensifica el fenotipo *kdr* en cepas de moscas resistentes, sin embargo, esta mutación no ha sido identificada en poblaciones de moscas de campo, ni en mosquitos vectores. En forma interesante, las alteraciones del canal de sodio asociado con la resistencia, son mucho mas variables que las alteraciones identificadas en los receptores GABA, sin embargo, se siguen limitando a un pequeño número de regiones en la proteína. La mayoría de las alteraciones de la proteína del canal de sodio ocurren en una región que forma parte de la cobertura del canal de sodio (DIIS6). Se ha sugerido que los canales de sodio alterados permiten una rápida disociación del insecticida, confiriendo resistencia a los efectos tóxicos del insecticida (Soderlund y Knipple, 2003).

La mutación leucina→fenilalanina en anofelinos puede detectarse mediante pruebas diagnóstico-moleculares basadas en PCR, para discriminar entre individuos homocigotos susceptibles, homocigotos resistentes y heterocigotos (Martínez-Torres *et al*, 1998; Lynd *et al*, 2004). Debido a que la resistencia *kdr* es semi-recesiva o completamente recesiva, la capacidad de identificar organismos heterocigotos es de vital importancia para la detección temprana y manejo de resistencia en campo. Actualmente existe una tendencia a investigar la resistencia a piretroides mediante PCR en regiones donde otras mutaciones *kdr* han sido encontradas, sin embargo, cambios en otras regiones podrían estar asociados a la resistencia.

4.6.-SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DEL DENGUE EN VERACRUZ

Durante muchos años el dengue ha sido una enfermedad que ha ido ganando terreno en todo el país. En el estado de Veracruz su presencia había sido inusual, hasta el 2004, año en el que se presentó como un brote de grandes dimensiones en la zona conurbada de Veracruz-Boca del Río (Boletín Epidemiología, CENAVECE, México).

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 permanente campaña para involucrar a la población a que participe activamente en la eliminación de criaderos del mosquito.

La época de lluvia, la intensa temporada de huracanes y la circulación de nuevos serotipos de dengue en los estados vecinos, son condiciones de riesgo por las cuales se podría esperar un incremento significativo de casos, sobre todo del tipo hemorrágico: cerca de 60 comunidades del estado son consideradas de alto riesgo en las que se están realizando en forma más estricta actividades de prevención y control del mosquito, sin embargo la participación ciudadana es importante, ya que el cuidado de los depósitos de agua y la eliminación de los posibles criaderos hacen que la población tenga una mejor expectativa de salud. (Luzanía *et al.* 2006).

Tabla 1. Casos de Dengue período 2005-2009 a nivel nacional y en el estado de Veracruz, México

	2007		2008		2009	
	DC	DH	DC	DH	DC	DH
Veracruz	12,608	2,645	2,168	1,914	3412	2980

DC: Fiebre por dengue

DH: Fiebre hemorrágica por dengue

Fuente: Secretaría de Salud. Información Epidemiológica de Morbilidad. Dirección General de Epidemiología. México,

La Secretaría de Salud del gobierno estatal de Veracruz afirma que en el territorio veracruzano existen 630 casos de dengue clásico y hemorrágico, cifra que disminuyó en un 45% con relación a los casos detectados en el año 2008. También cataloga como “focos rojos” en incidencia de dengue a los municipios de Coatzacoalcos, Minatitlán y Nanchital, y como "de alto riesgo" a las municipalidades de Veracruz, Boca del Río, Alvarado, Acayucan, entre otros.

Veracruz es hoy por hoy una de las entidades con menos casos de dengue, 97 casos de dengue clásico y hemorrágico (Secretaría Salud Veracruz). Entre los municipios con mayor incidencia se encuentran: Coatzacoalcos, Minatitlán, Cosoleacaque, Veracruz, Poza Rica y Boca del Río.

METODOS

5.1. ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio comprendió el Estado de Veracruz, enfocándose principalmente en las localidades de Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque, además de trabajar con la cepa susceptible New Orleans.



Figura 2. Mapa del Estado de Veracruz

Pánuco. Se encuentra ubicado en la zona norte del Estado, en las coordenadas 22° 03' latitud norte y 98° 11' longitud oeste, a una altura de 10 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con el Estado de Tamaulipas, al este con Pueblo Viejo, Tampico Alto y Ozuluama; al suroeste con Tempoal; al oeste con el Estado de San Luis Potosí.

Tantoyuca. Se encuentra ubicado en la zona montañosa de la Huasteca Veracruzana del Estado, en las coordenadas 21° 21' latitud norte y 98° 14' longitud oeste a una altura de 140 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con Tempoal y Ozuluama, al este con Chontla e Ixcatepec, al Sureste con Chicontepec, al sur con el Estado de Hidalgo, al oeste con Platón Sánchez.

Poza Rica. Se ubica en la zona centro del Estado, a una altura 50 metros sobre el nivel del mar. Limita al noroeste y este con Papantla; al sur con Coatzintla; al noroeste con Tihuatlán.

Martínez de la Torre. Se encuentra ubicado en la zona Norte del Estado, en las coordenadas 20° 04' de latitud norte y 97° 04' de longitud oeste, a una altura de 151 metros sobre el nivel del mar. Limita al Norte con Tecolutla, al Este con Nautla y Misantla, al Sur con Atzalan y Tlapacoyan, al Oeste con el Estado de Puebla y Papantla.

Veracruz. Se encuentra a una altitud de 10msnm con una latitud de 19° 12' 30" N y una longitud de 096° 07' 59" O colindando al norte con La Antigua y el Golfo de México; al sur con Medellín y Boca del Río; al este con el Golfo de México y al oeste con Manlio Fabio Altamirano y Paso de Ovejas.

Coatzacoalcos. Se localiza en la zona sur del Estado, en las coordenadas 18° 09' latitud norte y 94° 26' longitud oeste, a una altura de 10 metros sobre el nivel del mar. Limita con los municipios de Pajapan, Cosoleacaque, Minatitlán, Ixhuatlán del Sureste, Moloacán y las Choapas, al norte con el Golfo de México, al este con el estado de Tabasco.

Cosoleacaque. Se localiza en las llanuras del Sotavento, zona centro costera del Estado, en las coordenadas 18° 00' latitud norte y 94° 38' longitud oeste, a una altura de 50 metros sobre el nivel del mar.

5.2.- MATERIAL BIOLÓGICO

Se realizaron muestreos en las áreas de estudio durante el mes de Octubre 2007 y Julio 2009 colectándose larvas de distintos estadios, las cuales se obtuvieron en criaderos conocidos donde el vector se reproduce (agua estancada) mediante el uso de caladores estándares, aspiradores manuales y eléctricos. El material colectado fue transportado en bolsas Whirl-Pak Nasco ® dentro de termos conteniendo agua para minimizar el estrés causado por el traslado (figura 3).



Figura 3. Acondicionamiento de las larvas colectadas en el insectario.

Figura 4. Distribución de las larvas en charolas por sub-población.

5.2.1.- Establecimiento de colonias en laboratorio

Las larvas fueron distribuidas en charolas de plástico de 35 x 25 cm conteniendo agua declorinada. Cada charola fue identificada cuidadosamente con el nombre de la localidad donde se colectaron. (Figura 4). Las larvas fueron alimentadas periódicamente con alimento balanceado para pez (en hojuela) finamente molido y en con una solución de hígado en polvo al 50% en base de agua. Una vez que las larvas pasaron al estadio de pupa, estas se transfirieron a cámaras de emergencia, al emerger los mosquitos se trasladaron a jaulas de cría de 30 x 30 cm. (figura 5)



Figura 5. Cámaras de emergencia y jaulas para mosquitos

Los mosquitos adultos se alimentaron con agua azucarada al 10% sobre algodones impregnados y con néctar de naranja (como fuente de carbohidratos). Las hembras fueron alimentadas con sangre de rata para la producción de huevos. Las colonias se mantuvieron en condiciones de temperatura y humedad controladas: $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y 70% HR. (Figura 6)



Figura 6. Alimentación de mosquitos con naranja y sangre de rata.

Dentro de las jaulas se colocaron vasos de agua conteniendo papeletas como sustrato de ovoposición para la obtención de huevecillos, las cuales se dejaron de 3-5 días para que los huevos embrionáran. Al extraer las papeletas (con huevos) estas se dejaron secar sobre charolas para su posterior almacenamiento, y se colocaron nuevas papeletas para la obtención de más huevos. (Figura 7)



Figura 7. Vasos con papeletas dentro de la jaula para la ovoposición de huevecillos.

Figura 8. Charola con papeletas para eclosionar huevecillos.

Los huevos contenidos en papeletas fueron puestos a eclosionar para la obtención de larvas y adultos, continuando el ciclo hasta obtener la generación F₀, F₁ y F₂ de larvas y mosquitos adultos con las que se deseó trabajar (Figura 8).

5.3.- PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD Y /O RESISTENCIA EN LARVAS AL ORGANOFOSFORADO TEMEFOS.

La susceptibilidad y /o resistencia de las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) ante el organofosforado temefos se determinó mediante el método de WHO, 1981.

Para la realización del ensayo se utilizaron larvas de estadio III tardío o IV temprano utilizándose temefos (O,O,O´O´-tetrametil – O,O´-tiodi p-fenilen difosforotionato), también comúnmente conocido como “Abate”, (i.a. Chem Service)

Se prepararon recipientes con capacidad 250/500 ml, correctamente etiquetados con anotaciones de control, nombre del producto en evaluación, concentración y numeración secuencial (Ej. 1, 2,3...) ya que los ensayos se realizaron por triplicado. En cada recipiente se colocaron 20 larvas de III o IV estadio. Para los controles se colocaron 99 ml de agua corriente de clorada o agua destilada más 1 ml de alcohol (etanol). Se prepararán soluciones stock del insecticida temefos y se hicieron diluciones que constituyeron las diferentes dosis; se agregó el insecticida temefos a cada vaso y se

registró la mortalidad cada 15min hasta completar 2hrs, 4 hrs, 6hrs, 8hrs y 24hrs de exposición.

Con estos datos se determinó el porcentaje de mortalidad a las 24 hrs, buscándose porcentajes entre el 8% al 90 % de mortalidad (ver anexos).

Los datos obtenidos fueron analizados en el programa Probit (Finney 1971). El cual nos proporciono los resultados que se buscaban: la concentración letal 50 (CL₅₀).



Figura 9. Recipientes con 99ml de agua declorada correctamente etiquetados para la realización de bioensayo en larvas

Como todos los bioensayos de resistencia, los datos obtenidos por este método necesitan una comparación con larvas susceptibles. En este trabajo se utilizó la cepa de referencia New Orleans (proporcionada por el CDC de Atlanta).

Para determinar el grado de resistencia que presentaron las sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* (L.) al organofosforado temefos se realizó la relación R/S, donde R representa a la sub-población en estudio y la S la cepa de referencia. Esta relación se hizo en base a los resultados de CL₅₀, obteniendo así la fracción o proporción de resistencia al organofosforado temefos empleado en cada una de las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) en estudio.

Con los datos obtenidos también se determinó el TL₅₀ (tiempo letal medio) para cada una de las poblaciones a diferentes dosis del organofosforado.

5.4.- PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR SUSCEPTIBILIDAD Y/O RESISTENCIA EN MOSQUITOS ADULTOS A INSECTICIDAS

La susceptibilidad y /o resistencia de las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) se determinó mediante el método de “Botella impregnada” (método CDC) ante diferentes dosis de los insecticidas: fenotrina, permetrina ,deltametrina, bifentrina, lambdacialotina, cipermetrina, alfa-cipermetrina z-cipermetrina grado técnico (tabla 2). Las dosis empleadas para cada insecticida variaron según la respuesta obtenida en los mosquitos de cada una de las sub-poblaciones.

Tabla 2. Insecticidas empleados para la determinación de susceptibilidad.

Nombre	Nombre químico	Cantidad (mg)	Pureza
fenotrina	d-(cis-trans)-Phenotrin	50	6% cis-1R 94% trans-1R
permetrina	Trans-permethrin (mezcla isomerica)	50	92% trans 6% cis
deltametrina		100	99 %
bifentrina		100	98%
lambda-cialotrina	lambda-cialotrina	100	99 %
cipermetrina	cipermetrina (mezcla isomerica)	100	99 %
alfa-cipermetrina	alfa-cipermetrina	250	99.5 %
zeta-cipermetrina	zeta-cipermetrina (mezcla isomerica)	250	98%

^a A cada I.A se le agrego 1ml de acetona para poder utilizarse

Contando con el material preparado y los mosquitos se procede al bioensayo. Para ello se utilizaron mosquitos de la generación F0, F1 y F2 de cada una de las sub-poblaciones (no hubo discriminación entre hembras y machos). Se colectaron en un tubo

o aspirador bucal 20 mosquitos adultos de 1-3 días de edad, alimentados sin ingesta de sangre (en el caso de las hembras) y se transfirieron a las botellas impregnadas. Se tapa rápidamente la botella para impedir el escape de los mosquitos y se examinan para ver si están en perfecto estado de supervivencia (Figura 9).



Figura 10. Mosquitos aspirados y transferidos a las botellas.

Una vez que los mosquitos fueron expuestos a la dosis de insecticida empezó el conteo del tiempo, y se hicieron observaciones cada 10 minutos, así hasta completar 1 hora. Cada 10 min se hizo un registro sobre la cantidad de mosquitos derribados teniendo el dato a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min. El criterio para determinar el estado de derribe se basó en: 1) el mosquito se encuentra con el dorso en el fondo de la botella (o con las patas hacia arriba), 2) es incapaz de volar, 3) tiene movimientos aberrantes y es incapaz de mantenerse en posición erguida, mientras que la mortalidad fue registrada a las 24 horas post-exposición. Un mosquito muerto fue aquel que no presentó movimiento después de un tiempo de 24 horas. Los experimentos se replicaron por triplicado.

Ya completada la hora de exposición los mosquitos (derribados o no) fueron transferidos a cámaras de recuperación. Estas cámaras no son más que vasos desechables con una tapa de gasa, a los cuales se les colocó en la parte superior un algodón humedecido con agua azucarada al 10% para su alimentación.



Figura 11. Cámaras de recuperación

El tiempo de recuperación que se empleó fue de 24 hrs, cumplidas estas se registró ahora la cantidad de mosquitos tanto vivos como muertos, y en casos de que haya recuperados al efecto del insecticida, también se registro. A la hora solo se hace anotación de la cantidad de mosquitos derribados (efecto *knock down* de los piretroides), y a las 24 hrs aquellos que estén muertos o vivos, sin embargo puede darse el caso de que algunos mosquitos puedan haberse recuperado en el transcurso de las 24 hrs. Con estos datos se determinó el porcentaje de mortalidad tanto a la hora como a las 24 hrs, buscándose porcentajes entre el 8% al 90 % de mortalidad (ver anexos). Todos los bioensayos fueron realizados por triplicado para cada dosis de insecticida

Los datos obtenidos fueron analizados en el programa Probit (Finney 1971). El cual nos proporciona los resultados que se buscaban: dosis *knock-down* 50 (DK₅₀) a la hora de exposición, la dosis letal 50 y 95 (DL₅₀ y DL₉₅) a las 24 hrs.

Como todos los bioensayos de resistencia, los datos obtenidos por este método necesitan una comparación con mosquitos susceptibles. En este trabajo se utilizó la cepa de referencia New Orleans (proporcionada por el CDC de Atlanta).

Para determinar el grado de resistencia que presentaron las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) a cada uno de los insecticidas se realizó la relación R/S, donde R representa a la sub-población en estudio y la S la cepa de referencia. Esta relación se hizo en base a los resultados de DK₅₀, y DL₅₀ obteniendo así la fracción o proporción de resistencia a los insecticidas empleados en cada una de las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) en estudio.

Con los datos obtenidos también se determino el TL_{50} (tiempo letal medio) para cada una de las poblaciones a diferentes dosis de los insecticidas.

5.4.1.- Metodología para la preparación de la botella (Método CDC)

1. Seleccionar botellas Wheaton® de 250 ml limpias y secas
2. Etiquetar las botellas con: fecha, localidad, dosis y número de repetición.
3. Agregar 1 ml de Acetona más la cantidad apropiada de la solución stock del insecticida a probar. Las soluciones stock se prepararon diluyendo la cantidad apropiada del insecticida en un volumen de acetona, dependiendo el volumen final requerido, utilizando la formula de $C_1V_1 = C_2V_2$ (ejemplo: tabla 3). Una vez elaboradas estas se etiquetan correctamente y se almacenan en refrigeración en frascos ámbar o cubiertos con aluminio (debido a su fotoestabilidad).
4. Agitar la botella para permitir que el insecticida se mezcle con la acetona y que cubra las paredes de la botella, e invertir la botella para asegurarse que quede impregnada la tapa.
5. Remover la tapa y seguir girando la botella hasta que cualquier signo visible de líquido desaparezca.
6. Dejar la botella verticalmente en la oscuridad.
7. Dejar secar la botella 24 horas a una temperatura de 25 °C, de ser más baja hasta que esté completamente seca y no se perciba olor a acetona.

En los bioensayos es importante llevar un control, en este caso los controles fueron impregnados solo con 1 mL de acetona.

Tabla 3. Ejemplo sobre cómo realizar la selección de volumen del stock para impregnar las botellas.

Concentración de la Solución stock	Cantidad de stock adicionada a la botella *	Concentración final por botella
1000 ppm ^a	1 µg	1 µg
100 ppm	10 µg	1 µg
10 ppm	100 µg	1 µg

*Más el ml de acetona, ^a 1ppm = 1 µg/mL



Figura 12. Material necesario para impregnar las botellas.

5.5.- SEPARACIÓN DEL MATERIAL PARA LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se llevó a cabo la separación de material biológico que no fue expuesto a ningún insecticida así como del material biológico del cual se tenía previo conocimiento de susceptibilidad y / o resistencia en base a CL_{50} y DL_{50} para cada una de las siete sub-poblaciones larvarias y adultas de *Ae. aegypti* (L.).

Se separaron 60 hembras para cada una de las siete sub-poblaciones larvarias y adultas de *Ae. aegypti* (L.) procedentes del estado de Veracruz que no tuvieron ninguna exposición a insecticidas y 30 hembras para cada una de las siete sub-poblaciones larvarias y adultas que tuvieron exposición a insecticidas.

5.6.- DETERMINACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA

Mediante los ensayos bioquímicos se buscaron enzimas alteradas de acetilcolinesterasa (AChE), glutatión - s - transferasa (GST), esterasas y mono oxigenasas. La AChE alterada es el mecanismo de resistencia más común para insecticidas organofosforados y carbamatos. Los altos niveles de GST son asociados con resistencia al DDT y en algunos casos a organofosforados. Las esterasas pueden también estar involucradas en la resistencia a organofosforados, carbamatos y piretroides. Sin embargo, existen esterasas específicas para cada tipo de insecticidas.

Para la determinación de los mecanismos de resistencia se aplicó el método del CDC de Atlanta, GA, USA. Se homogenizó el individuo completo (larva o adulto) individualmente en 100 µl de 0.01 M pH 7.2 de buffer de potasio, y posteriormente se re suspendió con el mismo buffer hasta tener un volumen de 2 ml. Se tomaron alícuotas de 100 µl del homogenato y se transfirieron a pocillos de una microplaca. Los individuos fueron analizados por triplicado. Se evaluaron las 6 diferentes enzimas de resistencia para cada mosquito: acetilcolinesterasa (AChE), acetilcolinesterasa insensible (iAChE), α y β esterasas, oxidasas microsómicas de función múltiple (MFO) y glutatión s-transferasas (GST) según lo describe Brogdon y McAllister (1998, 1997), Brogdon y Barber (1990); Brogdon (1989) y Brogdon *et al.*, (1988 a, b)

5.6.1 –Prueba α y β - esterasas

Los reactivos alfa o beta naftil acetato se mezclaron con el homogenato y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. Orto Dianisidina tetrazotizada es agregada, y la microplaca se incuba por 4 minutos y después de este tiempo se leyó utilizando el filtro de 540 nm. Alfa o beta naftil son utilizados como controles positivos.

5.6.2.- Prueba hemo-peroxidasas

3,3,5,5-tetrametil benzidina hidrocloreuro (TMBZ) se disuelve en metanol y se agregan a buffer de acetato 0.25 M pH 5 y se mezcla con el homogenato del mosquito junto con peroxido de hidrogeno 3% . Esto se incubó por 10 minutos y después se leyó con un filtro de 620 nanómetros. Citocromo C (de corazón bovino) es utilizado como control positivo.

5.6.3.- Prueba Glutación-S-Transferasa

Glutación reducido se agregó al homogenato junto con 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (cDNB). Esto se lee inmediatamente con un lector de microplacas utilizando un filtro de 340 nm y después de 5 minutos. La lectura inicial T0 se resta de la lectura a los 5 minutos.

5.6.4.- Prueba Acetilcolinesterasa.

Yoduro de acetiltiocolina (ATCH) se mezcla con el homogenato del mosquito. El ácido ditio-bis nitrobenzoico (DTNB) es agregado y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente después de este tiempo se leyó en un lector de microplacas utilizando un filtro de 414 nm.

5.6.5.- Prueba Acetilcolinesterasa insensible.

Esta prueba determina si un sitio de unión alterado en la AchE está presente. ATCH se mezcla con propoxur y se agrega al homogenato del mosquito. El ácido DTNB es agregado y es leído en un lector de microplacas utilizando un filtro de 414 nm. Si un sitio de unión de la acetilcolina está presente en forma homocigótica, se tornará de un color amarillo oscuro. Si se encuentra en forma heterocigótica, la reacción será amarilla intermedio, indicando que los heterocigotos están presentes. De otra forma, la solución permanecerá amarillo claro.

5.7.- ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se utilizaron un mínimo de 2 controles positivos y negativos por placa de acuerdo a la pruebas enzimática. Se registraron los valores de absorbancia en un lector de placas marca Benchmark (Biorad®). Una vez obtenidos los valores de absorbancia para cada una de la pruebas se realizó un análisis de varianza entre los individuos vivos por insecticida y sub-población, comparando también la cepa susceptible, así como los individuos sin exponer de cada sub-población estudiada, esto para determinar si los grupos son significativamente distintos. Posteriormente se llevó a cabo una comparación múltiple de medias con la finalidad de seleccionar el o los tratamientos con diferencias estadísticamente significativas. Se utilizó el software computacional SPSS17.

Se determinó el umbral de tolerancia a partir de los valores máximos de absorbancia mostrados por la cepa susceptible New Orleans.

6.-RESULTADOS

6.1. Determinación de la susceptibilidad y/o resistencia al organofosforado Temefos

El organofosforado temefos fue probado en siete sub-poblaciones del estado de Veracruz. Los resultados de mortalidad CL_{50} y factores de resistencia se presentan en la tabla 4. La respuesta de las sub-poblaciones al organofosforado fue la siguiente: Poza Rica mostró resistencia con un factor de resistencia de 10X sin embargo las sub-poblaciones de Martínez de la Torre (6X), Coatzacoalcos (6X) y Cosoleacaque (8X) mostraron tolerancia a este; Pánuco, Tantoyuca y Veracruz muestran aún susceptibilidad.

Tabla 4. Toxicidad (CL_{50}) y razón de resistencia (RR50) de larvas *Ae. aegypti* (L.) de las sub-poblaciones del estado de Veracruz, México expuestas a temefos.

SUBPOBLACION	CL ₅₀ (µg/ml)	TL ₅₀ (hrs)	RRCL ₅₀
Pánuco	0.008 (0.007- 0.009)	12.3 (9.83- 16.86)	1.6
Tantoyuca	0.01 (0.009- 0.013)	19.63 (13.48- 45.07)	2
Poza Rica	0.05 (0.040-0.051)	13.73 (10.07-21.22)	10
Martínez de la Torre	0.03 (0.016-0.042)	20.23 (12.23-49.33)	6
Veracruz	0.023 (0.020-0.026)	14.81 (10.65-24.66)	4.6
Coatzacoalcos	0.03 (0.020- 0.032)	19.33 (13.737-31.921)	6
Cosoleacaque	0.04 (0.038- 0.048)	5.92 (4.17-9.81)	8
New Orleans	0.005 (0.005-0.0068)	16.80 (13.60-22.84)	

6.2. Mecanismos enzimáticos y umbral de tolerancia de la cepa de referencia

Se estudiaron cinco diferentes pruebas enzimáticas involucradas en la resistencia a insecticidas: α -esterasa, β -esterasa, oxidasas de función múltiple (MFO), glutatión s-transferasa (GST) y acetilcolinesterasa insensible (iAChE); ante las cuales fueron expuestas larvas de III y IV instar de *Ae. aegypti* (L.) seleccionadas con temefos a la CL₅₀ obtenida y larvas que no fueron seleccionadas con este.

Las sub-poblaciones estudiadas fueron: Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque, así como la cepa de referencia New Orleans.

Los resultados de los niveles promedios máximos obtenidos a partir de la cepa de referencia se muestran en la tabla 5 y 6. Dichos resultados presentan larvas que sobrevivieron a la selección de temefos y aquellas que no tuvieron selección con este.

Tabla 5. Valores máximos de absorbancia (umbral de tolerancia) obtenidos a partir de la cepa de referencia New Orleans **expuesta** al organofosforado **temefos**.

	PRUEBAS ENZIMATICAS				
	α -esterasa	β -esterasa	Oxidasas	GST	iAChE
NEW ORLEANS	0.590	1.004	0.169	0.052	0.034

Tabla 6. Valores máximos de absorbancia (umbral de tolerancia) obtenidos a partir de la cepa de referencia New Orleans **no expuesta** al organofosforado **temefos**.

	PRUEBAS ENZIMATICAS				
	α -esterasa	β -esterasa	Oxidasas	GST	iAChE
NEW ORLEANS	1.039	1.138	0.275	0.040	0.013

6.3. Mecanismos enzimáticos y umbral de tolerancia en sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz.

A partir de los valores máximos de absorbancia obtenidos por la cepa de referencia New Orleans se determinaron los porcentajes de individuos que sobrepasaron ese umbral de tolerancia. Dichos valores se utilizaron para clasificar la actividad enzimática como inalterada cuando los porcentajes fueran menores al 15%, incipientemente alterada si los porcentajes están entre el 15% y 50% y alterada si sobrepasan el 50% (Montella *et al.* 2007)

Las tablas 7 y 8 muestran los porcentajes de individuos que sobrepasaron el umbral de tolerancia expresado por la cepa de referencia. De acuerdo con la clasificación antes mencionada se presenta en color rojo claro las enzimas no alteradas ($\leq 15\%$), en rojo medio las incipientemente alteradas ($15\% \geq 50\%$) y en rojo fuerte las enzimas alteradas ($> 50\%$) para cada sub-población que fue expuesta al organofosforado así como sin ninguna exposición a este.

Tabla 7. Porcentaje de individuos *Ae.aegypti* (L.) que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans al ser **seleccionados con temefos**

SUB-POBLACIÓN	MECANISMOS DE RESISTENCIA ENZIMÁTICA				
	α ESTERASA	β ESTERASA	OXIDASAS	GST	iAChE
Pánuco	0	0	0	2	0
Tantoyuca	0	0	0	2	5
Poza Rica	0	0	0	2	2
Martínez de la Torre	0	0	0	0	0
Veracruz	0	0	0	0	2
Coatzacoalcos	0	0	0	0	0
Cosoleacaque	2	0	0	8	0

Tabla 8. Porcentaje de individuos *Ae.aegypti* que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans **sin tener selección previa con temefos**

SUB-POBLACIÓN	MECANISMOS DE RESISTENCIA ENZIMÁTICA				
	α ESTERASA	β ESTERASA	OXIDASAS	GST	iAChE
Pánuco	55	0	82	20	0
Tantoyuca	37	2	65	0	2
Poza Rica	7	0	8	8	0
Martínez de la Torre	47	0	0	0	0
Veracruz	42	62	3	0	0
Coatzacoalcos	28	2	0	0	0
Cosoleacaque	27	3	5	0	0

6.4. Análisis y comparaciones de medias de absorbancia obtenidas entre las sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz expuestas al organofosforado temefos

Valores de absorbancia obtenidos fueron posteriormente evaluados mediante un análisis de varianza y comparación múltiple de medias Tukey con un nivel de significancia $p \leq 0.05$. Las comparaciones se realizaron entre los individuos de cada sub-población contra los pertenecientes a la cepa de referencia New Orleans. La tabla 9 muestra las medias de absorbancias obtenidas en cada prueba bioquímica de las sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* (L) del estado de Veracruz que sobrevivieron al ser expuestas a temefos así como la comparación múltiple de medias realizadas entre cada una de las sub-poblaciones estudiadas respecto a la cepa susceptible.

Tabla 9. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas en larvas *Ae. aegypti* (L.) que fueron expuestas al organofosforado **temefos** y comparación de medias respecto a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$).

SUB-POBLACIÓN	PRUEBAS ENZIMÁTICAS									
	α - ESTERASA		β - ESTERASA		OXIDASA		GST		iAChE	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
NEW ORLEANS	0.765 ^A	0.099	0.857 ^A	0.103	0.158 ^A	0.035	0.007 ^A	0.037	0.003 ^A	0.003
PÁNUCO	0.645 ^B	0.096	0.767 ^B	0.077	0.071 ^B	0.012	0.019 ^B	0.004	-0.008 ^A	0.015
TANTOYUCA	0.705 ^C	0.102	0.744 ^C	0.099	0.067 ^C	0.014	0.023 ^C	0.004	0.000 ^A	0.009
POZA RICA	0.652 ^D	0.096	0.763 ^D	0.142	0.100 ^D	0.034	0.022 ^D	0.006	-0.032 ^B	0.042
MTZ DE LA TORRE	0.734 ^A	0.110	0.843 ^A	0.096	0.088 ^E	0.023	0.020 ^E	0.005	0.002 ^A	0.002
VERACRUZ	0.690 ^E	0.061	0.743 ^E	0.060	0.139 ^F	0.021	0.016 ^F	0.007	0.001 ^A	0.006
COATZACOALCOS	0.707 ^F	0.079	0.792 ^F	0.072	0.130 ^G	0.018	-0.001 ^A	0.025	-0.009 ^C	0.030
COSOLEACAQUE	0.658 ^G	0.081	0.724 ^G	0.059	0.136 ^H	0.015	0.024 ^G	0.006	0.002 ^A	0.004

Letras diferentes significa diferencia significativa

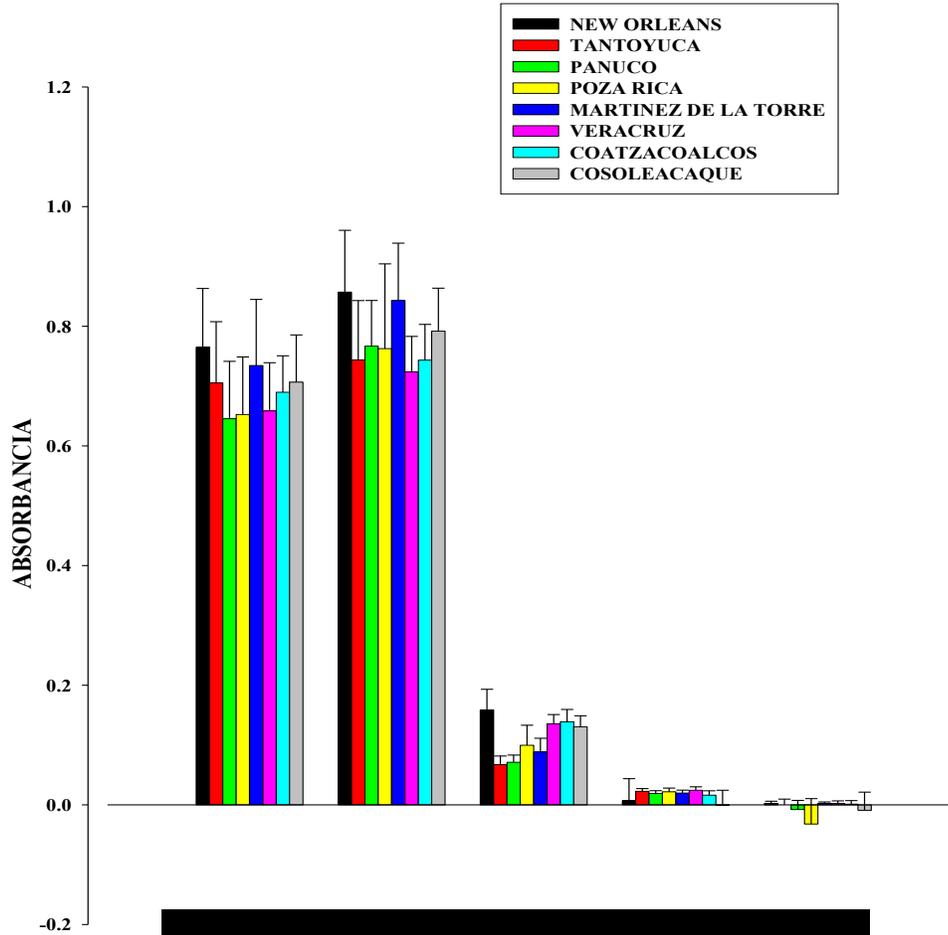


Figura 13. Valores medios de absorbancia en larvas *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que **sobrevivieron a la exposición de temefos** obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.

6.4.1. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en sub-poblaciones larvarias *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz expuestas al organofosforado temefos.

De acuerdo a los resultados que se muestran en la tabla 9 se encuentra que para las pruebas enzimáticas α -esterasas y β -esterasas seis de las siete sub-poblaciones larvarias del estado de Veracruz (Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque) son diferentes significativamente respecto a New Orleans en donde en ninguna de estas sobrepasan los valores medios de absorbancia de la línea de referencia. En ambas pruebas Martínez de la Torre no presento diferencia significativa con New Orleans. Mientras que para oxidasas todas las sub-poblaciones larvarias fueron diferentes significativamente de la línea de referencia aun sin que ninguna de estas sobrepasara los valores medios de absorbancia de New Orleans. Para glutatión s-transferasas Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz y Cosoleacaque se encontró diferencias significativas entre estas y New Orleans en donde se superaron los valores medios de absorbancia de la cepa de referencia. En la prueba de acetilcolinesterasa insensible se observa que solo Poza Rica y Coatzacoalcos son diferentes significativamente a la cepa de referencia New Orleans en donde ninguna de estas sobrepasa los valores medios de absorbancia de New Orleans.

6.5. Análisis y comparaciones de medias de absorbancia obtenidas entre las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz que no fueron expuestas al organofosforado temefos

Los resultados de absorbancia obtenidos fueron evaluados mediante un análisis de varianza y una comparación múltiple de medias Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Se realizaron comparaciones entre individuos de cada sub-población del estado de Veracruz contra los pertenecientes a la cepa de referencia NEW ORLEANS. En la tabla 10 se muestran las medias de absorbancias obtenidas en cada ensayo bioquímico de las sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz así como la comparación múltiple de medias realizada entre cada una de las sub-poblaciones respecto a la cepa de referencia.

Tabla 10. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas en larvas de *Ae. aegypti* (L.) que **no fueron expuestas** al organofosforado **temefos** y comparación de medias respecto a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$).

SUB-POBLACIÓN	PRUEBAS ENZIMÁTICAS									
	α - ESTERASA		β - ESTERASA		OXIDASA		GST		iAChE	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
NEW ORLEANS	0.442 ^A	0.048	0.739 ^A	0.099	0.133 ^A	0.021	0.011 ^A	0.032	0.003 ^A	0.007
PÁNUCO	0.561 ^B	0.096	0.737 ^B	0.111	0.196 ^B	0.050	-0.011 ^A	0.034	-0.040 ^B	0.069
TANTOYUCA	0.617 ^C	0.096	0.609 ^A	0.096	0.214 ^C	0.040	-0.004 ^A	0.070	-0.022 ^C	0.040
POZA RICA	0.464 ^A	0.069	0.675 ^A	0.082	0.096 ^D	0.048	-0.012 ^A	0.052	-0.012 ^A	0.027
MTZ DE LA TORRE	0.601 ^D	0.123	0.622 ^C	0.111	0.095 ^E	0.013	-0.060 ^B	0.073	-0.027 ^D	0.052
VERACRUZ	0.522 ^E	0.081	0.771 ^D	0.100	0.111 ^A	0.025	-0.009 ^C	0.034	0.001 ^A	0.009
COATZACOALCOS	0.572 ^F	0.100	1.072 ^A	0.218	0.124 ^F	0.019	-0.026 ^D	0.040	-0.009 ^A	0.020
COSOLEACAQUE	0.545 ^G	0.083	0.748 ^A	0.105	0.103 ^G	0.020	-0.036 ^A	0.049	-0.008 ^A	0.028

Letras diferentes significa diferencia significativa

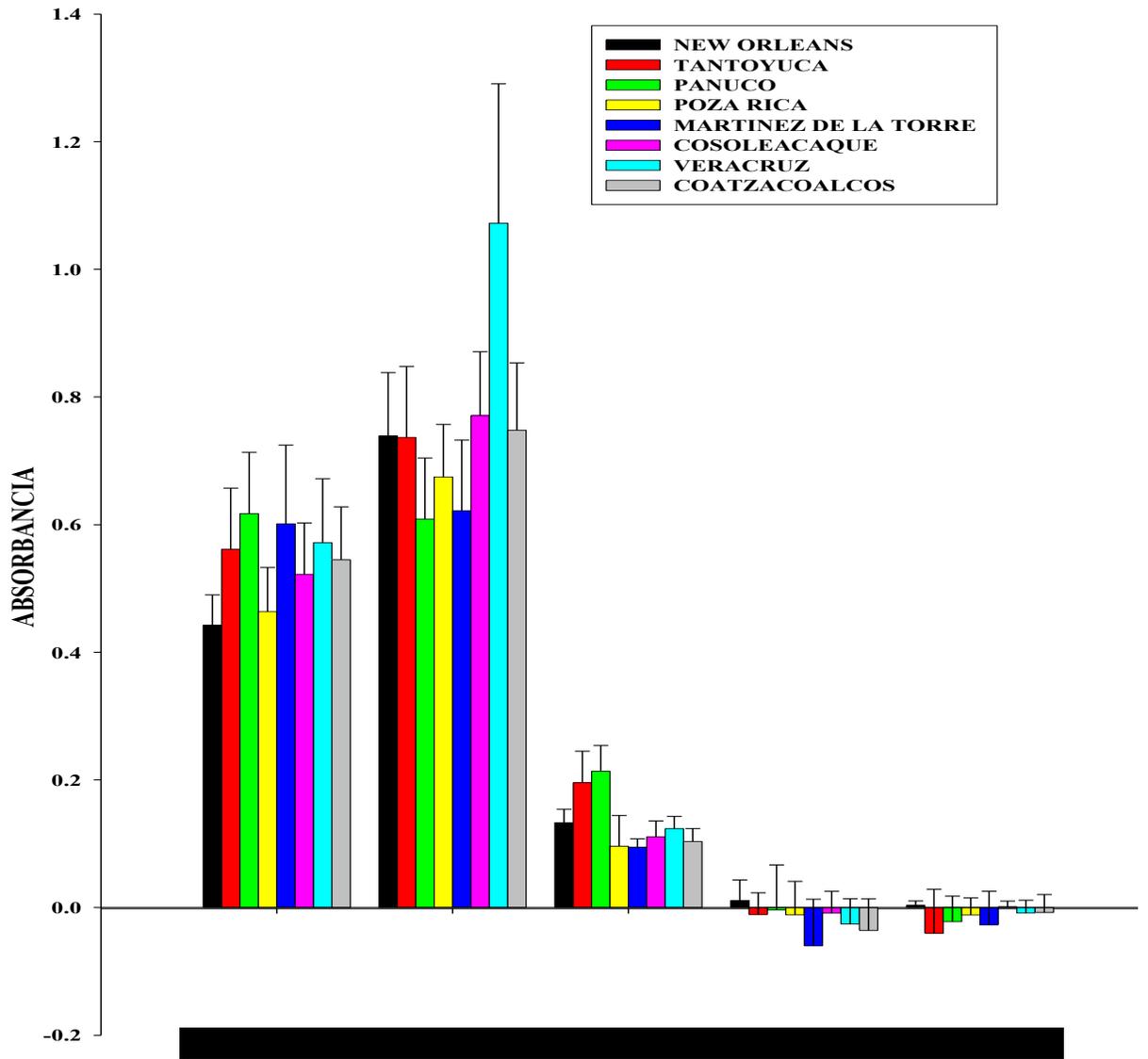


Figura 14. Valores medios de absorbancia en larvas *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia **que no fueron expuestas al organofosforado temefos** obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.

6.5.1. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en sub-poblaciones larvarias *Ae.aegypti* (L.) del estado de Veracruz sin haber sido expuestas al organofosforado temefos.

Se analizó un grupo de larvas de III y IV instar de *Ae.aegypti* (L.) que no fueron expuestas al organofosforado, sino que fueron sacadas de las poblaciones y muertas al someterse a temperaturas de -70°C . A estos individuos se les realizaron las pruebas enzimáticas correspondientes, se determinó el umbral de tolerancia a partir de la cepa de referencia New Orleans y se compararon a nivel media con respecto a la cepa de referencia. De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 10 la prueba enzimática de α -estarasas se observa que no hubo diferencia significativa entre la cepa de referencia y la sub-población de Poza Rica aun cuando el valor medio de absorbancia de esta sobrepasa el de New Orleans. Pánuco, Tantoyuca, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque fueron diferentes significativamente de la línea de referencia en donde los valores medios de absorbancia de cada sub-población sobrepasaron el valor medio de la cepa de referencia New Orleans.

En lo que respecta para el mecanismo de β -esterasas se encuentra que hubo diferencia significativa entre la cepa New Orleans y las sub-poblaciones de Pánuco, Martínez de la Torre y Veracruz, sin embargo ninguna de estas sobrepasa el valor medio de absorbancia de New Orleans. Para las sub-poblaciones de Pánuco, Tantoyuca, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque no hubo diferencia significativa entre estas y la cepa de referencia aun y cuando los valores medios de absorbancia de Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque sobrepasaron el valor medio de absorbancia de New Orleans.

Para la prueba enzimática oxidadasas se encuentra que seis de las siete sub-poblaciones (Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Coatzacoalcos y Cosoleacaque) son diferentes significativamente a la línea de referencia en donde solo Pánuco y Tantoyuca sobrepasaron los valores medios de absorbancia de New Orleans.

En el ensayo de glutatión s-transferasas solo las sub-poblaciones de Martínez de la Torre, Veracruz y Coatzacoalcos fueron diferentes significativamente respecto a la cepa de referencia sin embargo en ninguna de estas sobrepasaron los valores medios de absorbancia de New Orleans. Mientras que para la acetilcolinesterasa insensible solo

hubo diferencia significativa entre New Orleans y las sub-poblaciones de Pánuco, Tantoyuca y Martínez de la Torre en donde en ninguna de estas se sobrepasó el valor medio de absorbancia de New Orleans.

6.6. Determinación de la susceptibilidad y/o resistencia a insecticidas piretroides

Los resultados del efecto Knockdown DK50 (dosis Knockdown a 1h de exposición) y mortalidad DL50 (dosis letal registrada después de 1h de exposición y 24h post-recuperación) y factores de resistencia se presentan en la tabla 11. Los insecticidas d-fenotrina, permetrina, deltametrina, cipermetrina, alfa-cipermetrina, z-cipermetrina, lambdacialotrina y bifentrina fueron probados para las siete sub-poblaciones del estado

Las sub-poblaciones mostraron mayor resistencia Knockdown ($RR_{KD50} > 10$) para los piretroides alfa-cipermetrina (7/7), fenotrina (5/7), lambdacialotrina (3/7) y en menor proporción permetrina, cipermetrina (2/7), z-cipermetrina y bifentrina (1/7). Para alfa-cipermetrina todas las sub-poblaciones mostraron resistencia Knockdown ($RR_{KD50} > 10$) superando valores de 100X las sub-poblaciones: Poza Rica (289X), Coatzacoalcos (272X), Martínez de la Torre (226X) y Veracruz (153X) y valores menores para Pánuco (88X), Cosoleacaque (76X) y Tantoyuca (29X). Para fenotrina, cinco de las siete sub-poblaciones mostraron resistencia alta: Poza Rica (62X), Veracruz (58X), Coatzacoalcos (42X), Martínez de la Torre (32X) y Pánuco (19X).

Coatzacoalcos (24X), Poza Rica (18X) y Veracruz (17X) mostraron valores altos de resistencia Knockdown ($RR_{KD50} > 10$) para el piretroide lambdacialotrina.

Para los piretroides permetrina y cipermetrina sólo dos sub-poblaciones de las siete mostraron resistencia Knockdown (RR_{KD50}) con valores 12X, 11X, 16X y 11X respectivamente. Para los piretroides z-cipermetrina y bifentrina únicamente una de las siete sub-poblaciones mostraron resistencia Knockdown (RR_{KD50}) con valores de 10X y 21X respectivamente. Para deltametrina ninguna de las sub-poblaciones mostró resistencia Knockdown ($RR_{KD50} > 10$), solo en tres sub-poblaciones mostraron resistencia moderada (Coatzacoalcos (8X), Veracruz (7X) y Poza Rica (7x)) por lo que el resto de las sub-poblaciones fueron susceptibles.

Resultados de mortalidad a las 24hrs muestran que seis de las siete sub-poblaciones exhibieron resistencia a alpha-cipermetrina, superando valores de RR_{DL50} de 100X los valores obtenidos fueron: Poza Rica (675X), Cosoleacaque (526X), Martínez de la Torre (425X), Veracruz (290X) y Pánuco (155X), solo Tantoyuca con el menor valor (46X). Para lambda-cialotrina cuatro de las siete sub-poblaciones analizadas mostraron valores de $RR_{DL50} >10$, las sub-poblaciones de Coatzacoalcos y Poza Rica (197X y 156X, respectivamente), seguido por Veracruz (67X) y Cosoleacaque (27X), Pánuco y Tantoyuca se mostraron susceptibles. Para d-fenotrina cuatro de las siete sub-poblaciones analizadas exhibieron resistencia, de mayor a menor Poza Rica (51X), Veracruz (43X), Coatzacoalcos (29X) y Martínez de la Torre (14X), Tantoyuca y Cosoleacaque exhibieron resistencia moderada (7X y 6X respectivamente). En deltametrina, aunque ninguna sub-población mostró resistencia knockdown, si se observó recuperación a las 24h postexposición lo que resultó que en tres de las siete sub-poblaciones mostraron resistencia, siendo estas Coatzacoalcos (19X), Veracruz (18X) y Poza Rica (17X). Pánuco, Tantoyuca, Martínez de la Torre y Cosoleacaque se mantuvieron susceptibles.

Tabla 11. Susceptibilidad en mosquitos adultos de *Ae. aegypti* (L.) del estado Veracruz, México a insecticidas piretroides a 1 h de exposición (KD₅₀) y 24 h postrecuperación (DL₅₀)

	d-FENOTRINA	PERMETRINA	DELTAMETRINA	CIPERMETRINA	ALFA-CYPERMETRINA	Z-CIPERMETRINA	LAMBDA-CIALOTRINA	BIFENTRINA
Panuco KD ₅₀	8.13 (4.67-14.68)	2.28(1.71-2.96)	0.063(0.046-0.089)	0.263(0.190-0.368)	0.141(0.113-0.177)	0.223(0.180-0.282)	0.014(0.010-0.019)	0.09(0.060-0.140)
RR _{KD50}	18.48	5.07	3.00	2.58	88.12	2.14	2.76	0.43
LD ₅₀	0.24(0.13-0.41)	0.62(0.43-0.83)	0.023(0.016-0.031)	0.196(0.129-0.299)	0.171(0.135-0.222)	0.200(0.158-0.258)	0.006(0.003-0.114)	0.033(0.019-0.056)
RR _{LD50}	0.71	2.82	2.56	2.97	155.45	3.92	1.43	0.61
Tantoyuca KD ₅₀	3.26(2.53-4.16)	1.48(1.27-1.70)	0.017(0.015-0.020)	0.108(0.076-0.148)	0.047(0.032-0.070)	0.561(0.432-0.727)	0.016(0.009-0.029)	0.18(0.140-0.230)
RR _{KD50}	7.41	3.29	0.81	1.06	29.37	5.39	3.24	0.86
LD ₅₀	0.98(0.68-1.34)	1.24(1.05-1.44)	0.017(0.014-0.018)	0.124(0.085-0.177)	0.051(0.032-0.0825)	0.990(0.784-1.284)	0.001(0.0004-0.002)	0.147(0.113-0.188)
RR _{LD50}	2.88	5.64	1.89	1.88	46.36	19.41	1.43	2.72
Poza Rica KD ₅₀	27.29(24.54-29.96)	8.29(7.15-9.57)	0.146(0.130-0.160)	1.580(1.410-1.762)	0.462(0.385-0.560)	0.923(0.790-1.062)	0.090(0.070-0.120)	1.04(0.900-1.200)
RR _{KD50}	62.02	18.42	6.95	15.49	288.75	8.87	18.00	4.95
LD ₅₀	17.40(15.16-19.64)	7.31(4.78-10.71)	0.150(0.130-0.170)	1.881(1.502-2.514)	0.743(0.595-0.972)	1.096(0.882-1.366)	0.109(0.081-0.143)	0.835(0.737-0.947)
RR _{LD50}	51.18	33.23	16.67	28.50	675.45	21.49	155.71	15.46
M.de la Torre KD ₅₀	14.01(10.60-18.30)	5.59(4.61-6.58)	0.019 (0.014-0.026)	1.145(1.00-1.294)	0.361(0.307-0.428)	0.260(0.199-0.339)	0.016(0.014-0.019)	0.153(0.127-0.187)
RR _{KD50}	31.84	12.42	0.90	11.22	225.62	2.5	3.20	0.73
LD ₅₀	4.74(3.39-6.37)	4.84(3.94-5.74)	0.001(0.0004-0.002)	1.234(1.055-1.444)	0.467(0.373-0.624)	0.337(0.262-0.434)	0.006(0.0042-0.0074)	0.131(0.110-0.158)
RR _{LD50}	13.94	22.00	0.11	18.70	424.54	6.61	8.57	2.43
Veracruz KD ₅₀	25.47(21.70-29.80)	2.66(2.23-3.14)	0.154(0.132-0.177)	0.281(0.231-0.339)	0.245(0.204-0.297)	0.333(0.259-0.426)	0.086(0.060-0.120)	4.40 (3.870-4.970)
RR _{KD50}	57.89	5.91	7.33	2.75	153.12	3.20	17.20	20.95
LD ₅₀	14.72(12.22-17.39)	2.41(2.03-2.83)	0.159(0.126-0.197)	0.276(0.227-0.333)	0.320(0.259-0.408)	0.376(0.267-0.538)	0.047(0.029-0.073)	1.908(1.508-2027)
RR _{LD50}	43.29	10.95	17.67	4.18	290.91	7.37	67.14	35.33
Coatzacoalcos KD ₅₀	18.40(15.84-21.19)	2.94(2.48-3.45)	0.168(0.149-0.189)	0.550(0.447-0.662)	0.435(0.344-0.562)	1.078(0.937-1.232)	0.120(0.080-0.180)	0.43(0.310-0.600)
RR _{KD50}	41.82	6.53	8.00	5.39	271.87	10.36	24.00	2.05
LD ₅₀	9.97(8.16-11.82)	1.96(1.64-2.30)	0.175(0.156-0.195)	0.405(0.315-0.509)	0.579(0.448-0.776)	1.364(1.216-1.545)	0.138(0.084-0.243)	0.413(0.281-0.608)
RR _{LD50}	29.32	8.91	19.44	6.14	526.36	26.74	197.14	7.65
Cosoleacaque KD ₅₀	3.78(3.05-4.46)	0.68(0.57-0.80)	0.030(0.023-0.038)	0.256(0.198-0.319)	0.122(0.089-0.167)	0.203(0.157-0.254)	0.045(0.030-0.060)	1.32(1.060-1.660)
RR _{KD50}	8.59	1.51	1.43	5.39	76.25	1.29	9.00	6.29
LD ₅₀	2.18(1.68-2.77)	0.43(0.35-0.51)	0.025(0.019-0.033)	0.155(0.108-0.207)	0.005(0.0008-0.014)	0.102(0.066-0.140)	0.019(0.010-0.033)	1.358(1.082-1.722)
RR _{LD50}	6.41	1.95	2.78	2.35	4.54	2.00	27.14	25.15
New Orleans KD ₅₀	0.44(0.38-0.49)	0.45(0.37-0.51)	0.021(0.017-0.024)	0.102(0.084-0.122)	0.0016(0.0013-0.0018)	0.104(0.081-0.135)	0.005(0.0002-0.001)	0.21(0.170-0.280)
LD ₅₀	0.34(0.28-0.39)	0.22(0.15-0.27)	0.009(0.003-0.015)	0.066(0.054-0.081)	0.0011(0.0009-0.0013)	0.051(0.041-0.064)	0.0007(0.0002-0.001)	0.054(0.040-0.071)

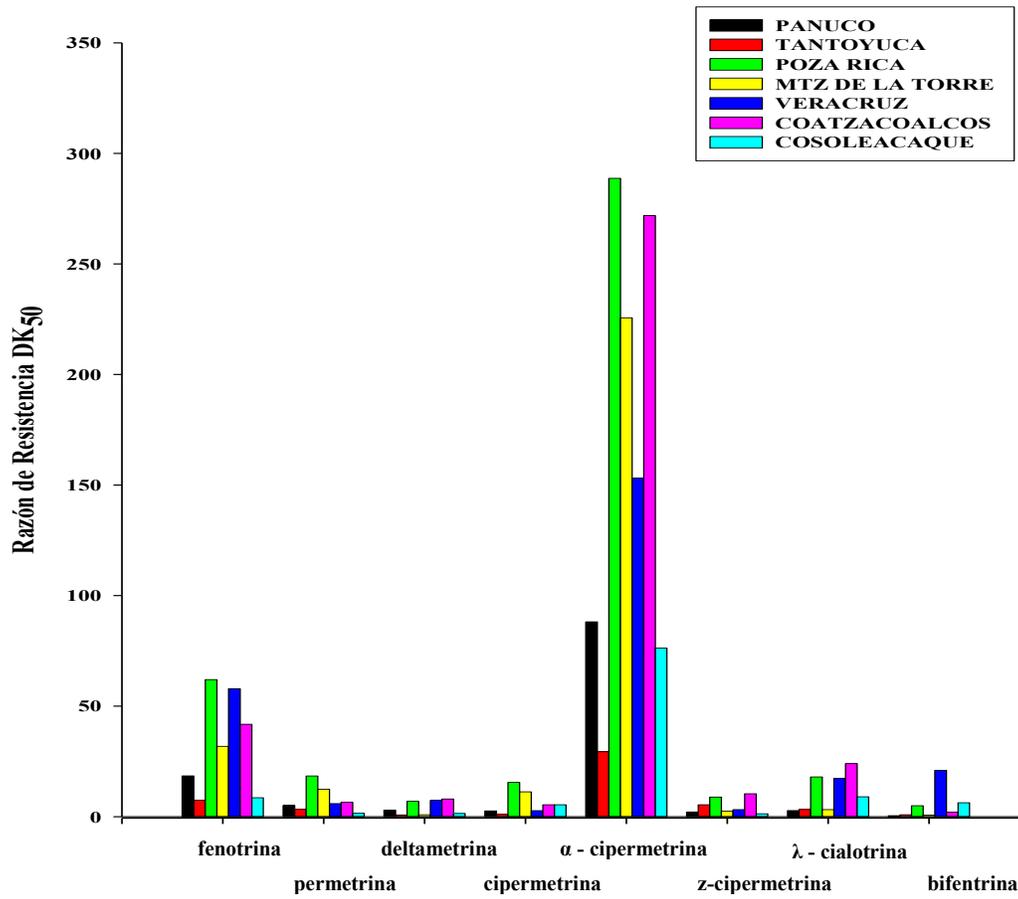


Figura 15. Resistencia Knock down en sub-poblaciones del estado de Vreracruz

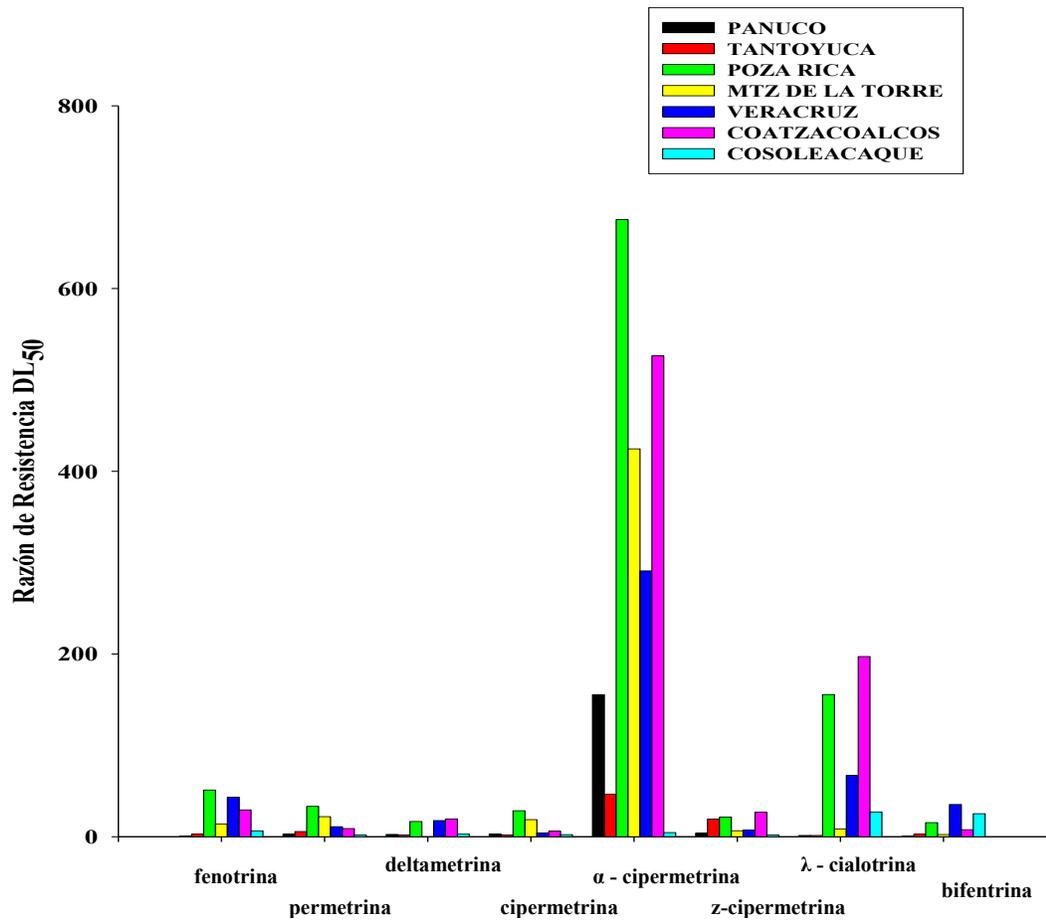


Figura 16. Resistencia dosis letal media DL₅₀ en sub-poblaciones del estado de Vreracruz

6.7. Mecanismos enzimáticos y umbral de tolerancia de la cepa de referencia

Se estudiaron cinco diferentes pruebas enzimáticas involucradas en la resistencia a insecticidas: α -esterasa, β -esterasa, oxidasas de función múltiple (MFO), glutatión s-transferasa (GST) y acetilcolinesterasa insensible (iAChE); ante las cuales fueron expuestos mosquitos hembra seleccionados y no seleccionados por ocho insecticidas piretroides.

Las sub-poblaciones estudiadas fueron: Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque, así como la cepa de referencia New Orleans.

Los resultados de los niveles promedios máximos obtenidos a partir de la cepa de referencia se muestran en la tabla 12 y 13. Dichos resultados presentan los mosquitos que no fueron seleccionados con ningún piretroide y aquellos que sobrevivieron a la selección de los ocho piretroides.

Tabla 12. Valores máximos de absorbancia (umbral de tolerancia) obtenidos a partir de la cepa de referencia New Orleans la cual **no tuvo exposición** a insecticidas piretroides.

	PRUEBAS ENZIMATICAS				
	α -esterasa	β -esterasa	Oxidasas	GST	iAChE
NEW ORLEANS	0.482	0.437	0.326	0.099	0.030

Tabla 13. Valores máximos de absorbancia (umbral de tolerancia) obtenidos a partir de la cepa de referencia New Orleans que sobrevivieron a la **exposición** de insecticidas **piretroides**.

PRUEBAS ENZIMATICAS	PIRETROIDES							
	FENOTRINA	PERMETRINA	DELTAMETRINA	CIPERMETRINA	Z-CIPERMETRINA	ALFA-CIPERMETRINA	LAMBDAALOTRINA	BIFENTRINA
α -esterasa	0.982	0.945	0.794	0.575	0.940	0.690	0.748	0.911
β -esterasa	1.205	1.196	0.966	0.733	1.117	1.065	0.702	1.582
Oxidasas	0.566	0.402	0.544	0.249	0.515	0.596	0.883	0.621
GST	0.050	0.094	0.063	0.051	0.049	0.199	0.038	0.091
iAChE	0.019	0.030	0.023	0.022	0.013	0.026	0.026	0.124

6.8. Mecanismos enzimáticos y umbral de tolerancia en sub-poblaciones de *Aedes aegypti* (L.) de Veracruz, México

A partir de los valores máximos de absorbancia obtenidos por la cepa de referencia New Orleans se determinaron los porcentajes de individuos que sobrepasaron ese umbral de tolerancia. Dichos valores se utilizaron para clasificar la actividad enzimática como inalterada cuando los porcentajes fueron menores al 15%, incipientemente alterada si los porcentajes están entre el 15% y 50% y alterada si sobrepasan el 50% (Montella *et al.* 2007)

De la tabla 14 a la 22 se muestran los porcentajes de individuos que sobrepasaron el umbral de tolerancia expresado por la cepa de referencia. De acuerdo con la clasificación antes mencionada se presenta en color rojo claro las enzimas no alteradas ($\leq 15\%$), en rojo medio las incipientemente alteradas ($15\% \geq 50\%$) y en rojo fuerte las enzimas alteradas ($> 50\%$) para cada sub-población que fue expuesta a los ocho piretroides así como sin ninguna exposición a estos.

Tabla 14. Porcentaje de individuos *Aedes aegypti* (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con **fenotrina** que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans.

PRUEBAS ENZIMATICAS	FENOTRINA						
	PÁNUCO	TANTOYUCA	POZA RICA	MTZ DE LA TORRE	VERACRUZ	COATZACOALCOS	COSOLEACAQUE
α -esterasa	57	0	0	0	0	17	0
β -esterasa	20	0	0	0	3	53	0
Oxidasas	10	36	46	87	0	3	14
GST	17	30	55	80	20	0	19
iAChE	13	18	6	22	0	0	18

Tabla 15. Porcentaje de individuos *Aedes aegypti* (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con **permetrina** que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans.

PRUEBAS ENZIMATICAS	PERMETRINA						
	PÁNUCO	TANTOYUCA	POZA RICA	MTZ DE LA TORRE	VERACRUZ	COATZACOALCOS	COSOLEACAQUE
α -esterasa	0	0	0	0	0	0	0
β -esterasa	0	0	0	0	0	0	0
Oxidasas	0	0	0	17	14	0	0
GST	0	0	0	0	19	0	0
iAChE	0	2	0	3	2	0	4

Tabla 16. Porcentaje de individuos *Aedes aegypti* (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con **deltametrina** que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans.

PRUEBAS ENZIMATICAS	DELTAMETRINA						
	PÁNUCO	TANTOYUCA	POZA RICA	MTZ DE LA TORRE	VERACRUZ	COATZACOALCOS	COSOLEACAQUE
α -esterasa	0	0	17	0	10	0	10
β -esterasa	0	2	3	0	15	0	93
Oxidasas	0	0	3	0	0	0	87
GST	0	43	66	17	55	5	0
iAChE	3	7	7	0	0	0	20

Tabla 17. Porcentaje de individuos *Aedes aegypti* (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con **cipermetrina** que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans.

PRUEBAS ENZIMATICAS	CIPERMETRINA						
	PÁNUCO	TANTOYUCA	POZA RICA	MTZ DE LA TORRE	VERACRUZ	COATZACOALCOS	COSOLEACAQUE
α -esterasa	95	100	55	35	98	100	53
β -esterasa	99	51	55	45	51	96	50
Oxidasas	78	48	78	62	45	45	50
GST	57	19	35	17	4	20	47
iAChE	10	1	6	4	4	2	0

Tabla 18. Porcentaje de individuos *Aedes aegypti* (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con **alfa-cipermetrina** que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans.

PRUEBAS ENZIMATICAS	ALFA-CIPERMETRINA						
	PÁNUCO	TANTOYUCA	POZA RICA	MTZ DE LA TORRE	VERACRUZ	COATZACOALCOS	COSOLEACAQUE
α -esterasa	0	7	34	5	70	72	0
β -esterasa	0	0	3	0	20	16	0
Oxidasas	0	0	2	0	0	11	0
GST	0	3	0	0	0	0	0
iAChE	0	3	2	0	0	2	7

Tabla 19. Porcentaje de individuos *Aedes aegypti* (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con **z-cipermetrina** que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans.

PRUEBAS ENZIMATICAS	Z-CIPERMETRINA						
	PÁNUCO	TANTOYUCA	POZA RICA	MTZ DE LA TORRE	VERACRUZ	COATZACOALCOS	COSOLEACAQUE
α -esterasa	25	14	63	63	35	0	0
β -esterasa	57	51	100	88	100	42	0
Oxidasas	18	20	17	8	19	27	0
GST	32	43	19	25	33	65	26
iAChE	0	12	23	13	2	2	13

Tabla 20. Porcentaje de individuos *Aedes aegypti* (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con **lambdacialotrina** que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans.

PRUEBAS ENZIMATICAS	LAMBDACIALOTRINA						
	PÁNUCO	TANTOYUCA	POZA RICA	MTZ DE LA TORRE	VERACRUZ	COATZACOALCOS	COSOLEACAQUE
α -esterasa	75	0	11	33	56	0	15
β -esterasa	90	52	70	100	83	45	63
Oxidasas	0	0	0	37	27	0	2
GST	40	0	66	93	56	32	46
iAChE	5	0	10	0	7	22	6

Tabla 21. Porcentaje de individuos *Aedes aegypti* (L.) de sub-poblaciones del estado de Veracruz seleccionados con **bifentrina** que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans

PRUEBAS ENZIMATICAS	BIFENTRINA						
	PÁNUCO	TANTOYUCA	POZA RICA	MTZ DE LA TORRE	VERACRUZ	COATZACOALCOS	COSOLEACAQUE
α -esterasa	0	20	0	0	33	56	33
β -esterasa	0	0	0	0	2	0	0
Oxidasas	17	0	25	0	0	0	11
GST	100	40	33	0	70	0	11
iAChE	10	0	0	0	12	0	0

Tabla 22. Porcentaje de individuos *Ae.aegypti* (L.) que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans **sin tener selección previa con piretroides**

MOSQUITOS SIN SELECCION							
PRUEBAS ENZIMÁTICAS	PÁNUCO	TANTOYUCA	POZA RICA	MTZ DE LA TORRE	VERACRUZ	COATZACOALCOS	COSOLEACAQUE
α -esterasa	100	100	100	100	100	100	100
β -esterasa	100	100	100	100	100	100	100
Oxidasas	33	0	0	25	5	12	2
GST	43	65	65	15	47	27	0
iAChE	3	3	3	2	2	7	0

6.9. Análisis y comparaciones de medias de absorbancia obtenidas entre las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) del estado Veracruz que fueron expuestas a piretroides

Los resultados de absorbancia obtenidos fueron posteriormente evaluados mediante un análisis de varianza y comparación múltiple de medias Tukey con un nivel de significancia $p \leq 0.05$. Las comparaciones se realizaron entre los individuos de cada sub-población contra los pertenecientes a la cepa de referencia New Orleans. Las tablas 23 a 27 muestran las medias de absorbancias obtenidas en cada prueba bioquímica en las sub-poblaciones de hembras *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz que sobrevivieron al ser expuestas a piretroides así como la comparación múltiple de medias realizada entre cada una de las sub-poblaciones estudiadas respecto a la cepa susceptible.

Tabla 23. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas en mosquitos *Ae. aegypti* (L.) que sobrevivieron a la exposición de ocho piretroides y comparación de medias en base a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$) correspondientes al ensayo de α -esterasa

SUB-POBLACIÓN	α - ESTERASA															
	FENOTRINA		PERMETRINA		DELTAMETRINA		CIPERMETRINA		Z-CIPERMETRINA		ALFA-CIPERMETRINA		LAMBDAALOTRINA		BIFENTRINA	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
NEW ORLEANS	0.845 ^A	0.101	0.811 ^A	0.060	0.653 ^A	0.055	0.500 ^A	0.033	0.824 ^A	0.061	0.593 ^A	0.052	0.665 ^A	0.045	0.755 ^A	0.067
PÁNUCO	1.011 ^B	0.113	0.542 ^B	0.061	0.570 ^B	0.044	0.726 ^B	0.110	0.882 ^A	0.076	0.537 ^A	0.034	0.783 ^B	0.070	0.739 ^A	0.073
TANTOYUCA	0.676 ^C	0.049	0.589 ^C	0.041	0.602 ^C	0.067	0.978 ^C	0.084	0.861 ^A	0.072	0.574 ^A	0.075	0.636 ^A	0.034	0.868 ^B	0.062
POZA RICA	0.710 ^D	0.073	0.818 ^A	0.060	0.707 ^D	0.107	0.794 ^D	0.277	0.997 ^B	0.101	0.653 ^B	0.107	0.626 ^A	0.099	0.663 ^C	0.064
MTZ DE LA TORRE	0.706 ^E	0.058	0.600 ^D	0.062	0.614 ^A	0.047	0.586 ^A	0.126	1.063 ^C	0.273	0.580 ^A	0.054	0.708 ^A	0.080	0.579 ^D	0.081
VERACRUZ	0.789 ^A	0.081	0.600 ^E	0.062	0.734 ^E	0.052	0.864 ^E	0.189	0.929 ^D	0.077	0.749 ^C	0.091	0.768 ^C	0.113	0.889 ^E	0.094
COATZACOALCOS	0.913 ^F	0.085	0.563 ^F	0.052	0.628 ^A	0.057	0.814 ^F	0.071	0.773 ^A	0.054	0.733 ^D	0.069	0.513 ^D	0.051	0.954 ^F	0.211
COSOLEACAQUE	0.560 ^G	0.058	0.579 ^G	0.039	0.716 ^F	0.061	0.387 ^A	0.331	0.554 ^E	0.033	0.518 ^E	0.041	0.638 ^A	0.102	0.914 ^G	0.265

Letras diferentes significa diferencia significativa

Tabla 24. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas en mosquitos *Ae. aegypti* (L.) que sobrevivieron a la exposición de ocho piretroides y comparación de medias en base a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$) correspondientes al ensayo de β - esterasa

SUB-POBLACIÓN	β - ESTERASA															
	FENOTRINA		PERMETRINA		DELTAMETRINA		CIPERMETRIN A		Z- CIPERMETRINA		ALFA- CIPERMETRINA		LAMBDAALOTRINA		BIFENTRINA	
	\bar{x}	DS														
NEW ORLEANS	1.034 ^A	0.105	1.058 ^A	0.085	0.794 ^A	0.077	0.634 ^A	0.043	0.992 ^A	0.073	0.778 ^A	0.119	0.605 ^A	0.043	1.096 ^A	0.151
PÁNUCO	1.120 ^B	0.084	0.677 ^B	0.065	0.689 ^B	0.056	0.986 ^B	0.109	1.207 ^B	0.215	0.694 ^B	0.088	0.935 ^B	0.128	1.083 ^A	0.099
TANTOYUCA	0.745 ^C	.071	0.788 ^C	0.091	0.713 ^C	0.108	0.782 ^C	0.206	1.137 ^C	0.078	0.677 ^C	0.069	0.735 ^C	0.077	1.296 ^B	0.083
POZA RICA	0.826 ^D	0.095	0.952 ^D	0.082	0.802 ^A	0.088	0.768 ^D	0.116	1.348 ^D	0.117	0.784 ^A	0.140	0.782 ^D	0.116	0.731 ^C	0.120
MTZ DE LA TORRE	0.848 ^E	0.101	0.698 ^E	0.083	0.750 ^A	0.090	0.839 ^E	0.250	1.269 ^E	0.219	0.870 ^D	0.080	0.988 ^E	0.153	0.726 ^D	0.096
VERACRUZ	1.008 ^A	0.103	0.698 ^F	0.083	0.883 ^D	0.048	0.745 ^A	0.091	1.568 ^F	0.316	0.971 ^E	0.084	0.892 ^F	0.186	1.193 ^E	0.167
COATZACOALCOS	1.211 ^F	0.101	0.725 ^G	0.069	0.702 ^E	0.076	0.884 ^F	0.114	1.070 ^A	0.150	0.962 ^F	0.119	0.690 ^A	0.124	1.000 ^F	0.062
COSOLEACAQUE	0.724 ^G	0.084	0.750 ^H	0.058	1.103 ^F	0.093	0.557 ^A	0.479	0.775 ^G	0.080	0.669 ^G	0.061	0.750 ^G	0.092	0.890 ^G	0.114

Letras diferentes significa diferencia significativa

Tabla 25. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas en mosquitos *Ae. aegypti* (L.) que sobrevivieron a la exposición de ocho piretroides y comparación de medias en base a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$) correspondientes al ensayo de **oxidasa**

SUB-POBLACIÓN	OXIDASA															
	FENOTRINA		PERMETRINA		DELTAMETRINA		CIPERMETRINA		Z-CIPERMETRINA		ALFA-CIPERMETRINA		LAMBDAALOTRINA		BIFENTRINA	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS												
NEW ORLEANS	0.296 ^A	0.103	0.213 ^A	0.066	0.293 ^A	0.088	0.165 ^A	0.046	0.248 ^A	0.115	0.328 ^A	0.124	0.376 ^A	0.143	0.38 ^A	0.111
PÁNUCO	0.452 ^B	0.113	0.184 ^A	0.038	0.187 ^B	0.047	0.332 ^B	0.097	0.365 ^A	0.152	0.167 ^A	0.042	0.531 ^A	0.169	0.44 ^A	0.187
TANTOYUCA	0.539 ^C	0.201	0.246 ^A	0.038	0.301 ^A	0.084	0.260 ^C	0.100	0.334 ^A	0.204	0.227 ^A	0.127	0.239 ^A	0.040	0.34 ^A	0.104
POZA RICA	0.584 ^D	0.237	0.321 ^B	0.097	0.374 ^C	0.099	0.317 ^D	0.083	0.338 ^A	0.209	0.261 ^A	0.131	0.399 ^A	0.154	0.42 ^A	0.227
MTZ DE LA TORRE	0.655 ^E	0.175	0.293 ^C	0.088	0.287 ^A	0.098	0.337 ^E	0.144	0.243 ^A	0.179	0.221 ^A	0.073	0.848 ^B	0.114	0.21 ^B	0.061
VERACRUZ	0.356 ^A	0.081	0.293 ^D	0.088	0.361 ^D	0.065	0.237 ^A	0.055	0.353 ^A	0.199	0.283 ^A	0.118	0.704 ^C	0.292	0.33 ^A	0.062
COATZACOALCOS	0.467 ^F	0.082	0.139 ^E	0.026	0.218 ^E	0.055	0.241 ^A	0.076	0.402 ^B	0.169	0.298 ^A	0.198	0.437 ^A	0.129	0.24 ^C	0.060
COSOLEACAQUE	0.379 ^A	0.142	0.145 ^F	0.025	0.605 ^F	0.059	0.322 ^F	0.289	0.334 ^A	0.062	0.264 ^A	0.062	0.500 ^A	0.145	0.43 ^B	0.158

Letras diferentes significa diferencia significativa

Tabla 26. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas en mosquitos *Ae. aegypti* (L.) que sobrevivieron a la exposición de ocho piretroides y comparación de medias en base a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$) correspondientes al ensayo de **glutación s-transferasa (GST)**

SUB-POBLACIÓN	GST															
	FENOTRINA		PERMETRINA		DELTAMETRIN A		CIPERMETRINA		Z- CIPERMETRINA		ALFA- CIPERMETRINA		LAMBDAIALOTRINA		BIFENTRINA	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
NEW ORLEANS	0.024 ^A	0.022	0.057 ^A	0.019	0.028 ^A	0.012	0.018 ^A	0.012	0.028 ^A	0.008	0.043 ^A	0.054	-0.027 ^A	0.041	0.030 ^A	0.055
PÁNUCO	0.017 ^A	0.040	0.035 ^A	0.012	0.018 ^A	0.012	0.058 ^B	0.053	0.042 ^A	0.021	0.021 ^B	0.018	0.036 ^B	0.012	0.404 ^B	0.062
TANTOYUCA	0.020 ^A	0.043	0.053 ^A	0.021	0.060 ^B	0.023	0.034 ^A	0.026	0.047 ^A	0.024	-0.003 ^C	0.008	-0.194 ^C	0.030	0.077 ^C	0.042
POZA RICA	0.042 ^A	0.039	-0.003 ^B	0.062	0.081 ^C	0.034	0.042 ^C	0.041	0.020 ^A	0.065	0.001 ^D	0.008	0.034 ^D	0.070	0.059 ^D	0.053
MTZ DE LA TORRE	0.068 ^B	0.026	0.071 ^A	0.038	0.046 ^D	0.016	0.023 ^A	0.031	0.022 ^A	0.061	0.001 ^E	0.004	0.088 ^E	0.037	0.024 ^A	0.008
VERACRUZ	0.033 ^A	0.018	0.071 ^A	0.038	0.066 ^E	0.022	0.026 ^A	0.011	0.043 ^A	0.022	0.006 ^F	0.006	0.048 ^F	0.034	0.110 ^E	0.042
COATZACOALCOS	-0.013 ^C	0.017	0.027 ^C	0.009	0.025 ^A	0.016	0.034 ^A	0.018	0.047 ^A	0.020	0.006 ^G	0.005	0.010 ^G	0.052	0.031 ^A	0.010
COSOLEACAQUE	0.033 ^A	0.027	0.034 ^A	0.014	0.040 ^A	0.009	0.060 ^D	0.065	0.040 ^A	0.021	0.007 ^H	0.012	0.001 ^A	0.069	0.038 ^A	0.044

Letras diferentes significa diferencia significativa

Tabla 27. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas en mosquitos *Ae. aegypti* (L.) que sobrevivieron a la exposición de ocho piretroides y comparación de medias en base a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$) correspondientes al ensayo de **acetilcolinesterasa insensible (iAChE)**

SUB-POBLACIÓN	iAChE															
	FENOTRINA		PERMETRINA		DELTAMETRIN A		CIPERMETRINA		Z-CIPERMETRINA		ALFA- CIPERMETRINA		LAMBDAALOTRINA		BIFENTRINA	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
NEW ORLEANS	0.004 A	0.007	0.014 A	0.009	0.002 ^A	0.010	0.000 A	0.007	0.003 ^A	0.003	0.002 ^A	0.006	0.007 ^A	0.006	0.023 A	0.063
PÁNUCO	0.013 B	0.005	-0.080 B	0.077	0.002 ^A	0.008	0.003 A	0.018	-0.006 ^B	0.006	0.002 ^A	0.004	0.013 ^A	0.014	0.086 B	0.026
TANTOYUCA	0.012 C	0.011	-0.034 C	0.067	0.011 ^B	0.007	0.007 B	0.006	0.006 ^A	0.006	0.024 ^A	0.082	0.005 ^A	0.006	0.010 A	0.012
POZA RICA	0.005 A	0.012	-0.014 A	0.044	0.012 ^C	0.009	0.006 C	0.010	0.009 ^A	0.010	0.036 ^B	0.025	0.013 ^A	0.027	-0.048 C	0.090
MTZ DE LA TORRE	0.011 D	0.018	-0.029 D	0.052	0.005 ^A	0.005	-0.002 A	0.010	0.003 ^A	0.018	0.032 ^A	0.029	0.010 ^A	0.004	0.008 A	0.005
VERACRUZ	0.008 A	0.006	-0.029 E	0.052	0.000 ^A	0.007	0.007 A	0.011	0.002 ^A	0.004	0.032 ^C	0.020	0.011 ^A	0.008	0.060 A	0.061
COATZACOALCOS	0.007 A	0.006	0.008 A	0.005	0.002 ^A	0.008	0.005 A	0.007	0.003 ^A	0.005	-0.024 ^D	0.069	0.020 ^A	0.027	0.008 A	0.009
COSOLEACAQUE	0.011 E	0.008	0.014 A	0.007	0.017 ^D	0.007	0.005 A	0.006	0.005 ^A	0.009	0.044 ^E	0.025	0.009 ^A	0.007	-0.086 A	0.096

Letras diferentes significa diferencia significativa

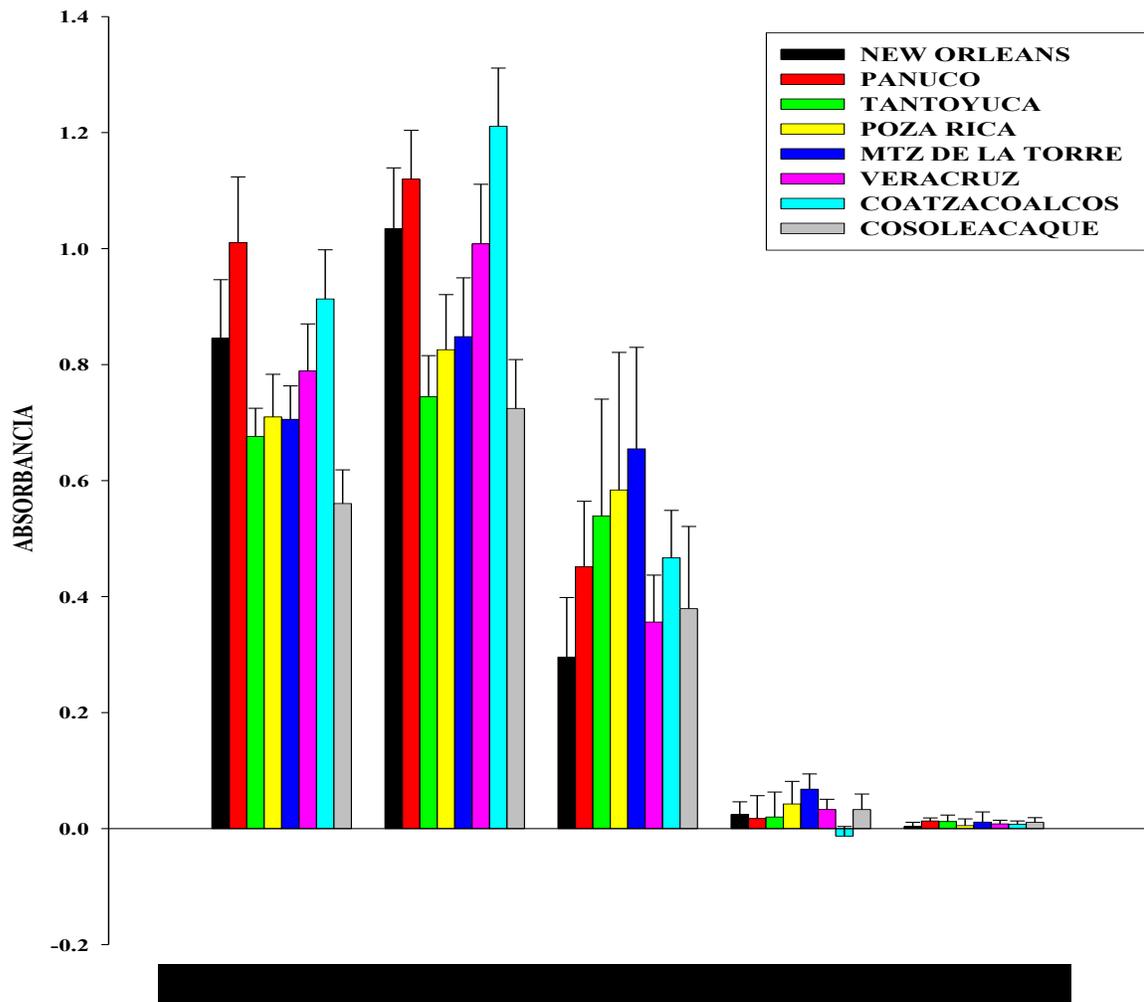


Figura 17. Valores medios de absorbancia de hembras *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de **fenotrina** obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.

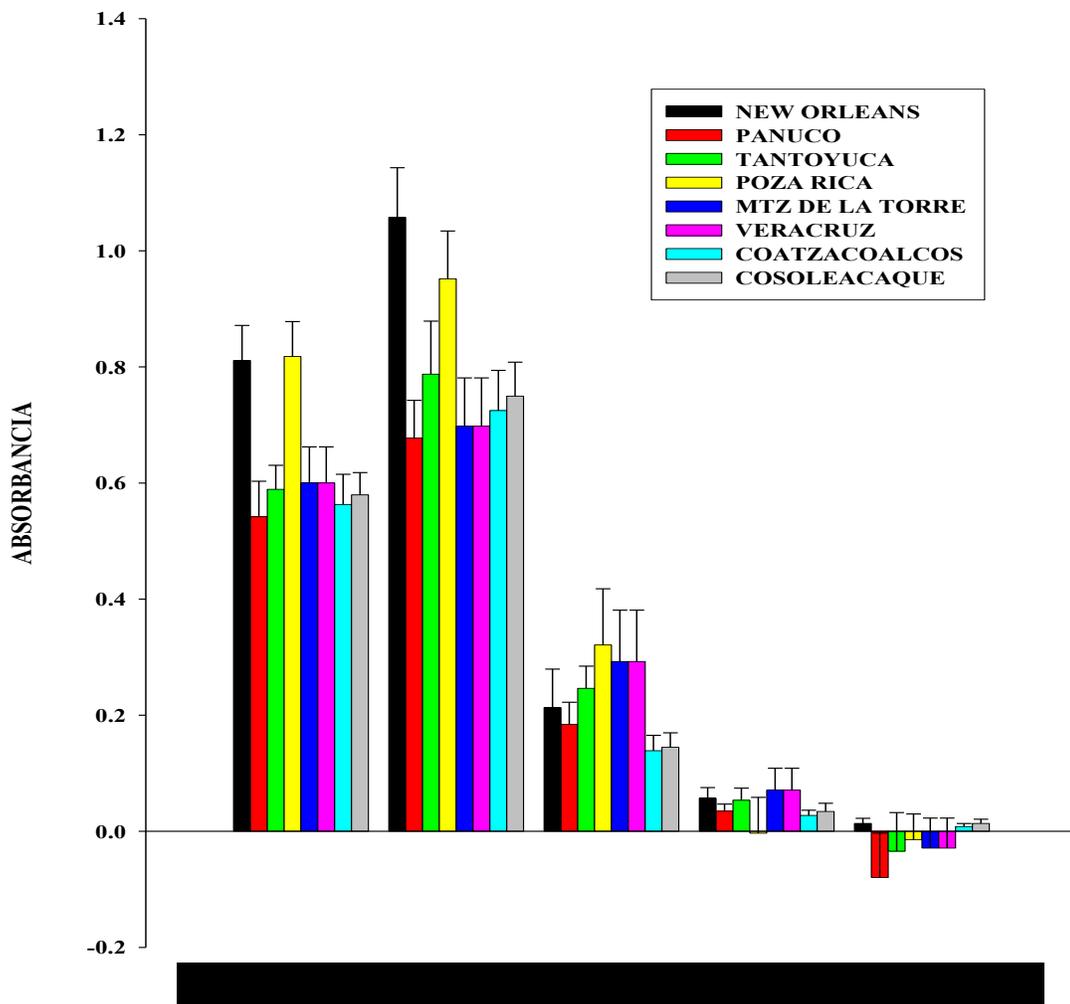


Figura 18. Valores medios de absorbancia de hembras *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de **permethrina** obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.

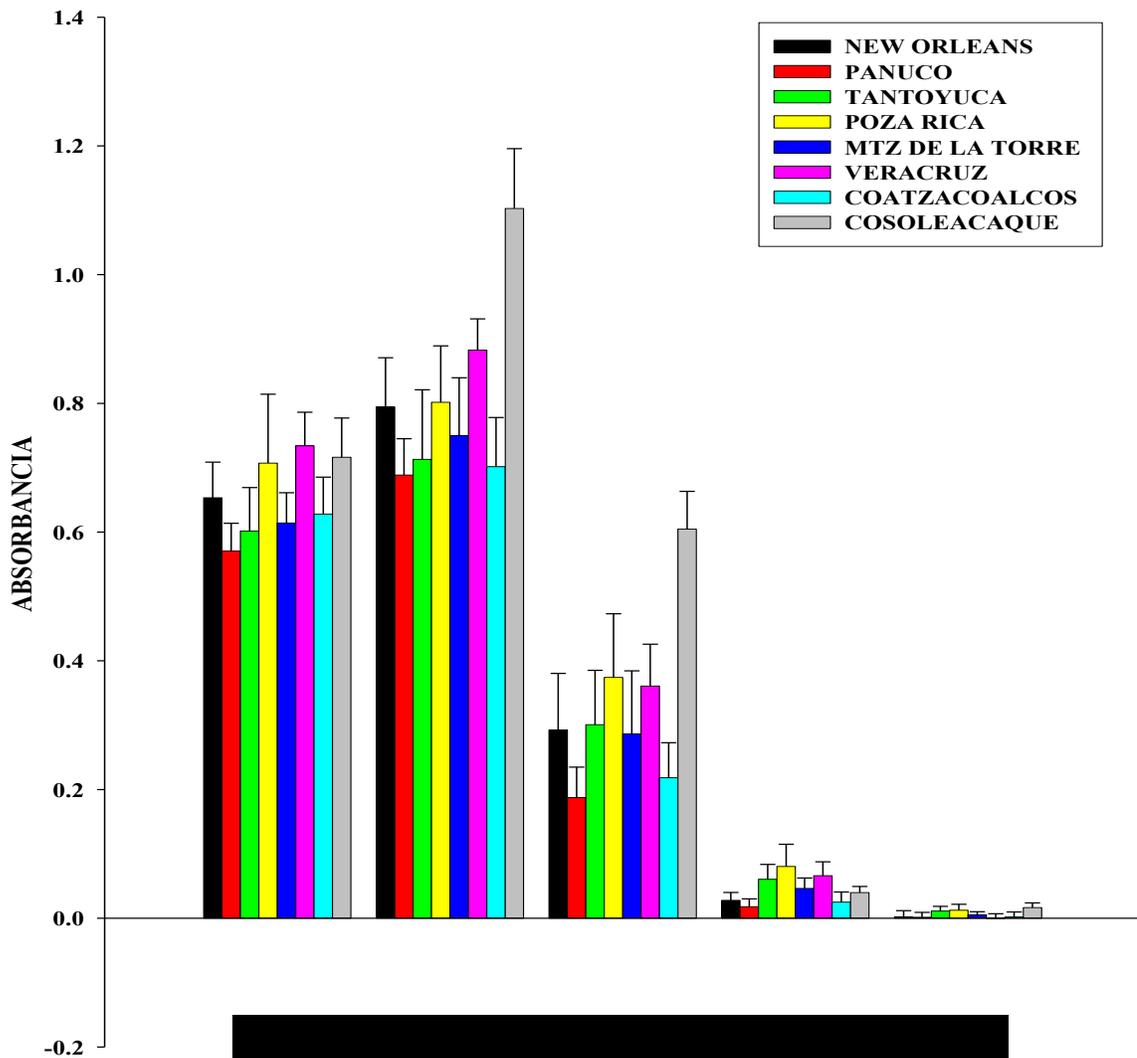


Figura 19. Valores medios de absorbancia de hembras *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de **deltametrina** obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.

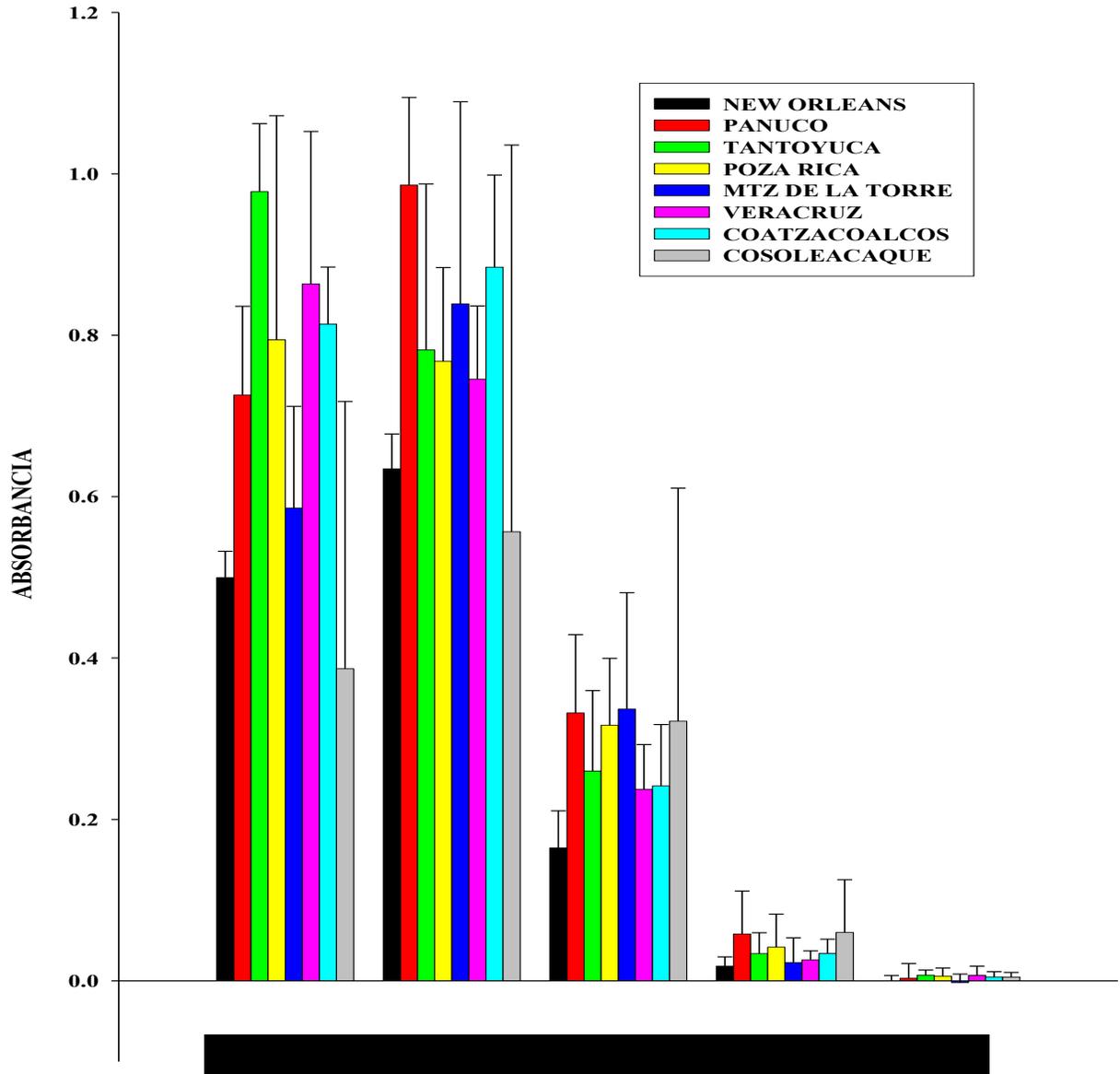


Figura 20. Valores medios de absorbancia de hembras *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de **cipermetrina** obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.

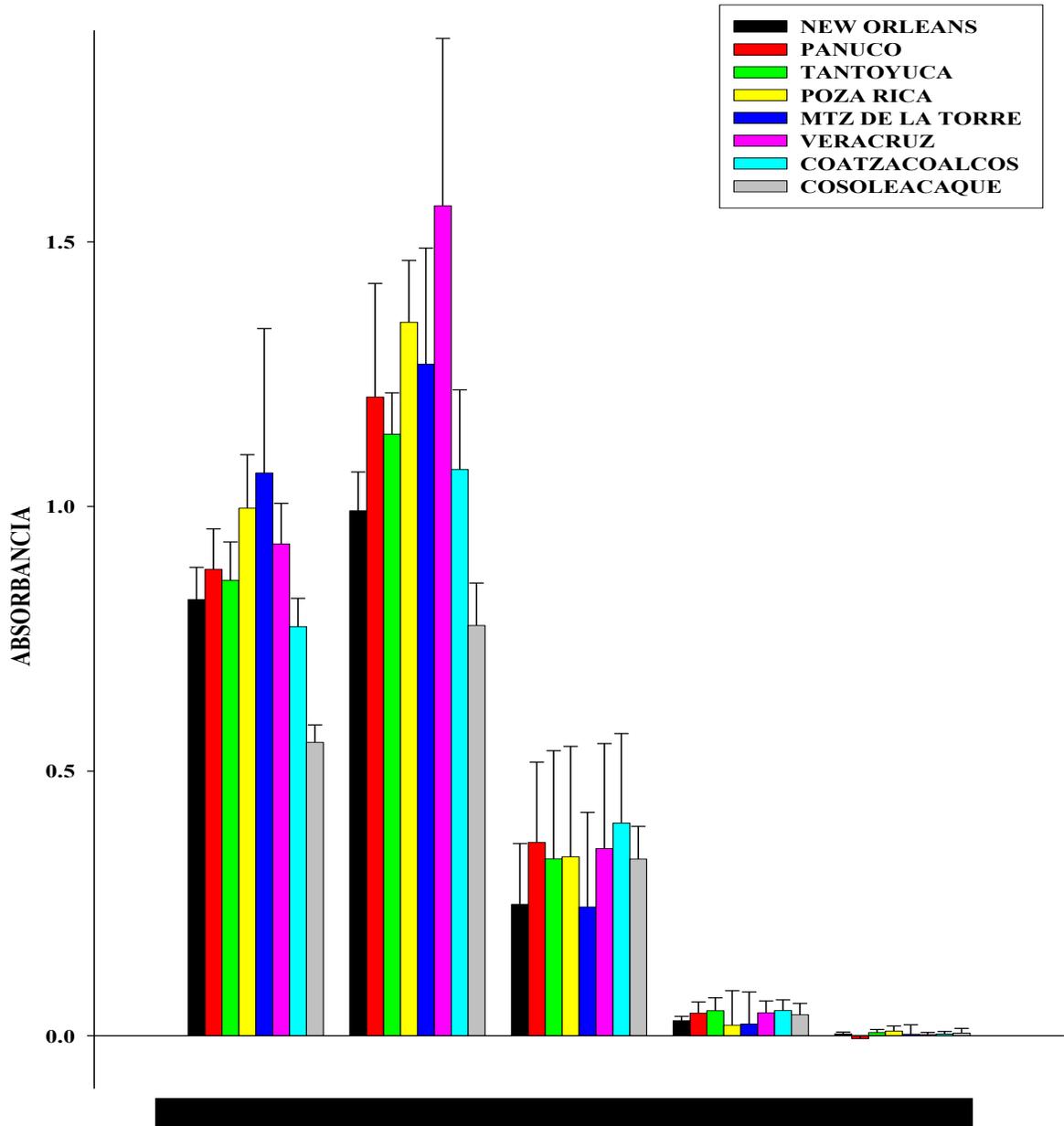


Figura 21. Valores medios de absorbancia de hembras *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de **z-cipermetrina** obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.

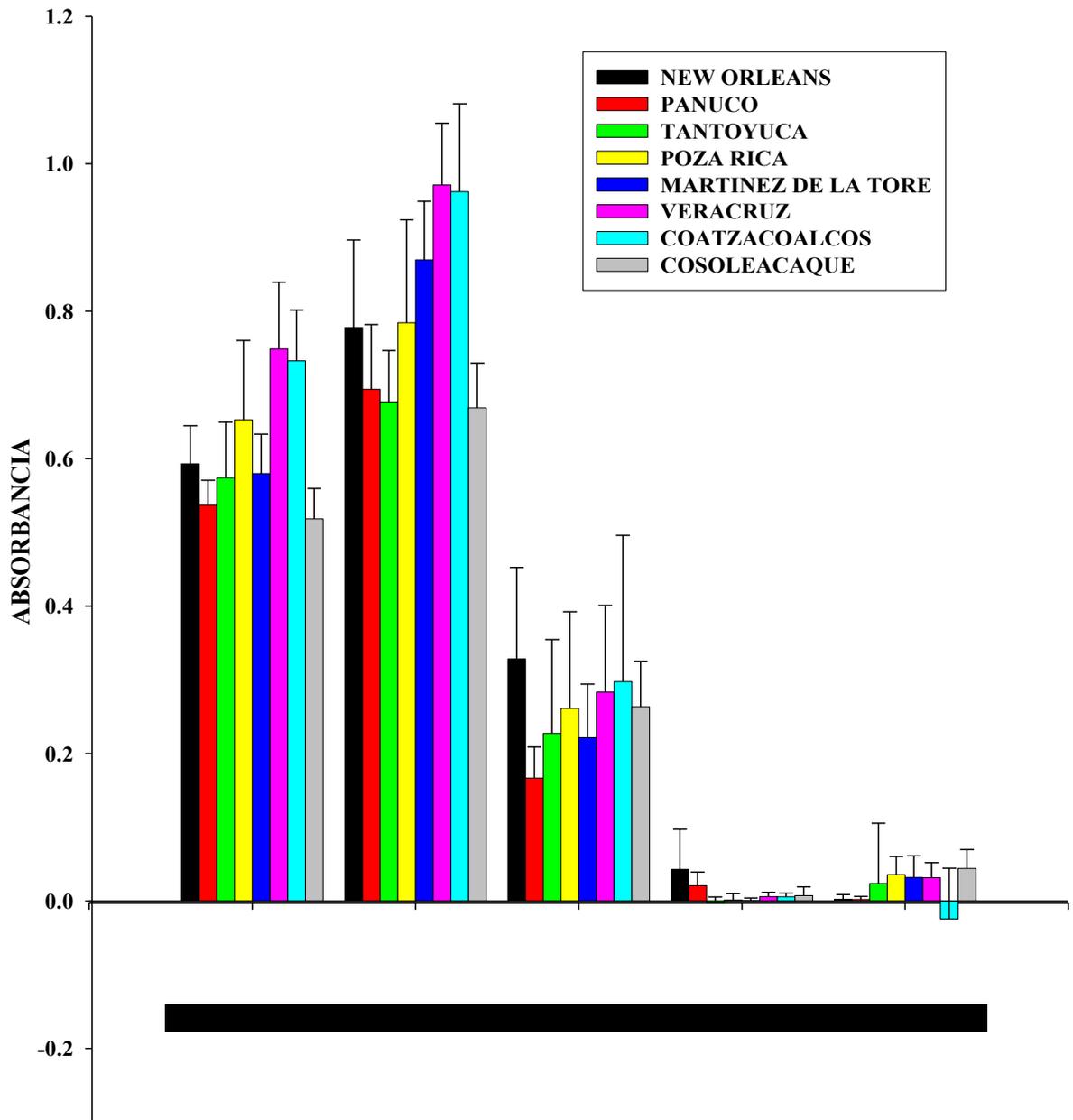


Figura22. Valores medios de absorbancia de hembras *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de **alfa-cipermetrina** obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.

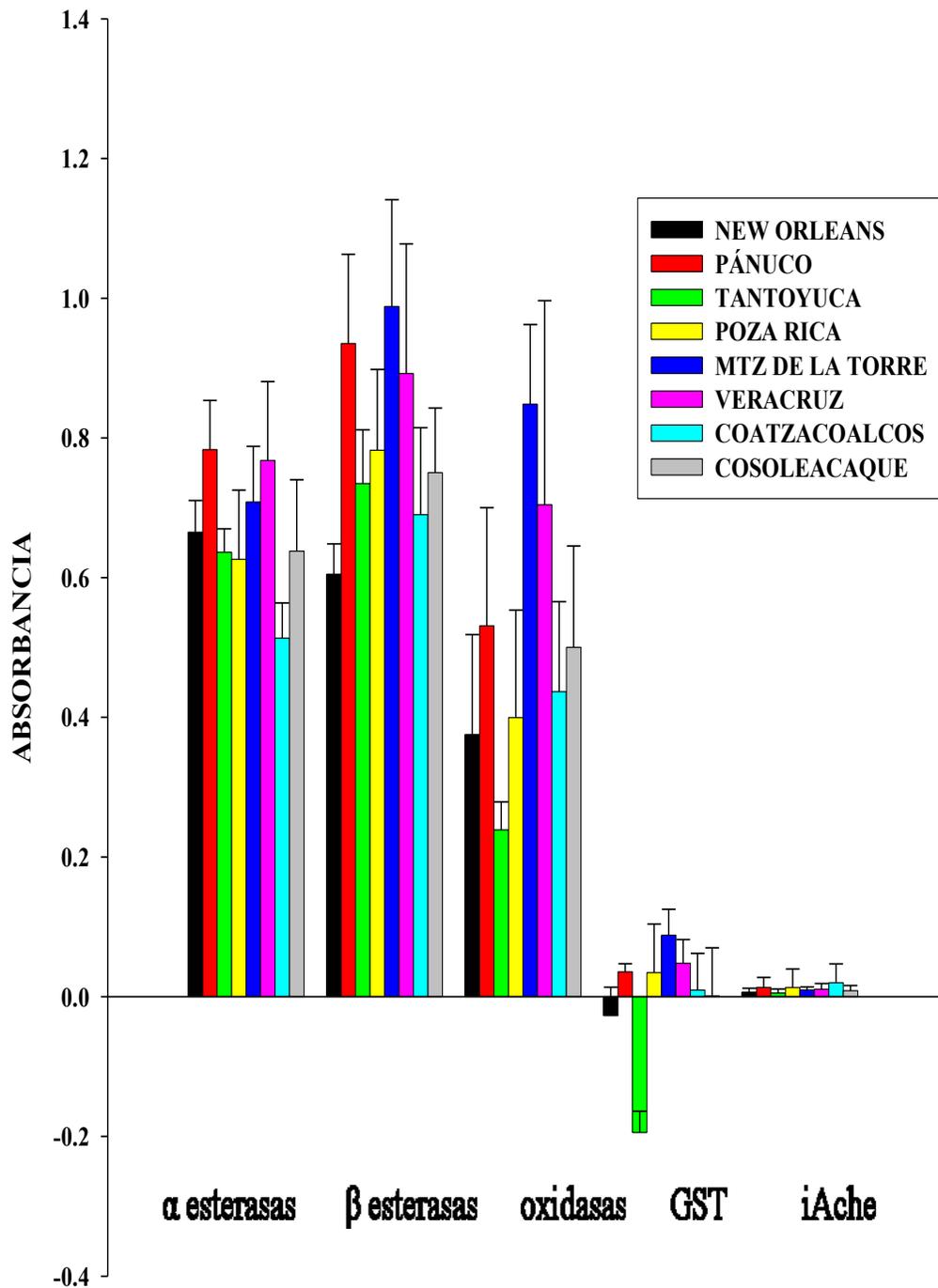


Figura 23. Valores medios de absorbancia de hembras *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de **lambdacialotrina** obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.

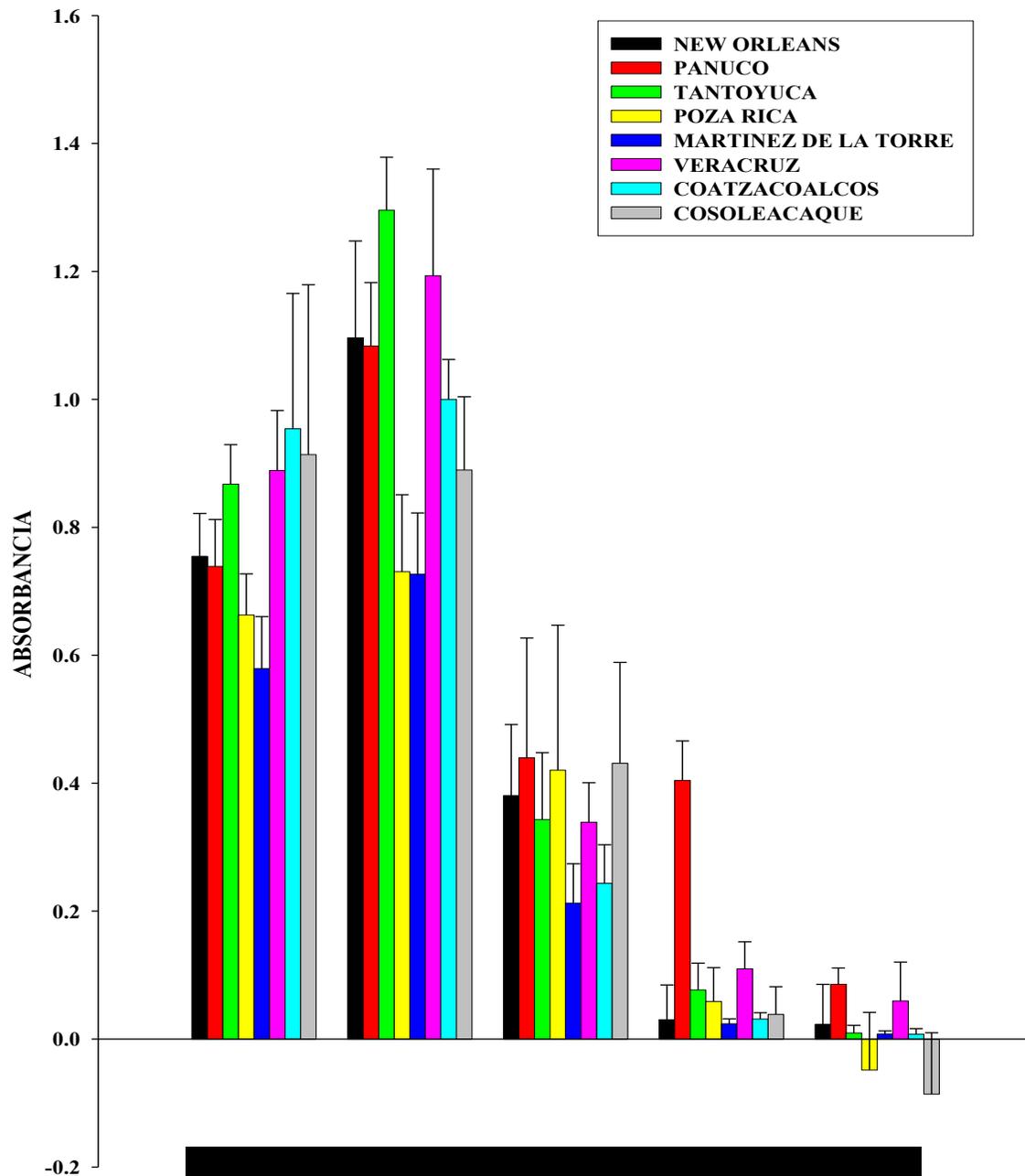


Figura 24. Valores medios de absorbancia de hembras *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que sobrevivieron a la exposición de **bifentrina** obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.

6.9.1. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz expuestos a fenotrina.

De acuerdo a los resultados presentados en las tablas 23 a 27 en las prueba enzimáticas α y β esterasas se observa que seis de las siete sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) (Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Coatzacoalcos y Cosoleacaque) fueron significativamente diferentes a la cepa de referencia, en donde solo Pánuco y Coatzacoalcos sobrepasaron los valores medios de absorbancia de New Orleans. En mecanismos enzimáticos de oxidasas se observa que sub-poblaciones de Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Coatzacoalcos y Cosoleacaque fueron diferentes significativamente a New Orleans sobrepasando los valores medios de absorbancia. En la sub-población de Veracruz no hubo diferencia significativa pero sin embargo sobrepaso el valor medio de absorbancia de la cepa de referencia. Para las sub-poblaciones de Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz y Cosoleacaque sobrepasaron los valores medios de absorbancia de New Orleans sin embargo solo la sub-población de Martínez de la Torre presentó diferencia significativa y sobrepaso los valores medios de absorbancia de la cepa de referencia, para la prueba enzimática glutatión s-transferasas (GST). La sub-población de Coatzacoalcos presentó diferencia significativa a esta prueba (GST) pero sus valores medios de absorbancia no sobrepasaron los valores medios de absorbancia de New Orleans.

Para el mecanismo enzimático de acetilcolinesterasa insensible las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) (Pánuco, Tantoyuca, Martínez de la Torre y Cosoleacaque) mostraron diferencia significativa a la cepa New Orleans sobrepasando los valores medios de absorbancia. Las sub-poblaciones de Poza Rica, Veracruz y Cotzacoalcos no mostraron diferencias significativas a la línea susceptible pero si sobrepasaron los valores medios de absorbancia.

6.9.2. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz expuestos a permetrina.

En la prueba enzimática de α esterasas se observa que seis de las siete sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz (Pánuco, Tantoyuca, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque) muestran diferencia significativa a New Orleans en donde solo la sub-población de Poza Rica sobrepasa los valores medios de absorbancia sin haber presentado diferencia significativa. En mecanismos de β esterasas todas las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) mostraron diferencia significativa a la cepa New Orleans pero ninguna de ellas sobrepasó los valores medios de absorbancia.

Las sub-poblaciones de Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque fueron significativamente diferentes a la cepa de referencia siendo las primeras tres sub-poblaciones y Tantoyuca las que sobrepasaron los valores medios de absorbancia de New Orleans para el mecanismo enzimático de oxidasas.

Para la prueba enzimática glutatión s-transferasas las sub-poblaciones de Martínez de la Torre y Veracruz sobrepasaron los valores medios de absorbancia de New Orleans pero no mostraron diferencia significativa no obstante las sub-poblaciones de Poza Rica y Coatzacoalcos fueron significativamente diferentes pero no sobrepasaron los valores medios de absorbancia de la cepa de referencia. En mecanismos enzimáticos de acetilcolinesterasa insensible solo la sub-población de Cosoleacaque sobrepasó los valores medios de absorbancia de New Orleans pero no mostró diferencia significativa; no obstante las sub-poblaciones de Pánuco, Tantoyuca, Martínez de la Torre y Veracruz sí fueron significativamente diferentes a New Orleans.

6.9.3. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz expuestos a deltamterina.

Las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) de Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Veracruz y Cosoleacaque fueron significativamente diferentes a la cepa New Orleans en donde solo las sub-poblaciones de Poza Rica, Veracruz y Cosoleacaque sobrepasan los valores medios de absorbancia de la cepa de referencia para el mecanismo enzimático de α -esterasas. En mecanismos de β esterases las sub-poblaciones de Pánuco, Tantoyuca, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque mostraron diferencia significativa a New Orleans siendo las sub-poblaciones de Poza Rica, Veracruz y Cosoleacaque las únicas sub-poblaciones que sobrepasaron los valores medios de absorbancia de New Orleans.

Para el mecanismo enzimático glutatión s-transferasas las sub-poblaciones de Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre y Veracruz mostraron diferencia significativa sobrepasando los valores medios de absorbancia de New Orleans. La sub-población de Cosoleacaque no mostró diferencia significativa a New Orleans pero si sobrepaso el valor medio de absorbancia. En mecanismos enzimáticos de acetilcolinesterasa insensible tres de las siete sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) (Tantoyuca, Poza Rica y Cosoleacaque) fueron significativamente diferentes a New Orleans sobrepasando los valores medios de absorbancia. Las sub-poblaciones de Pánuco, Martínez de la Torre y Coatzacoalcos solo sobrepasaron los valores medios de absorbancia de la línea susceptible.

6.9.4. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz expuestos a cipermetrina.

Cinco de las siete sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) (Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Veracruz y Coatzacoalcos) mostraron diferencia significativa a la cepa de referencia New Orleans sobrepasando los valores medios de absorbancia. La sub-población de Martínez de la Torre no mostro diferencia significativa a New Orleans pero si sobrepaso los valores medios de absorbancia para el mecanismo enzimático α -esterasas. En mecanismos enzimáticos de β -esterasas las sub-poblaciones de Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre y Coatzacoalcos fueron sigificativamente diferentes a New Orleans sobrepasando los valores medios de absorbancia. Para el mecanismo de oxidasas todas las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) sobrepasaron los valores medios de absorbancia de New Orleans mostrando diferencia significativa solo cinco de las siete sub-poblaciones (Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre y Cosoleacaque) . Para el mecanismo enzimático de acetilcolinesterasa insensible todas las sub-poblaciones sobrepasaron los valores medios de absorbancia de New Orleans siendo solo Tantoyuca y Poza Rica únicamente las sub-poblaciones que fueron significativamente diferentes a la cepa de referencia New Orleans.

6.9.5. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz expuestos a z-cipermetrina.

Para el mecanismo enzimático de α -esterasas las sub-poblaciones de Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz y Cosoleacaque fueron significativamente diferentes a la cepa de referencia en donde solo las tres primeras sub-poblaciones sobrepasaron los valores medios de absorbancia de New Orleans. Las sub-poblaciones de Pánuco y Tantoyuca no fueron significativamente diferentes pero si mostraron valores de absorbancia superiores a la cepa de referencia New Orleans. En la prueba enzimática de β -esterasas cinco de las siete sub-poblaciones fueron significativamente diferentes a la cepa de referencia sobrepasando los valores medios de absorbancia (Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre y Veracruz). La sub-población de Cosoleacaque mostro diferencia significativa a New Orleans pero sus valores medios de absorbancia no fueron superiores a esta. En la prueba enzimática de oxidasas seis de las siete sub-poblaciones (Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz y Cosoleacaque) mostraron valores medios de absorbancia superiores a New Orleans siendo únicamente la sub-población de Coatzacoalcos significativamente diferente a New Orleans y a su vez sobrepasando los valores medios de absorbancia de esta. Para el mecanismo enzimático de glutatión s-transferasas las sub-poblaciones del estado de Veracruz no mostraron diferencia significativa a New Orleans pero si únicamente cinco de las siete sub-poblaciones (Pánuco, Tantoyuca, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque) mostraron valores medios de absorbancia superiores a la cepa New Orleans. En la prueba enzimática de acetilcolinesterasa insensible las sub-poblaciones de Tantoyuca, Poza Rica, y Cosoleacaque mostraron valores medios de absorbancia superiores a New Orleans pero no diferencia significativa a esta. La sub-población de Pánuco fue significativamente diferente pero sus valores medios de absorbancia no fueron superiores a la cepa de referencia.

6.9.6. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz expuestos a alfa-cipermetrina.

En el mecanismo de α -esterasas las sub-poblaciones de Poza Rica, Veracruz, Coatzacoalcos fueron significativamente diferentes a la cepa de referencia sobrepasando los valores medios de absorbancia de New Orleans. La sub-población de Cosoleacaque mostro diferencia significativa a la cepa de referencia pero sus valores medios de absorbancia no fueron mayores. En el mecanismo enzimático de β -esterasas seis de las siete sub-poblaciones (Pánuco, Tantoyuca, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque) fueron significativamente diferentes a la cepa de referencia en donde solo las sub-poblaciones Martínez de la Torre, Veracruz y Coatzacoalcos sobrepasaron los valores medios de absorbancia de New Orleans. La sub-población Poza Rica mostró valores medios de absorbancia superiores a la cepa de referencia. Para la prueba enzimática de oxidasas ninguna de las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz mostro diferencia significativa a la cepa de referencia y los valores medios de absorbancia no fueron superiores a New Orleans. En el mecanismo de glutatión s-transferasas todas las sub-poblaciones fueron significativamente diferentes a la cepa de refencia New Orleans pero ninguna de ella mostró valores medios de absorbancia superiores. Para los mecanismos enzimáticos de acetilcolinesterasa insensible cinco de las siete sub-poblaciones (Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque) mostraron valores valores medios de absorbancia superiores a New Orleans. Solo las sub-poblaciones Poza Rica, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque fueron significativamente diferentes a la cepa de referencia.

6.9.7. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz expuestos a lambda-cialotrina.

Las sub-poblaciones Pánuco, Veracruz y Coatzacoalcos fueron significativamente diferentes a New Orleans superando los valores máximos de absorbancia. Las sub-poblaciones Martínez de la Torre y Cosoleacaque mostraron valores medios de absorbancia superiores a la cepa de referencia para los mecanismos enzimáticos de α -esterasas. Para la prueba enzimática de β -esterasas cinco de las siete sub-poblaciones (Pánuco, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz y Cosoleacaque) mostraron diferencia significativa y a su vez superando los valores medios de absorbancia de la cepa de referencia. La sub-población de Tantoyuca solo mostro diferencia significativa pero sus valores de absorbancia no sobrepasaron los valores medios de absorbancia de New Orleans. Los valores medios de absorbancia de la sub-población de Coatzacoalcos fueron superiores a la cepa de referencia pero no hubo diferencia significativa entre ellas. En los mecanismos enzimáticos de oxidasas seis de las siete sub-poblaciones (Pánuco, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque) sobrepasaron los valores medios de absorbancia de New Orleans pero solamente las sub-poblaciones de Martínez y Veracruz fueron significativamente diferentes a la cepa de referencia. En la prueba enzimática glutatión s-transferasas las sub-poblaciones Pánuco, Poza Rica, Martínez de la Torre y Veracruz fueron significativamente diferentes a la cepa New Orleans superando los valores medio de absorbancia de la cepa de referencia. Para el mecanismo de acetilcolinesterasa insensible ninguna de las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz fueron significativamente diferentes a New Orleans sin embargo las sub-poblaciones Pánuco, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque tuvieron valores medios de absorbancia superiores a la cepa de referencia.

6.9.8. Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz expuestos a bifentrina.

En la prueba enzimática α -esterasas las sub-poblaciones Tantoyuca, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque fueron significativamente diferentes a la cepa de referencia mostrando valores medios de absorbancia superiores a New Orleans. Para los mecanismos de β -esterasas las sub-poblaciones de Tantoyuca y Veracruz fueron significativamente diferentes a New Orleans y a su vez sus valores medios de absorbancia fueron superiores. En la prueba de oxidasas solo las sub-poblaciones de Martínez de la Torre y Coatzacoalcos mostraron diferencia significativa a la cepa de referencia pero ninguna de estas sobrepasó los valores medios de absorbancia de New Orleans a diferencia de las sub-poblaciones Pánuco, Poza Rica y Cosoleacaque que sí sobrepasaron los valores medios de absorbancia. Para el mecanismo enzimático glutatión s-transferasas las sub-poblaciones Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica y Veracruz mostraron diferencia significativa a la cepa New Orleans superando los valores medios de absorbancia. La sub-población de Cosoleacaque no fue significativamente diferente a la cepa New Orleans pero sus valores medios de absorbancia fueron superiores. En el mecanismo de acetilcolinesterasa insensible solo la sub-población de Pánuco fue significativamente diferente a New Orleans superando los valores medios de absorbancia. La sub-población de Veracruz no fue significativamente diferente a New Orleans pero sí superando los valores medios de absorbancia. La sub-población Poza Rica fue significativamente diferente a la cepa de referencia pero sus valores medios de absorbancia no fueron mayores a New Orleans.

6.9.9. Análisis y comparaciones de medias de absorbancia obtenidas entre las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz que no fueron expuestas a piretroides.

Los resultados de absorbancia obtenidos fueron evaluados mediante un análisis de varianza y una comparación múltiple de medias Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Se realizaron comparaciones entre individuos de cada sub-población del estado de Veracruz contra los pertenecientes a la cepa de referencia New Orleans. En la tabla 28 se muestran las medias de absorbancias obtenidas en cada ensayo bioquímico en sub-poblaciones de hembras *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz así como la comparación múltiple de medias realizada entre cada una de las sub-poblaciones respecto a la cepa de referencia.

Tabla 28. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas en mosquitos hembras *Ae. aegypti* (L.) que **no fueron expuestos** a los ocho piretroides y comparación de medias respecto a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$).

SUB-POBLACIÓN	PRUEBAS ENZIMÁTICAS									
	α - ESTERASA		β - ESTERASA		OXIDASA		GST		iAChE	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
NEW ORLEANS	0.265 ^A	0.148	0.367 ^A	0.027	0.185 ^A	0.058	0.025 ^A	0.014	0.009 ^A	0.006
PÁNUCO	0.709 ^B	0.054	0.873 ^B	0.072	0.316 ^B	0.095	0.012 ^A	0.009	0.096 ^B	0.026
TANTOYUCA	0.676 ^C	0.090	0.833 ^C	0.176	0.178 ^C	0.136	0.021 ^A	0.014	0.018 ^A	0.029
POZA RICA	0.874 ^D	0.078	1.172 ^D	0.111	0.202 ^D	0.045	0.116 ^B	0.033	0.008 ^A	0.008
MTZ DE LA TORRE	0.667 ^E	0.061	0.827 ^E	0.089	0.289 ^E	0.108	0.076 ^C	0.030	0.008 ^A	0.006
VERACRUZ	0.772 ^F	0.071	1.000 ^F	0.075	0.210 ^F	0.060	0.073 ^D	0.077	0.009 ^A	0.008
COATZACOALCOS	0.874 ^G	0.078	1.172 ^G	0.111	0.225 ^G	0.068	0.080 ^E	0.029	0.011 ^A	0.023
COSOLEACAQUE	0.772 ^H	0.071	1.000 ^H	0.075	0.124 ^A	0.054	0.011 ^A	0.023	0.005 ^A	0.005

Letras diferentes significa diferencia significativa

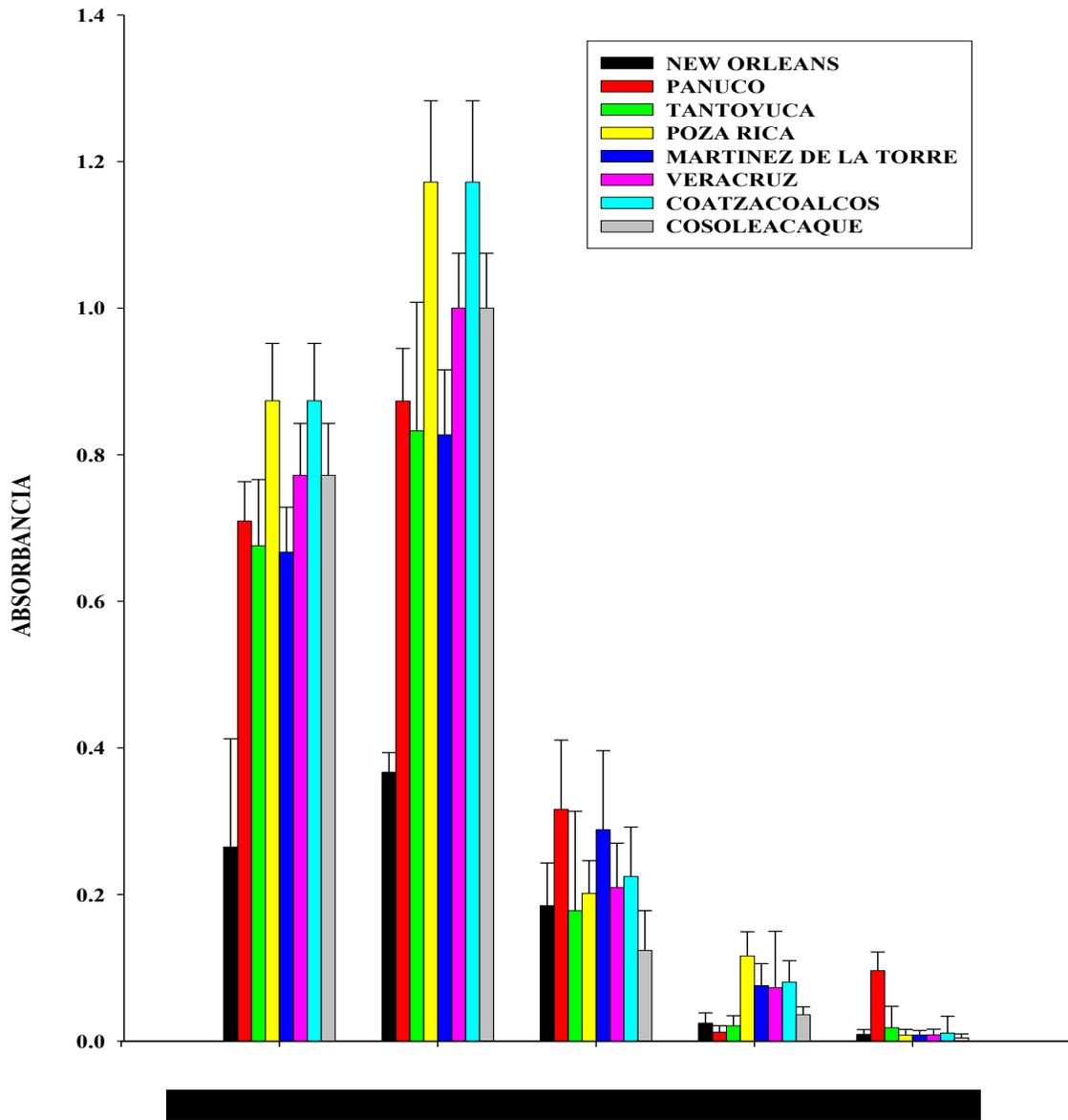


Figura 25. Valores medios de absorbancia de hembras *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz y cepa de referencia que no tuvieron exposición a piretroides obtenidas en las diferentes pruebas enzimáticas.

6.9.10 Comparación de los resultados obtenidos de ensayos bioquímicos realizados en individuos *Ae.aegypti* (L.) del estado de Veracruz que no fueron expuestos a piretroides.

Se analizó un grupo de hembras *Ae. aegypti* (L.) que no fueron expuestas a ningún piretroide, sino que fueron sacadas de las sub-poblaciones y muertas al someterse a temperaturas de -70°C . A estos individuos se les realizaron las pruebas enzimáticas correspondientes, se determinó el umbral de tolerancia a partir de la cepa de referencia New Orleans y se compararon a nivel media con respecto a la cepa de referencia. Los resultados se muestran en la tabla 28 en donde todas las sub-poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) del estado de Veracruz fueron significativamente diferentes a la cepa New Orleans superando los valores medios de absorbancia para las pruebas enzimáticas de α y β -esterasas.

En mecanismos enzimáticos de oxidasas todas las sub-poblaciones mostraron diferencia significativa a New Orleans superando los valores medios de absorbancia. La sub-población de Cosoleacaque fue la excepción ya que en esta no hubo diferencia significativa con New Orleans y sus valores medios de absorbancia no fueron mayores a los de la cepa de referencia.

Para la prueba enzimática glutatión s-transferasa las sub-poblaciones Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz y Coatzacoalcos mostraron diferencia significativa a la cepa New Orleans superando los valores medios de absorbancia. En la prueba enzimática acetilcolinesterasa insensible solo la sub-población de Pánuco fue significativamente diferente a la cepa de referencia New Orleans superando los valores medios de absorbancia.

7.-DISCUSIÓN

En México como en otros países se ha llevado el control de vectores transmisores de enfermedades a través del uso de insecticidas ejemplo de esto es el DDT, el cual fue usado indiscriminadamente en la década de los 60's para el control de la malaria, eventualmente se siguieron utilizando otros insecticidas como malatión como adulticida y temefos como larvicida. Para el control de *Ae. aegypti* (L.) se utilizó hasta 1989 el malatión como adulticida en aplicaciones espaciales ULV y en presentación de gránulo el temefos como larvicida sobre contenedores de agua que pudieran representar criaderos para las larvas de *Ae. aegypti* (L.) (Fernández 1999), siendo hasta la fecha el uso interrumpido de este. Reportes han indicado que el uso del DDT ha influido en la resistencia a piretroides (Hemingway *et al* 1989). En el Caribe y Sudamérica, existe el reporte de resistencia a piretroides en poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) en Venezuela (Field *et al.* 1984, Mazarri y Georgiou 1995), Puerto Rico (Hemingway *et al* 1989) y República Dominicana (Mekuria *et al* 1991) asociada con resistencia cruzada a DDT. Brengues *et al.* 2003 y Rodríguez *et al.* 2005 reportan que la resistencia asociada a piretroides no solo se debe únicamente a mutaciones en los canales de sodio sino que también se encuentran involucrados mecanismos enzimáticos. De igual forma existen numerosos reportes en donde el uso prolongado del organofosforado temefos por más de 30 años ha generado resistencia en poblaciones del vector *Ae. aegypti* (L.) (Bisett *et al.* 2004, Rodríguez *et al.* 2004, Montella *et al.* 2007) y aun en México donde se ha sugerido resistencia cruzada con permetrina mediada por esterasas por Flores *et al.* 2005, 2006, 2009.

Los mosquitos son capaces de desarrollar resistencia a la mayoría de los insecticidas usados para el control de estos, de modo que las dosis iniciales del tóxico efectivas no logran controlar a las poblaciones resistentes, generando como respuesta inmediata aumentar la frecuencia del tratamiento o la concentración del insecticida agravando el fracaso del control químico por ello la estrategia para manejar la resistencia requiere el

conocimiento de los mecanismos enzimáticos involucrados en dicho fenómeno (Picollo,2006). Razón por la cual se llevo a cabo la caracterización de la resistencia bioquímica en sub-poblaciones del estado de Veracruz encontrando en la sub-población de Pánuco los mecanismos enzimáticos α y β esterasas para los insecticidas temefos, fenotrina, cipermetrina y lambdacialotrina. Los mecanismos enzimáticos oxidasas y glutatión s-transferasa (GST) actuaron ante los insecticidas cipermetrina, lambdacialotrina, bifentrina y temefos.

Para la sub-población de Tantoyuca se encontró como principal mecanismo de acción las α -esterasas para los insecticidas cipermetrina, z-cipermetrina, bifentrina y temefos. El mecanismo enzimático de oxidasas actuó ante la presencia de los insecticidas fenotrina, cipermetrina y temefos. La presencia de las enzimas β -esterasas se dio cuando la sub-población fue expuesta a los piretroides cipermetrina y z-cipermetrina. Los mecanismos enzimáticos glutatión s-transferasas (GST) y acetilcolinesterasa insensible (iAChE) se manifestaron ante los piretroides fenotrina y bifentrina. La sub-población de Poza Rica presentó mayor actividad enzimática de α -esterasas ante la acción de los piretroides deltametrina, cipermetrina y alfa-cipermetrina. La acción de β -esterasas, se manifestó ante la acción de los piretroides cipermetrina, z-cipermetrina y lambdacialotrina. El mecanismo de oxidasas se manifestó ante los piretroides fenotrina y cipermetrina. Las enzimas glutatión s-transferasas se manifestaron ante la acción de los piretroides lambdacialotrina y bifentrina.

La sub-población de Martínez de la Torre mostro la acción de las enzimas detoxificativas oxidasas ante la acción de los piretroides fenotrina, permetrina, cipermetrina y lambdacialotrina. La acción de los piretroides cipermetrina, z-cipermetrina y lambdacialotrina activaron el mecanismo enzimático β -esterasas. El mecanismo enzimático α -esterasa se manifestó ante la acción de los insecticidas z-cipermetrina y temefos. El mecanismo detoxificativo glutatión s-transferasa se presentó ante los piretroides fenotrina y lambdacialotrina. La enzima detoxificativa acetilcolinesterasa insensible solo se presento ante la acción de fenotrina.

Los principales mecanismos enzimáticos detoxificativos en la sub-población de Veracruz fueron la α y β -esterasas ante la acción de los insecticidas deltametrina,

cipermetrina, alfa-cipermetrina, z-cipermetrina, lambdacialotrina, bifentrina y temefos. La acción de las enzimas glutatión s-transferasas se manifestaron ante la presencia de los piretroides permetrina, lambdacialotrina y bifentrina.

En la sub-población de Coatzacoalcos se encontraron como principales mecanismos enzimáticos α y β - esterasas para los piretroides fenotrina, cipermetrina, alfa-cipermetrina. En los insecticidas bifentrina, temefos y z-cipermetrina se encontró la acción de las enzimas detoxificativas α -esterasa y oxidasas respectivamente. La sub-población de Cosoleacaque mostro como principales mecanismos enzimáticos la acción de α y β -esterasas ante los insecticidas temefos, deltametrina, cipermetrina, lambdacialotrina y bifentrina. La acción de las enzimas detoxificativas oxidasas se presentaron ante los piretroides fenotrina, deltametrina y cipermetrina. Los mecanismos enzimáticos acetilcolinesterasa insensible y glutatión s-transferasa se presentaron ante la acción de los insecticidas fenotrina y cipermetrina respectivamente. Los resultados sugieren que las sub-poblaciones del estado de Veracruz han estado sometidas a una fuerte presión de selección en campo, comprobándose lo dicho por Flores *et al.* 2005, 2006 ,2009 y Saavedra *et al.* 2007,2008 de que el uso de permetrina en poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) en México está ocasionando la pérdida de susceptibilidad a este insecticida, y a otros piretroides como se reporta en este trabajo, aun y cuando no son de uso común para el control del vector en el País. Demostrándose a su vez lo dicho por Sosa, 1992 de que la resistencia a piretroides se desarrolla con mayor rapidez que la resistencia a otros productos químicos. La detección temprana como método preventivo debe complementarse con una estrategia de rotación de activos que permita la utilización de un compuesto alternativo hacia el que la resistencia en desarrollo no cruce, o con el desarrollo de nuevas formulaciones reduzcan la resistencia o potencien la acción del insecticida por tanto los resultados obtenidos en el estado de Veracruz contribuyen a lo antes mencionado y nos llevan a considerar si los piretroides seguirán siendo insecticidas de primera elección en México para controlar las poblaciones del vector *Ae. aegypti* (L.)

8.-CONCLUSIONES

Los principales mecanismos enzimáticos presentes en sub-poblaciones larvarias del estado de Veracruz son α y β - **esterasas** lo que sugiere resistencia cruzada entre piretroides y organofosforados (temefos).

Los mecanismos enzimáticos detoxificativos **glutación s-transferasa y α - esterasa** fueron los principales mecanismos presentes en las sub-poblaciones del estado de Veracruz ante la exposición del piretroide **bifentrina**.

Las sub-poblaciones del estado de Veracruz presentaron como principales mecanismos enzimáticos detoxificativos a la **β - esterasas y glutación s-transferasas** al ser expuestas con el piretroide **lambdacialotrina** y en **menor proporción** se encontraron los mecanismos enzimáticos **α – esterasas y oxidasas**.

Los principales mecanismos enzimáticos detoxificativos presentes en las sub-poblaciones del estado de Veracruz ante la exposición del piretroide **z-cipermetrina** fueron las **β - esterasas, α – esterasas** y en menor proporción se encontró a la **acetilcolinesterasa insensible (iAChE) y oxidasas**.

Los mecanismos enzimáticos detoxificativos **α – esterasa y β - esterasas** fueron los principales mecanismos presentes en las sub-poblaciones del estado de Veracruz al ser seleccionados con el piretroide **alfa-cipermetrina**.

Los principales mecanismos enzimáticos detoxificativos presentes en las sub-poblaciones del estado de Veracruz ante la exposición del piretroide **cipermetrina** fueron **β - esterasas, oxidasas y α – esterasa** y en menor proporción **glutación s-transferasa (GST)**

Los mecanismos enzimáticos detoxificativos **β - esterasas, oxidasas y α – esterasa** se manifestaron ante la exposición del piretroide **deltametrina** en las sub-poblaciones de Poza Rica, Veracruz y Cosoleacaque.

Los mecanismos enzimáticos detoxificativos **glutación s-transferasa (GST)** y **oxidasas** se manifestaron ante la exposición del piretroide **permetrina** en las sub-poblaciones de Veracruz y Martínez de la Torre.

Los mecanismos enzimáticos detoxificativos **oxidasas**, **acetilcolinesterasa insensible (iAChE)** y **α – esterasa** fueron los principales mecanismos presentes en las sub-poblaciones del estado de Veracruz al ser expuestas al piretroide **fenotrina** y en menor proporción se encontró el mecanismo de **β - esterasas**

APENDICES

Apéndice A. Comparación de medias y análisis de varianza en sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* seleccionadas con el organofosforado temefos

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
ALFA	NEW ORLEANS	60	.76458	.098538	.012721	.73913	.79004	.485	1.039
	PANUCO	60	.64522	.096006	.012394	.62042	.67002	.437	.900
	TANTOYUCA	60	.70522	.102350	.013213	.67878	.73166	.483	.958
	POZA RICA	60	.65238	.096273	.012429	.62751	.67725	.449	.940
	MTZ DE LA TORRE	60	.73430	.110486	.014264	.70576	.76284	.502	.999
	VERACRUZ	60	.68957	.060891	.007861	.67384	.70530	.587	.845
	COATZACOALCOS	60	.70663	.078844	.010179	.68627	.72700	.570	1.128
	COSOLEACAQUE	60	.66058	.081929	.010577	.63942	.68175	.412	.864
	Total		480	.69481	.099177	.004527	.68592	.70371	.412
BETA	NEW ORLEANS	60	.85692	.103459	.013356	.83019	.88364	.662	1.138
	PANUCO	60	.76657	.076523	.009879	.74680	.78633	.604	.963
	TANTOYUCA	60	.74362	.099237	.012811	.71798	.76925	.531	1.047
	POZA RICA	60	.76258	.141635	.018285	.72600	.79917	.514	1.090
	MTZ DE LA TORRE	60	.84293	.095895	.012380	.81816	.86771	.659	1.073
	VERACRUZ	60	.74323	.059788	.007719	.72779	.75868	.627	.932
	COATZACOALCOS	60	.79173	.071952	.009289	.77315	.81032	.685	1.013
	COSOLEACAQUE	60	.72495	.060442	.007803	.70934	.74056	.509	.913
	Total		480	.77907	.102045	.004658	.76991	.78822	.509

OXI	NEW ORLEANS	60	.15813	.034926	.004509	.14911	.16716	.113	.275
	PANUCO	60	.07115	.012073	.001559	.06803	.07427	.057	.104
	TANTOYUCA	60	.06718	.014376	.001856	.06347	.07090	.051	.152
	POZA RICA	60	.09960	.033512	.004326	.09094	.10826	.059	.219
	MTZ DE LA TORRE	60	.08818	.023017	.002971	.08224	.09413	.055	.156
	VERACRUZ	60	.13882	.020546	.002652	.13351	.14412	.109	.219
	COATZACOALCOS	60	.13048	.018283	.002360	.12576	.13521	.100	.186
	COSOLEACAQUE	60	.13503	.015257	.001970	.13109	.13897	.109	.195
	Total	480	.11107	.039180	.001788	.10756	.11459	.051	.275
GST	NEW ORLEANS	60	.00655	.037130	.004793	-.00304	.01614	-.095	.040
	PANUCO	60	.01917	.004480	.000578	.01801	.02032	.012	.045
	TANTOYUCA	60	.02265	.004452	.000575	.02150	.02380	.016	.040
	POZA RICA	60	.02172	.006279	.000811	.02009	.02334	.010	.041
	MTZ DE LA TORRE	60	.01970	.004862	.000628	.01844	.02096	.009	.036
	VERACRUZ	60	.01608	.007454	.000962	.01416	.01801	-.010	.038
	COATZACOALCOS	60	-.00053	.024909	.003216	-.00697	.00590	-.024	.080
	COSOLEACAQUE	60	.02440	.005651	.000730	.02294	.02586	.013	.038
	Total	480	.01622	.018344	.000837	.01457	.01786	-.095	.080
IACHE	NEW ORLEANS	60	.00258	.003480	.000449	.00168	.00348	-.002	.013
	PANUCO	60	-.00792	.015266	.001971	-.01186	-.00397	-.067	.004
	TANTOYUCA	60	.00000	.009464	.001222	-.00244	.00244	-.032	.029
	POZA RICA	60	-.03195	.042287	.005459	-.04287	-.02103	-.142	.014
	MTZ DE LA TORRE	60	.00243	.002295	.000296	.00184	.00303	-.003	.008
	VERACRUZ	60	.00112	.006031	.000779	-.00044	.00267	-.017	.015
	COATZACOALCOS	60	-.00917	.030412	.003926	-.01702	-.00131	-.130	.006
	COSOLEACAQUE	60	.00207	.004399	.000568	.00093	.00320	-.018	.012
	Total	480	-.00510	.022479	.001026	-.00712	-.00309	-.142	.029

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ALFA	Between Groups	.728	7	.104	12.324	.000
	Within Groups	3.983	472	.008		
	Total	4.711	479			
BETA	Between Groups	.972	7	.139	16.317	.000
	Within Groups	4.016	472	.009		
	Total	4.988	479			
OXI	Between Groups	.487	7	.070	131.977	.000
	Within Groups	.249	472	.001		
	Total	.735	479			
GST	Between Groups	.032	7	.005	16.707	.000
	Within Groups	.129	472	.000		
	Total	.161	479			
IACHE	Between Groups	.059	7	.008	21.554	.000
	Within Groups	.183	472	.000		
	Total	.242	479			

ALFA

Tukey HSD^a

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
PANUCO	60	.64522			
POZA RICA	60	.65238			
COSOLEACAQUE	60	.66058	.66058		
VERACRUZ	60	.68957	.68957	.68957	
TANTOYUCA	60		.70522	.70522	
COATZACOALCOS	60		.70663	.70663	
MTZ DE LA TORRE	60			.73430	.73430
NEW ORLEANS	60				.76458
Sig.		.143	.112	.135	.617

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

BETA

Tukey HSD^a

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
COSOLEACAQUE	60	.72495			
VERACRUZ	60	.74323	.74323		
TANTOYUCA	60	.74362	.74362		
POZA RICA	60	.76258	.76258		
PANUCO	60	.76657	.76657		
COATZACOALCOS	60		.79173	.79173	
MTZ DE LA TORRE	60			.84293	.84293
NEW ORLEANS	60				.85692
Sig.		.210	.079	.051	.991

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

OXI

Tukey HSD^a

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
TANTOYUCA	60	.06718			
PANUCO	60	.07115			
MTZ DE LA TORRE	60		.08818		
POZA RICA	60		.09960		
COATZACOALCOS	60			.13048	
COSOLEACAQUE	60			.13503	
VERACRUZ	60			.13882	
NEW ORLEANS	60				.15813
Sig.		.981	.118	.491	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

GST

Tukey HSD^a

ID	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
COATZACOALCOS	60	-.00053	
NEW ORLEANS	60	.00655	
VERACRUZ	60		.01608
PANUCO	60		.01917
MTZ DE LA TORRE	60		.01970
POZA RICA	60		.02172
TANTOYUCA	60		.02265
COSOLEACAQUE	60		.02440
Sig.		.271	.110

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

IACHE

Tukey HSD^a

ID	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
POZA RICA	60	-.03195		
COATZACOALCOS	60		-.00917	
PANUCO	60		-.00792	-.00792
TANTOYUCA	60		.00000	.00000
VERACRUZ	60		.00112	.00112
COSOLEACAQUE	60			.00207
MTZ DE LA TORRE	60			.00243
NEW ORLEANS	60			.00258
Sig.		1.000	.084	.071

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

Apéndice B. Comparación de medias y análisis de varianza en sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* que no fueron seleccionadas con el organofosforado temefos

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
ALFA	NEW ORLEANS	60	.44217	.047792	.006170	.42982	.45451	.355	.590
	PANUCO	60	.61718	.096106	.012407	.59236	.64201	.445	.864
	TANTOYUCA	60	.56133	.095842	.012373	.53657	.58609	.333	.780
	POZA RICA	60	.46368	.069203	.008934	.44581	.48156	.346	.642
	MTZ DE LA TORRE	60	.60128	.123307	.015919	.56943	.63314	.429	.999
	VERACRUZ	60	.57168	.100311	.012950	.54577	.59760	.402	.819
	COATZACOALCOS	60	.54482	.083122	.010731	.52334	.56629	.399	.739
	COSOLEACAQUE	60	.52222	.080488	.010391	.50142	.54301	.328	.691
	Total	480	.54055	.106168	.004846	.53102	.55007	.328	.999
BETA	NEW ORLEANS	60	.73907	.099105	.012794	.71347	.76467	.565	1.004
	PANUCO	60	.60887	.095485	.012327	.58420	.63353	.445	.870
	TANTOYUCA	60	.73657	.111349	.014375	.70780	.76533	.544	1.021
	POZA RICA	60	.67477	.082224	.010615	.65353	.69601	.485	.882
	MTZ DE LA TORRE	60	.62188	.110537	.014270	.59333	.65044	.476	.999
	VERACRUZ	60	1.07233	.218312	.028184	1.01594	1.12873	.689	1.743
	COATZACOALCOS	60	.74792	.105367	.013603	.72070	.77514	.465	1.023
	COSOLEACAQUE	60	.77075	.100082	.012921	.74490	.79660	.522	1.094
	Total	480	.74652	.181725	.008295	.73022	.76282	.445	1.743

OXI	NEW ORLEANS	60	.13300	.021099	.002724	.12755	.13845	.093	.169
	PANUCO	60	.21353	.040425	.005219	.20309	.22398	.118	.288
	TANTOYUCA	60	.19557	.049461	.006385	.18279	.20834	.111	.306
	POZA RICA	60	.09618	.048004	.006197	.08378	.10858	.063	.358
	MTZ DE LA TORRE	60	.09478	.012851	.001659	.09146	.09810	.071	.132
	VERACRUZ	60	.12342	.019421	.002507	.11840	.12843	.094	.180
	COATZACOALCOS	60	.10337	.020278	.002618	.09813	.10860	.068	.163
	COSOLEACAQUE	60	.11112	.024745	.003195	.10472	.11751	.083	.213
	Total	480	.13387	.053576	.002445	.12907	.13868	.063	.358
GST	NEW ORLEANS	60	.01098	.032230	.004161	.00266	.01931	-.128	.052
	PANUCO	60	-.00352	.070421	.009091	-.02171	.01468	-.158	.138
	TANTOYUCA	60	-.01063	.033903	.004377	-.01939	-.00188	-.143	.039
	POZA RICA	60	-.01148	.052449	.006771	-.02503	.00207	-.110	.187
	MTZ DE LA TORRE	60	-.05995	.073093	.009436	-.07883	-.04107	-.229	.024
	VERACRUZ	60	-.02577	.039496	.005099	-.03597	-.01556	-.130	.045
	COATZACOALCOS	60	-.03565	.049166	.006347	-.04835	-.02295	-.165	.038
	COSOLEACAQUE	60	-.00873	.034060	.004397	-.01753	.00007	-.119	.032
	Total	480	-.01809	.054142	.002471	-.02295	-.01324	-.229	.187
IACHE	NEW ORLEANS	60	.00317	.007169	.000926	.00131	.00502	-.006	.034
	PANUCO	60	-.02202	.039934	.005155	-.03233	-.01170	-.158	.019
	TANTOYUCA	60	-.04003	.068811	.008883	-.05781	-.02226	-.282	.096
	POZA RICA	60	-.01163	.026722	.003450	-.01854	-.00473	-.141	.017
	MTZ DE LA TORRE	60	-.02657	.052028	.006717	-.04001	-.01313	-.246	.014
	VERACRUZ	60	-.00857	.020174	.002604	-.01378	-.00336	-.101	.019
	COATZACOALCOS	60	-.00750	.028040	.003620	-.01474	-.00026	-.153	.022
	COSOLEACAQUE	60	.00148	.008662	.001118	-.00075	.00372	-.016	.026
	Total	480	-.01396	.039407	.001799	-.01749	-.01042	-.282	.096

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ALFA	Between Groups	1.614	7	.231	28.759	.000
	Within Groups	3.785	472	.008		
	Total	5.399	479			
BETA	Between Groups	8.792	7	1.256	84.367	.000
	Within Groups	7.027	472	.015		
	Total	15.818	479			
OXI	Between Groups	.880	7	.126	119.722	.000
	Within Groups	.495	472	.001		
	Total	1.375	479			
GST	Between Groups	.202	7	.029	11.320	.000
	Within Groups	1.202	472	.003		
	Total	1.404	479			
IACHE	Between Groups	.091	7	.013	9.364	.000
	Within Groups	.653	472	.001		
	Total	.744	479			

ALFA

Tukey HSD^a

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
NEW ORLEANS	60	.44217			
POZA RICA	60	.46368			
COSOLEACAQUE	60		.52222		
COATZACOALCOS	60		.54482		
TANTOYUCA	60		.56133	.56133	
VERACRUZ	60		.57168	.57168	.57168
MTZ DE LA TORRE	60			.60128	.60128
PANUCO	60				.61718
Sig.		.893	.053	.223	.102

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

BETA

Tukey HSD^a

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
PANUCO	60	.60887			
MTZ DE LA TORRE	60	.62188			
POZA RICA	60	.67477	.67477		
TANTOYUCA	60		.73657	.73657	
NEW ORLEANS	60		.73907	.73907	
COATZACOALCOS	60			.74792	
COSOLEACAQUE	60			.77075	
VERACRUZ	60				1.07233
Sig.		.064	.078	.788	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

OXI

Tukey HSD^a

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
MTZ DE LA TORRE	60	.09478			
POZA RICA	60	.09618			
COATZACOALCOS	60	.10337			
COSOLEACAQUE	60	.11112	.11112		
VERACRUZ	60		.12342	.12342	
NEW ORLEANS	60			.13300	
TANTOYUCA	60				.19557
PANUCO	60				.21353
Sig.		.107	.430	.738	.051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

GST

Tukey HSD^a

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
MTZ DE LA TORRE	60	-.05995			
COATZACOALCOS	60	-.03565	-.03565		
VERACRUZ	60		-.02577	-.02577	
POZA RICA	60		-.01148	-.01148	-.01148
TANTOYUCA	60		-.01063	-.01063	-.01063
COSOLEACAQUE	60		-.00873	-.00873	-.00873
PANUCO	60			-.00352	-.00352
NEW ORLEANS	60				.01098
Sig.		.145	.071	.237	.225

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

IACHE

Tukey HSD^a

ID	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
TANTOYUCA	60	-.04003		
MTZ DE LA TORRE	60	-.02657	-.02657	
PANUCO	60	-.02202	-.02202	
POZA RICA	60		-.01163	-.01163
VERACRUZ	60		-.00857	-.00857
COATZACOALCOS	60		-.00750	-.00750
COSOLEACAQUE	60			.00148
NEW ORLEANS	60			.00317
Sig.		.140	.096	.366

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

Apéndice C. Comparación de medias y análisis de varianza en sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* que fueron seleccionadas con el piretroide fenotrina

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ALFA								
NEW ORLEANS	30	.84533	.101155	.018468	.80756	.88311	.689	.982
PANUCO	30	1.01053	.112991	.020629	.96834	1.05272	.833	1.228
TANTOYUCA	44	.67618	.048658	.007336	.66139	.69098	.562	.789
POZA RICA	80	.70980	.073458	.008213	.69345	.72615	.572	.922
MTZ DE LA TORRE	74	.70568	.057651	.006702	.69232	.71903	.564	.799
VERACRUZ	30	.78897	.081176	.014821	.75865	.81928	.645	.981
COATZACOALCOS	30	.91317	.084808	.015484	.88150	.94483	.682	1.091
COSOLEACAQUE	107	.56050	.058022	.005609	.54937	.57162	.439	.698
Total	425	.71875	.148017	.007180	.70464	.73286	.439	1.228
BETA								
NEW ORLEANS	30	1.03430	.104762	.019127	.99518	1.07342	.878	1.205
PANUCO	30	1.11973	.084160	.015365	1.08831	1.15116	.937	1.281
TANTOYUCA	44	.74452	.070931	.010693	.72296	.76609	.618	.925
POZA RICA	80	.82563	.095108	.010633	.80446	.84679	.627	1.049
MTZ DE LA TORRE	74	.84819	.101392	.011787	.82470	.87168	.667	1.167
VERACRUZ	30	1.00820	.102745	.018759	.96983	1.04657	.783	1.279
COATZACOALCOS	30	1.21070	.100695	.018384	1.17310	1.24830	.923	1.455
COSOLEACAQUE	107	.72432	.084383	.008158	.70814	.74049	.576	.960
Total	425	.87121	.178118	.008640	.85423	.88819	.576	1.455

OXI	NEW ORLEANS	30	.29577	.102718	.018754	.25741	.33412	.168	.566
	PANUCO	30	.45160	.112700	.020576	.40952	.49368	.278	.802
	TANTOYUCA	44	.53925	.201148	.030324	.47810	.60040	.201	.998
	POZA RICA	80	.58380	.237150	.026514	.53102	.63658	.123	1.215
	MTZ DE LA TORRE	74	.65480	.174899	.020332	.61428	.69532	.264	1.948
	VERACRUZ	30	.35607	.081009	.014790	.32582	.38632	.239	.495
	COATZACOALCOS	30	.46697	.081598	.014898	.43650	.49744	.329	.728
	COSOLEACAQUE	107	.37917	.141825	.013711	.35199	.40635	.199	.908
	Total	425	.48604	.202949	.009844	.46669	.50539	.123	1.948
GST	NEW ORLEANS	30	.02413	.022145	.004043	.01586	.03240	-.062	.050
	PANUCO	30	.01723	.039500	.007212	.00248	.03198	-.109	.061
	TANTOYUCA	44	.02000	.042971	.006478	.00694	.03306	-.120	.080
	POZA RICA	80	.04244	.038999	.004360	.03376	.05112	-.088	.103
	MTZ DE LA TORRE	74	.06805	.026128	.003037	.06200	.07411	-.016	.142
	VERACRUZ	30	.03283	.017753	.003241	.02620	.03946	-.010	.077
	COATZACOALCOS	30	-.01293	.016549	.003021	-.01911	-.00675	-.041	.033
	COSOLEACAQUE	107	.03276	.026909	.002601	.02760	.03791	-.042	.118
	Total	425	.03448	.036997	.001795	.03095	.03801	-.120	.142
IACHE	NEW ORLEANS	30	.00350	.007267	.001327	.00079	.00621	-.017	.019
	PANUCO	30	.01313	.005171	.000944	.01120	.01506	.002	.025
	TANTOYUCA	44	.01202	.011350	.001711	.00857	.01547	-.004	.046
	POZA RICA	80	.00510	.011703	.001308	.00250	.00770	-.026	.057
	MTZ DE LA TORRE	74	.01119	.017518	.002036	.00713	.01525	-.027	.076
	VERACRUZ	30	.00823	.006191	.001130	.00592	.01054	-.020	.016
	COATZACOALCOS	30	.00740	.005781	.001055	.00524	.00956	-.013	.016
	COSOLEACAQUE	107	.01065	.008233	.000796	.00908	.01223	-.011	.038
	Total	425	.00911	.011296	.000548	.00804	.01019	-.027	.076

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ALFA	Between Groups	7.095	7	1.014	192.628	.000
	Within Groups	2.194	417	.005		
	Total	9.289	424			
BETA	Between Groups	9.892	7	1.413	165.525	.000
	Within Groups	3.560	417	.009		
	Total	13.452	424			
OXI	Between Groups	5.858	7	.837	30.069	.000
	Within Groups	11.606	417	.028		
	Total	17.464	424			
GST	Between Groups	.178	7	.025	26.285	.000
	Within Groups	.403	417	.001		
	Total	.580	424			
IACHE	Between Groups	.004	7	.001	4.468	.000
	Within Groups	.050	417	.000		
	Total	.054	424			

ALFA

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
COSOLEACAQUE	107	.56050					
TANTOYUCA	44		.67618				
MTZ DE LA TORRE	74		.70568				
POZA RICA	80		.70980				
VERACRUZ	30			.78897			
NEW ORLEANS	30				.84533		
COATZACOALCOS	30					.91317	
PANUCO	30						1.01053
Sig.		1.000	.405	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 41.793.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

BETA

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
COSOLEACAQUE	107	.72432				
TANTOYUCA	44	.74452				
POZA RICA	80		.82563			
MTZ DE LA TORRE	74		.84819			
VERACRUZ	30			1.00820		
NEW ORLEANS	30			1.03430		
PANUCO	30				1.11973	
COATZACOALCOS	30					1.21070
Sig.		.974	.953	.902	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 41.793.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

OXI

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
NEW ORLEANS	30	.29577				
VERACRUZ	30	.35607	.35607			
COSOLEACAQUE	107	.37917	.37917			
PANUCO	30		.45160	.45160		
COATZACOALCOS	30		.46697	.46697		
TANTOYUCA	44			.53925	.53925	
POZA RICA	80				.58380	.58380
MTZ DE LA TORRE	74					.65480
Sig.		.304	.051	.243	.926	.520

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 41.793.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

GST

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
COATZACOALCOS	30	-.01293			
PANUCO	30		.01723		
TANTOYUCA	44		.02000		
NEW ORLEANS	30		.02413	.02413	
COSOLEACAQUE	107		.03276	.03276	
VERACRUZ	30		.03283	.03283	
POZA RICA	80			.04244	
MTZ DE LA TORRE	74				.06805
Sig.		1.000	.299	.128	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 41.793.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
NEW ORLEANS	30	.00350		
POZA RICA	80	.00510	.00510	
COATZACOALCOS	30	.00740	.00740	.00740
VERACRUZ	30	.00823	.00823	.00823
COSOLEACAQUE	107	.01065	.01065	.01065
MTZ DE LA TORRE	74		.01119	.01119
TANTOYUCA	44		.01202	.01202
PANUCO	30			.01313
Sig.		.061	.079	.251

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 41.793.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Apéndice D. Comparación de medias y análisis de varianza en sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* que fueron seleccionadas con el piretroide permetrina

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ALFA								
NEW ORLEANS	30	.81103	.060314	.011012	.78851	.83356	.687	.945
PANUCO	33	.54179	.061341	.010678	.52004	.56354	.441	.704
TANTOYUCA	21	.58910	.041330	.009019	.57028	.60791	.499	.654
POZA RICA	30	.81797	.060135	.010979	.79551	.84042	.669	.915
MTZ DE LA TORRE	42	.60010	.062126	.009586	.58074	.61946	.482	.749
VERACRUZ	42	.60010	.062126	.009586	.58074	.61946	.482	.749
COATZACOALCOS	44	.56300	.052016	.007842	.54719	.57881	.462	.675
COSOLEACAQUE	25	.57948	.038515	.007703	.56358	.59538	.509	.643
Total	267	.63216	.114767	.007024	.61833	.64599	.441	.945
BETA								
NEW ORLEANS	30	1.05760	.085444	.015600	1.02569	1.08951	.859	1.196
PANUCO	33	.67706	.065433	.011390	.65386	.70026	.567	.901
TANTOYUCA	21	.78752	.091375	.019940	.74593	.82912	.633	.977
POZA RICA	30	.95183	.082365	.015038	.92108	.98259	.779	1.136
MTZ DE LA TORRE	42	.69798	.083025	.012811	.67210	.72385	.520	.909
VERACRUZ	42	.69798	.083025	.012811	.67210	.72385	.520	.909
COATZACOALCOS	44	.72484	.069208	.010434	.70380	.74588	.604	.891
COSOLEACAQUE	25	.74976	.058405	.011681	.72565	.77387	.658	.848
Total	267	.78064	.148119	.009065	.76279	.79849	.520	1.196

OXI	NEW ORLEANS	30	.21293	.066368	.012117	.18815	.23772	.120	.402
	PANUCO	33	.18406	.038272	.006662	.17049	.19763	.117	.282
	TANTOYUCA	21	.24629	.038210	.008338	.22889	.26368	.193	.340
	POZA RICA	30	.32100	.096696	.017654	.28489	.35711	.121	.554
	MTZ DE LA TORRE	42	.29250	.088470	.013651	.26493	.32007	.165	.533
	VERACRUZ	42	.29250	.088470	.013651	.26493	.32007	.165	.533
	COATZACOALCOS	44	.13880	.026428	.003984	.13076	.14683	.100	.212
	COSOLEACAQUE	25	.14464	.025000	.005000	.13432	.15496	.103	.183
	Total	267	.23055	.094399	.005777	.21918	.24193	.100	.554
GST	NEW ORLEANS	30	.05670	.018596	.003395	.04976	.06364	.033	.094
	PANUCO	33	.03464	.012219	.002127	.03030	.03897	.007	.065
	TANTOYUCA	21	.05329	.021133	.004612	.04367	.06291	.014	.081
	POZA RICA	30	-.00330	.061707	.011266	-.02634	.01974	-.137	.075
	MTZ DE LA TORRE	42	.07083	.037811	.005834	.05905	.08262	.007	.164
	VERACRUZ	42	.07083	.037811	.005834	.05905	.08262	.007	.164
	COATZACOALCOS	44	.02730	.008930	.001346	.02458	.03001	.012	.054
	COSOLEACAQUE	25	.03420	.014012	.002802	.02842	.03998	-.015	.051
	Total	267	.04446	.039323	.002407	.03972	.04920	-.137	.164
IACHE	NEW ORLEANS	30	.01353	.008846	.001615	.01023	.01684	-.009	.030
	PANUCO	33	-.07967	.076587	.013332	-.10682	-.05251	-.206	.014
	TANTOYUCA	21	-.03433	.066619	.014538	-.06466	-.00401	-.207	.011
	POZA RICA	30	-.01427	.044205	.008071	-.03077	.00224	-.139	.044
	MTZ DE LA TORRE	42	-.02893	.051672	.007973	-.04503	-.01283	-.171	.039
	VERACRUZ	42	-.02893	.051672	.007973	-.04503	-.01283	-.171	.039
	COATZACOALCOS	44	.00820	.005254	.000792	.00661	.00980	-.008	.024
	COSOLEACAQUE	25	.01364	.007216	.001443	.01066	.01662	.001	.031
	Total	267	-.01910	.054257	.003320	-.02564	-.01256	-.207	.044

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ALFA	Between Groups	2.670	7	.381	118.553	.000
	Within Groups	.833	259	.003		
	Total	3.504	266			
BETA	Between Groups	4.270	7	.610	100.926	.000
	Within Groups	1.566	259	.006		
	Total	5.836	266			
OXI	Between Groups	1.209	7	.173	38.490	.000
	Within Groups	1.162	259	.004		
	Total	2.370	266			
GST	Between Groups	.152	7	.022	21.636	.000
	Within Groups	.260	259	.001		
	Total	.411	266			
IACHE	Between Groups	.226	7	.032	15.038	.000
	Within Groups	.557	259	.002		
	Total	.783	266			

ALFA

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
PANUCO	33	.54179		
COATZACOALCOS	44	.56300	.56300	
COSOLEACAQUE	25	.57948	.57948	
TANTOYUCA	21		.58910	
MTZ DE LA TORRE	42		.60010	
VERACRUZ	42		.60010	
NEW ORLEANS	30			.81103
POZA RICA	30			.81797
Sig.		.149	.164	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 31.381.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

BETA

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
PANUCO	33	.67706				
MTZ DE LA TORRE	42	.69798	.69798			
VERACRUZ	42	.69798	.69798			
COATZACOALCOS	44	.72484	.72484			
COSOLEACAQUE	25		.74976	.74976		
TANTOYUCA	21			.78752		
POZA RICA	30				.95183	
NEW ORLEANS	30					1.05760
Sig.		.229	.147	.536	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 31.381.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

OXI

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
COATZACOALCOS	44	.13880				
COSOLEACAQUE	25	.14464				
PANUCO	33	.18406	.18406			
NEW ORLEANS	30		.21293	.21293		
TANTOYUCA	21			.24629	.24629	
MTZ DE LA TORRE	42				.29250	.29250
VERACRUZ	42				.29250	.29250
POZA RICA	30					.32100
Sig.		.134	.682	.503	.117	.697

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 31.381.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

GST

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
POZA RICA	30	-.00330			
COATZACOALCOS	44		.02730		
COSOLEACAQUE	25		.03420	.03420	
PANUCO	33		.03464	.03464	
TANTOYUCA	21			.05329	.05329
NEW ORLEANS	30			.05670	.05670
MTZ DE LA TORRE	42				.07083
VERACRUZ	42				.07083
Sig.		1.000	.984	.096	.358

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 31.381.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

IACHE

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
PANUCO	33	-.07967		
TANTOYUCA	21		-.03433	
MTZ DE LA TORRE	42		-.02893	
VERACRUZ	42		-.02893	
POZA RICA	30		-.01427	-.01427
COATZACOALCOS	44			.00820
NEW ORLEANS	30			.01353
COSOLEACAQUE	25			.01364
Sig.		1.000	.678	.254

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 31.381.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Apéndice E. Comparación de medias y análisis de varianza en sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* que fueron seleccionadas con el piretroide deltametrina

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
ALFA	NEW ORLEANS	86	.65343	.055294	.005963	.64158	.66529	.523	.794
	PANUCO	31	.57019	.043617	.007834	.55419	.58619	.487	.661
	TANTOYUCA	108	.60169	.067461	.006491	.58883	.61456	.464	.806
	POZA RICA	29	.70707	.107240	.019914	.66628	.74786	.564	1.054
	MTZ DE LA TORRE	30	.61410	.047071	.008594	.59652	.63168	.513	.716
	VERACRUZ	20	.73390	.052216	.011676	.70946	.75834	.664	.828
	COATZACOALCOS	55	.62796	.057345	.007732	.61246	.64347	.532	.776
	COSOLEACAQUE	30	.71627	.061009	.011139	.69349	.73905	.614	.857
	Total	389	.63878	.078012	.003955	.63100	.64656	.464	1.054
BETA	NEW ORLEANS	86	.79423	.076504	.008250	.77783	.81063	.601	.966
	PANUCO	31	.68865	.056325	.010116	.66798	.70931	.601	.843
	TANTOYUCA	108	.71294	.108161	.010408	.69231	.73358	.517	1.163
	POZA RICA	29	.80172	.087669	.016280	.76838	.83507	.638	1.029
	MTZ DE LA TORRE	30	.74993	.089826	.016400	.71639	.78348	.561	.945
	VERACRUZ	20	.88280	.048437	.010831	.86013	.90547	.818	.993
	COATZACOALCOS	55	.70165	.076424	.010305	.68099	.72231	.561	.924
	COSOLEACAQUE	30	1.10270	.092994	.016978	1.06798	1.13742	.927	1.298
	Total	389	.77565	.137846	.006989	.76190	.78939	.517	1.298

OXI	NEW ORLEANS	86	.29255	.087801	.009468	.27372	.31137	.109	.544
	PANUCO	31	.18739	.047410	.008515	.17000	.20478	.108	.268
	TANTOYUCA	108	.30081	.084384	.008120	.28472	.31691	.115	.520
	POZA RICA	29	.37414	.098971	.018379	.33649	.41178	.195	.578
	MTZ DE LA TORRE	30	.28657	.097779	.017852	.25006	.32308	.077	.478
	VERACRUZ	20	.36090	.064854	.014502	.33055	.39125	.248	.512
	COATZACOALCOS	55	.21822	.054547	.007355	.20347	.23296	.118	.377
	COSOLEACAQUE	30	.60457	.058750	.010726	.58263	.62650	.513	.762
	Total	389	.30915	.125713	.006374	.29662	.32168	.077	.762
GST	NEW ORLEANS	86	.02776	.012292	.001326	.02512	.03039	.000	.063
	PANUCO	31	.01797	.012082	.002170	.01354	.02240	-.005	.049
	TANTOYUCA	108	.06042	.023349	.002247	.05596	.06487	.021	.124
	POZA RICA	29	.08052	.034442	.006396	.06742	.09362	.032	.157
	MTZ DE LA TORRE	30	.04630	.016176	.002953	.04026	.05234	.000	.073
	VERACRUZ	20	.06615	.021583	.004826	.05605	.07625	.036	.113
	COATZACOALCOS	55	.02498	.015828	.002134	.02070	.02926	.007	.087
	COSOLEACAQUE	30	.03987	.009468	.001729	.03633	.04340	.022	.058
	Total	389	.04392	.027016	.001370	.04123	.04662	-.005	.157
IACHE	NEW ORLEANS	86	.00176	.009994	.001078	-.00039	.00390	-.026	.023
	PANUCO	31	.00152	.007724	.001387	-.00132	.00435	-.011	.024
	TANTOYUCA	108	.01103	.007498	.000721	.00960	.01246	.000	.048
	POZA RICA	29	.01238	.009283	.001724	.00885	.01591	.002	.052
	MTZ DE LA TORRE	30	.00527	.004934	.000901	.00342	.00711	-.005	.015
	VERACRUZ	20	-.00020	.007331	.001639	-.00363	.00323	-.012	.013
	COATZACOALCOS	55	.00200	.007777	.001049	-.00010	.00410	-.028	.016
	COSOLEACAQUE	30	.01660	.007180	.001311	.01392	.01928	.006	.036
	Total	389	.00645	.009664	.000490	.00549	.00742	-.028	.052

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ALFA	Between Groups	.834	7	.119	29.712	.000
	Within Groups	1.527	381	.004		
	Total	2.361	388			
BETA	Between Groups	4.468	7	.638	83.734	.000
	Within Groups	2.904	381	.008		
	Total	7.373	388			
OXI	Between Groups	3.755	7	.536	85.990	.000
	Within Groups	2.377	381	.006		
	Total	6.132	388			
GST	Between Groups	.142	7	.020	54.627	.000
	Within Groups	.141	381	.000		
	Total	.283	388			
IACHE	Between Groups	.011	7	.002	23.846	.000
	Within Groups	.025	381	.000		
	Total	.036	388			

ALFA

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
PANUCO	31	.57019			
TANTOYUCA	108	.60169	.60169		
MTZ DE LA TORRE	30	.61410	.61410	.61410	
COATZACOALCOS	55		.62796	.62796	
NEW ORLEANS	86			.65343	
POZA RICA	29				.70707
COSOLEACAQUE	30				.71627
VERACRUZ	20				.73390
Sig.		.068	.648	.147	.623

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 35.959.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

BETA

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
PANUCO	31	.68865			
COATZACOALCOS	55	.70165			
TANTOYUCA	108	.71294			
MTZ DE LA TORRE	30	.74993	.74993		
NEW ORLEANS	86		.79423		
POZA RICA	29		.80172		
VERACRUZ	20			.88280	
COSOLEACAQUE	30				1.10270
Sig.		.061	.192	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 35.959.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

OXI

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
PANUCO	31	.18739			
COATZACOALCOS	55	.21822			
MTZ DE LA TORRE	30		.28657		
NEW ORLEANS	86		.29255		
TANTOYUCA	108		.30081		
VERACRUZ	20			.36090	
POZA RICA	29			.37414	
COSOLEACAQUE	30				.60457
Sig.		.716	.995	.997	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 35.959.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

GST

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
PANUCO	31	.01797				
COATZACOALCOS	55	.02498				
NEW ORLEANS	86	.02776	.02776			
COSOLEACAQUE	30		.03987	.03987		
MTZ DE LA TORRE	30			.04630		
TANTOYUCA	108				.06042	
VERACRUZ	20				.06615	
POZA RICA	29					.08052
Sig.		.382	.136	.849	.912	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 35.959.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

IACHE

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
VERACRUZ	20	-.00020		
PANUCO	31	.00152		
NEW ORLEANS	86	.00176		
COATZACOALCOS	55	.00200		
MTZ DE LA TORRE	30	.00527	.00527	
TANTOYUCA	108		.01103	.01103
POZA RICA	29			.01238
COSOLEACAQUE	30			.01660
Sig.		.086	.057	.074

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 35.959.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Apéndice F. Comparación de medias y análisis de varianza en sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* que fueron seleccionadas con el piretroide cipermetrina

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
ALFA	NEW ORLEANS	31	.49961	.032728	.005878	.48761	.51162	.445	.575
	PANUCO	77	.72588	.110011	.012537	.70091	.75085	.517	1.060
	TANTOYUCA	86	.97783	.084451	.009107	.95972	.99593	.779	1.137
	POZA RICA	172	.79446	.277493	.021159	.75269	.83623	.439	1.247
	MTZ DE LA TORRE	84	.58598	.125851	.013731	.55866	.61329	.442	.973
	VERACRUZ	49	.86357	.189070	.027010	.80926	.91788	.574	1.131
	COATZACOALCOS	55	.81389	.070671	.009529	.79479	.83300	.630	.986
	COSOLEACAQUE	30	.38660	.331389	.060503	.26286	.51034	.039	.794
	Total	584	.75346	.245277	.010150	.73352	.77339	.039	1.247
BETA	NEW ORLEANS	31	.63448	.043198	.007759	.61864	.65033	.569	.733
	PANUCO	77	.98605	.108603	.012376	.96140	1.01070	.727	1.234
	TANTOYUCA	86	.78179	.205778	.022190	.73767	.82591	.491	1.285
	POZA RICA	172	.76769	.116247	.008864	.75019	.78518	.548	1.151
	MTZ DE LA TORRE	84	.83896	.250462	.027328	.78461	.89332	.598	1.681
	VERACRUZ	49	.74549	.090829	.012976	.71940	.77158	.602	.953
	COATZACOALCOS	55	.88447	.113987	.015370	.85366	.91529	.655	1.156
	COSOLEACAQUE	30	.55650	.479226	.087494	.37755	.73545	.039	1.217
	Total	584	.80002	.211155	.008738	.78286	.81719	.039	1.681

OXI	NEW ORLEANS	31	.16474	.045818	.008229	.14794	.18155	.095	.249
	PANUCO	77	.33194	.097103	.011066	.30990	.35397	.121	.579
	TANTOYUCA	86	.26002	.099629	.010743	.23866	.28138	.117	.611
	POZA RICA	172	.31678	.082899	.006321	.30431	.32926	.132	.606
	MTZ DE LA TORRE	84	.33670	.144250	.015739	.30540	.36801	.138	.704
	VERACRUZ	49	.23741	.055448	.007921	.22148	.25333	.119	.355
	COATZACOALCOS	55	.24138	.076187	.010273	.22079	.26198	.121	.423
	COSOLEACAQUE	30	.32180	.288732	.052715	.21399	.42961	.038	.764
	Total	584	.29171	.122187	.005056	.28178	.30164	.038	.764
GST	NEW ORLEANS	31	.01816	.011596	.002083	.01391	.02241	-.008	.051
	PANUCO	77	.05809	.053176	.006060	.04602	.07016	-.089	.186
	TANTOYUCA	86	.03362	.025991	.002803	.02804	.03919	-.013	.120
	POZA RICA	172	.04170	.040996	.003126	.03553	.04787	-.075	.200
	MTZ DE LA TORRE	84	.02255	.030696	.003349	.01589	.02921	-.014	.127
	VERACRUZ	49	.02573	.011311	.001616	.02249	.02898	.006	.061
	COATZACOALCOS	55	.03396	.017599	.002373	.02921	.03872	.010	.084
	COSOLEACAQUE	30	.05990	.065368	.011934	.03549	.08431	.000	.196
	Total	584	.03753	.038821	.001606	.03438	.04069	-.089	.200
IACHE	NEW ORLEANS	31	-.00023	.006717	.001206	-.00269	.00224	-.013	.022
	PANUCO	77	.00305	.018388	.002095	-.00112	.00723	-.064	.072
	TANTOYUCA	86	.00700	.006365	.000686	.00564	.00836	-.008	.025
	POZA RICA	172	.00583	.010125	.000772	.00430	.00735	-.014	.062
	MTZ DE LA TORRE	84	-.00208	.010450	.001140	-.00435	.00018	-.041	.036
	VERACRUZ	49	.00680	.011396	.001628	.00352	.01007	-.037	.059
	COATZACOALCOS	55	.00480	.006539	.000882	.00303	.00657	-.007	.023
	COSOLEACAQUE	30	.00467	.005719	.001044	.00253	.00680	-.002	.016
	Total	584	.00410	.011120	.000460	.00320	.00500	-.064	.072

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ALFA	Between Groups	13.863	7	1.980	53.783	.000
	Within Groups	21.210	576	.037		
	Total	35.074	583			
BETA	Between Groups	6.167	7	.881	25.595	.000
	Within Groups	19.827	576	.034		
	Total	25.994	583			
OXI	Between Groups	1.300	7	.186	14.446	.000
	Within Groups	7.404	576	.013		
	Total	8.704	583			
GST	Between Groups	.090	7	.013	9.376	.000
	Within Groups	.789	576	.001		
	Total	.879	583			
IACHE	Between Groups	.006	7	.001	6.803	.000
	Within Groups	.067	576	.000		
	Total	.072	583			

ALFA

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
COSOLEACAQUE	30	.38660				
NEW ORLEANS	31		.49961			
MTZ DE LA TORRE	84		.58598			
PANUCO	77			.72588		
POZA RICA	172			.79446	.79446	
COATZACOALCOS	55			.81389	.81389	
VERACRUZ	49				.86357	
TANTOYUCA	86					.97783
Sig.		1.000	.268	.245	.564	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 54.602.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

BETA

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
COSOLEACAQUE	30	.55650			
NEW ORLEANS	31	.63448			
VERACRUZ	49		.74549		
POZA RICA	172		.76769		
TANTOYUCA	86		.78179	.78179	
MTZ DE LA TORRE	84		.83896	.83896	
COATZACOALCOS	55			.88447	.88447
PANUCO	77				.98605
Sig.		.355	.146	.076	.083

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 54.602.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

OVI

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
NEW ORLEANS	31	.16474			
VERACRUZ	49		.23741		
COATZACOALCOS	55		.24138		
TANTOYUCA	86		.26002	.26002	
POZA RICA	172			.31678	.31678
COSOLEACAQUE	30			.32180	.32180
PANUCO	77				.33194
MTZ DE LA TORRE	84				.33670
Sig.		1.000	.968	.086	.984

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 54.602.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

GST

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
NEW ORLEANS	31	.01816		
MTZ DE LA TORRE	84	.02255	.02255	
VERACRUZ	49	.02573	.02573	
TANTOYUCA	86	.03362	.03362	
COATZACOALCOS	55	.03396	.03396	
POZA RICA	172		.04170	.04170
PANUCO	77			.05809
COSOLEACAQUE	30			.05990
Sig.		.335	.123	.169

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 54.602.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

IACHE

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MTZ DE LA TORRE	84	-.00208		
NEW ORLEANS	31	-.00023	-.00023	
PANUCO	77	.00305	.00305	.00305
COSOLEACAQUE	30		.00467	.00467
COATZACOALCOS	55		.00480	.00480
POZA RICA	172		.00583	.00583
VERACRUZ	49			.00680
TANTOYUCA	86			.00700
Sig.		.199	.067	.539

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 54.602.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Apéndice G. Comparación de medias y análisis de varianza en sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* que fueron seleccionadas con el piretroide z-cipermetrina

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
ALFA	NEW ORLEANS	33	.82430	.060657	.010559	.80279	.84581	.706	.940
	PANUCO	28	.88150	.076182	.014397	.85196	.91104	.746	.998
	TANTOYUCA	49	.86073	.072237	.010320	.83999	.88148	.704	1.079
	POZA RICA	48	.99692	.101039	.014584	.96758	1.02626	.813	1.244
	MTZ DE LA TORRE	83	1.06336	.272986	.029964	1.00375	1.12297	.568	1.648
	VERACRUZ	43	.92926	.076688	.011695	.90565	.95286	.824	1.315
	COATZACOALCOS	83	.77294	.053548	.005878	.76125	.78463	.640	.894
	COSOLEACAQUE	23	.55417	.033264	.006936	.53979	.56856	.502	.654
	Total	390	.88982	.194058	.009826	.87050	.90914	.502	1.648
BETA	NEW ORLEANS	33	.99203	.073224	.012747	.96607	1.01799	.753	1.117
	PANUCO	28	1.20668	.214809	.040595	1.12338	1.28997	.898	1.527
	TANTOYUCA	49	1.13651	.078197	.011171	1.11405	1.15897	1.014	1.391
	POZA RICA	48	1.34833	.116814	.016861	1.31441	1.38225	1.229	1.794
	MTZ DE LA TORRE	83	1.26899	.219335	.024075	1.22109	1.31688	.675	1.670
	VERACRUZ	43	1.56821	.316282	.048233	1.47087	1.66555	1.198	2.222
	COATZACOALCOS	83	1.07017	.150370	.016505	1.03733	1.10300	.755	1.328
	COSOLEACAQUE	23	.77522	.080164	.016715	.74055	.80988	.632	.982
	Total	390	1.19576	.263179	.013327	1.16956	1.22196	.632	2.222

OXI	NEW ORLEANS	33	.24821	.114870	.019996	.20748	.28894	.084	.515
	PANUCO	28	.36511	.151912	.028709	.30620	.42401	.135	.793
	TANTOYUCA	49	.33410	.204428	.029204	.27538	.39282	.077	.858
	POZA RICA	48	.33798	.208767	.030133	.27736	.39860	.116	1.237
	MTZ DE LA TORRE	83	.24299	.178788	.019625	.20395	.28203	.079	.842
	VERACRUZ	43	.35335	.198543	.030277	.29225	.41445	.098	1.081
	COATZACOALCOS	82	.40170	.169219	.018687	.36451	.43888	.102	.871
	COSOLEACAQUE	23	.33378	.061732	.012872	.30709	.36048	.232	.474
	Total	389	.32644	.183800	.009319	.30812	.34476	.077	1.237
GST	NEW ORLEANS	33	.02836	.008223	.001431	.02545	.03128	.016	.049
	PANUCO	28	.04243	.021244	.004015	.03419	.05067	.019	.105
	TANTOYUCA	49	.04720	.024394	.003485	.04020	.05421	.013	.127
	POZA RICA	48	.01975	.065309	.009427	.00079	.03871	-.231	.196
	MTZ DE LA TORRE	83	.02193	.060630	.006655	.00869	.03517	-.158	.204
	VERACRUZ	43	.04328	.022229	.003390	.03644	.05012	.014	.121
	COATZACOALCOS	83	.04740	.020299	.002228	.04297	.05183	.009	.111
	COSOLEACAQUE	23	.03978	.021084	.004396	.03067	.04890	.019	.092
	Total	390	.03568	.041216	.002087	.03158	.03978	-.231	.204
IACHE	NEW ORLEANS	33	.00345	.003474	.000605	.00222	.00469	-.002	.013
	PANUCO	28	-.00586	.005791	.001094	-.00810	-.00361	-.025	.008
	TANTOYUCA	49	.00608	.005571	.000796	.00448	.00768	-.009	.023
	POZA RICA	48	.00877	.009755	.001408	.00594	.01160	-.006	.061
	MTZ DE LA TORRE	83	.00269	.018079	.001984	-.00126	.00663	-.106	.034
	VERACRUZ	43	.00214	.004086	.000623	.00088	.00340	-.013	.016
	COATZACOALCOS	83	.00312	.004888	.000536	.00205	.00419	-.016	.020
	COSOLEACAQUE	23	.00504	.008808	.001837	.00123	.00885	-.005	.033
	Total	390	.00348	.010481	.000531	.00244	.00453	-.106	.061

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ALFA	Between Groups	7.027	7	1.004	50.313	.000
	Within Groups	7.622	382	.020		
	Total	14.649	389			
BETA	Between Groups	14.449	7	2.064	63.111	.000
	Within Groups	12.494	382	.033		
	Total	26.943	389			
OXI	Between Groups	1.328	7	.190	6.136	.000
	Within Groups	11.780	381	.031		
	Total	13.108	388			
GST	Between Groups	.052	7	.007	4.631	.000
	Within Groups	.609	382	.002		
	Total	.661	389			
IACHE	Between Groups	.004	7	.001	6.126	.000
	Within Groups	.038	382	.000		
	Total	.043	389			

ALFA

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
COSOLEACAQUE	23	.55417					
COATZACOALCOS	83		.77294				
NEW ORLEANS	33		.82430	.82430			
TANTOYUCA	49		.86073	.86073	.86073		
PANUCO	28			.88150	.88150		
VERACRUZ	43				.92926	.92926	
POZA RICA	48					.99692	.99692
MTZ DE LA TORRE	83						1.06336
Sig.		1.000	.100	.607	.366	.383	.408

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 40.386.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

BETA

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
COSOLEACAQUE	23	.77522						
NEW ORLEANS	33		.99203					
COATZACOALCOS	83		1.07017	1.07017				
TANTOYUCA	49			1.13651	1.13651			
PANUCO	28				1.20668	1.20668		
MTZ DE LA TORRE	83					1.26899	1.26899	
POZA RICA	48						1.34833	
VERACRUZ	43							1.56821
Sig.		1.000	.523	.720	.659	.781	.503	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 40.386.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

OXI

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MTZ DE LA TORRE	83	.24299		
NEW ORLEANS	33	.24821	.24821	
COSOLEACAQUE	23	.33378	.33378	.33378
TANTOYUCA	49	.33410	.33410	.33410
POZA RICA	48	.33798	.33798	.33798
VERACRUZ	43	.35335	.35335	.35335
PANUCO	28		.36511	.36511
COATZACOALCOS	82			.40170
Sig.		.093	.060	.664

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 40.356.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

GST

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
POZA RICA	48	.01975	
MTZ DE LA TORRE	83	.02193	.02193
NEW ORLEANS	33	.02836	.02836
COSOLEACAQUE	23	.03978	.03978
PANUCO	28	.04243	.04243
VERACRUZ	43	.04328	.04328
TANTOYUCA	49		.04720
COATZACOALCOS	83		.04740
Sig.		.142	.083

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 40.386.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
PANUCO	28	-0.00586	
VERACRUZ	43		.00214
MTZ DE LA TORRE	83		.00269
COATZACOALCOS	83		.00312
NEW ORLEANS	33		.00345
COSOLEACAQUE	23		.00504
TANTOYUCA	49		.00608
POZA RICA	48		.00877
Sig.		1.000	.062

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 40.386.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Apéndice H. Comparación de medias y análisis de varianza en sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* que fueron seleccionadas con el piretroide alfa-cipermetrina

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
						ALFA	NEW ORLEANS		
	PANUCO	21	.53695	.033791	.007374	.52157	.55233	.473	.621
	TANTOYUCA	30	.57410	.075351	.013757	.54596	.60224	.471	.859
	POZA RICA	59	.65285	.107470	.013991	.62484	.68085	.446	.926
	MTZ DE LA TORRE	22	.57973	.053694	.011448	.55592	.60353	.494	.734
	VERACRUZ	46	.74893	.090532	.013348	.72205	.77582	.577	.943
	COATZACOALCOS	57	.73268	.068890	.009125	.71441	.75096	.623	.951
	COSOLEACAQUE	68	.51828	.041342	.005013	.50827	.52829	.430	.617
	Total	344	.62658	.111818	.006029	.61472	.63843	.430	.951
BETA	NEW ORLEANS	41	.77802	.118752	.018546	.74054	.81551	.568	1.065
	PANUCO	21	.69414	.087826	.019165	.65417	.73412	.559	.878
	TANTOYUCA	30	.67723	.069496	.012688	.65128	.70318	.555	.883
	POZA RICA	59	.78449	.139521	.018164	.74813	.82085	.600	1.075
	MTZ DE LA TORRE	22	.86968	.079532	.016956	.83442	.90494	.721	1.024
	VERACRUZ	46	.97139	.083763	.012350	.94652	.99627	.842	1.178
	COATZACOALCOS	57	.96221	.119241	.015794	.93057	.99385	.826	1.412
	COSOLEACAQUE	68	.66896	.060680	.007358	.65427	.68364	.541	.840
	Total	344	.80590	.155689	.008394	.78939	.82241	.541	1.412

OXI	NEW ORLEANS	41	.32837	.124055	.019374	.28921	.36752	.093	.596
	PANUCO	21	.16671	.042079	.009182	.14756	.18587	.098	.280
	TANTOYUCA	30	.22733	.127250	.023233	.17982	.27485	.093	.561
	POZA RICA	59	.26119	.131217	.017083	.22699	.29538	.116	.606
	MTZ DE LA TORRE	22	.22136	.072737	.015508	.18911	.25361	.087	.367
	VERACRUZ	46	.28324	.117658	.017348	.24830	.31818	.098	.570
	COATZACOALCOS	57	.29758	.198335	.026270	.24495	.35020	.082	1.018
	COSOLEACAQUE	68	.26353	.061696	.007482	.24860	.27846	.066	.422
	Total	344	.26737	.130462	.007034	.25353	.28120	.066	1.018
GST	NEW ORLEANS	41	.04285	.054213	.008467	.02574	.05997	.007	.199
	PANUCO	21	.02062	.018459	.004028	.01222	.02902	.004	.087
	TANTOYUCA	30	-.00273	.008233	.001503	-.00581	.00034	-.015	.026
	POZA RICA	59	.00134	.008454	.001101	-.00086	.00354	-.027	.029
	MTZ DE LA TORRE	22	.00050	.003502	.000747	-.00105	.00205	-.007	.006
	VERACRUZ	46	.00583	.005960	.000879	.00406	.00760	-.019	.020
	COATZACOALCOS	57	.00558	.005189	.000687	.00420	.00696	.000	.030
	COSOLEACAQUE	68	.00726	.011869	.001439	.00439	.01014	-.026	.045
	Total	344	.00953	.024360	.001313	.00695	.01211	-.027	.199
IACHE	NEW ORLEANS	41	.00217	.006477	.001011	.00013	.00421	-.009	.026
	PANUCO	21	.00181	.004400	.000960	-.00019	.00381	-.002	.018
	TANTOYUCA	30	.02377	.081651	.014907	-.00672	.05426	-.179	.242
	POZA RICA	59	.03578	.024545	.003195	.02938	.04218	.003	.131
	MTZ DE LA TORRE	22	.03186	.029321	.006251	.01886	.04486	.005	.123
	VERACRUZ	46	.03152	.020394	.003007	.02547	.03758	.005	.078
	COATZACOALCOS	57	-.02433	.068677	.009097	-.04256	-.00611	-.162	.176
	COSOLEACAQUE	68	.04418	.025428	.003084	.03802	.05033	.015	.138
	Total	344	.01953	.047398	.002556	.01451	.02456	-.179	.242

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ALFA	Between Groups	2.514	7	.359	68.026	.000
	Within Groups	1.774	336	.005		
	Total	4.289	343			
BETA	Between Groups	4.835	7	.691	66.711	.000
	Within Groups	3.479	336	.010		
	Total	8.314	343			
OXI	Between Groups	.527	7	.075	4.761	.000
	Within Groups	5.311	336	.016		
	Total	5.838	343			
GST	Between Groups	.060	7	.009	20.181	.000
	Within Groups	.143	336	.000		
	Total	.204	343			
IACHE	Between Groups	.196	7	.028	16.374	.000
	Within Groups	.575	336	.002		
	Total	.771	343			

ALFA

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
COSOLEACAQUE	68	.51828				
PANUCO	21	.53695	.53695			
TANTOYUCA	30		.57410	.57410		
MARTINEZ DE LA TORRE	22		.57973	.57973		
NEW ORLEANS	41			.59302		
POZA RICA	59				.65285	
COATZACOALCOS	57					.73268
VERACRUZ	46					.74893
Sig.		.958	.199	.955	1.000	.981

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 36.079.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

BETA

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
COSOLEACAQUE	68	.66896			
TANTOYUCA	30	.67723			
PANUCO	21	.69414			
NEW ORLEANS	41		.77802		
POZA RICA	59		.78449		
MARTINEZ DE LA TORRE	22			.86968	
COATZACOALCOS	57				.96221
VERACRUZ	46				.97139
Sig.		.966	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 36.079.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

OXI

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
PANUCO	21	.16671		
MARTINEZ DE LA TORRE	22	.22136	.22136	
TANTOYUCA	30	.22733	.22733	
POZA RICA	59		.26119	.26119
COSOLEACAQUE	68		.26353	.26353
VERACRUZ	46		.28324	.28324
COATZACOALCOS	57		.29758	.29758
NEW ORLEANS	41			.32837
Sig.		.451	.169	.314

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 36.079.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used.

Type I error levels are not guaranteed.

GST

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
TANTOYUCA	30	-.00273		
MARTINEZ DE LA TORRE	22	.00050		
POZA RICA	59	.00134		
COATZACOALCOS	57	.00558		
VERACRUZ	46	.00583	.00583	
COSOLEACAQUE	68	.00726	.00726	
PANUCO	21		.02062	
NEW ORLEANS	41			.04285
Sig.		.446	.051	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 36.079.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used.

Type I error levels are not guaranteed.

IACHE

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
COATZACOALCOS	57	-.02433			
PANUCO	21	.00181	.00181		
NEW ORLEANS	41	.00217	.00217	.00217	
TANTOYUCA	30		.02377	.02377	.02377
VERACRUZ	46			.03152	.03152
MARTINEZ DE LA TORRE	22			.03186	.03186
POZA RICA	59				.03578
COSOLEACAQUE	68				.04418
Sig.		.120	.322	.050	.419

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 36.079.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Apéndice I. Comparación de medias y análisis de varianza en sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* que fueron seleccionadas con el piretroide lambdacialotrina

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
ALFA								
NEW ORLEANS	22	.66495	.045347	.009668	.64485	.68506	.547	.748
PANUCO	20	.78330	.070204	.015698	.75044	.81616	.626	.874
TANTOYUCA	23	.63626	.033563	.006998	.62175	.65077	.581	.691
POZA RICA	135	.62618	.099073	.008527	.60931	.64304	.504	1.030
MTZ DE LA TORRE	30	.70817	.079745	.014559	.67839	.73794	.581	.854
VERACRUZ	59	.76773	.112916	.014700	.73830	.79715	.582	.998
COATZACOALCOS	107	.51328	.050527	.004885	.50360	.52296	.384	.653
COSOLEACAQUE	48	.63773	.102312	.014767	.60802	.66744	.448	.889
Total	444	.63409	.120372	.005713	.62286	.64532	.384	1.030
BETA								
NEW ORLEANS	22	.60495	.043459	.009266	.58569	.62422	.536	.702
PANUCO	20	.93510	.127820	.028581	.87528	.99492	.679	1.087
TANTOYUCA	23	.73470	.076962	.016048	.70141	.76798	.596	.932
POZA RICA	135	.78236	.115676	.009956	.76267	.80205	.567	1.147
MTZ DE LA TORRE	30	.98810	.152856	.027908	.93102	1.04518	.751	1.498
VERACRUZ	59	.89212	.185517	.024152	.84377	.94046	.621	1.440
COATZACOALCOS	107	.69007	.124426	.012029	.66623	.71392	.403	1.050
COSOLEACAQUE	48	.75017	.092434	.013342	.72333	.77701	.619	1.048
Total	444	.78075	.158588	.007526	.76596	.79554	.403	1.498

OXI	NEW ORLEANS	22	.37550	.142885	.030463	.31215	.43885	.132	.883
	PANUCO	20	.53110	.168972	.037783	.45202	.61018	.199	.756
	TANTOYUCA	23	.23878	.040318	.008407	.22135	.25622	.173	.315
	POZA RICA	135	.39944	.154120	.013265	.37320	.42567	.137	.822
	MTZ DE LA TORRE	30	.84817	.114188	.020848	.80553	.89081	.666	1.176
	VERACRUZ	59	.70432	.292225	.038044	.62817	.78048	.243	1.440
	COATZACOALCOS	107	.43670	.128843	.012456	.41201	.46140	.234	1.010
	COSOLEACAQUE	48	.50023	.145055	.020937	.45811	.54235	.075	.947
	Total	444	.48657	.222913	.010579	.46578	.50736	.075	1.440
GST	NEW ORLEANS	22	-.02714	.040706	.008679	-.04518	-.00909	-.099	.038
	PANUCO	20	.03565	.011513	.002574	.03026	.04104	.016	.064
	TANTOYUCA	23	-.19422	.030372	.006333	-.20735	-.18108	-.225	-.074
	POZA RICA	135	.03444	.069690	.005998	.02257	.04630	-.253	.129
	MTZ DE LA TORRE	30	.08800	.037234	.006798	.07410	.10190	.037	.207
	VERACRUZ	59	.04783	.034004	.004427	.03897	.05669	-.023	.120
	COATZACOALCOS	107	.00969	.052459	.005071	-.00036	.01975	-.141	.134
	COSOLEACAQUE	48	.00123	.068642	.009908	-.01870	.02116	-.136	.107
	Total	444	.01544	.077629	.003684	.00820	.02268	-.253	.207
IACHE	NEW ORLEANS	22	.00655	.005587	.001191	.00407	.00902	.000	.026
	PANUCO	20	.01340	.014372	.003214	.00667	.02013	-.006	.068
	TANTOYUCA	23	.00539	.005590	.001166	.00297	.00781	-.003	.023
	POZA RICA	135	.01303	.026649	.002294	.00849	.01757	-.128	.195
	MTZ DE LA TORRE	30	.00973	.004242	.000774	.00815	.01132	.000	.018
	VERACRUZ	59	.01075	.008021	.001044	.00866	.01284	.000	.036
	COATZACOALCOS	107	.02012	.026800	.002591	.01498	.02526	-.020	.084
	COSOLEACAQUE	48	.00871	.007406	.001069	.00656	.01086	.000	.035
	Total	444	.01305	.020850	.000989	.01110	.01499	-.128	.195

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ALFA	Between Groups	3.255	7	.465	64.097	.000
	Within Groups	3.163	436	.007		
	Total	6.419	443			
BETA	Between Groups	4.152	7	.593	36.996	.000
	Within Groups	6.990	436	.016		
	Total	11.142	443			
OXI	Between Groups	9.743	7	1.392	49.462	.000
	Within Groups	12.270	436	.028		
	Total	22.013	443			
GST	Between Groups	1.341	7	.192	62.849	.000
	Within Groups	1.329	436	.003		
	Total	2.670	443			
IACHE	Between Groups	.009	7	.001	3.118	.003
	Within Groups	.183	436	.000		
	Total	.193	443			

ALFA

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
COATZACOALCOS	107	.51328				
POZA RICA	135		.62618			
TANTOYUCA	23		.63626			
COSOLEACAQUE	48		.63773			
NEW ORLEANS	22		.66495	.66495		
MTZ DE LA TORRE	30			.70817	.70817	
VERACRUZ	59				.76773	.76773
PANUCO	20					.78330
Sig.		1.000	.543	.397	.068	.995

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 35.273.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

BETA

ID	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
NEW ORLEANS	22	.60495				
COATZACOALCOS	107	.69007	.69007			
TANTOYUCA	23		.73470	.73470		
COSOLEACAQUE	48		.75017	.75017		
POZA RICA	135			.78236		
VERACRUZ	59				.89212	
PANUCO	20				.93510	.93510
MTZ DE LA TORRE	30					.98810
Sig.		.092	.488	.762	.845	.649

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 35.273.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

OXI

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
TANTOYUCA	23	.23878					
NEW ORLEANS	22		.37550				
POZA RICA	135		.39944	.39944			
COATZACOALCOS	107		.43670	.43670	.43670		
COSOLEACAQUE	48			.50023	.50023		
PANUCO	20				.53110		
VERACRUZ	59					.70432	
MTZ DE LA TORRE	30						.84817
Sig.		1.000	.790	.188	.262	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 35.273.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

GST

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
TANTOYUCA	23	-.19422				
NEW ORLEANS	22		-.02714			
COSOLEACAQUE	48		.00123	.00123		
COATZACOALCOS	107		.00969	.00969	.00969	
POZA RICA	135			.03444	.03444	
PANUCO	20			.03565	.03565	
VERACRUZ	59				.04783	
MTZ DE LA TORRE	30					.08800
Sig.		1.000	.097	.152	.075	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 35.273.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

IACHE

Tukey HSD^{a,b}

ID	N	Subset for alpha =
		0.05
TANTOYUCA	23	.00539
NEW ORLEANS	22	.00655
COSOLEACAQUE	48	.00871
MTZ DE LA TORRE	30	.00973
VERACRUZ	59	.01075
POZA RICA	135	.01303
PANUCO	20	.01340
COATZACOALCOS	107	.02012
Sig.		.054

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 35.273.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Apéndice J. Comparación de medias y análisis de varianza en sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* que fueron seleccionadas con el piretroide bifentrina

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
ALFA	NEW ORLEANS	80	.75464	.067003	.007491	.73973	.76955	.641	.911
	PANUCO	30	.73883	.073419	.013404	.71142	.76625	.590	.889
	TANTOYUCA	20	.86750	.061742	.013806	.83860	.89640	.742	.992
	POZA RICA	138	.66296	.064256	.005470	.65215	.67378	.551	1.000
	MTZ DE LA TORRE	52	.57925	.081251	.011268	.55663	.60187	.440	.717
	VERACRUZ	43	.88891	.093580	.014271	.86011	.91771	.694	1.108
	COATZACOALCOS	45	.95400	.211486	.031526	.89046	1.01754	.606	1.361
	COSOLEACAQUE	63	.91373	.265422	.033440	.84688	.98058	.618	1.416
	Total	471	.76479	.180547	.008319	.74844	.78113	.440	1.416
BETA	NEW ORLEANS	80	1.09633	.151283	.016914	1.06266	1.12999	.839	1.582
	PANUCO	30	1.08327	.099115	.018096	1.04626	1.12028	.910	1.336
	TANTOYUCA	20	1.29575	.082711	.018495	1.25704	1.33446	1.211	1.533
	POZA RICA	138	.73051	.120394	.010249	.71025	.75078	.535	1.134
	MTZ DE LA TORRE	52	.72633	.096001	.013313	.69960	.75305	.561	.901
	VERACRUZ	43	1.19337	.166606	.025407	1.14210	1.24465	.888	1.620
	COATZACOALCOS	45	1.00011	.062305	.009288	.98139	1.01883	.854	1.135
	COSOLEACAQUE	63	.88968	.114409	.014414	.86087	.91850	.673	1.129
	Total	471	.92796	.223003	.010275	.90777	.94815	.535	1.620

OXI	NEW ORLEANS	80	.38056	.111166	.012429	.35582	.40530	.183	.621
	PANUCO	30	.43990	.187060	.034152	.37005	.50975	.136	.972
	TANTOYUCA	20	.34325	.104333	.023330	.29442	.39208	.238	.599
	POZA RICA	138	.42039	.226687	.019297	.38223	.45855	.110	.984
	MTZ DE LA TORRE	52	.21258	.061406	.008515	.19548	.22967	.108	.404
	VERACRUZ	43	.33907	.061611	.009396	.32011	.35803	.179	.428
	COATZACOALCOS	45	.24358	.060312	.008991	.22546	.26170	.155	.462
	COSOLEACAQUE	63	.43108	.157834	.019885	.39133	.47083	.153	.967
	Total	471	.36576	.173143	.007978	.35009	.38144	.108	.984
GST	NEW ORLEANS	80	.03002	.054581	.006102	.01788	.04217	-.300	.091
	PANUCO	30	.40433	.061667	.011259	.38131	.42736	.331	.633
	TANTOYUCA	20	.07680	.041849	.009358	.05721	.09639	-.036	.138
	POZA RICA	138	.05896	.052768	.004492	.05008	.06785	-.062	.172
	MTZ DE LA TORRE	52	.02383	.007740	.001073	.02167	.02598	.004	.041
	VERACRUZ	43	.10993	.042080	.006417	.09698	.12288	.037	.221
	COATZACOALCOS	45	.03133	.009982	.001488	.02833	.03433	.012	.055
	COSOLEACAQUE	63	.03837	.043593	.005492	.02739	.04934	-.046	.160
	Total	471	.07218	.100704	.004640	.06306	.08130	-.300	.633
IACHE	NEW ORLEANS	80	.02289	.062683	.007008	.00894	.03684	-.146	.124
	PANUCO	30	.08563	.025624	.004678	.07607	.09520	.056	.159
	TANTOYUCA	20	.00950	.012050	.002695	.00386	.01514	-.006	.040
	POZA RICA	138	-.04835	.090159	.007675	-.06352	-.03317	-.285	.098
	MTZ DE LA TORRE	52	.00806	.004709	.000653	.00675	.00937	.000	.023
	VERACRUZ	43	.05970	.060597	.009241	.04105	.07835	-.057	.154
	COATZACOALCOS	45	.00771	.008683	.001294	.00510	.01032	-.011	.036
	COSOLEACAQUE	63	-.08594	.095858	.012077	-.11008	-.06179	-.294	.036
	Total	471	-.00884	.084403	.003889	-.01648	-.00120	-.294	.159

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
alfa	Between Groups	7.131	7	1.019	57.598	.000
	Within Groups	8.189	463	.018		
	Total	15.321	470			
beta	Between Groups	16.546	7	2.364	160.311	.000
	Within Groups	6.827	463	.015		
	Total	23.373	470			
oxi	Between Groups	2.796	7	.399	16.373	.000
	Within Groups	11.294	463	.024		
	Total	14.090	470			
gst	Between Groups	3.806	7	.544	262.257	.000
	Within Groups	.960	463	.002		
	Total	4.766	470			
iache	Between Groups	1.174	7	.168	35.716	.000
	Within Groups	2.174	463	.005		
	Total	3.348	470			

alfa

Tukey HSD^{a,b}

id	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
MTZ DE LA TORRE	52	.57925			
POZA RICA	138	.66296	.66296		
PANUCO	30		.73883	.73883	
NEW ORLEANS	80			.75464	
TANTOYUCA	20				.86750
VERACRUZ	43				.88891
COSOLEACAQUE	63				.91373
COATZACOALCOS	45				.95400
Sig.		.068	.137	.999	.051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 43.558.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

beta

Tukey HSD^{a,b}

id	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
MTZ DE LA TORRE	52	.72633					
POZA RICA	138	.73051					
COSOLEACAQUE	63		.88968				
COATZACOALCOS	45			1.00011			
PANUCO	30				1.08327		
NEW ORLEANS	80				1.09633		
VERACRUZ	43					1.19337	
TANTOYUCA	20						1.29575
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 43.558.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

oxi

Tukey HSD^{a,b}

id	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
MTZ DE LA TORRE	52	.21258		
COATZACOALCOS	45	.24358	.24358	
VERACRUZ	43		.33907	.33907
TANTOYUCA	20		.34325	.34325
NEW ORLEANS	80			.38056
POZA RICA	138			.42039
COSOLEACAQUE	63			.43108
PANUCO	30			.43990
Sig.		.983	.060	.055

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 43.558.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

gst

Tukey HSD^{a,b}

id	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
MTZ DE LA TORRE	52	.02383				
NEW ORLEANS	80	.03002	.03002			
COATZACOALCOS	45	.03133	.03133			
COSOLEACAQUE	63	.03837	.03837			
POZA RICA	138		.05896	.05896		
TANTOYUCA	20			.07680		
VERACRUZ	43				.10993	
PANUCO	30					.40433
Sig.		.813	.063	.601	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 43.558.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

iache

Tukey HSD^{a,b}

id	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
COSOLEACAQUE	63	-.08594			
POZA RICA	138	-.04835			
COATZACOALCOS	45		.00771		
MTZ DE LA TORRE	52		.00806		
TANTOYUCA	20		.00950		
NEW ORLEANS	80		.02289	.02289	
VERACRUZ	43			.05970	.05970
PANUCO	30				.08563
Sig.		.174	.969	.195	.643

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 43.558.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Apéndice K. Comparación de medias y análisis de varianza en sub-poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* que no fueron seleccionadas con piretroides

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
						ALFA	NEW ORLEANS		
	PANUCO	60	.70943	.053934	.006963	.69550	.72337	.564	.838
	TANTOYUCA	60	.67560	.090500	.011683	.65222	.69898	.530	.926
	POZA RICA	60	.87373	.078139	.010088	.85355	.89392	.688	1.073
	MTZ DE LA TORRE	60	.66725	.061146	.007894	.65145	.68305	.570	.852
	VERACRUZ	60	.77195	.070608	.009115	.75371	.79019	.515	.887
	COATZACOALCOS	60	.87373	.078139	.010088	.85355	.89392	.688	1.073
	COSOLEACAQUE	60	.77195	.070608	.009115	.75371	.79019	.515	.887
	Total	480	.70105	.200130	.009135	.68310	.71900	.087	1.073
BETA	NEW ORLEANS	60	.36680	.026781	.003457	.35988	.37372	.327	.437
	PANUCO	60	.87330	.071700	.009256	.85478	.89182	.697	1.100
	TANTOYUCA	60	.83257	.175526	.022660	.78722	.87791	.555	1.251
	POZA RICA	60	1.17190	.110975	.014327	1.14323	1.20057	1.017	1.440
	MTZ DE LA TORRE	60	.82718	.088691	.011450	.80427	.85009	.700	1.103
	VERACRUZ	60	1.00008	.074684	.009642	.98079	1.01938	.848	1.262
	COATZACOALCOS	60	1.17190	.110975	.014327	1.14323	1.20057	1.017	1.440
	COSOLEACAQUE	60	1.00008	.074684	.009642	.98079	1.01938	.848	1.262
	Total	480	.90548	.260439	.011887	.88212	.92883	.327	1.440

OXI	NEW ORLEANS	60	.18493	.058197	.007513	.16990	.19997	.069	.326
	PANUCO	60	.31615	.094507	.012201	.29174	.34056	.146	.623
	TANTOYUCA	60	.17773	.135904	.017545	.14263	.21284	.063	1.061
	POZA RICA	60	.20165	.044616	.005760	.19012	.21318	.120	.309
	MTZ DE LA TORRE	60	.28853	.107750	.013911	.26070	.31637	.128	.664
	VERACRUZ	60	.20977	.060361	.007793	.19417	.22536	.123	.449
	COATZACOALCOS	60	.22450	.067550	.008721	.20705	.24195	.108	.385
	COSOLEACAQUE	60	.12383	.054142	.006990	.10985	.13782	.061	.380
	Total	480	.21589	.100811	.004601	.20685	.22493	.061	1.061
GST	NEW ORLEANS	60	.02460	.013961	.001802	.02099	.02821	-.003	.099
	PANUCO	60	.01220	.008791	.001135	.00993	.01447	-.004	.056
	TANTOYUCA	60	.02083	.013833	.001786	.01726	.02441	-.014	.056
	POZA RICA	60	.11613	.032994	.004260	.10761	.12466	.067	.196
	MTZ DE LA TORRE	60	.07588	.029919	.003863	.06815	.08361	.040	.183
	VERACRUZ	60	.07287	.076939	.009933	.05299	.09274	.000	.206
	COATZACOALCOS	60	.08048	.029277	.003780	.07292	.08805	.037	.167
	COSOLEACAQUE	60	.03608	.010774	.001391	.03330	.03887	.020	.087
	Total	480	.05489	.048278	.002204	.05056	.05922	-.014	.206
IACHE	NEW ORLEANS	60	.00928	.006476	.000836	.00761	.01096	.000	.030
	PANUCO	60	.09608	.025548	.003298	.08948	.10268	.054	.165
	TANTOYUCA	60	.01828	.029248	.003776	.01073	.02584	-.018	.117
	POZA RICA	60	.00802	.008012	.001034	.00595	.01009	-.014	.041
	MTZ DE LA TORRE	60	.00830	.006176	.000797	.00670	.00990	-.004	.035
	VERACRUZ	60	.00868	.007637	.000986	.00671	.01066	-.019	.033
	COATZACOALCOS	60	.01090	.022989	.002968	.00496	.01684	-.070	.106
	COSOLEACAQUE	60	.00458	.005318	.000687	.00321	.00596	-.013	.019
	Total	480	.02052	.033320	.001521	.01753	.02350	-.070	.165

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ALFA	Between Groups	15.715	7	2.245	305.344	.000
	Within Groups	3.470	472	.007		
	Total	19.185	479			
BETA	Between Groups	27.751	7	3.964	394.866	.000
	Within Groups	4.739	472	.010		
	Total	32.490	479			
OXI	Between Groups	1.592	7	.227	32.765	.000
	Within Groups	3.276	472	.007		
	Total	4.868	479			
GST	Between Groups	.565	7	.081	69.180	.000
	Within Groups	.551	472	.001		
	Total	1.116	479			
IACHE	Between Groups	.398	7	.057	200.601	.000
	Within Groups	.134	472	.000		
	Total	.532	479			

ALFA

Tukey HSD^a

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
NO	60	.26475			
MARTINEZ DE LA TORRE	60		.66725		
TANTOYUCA	60		.67560		
PANUCO	60		.70943		
VERACRUZ	60			.77195	
COSOLEACAQUE	60			.77195	
POZA RICA	60				.87373
COATZACOALCOS	60				.87373
Sig.		1.000	.127	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

BETA

Tukey HSD^a

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
NO	60	.36680			
MARTINEZ DE LA TORRE	60		.82718		
TANTOYUCA	60		.83257		
PANUCO	60		.87330		
VERACRUZ	60			1.00008	
COSOLEACAQUE	60			1.00008	
POZA RICA	60				1.17190
COATZACOALCOS	60				1.17190
Sig.		1.000	.189	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

OXI

Tukey HSD^a

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
COSOLEACAQUE	60	.12383			
TANTOYUCA	60		.17773		
NO	60		.18493	.18493	
POZA RICA	60		.20165	.20165	
VERACRUZ	60		.20977	.20977	
COATZACOALCOS	60			.22450	
MARTINEZ DE LA TORRE	60				.28853
PANUCO	60				.31615
Sig.		1.000	.413	.158	.610

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

GST

Tukey HSD^a

ID	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
PANUCO	60	.01220			
TANTOYUCA	60	.02083	.02083		
NO	60	.02460	.02460		
COSOLEACAQUE	60		.03608		
VERACRUZ	60			.07287	
MARTINEZ DE LA TORRE	60			.07588	
COATZACOALCOS	60			.08048	
POZA RICA	60				.11613
Sig.		.491	.223	.926	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

IACHE

Tukey HSD^a

ID	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
COSOLEACAQUE	60	.00458		
POZA RICA	60	.00802		
MARTINEZ DE LA TORRE	60	.00830		
VERACRUZ	60	.00868		
NO	60	.00928	.00928	
COATZACOALCOS	60	.01090	.01090	
TANTOYUCA	60		.01828	
PANUCO	60			.09608
Sig.		.446	.069	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000.

LITERATURA CITADA

- Ahmed, S., Wilkins, R. M. & Mantle, D. (1998) Comparison of proteolytic enzyme activities in adults of insecticide resistant and susceptible strains of the housefly *Musca domestica* L. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 629–639.
- Albert LA, Alpuche L, Aranda HE, Badillo F, Bárcenas PC, Chediack R, Loera GR, Pomares TG, Rendón von OJ, Viveros RA. 1990. Los plaguicidas, el ambiente y la salud. Centro de Ecodesarrollo; México. Pp. 157-173.
- Anthony N., Rocheleau T., Mocelin G., Lee Hwa-Jung, R. French-Constant. 1995. Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *FEBS Letters* 368: 461-465
- Apperson and Georghiou. 1975. Changes in Cross-Resistance Spectrum Resulting from Methyl Parathion Selection of *Culex Tarsalis* Coq. *Am J Trop Med Hyg.*; 24: 698- 703
- Ayasa P, Harrington LC, and JG. Scott. 2006. Evaluation of Novel Insecticides for Control of Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 43(1): 55-60
- Basten, C. J., B. S. Weir and Z.-B. Zeng, 2002 QTL Cartographer, pp. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Bennett KE, Flick D, Fleming KH, Jochim R, Beaty BJ, Black WC 4th. 2005. Quantitative trait loci that control dengue-2 virus dissemination in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics.* 170(1):185-94.
- Bennett KE., Olson KE, Munoz MdeL, Fernandez-Salas I. and JA. Farfan-Ale. 2002. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67: 85–92.
- Berge J.B, Feyereisen R. and M. Amichot. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B.* 353, 1701-1705
- Berticat C, Boquien G, Raymond M and C. Chevillon. 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet. Res. Camb.* 79:41-47.

- Bisset JA. 2006. Uso correcto de insecticidas: Control de la resistencia. *Revista Cubana Medicina Tropical* 54 (3): 202-219
- Black C. W., Baer F.C., Antolin M.F and N. M. DuTeau. 2001. Population genomics: Genome-Wide Sampling of Insect Populations. *Annu. Rev. Entomol.* 46:441-469.
- Black W and LM Munstermann, 1996. Molecular taxonomy and systematic of arthropod vectors, pp. 438-470, en *Biology of Disease Vectors*, editado por W.C. Marquardt y B. Beaty. University Press of Colorado, Boulder, CO.
- Black WC IV and NM DuTeau. 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. See Ref. 63a, pp. 361–73 Crampton JM, Beard CB, Louis C, eds. 1997. *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual*. London: Chapman & Hall
- Black y Severson, 2005. Genetics of Vector Competente. pp 415-447 en *Biology of Disease Vectors* (2nd ed) editado por W. C. Marquardt *et al* . Elsevier Academic Press.
- Black, W. C., and D. W. Severson, 2005. Genetics of vector competence. pp. 415–448 in *Biology of Disease Vectors*, edited by W. C. Marquardt. Elsevier Academic Press. Harcourt Academic Press, San Diego.
- Bloomquist J. R. 1999. Insecticides: Chemistries and Characteristics. E. B. Radcliffe and W. D. Hutchison Editors. Radcliffe's IPM World Textbook, URL:<http://ipmworld.umn.edu>, University of Minnesota, St. Paul, MN.
- Bloomquist J.R.. 1996. Ion Channels as Targets for Insecticides. *Ann. Rev. Entomol.* 41, 163-190.
- Bloomquist, J.R. & Miller, T.A. (1986) Sodium channel neurotoxin as probes of the knockdown resistance mechanism. *Neurotoxicology*, 7.
- Bowman D, Randy Carl Lynn, Mark L , Eberhard, Jay R Georgi. 2004. Parasitología Veterinaria de Georgi, Publicado por Elsevier España. Pp. 257-258.
- Bosio, C. F., R. E. Fulton, M. L. Salasek, B. J. Beaty and W. C. T. Black, 2000. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* 156: 687-698.
- Bourguet D., Guillemaud T, Chevillon C, and M Raymond. 2004. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution*. 58(1):128-135.

- Bregues, C., Hawkes, N.J., Chandre, F., McCarroll, L., Duchon, S., Guillet, P., Manguin, S., Morgan, J.C., Hemingway, J., 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med. Vet. Entomol.* 17, 87–94.
- Brogdon G. W., McAllister J., Corwin A. M. and C. Cordon-Rosales. 1999. Oxidase-Based DDT-Pyrthroid Cross-Resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 64:101-111.
- Brogdon GW and Janet McAllister. 1998a. Insecticide Resistance and Vector Control. *Emerging Infectious Diseases.* 4: 605-613
- Brogdon GW. 1989. Biochemical Resistance Detection: an alternative to bioassay. *Parasitology Today.* 5(1):56-60
- Brogdon, W. G. & McAllister, J. C. (1998b) Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14, 159-164
- Brown AWA, 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2:123-140.
- Brown, AWA., and R. Pal. 1971. Insecticide resistance in arthropods. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- Callaghan A., T. Guillemaud, N. Makate and M. Raymond. 1998. Polymorphisms and Fluctuations in copy number of amplified esterase genes in *Culex pipiens* mosquitoes. *Insect Molecular Biology* 7(3), 295-300
- Casida J, and G. Quistad. 1998 Golden Age of Insecticide Research: Past, Present or Future ?. *Annu. Rev. Entomol.* 43:1-16
- Chandre F, Darriet F, Darder M, Cuani A and JMC Doannio. 1998. Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from West Africa. *Med. Vet. Entomol.* 12:356-366.
- Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P. 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensu lato*. *Bull World Health Organ*, 77:230-234.
- Coleman M., Vontas J.G. and J. Hemingway. 2002. Molecular characterization of the amplified aldehyde oxidase from insecticide resistant *Culex quinquefasciatus* *Eur. J. Biochem.* 269, 768-779.
- Curtis, CF. 1989. *Appropriate technology in vector control.* CRC Press, Boca Raton, FL.

- Darvasi, A. and Soller, M. 1995. Advanced intercross lines, and experimental population for fine genetic mapping. *Genetics* 141: 1199–1207.
- Ding, Y., Ortelli, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J. and Ranson, H. 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase family: annotation, phylogeny and gene expression profiles. *BMC Genomics* 13: 35.
- Eldridge BF. 2005. Mosquitoes, the Culicidae. pp 95-11 en *Biology of Disease Vectors* (2nd ed) editado por W. C. Marquardt *et al* . Elsevier Academic Press.
- Enayati A.A., Ranson H. and J. Hemingway. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*. 14(1): 3-8.
- Enayati, A.A., Vatandoost, H., Ladonni, H., Townson, H., J Hemingway. 2003. Molecular evidence for a kdr-like pyrethroid resistance mechanism in the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Med. Vet. Ent.* 17, 138–144
- Falconer, D.S. and MacKay, T.F.C. 1996. Introduction to quantitative genetics. (4th Ed.) Longham Press.
- Fernández-Salas I.1999. Biología y Control de *Aedes aegypti*. Manual de Operaciones. Editorial UANL. ISBN 968 7808 88 8, Monterrey, Mexico.
- Feyereisen R, Anderson JF, Carino FA, Cohen MB, Koener JF. 1995. Cytochrome P450 in the house fly: Structure, catalytic activity and regulation of expression of CYP6A1 in an insecticide-resistant strain. *Pestic Sci*,43: 233–239
- French-Constant, R. H. Rocheleau, T. A., Steichen, J. C., and A. E. Chalmers, 1993. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363, 449–451
- French-Constant, R. H., Steichen J. C., and F. Shotkoski, 1994. Polymerase chain reaction diagnostic for cyclodiene insecticide resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology*, 8:99-100.
- Flores Adriana E., Albeldano-Vazquez Walter, Ildelfonso Fernandez Salas, Mohammad H. Badii, Haydee Loaiza Becerra, Gustavo Ponce Garcia, Saul Lozano Fuentes, William G. Brogdon, William C. Black IV and Barry Beaty. 2005. Elevated α -esterases levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.82: 66-78.
- Flores Adriana E., Grajales JS, Fernandez-Salas I, Ponce-Garcia G, Loaiza-Becerra Ma. H, Lozano S, Brogdon WG, Black IV WC, and B. Beaty. 2006. Mechanisms Of Insecticide Resistance In Field Populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico *Journal of the American Mosquito Control Association*: Vol. 22 (4): pp. 672–677.

- Flores Adriana E., Reyes Solis Guadalupe, Fernandez-Salas I, Sanchez Ramos Francisco J. and Ponce-Garcia G. 2009. Resistance to Permethrin in *Aedes aegypti* (L.) in Northern Mexico. *Southwestern Entomologist*: Vol. 34 (2): pp. 167–177.
- Fulton R. E., Salasek M.L., DuTeau N. M. and W. C. Black IV. 2001. SSCP Analysis of cDNA Markers Provides a Dense Linkage Map of the *Aedes aegypti* Genome. *Genetics* 158: 715-726
- Georghiou, G. P., M. Wirth, H. Tran, F. Saume, and A. B., Knudsen. 1987. Potential for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* in the Caribbean area and neighbouring countries. *J. Med. Entomol.* 24: 290-0294
- Germer, S. and Higuchi, R. 1999 Single-tube genotyping without oligonucleotide probes. *Genome Research*, 9, 72-78
- Gomez-Machorro, C., K. E. Bennett, M. L. Munoz and W. C. Black, 2004. Quantitative Trait Loci Affecting Dengue Midgut Infection Barriers in an Advanced Intercross Line of *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 13: 637-648.
- Gong M, Yan Gu, X Hu, Y Sun, L Ma, X Li, L Sun, J Sun, J Qian, and C Zhu. 2005. Cloning and Overexpression of *CYP6F1*, a Cytochrome P450 Gene, from Deltamethrin-resistant *Culex pipiens pallens*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(5): 317–326
- Gordon J. 1988. Health Education Research: Mixed strategies in health education and community participation: an evaluation of dengue control in the Dominican Republic. Oxford University Press 3(4): 399-419.
- Gorrochotegui-Escalante N and W. C. Black IV. 2003. Amplifying whole insect genomes with multiple displacement amplification. *Insect Molecular Biology*. 12(2), 195–200
- Gubler DJ. 1989. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. *Am J Trop Med Hyg*;40:571-578.
- Gubler DJ. 1998 (b). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(3): 480–496.
- Gubler, D.J. & Trent, DW. 1994. Emergence of epidemic Dengue: Dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infectious Agents and Disease* 2, 383-393.
- Gubler, DJ. 1998 (a). Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 442–450.
- Guerrero, F.D., Jamroz, R.C., Kammlah, D.M., Kunz, S.E., 1997. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of *kdr* and *superkdr* point mutations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 745–755.

- Hardy, J.L., 1988 Susceptibility and resistance of vector mosquitoes, pp. 87–126 in *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, edited by T. P. Monath. CRC Press, Boca Raton, FL
- Hemingway and Ranson, 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45:371-391
- Hemingway J and H. Ranson. 2005. Chemical control of Vectors and Mechanisms of Resistance. pp 627-647 in *Biology of Disease Vectors* (2nd ed) edited by W. C. Marquardt *et al* . Elsevier Academic Press.
- Hemingway J, 1982. The biochemical nature of malathion resistance in *Anopheles stephensi* froma Pakistan. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 17, 149-155.
- Hemingway J., Coleman M., M. Paton, L. McCarroll, A. Vaughan and D. DeSilva. 2000b. Aldehyde oxidase is co-amplified with the World's most common *Culex* mosquito insecticide resistance associated esterases. *Insect Molecular Biology.* (1), 93–99
- Hemingway, J. 1983. The genetics of malathion resistance in *Anopheles stephensi* from Pakistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* 77, 106-108.
- Hemingway, J. and Karunaratne, S.H.P.P. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 12: 1–12.
- Hemingway, J., R. G. Boddington, and J. Harris. 1989. Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. *Bull. Entomol.Res.* 79: 123-130
- Hemingway, NJ Hawkes, L McCarroll, H Ranson. 2004 The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34:653-665
- Hill, W. G. & Robertson, A. (1968) Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor. Appl. Genet,* 38, 226-231
- Hudson, R. R. & Kaplan, N. L. (1985) Statistical Properties of the Number of Recombination Events in the History of a Sample of DNA-Sequences. *Genetics,* 111, 147-164
- Jeffreys AJ, Holloway JK, Kauppi L., May CA, Neumann R, Slingsby MT and A J. Webb. 2004. Meiotic recombination hot spots and human DNA diversity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 359, 141–152

- Karch S; Asidi N, Manzambi Z, Salaun J and J. Mouchet. 1995. Impact of deltamethrin-impregnated bednets on biting rates of mosquitoes in Zaire. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11(2):191-194.
- Kroeger A, Lenhart A, Ochoa M, Villegas, Alexander N, Catillo CE, Levy M and P McCall. 2006. Effective dengue vector control with insecticide treated curtains and water container covers: cluster randomized trials in Mexico and Venezuela. *British Medical Journal* 332:1247-1252
- Lander ES, Botstein D: Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 1989, 121(1):185-199.
- Lines, J.D., Myamba, J. and Curtis, C.F., 1987. Experimental hut trials of permethrin-impregnated mosquito nets and curtains against malaria vectors in Tanzania. *Med. Vet. Entomol.* 1, pp. 37–51.
- Luleyap, H.U., Alptekin, D., Kasap, H., M. Kasap. 2002. Detection of knockdown resistance mutations in *Anopheles sacharovi* (Diptera: Culicidae) and genetic distance with *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) using cDNA sequencing of the voltage-gated sodium channel gene. *J. Med. Ent.* 39, 870–874.
- Lumjuan N., McCarroll L., Prapanthadara L., Hemingway J., H. Ranson. 2005. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 861–871
- Lynd A, Ranson H, McCall P J, Randle N P, Black IV W, Walker E D and M J Donnelly. 2005. A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (*kdr*) detection in *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 4:16
- Mackay T.F.C. 2001 Quantitative Trait Loci in *Drosophila*. *Nature.* 2:11-19.
- Malcolm C. A., Bourguet D., Ascolillo A., Rooker S. J., Garvey C. F., Hall L. M. C., Pasteur N. and M. Raymond. 1998. A sex-linked Ace gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Molecular Biology* 7(2): 107-120
- Martinez-Torres D., F. Chandre, M. S. Williamson, F. Darriet, J. B. Bergé, A. L. Devonshire, P. Guillet, N. Pasteur, D. Pauron, 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* 7:179-184.
- Martinez-Torres, D., Chevillon, C., Brun-Barale, A., Berge', J.B., Pasteur, N., Pauron, D., 1999a. Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. *Pestic. Sci.* 55:1012–1020.

- Mbogo, C.N.M., Baya, N.M., Ofulla, A.V.O., Githure, J.I. and Snow, R.W., 1996. The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. *Med. Vet. Entomol.* 10, pp. 251–259.
- Ming An Shi,² Lougarre A., Alies C., Frémaux I., Tang Z. H., J. Stojan and D. Fournier. 2004. Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BMC Evolutionary Biology*, 4(5).
- Mouches, C., Pauplin, Y., Agarwal, M., Lemieux, L., Herzog, M., Abadon, M., Beyssat-Arnaouty, V., Hyrien, O., De SaintVincent, B.R., Georghiou, G.P. and N. Pasteur. 1990. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 2574–2578.
- Murray B. Isman. 2006. Botanical Insecticides, Deterrents, And Repellents In Modern Agriculture And An Increasingly Regulated World. *Annu. Rev. Entomol.* 51:45–66
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J.-M., and Fournier, D. 1994. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 5922–5926.
- Nei, M. & Miller, J. C. (1990) A Simple Method for Estimating Average Number of Nucleotide Substitutions within and between Populations from Restriction Data. *Genetics*, **125**, 873-879
- Nikou, D., Ranson, H. and J. Hemingway. 2003 An adult specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene* 318: 91–102
- Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA-2-2002 para la vigilancia epidemiologica, prevencion y control de enfermedades transmitidas por vector (D.O.F. 21 julio del 2003). Mexico.
- Norma Emergente NOM-EM-SSA2-2008 para la vigilancia epidemiologica, prevencion y control de enfermedades transmitidas por vector (D.O.F.8 septiembre del 2008). Mexico.
- Okimoto, R. & Dodgson, J. B. 1996. Improved PCR amplification of multiple specific alleles (PAMSA) using internally mismatched primers. *Biotechniques*, **21**, 20-&
- Ooijen Van, J. W., 1994. DrawMap: a computer program for drawing genetic linkage maps. *J. Hered.* 85:66
- Pedra, J.H., McIntyre, L.M., Scharf, M.E. and B.R. Pittendrigh. 2004. Genome-wide transcription profile of field- and laboratory selected dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)-resistant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7034–7039
- Picollo, Ma. I. 2006. Manejo de la Resistencia en plagas sanitarias. *Revista de la Sociedad Entomológica de Argentina*.
- Philip CB, Rozenboom LE. 1973. Medico-veterinary entomology: a generation of progress. In: Smith RF, Mittler TE, Smith CN, editors. *History of entomology*. Palo Alto (CA): Annual Reviews Inc.
- Phillips, RS. 1983. *Malaria*. Camelot Press, Southampton, United Kingdom.

- Platt KB., Linthicum KJ., Myint KS., Innis BL., Lerdthusnee K., Vaughn, DW. 1997. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *Am Jour Trop Med Hyg.* 57(2):119-25.
- Prapanthadara, L., Promtet, N., Koottathep, S., Somboon, P., Suwonkerd, W., McCarroll, L., Hemingway, J., 2002. Mechanisms of DDT and Permethrin Resistance in *Aedes aegypti* from Chiang Mai, Thailand. *Dengue Bull.* 26, 185–189.
- Ranson H, Claudianos C, Ortelli F., Abgrall C, Hemingway J, Sharvakhova M, Unger M, Collins F,H, and Rene Freyereisen. 2002. Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance. *Science* 298: 170-181
- Ranson H, Paton M. G, Jensen B, McCarroll L, Vaughan A, Hogan J. R, Hemingway J, and FH Collins. 2004. Genetic mapping of genes conferring permethrin resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 13(4), 379–386
- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J., Collins, F.H., 2000b. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol. Biol.* 9:491–497
- Ranson, H., Jensen, B., Wang, X., Prapanthadara, L., Hemingway, J., Collins, F.H., 2000a. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect. Mol. Biol.* 9, 499–507.
- Ranson, H., Prapanthadara, L., J., Hemingway. 1997. Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* 324 (1):97–102.
- Rawlins, S. C. 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Pan Am. J. Public Health* 4: 243–251.
- Raymond, M., Fournier, D., Bride, J.-M., Cuany, A., Berge, J., Magnin, M., and Pasteur, N. 1986. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Journal of Economic Entomology* 79: 1452–1458.
- Roberts, DR., *et al.* 1997. DDT, global strategies, and a malaria control crisis in South America. *Emerging Infectious Diseases* 3: 295.
- Rodríguez M, Bisset J, Ruiz M, and A Soca. 2002. Cross-Resistance to Pyrethroid and Organophosphorus Insecticides Induced by Selection with Temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J. Med. Entomol.* 39(6): 882-888 (2002)

- Rodríguez, M. M., Bisset, J. A., De Armas, Y. and F. Ramos. 2005. Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **21**, 437-445
- Rodríguez, M. M., J. Bisset, D. Molina, L. Lauzan, and Soca A. 2001. Detection of resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from Cuba and Venezuela. *J. Med. Entomol.* 38: 623-628.
- Roush R. T and J.C. Daly. 1990. The role of populations genetics in resistance research and management. pp 97-143. *Pesticide Resistance in Arthropods* editada por Roush R. T. and Tabashnik B.E. Routledge Chapman & Hall Inc. Great Britain.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496-2497.
- Scott J. A.1995. The molecular Genetics of Resistance: Resistance as a Response to Stress. *Florida Entomologist.* 78 (3): 399-414.
- Severson DW, Anthony NM, Andreev O, ffrench-Constant RH. 1997. Molecular mapping of insecticide resistance genes in the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *J. Hered.* 88:520–24
- Severson, D. W., A. Mori, Y. Zhang and B. M. Christensen, 1993. Linkage map for *Aedes aegypti* using restriction fragment length polymorphisms. *J. Hered.* 84: 241–247.
- Shafer TJ., Meyer DA., and KM. Crofton. 2005. Developmental Neurotoxicity of Pyrethroid Insecticides: Critical Review and Future Research Needs. *Environmental Health Perspectives* 113 (2): 123-136
- Sosa M.A.1992. Consideraciones generales sobre Resistencia de los insectos a los plaguicidas con especial referencia a los “piretroides”. *Publicación Miscelanea.* No 5. INTA EEA Reconquista.
- Soderlund D. and J. Bloomquist, 1990. Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance. pp58-96 en *Pesticide Resistance in Arthropods* editada por Roush R. T. and Tabashnik B.E.. Routledge Chapman & Hall Inc. Great Britain
- Soderlund D.M. and Knipple D.C., 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 563–577.
- Soderlund, D.M., and Knipple, D.C., 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 563–577.
- Stam, P., 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant Journal* 3: 739-744.

- Stam, P. and J.W. Van Ooijen, 1995. JoinMap (tm) version 2.0: Software for the calculation of genetic linkage maps. CPRO-DLO, Wageningen.
- Swofford, D. L. (1993) Paup - a Computer-Program for Phylogenetic Inference Using Maximum Parsimony. *Journal of General Physiology*, **102**, A9-A9
- Tajima, F. (1993) Simple Methods for Testing the Molecular Evolutionary Clock Hypothesis. *Genetics*, **135**, 599-607
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & T. J. Gibson. 1994 Clustal-W - Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680
- Vaughan, A., and R. H. French-Constant. 1998. Biochemical monitoring of organophosphorous and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. *Med. Vet. Entomol.* 12: 318-321.
- Vaughan, A., Rocheleau, T. and French-Constant, R. 1997. Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. *Exper Parasit* 87: 237-244.
- Villani F, Hemingway J. 1987. The detection and interaction of multiple organophosphorus and carbamate insecticide resistance genes in populations of *Culex pipiens* from Italy. *Pest Bioche Physiol.* 27:218-228
- Vontas J, David J.-P., Nikou D., Hemingway J., Christophides G. K., Louis C. and H. Ranson. 2007. Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Molecular Biology* 16(3), 315-32
- Vontas, J.G., Small, G.J. and J. Hemingway. 2001 Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J* **357**: 65-72
- Vulule, J.M., Beach, R.F., Atieli, F.K., McAllister, J.C., Brogdon, W.G., Robets, J.M., Mwangi, R.W., Hawley, W.A. (1999) Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Med Vet Ent* 13: 239-244
- Wang, J., Chuang, K., Ahluwalia, M., Patel, S., Umblas, N., Mirel, D., Higuchi, R. & Germer, S. 2005. High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with Tm-shift primers. *Biotechniques*, **39**, 885-93
- WHO, 1981. Instruction for Determining the Susceptibility or Resistance of Adult Mosquitoes to Organochlorine, Organophosphate and Carbamate Insecticide-Diagnostic Test. WHO/VBA/ 81.806, Geneva, Switzerland.

- WHO, 1997. Dengue hemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control, 2nd edition. Geneva.
- 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.
- WHO, 1998. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual). Geneva, Switzerland.
- WHO, 2002. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet No. 117. World Health Organization, Geneva.
- Williamson M.S Denhold I., Bell C. A., A. L Devonshire. 1993. Knockdown resistance (*kdr*) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene in the housefly (*Musca domestica*). Mol Gen Genet 240:17-22
- Williamson, M.S., Martinez-Torres, D., Hick, C.A., A.L., Devonshire. 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.
- Wondji CS, Morgan J, Coetzee M, Hunt RH, Steen K, Black WC IV, Hemingway J, Ranson H. 2007. Mapping a Quantitative Trait Locus (QTL) conferring pyrethroid resistance in the African malaria vector *Anopheles funestus*. BMC Genomics.; 8: 34.
- World Health Organization. 1992. *Vector resistance to pesticides*. Technical Report Series 818, Geneva.
- Zeng ZB. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*. 136(4):1457-1468
- Zheng, L., Cornel, A.J., Wang, R., Erfle, H., Voss, H., Ansorge, W., Kafatos, F.C. and Collins F.H. (1997) Quantitative trait loci for refractoriness of *Anopheles gambiae* to *Plasmodium cynomolgi* B. *Science* 276: 425–428.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Brenda Guadalupe Silva Salinas

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias Biológicas

Tesis: MECANISMOS DE RESISTENCIA ENZIMÁTICA EN SIETE SUB-POBLACIONES DE *Aedes Aegypti* (L.) A INSECTICIDAS COMUNES Y ALTERNATIVOS PARA SU CONTROL EN EL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO.

Campo de Estudio: Biología de la Resistencia a Insecticidas en mosquitos vectores de Enfermedades

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, México, el 31 de agosto de 1985. Hija de Bertha Salinas Vázquez y Alfredo Silva Hinojosa.

Educación: Licenciada en Químico Bacteriólogo Parasitólogo, egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, desde 2008.

Experiencia Profesional:

Agosto 2010 a la fecha Desempeño como Entomólogo en el Programa de Prevención y Control de Dengue a nivel estatal en Servicios de Salud estado de Nuevo León

Abril-Julio 2010 Desempeño como supervisor en el Manejo Integrado de Plagas en Industrias de Alimentos

2007- 2009 Desempeño como Entomólogo en el Programa de Prevención y Control del Virus del Oeste del Nilo en la en la Jurisdicción Sanitaria No1 de la Secretaría de Salud del estado de Nuevo León