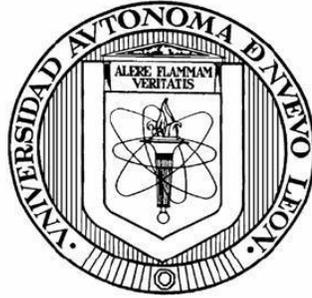


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



IMPACTO DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS PIRETROIDES EN LA
COMPETENCIA VECTORIAL A DENV-2 EN *Aedes aegypti* (L.).

POR

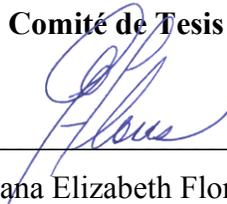
ALAN ESTEBAN JUACHE VILLAGRANA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA Y VETERINARIA

2024

**IMPACTO DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS PIRETROIDES EN LA
COMPETENCIA VECTORIAL A DENV-2 EN *Aedes Aegypti* (L.).**

Comité de Tesis



Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez

Presidenta



Dra. Beatriz López Monroy

Secretaria



Dr. Jesús Antonio Dávila Barboza

Vocal



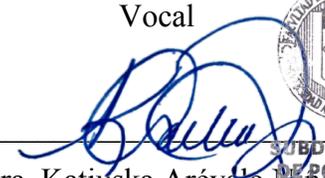
Dr. Humberto Quiróz Martínez

Vocal



Dr. Ildefonso Fernández Salas

Vocal



Dra. Katiuska Arévalo Niño

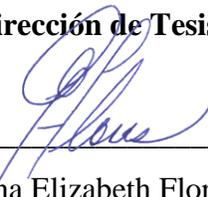
Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

**IMPACTO DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS PIRETROIDES EN LA
COMPETENCIA VECTORIAL A DENV-2 EN *AEDES AEGYPTI* (L.).**

Dirección de Tesis



Dra. Adriana Elizabeth Flores Suárez

Directora



Dra. Victoria Pando Robles

Directora externa

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el CONACYT, Problemas Nacionales PN2016-2134 y el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL 301-CN-2022.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Adriana Flores por todas sus enseñanzas, guía, dirección y apoyo. Gracias por siempre brindarme consejos que me ayudaron -y siguen ayudándome- a crecer personal y profesionalmente día con día. Gracias por darme la confianza para participar en tantos proyectos. Gracias por darme la oportunidad de aprender y experimentar más acerca de la entomología.

Al Dr. Gustavo Ponce por toda su dedicación y esfuerzo para enseñarme. Gracias por la confianza que me dio para poder participar en sus proyectos. Gracias también por compartirme su experiencia en campo y todos los consejos personales que de alguna u otra forma me ayudaron a seguir adelante. Abrazo hasta el cielo doctor.

A la Dra. Victoria Pando por sus enseñanzas y apoyo durante la realización de este proyecto y en particular durante mi estadía en su laboratorio.

A todos mis maestros durante el doctorado, en especial a la Dra. Beatriz López y al Dr. Ildefonso Fernández, con quienes tuve la dicha de aprender más sobre la entomología médica.

A mi esposa, la MEMV Karely Ortega, por todo su apoyo, paciencia, enseñanzas, y amor incondicional que me brindas siempre. Gracias por darme la maravillosa familia que tenemos. Te amo.

A mis amigos, Delia Suárez, Francisco González, y Mizaél de Jesús González, por todo su apoyo incondicional, compañía, consejos, y por escucharme siempre que lo necesitaba.

Agradezco el apoyo brindado por el CONACYT tanto para el financiamiento de este proyecto (CONACYT PN-2016 No. de proyecto 2134), así como por haberme proporcionado una beca para los estudios de Doctorado en Entomología Médica y Veterinaria (CVU: 783973) en el período de agosto de 2019 a julio del 2023.

DEDICATORIA

Por el futuro, Karely y León; por lo que vivimos, Noelia Martínez y Gustavo Ponce.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Artrópodos y su participación como vectores	3
2.2. Dípteros de importancia médica y veterinaria	4
2.3. Control de mosquitos vectores	5
2.3.1. Control ambiental de <i>Ae. aegypti</i>	6
2.3.2. Control químico de <i>Ae. aegypti</i>	7
2.4. Modo de acción de insecticidas	8
2.5. Resistencia a insecticidas.....	10
2.5.1. Resistencia metabólica	11
2.5.2. Resistencia por modificaciones de sitio blanco	12
2.6. Competencia vectorial	16
2.6.1. Competencia vectorial de <i>Aedes</i> para virus del dengue	18
2.7. Relación entre resistencia a insecticidas y competencia vectorial	22
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS.....	27
5. OBJETIVOS	28
5.1. Objetivo general	28
5.2. Objetivos específicos.....	28
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
6.1. Material biológico	29
6.2. Caracterización de la cepa resistente a piretroides	29
6.3. Diseño experimental	30
6.4. Exposición subletal a permetrina y determinación de LC ₃₀	32

6.5.	Actividad enzimática	33
6.5.1.	Oxidasas de función mixta.....	33
6.5.2.	Glutación S transferasa.....	33
6.5.3.	Concentración de proteínas.....	34
6.5.4.	Determinación de actividad de OFM y GST	34
6.6.	Genotipificación de poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> para mutaciones kdr	35
6.6.1.	Extracción de DNA	35
6.6.2.	Detección de mutaciones kdr.....	35
6.7.	Análisis de competencia vectorial para virus del dengue serotipo 2	37
6.7.1.	Cultivo viral de DENV-2.....	37
6.7.2.	Titulación viral	38
6.7.3.	Infecciones orales con DENV-2	38
6.7.4.	Detección de DENV-2 por PCR	39
6.7.5.	Curva estándar para cuantificación de carga viral	40
6.7.6.	Determinación de carga viral.....	40
6.8.	Análisis de resultados	40
7.	RESULTADOS.....	42
7.1.	Caracterización de la cepa MTY	42
7.2.	Análisis univariante del efecto de la edad, alimentación, exposición a permetrina, y desafío viral sobre la actividad de OFM.....	42
7.3.	Análisis univariante del efecto de la edad, alimentación, exposición a permetrina, y desafío viral sobre la actividad de GST.....	49
7.4.	Carga viral de DENV-2 en cepas de <i>Ae. aegypti</i> y su asociación a la actividad enzimática y exposición a permetrina.....	55
8.	DISCUSIÓN	60
9.	CONCLUSIONES	71
10.	PERSPECTIVAS	72
11.	BIBLIOGRAFÍA	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos experimentales.....	31
Tabla 2. Cebadores utilizados para identificación de las mutaciones kdr V1016I, V410L, y F1534C.....	36
Tabla 3. Protocolo de amplificación de mutaciones kdr.....	37
Tabla 4. CL ₃₀ (µg/botella) estimada y RR ₅₀ para las cepas MTY y NO de <i>Ae. aegypti</i>	42
Tabla 5. Comparación de la actividad de OFM por edad, alimentación, exposición a insecticidas, y desafío viral en la cepa NO de <i>Ae. aegypti</i>	43
Tabla 6. Comparación de la actividad de OFM entre grupos de edad, tipos de alimentación, exposición a insecticidas, y desafío viral en la cepa MTY de <i>Ae. aegypti</i>	45
Tabla 7. ANOVA tipo III para los tratamientos e interacciones para la actividad de OFM.	47
Tabla 8. Comparaciones múltiples de medias marginales estimadas de la actividad de OFM entre diferentes cepas de <i>Ae. aegypti</i> , estado de exposición a insecticidas y tipo de alimentación sanguínea.	49
Tabla 9. Comparación de la actividad de GST entre categorías de edad, tipos de alimento, exposición a insecticidas, y desafío viral en la cepa NO de <i>Ae. aegypti</i>	50
Tabla 10. Comparación de la actividad de GST entre categorías de edad, tipos de alimento, exposición a insecticidas, y desafío viral en la cepa MTY de <i>Ae. aegypti</i>	51
Tabla 11. ANOVA tipo III para los tratamientos e interacciones para la actividad de GST.....	53
Tabla 12. Cargas virales de DENV-2 en intestino y saliva de individuos expuestos y no expuestos a permetrina.	56
Tabla 13. Valores de AICc de los modelos GLM ajustados para la carga viral de DENV-2 en la cepa NO.	57
Tabla 14. Valores AICc de los modelos GLM para la carga viral de DENV-2 en la cepa MTY.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transducción de señales nerviosas mediada por iones sodio.....	9
Figura 2. Actividad de la acetilcolinesterasa en la transmisión de impulsos nerviosos..	10
Figura 3. Inhibición del sitio activo de acetilcolinesterasa por clorpirifos	13
Figura 4. Estructura del VGSC y localización de las mutaciones	15
Figura 5. Esquema de trayectoria viral desde la ingesta virémica hasta la transmisión del patógeno	18
Figura 6. Vías de señalización de inmunidad innata.....	21
Figura 7. Descripción general de los tratamientos experimentales (A) y cronograma de aplicación de los tratamientos (B)	32
Figura 8. Comparación de la actividad de OFM entre las cepas NO y MTY de <i>Ae. aegypti</i> en relación con la edad (A), alimento (B), exposición a insecticidas (C), y desafío viral (D).....	46
Figura 9. Valores estimados de actividad de OFM en función de la edad, el tipo de alimentación sanguínea, la exposición al insecticida y la cepa obtenidos del GLM.	48
Figura 10. Comparación de la actividad de GST entre las cepas NO y MTY en relación con la edad (A), el tipo de alimento (B), la exposición a permetrina (C), y el desafío viral (D).....	52
Figura 11. Medias marginales estimadas de la actividad de GST en función de la edad, el tipo de alimentación sanguínea, la exposición a permetrina y cepa.	54
Figura 12. Carga viral de DENV-2 en intestino medio y saliva de <i>Ae. aegypti</i> expuestos y no expuestos a permetrina.	55
Figura 13. Carga viral de DENV-2 estimadas en la cepa NO en función del tejido, estado de exposición a permetrina y la actividad de OFM.....	57
Figura 14. Comparación múltiple de medias marginales estimadas de la carga viral de DENV-2 en la cepa NO.....	57
Figura 15. Carga viral de DENV-2 estimadas en la cepa MTY en función del tejido, el estado de exposición a permetrina y la actividad de OFM.	59
Figura 16. Comparación múltiple de medias marginales estimadas de la carga viral de DENV-2 en la cepa MTY.....	59

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

BM Alimentación sanguínea

BM+V Alimentación sanguínea con DENV-2

DENV-2 Dengue serotipo 2

EAA Determinación de actividad enzimática

GLM Modelo lineal generalizado

GST Glutación S transferasas

IMD Inmunidad mediada por el dominio de muerte

JAK-STAT Vía de señalización de Janus quinasa y transductores de señal y activadores de transcripción

kdr Resistencia Knockdown (al derribo)

MTY Cepa de campo resistente a permetrina de Monterrey

NO Cepa de referencia susceptible a permetrina New Orleans

OFM Oxidasas de función múltiple

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

RR50 Ratio de resistencia 50

S/A Sin alimentación

S10% Solución de sacarosa al 10%

VGSC Canal de sodio dependiente de voltaje

RESUMEN

El dengue es la arbovirosis de mayor prevalencia a nivel mundial. En las Américas el virus del dengue es transmitido principalmente por el mosquito *Aedes aegypti* (L.). Debido a esto, el control de poblaciones de mosquitos mediante diversos métodos, incluyendo el uso de insecticidas, sigue siendo la estrategia más empleada para mitigar el impacto de esta enfermedad. Sin embargo, el uso continuo de insecticidas ha provocado la aparición de resistencia a través de diversos mecanismos, los metabólicos, regulados por la sobreexpresión de enzimas detoxificantes y la resistencia derivada de mutaciones no sinónimas en los sitios de acción de los insecticidas, como el canal de sodio dependiente de voltaje. Diferentes estudios han sugerido que la resistencia a insecticidas puede tener efectos tanto positivos como negativos sobre la capacidad de los mosquitos para transmitir patógenos. Sin embargo, la relación exacta puede variar dependiendo del tipo de mosquito, el patógeno en cuestión y el mecanismo específico de resistencia. En esta investigación se determinó el impacto de la sobre-activación de las enzimas Glutación S transferasas (GST) y Oxidasas de Función Múltiple (OFM) relacionadas a la resistencia a permetrina, y la exposición a permetrina, sobre la infección y transmisión de dengue serotipo 2 (DENV-2) en *Ae. aegypti*. Para ello, se analizaron una cepa de campo resistente a permetrina, denominada MTY, que muestra una actividad basal incrementada de GST y OFM y una cepa de referencia susceptible a permetrina, New Orleans (NO). Ambas cepas fueron desafiadas a través de ingestas sanguíneas con DENV-2. Se encontró una carga viral de DENV-2 mayor en intestino de los mosquitos resistentes a la permetrina, lo cual se asoció con la actividad de OFM. Los hallazgos sugieren que la sobre activación de las enzimas OFM, inducida por la resistencia a la permetrina, puede incrementar la capacidad de *Ae. aegypti* para infectarse y potencialmente transmitir DENV-2.

ABSTRACT

The dengue is the most prevalent arboviral disease worldwide. Dengue virus is transmitted to human principally by the mosquito *Aedes aegypti* (L.) in the Americas. As a result, the control of mosquito populations by different means, such as insecticides, remains the most used method to eliminate the impact of this arbovirus. The continuous use of insecticides has led to the emergence of resistance through various pathways, such as metabolic mechanisms controlled by the overexpression of detoxifying enzymes and resistance due to non-synonymous mutations in target sites of insecticides, such as the voltage-gated sodium channel. Several studies have shown that insecticide resistance could positively or negatively impact the mosquito ability to transmit pathogens. However, the exact relationship varies on the type of mosquito, pathogen, and insecticide resistance mechanism. In this research, the impact of the overactivation of Glutathione S transferase (GST) and Multiple Function Oxidases (MFO) related to resistance to permethrin and exposure to permethrin on the infection and transmission of dengue serotype 2 (DENV-2) was determined in *Ae. aegypti*. To this end, a permethrin-resistant field strain called MTY that has increased basal activity of GST and MFO and a permethrin-susceptible reference strain, New Orleans (NO), were challenged through blood meals with DENV-2. A statistically higher DENV-2 viral load was found in the midgut of permethrin-resistant mosquitoes, which was later associated with MFO activity. This research shows evidence suggesting that metabolic resistance is related to an increase in the vector competence of *Ae. aegypti* for DENV-2.

1. INTRODUCCIÓN

El dengue, chikungunya, Zika y la fiebre amarilla, son los arbovirosis con mayor relevancia a nivel mundial debido a su impacto en la salud pública. Los virus causantes de estas enfermedades son transmitidos por las picaduras infectivas de mosquitos del género *Aedes* (Diptera: Culicidae); destacando *Ae. aegypti* y *Aedes albopictus* (Skuse) por sus hábitos antropofílicos y distribución geográfica (Gratz 2004; Vega et al. 2014; Patterson et al. 2016; Mckenzie et al. 2019). En la actualidad se carece de vacunas efectivas o tratamientos antivirales específicos para arbovirus como el dengue y a razón de ello, el control de poblaciones de mosquitos es el método más utilizado para el control de estas enfermedades.

Existen diferentes técnicas para el control de poblaciones de mosquitos, no obstante, el control químico a través de la aplicación de insecticidas es el de mayor relevancia en México y en el mundo (Baldacchino et al. 2014; NOM-032-SSA2-2014).

La aplicación constante de agentes químicos ha propiciado el desarrollo de resistencia por diferentes mecanismos. Estos comprenden la resistencia metabólica, asociada a la sobreexpresión de enzimas detoxificantes como oxidasas de función múltiple (OFM), esterasas, glutatión S transferasas (GST). Así como, la resistencia por modificaciones de sitio blanco mediada por la presencia de mutaciones no sinónimas en los genes que codifican a las proteínas, que son sitios de acción de insecticidas, como el canal de sodio dependiente de voltaje (VGSC) para el DDT y piretroides y la acetilcolinesterasa insensible para los organofosforados y carbamatos (Rivero et al. 2010). En *Ae. aegypti* ambos mecanismos están presentes. Se ha determinado que existe una sobreexpresión de enzimas como GSTs, GSTe2, 5 y 7, además de OFM como citocromo P450 al ser expuestos a DDT y diversos piretroides (Lumjuan et al. 2011; Alvarez et al. 2017). También, se han descrito 13 mutaciones en el VGSC de *Ae. aegypti* de las cuales cinco han sido asociadas experimentalmente a una pérdida en la sensibilidad a piretroides de este canal (Saavedra et al. 2018).

La resistencia a insecticidas provoca un evidente problema para el control de poblaciones de mosquitos, sin embargo, se desconoce el impacto de este fenómeno sobre la competencia vectorial de *Ae. aegypti* para transmitir arbovirus como el dengue, es decir,

la implicación que tiene la resistencia a insecticidas y sus mecanismos, ya sean metabólicos o por mutaciones de sitio blanco, sobre la capacidad de un vector de adquirir, mantener y transmitir un arbovirus. Sin embargo, no existen muchas investigaciones al respecto. Recientemente, nuestro grupo publicó una revisión sobre la relación entre la exposición a insecticidas, la resistencia a los mismos y la competencia vectorial, evidenciando la ocurrencia de tres patrones: una relación positiva (la resistencia incrementa la competencia), una negativa (efecto contrario al anterior) y una relación neutral (no existe alteración) (Juache-Villagrana et al., 2022).

Esta investigación exploró la asociación entre la resistencia a insecticidas y la competencia vectorial utilizando un elemento compartido por estos procesos *en Ae. aegypti*, la actividad de enzimas detoxificantes como OFM y GST. Más específicamente, se analizaron los efectos individuales y de interacción de la edad, la exposición a la permetrina y el desafío viral con DENV-2 sobre la actividad de OFM y GST en dos cepas; una cepa de referencia susceptible a los piretroides y la infección por DENV-2 y una cepa de campo resistente a la permetrina que posee una actividad basal alterada de OFM y GST. Posteriormente, se analizó si la exposición a insecticidas y las actividades enzimáticas basales diferenciales tenían un impacto en las cargas virales de DENV-2 en el intestino medio y la saliva de los mosquitos a los 14 días post-infección en ambas cepas.

Los resultados de este estudio contribuyen a la comprensión de la interacción entre la resistencia a insecticidas y la competencia vectorial, punto esencial para el diseño de estrategias de manejo de poblaciones y control de vectores que sean más efectivas y sostenibles en el tiempo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Artrópodos y su participación como vectores

En el mundo existen diversas especies de artrópodos capaces de transmitir microorganismos como bacterias, protozoarios o virus los cuales son causantes de enfermedades que amenazan la salud pública. Tales artrópodos reciben el nombre de vectores; organismos competentes para la transmisión de patógenos entre huéspedes vertebrados (Mullen y Durden 2009). Wilson et al. (2017) proponen a los organismos vectores como artrópodos hematófagos que tienen una mayor movilidad respecto a sus huéspedes vertebrados y que transportan y transmiten un patógeno. Incriminar un organismo como vector atiende a ciertos criterios básicos definidos por Barnett (1962) que, en resumen, propone que una especie vector debe alimentarse de humanos en su ambiente natural, los individuos y la aparición de brotes infecciosos clínicos o subclínicos debe asociarse biológicamente en tiempo y espacio, debe ocurrir el aislamiento repetido de la forma infecciosa en el artrópodo, y la transmisión experimental de un patógeno a un huésped susceptible debe de ser demostrable.

Una vez que ha sido posible incriminar satisfactoriamente a un vector, el estudio de la diseminación de la enfermedad puede investigarse a través del modo de transmisión del patógeno. Este fenómeno efectuado por los artrópodos puede ocurrir a través de dos modos, la transmisión vertical y horizontal. La primera, ocurre cuando una hembra infectada transmite un agente infeccioso a su descendencia por medio de un contagio transovárico o transtadial (Graczyk et al. 2005; Lequime y Lambrechts 2014). Mientras, la transmisión horizontal involucra el transporte de un patógeno entre un organismo invertebrado hematófago competente y un huésped vertebrado susceptible (Lequime et al. 2016). La transmisión horizontal a su vez puede dividir a los vectores en dos tipos: los biológicos, aquellos donde el patógeno se reproduce dentro del artrópodo y se transmite principalmente por picaduras de individuos con hábitos hematófagos (por ejemplo: mosquito *Aedes spp.* - virus dengue) y los vectores mecánicos, en los cuales no ocurre la replicación del patógeno y la transmisión se da principalmente por contacto físico de

estructuras contaminadas (por ejemplo: chinche, *Triatoma infestans-Tripanozoma cruzi*) (Blanc y Gutiérrez 2015).

El filo Artrópoda representa el grupo de invertebrados con mayor diversidad de especies en el mundo, incluye a los miriápodos, crustáceos, arácnidos e insectos. Dentro este filo se encuentra numerosas especies que participan activamente como vectores biológicos (Ribera et al. 2015). Si bien los artrópodos más conocidos como vectores son los mosquitos existen otros como las garrapatas *Ixodes scapularis* transmisora de *Borrelia burgdorferi*, bacteria causante de la enfermedad de Lyme (Gulia et al. 2016), y *Amblyomma americanum* y *Rhipicephalus sanguineus*, arácnidos transmisores de bacterias del género *Ehrlichia* causantes de ehrliquiosis (Paddock y Childs 2003; Dantas 2008).

La entomología médica y veterinaria, es una rama de la ciencia que se encarga de estudiar a los insectos y patógenos asociados a los seres humanos, animales de compañía, al ganado y vida silvestre (Mullen y Durden 2009), se consolidó aproximadamente hace 152 años, con el descubrimiento de Patrick Manson sobre el desarrollo de una filaria en un mosquito y trabajos como el de Grassi y Rovelli sobre pulgas (Service 1978). Otros vectores de importancia en la entomología médica y veterinaria son el piojo *Pediculus humanus corporis* capaz de dispersar a las bacterias *Rickettsia prowazekii*, *Borrelia recurrentis* y *Bartonella quintana* (Reeves et al. 2006); los hemípteros de la subfamilia triatominae capaces de infectar huéspedes con el protozooario *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas (Lehane 2005; Bern 2015), y mosquitos que diseminan al virus del oeste del Nilo como *Cx. quinquefasciatus* (Marra et al. 2004) son ejemplos de.

2.2. Dípteros de importancia médica y veterinaria

Los insectos más estudiados en cuanto a su rol en la transmisión de enfermedades de importancia médica y veterinaria pertenecen al orden díptera, ya que aquí se encuentran las especies que han participado en las epidemias más recientes, ejemplo de ello son los casos reportados de fiebre del Zika en América hasta septiembre de 2023 alcanzando a 27,000 personas (OPS 2023), y 29 casos reportados hasta la semana epidemiológica 52 en México durante el mismo año (Secretaría de Salud, 2023). Al igual que las infecciones con mayor prevalencia a nivel mundial como la malaria, la cual afectó alrededor de 1.2

millones de personas en 2023 (PAHO 2023), de los cuales 37 se reportaron en México (Secretaría de Salud, 2023) y la fiebre del dengue de la cual se estimaron aproximadamente 4.1 millones de infecciones en 2023 (PAHO 2023) y 400 000 casos en México (PAHO, 2023). Además, otras especies como la mosca de establo, *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), transmisora de WNV (Doyle et al. 2011) y diferentes especies del género *Culicoides spp.* (Diptera: Ceratopogonidae) capaces de dispersar el virus de la lengua azul y la enfermedad del caballo africano (Slama et al. 2015), son ejemplos de vectores con relevancia en la ganadería.

Por otro lado, algunas especies como las moscas del género *Chrysops spp.* (Diptera: *Tabanidae*) capaces de transmitir al nematodo *Loa loa* (Baldacchino et al. 2014) y los mosquitos (Diptera: *Culicidae*) son quienes tienen una mayor importancia dentro de la salud humana. Globalmente, los principales mosquitos vectores de enfermedades pertenecen a la familia *Culicidae* y se encuentran dentro de los géneros *Anopheles*, *Aedes* y *Culex*. Los mosquitos *Anopheles spp.* transmiten a diferentes especies de *Plasmodium*, como *P. falciparum* y *P. vivax*, parásitos causantes de la malaria (Tisgratog et al. 2012).

2.3. Control de mosquitos vectores

Con la finalidad de disminuir y prevenir las enfermedades transmitidas por vectores se han desarrollado diferentes métodos a través de los cuales se realiza el control de las poblaciones de mosquitos. Según el manual de manejo integrado de vectores publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2012, los métodos de control pueden ser clasificados en cuatro categorías: ambientales (control de sitios de desarrollo larvario), mecánicos (trampeo de adultos con o sin insecticida), biológicos (enemigos naturales, aceites esenciales, entomopatógenos) y químicos (insecticidas, reguladores de crecimiento). No obstante, recientemente se han puesto a prueba nuevas metodologías que se agrupan como métodos genéticos (Baldacchino et al. 2014).

En México se promueve el manejo integrado de vectores que incluya la utilización de 2 o más procedimientos los cuales pueden abarcar control físico (ambiental), biológico, regulatorio o químico (NOM-032-SSA2-2014). Para el control de mosquitos vectores los métodos más utilizados involucran el manejo de recipientes de desarrollo en conjunto con la comunicación ciudadana para la limpieza de recipientes, patios, lotes baldíos, y la

aplicación de insecticidas con previa autorización de la COFEPRIS y la evaluación periódica de los mismos por parte de la CENAPRECE para asegurar su efectividad (NOM-032-SSA2-2014). Ambos métodos de control son analizados más a fondo a continuación.

2.3.1. Control ambiental de *Ae. aegypti*

El control ambiental es una de las técnicas más eficientes en la relación costo-beneficio para el manejo de vectores. Este método de control incluye tres estrategias principales: la modificación ambiental duradera del hábitat de los vectores, manipulación ambiental temporal del hábitat para reducir condiciones favorables de desarrollo, y cambios en las condiciones de vivienda y actividades humanas (Manjarres y Olivero 2013). Una de las principales acciones de este método requiere un esfuerzo para caracterizar y georreferenciar sitios de crianza de mosquitos (llantas abandonadas, por ejemplo) los cuales deben ser dispuestos de manera correcta lo que en consecuencia disminuye la densidad de mosquitos adultos y evita la necesidad de otras medidas de control (Bellini et al. 2014).

Al utilizar esta técnica de control de estados inmaduros en Tubiacanga, Rio de Janeiro, Brasil, se demostró un efecto a largo plazo de reducción de mosquitos adultos solamente al cubrir con una malla los dos contenedores de mayor importancia para el desarrollo de larvas de *Ae. aegypti* (Maciel-de-Freitas y Lourenço-de-Oliveira 2011). De manera similar este mismo resultado fue obtenido en Chennai, India, donde una aproximación que conjuntaba el empleo de cubiertas para contenedores de agua (sitios de desarrollo de pupas), limpiezas de patios, y campañas informativas, logró disminuir los índices pupales en sitios intervenidos a comparación de los que no lo fueron (Arunachalam et al. 2012). Por otra parte, una investigación en Mérida, México, demostró que al implementar un programa de reciclaje se disminuía significativamente el número de recipientes utilizados por *Ae. aegypti*; lo que podría originar una disminución de la etapa adulta de este vector (Barrera et al. 2015). La reducción de sitios de ovoposición tiene un efecto claro sobre las poblaciones de mosquitos adultos, sin embargo, han sido poco estudiadas las consecuencias que tiene esta técnica sobre otros parámetros como la duración del ciclo gonotrófico, factor determinante en el contacto huésped-vector. Al modelar teóricamente

una disminución en los sitios utilizables para la ovoposición se encontró que la tasa de reproducción básica de la malaria se reduce, probablemente asociado al mayor tiempo de búsqueda de sitios idóneos y la consecuente prolongación del ciclo gonotrófico (Gu et al. 2006).

2.3.2. Control químico de *Ae. aegypti*

Otra de las estrategias ampliamente utilizadas para el control de vectores es el control químico. Los insecticidas utilizados para el manejo de poblaciones de mosquitos de importancia médica como *Ae. aegypti* son clasificados dentro de cuatro grupos principales basados en su estructura química: los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides (Polson et al. 2011). Los organoclorados poseen en su estructura carbono, hidrógeno y cloro; aquí se encuentra uno de los insecticidas más conocidos, el dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), ampliamente utilizado desde la segunda guerra mundial en 1944 (Zimdahl 2015), y recomendado por la OMS (2011) a pesar de su capacidad para bioacumularse (Yu 2015). La síntesis del DDT produce 5 isómeros, de los cuales el p,p'-DDT presenta mayor toxicidad; dentro de este grupo se encuentran otros insecticidas como los ciclodienos aldrin y dieldrin, no obstante, tal como reporta van den Berg et al. (2012) quienes recopilan la utilización de insecticidas en 125 países solo el DDT sigue siendo utilizado. En México no se encuentra registrado dentro de los productos recomendados por el CENAPRECE para combatir insectos vectores del 2024 (CENAPRECE 2024).

El siguiente grupo de compuestos utilizados como insecticidas derivan del ácido fosfórico y son conocidos en conjunto como organofosforados; se dividen en seis subclases (Yu 2015), siendo los de mayor distribución comercial ésteres o tioles derivados directamente del ácido ya mencionado o los ácidos fosfínico, fosfónico y fosforamídico en combinación con átomos de oxígeno o azufre (Sogorb y Vilanova 2002). En particular este grupo altamente toxico fungió como alternativa a los organoclorados debido a que no se bioacumulan, destacando la aplicación de temefos, malathion, fenitrothion y metil-pirimifos (Manjarres y Olivero 2013). En México los organofosforados recomendados para su utilización destacan el temefos, metil-pirimifós, malatión, clorpirifós-etil (CENAPRECE 2024).

Los carbamatos, compuestos derivados del ácido carbámico con un grupo funcional éster (Kay et al. 2016). Al igual que el grupo anterior la sustitución de átomos de hidrógeno en la estructura del ácido carbámico con sustituyentes como compuestos alifáticos o aromáticos brinda la variedad de productos carbamatos con acción insecticida (Yu 2015). Carbaryl, bendiocarb y propoxur son ejemplos de compuestos utilizados para el control de vectores, siendo los dos últimos productos recomendados para el uso en México (Rodrigues de Oliveira et al 2017; CENAPRECE, 2024).

El último de los cuatro grandes grupos toxicológicos en desarrollarse fue los piretroides. Este grupo posee baja permanencia en tejidos de organismos no blanco como los mamíferos terrestres, no se bioacumula o biomagnifica y son tóxicos para los insectos vectores (Schleier y Peterson 2011). Los piretroides tienen su origen a partir de la búsqueda de compuestos más estables a la luz a comparación de sus análogos naturales, las piretrinas, obtenidas a partir de extractos de flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium*; el primer piretroide sintetizado y comercializado fue la aletrina en 1952 (Palmquist et al 2012). En la actualidad se reportan alrededor de 1 000 piretroides clasificados en tipo uno y dos, basados en si su estructura se presenta el grupo funcional nitrilo (tipo dos) como en la cipermetrina, deltametrina, tralometrina, cialotrina, y flumetrina o no (tipo uno) como en la bifentrina, permetrina, aletrina, teflutrina y terametrina (Thatheyus y Gnana 2013). En México se autoriza el uso de alfacipermetrina, fenotrina, piretrinas naturales, bifentrina deltametrina, praletrina y transflutrina (CENAPRECE 2024).

2.4. Modo de acción de insecticidas neurotóxicos

Los insecticidas poseen dos mecanismos generales de acción sobre los organismos. Ambos actúan a nivel celular interfiriendo con procesos básicos de transducción de señales nerviosas (neurotóxicos), no obstante, la maquinaria específica con la que interactúan varía de acuerdo con el grupo de insecticida. Durante la transducción de señales podemos encontrar a una célula en tres estados, un estado de reposo sin estímulo en donde el interior es netamente negativo con una alta concentración de iones de potasio; un estado de activación-despolarización en donde la membrana permite la salida de iones potasio y la entrada de iones sodio presentes en altas concentraciones en el medio

extracelular invirtiendo con ello la carga eléctrica al interior celular, y un período de repolarización que ocurre al eliminar el estímulo retornando la carga negativa al interior celular correspondiente a la entrada de iones potasio y la salida de los iones sodio (Figura 1) (Kandel et al. 2000). El DDT y los piretroides siguen un mismo patrón de toxicidad en las células nerviosas de los insectos (Vijverberg et al. 1982) al evitar la repolarización de las células y provocar un estado de hiperexcitación uniéndose a sitios específicos de los canales de sodio que promueven la repolarización. Los efectos de los piretroides y el DDT sobre los insectos incluyen pérdida del movimiento coordinado, actividad convulsiva, y por último parálisis (Soderlund y Bloomquist 1989).

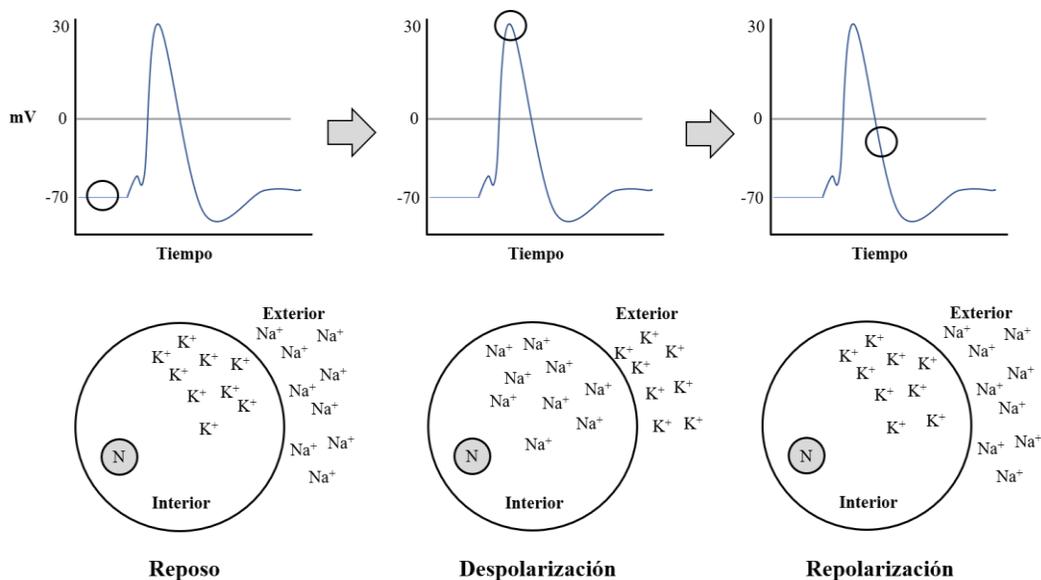


Figura 1. Transducción de señales nerviosas mediada por iones sodio. Inspirado de: Kandel et al. 2000.

Por otro lado, los organofosforados y carbamatos siguen un patrón de inhibición enzimático al interrumpir con la actividad normal de la acetilcolinesterasa (Yu 2015). Esta enzima esta encargada de la hidrólisis de la acetilcolina en el espacio sináptico (Figura 2); una disfunción en la misma ocasiona una acumulación de este neurotransmisor y la consecuente sobreestimulación de la membrana post sináptica lo que desemboca en la extenuación de la célula nerviosa, o tetania en células musculares (Fukuto 1990). Los cuatro grupos principales de insecticidas descritos en la sección anterior basan su efecto en los modos de acción descritos previamente. Sin embargo, en vectores han surgido mecanismos para evitar la acción de insecticidas que se basan principalmente en la

detoxificación o la modificación de los puntos de unión proteína-insecticida los cuales serán discutidos a continuación.

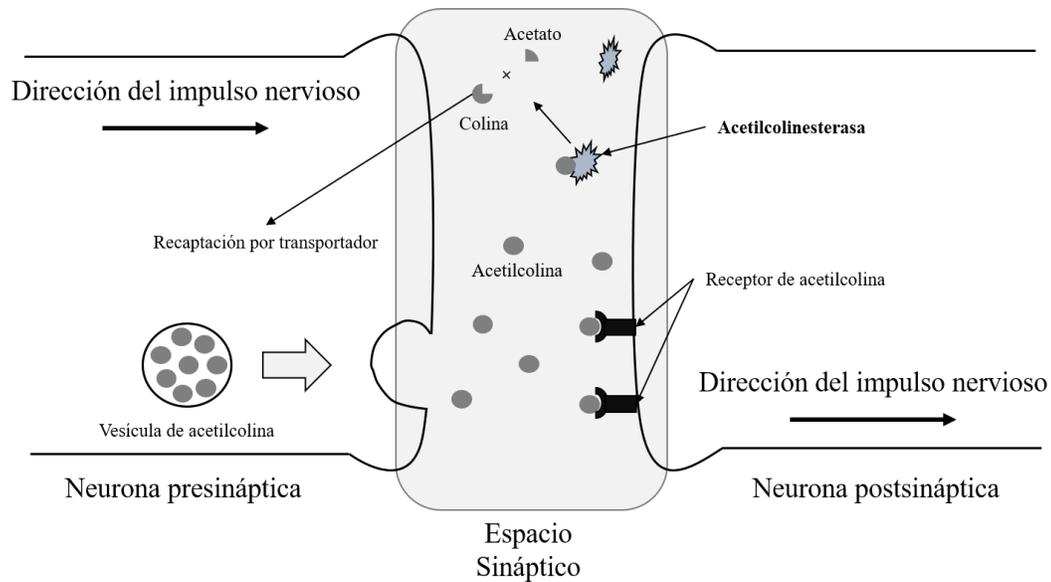


Figura 2. Actividad de la acetilcolinesterasa en la transmisión de impulsos nerviosos (Inspirado de: Jean-David et al. 2013).

2.5. Resistencia a insecticidas

El empleo de insecticidas para el control de las poblaciones de *Ae. aegypti* ha dado como resultado el desarrollo de resistencia a los principales grupos de insecticidas. Este fenómeno de resistencia se define como la disminución en la susceptibilidad de una población de vectores hacia un insecticida previamente efectivo ocasionado por su utilización continua y/o la posible selección cruzada con otros químicos, que surge por medio de cambios genéticos, fisiológicos o de comportamiento y además es heredable (OMS 2016; Oppold y Muller 2017; IRAC 2019). Uno de los primeros reportes de resistencia a insecticidas ocurrió en *Aedes taeniorhynchus* y *Aedes sollicitans* durante 1947, solamente un año después de la aplicación de DDT como método de control (Brown, 1986). En la actualidad se registran 21 especies del género *Aedes* con reportes de resistencia a insecticidas de los cuales destacan *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* con el mayor número de casos (572 para el primero y 252 para el segundo) mostrando para *Ae. aegypti* resistencia a DDT, organofosforados (temefos), carbamatos, piretroides (cipermetrina,

deltametrina y permetrina, por ejemplo) y toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Mota-Sanchez y Wise 2019). Al presente se reconocen 4 tipos de resistencia: de comportamiento, penetración, metabólica y modificaciones de sitio blanco (Rivero et al. 2010), siendo las últimas dos las más estudiadas

2.5.1. Resistencia metabólica

En la resistencia metabólica se involucra principalmente tres familias de enzimas detoxificantes, oxidasas CyP450, esterases y GST, todas ellas asociadas a conferir resistencia mediante su sobreexpresión, el incremento en el metabolismo del insecticida o una mayor afinidad por el químico (Liu 2015; Moyes et al. 2017). Ejemplo de esta contribución es lo reportado por Lumjuan et al. (2011) quienes determinaron una sobreexpresión de GSTe2, GSTe5, GSTe7 y GSTE5-5 en individuos con resistencia a DDT y piretroides; este hecho se asocia directamente a la reducción en la susceptibilidad de estos individuos a estos insecticidas. De manera similar, utilizando loci de rasgos cuantitativos (QTL) se demostró que la resistencia a temefos está relacionada a un QTL en el cromosoma dos donde ocurre un clúster de carboxilesterasas; posteriores estudios mostraron que existe un incremento en la expresión de estas enzimas y por lo tanto una posible intervención como mecanismo de resistencia (Paiva et al. 2016). Resultados similares fueron reportados por Saavedra et al. (2008), donde se demostró la participación significativa de un marcador de esterasa descubierto por QTL, CCEunk7o, y su relación al desarrollo de resistencia en conjunto con mutaciones en el canal de sodio dependiente de voltaje.

A la par de los estudios de expresión génica diversas investigaciones se enfocan en estudiar los niveles de actividad enzimática asociados a la resistencia. Muestra de ello es el aumento en la actividad que sufren las OFM, donde se incluye a CyP450, en individuos seleccionados con deltametrina por 15 generaciones a comparación del grupo susceptible no seleccionado (Alvarez et al. 2017), no obstante, en cuanto a que este mecanismo sea por sí solo el que confiere la resistencia a insecticidas es cuestionable ya que otros mecanismos fueron descritos para estas poblaciones. Para comprobar que la actividad enzimática tiene un efecto directo sobre la disminución de la susceptibilidad se emplean sinergistas, compuestos químicos que inhiben enzimas detoxificantes. Al inhibir

la actividad enzimática de OFM, esterasas y GSTs implicadas directamente como mecanismo de resistencia permite regresar a individuos resistentes a un estado susceptible. Bharati y Saha (2018) encontraron un aumento en la actividad de oxidasas de función múltiple (CyP450) y carboxiesterasas ya que al inhibirlas con sinergistas se recuperó la susceptibilidad al piretroide deltametrina y al carbamato propoxur en poblaciones de *Ae. aegypti* de Bangladés. Un patrón similar se demostró en poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes a DDT y piretroides de Selangor, Malasia, donde la inhibición de OFM y GST a través de un ensayo con sinergistas se correlacionó con un aumento en la actividad de tales enzimas como posible mecanismo de resistencia (Shi et al. 2019).

Identificar la participación directa y exclusiva de la resistencia metabólica a insecticidas es un proceso complejo debido a la presencia simultánea de mecanismos como mutaciones en sitios blanco y niveles elevados de enzimas detoxificantes. A pesar de esto, al presente se ha reportado la ocurrencia de poblaciones de *Ae. albopictus* libres de mutaciones en sitio blanco resistentes a insecticidas, demostrando la participación directa y exclusiva de genes CyP450 como CYP6P12 y la sobreexpresión de genes cuticulares como mediadores de la resistencia (Ishak et al. 2016).

2.5.2. Resistencia por modificaciones de sitio blanco

El mecanismo de resistencia asociado a modificaciones de sitio actúa en dos vías de transducción de señales a través de mutaciones no sinónimas en los genes de los canales iónicos o las enzimas que representan los sitios de acción de insecticidas (Moyes et al. 2017). En el caso particular de los organofosforados y carbamatos, estos interfieren con la acción de la acetilcolinesterasa y evitan la hidrólisis de la acetilcolina a colina y ácido acético por medio de fosforilación o carbamilación de la enzima (O'Brien 1969). La acetilcolinesterasa es una serin-hidrolasa con un sitio activo catalítico inhibido por la unión de insecticidas como clorpirifós en el residuo serina 200 presente en el túnel que forma el sitio activo (Figura 3) (Pang et al. 2012). Fisiológicamente podemos distinguir dos genes de la acetilcolinesterasa (*ace*), uno expresado en sistema nervioso (*ace-1*) con funciones dentro del espacio sináptico involucrado a la resistencia a insecticidas, y uno expresado en otros tejidos con funciones no relacionadas a la comunicación sináptica (*ace-2*) (Fournier 2005). Se han descrito diversas mutaciones como F139L, G247S y G368A,

en la secuencia génica de *Ace-1* relacionadas a la insensibilidad hacia organofosforados y carbamatos en diferentes especies de plagas como *Aphis gossypii*, *Drosophila melanogaster* y *Tetranychus urticae* (Fournier 2005), además de la mutación G119S en los mosquitos *An. gambiae*, *Anopheles albimanus*, *Culex vishnui*, *Culex pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* (Weill et al. 2004; Liu 2015) mientras que en *Ae. aegypti* esta misma mutación ha sido reportada en 4 individuos colectados en Namakkal, Tamil Nadu, India (Muthusamy y Shivakumar 2015).

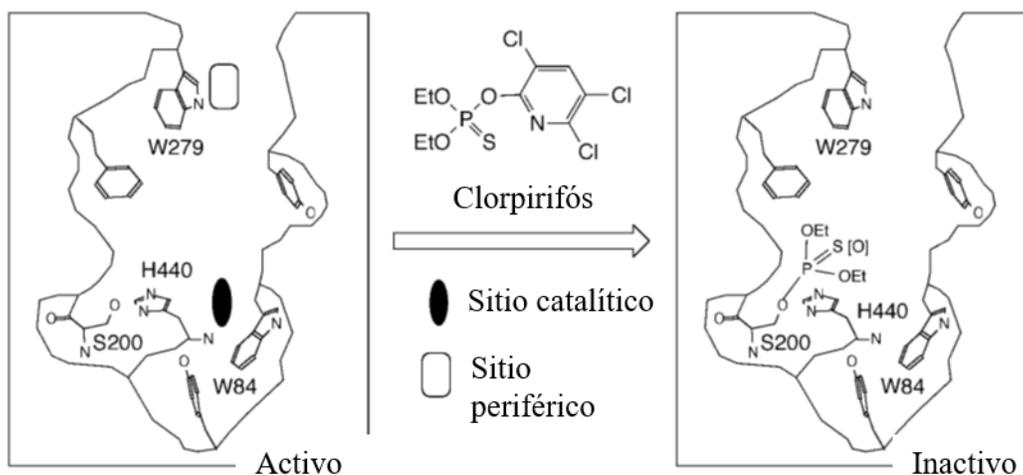


Figura 3. Inhibición del sitio activo de acetilcolinesterasa por clorpirifós (Modificada de: Pang et al. 2012).

Otra de las vías de transmisión de impulsos nerviosos involucrada en la resistencia a insecticidas es el canal de sodio dependiente de voltaje (VGSC) quien transmite los potenciales de acción a lo largo de la membrana celular (Dong et al. 2014). Estructuralmente, el VGSC es una proteína transmembranal que comprende cuatro dominios homólogos (I-IV) cada uno de los cuales posee seis segmentos transmembranales (1-6) altamente conservados entre y dentro de especies (Figura 4) (Scott 2019). Los insecticidas piretroides, al igual que el DDT, interactúan con este canal iónico evitando el cambio de estado conductor de iones al de no conductor provocando una despolarización prolongada y la consecuente parálisis del insecto en un fenómeno conocido como *Knock down* o derribo (Field et al. 2017). Actualmente son considerados dos modelos por los cuales ocurre la interacción canal-insecticida responsable de la insensibilidad a piretroides; un modelo de dos sitios de unión, el primero

localizado en IIS6 y IIIS6 donde se encuentran las mutaciones descritas para *Ae. aegypti* V1023G y F1565C y el segundo sitio receptor localizado en las uniones S4-S5 y S6 de los dominios I y II (Du et al. 2013). El modelo de sitio único de interacción propone que el estado conductor del canal de sodio es acoplado al insecticida en la cavidad hidrofóbica formada por el dominio II, las uniones S4-S5 y las hélices IIS5 y IIIS6 (O'reilly et al 2006).

La efectividad de los insecticidas depende de que el agente químico entre en contacto con alguno de los sitios receptores y produzca la despolarización continuada, no obstante, las mutaciones no sinónimas reducen la sensibilidad del VGSC a insecticidas como se demuestra por estudios de expresión heteróloga en oocitos de *Xenopus* y con ello se origina el desarrollo de resistencia *knock down* o resistencia al derribo (Rinkevich et al. 2013). Desde el descubrimiento de la mutación L1014F en *Musca domestica* y su participación en la resistencia a insecticidas (Rinkevich et al. 2012), a la fecha, se han descrito más de 50 mutaciones para el gen del VGSC en diferentes organismos plaga y vectores de enfermedades (Du et al. 2016). Trece de estos cambios de secuencia son encontrados comúnmente en *Ae. aegypti* en 10 posiciones diferentes abarcando cinco regiones de la estructura del VGSC (IIS4-5, IIS5-6, IIS-6, IIIS6 y IVS5) identificados en las posiciones 410 (V→L), 923 (G→I), 982 (L→W), 989 (S→P), 1007 (A→G) 1011 (I→M o V), 1016 (V→G o I), 1520 (T→I), 1534 (F→C o L), y 1763 (D→ Y) (Haddi et al. 2017; Moyes et al. 2017, Granada et al. 2018; Lien et al., 2018; Kushwah et al. 2019). En cuanto a la mutación del nucleótido 1014 de la secuencia de VGSC ninguno de los cambios de un solo nucleótido se ha asociado al desarrollo de resistencia en *Ae. aegypti* (Scott 2019). Cabe resaltar que solo una pequeña parte de las mutaciones descritas para esta especie ha sido asociada funcionalmente a la insensibilidad a piretroides y DDT a través de ensayos de expresión heteróloga y electrofisiología; solo S989P, I1011M, V1016G, F1534C y V410L han sido confirmadas (Saavedra et al. 2018). De igual manera es importante señalar que las mutaciones suelen asociarse a un sector geográfico específico, por ejemplo, la mutación V1016G ha sido descrita en el Sureste asiático, pero no en el continente americano (Fernando et al. 2018) con excepción de un mosquito portador de esta mutación en Panamá (Murcia et al. 2019).

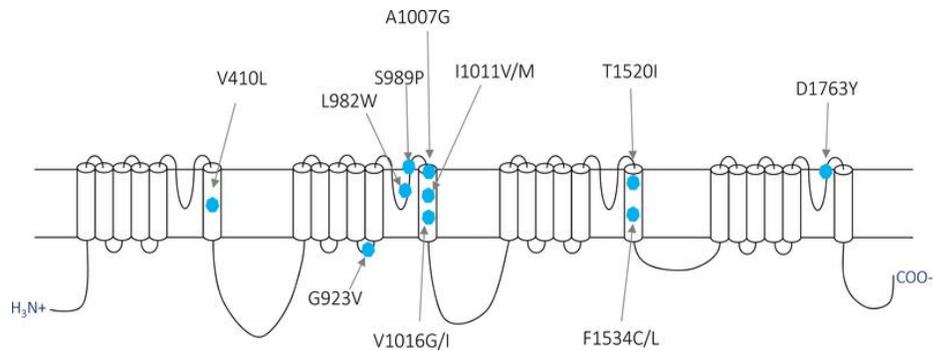


Figura 4. Estructura del VGSC y localización de las mutaciones (Tomado de: Chen et al. 2020).

En Latinoamérica y el Caribe las mutaciones que inducen una alteración en el sitio blanco son mayormente asociadas con la resistencia a insecticidas piretroides (Guedes et al. 2020). En México se han reportado las mutaciones F1534C, V1016I, y V410L para poblaciones de *Ae. aegypti* de diferentes estados de la República como Veracruz, Tapachula y Mérida; sitios en los cuales su distribución temporal indica prácticamente la ausencia de alelos mutantes en el 2000, el incremento gradual de estas mutaciones durante el periodo 2002-2008, hasta la fijación de los alelos mutantes en 2016 con un frecuencia alélica para los tres cambios simultáneos de 0.47 (Saavedra et al. 2018) De estas mutaciones, el cambio de fenilalanina a cisteína en la posición 1534 fue descrito inicialmente por Yanola et al. (2010) quienes asociaron su participación a la resistencia a piretroides, no obstante, estudios de expresión heteróloga y electrofisiología mostraron que este cambio reduce la sensibilidad del VGSC a piretroides tipo uno pero no a los tipo dos (Hu et al. 2011). En contraste, Fan y Scott (2020) demostraron que individuos homocigotos para el alelo mutante 1534C, carentes de resistencia metabólica mediada por oxidasa de función múltiple u otras mutaciones *kdr*, presentaba una resistencia de 7 a 16 veces a comparación de una cepa susceptible a piretroides tipo uno y dos, respectivamente. La presencia de esta mutación se ha vinculado al desarrollo de niveles bajos de resistencia y su asociación con otros cambios génicos al establecimiento de un fenotipo más resistente. Tal es el caso de su asociación con V1016I, descrita por Saavedra et al. (2007) de la cual no se ha identificado su participación en la insensibilización del VGSC al aparecer como mutación única (Chen et al. 2019). Analizando la frecuencia de V1016I y F1534C en 24 poblaciones de *Ae. aegypti* de los estados de Nuevo León, Veracruz, Yucatán, Quintana Roo, y Chiapas, se determinó que el proceso evolutivo más probable

es la aparición de F1534C y posteriormente la aparición de V1016I, esto corroborado por el bajo *fitness* del haplotipo I1016-F1534 (Vera et al. 2015) y el aumento en la resistencia a insecticidas en oocitos de *Xenopus* al inducir las dos mutaciones (Chen et al. 2019).

Estudios de distribución temporal de la mutación V1016I en México identificaron el aumento en la frecuencia del alelo mutante I1016 desde el lapso de 1996 al 2000 con una frecuencia de 0.04 % hasta el aumento al 33.2 % en el periodo de 2007 al 2009 (Ponce et al. 2009).

La mutación V410L ha sido recientemente descrita por Haddi et al. (2017), quienes determinaron su asociación a la resistencia a piretroides tipo uno y dos a través de la expresión y análisis en oocitos de *Xenopus*. Su participación en la resistencia promueve la insensibilización del VGSC de *Ae. aegypti* y disminuye la efectividad de piretroides hasta 10 veces, aumentando conforme se co-expresa con F1534C. Esta mutación ha sido estudiada en México en poblaciones de *Ae. aegypti* colectadas entre el año 2000 y 2016 donde se reportó su aparición en 2002 en individuos heterocigotos colectados en Coatzacoalcos, Veracruz, y donde también se documentó el aumento en la frecuencia de L410 alcanzando hasta el 0.9 en poblaciones colectadas en 2014 en Mérida, Yucatán (Saavedra et al. 2018). Un patrón similar fue encontrado para 26 poblaciones de *Ae. aegypti* colectadas al este de la república mexicana mostrando una frecuencia del alelo L410 cercana a uno en Minatitlán, Jose Cardel, y Cancún (0.99, 0.97 y 0.93, respectivamente) pero los valores medios, así como el intervalo de frecuencias observadas en las poblaciones oscila desde 0.3 hasta 0.99 (Villanueva et al. 2019).

2.6. Competencia vectorial

La competencia vectorial es una característica que establece la capacidad intrínseca de los vectores para adquirir, mantener y transmitir un patógeno dados sus componentes genéticos; este término no debe ser confundido con el de capacidad vectorial, locución cuantitativa que toma en cuenta tanto factores asociados a la relación patógeno-vector como la competencia vectorial, así como factores abióticos o extrínsecos tales como elementos ambientales o de comportamiento (Beerntensen et al. 2000; Franz et al. 2015; Kramer y Ciota 2015). La competencia vectorial es por tanto un factor determinante en la participación de *Ae. aegypti* durante la transmisión horizontal de

arbovirus la cual está determinada, entre otros factores, por las barreras inmunológicas y el microbioma de los mosquitos, además de la capacidad de los virus de traspasar dichas barreras (Conway et al., 2014; Lequime y Lambrechts, 2014). Chamberlain y Sudia (1961), Hardy et al. (1983), Franz et al. (2015), Kramer y Ciota (2015) y Wu et al. (2019) explican los principales factores y barreras que afectan la competencia vectorial de los mosquitos (Figura 5); primero, después de una ingesta virémica ocurre la infección de las células del segmento posterior del intestino medio (IM). Si un mosquito es refractario a la infección y no ocurre la colonización de estas células, o bien, ocurre la invasión de las células y no la replicación del virus, está presente la primera barrera conocida como barrera de infección del IM (MIB). La MIB es mediada por múltiples factores como la inactivación viral por fluidos digestivos, dosis infectiva, permeabilidad de las células epiteliales, membrana peritrófica, falta de receptores específicos, interacciones con la superficie celular, sistema inmune del huésped virémico, digestión de proteínas de la sangre, activación del sistema GABAérgico, activación de la barrera inmune de los mosquitos como las vías RNAi, Toll, de inmunodeficiencia, o JAK-STAT y la microbiota localizada en el MG como *Chromobacterium* quien segrega aminopeptidasas en contra de la envoltura viral del dengue (Ramirez et al. 2014).

Después de la infección del IM los arbovirus sufren una multiplicación inicial hasta un nivel virémico específico y de aquí ocurre la diseminación hacia otros tejidos como los cuerpos grasos, ovarios, tejido neural, entre otros. No obstante, la barrera de escape del IM (MEB) evita el paso del arbovirus de la lámina basal hacia la hemolinfa circulante en el hemocele; esta barrera se ha caracterizado por diferentes interacciones moleculares como las lectinas tipo-C, la proteína NS4B o la cascada de la fenoloxidasas que al ser inhibida promueve la replicación del virus del Semliki y la mortalidad de *Ae. aegypti*. De igual forma, se ha planteado que puede ocurrir una maduración incorrecta de los virus dejando nucleocápsides no infectivas incapaces de cruzar esta barrera.

Si un patógeno logra llegar al hemocele se distribuirá a otros tejidos incluyendo las glándulas salivales (GS). Generalmente, cuando el arbovirus se encuentra dentro de las GS y el ducto salivario de los vectores estos se consideran como infectivos, sin embargo, se han descrito dos barreras en este sitio. Una de ellas, la barrera de infección de las GS (SGIB), se presenta de manera dependiente o independiente de la dosis infectiva

de arbovirus y constituye un impedimento para establecer una infección en este tejido como consecuencia de la lámina basal que rodea a las GS, aunque esto no ha sido confirmado. Por otro lado, la barrera de infección de escape de las GS (SGEB) ha sido propuesta pero no existe información concluyente de la forma en que esta barrera actúa; se sugiere que uno de los principales factores que da origen a esta barrera es el estado inmaduro de la infección y la falta de viriones infectivos presentes en el ducto salivario.

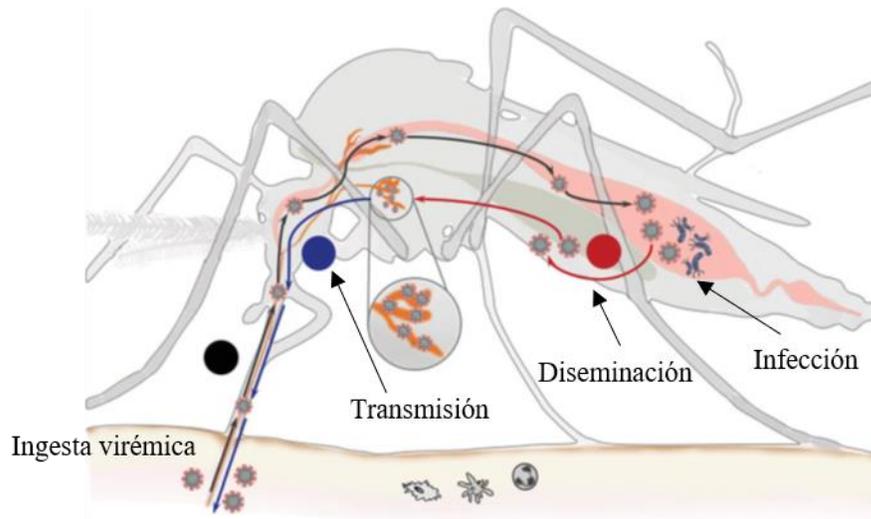


Figura 5. Esquema de trayectoria viral desde la ingesta virémica hasta la transmisión del patógeno (Modificado de: Wu et al. 2019).

2.6.1. Competencia vectorial de *Aedes* para virus del dengue

El virus del dengue (DENV) es un flavivirus perteneciente al serocomplejo dengue diferenciado en 4 serotipos. Estructuralmente es un eicosaedro de 50 nm, con un genoma de RNA de sentido positivo codificante para un polipéptido que contiene a las proteínas estructurales C, prM, M y, E, además de las proteínas no estructurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5 (Velandia y Castellanos, 2011). Especies del género *Aedes* participan en la diseminación de este patógeno, por ejemplo, *Ae. aegypti* es el principal vector de este arbovirus, seguido de *Ae. albopictus* y otras especies como *Aedes japonicus* han demostrado competencia vectorial para este flavivirus (Schaffner et al. 2011). La susceptibilidad de mosquitos vectores a infección por DENV está determinada por mecanismos específicos aun no bien establecidos presentes en las MIB, MEB, SGIB y SGEB. En la actualidad se han descrito proteínas con probable función como receptoras

de DENV en *Ae. aegypti*. Por un lado, las proteínas de 67 kDa y 80 kDa se han identificado en intestino medio mientras que las de 77, 58, 54 y 37 kDa en glándulas salivales tal y como se concluyó por medio de ensayos de unión a proteínas virales (Quintero et al. 2010). Existen otras moléculas posiblemente involucradas como receptores destacando proteínas de unión a laminina, glicoproteínas, prohibitina, proteína similar a tubulina, y proteínas de superficie celular aun no descritas, sin embargo, a la fecha no existe un estudio concluyente que señale una molécula proteica o de otra naturaleza como receptor definitivo (Hidari y Susuki 2011).

Otro determinante de la competencia vectorial de *Aedes* para transmitir DENV son las defensas inmunológicas innatas. Debido a estas el virus es retenido en un nivel de viremia insuficiente para establecer un nivel patogénico, pero a la vez logra evadir estos mecanismos para replicarse y diseminarse a otros tejidos. La inmunidad innata en mosquitos es mediada por tres mecanismos principales: las vías de señalización antivirales como Toll, de inmunodeficiencia y JAK-STAT, proteínas parecidas al complemento como AsSR-C/ AaMCR y los RNA pequeños como los interferentes, microRNA o RNA interactuantes con Piwi (Mukherjee et al. 2019). Los receptores Toll requieren de la activación mediada por ligandos derivados del virus los cuales se unen con receptores de reconocimiento de patógenos (RRP). Esta unión produce la subsecuente escisión del factor pro-spaetzle a spaetzle quien funge como ligando de los receptores Toll. La interacción entre spaetzle y los receptores Toll ocasiona el reclutamiento de moléculas como MyD88, tube y pelle en el interior celular para, posteriormente, provocar la disociación del inhibidor cactus de Rel 1 causando la translocación al núcleo de este último quien actúa como factor de transcripción de péptidos antimicrobianos (PAM) (Figura 9) (Kumar et al. 2018; Mukherjee et al. 2019). Se ha demostrado que componentes de la vía Toll son diferencialmente regulados por la infección con DENV; Spaetzle, Toll y Rel1A son regulados positivamente mientras que Cactus lo es negativamente sugiriendo la participación de esta vía como mecanismo de defensa en la infección por DENV (Xi et al. 2008). Además, los PAM producidos por la activación de esta vía poseen una actividad antiviral, aunque se desconoce los mecanismos de acción (Cheng et al. 2016).

La vía de inmunodeficiencia (IMD) es otro mecanismo de defensa innato el cual se activa cuando un virión se une a un receptor específico aún no identificado. Esta unión

origina el reclutamiento de diferentes moléculas en dos cascadas de señalización diferentes. Por un lado, una quinasa Janus (JNK) fosforila Rel2 mientras que el dominio de muerte asociado a fas (FADD) y la proteína similar a ced-3/Nedd2 relacionada a muerte (DREDD) son reclutados en el receptor de arbovirus aun no descrito. El complejo FADD-DREDD escinde el Rel2 previamente fosforilado lo que culmina en la translocación del Rel2 al núcleo y la producción de péptidos antimicrobianos o el péptido Vago el cual actúa como ligando efector de la vía JAK-STAT en células adyacentes (Figura 9) (Ramirez et al. 2018; Mukherjee et al. 2019). Se ha observado que el silenciamiento de esta vía promueve un aumento en los títulos virales de cepas refractarias a infección, pero no tiene un efecto en poblaciones susceptibles indicando que puede estar asociada al máximo de actividad dentro de estas poblaciones (Sim et al. 2013).

La activación de la vía del transductor de señales de quinasa Janus y activador de transcripción, JAK-STAT, se inicia por la unión del ligando unpaired (upd) a un receptor transmembranal conocido como Dome. Esta unión promueve la autofosforilación de Hop y el receptor Dome originando la unión de STAT a este complejo. La dimerización y fosforilación de STAT mediada por el complejo Dome-Hop causa la traslocación de STAT al núcleo y activa su función como factor de transcripción (Figura 6) (Jupatanakul et al. 2017). Souza et al. (2009) demostraron que al suprimir la expresión del receptor Dome y la quinasa Janus Hop se aumenta la susceptibilidad a infección por DENV mientras que, al suprimir el inhibidor de esta vía, PIAS, se obtiene un efecto contrario.

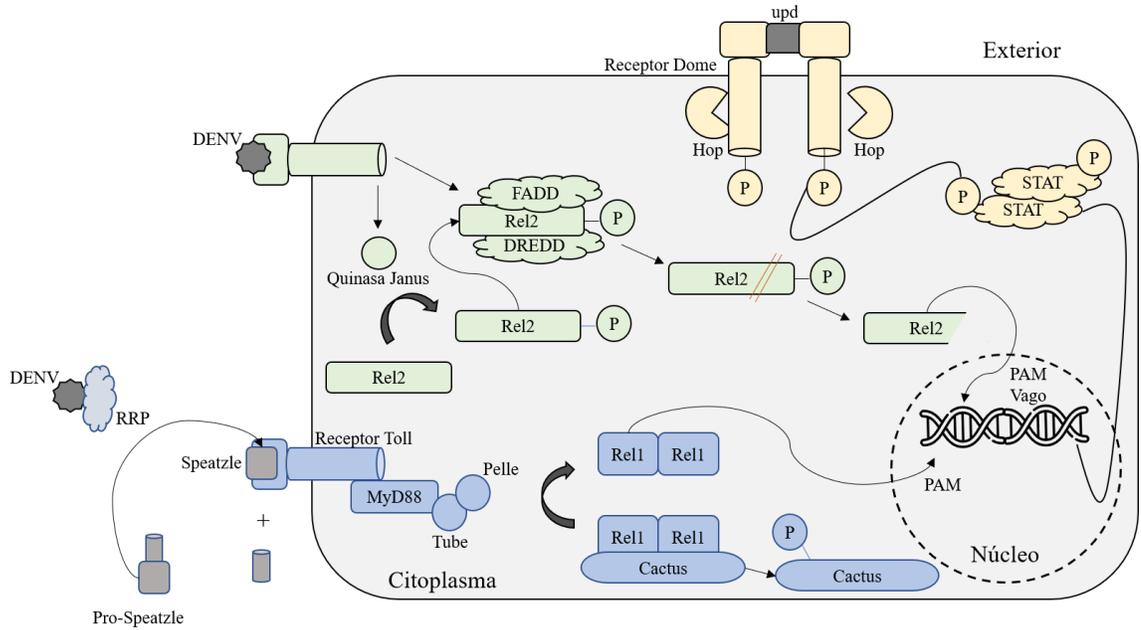


Figura 6. Vías de señalización de inmunidad innata (Inspirado de: Mukherjee et al. 2019). En color azul se muestra la vía Toll, en verde IMD y en amarillo JAK-STAT.

La microbiota presente en etapas inmaduras o en individuos adultos participa activamente mediante la competencia vectorial de *Ae. aegypti* (Caragata et al. 2019), diferentes especies de microorganismos que forman parte de la microbiota natural de mosquitos han sido relacionados como reguladores de la susceptibilidad a la infección. Ramirez et al. (2014) demostraron que una bacteria del género *Chromobacterium Csp_P* aislada de poblaciones naturales de *Ae. aegypti* es capaz de disminuir la infectividad de DENV. Posteriores investigaciones en esta especie demostraron que la molécula relacionada a la actividad antiviral forma parte de las proteínas segregadas identificada como una aminopeptidasa (Saraiva et al. 2018). No obstante, otros estudios han mostrado variabilidad en cuanto a la interacción microbiota-arbovirus. Hill et al. (2014) indicaron que, aunque no de manera estadísticamente significativa, existía una tendencia a que los individuos tratados con antibióticos y por lo tanto asépticos, presentaban menores tasas de infección de DENV a comparación de los individuos con microbiota normal. De manera similar, la ingesta de esporas de *Talaromyces* spp. causo el aumento de la infección de DENV en dos cepas susceptibles a infección de *Ae. aegypti* (Angleró et al. 2017). La bacteria *Wolbachia* es uno de los simbioses más importantes encontrada en el 40 % de las especies de insectos terrestres, no obstante ha sido muy poco encontrada en

mosquitos *Aedes spp.* Sin embargo, cuando esta bacteria se inyecta en los mosquitos artificialmente se inhibe la infección a DENV y otros patógenos de manera dependiente de la densidad poblacional, activando las defensas inmunológicas, y las especies reactivas de oxígeno (Caragata et al. 2019). Evidencia de lo anterior ha sido expuesto realizando infecciones en cultivo de líneas celulares de mosquito en donde aquellas líneas celulares infectadas con esta bacteria obtuvieron títulos virales menores a comparación de las líneas no infectadas (Frentiu et al. 2010).

2.7. Relación entre resistencia a insecticidas y competencia vectorial

La relación entre resistencia a insecticidas y competencia vectorial es un tópico de importancia para el control de enfermedades arbovirales. Al presente se desconoce el impacto concreto de los mecanismos de resistencia sobre la competencia vectorial de *Ae. aegypti*. Una revisión sistemática de las investigaciones que estudian el nexo de los mecanismos de resistencia y la competencia vectorial sugieren la existencia de tres posibles escenarios; la competencia vectorial se incrementa (relación positiva), disminuye (relación negativa), o bien, permanece sin alteración (neutral), dada la resistencia a insecticidas (Juache-Villagrana et al. 2022).

La mayor parte de los estudios sobre esta relación se han realizado en vectores de malaria; por ejemplo, se ha demostrado que *An. gambiae s.s.* seleccionado con piretroides y portadora de mutaciones *kdr* es más susceptible a infección por *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Howard et al. 2010). De manera similar, esta asociación positiva fue reportada en individuos *An. gambiae s.s.* portadores de mutaciones *kdr* (L1014F) y *ace-1* (G119S) quienes presentaron una mayor prevalencia de esporozoítos de *P. falciparum* en intestino medio al comparar con una cepa de referencia sin mutaciones, no obstante, presentan una disminución en la cantidad de esporozoítos, fase infectiva del parásito para los seres humanos (Alout et al. 2013). Esta relación positiva fue también encontrada no solo en vectores de patógenos de importancia médica sino en especies vectores de importancia agrícola. Ejemplo de ello, Wan et al. (2021) reportaron un incremento en la competencia vectorial de *Frankliniella occidentalis* resistente a spinosad para transmitir el virus del bronceado del tomate. Análogamente, poblaciones de *Myzus persicae* resistentes a Dietil carbamatos y piretroides asociados a mutaciones ACE y *kdr*

en M918L mostraron un incremento en la competencia vectorial para el virus del mosaico severo de la papa (Fenton et al. 2015).

Al contrario de estas investigaciones, Alout et al. (2014) encontraron una disminución de la competencia vectorial en poblaciones de *An. Gambiae s.s.* portadoras de las mutaciones *ace-1* o *kdr* expuestas a bendiocarb o DDT respectivamente, en quienes se disminuía la prevalencia e intensidad de infección (número de ooquistes) de *P. falciparum* en la población resistente a carbamato mientras que en la población resistente a DDT solo se disminuía la prevalencia. Este mismo efecto fue encontrado para poblaciones de *An. gambiae s.s.* homocigotos resistentes de la mutación *kdr* L1014S colectados en Uganda, quienes mostraron una reducción de la prevalencia e intensidad de infección por *P. falciparum* al ser expuestos a deltametrina y comparación con el grupo control (Kristan et al. 2016). Este mismo grupo de investigación encontró que la infección por *P. falciparum* aumenta la susceptibilidad a DDT a comparación del grupo sin infección (Alout et al. 2014). La relación negativa fue también reportada para poblaciones de *Anopheles funestus* quienes presentaron competencia vectorial disminuida para *Plasmodium* sp. asociado a la mutación A296S en el receptor GABA, receptor involucrado en la resistencia a Dieldrin. Además de los estudios en *Anopheles*, en *Culex quinquefasciatus* se ha encontrado una asociación negativa entre competencia vectorial y mecanismos de resistencia. En esta especie se demostró que el aumento en la actividad de esterases induce una disminución en la prevalencia de *Wuchereria bancrofti* (McCarroll and Hemingway, 2002).

Además de estos efectos negativos sobre la competencia vectorial, los mecanismos de resistencia se asocian a consecuencias negativas pleiotrópicas sobre características de mosquitos vectores tales como disminución en la fecundidad, sobrevivencia, ovoposición, tamaño, y alargamiento del tiempo de desarrollo larvario en un fenómeno conocido como *fitness cost* (Jesus et al. 2012; Brito et al. 2013; Araujo et al. 2015; Alvarez et al. 2017). Este *fitness cost* puede conducir a repercusiones positivas o negativas en la interacción vector-patógeno debido a la disminución de la longevidad de los mosquitos, así como la promoción de su fecundidad. En particular, se ha determinado que la infección con *Plasmodium* reduce la supervivencia de *An. gambiae* pero aumenta la fecundidad (Alout et al. 2016); esto podría traducirse en un aumento poblacional ocasionado por la

fecundidad y baja de las poblaciones adultas por la supervivencia de *An. gambiae*, sin embargo, si el tiempo de supervivencia es suficiente para concluir con el periodo de incubación extrínseca de un patógeno, podría suponer un aumento en el número de infecciones. Al igual que lo anterior, los mecanismos de resistencia pueden propiciar que las reservas energéticas se reduzcan y con ello la respuesta inmune de los mosquitos se vea afectada de manera negativa abriendo paso a la infección por patógenos (Alout et al. 2017; Richards et al. 2017).

En cuanto a los estudios en arbovirus que relacionan competencia y resistencia se ha demostrado que la presencia de mutaciones en *ace-1* y *ester*² se asocia a una mayor susceptibilidad a la infección y capacidad para transmitir virus del Oeste del Nilo en *Cx. quinquefasciatus*, pero no así para el virus del valle del Rift (Atyame et al. 2019). Los estudios realizados en *Ae. aegypti* se han enfocado, en su mayoría, a determinar el efecto de la exposición a insecticidas sobre la competencia vectorial. Los estudios de competencia vectorial-exposición a insecticidas están acompañados, en diversas investigaciones, de otras variables. Tal es el caso de la aplicación de altas temperaturas durante el desarrollo larvario, mismo que dificulta la determinación del efecto inmediato de la resistencia sobre la competencia vectorial. Muturi y Alto (2011) demostraron que la exposición de larvas de *Ae. aegypti* a malatión y altas temperaturas (30 °C) incrementa la infección y diseminación de virus del Sindbis. De manera similar, la edad cronológica y la exposición a un piretroide, bifentrina, impactan en la diseminación de virus del Zika en *Ae. albopictus*; aquellos individuos de mayor edad cronológica y expuestos a una dosis subletal de bifentrina tienen títulos virales de diseminación mayores a los grupos no expuestos de individuos viejos y jóvenes, así también al grupo de mosquitos jóvenes expuestos a la misma dosis subletal (Knecht et al. 2018). La ingestión de este piretroide ha mostrado efectos contrarios, tal es el caso de la investigación realizada por Richards et al. (2017), quienes establecieron que al alimentar a mosquitos *Ae. albopictus* con una mezcla de agua azucarada y bifentrina disminuye los títulos virales de DENV-2 a los 14 días de exposición. En cuanto al estudio de la competencia vectorial de *Ae. aegypti* para otros arbovirus, la exposición a DDT de un grupo susceptible al virus del chikungunya y a este insecticida produjo una mayor prevalencia de este arbovirus a comparación de un grupo susceptible al virus, pero resistente al DDT y a otro grupo refractario al patógeno y

susceptible al DDT (Mourya et al. 1994). En *Ae. aegypti* se ha reportado que la resistencia a piretroides mediada por las mutaciones kdr V1016I y F1534C incrementa su competencia vectorial para el virus del Zika (Parker-Crockett et al. 2021). Chen et al. (2021) describieron este mismo resultado en poblaciones resistentes a piretroides asociadas a estas mutaciones kdr y enzimas como CyP450 y GST.

3. JUSTIFICACIÓN

La transmisión del virus del dengue esta mediada principalmente por los mosquitos vectores *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Este patógeno impacta a la salud pública, ejemplo de ello, se estima que anualmente ocurren alrededor de 390 millones infecciones con virus del dengue en todo el mundo (Bhatt et al. 2013; Kraemer et al. 2015) mientras que en México se registraron 54 406 casos confirmados en 2023 y alrededor de 300,000 casos probables de dengue (Secretaría de Salud 2023). Las infecciones causadas por este virus carecen de tratamientos antivirales específicos además de vacunas efectivas para su prevención, por lo cual, los esfuerzos para disminuir su impacto en la salud pública se enfocan en reducir las poblaciones de los mosquitos vectores por medio del uso de insecticidas. No obstante, su aplicación ha originado que en México y en el mundo *Ae. aegypti* adquiera resistencia a los cuatro grupos toxicológicos usados principalmente para su control. Además, existe escases de información del impacto de los mecanismos de resistencia sobre la competencia vectorial, es decir, sobre la susceptibilidad para infectarse y transmitir arbovirus. De acuerdo con esto, investigaciones señalan que las mutaciones kdr en *An. gambiae* aumentan la susceptibilidad hacia entomopatógenos como *Metarhizium anisoplia* y *Beauveria bassiana* (Howard et al. 2010), y aumentan la prevalencia de *P. falciparum* en ausencia de exposición a insecticidas (Alout et al. 2014). Estudios sobre competencia vectorial, mecanismos de resistencia y arbovirus señalan que *Cx. quinquefasciatus* posee una mayor diseminación y eficiencia de transmisión de virus del oeste del Nilo, pero no del virus del valle del Rift (Atyame et al. 2019) así mismo se ha determinado que la exposición a bifentrina en individuos longevos de *Ae. albopictus* propicia una mayor diseminación del virus del Zika (Knecht et al. 2018). Dado los estudios en otros vectores y la escasez de información sobre el impacto de la resistencia en la competencia vectorial de *Ae. aegypti*, en esta investigación se evaluó la competencia vectorial de esta especie para transmitir DENV-2 en poblaciones resistentes a piretroides con presencia de mutaciones kdr V410L, V1016I, y F1534C y actividades enzimáticas elevadas y con ello se determinó si la resistencia a estos insecticidas y sus mecanismos promueven una mayor susceptibilidad de infección y transmisión de este arbovirus. En consecuencia, los resultados de esta investigación proporcionarán un soporte para la utilización adecuada del control químico y profundizar en la relación arbovirus-vector.

4. HIPÓTESIS

La competencia vectorial a DENV-2 aumenta en función de la actividad de las enzimas GST y OFM en *Aedes aegypti* resistente a permetrina.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la competencia vectorial a DENV-2 de *Ae. aegypti* en función de la actividad de GST y OFM y su relación al efecto individual y de interacción con la alimentación, edad, exposición a un piretroide tipo 1 y el desafío con DENV-2 en una cepa de referencia susceptible a piretroides y una cepa de campo resistente a permetrina.

5.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto e interacción de la edad, tipo de alimentación, pre-exposición con CL_{30} de permetrina y el desafío viral con DENV-2 en la actividad de OFM y GST
2. Establecer la relación entre carga viral de DENV-2, la pre-exposición a permetrina y la actividad de OFM, GST.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Para determinar el impacto de la resistencia a los piretroides, la exposición a insecticidas y la influencia de la actividad enzimática de OFM y GST en la competencia vectorial para DENV-2 en *Ae. aegypti* se utilizaron dos cepas de *Ae. aegypti*. La cepa New Orleans (NO) caracterizada por su susceptibilidad a insecticidas, incluidos los piretroides, se utilizó como cepa de referencia no refractaria a la infección por DENV-2. Para evaluar la influencia de la resistencia a la permetrina y el impacto de la actividad basal alterada de OFM y GST en la competencia vectorial a DENV-2, se utilizó una cepa resistente a permetrina recolectada en Monterrey (MTY), México (25° 41' 11.8068" N, 100° 18' 58.0176" W). En todos los procedimientos experimentales las larvas de ambas cepas se criaron en bandejas de plástico que contenían 4 ml de agua del grifo y 0.9 mg de proteína de hígado bovino en polvo por larva. Este esquema de cría se utilizó para evitar influencias externas en el desarrollo de los estadios inmaduras y siguiendo las investigaciones de Asahina (1964) y Pérez et al. (2004). Las pupas fueron trasladadas a cámaras de emergencia y los adultos se mantuvieron en jaulas de 30 X 30 cm. La producción de huevos se obtuvo mediante alimentación con sangre por membrana artificial utilizando sangre de oveja desfibrinada. Ambas cepas se mantuvieron en las mismas condiciones de insectario (26 ± 2 °C, 70 ± 10 % HR).

6.2. Caracterización de la cepa resistente a piretroides

Para confirmar que la población recolectada de campo presentará las características deseadas se realizaron bioensayos de exposición para confirmar la resistencia a permetrina y ensayos enzimáticos para corroborar que las actividades basales de OFM y GST se encontraran alteradas. Además, se determinó la presencia de mutaciones kdr en esta misma cepa. Para caracterizar la susceptibilidad de la cepa MTY a la permetrina se utilizó la relación de resistencia (RRCL₅₀). El RRCL₅₀ se calculó dividiendo la CL₅₀ de permetrina de la población de campo entre la CL₅₀ de la cepa susceptible. Esta cepa fue posteriormente clasificada siguiendo los criterios de (Mazzarri & Georghiou, 1995),

donde un valor de $RRCL_{50} < 5$ indica susceptibilidad, $RRCL_{50} = 5-10$ resistencia moderada y $RRC_{50} > 10$ perfil resistente. De manera similar, el estado de actividad de GST y OFM en la cepa MTY se clasificó comparando la actividad enzimática de MTY con la actividad encontrada en la cepa susceptible a NO y siguiendo el criterio de Montella et al. (2007). Ante esto, cuando $< 15\%$ de los individuos de campo no excedieron el percentil 99 del valor de actividad de la cepa de NO, la actividad enzimática se caracterizó como no alterada, $15-50\%$ como incipientemente alterada y $> 50\%$ como alterada. Finalmente, las frecuencias de las mutaciones *kdr* V410L, V1016I y F1534C de la cepa MTY se obtuvieron siguiendo el procedimiento que se describe a continuación.

6.3. Diseño experimental

Se utilizaron 17 tratamientos para analizar la competencia vectorial de *Ae. aegypti* para DENV-2 y su relación con las actividades de GST y OFM en el contexto del estado de alimentación y la edad del mosquito susceptibles y resistentes a la permetrina. En cuanto al estado de alimentación, los mosquitos se separaron en tres categorías: sin alimentación, alimentados con azúcar y alimentados con sangre. Asimismo, se utilizaron cuatro edades: mosquitos de 1, 6, 12 y 19 días. Tanto la exposición a permetrina como la exposición al DENV-2 se trataron como variables binomiales; es decir, los mosquitos estuvieron o no expuestos a la dosis letal 30 (LD_{30}) de insecticida o expuestos al DENV-2. Todos los tratamientos analizados se obtuvieron combinando las covariables (estado de alimentación y edad), el desafío viral y la exposición a permetrina (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos experimentales.

Tratamiento	Edad (días)	Alimentación	Exposición	Desafío viral
1	1	-	-	-
2	6	Sacarosa	-	-
3	6		-	-
4	12	Sangre	-	-
5	19		-	-
6	6		-	
7	12	Sangre	-	DENV-2
8	19		-	
9	6			-
10	12	Sacarosa	LD ₃₀	-
11	19			-
12	6			-
13	12	Sangre	LD ₃₀	-
14	19			-
15	6			
16	12	Sangre	LD ₃₀	DENV-2
17	19			

El quinto día después de la eclosión se ofreció a los mosquitos alimentación con azúcar y sangre. La exposición a la dosis subletal de permetrina se realizó al quinto día. Después de la exposición al insecticida, los mosquitos fueron transferidos a contenedores de recuperación y se les ofreció un hisopo de algodón impregnado de azúcar. Después del período de recuperación de 24 h (día 5), se ofreció a los mosquitos alimento con sangre infectada o no infectada. La Figura 7 muestra un esquema de los tratamientos experimentales (A) y el cronograma de los tratamientos (B).

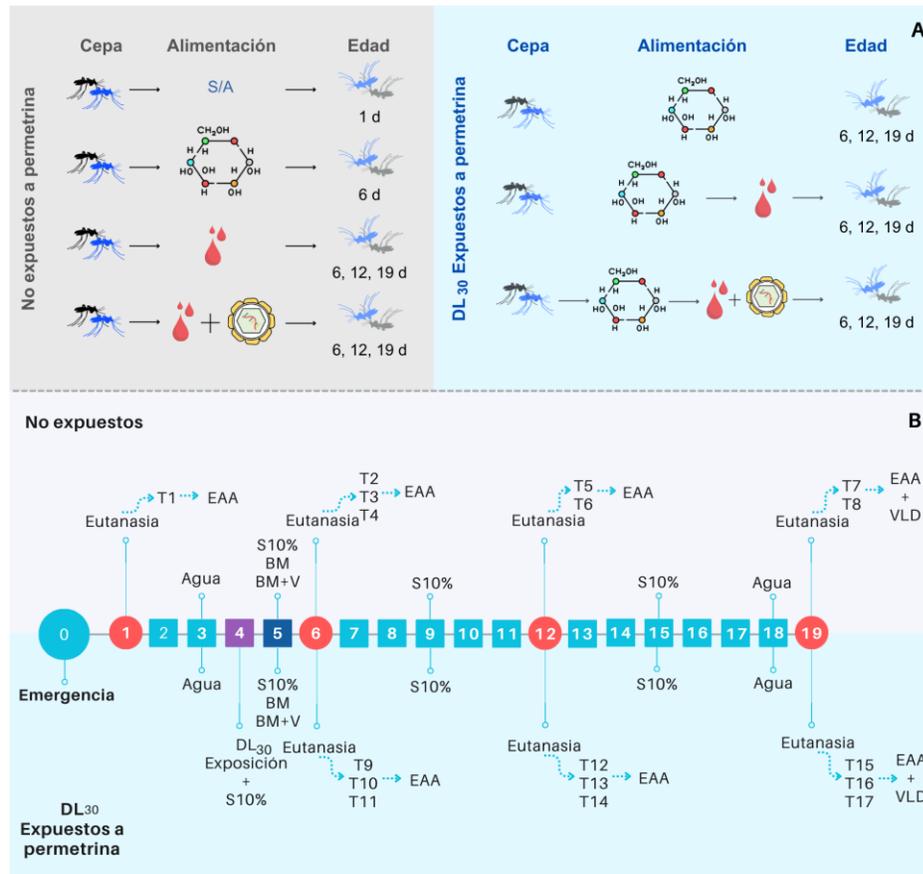


Figura 7. Descripción general de los tratamientos experimentales (A) y cronograma de aplicación de los tratamientos (B). S/A, sin alimentación; S10%, sacarosa al 10%; BM, alimentación sanguínea; BM+V, alimentación sanguínea con DENV-2; EAA, determinación de actividad enzimática; VLD; determinación de carga viral.

6.4. Exposición subletal a permetrina y determinación de LC₃₀

La CL₃₀ y CL₅₀ de permetrina se estimaron con base en ambas poblaciones mediante un análisis de dosis-respuesta utilizando el bioensayo en botella descrito por (Brogdon & Mcallister, 1998). Brevemente, 60 mosquitos hembra (de 3 a 5 días de edad) distribuidos en 20 hembras por botella fueron expuestos a varias dosis de permetrina. Después de 1 h de exposición, todos los mosquitos se transfirieron suavemente a un recipiente de recuperación sin insecticida y se les ofreció una torunda de algodón empapada en una solución de azúcar al 10 %. La mortalidad se registró a las 24 h. La cepa susceptible NO se expuso a 0.08, 0.15, 0.3, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1 y 1.5 µg/frasco de

permetrina. Por otro lado, la cepa MTY resistente a la permetrina fue expuesta a 7, 13, 20, 35, 45, 60, 64, 68, 80 y 120 µg/frasco de permetrina. Los datos de los bioensayos de dosis-respuesta se analizaron por medio del análisis probit (Finney, 1971) en Polo Plus® version 0.03 para estimar las concentraciones letales.

6.5. Actividad enzimática

La actividad de OFM y GST se evaluó mediante técnicas espectrofotométricas (Brogdon & Barber, 1990; Brogdon et al., 1997) utilizando el tórax de 20-30 mosquitos de los 17 tratamientos analizados. Cada tórax se maceró dentro de un microtubo de 2.0 ml que contenía 800 µl de Tris-HCl frío (0.1 M, pH 8.2). Los valores de actividad de OFM y GST se corrigieron por la cantidad total de proteína determinada mediante el procedimiento de cuantificación de Bradford (Bradford, 1976).

6.5.1. Oxidasas de función mixta

Para medir la actividad de OFM, se utilizaron 100 µL de homogeneizado por triplicado. La reacción consistió en agregar a cada repetición 200 µL de TMBZ (diclorhidrato de 3,3,5,5-tetrametilbencidina) disuelto en metanol y acetato de sodio (0.25 M, pH 5.0) junto con 25 µL de peróxido de hidrógeno (3 %). Después de 10 min de incubación a temperatura ambiente, se cuantifica la TMBZ oxidada midiendo a una longitud de onda de 620 nm. Se incluyeron controles negativos y positivos en las placas de reacción. Como control negativo se utilizó el tampón de maceración (Tris-HCL, 0,1 M, pH 8.2), en combinación con TMBZ y peróxido de hidrógeno. Por otro lado, el control positivo se obtuvo mezclando 0.02 µg de Citocromo C, TMBZ y peróxido de hidrógeno.

6.5.2. Glutación S transferasa

La reacción consistió en agregar 100 µL de glutatión reducido (2 mM) y 100 µL de 1-cloro-2,4 dinitrobenceno (CDNB 1 mM) previamente diluidos en acetona y Tris-HCL (0.1 M pH 8.2). La producción de GST-CDNB se cuantificó a 340 nm inmediatamente (T0) y después de 10 min de incubación (T10) a temperatura ambiente.

La diferencia entre T10 y T0 se utilizó como valor de actividad. La actividad de GST también se determinó por triplicado utilizando 100 μl de homogeneizado.

6.5.3. Concentración de proteínas

Brevemente, se agregaron 20 μl de homogeneizado por triplicado y se agregaron 200 μl de reactivo de Bradford a cada pocillo. La concentración de proteínas se encontró leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm.

6.5.4. Determinación de actividad de OFM y GST

Todos los valores de actividad se obtuvieron siguiendo a Valle et al. (2006) y Hemingway (1998). Se utilizaron curvas de calibración para calcular la concentración de proteína total de las muestras y la actividad de OFM. Estas curvas se generaron utilizando controles estándar. Para la concentración de proteína se utilizaron soluciones de Albúmina Sérica Bovina (BSA) que oscilaron entre 0.001 y 5.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para OFM, se utilizaron soluciones de Citocromo C que oscilaron entre 0.002 y 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La concentración de proteína y la actividad de OFM se determinaron promediando tres mediciones de absorbancia y corrigiéndolas por el volumen total de homogeneización. Cada valor promediado se multiplicó por un factor de conversión obtenido del análisis del modelo lineal de los controles estándar de BSA para la concentración de proteínas. Para OFM, los valores promedio se corrigieron por el contenido total de proteína y se multiplicaron por un factor de conversión obtenido del análisis del modelo lineal de los estándares de citocromo C. Para GST, se promediaron los valores de absorbancia, corregidos por el volumen de homogenización, y se incorporaron los parámetros empleados por Hemingway (1998), es decir, el valor del coeficiente de extinción del producto de reacción y la longitud del camino del espectrofotómetro, para determinar la actividad final.

6.6. Genotipificación de poblaciones de *Ae. aegypti* para mutaciones kdr

6.6.1. Extracción de DNA

La genotipificación de individuos se realizó para identificar las frecuencias alélicas de los loci en donde se registran las mutaciones kdr presentes en poblaciones mexicanas de *Ae. aegypti*. Para ello se extrajo el DNA de mosquitos hembra *Ae. aegypti* utilizando la extracción por sales modificada a partir de Coen et al. (1982) la cual consta de una fase de lisis, precipitación del DNA, lavados y solubilización. La lisis celular se llevó a cabo por medio de la maceración de mosquitos individuales en microtubos de 1.5 mL con ayuda de un pistilo y 50 µL de buffer de macerado (NaCl 0.1 M, Sacrosa 0.2 M, Tris-HCl 0.1 M pH 9.1, EDTA 0.05 M, SDS 5 %). Una vez macerada la mayor parte del mosquito se adicionó 50 µL de buffer y se centrifugó por 1 min a 13 000 rpm. Al concluir la centrifugación se incubó el homogenado a 65 °C durante 30 min seguido de la adición de 15 µL de acetato de potasio (8 N). La muestra fue incubada en hielo durante 30 min y centrifugada a 13 000 rpm durante 15 min. La precipitación del DNA se llevó a cabo por medio de la separación del sobrenadante y la adición de 200 µL de alcohol etílico absoluto frío en un microtubo nuevo. Este se incubó a -20 °C durante toda la noche, para al día siguiente centrifugar a 13 000 rpm durante 5 min. Posterior a la centrifugación se decantó el contenido y se agregó 200 µL de etanol al 70 % y se centrifugó por 5 min a 13 000 rpm. Este paso fue repetido en dos ocasiones para finalizar secando el pellet de DNA y se resuspendió en 50 µL de agua destilada. La calidad de la extracción fue evaluada por medio de espectrofotometría UV visible mediante las relaciones 260/280 y 260/230.

6.6.2. Detección de mutaciones kdr

Las mutaciones del gen del canal de sodio dependiente de voltaje relacionadas a resistencia a insecticidas fueron detectadas en las poblaciones de estudio por medio de reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Las mutaciones V410L, V1016I, y F1534C fueron evaluadas utilizando los cebadores descritos en el Tabla 2, para cada uno de los oligonucleótidos descritos se tienen dos amplicones esperados según el

estado susceptible (V410, V1016, y F1534) o la mutación (L410, I1016, C1534) y el perfil de temperatura de fusión esperado de su curva de calibración.

Tabla 2. Cebadores utilizados para identificación de las mutaciones kdr V1016I, V410L, y F1534C.

Mutación	Alelo	Secuencia	Melting (°C)
V1016I ^a	Val1016	GCGGGCGGCGGGGGCGGGGCCACAAATTGTTTCCCA	81
		CCCGCACCGG	
	Ile1016	GCGGGCACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA	78
	1016-R	TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC	
F1534C ^b	F1534-F	GCGGGCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATATT	81
	C1534-F	GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCTCTACTTTGT	83
		GTTCTTCATCATGTG	
	1534-R	TCTGCTCGTTGAAGTTGTCGAT	
V410L ^c	V410 F	ATCTTCTTGGGTCGTTCTACCGTG	83
	L410 F	ATCTTCTTGGGTCGTTCTACCATT	81
		410-R	

Los cebadores utilizados fueron descritos originalmente por: ^aSaavedra-Rodríguez et al., 2007, ^bYanola et al., 2011, y ^cSaavedra-Rodríguez et al., 2018.

Las reacciones de PCR constaron de 12.5 µL de Master Mix Go Taq (2x), 0.05 µL de cebador sentido y antisentido para la mutación V410L (1 µM), 0.15 µL de cebadores para V1016I (5 µM), y 0.075 µL para F1534C (0.25 µM). Lo anterior se hizo por separado para cada mutación agregando 100 ng de DNA genómico y aforando con agua libre de nucleasas a volumen final de 25 µL para V410L y 15 µL para el resto de las mutaciones. El protocolo de amplificación para cada uno de los cebadores se muestra en el Tabla 3.

Tabla 3. Protocolo de amplificación de mutaciones kdr.

V1016I		F1534C		V410L	
Temperatura (°C)	Tiempo	Temperatura (°C)	Tiempo	Temperatura (°C)	Tiempo
95	4 min	95	3 min	95	3 min
30 ciclos					
95	10 s	95	10 s	95	1 min
60	10 s	57	30 s	56	20 s
72	30 s	72 ^a	30 s	72 ^a	20 s
Curva de fusión					
95	10 s	95	10 s	95	10 s
65	10 s +0.3°C	65	10 s +0.3°C	65	10 s +0.3°C
95	10 s	95	10 s	95	10 s

^aDetección de amplicones generados

6.7. Análisis de competencia vectorial para virus del dengue serotipo 2

6.7.1. Cultivo viral de DENV-2

El virus que fue utilizado para llevar a cabo las infecciones experimentales es una cepa de referencia de dengue serotipo 2 (DENV-2) identificada como Nueva Guinea C cultivada en la línea celular C6/36 proveniente de *Ae. albopictus*. El cultivo celular de C6/36 fue realizado en medio Leibovitz suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 10 % de triptosa en condiciones de incubación a 28 °C sin CO₂. Las células C6/C36 se sembraron en frascos de cultivo y al alcanzar una confluencia del 80 % se infectó la monocapa celular con la previa remoción del medio de cultivo a una multiplicidad de infección de 0.1. El virus agregado al cultivo celular fue incubado durante 90 minutos para su absorción con agitación intermitente cada 15 min. Una vez concluido el tiempo de absorción del inóculo, fue eliminado adicionando buffer de fosfatos PBS (1X,

pH 7.4) en dos ocasiones para posteriormente añadir medio Leibovitz suplementado con SFB y triptosa. El sobrenadante del cultivo celular fue colectado en viales hasta observar un efecto citopático y será almacenado a -70 °C. Lo anterior fue llevado a cabo dentro de un laboratorio con nivel de bioseguridad nivel dos dentro de las instalaciones del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI).

6.7.2. Titulación viral

Para obtener los títulos del virus del dengue obtenidos en los viales almacenados a -70 °C se utilizó el ensayo en placas en células Vero. Las células Vero se sembraron en placa de 24 pozos con medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM) adicionado con 5 % de SFB y 1 % de L-Glutamina, siguiendo un periodo de incubación de dos días a 37 °C y 5 % de saturación de CO₂. Al obtenerse una confluencia de 80 al 90 % se inocularon las células Vero con diluciones seriadas del virus del dengue previamente obtenido desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁸ diluyendo con medio DMEM sin añadir ningún suplemento. Al adicionar el inoculo y este fuera absorbido durante 90 min, se retiró inoculo y se añadió medio DMEM suplementado con 5 % de SFB y 1.5 % de carboximetilcelulosa. Posteriormente, las placas fueron incubadas por siete días sin movimiento a 37 °C y al finalizar este periodo de incubación la carboximetilcelulosa se desechó realizando 3 lavados con PBS sin tocar la monocapa de células. Al concluir, la monocapa de células es fijada por medio de paraformaldehído al 1 % en PBS 1X por 30 min y fue teñido con cristal violeta al 1.5 % por 30 min para realizar el conteo de las placas de lisis. El titulo viral fue calculado a través de unidades formadores de placa (PFU) por mililitro utilizando la siguiente formula: $PFU/mL = (\text{número de placas} / \text{inverso de la dilución}) * \text{volumen del inoculo en mL}$. Metodología descrita por Santana ME (2018).

6.7.3. Infecciones orales con DENV-2

Las infecciones virales fueron llevadas a cabo en las hembras de los tratamientos antes mencionados. Para ello, las hembras se alimentaron con sangre de conejo defibrinada mezclada a razón de 1:1 con virus del dengue previamente obtenido y con un título viral no menor de 5x10⁶ PFU/mL. La ingesta sanguínea se llevó a cabo en

alimentadores artificiales cubiertos con politetrafluoroetileno por 30 min a 37 °C. Las hembras alimentadas a repleción fueron separadas en contenedores de grupos de 50 hembras para futuros ensayos y mantenidas en condiciones de insectario previamente detalladas.

6.7.4. Detección de DENV-2 por PCR

La carga viral fue determinada en el intestino medio (como aproximación a la infección en el mosquito) y la saliva (como aproximación a la transmisión de DENV-2 en mosquitos) de mosquitos expuestos o no expuestos a permetrina y desafiados con DENV-2. Solamente el tratamiento de mosquitos de 19 días de edad fue utilizado para esta cuantificación. Como control negativo un subgrupo de 10 mosquitos de la misma edad, pero no desafiados con DENV-2 fue probado para la presencia de DENV-2. La saliva fue extraída por medio del método descrito por Heitmann et al. (2018). A partir de los tejidos y el tratamiento mencionado se extrajo el RNA mediante del kit QIAmpViral RNA siguiendo las recomendaciones del fabricante. La extracción basa su funcionamiento a partir de la lisis de las células y la consecuente inactivación de RNAsas, la unión no covalente del RNA a una membrana de silica, una serie de lavados para eliminar contaminantes del aislamiento del ácido nucleico y una elusión en una solución amortiguadora. Posterior a la extracción de RNA se sintetizó la cadena complementaria de DNA (cDNA) utilizando el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis e iniciadores específicos para DENV-2. Esta técnica tiene su fundamento en la transcripción reversa de DNA a partir de un molde de RNA por medio de la transcriptasa reversa M-MuLV la cual carece de actividad de RNAsa H y evita la degradación del RNA una vez sintetizada la primera cadena de cDNA. El cDNA obtenido se utilizó para la detección de DENV-2 en los tejidos analizados por medio de PCR. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando los cebadores sentido mFU1 (5'-TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAAAA-3') y antisentido CFD2 (5'-GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC-3') descritos por Kuno et al. (1998), diseñados para amplificar una región de 266 pb de la proteína no estructural NS5. El protocolo de amplificación utilizado consta de una desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos a 94, 60 y 72 °C por 30 s para las fases de desnaturalización,

alineación y extensión, respectivamente, para concluir con un ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min.

6.7.5. Curva estándar para cuantificación de carga viral

Para realizar la cuantificación de la carga viral por medio de PCR cuantitativa en cada uno de los tejidos analizados fue necesario generar una curva estándar a partir de un control de DNA proveniente del DENV-2. Para ello, se amplificó un fragmento de 152 pb utilizando los primers sentido 5'- CAATATGCTGAAACGCGAGAGAA-3' y antisentido 5'-CCCCATCTA TTCAGAATCCCTGC-3 (Santana 2018). Una vez obtenidos los productos de PCR se purificaron por medio del kit Min Elute PCR para la eliminación de sobrantes de la reacción como dNTP, polimerasa, iones, entre otros. El DNA obtenido de las reacciones fue evaluado por medio de espectrofotometría UV-visible para determinar su pureza y concentración.

6.7.6. Determinación de carga viral

Para determinar la carga viral en los tejidos analizados se utilizó la PCR cuantitativa (qPCR) empleando SYBR green como molécula reportera. Las reacciones de qPCR se elaboraron con los cebadores descritos por Kuno (1993) siguiendo el mismo protocolo utilizando el termociclador Step One Plus®. La determinación de la carga viral en los tejidos analizados se obtuvo por comparación con la curva estándar realizada por triplicado y diluciones a razón 1:5 del estándar generado por la clonación del fragmento de DENV-2.

6.8. Análisis de resultados

Dado que los datos obtenidos no siguen una distribución normal y, además, se detectó desigualdad de varianzas por medio de la prueba de Levene, se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas.

Para evaluar la diferencia en las actividades basales medias de OFM y GST entre las cepas de NO y MTY se realizó una prueba de Mann-Whitney. Para comparar la

actividad enzimática de los cuatro grupos de edades y tipos de alimentación se realizó una prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de suma de rangos de Wilcoxon con corrección de Holm (1979) para determinar diferencias estadísticas entre los niveles de cada factor. En comparaciones con solo dos niveles se realizó una prueba de Mann-Whitney para comparar la actividad de las enzimas relacionadas con la exposición a la permetrina y el desafío viral.

La interacción entre la edad, el desafío viral y la exposición a insecticidas relacionados con la actividad de OFM y GST se evaluó comparando las medias marginales estimadas obtenidas de modelos GLM. Los modelos GLM se construyeron utilizando la actividad enzimática (ya sea OFM o GST) como variable respuesta y la edad, el tipo de alimentación sanguínea, y la exposición a insecticidas como predictores. Se utilizó un ANOVA de tipo III utilizando la estimación del índice de verosimilitud X^2 para probar la significancia estadística de cada factor e interacción. Para confirmar las diferencias en los distintos niveles de cada factor de dos o más elementos (p. ej., actividad de OFM entre mosquitos de seis días de edad, no expuestos, alimentados con sangre versus mosquitos de seis días de edad, expuestos a permetrina, alimentados con sangre) se calcularon las medias marginales estimadas y se realizaron comparaciones múltiples de medias con corrección de Tukey.

Finalmente, se construyó un modelo GLM para cada cepa utilizando la carga viral de DENV-2 como variable respuesta en combinación con el estado de exposición a insecticidas, las actividades enzimáticas y el tejido donde se midió la carga viral como predictores. Utilizamos el Criterio de Información de Akaike corregido (AICc) para identificar el modelo con el mejor ajuste. En el modelo final se incluyeron solo los predictores que arrojaron el AICc más bajo. Se calcularon las medias marginales estimadas para probar las diferencias en los niveles de los factores y se realizaron comparaciones múltiples de medias con la corrección de Tukey.

El factor de inflación de la varianza (VIF) se calculó para todos los análisis GLM; cualquier término se eliminó de la fórmula cuando el valor VIF era superior a 5. El nivel de significancia se estableció en $\alpha = 0.05$ para todas las pruebas. Todos los procedimientos estadísticos se realizaron en R (ver. 4.2.2).

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización de la cepa MTY

La RRCL₅₀ estimada de la cepa MTY fue de 71 mg/botella (Tabla 4). Según el criterio de Mazzarri y Georghiou (1995), esta población es resistente a permetrina. Del mismo modo, siguiendo el criterio de Montella et al., (2007) la actividad basal de OFM resultó alterada (el 100 % superó el percentil 99 de la cepa NO), y la actividad GST se clasificó como alterada (el 87.5 % superó el percentil 99 de la cepa NO). Asimismo, se encontró una diferencia estadísticamente significativa para la actividad media de OFM entre NO (μ NO = 111.5689 nmol cyt/mg ptn) y MTY (μ MTY = 241.2337 nmol cyt/mg ptn) (Mann-Whitney U = 550, P<0.001) y GST (μ NO = 0.0455 nmol/mg ptn/min, μ MTY = 0.0837 nmol/mg ptn/min, Mann-Whitney U = 576, P<0.001).

Los alelos mutantes kdr L410, I1016 y C1534 están presentes en la población de campo (MTY) con las siguientes frecuencias 0.6, 0.7 y 0.9, respectivamente. Estos resultados indican que la cepa MTY posee una resistencia fenotípica a la permetrina, y las actividades enzimáticas de OFM y GST se encuentran alteradas basalmente en esta cepa difiriendo estadísticamente de la cepa NO.

Tabla 4. CL₃₀ (μ g/botella) estimada y RR₅₀ para las cepas MTY y NO de *Ae. aegypti*.

Cepa	Pendiente	Pendiente \pm ES	X ²	DF	P	CL ₃₀ (IC _{95%})	RR ₅₀
MTY	4.75	4.11-5.38	15	9	0.0946	41 (6.59-1351)	71
NO	6.36	5.17-7.55	20	8	0.0091	0.6266 (0.33-0.80)	1

7.2. Análisis univariante del efecto de la edad, alimentación, exposición a permetrina, y desafío viral sobre la actividad de OFM

Se comparó el efecto individual de la edad, el tipo de alimentación, la exposición a insecticidas y el desafío viral sobre la actividad de OFM y GST en cada una de las cepas de manera separada y entre ellas. Para los efectos individuales de las covariables en la actividad de OFM, nuestros resultados mostraron diferencia estadísticamente significativa

entre las edades de los grupos (Kruskal-Wallis Chi-cuadrado = 176.8, $P < 0.001$), el tipo de alimento (Kruskal-Wallis Chi-cuadrado = 39.718, $P < 0.001$) y el desafío viral ($U = 22741$, $P < 0.01$), pero no para la exposición a insecticidas ($U = 21716$, $P = 0.4282$) en la cepa NO. En la Tabla 5 se muestra la comparación individual de los niveles de las covariables.

Los mosquitos de seis días de edad presentaron valores de actividad más elevados, seguidos de los mosquitos de 12 días. El grupo de 19 días poseía valores de actividad similares a los del grupo de 1 día. Los individuos alimentados con sangre mostraron los valores más altos de actividad OFM, seguidos de los mosquitos con sangre que contenía virus, los alimentados con azúcar y los mosquitos sin alimentar. Por el contrario, los mosquitos que no fueron desafiados con DENV-2 tuvieron valores de actividad más altos que los que fueron desafiados.

Tabla 5. Comparación de la actividad de OFM por edad, alimentación, exposición a insecticidas, y desafío viral en la cepa NO de *Ae. aegypti*.

Edad			
	1	6	12
6	202.79**		
12	32.37*	-170.42**	
19	17.64	-185.15**	-14.73
Alimentación			
	Sin Alimentación	Sacarosa	Sangre
Sacarosa	54.09**		
Sangre	171.36**	117.26*	
Sangre+DENV-2	59.08**	4.99*	-112.27*
Insecticida			
	Expuestos		
Sin exposición	20.56		
Desafío viral			
	Desafiados		
Sin desafío	45.94**		

Los números indican diferencias en los valores medios de actividad entre los diferentes niveles de las variables analizadas. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$

En la cepa MTY, los grupos de edad (Kruskal-Wallis Chi-cuadrado = 95.91, $P < 0.001$), tipos de alimentación (Kruskal-Wallis Chi-cuadrado = 93.962, $P < 0.001$), estatus de exposición a insecticidas ($W = 10027$, $P < 0.001$), y el desafío viral ($W = 7162$, $P < 0.001$) mostraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de OFM. La variación de la actividad de OFM según los diversos grupos en cada uno de los tratamientos (edad, alimentación, exposición a insecticidas, y desafío viral) se muestran en la Tabla 6.

En esta cepa resistente a la permetrina, la actividad de OFM fue mayor en el grupo de mosquitos de 6 y 19 días de edad en comparación con los de 1 y 12 días de edad. Los grupos alimentados con sangre presentaron valores más altos de actividad de OFM que los individuos sin alimentación o alimentados con azúcar. Por último, los mosquitos expuestos a permetrina y desafiados con DENV-2 presentaron valores de actividad más elevados.

Tabla 6. Comparación de la actividad de OFM entre grupos de edad, tipos de alimentación, exposición a insecticidas, y desafío viral en la cepa MTY de *Ae. aegypti*.

Edad			
	1	6	12
6	437.3086**		
12	229.907**	-207.4016**	
19	353.8536**	-83.4549	123.9466**
Alimentación			
	Sin alimentación	Sacarosa	Sangre
Sacarosa	249.7285**		
Sangre	391.2359**	141.5074*	
Sangre+DENV-2	394.0154**	144.2869**	2.7794*
Insecticida			
	Expuestos		
Sin exposición	-126.9559**		
Desafío viral			
	Desafiados		
Sin desafío	-102.118**		

Los números indican diferencias en los valores medios de actividad entre los diferentes niveles de las variables analizadas. *p<0.05 and **p<0.001

Nuestros resultados muestran diferencia significativa (p<0.0001) para todos los niveles de cada factor entre las cepas NO y MTY. En resumen, la cepa MTY posee una mayor actividad de OFM (Figura 8).

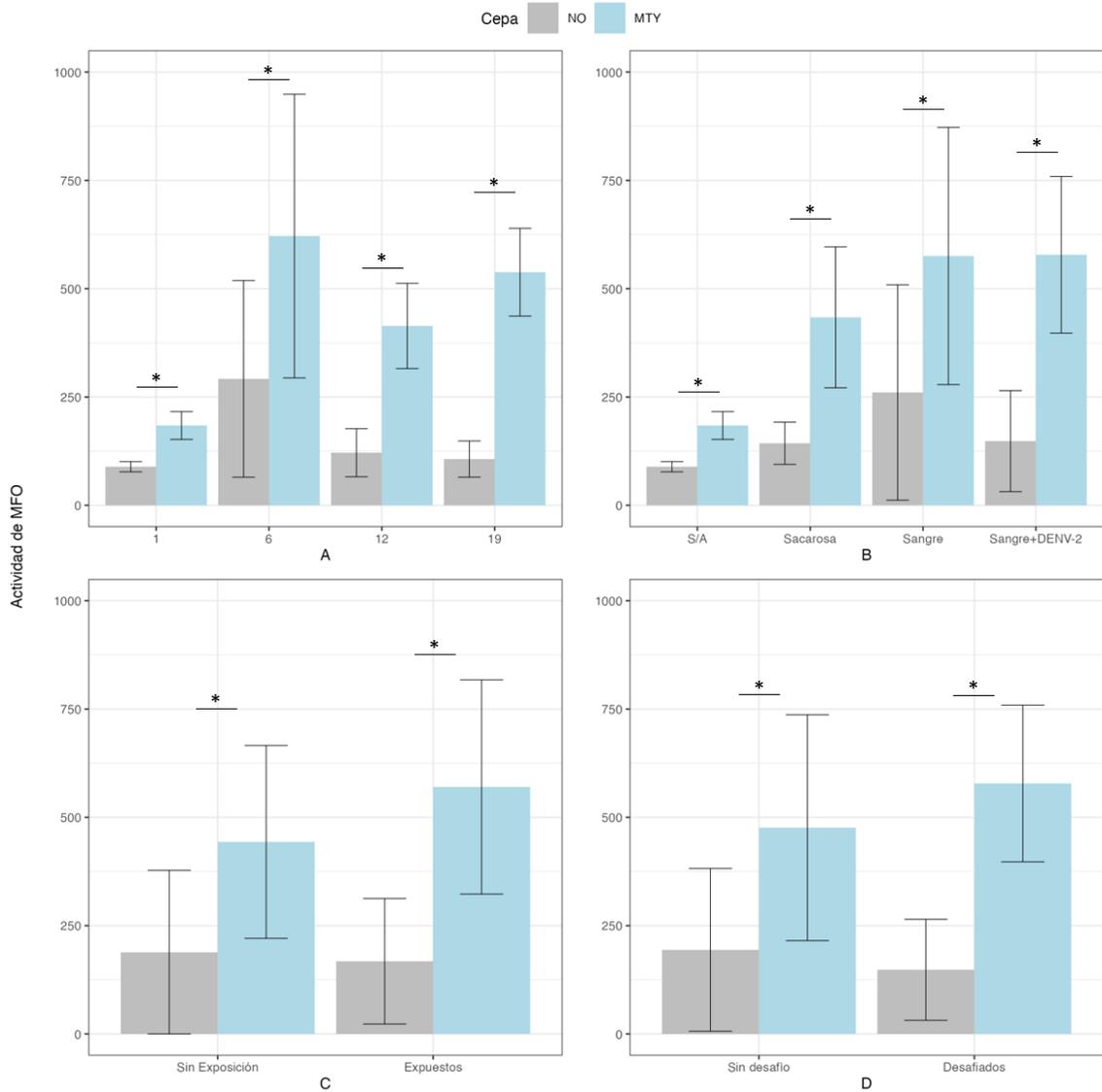


Figura 8. Comparación de la actividad de OFM entre las cepas NO y MTY de *Ae. aegypti* en relación con la edad (A), alimento (B), exposición a insecticidas (C), y desafío viral (D). La barra indica los valores medios de actividad con desviación estándar. * indica una diferencia significativa a $\alpha = 0.05$.

Con la finalidad de obtener los efectos de interacción entre los distintos tratamientos sobre la actividad de OFM, se construyó un modelo GLM utilizando la actividad de OFM como variable de respuesta. La edad, el tipo de alimentación sanguínea (sangre o sangre con DENV-2), la cepa, y la exposición a insecticidas fueron utilizados como predictores. El ANOVA de tipo III (Tabla 7) mostró que el tipo de alimentación con sangre, la exposición a insecticidas y la edad están estadísticamente asociados con la

actividad enzimática de la OFM ($p < 0.001$), pero no la cepa ($p > 0.05$). La cepa se asocia de manera estadística cuando se contemplan interacciones de tres vías.

Tabla 7. ANOVA tipo III para los tratamientos e interacciones para la actividad de OFM.

Factor	LR X²	df	Valor P
Tipo de alimentación sanguínea	12.3748071	1	0.0004
Insecticida	32.4398319	1	<0.0001
Cepa	0.11142022	1	0.7390
Edad	94.4669952	2	<0.0001
Tipo de alimentación sanguínea: Insecticida	35.740169	1	<0.0001
Tipo de alimentación sanguínea: Cepa	104.869749	1	<0.0001
Insecticida: Cepa	57.7539932	1	<0.0001
Tipo de alimentación sanguínea: Edad	7.22881455	2	0.0269
Cepa: Edad	326.947476	2	<0.0001
Tipo de alimentación sanguínea: Insecticida: Cepa	46.8885464	1	<0.0001
Tipo de alimentación sanguínea: Cepa: Edad	79.1289886	2	<0.0001

La Figura 9 muestra las medias marginales estimadas de la actividad OFM según la edad, el tipo de alimentación sanguínea y la exposición a insecticidas. La Tabla 8 muestra un resumen donde se contrastan los tratamientos de mayor relevancia. Los resultados muestran un patrón en ambas cepas en el que la actividad de OFM disminuye con la edad. Además, la interacción entre la exposición al insecticida y la alimentación con sangre indica que la actividad de OFM es mayor en los individuos no expuestos que en los mosquitos pre-expuestos a permetrina de la cepa MTY. Sin embargo, esto no es estadísticamente significativo.

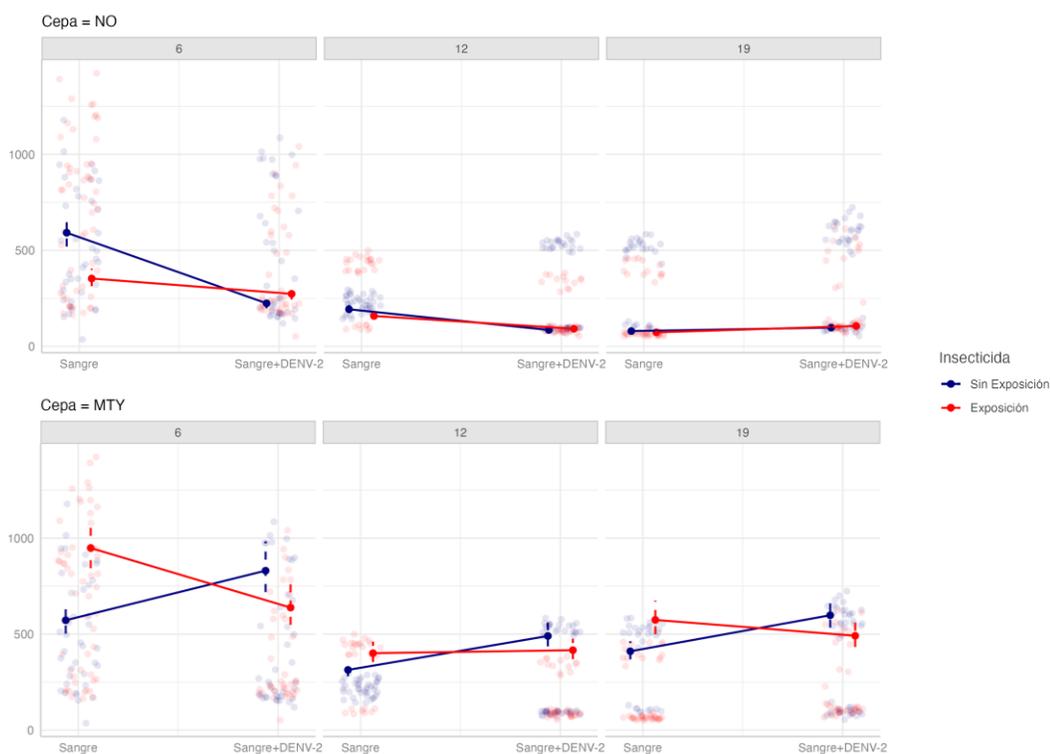


Figura 9. Valores estimados de actividad de OFM en función de la edad, el tipo de alimentación sanguínea, la exposición al insecticida y la cepa obtenidos del GLM.

En resumen, el análisis univariante muestra que el pico máximo de actividad OFM se produce a la edad de 6 días para ambas cepas. Por otra parte, la actividad OFM relacionada con la fuente de alimento, el desafío viral y la exposición a insecticidas difiere entre cepas. La exposición de los mosquitos *Ae. aegypti* NO al DENV-2 o a la permetrina no aumenta la actividad OFM. El valor máximo de actividad OFM para la cepa NO, relacionado con la fuente de alimento se encontró en los mosquitos alimentados con sangre y relacionado con el desafío viral. En cuanto a la exposición a insecticidas, la actividad OFM no difirió estadísticamente entre los grupos. En cambio, en la cepa MTY, los valores máximos de actividad se encontraron en la sangre que contenía DENV-2, en los mosquitos desafiados y en los individuos expuestos. El modelo multivariante muestra que, efectivamente, la actividad disminuye con la edad, y que existe una interacción entre la exposición al insecticida y el tipo de alimentación de la sangre.

Tabla 8. Comparaciones múltiples de medias marginales estimadas de la actividad de OFM entre diferentes cepas de *Ae. aegypti*, estado de exposición a insecticidas y tipo de alimentación sanguínea.

Edad	Grupo 1	Grupo 2	Media	SE	Valor P
6	Sangre no expuestos MTY	Virus expuestos-Sangre MTY	0.000180909	0.000179381	1
	Sangre no expuestos MTY	Virus expuestos-Sangre NO	-0.001909349	0.000255109	<0,0001
	Sangre expuestos MTY	Virus no expuestos-Sangre MTY	-0.000149681	0.000116407	1
	Sangre expuestos MTY	Virus no expuestos-Sangre NO	-0.003406174	0.000301809	<0,0001
12	Sangre no expuestos MTY	Virus expuestos-Sangre MTY	0.000785756	0.000244364	0.181
	Sangre no expuestos MTY	Virus expuestos-Sangre NO	-0.007722547	0.000582729	<0,0001
	Sangre expuestos MTY	Virus no expuestos-Sangre MTY	0.000455167	0.000209603	0.882
	Sangre expuestos MTY	Virus no expuestos-Sangre NO	-0.009219372	0.000582777	<0,0001
19	Sangre no expuestos MTY	Virus expuestos-Sangre MTY	0.00040106	0.000198543	0.94
	Sangre no expuestos MTY	Virus expuestos-Sangre NO	-0.007012951	0.000528417	<0,0001
	Sangre expuestos MTY	Virus expuestos-Sangre MTY	-0.000292091	0.000193003	0.998
	Sangre expuestos MTY	Virus no expuestos-Sangre NO	-0.008509775	0.000547232	<0,0001

7.3. Análisis univariante del efecto de la edad, alimentación, exposición a permetrina, y desafío viral sobre la actividad de GST

Similar a la actividad de OFM en la cepa NO, nuestros resultados indican diferencia estadística entre la actividad de GST entre las categorías de edad (Kruskal-Wallis Chi-cuadrado = 101.14, $P < 0.0001$), tipo de alimentación (Kruskal-Wallis Chi-cuadrado = 76.451, $P < 0.0001$), desafío viral con DENV-2 ($U = 17093$, $P < 0.01$), y exposición a permetrina ($U = 30240$, $P < 0.01$). La Tabla 9 muestra la comparación para cada nivel en los tratamientos analizados.

La actividad de GST en mosquitos de 12 d de edad fue mayor que en otras edades. Inesperadamente, el grupo que no fue alimentado mostró una mayor actividad de GST. En cuanto a la alimentación sanguínea, el grupo alimentado con sangre adicionada con DENV-2 se asoció con una mayor actividad enzimática. Por último, los mosquitos no expuestos y desafiados presentaron actividades más elevadas que sus homólogos expuestos y no desafiados.

Tabla 9. Comparación de la actividad de GST entre categorías de edad, tipos de alimento, exposición a insecticidas, y desafío viral en la cepa NO de *Ae. aegypti*.

Edad			
	1	6	12
6	-0.0132**		
12	0.0008*	0.014**	
19	-0.0046	0.0086**	-0.0054**
Alimentación			
	Sin alimentación	Sacarosa	Sangre
Sacarosa	-0.0046		
Sangre	-0.014**	-0.0094**	
Sangre+DENV-2	-0.0019	0.0027	0.0121**
Insecticida			
	Expuestos		
Sin exposición	0.004*		
Desafío Viral			
	Desafiados		
Sin desafío	-0.0067**		

Para la cepa MTY, la actividad de GST muestra diferencia estadística para las categorías de edad y el tipo de alimento (Kruskal-Wallis Chi-cuadrado = 34.047, $P < 0.0001$ y Kruskal-Wallis Chi-cuadrado = 65.07, $P < 0.0001$, respectivamente). También hay una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con y sin desafío ($U = 7830$, $P < 0.0001$), pero ninguna para los tratamientos expuestos o no expuestos a la permetrina ($U = 12669$, $P = 0.175$). La comparación individual de los niveles dentro de

cada tratamiento (Tabla 10) muestra que GST tuvo mayor actividad en los mosquitos de 1 día de edad, seguidos de los individuos de 12, 19 y 6 días de edad. En cuanto al tipo de alimento, la sangre adicionada con DENV-2 tuvieron mayor actividad de GST que los tratamientos alimentados con sangre sin DENV-2 o azúcar. Por último, no hay diferencia estadística en la actividad de GST entre los mosquitos expuestos o no expuestos a permetrina. Además, los mosquitos desafiados con DENV-2 presentaron valores de actividad más elevados que los individuos no desafiados.

Tabla 10. Comparación de la actividad de GST entre categorías de edad, tipos de alimento, exposición a insecticidas, y desafío viral en la cepa MTY de *Ae. aegypti*.

Edad			
	1	6	12
6	-0.0635**		
12	-0.0308*	0.0327	
19	-0.0553**	0.0082	-0.0245*
Alimentación			
	Sin alimentación	Sacarosa	Sangre
Sacarosa	-0.0876**		
Sangre	-0.0825**	0.0051	
Sangre+DENV-2	0.0105	0.0981**	0.093**
Insecticida			
	Expuestos		
Sin exposición	-0.0367		
Desafío Viral			
	Desafiados		
Sin desafío	-0.0862**		

La actividad de GST también difirió estadísticamente ($p < 0.0001$) para los tratamientos entre ambas cepas de *Ae. aegypti*. Similar a la actividad de OFM, la actividad de GST fue mayor en la cepa MTY (Figura 10).

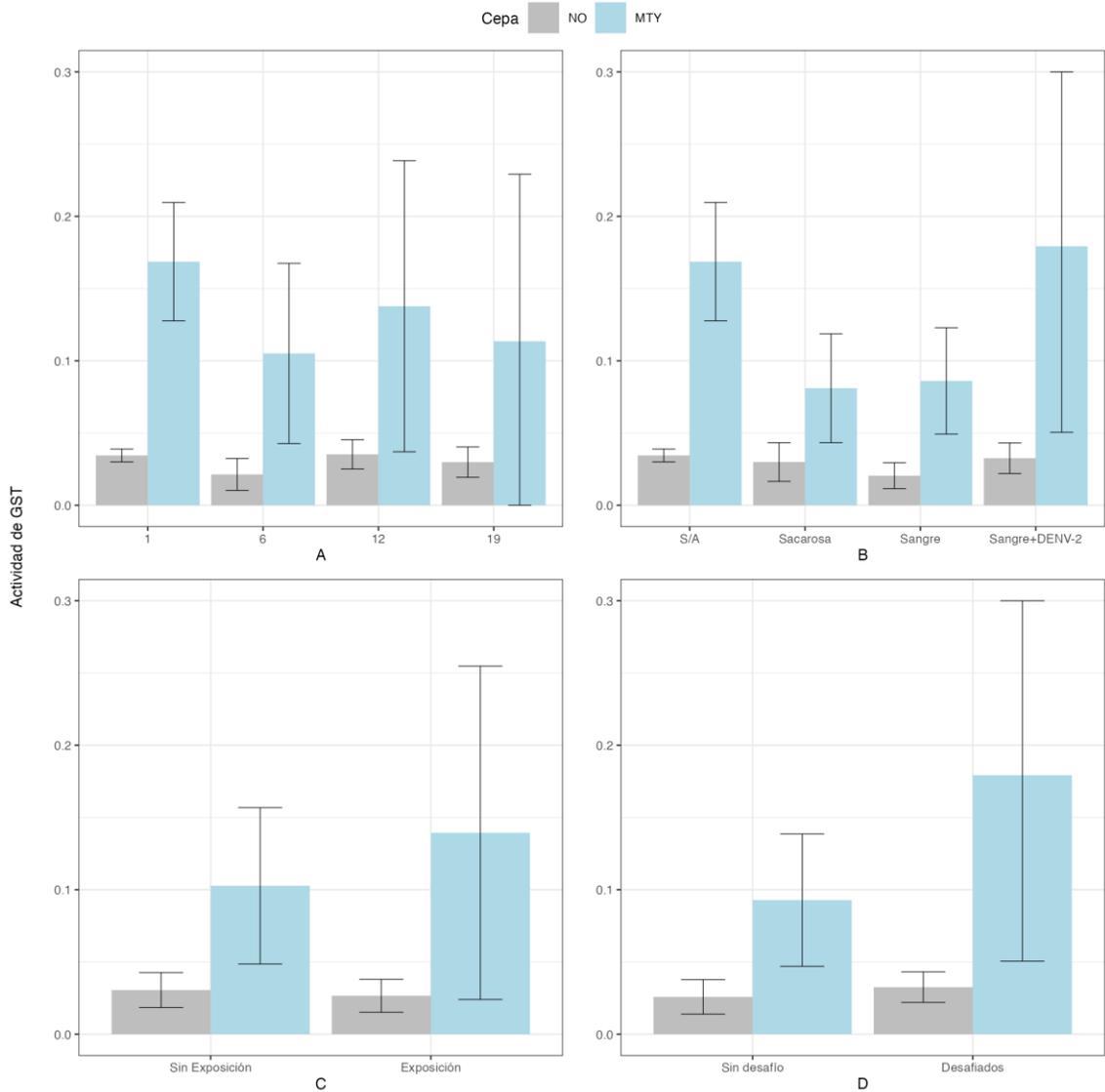


Figura 10. Comparación de la actividad de GST entre las cepas NO y MTY en relación con la edad (A), el tipo de alimento (B), la exposición a permetrina (C), y el desafío viral (D). La barra indica los valores medios de actividad más desviación estándar. * indica una diferencia significativa a $\alpha = 0.05$.

El modelo GLM construido para la actividad GST como variable respuesta incluyó los mismos predictores categóricos y sus interacciones: edad, tipo de alimentación sanguínea, cepa y exposición a insecticidas. La relevancia estadística de cada factor y su interacción se analizó mediante un ANOVA de tipo III. El análisis univariante muestra que la cepa y edad alteran de manera estadísticamente significativa la actividad de GST.

Además, estos análisis muestran un efecto de interacción entre el tipo de alimentación sanguínea y la exposición a permetrina (Tabla 11). La interacción de tres vías entre el tipo de alimentación sanguínea, la cepa y la edad no fue estadísticamente significativa.

La figura 11 muestra las medias marginales estimadas de la actividad GST basadas en el modelo GLM; el análisis de las medias marginales estimadas para este modelo indica una actividad de GST homogénea para la cepa NO. No se encontraron diferencias significativas a través de las comparaciones de las medias marginales estimadas. Por otra parte, la población resistente a la permetrina mostró que los individuos alimentados con sangre que contenía DENV-2 y expuestos a la permetrina tenían valores más altos de actividad GST (Tabla 12, Anexo 1).

Tabla 11. ANOVA tipo III para los tratamientos e interacciones para la actividad de GST.

Factor	LR X2	Df	Valor P
Tipo de alimentación sanguínea	0.23240514	1	0.6300
Insecticida	0.21764119	1	0.6410
Cepa	432.665342	1	<0.0001
Edad	7.44710619	2	0.0241
Tipo de alimentación sanguínea: Insecticida	50.7310228	1	<0.0001
Tipo de alimentación de sangre: Cepa	8.35452711	1	<0.05
Insecticida: Cepa	0.02510824	1	0.8740
Tipo de alimentación sanguínea: Edad	8.10923481	2	0.0173
Cepa: Edad	69.7432304	2	<0.0001
Tipo de alimentación sanguínea: Insecticida: Cepa	4.88451445	1	0.0271
Tipo de alimentación sanguínea: Cepa: Edad	1.0797814	2	0.5830

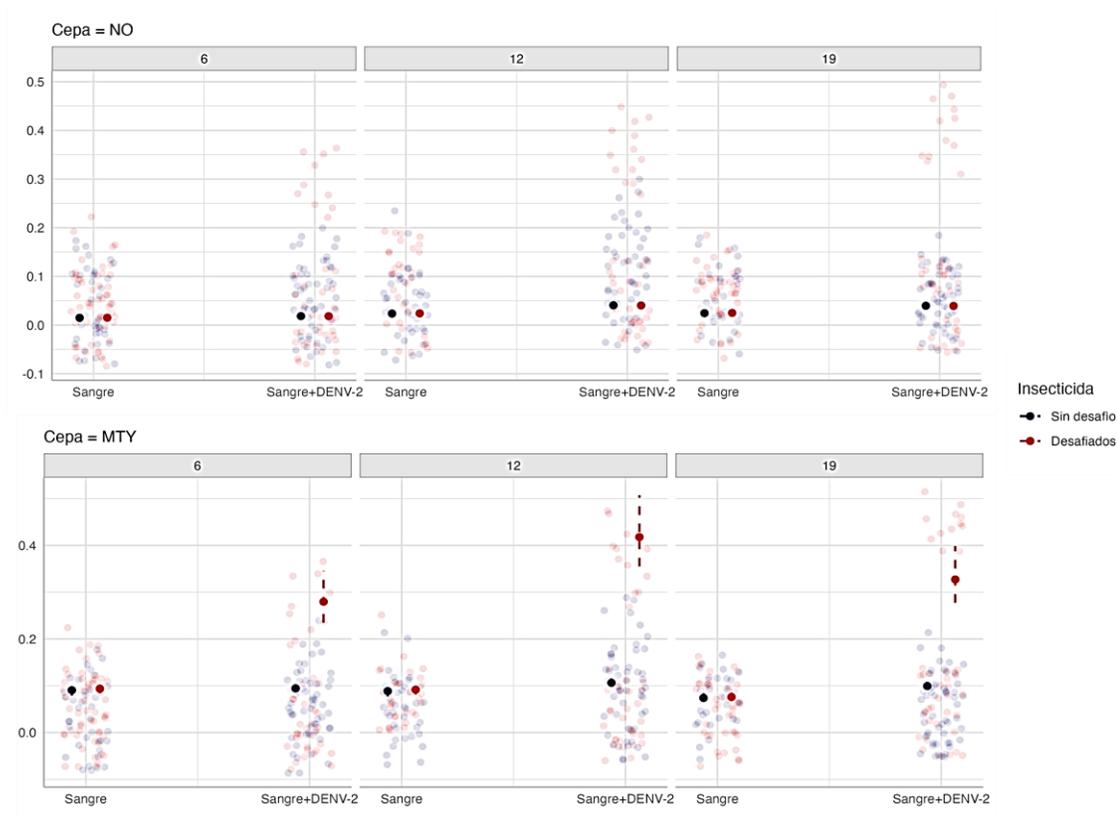


Figura 11. Medias marginales estimadas de la actividad de GST en función de la edad, el tipo de alimentación sanguínea, la exposición a permetrina y cepa.

En resumen, los resultados del análisis univariante de la actividad de GST señalan un patrón único en la cepa NO. En primer lugar, el pico de actividad se alcanza en mosquitos de 12 días. Los mosquitos no alimentados y no expuestos a permetrina mostraron una actividad enzimática superior a la de cualquier otra fuente de alimento o a la de los individuos expuestos, respectivamente. Sin embargo, el desafío viral se asoció con una mayor actividad GST.

Por el contrario, la cepa resistente a permetrina mostró una mayor actividad de GST en mosquitos de 1 día de edad. La ingestión de sangre con virus se asoció con mayores niveles de actividad de GST al igual que los mosquitos desafiados. En esta cepa, la exposición a permetrina no alteró la actividad enzimática. Los resultados del análisis multivariante indican que la actividad de GST en la cepa NO es homogénea a través de los distintos tratamientos. No obstante, en la cepa MTY, los mosquitos expuestos y los alimentados con sangre adicionada con DENV-2 presentaron una mayor actividad GST.

7.4. Carga viral de DENV-2 en cepas de *Ae. aegypti* y su asociación a la actividad enzimática y exposición a permetrina

Para ambas cepas, se determinó la carga viral de DENV-2 en el intestino medio y saliva de los mosquitos desafiados a los 14 dpi. Posteriormente, se comparó la carga viral de DENV-2 según diferentes niveles de actividad de OFM, exposición a permetrina, y entre cepas. En la Figura 12 se muestra el diagrama de caja destacando las cargas virales de DENV-2 cuantificadas en el intestino medio y la saliva de mosquitos expuestos o no expuestos a permetrina. Los valores medios de las cargas virales de DENV-2 se encuentran en la Tabla 13.

Para la cepa NO, el análisis univariante no paramétrico (prueba de Wilcoxon) muestra que no existe diferencia estadística entre la carga viral en el intestino medio de los individuos expuestos y no expuestos ($W = 102$, $P = 0.9475$) ni en la carga de DENV-2 medida en la saliva ($W = 92$, $P = 0.6135$). Este patrón fue encontrado en la cepa MTY tanto en intestino medio ($W = 48.5$, $P = 0.2043$) o en saliva ($W = 51.5$, $P = 0.118$).

Al comparar entre cepas (Figura 12), nuestros resultados indican diferencia estadística entre la carga viral del DENV-2 medida en el intestino medio de mosquitos NO y MTY no expuestos ($W = 22$, $P < 0.05$). Lo mismo ocurre con la carga viral en el intestino medio de los mosquitos expuestos ($W = 15$, $P < 0.05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la carga viral cuantificada en la saliva de los mosquitos NO y MTY no expuestos ($W = 44$, $P = 0.061$) o expuestos ($W = 48.5$, $P = 0.84$).

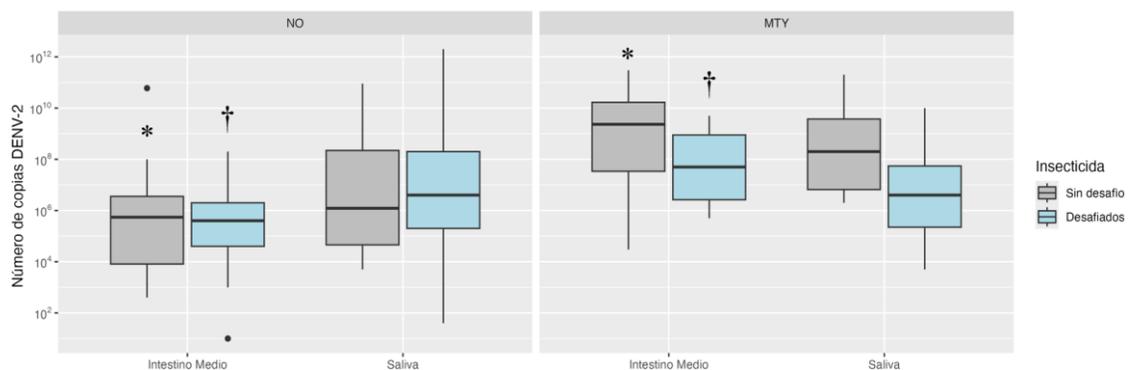


Figura 12. Carga viral de DENV-2 en intestino medio y saliva de *Ae. aegypti* expuestos y no expuestos a permetrina. * y † indican una diferencia estadística entre estas medias.

Tabla 12. Cargas virales de DENV-2 en intestino y saliva de individuos expuestos y no expuestos a permetrina.

Cepa	Insecticida	Tejido	Carga viral (media)
MTY	Expuestos	Intestino medio	9.80E+08
	Expuestos	Saliva	1.40E+09
	No expuesto	Intestino medio	3.80E+10
	No expuesto	Saliva	2.40E+10
NO	Expuestos	Intestino medio	3.90E+07
	Expuestos	Saliva	1.60E+11
	No expuesto	Intestino medio	3.80E+09
	No expuesto	Saliva	9.80E+09

Se utilizó un enfoque GLM para probar la contribución de los factores y su interacción en la carga viral medida en el intestino medio y la saliva de la cepa NO. El modelo completo incluía como predictores el tejido (intestino medio y saliva), la exposición a insecticidas (pre-expuesta o no expuesta), las actividades de OFM y GST, y la interacción entre el tejido y el estado de exposición a insecticidas. No se consideraron otras interacciones ya que ello aumentaba el VIF de los predictores (>5). El modelo con mejor ajuste incluyó el tejido, la exposición al insecticida y la actividad de OFM resultando en los valores AICc más bajos (Tabla 14). La Figura 13 muestra el patrón de las cargas virales de DENV-2 cuando la actividad de OFM se mantiene constante en tres niveles diferentes en la cepa NO. Cuando se analiza la carga viral en cada nivel de actividad de OFM por separado, la única diferencia estadísticamente significativa se produce al comparar la carga viral medida en el intestino medio de los mosquitos no expuestos frente a la carga de DENV-2 en la saliva de los mosquitos expuestos (Figura 14). Además, una tendencia indica que las cargas virales disminuyen a medida que aumenta la actividad de OFM en el intestino medio y la saliva a pesar del estado de exposición a insecticidas, lo cual es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) (Tabla 14). Por último, nuestro modelo muestra una tendencia a que los individuos expuestos muestren mayores cargas virales que los no expuestos en ambos tejidos, aunque este patrón no es estadísticamente significativo.

Tabla 13. Valores de AICc de los modelos GLM ajustados para la carga viral de DENV-2 en la cepa NO.

Modelo	K	AICc	Delta AICc	AICc weight	log-Likelihood
Tejido + Insecticida + OFM	5	360.6169	0.0000	0.65734779	-174.7315343
Tejido + Insecticida + OFM + GST	6	363.1076	2.4907	0.189214157	-174.7302617
Tejido + Insecticida + OFM + GST + Tejido* Insecticida	7	365.5749	4.9580	0.055103715	-174.6674535
Tejido	3	365.5993	4.9823	0.054436842	-179.5774072
Nulo	2	367.0446	6.4277	0.026426198	-181.4132238
Tejido + Insecticida	4	367.8722	7.2553	0.017471298	-179.5587527

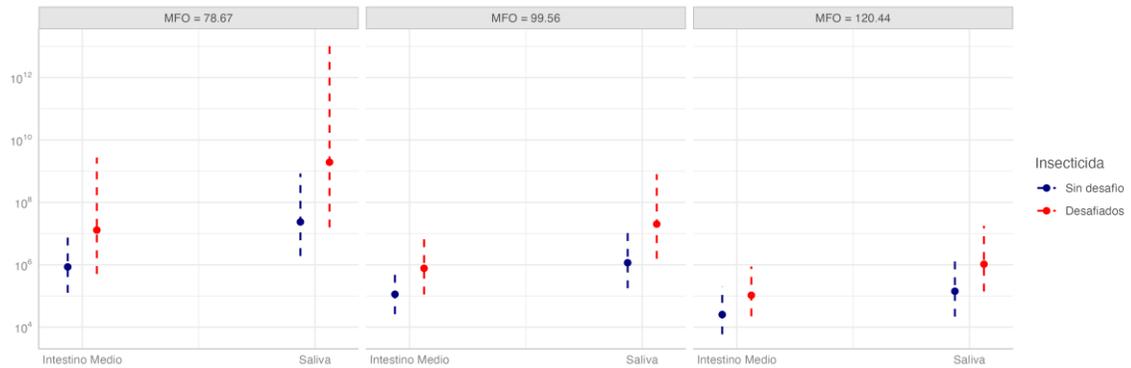


Figura 13. Carga viral de DENV-2 estimadas en la cepa NO en función del tejido, estado de exposición a permetrina y la actividad de OFM.

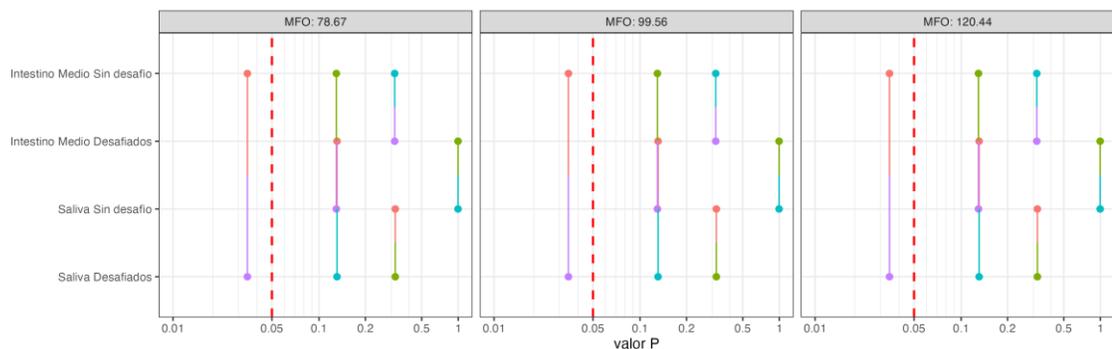


Figura 14. Comparación múltiple de medias marginales estimadas de la carga viral de DENV-2 en la cepa NO. La línea discontinua indica el límite donde $\alpha = 0.05$.

Para la cepa MTY, el modelo GLM incluyó como predictores el tejido (intestino medio y saliva), la exposición al insecticida (pre-expuesta o no expuesta), la actividad de OFM y GST, la interacción entre el tejido y el estado de exposición al insecticida. Se seleccionó el modelo con el mejor ajuste mediante la métrica AICc. El modelo con el AICc más bajo incluyó el tejido, la exposición a permetrina y la actividad de OFM como predictores (Tabla 15). Nuestros resultados destacan dos patrones en las medias marginales estimadas (Figura 10); en primer lugar, la carga viral en el intestino medio es ligeramente superior a la de la saliva y, en segundo lugar, los individuos no expuestos muestran una media superior a la de los individuos expuestos. Sin embargo, ninguno de estos dos patrones es estadísticamente significativo. Lo mismo ocurre al comparar la media marginal estimada de la carga viral del DENV-2 en el intestino medio o la saliva de mosquitos no expuestos y expuestos en cada nivel de actividad de la GST para la cepa MTY. Es importante mencionar que la actividad GST no estaba relacionada con la carga de DENV-2 en la cepa NO o MTY.

Tabla 14. Valores AICc de los modelos GLM para la carga viral de DENV-2 en la cepa MTY.

Modelo	K	AICc	Delta AICc	AICc weight	log-Likelihood
Tejido + Insecticida+ OFM	5	204.083517	0	0.34204592	-95.97032986
Tejido + Insecticida	4	204.850608	0.7670915	0.23308408	-97.73564901
Nulo	2	205.093746	1.01022917	0.20640296	-100.3533246
Tejido + Insecticida + OFM + GST	6	206.593162	2.50964536	0.09752632	-95.74102556
Tejido	3	206.653906	2.57038909	0.09460879	-99.92695298
Tejido + Insecticida + OFM + GST + Tejido * Insecticida	7	209.211842	5.12832557	0.02633193	-95.45207507

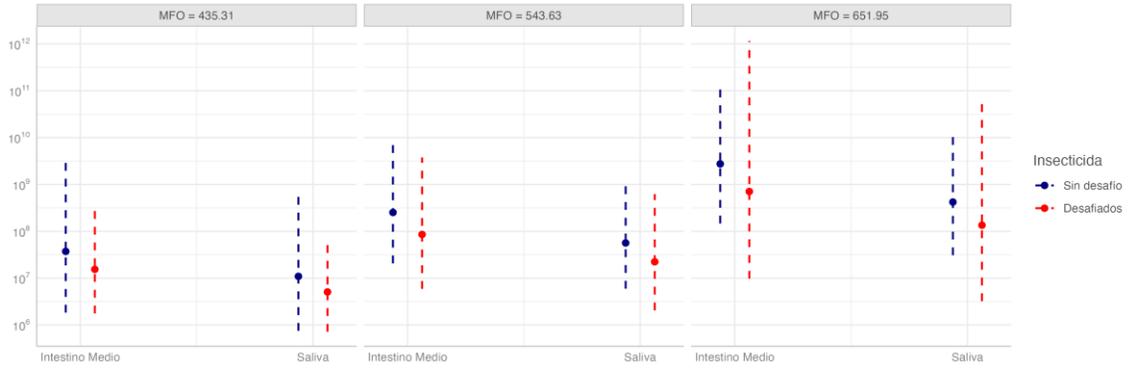


Figura 15. Carga viral de DENV-2 estimadas en la cepa MTY en función del tejido, el estado de exposición a permetrina y la actividad de OFM.

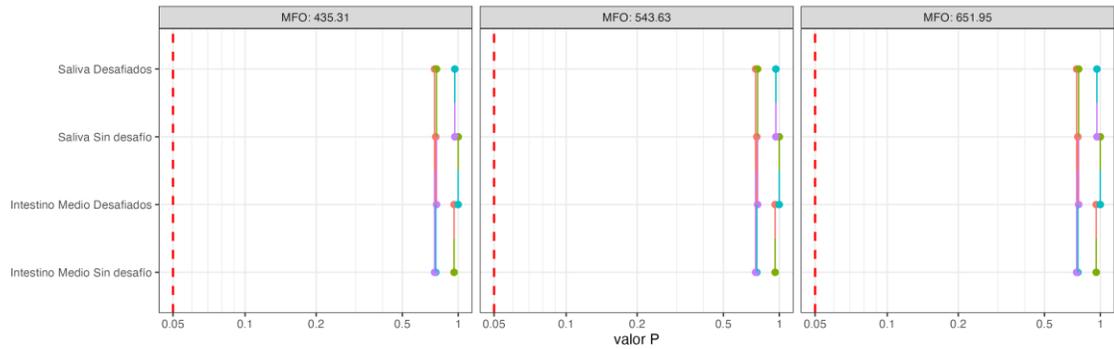


Figura 16. Comparación múltiple de medias marginales estimadas de la carga viral de DENV-2 en la cepa MTY. La línea discontinua indica el límite donde $\alpha = 0.05$.

Nuestros resultados no mostraron diferencias en la carga de DENV-2 entre mosquitos expuestos o no expuestos dentro de cada cepa. Sin embargo, existe una mayor carga de DENV-2 en el intestino medio de los mosquitos expuestos o no expuestos de la cepa MTY en comparación con la cepa NO. El GLM reveló que el GST no explica una mayor cantidad de variación relacionada con el número de copias del DENV-2 medido en los tejidos. En este modelo multivariante, la actividad OFM se relacionó con un efecto protector en la cepa NO; con una mayor actividad OFM, se mide un menor número de copias del DENV-2. En la cepa MTY, no se observó ningún efecto protector. En la cepa MTY, ninguna de las comparaciones resultó estadísticamente significativa. Sin embargo, los individuos no expuestos parecen presentar valores de DENV-2 más elevados. Por último, una carga de DENV-2 ligeramente superior se asocia a niveles de actividad OFM más elevados.

8. DISCUSIÓN

Caracterización de la Cepa MTY

Para determinar el efecto de la resistencia a la permetrina en la competencia vectorial de *Ae. aegypti* para el DENV-2, evaluamos la resistencia a este insecticida en una población recolectada en Monterrey, Nuevo León, México. Nuestros hallazgos confirman que dicha población es resistente al piretroide seleccionado, con una RR_{50} de 71. Los análisis revelaron la presencia de mecanismos de resistencia tanto metabólicos como moleculares. Se detectó una actividad elevada de OFM y GST, así como la presencia de los alelos mutantes L410, I1016 y C1534.

Dado que el principal objetivo de esta investigación fue evaluar la contribución de la resistencia metabólica en la competencia vectorial, es crucial interpretar los resultados considerando que otros mecanismos de resistencia están presentes en la cepa seleccionada. Hasta la fecha, no se ha identificado a la resistencia metabólica como el único factor responsable del fenotipo resistente en *Ae. aegypti* o cualquier otro insecto vector (Liu et al. 2015; Moyes et al. 2017; Bharati et al. 2021). Además, la resistencia identificada en esta cepa ya había sido reportada anteriormente. Existen estudios previos que documentan la presencia de resistencia metabólica en poblaciones mexicanas de *Ae. aegypti* en los estados de Quintana Roo y Baja California (Flores et al. 2005; Flores et al. 2006). Por lo tanto, es esencial analizar los resultados en el contexto de que el fenotipo resistente puede haber estado presente en generaciones anteriores.

Efecto univariante de la edad, alimentación, exposición a permetrina y desafío viral sobre la actividad enzimática

Edad

Nuestro estudio se centró en explorar cómo la resistencia metabólica, mediada por la sobre-activación de enzimas degradativas, influye en la competencia vectorial. Sin embargo, la actividad enzimática también es afectada por factores intrínsecos a los insectos, como la edad y la alimentación (Chapman 2013), así como por factores externos, incluyendo el desafío viral y la exposición a xenobióticos como los insecticidas. Esto ha

sido demostrado en diversas enzimas, incluidas las OFM y GST (Enayati et al. 2005; Zhu et al. 2020).

En insectos, las OFM son cruciales para la desintoxicación de insecticidas antes de que alcancen sus sitios diana (Bosch et al., 2015; Collins & Hooper, 1984; Rodríguez et al., 2011). Son una subclase de enzimas del CyP450, una superfamilia de proteínas que contienen hemo y son responsables de oxidar una variedad de sustancias orgánicas, localizadas principalmente en el retículo endoplásmico del intestino medio, el cuerpo graso y otros tejidos implicados en la desintoxicación (Feyereisen 1999; Scott 1999). Las GST en insectos son esenciales para los procesos de desintoxicación al catalizar la conjugación de glutatión reducido (GSH) a diversos compuestos endógenos y exógenos, presentes principalmente en el citoplasma de células del intestino medio y el cuerpo graso.

Observamos variaciones en los patrones de actividad de OFM y GST según la cepa y las covariables estudiadas. Para la cepa NO, la actividad de OFM varió significativamente con la edad, el tipo de alimentación y el desafío viral, pero no con la exposición a insecticidas. Los mosquitos de seis días mostraron la mayor actividad, así como aquellos alimentados con sangre. En contraste, los mosquitos no desafiados con DENV-2 exhibieron una actividad OFM más alta que los desafiados. En la cepa MTY, se observaron diferencias significativas en la actividad de OFM en relación con la edad, tipo de alimentación, exposición a insecticidas y desafío viral. Los mosquitos de 6 y 19 días alimentados con sangre mostraron la mayor actividad de OFM, especialmente aquellos expuestos a permetrina y desafiados con DENV-2.

En cuanto a la GST, el estudio reveló diferencias estadísticamente significativas en relación con diversas variables. En la cepa NO, se detectaron diferencias según la edad de los mosquitos, el tipo de alimentación, el desafío viral con DENV-2 y la exposición a la permetrina, con una mayor actividad de GST en mosquitos de 12 días de edad y en el grupo no alimentado. Además, el grupo alimentado con sangre adicionada con DENV-2 mostró una actividad enzimática más alta. Por otro lado, en la cepa MTY, las diferencias se relacionaron principalmente con la edad y el tipo de alimento, siendo más pronunciada la actividad de GST en mosquitos de 1 día de edad y aquellos alimentados con sangre adicionada con DENV-2. En términos generales, la actividad de GST fue mayor en la cepa MTY en comparación con la cepa NO.

En términos de la influencia de la edad sobre el patrón de actividad enzimática, nuestros hallazgos están mayormente alineados con lo reportado en la literatura. Davidson et al. (1954) investigaron las tasas de desintoxicación de DDT en moscas domésticas de diferentes edades, encontrando que las más jóvenes presentaban tasas de desintoxicación más altas que las más viejas. Aunque este estudio no especificó una enzima particular, ayudó a identificar una tendencia general. De manera similar, Hemingway y Ranson (2000) sugieren que la actividad enzimática varía con la edad, con individuos más jóvenes mostrando tasas metabólicas más elevadas, lo que les permite degradar contaminantes más eficientemente. Hemingway et al. (1992), Scharf et al. (2000), y Dabiré et al. (2010) encontraron un efecto similar de disminución en la actividad enzimática debido a la edad en moscas domésticas (*Musca domestica*), *Blatella germanica*, y mosquitos *Anopheles gambiae*, respectivamente.

Por otro lado, respecto a la actividad de GST, observamos que la cepa resistente presenta una mayor actividad en el primer día post-emergencia. Esto podría estar relacionado con una sobre-activación basal de esta enzima y su actividad residual desde los estadios larvarios. Investigaciones en *Apis mellifera* demostraron que la actividad de GST y esterasas se mantiene constante a lo largo del tiempo y no se ve afectada por la edad (Zhu et al. 2020). Tripathy y Kar (2015) mostraron que la actividad de GST incrementa durante los estadios larvales, alcanzando su máximo en la pupa y manteniéndose en los adultos emergidos. Este mismo comportamiento homogéneo en la actividad de esta enzima fue reportado en *Ae. aegypti* por Che-Mendoza et al. (2009).

Alimentación

Nuestros resultados indican un aumento en la actividad de OFM después de la ingestión de sangre, alcanzando niveles máximos cuando la sangre está adicionada con DENV-2 en ambas cepas. Para la enzima GST, observamos que la actividad enzimática en la cepa NO es constante y no se ve afectada por los distintos tratamientos alimenticios. Sin embargo, en la cepa MTY recolectada del campo, se encontró una mayor actividad enzimática en los mosquitos que no habían sido alimentados.

La actividad de OFM se intensifica en el intestino de los mosquitos para contrarrestar el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) derivadas de la digestión

de la sangre, fenómeno que es exacerbado por la liberación del grupo hemo de la hemoglobina. Oliveira et al. (2011) demostraron que, tras la ingestión de sangre, se produce una reducción en la concentración de ROS, mediada por la activación de la proteína quinasa C (PKC). Esta vía de señalización puede trabajar en conjunto con enzimas degradativas como las OFM para mitigar los efectos perjudiciales de las ROS. Esta sinergia ha sido evidenciada en especies como *Rhodnius prolixus* a través de análisis transcriptómicos (Leyria et al. 2020), donde se demostró la sobreexpresión de ambos elementos. En mosquitos *An. gambiae*, Machani et al. (2019) también encontraron un incremento en la actividad de OFM tras la ingestión de sangre. De igual forma, Chang et al. (2017) demostró el mismo patrón de incremento en la actividad de OFM dado la alimentación sanguínea en *Culex pipiens pallens* determinando que la actividad de OFM se incrementa en 14.5 veces 1 d post ingesta y 11.8 veces a los siete d post ingesta en comparación con individuos no alimentados con sangre susceptibles a infección, en individuos resistentes, el incremento de actividad puede alcanzar una diferencia de hasta 170.7 (1d) y 160.4 (7d) post ingesta sanguínea. Spillings et al. (2008) sugieren que la resistencia en cepas de *An. funestus* aumenta después de una ingestión de sangre, probablemente debido a la activación de mecanismos degradativos como la actividad de OFM.

La máxima actividad de OFM se observó en mosquitos alimentados con sangre infectada con DENV-2. Aunque este aspecto se discute más detalladamente en secciones posteriores, diversas investigaciones indican que la infección con DENV-2 provoca un desbalance en el estado redox celular tanto en células de mamíferos (Olagnier et al. 2014) como en células de insectos (Santana et al, 2021; Cheng et al. 2021). Estudios en células de mosquitos muestran que varios elementos antioxidantes, como las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutaredoxina, tiorredoxina y la proteína disulfuro isomerasa, se sobreexpresan como parte de la defensa contra microorganismos (Chen et al. 2011; 2012; 2017; Oliveira et al. 2017).

En contraste, la actividad de GST no mostró variaciones significativas entre los diferentes tratamientos alimenticios para la cepa susceptible (NO), mientras que en la cepa MTY, la actividad fue mayor en individuos no alimentados. Estos resultados concuerdan en parte con lo reportado por Oliver y Brooke (2014), quienes no encontraron diferencias

estadísticas en la actividad de GST entre mosquitos *Anopheles arabiensis* alimentados con o sin sangre a los 15 días de edad; sin embargo, observaron una mayor actividad enzimática en mosquitos con múltiples ingestas sanguíneas y en mosquitos no alimentados de 3 días de edad. Kumar et al. (2023) demostraron que la actividad de GST en *Ae. aegypti* solo se altera temporalmente hasta 6 horas después de la ingesta sanguínea.

Otros estudios en especies como la garrapata *Haemaphysalis longicornis* muestran que la expresión de transcritos de GST varía según el estado de alimentación, observándose una disminución desde la ingesta hasta el engorde de la garrapata (Pacia et al. 2018). Esquivel et al. (2016) mostraron que los transcritos de GST aumentan después de la ingestión sanguínea en los túbulos de Malpighi en *Ae. albopictus*. Esta actividad específica del tejido ha sido reportada en otros mosquitos como *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus*, *An. stephensi*, *Anopheles culicifacies*, *Anopheles annularis*, *Anopheles subpictus*, y *Anopheles vagus* por Tripathy y Kar (2014), quienes demostraron que la actividad de GST es mayor en la región abdominal en comparación con la cabeza y el tórax. Estos hallazgos subrayan cómo las características biológicas de los mosquitos y el sitio donde se cuantifica la actividad enzimática influyen en el patrón de actividad de GST.

Exposición a dosis subletales de permetrina

Al evaluar la actividad de las enzimas OFM y GST en respuesta a la exposición a la CL₅₀ de permetrina, observamos patrones variables que dependen de la cepa y del estatus de exposición. En la cepa NO, tanto la actividad de OFM como de GST resultaron ser más altas en los mosquitos no expuestos, aunque esta relación fue estadísticamente significativa solo para GST. Por el contrario, en la cepa MTY, los mosquitos expuestos mostraron una mayor actividad, siendo estadísticamente significativo únicamente para OFM.

Es bien conocido que en poblaciones resistentes de *Ae. aegypti* alrededor del mundo se observa la sobre-activación de enzimas como OFM y GST. Sin embargo, son menos frecuentes las investigaciones que evalúan específicamente la activación de estas enzimas en respuesta a la aplicación de insecticidas. Mack y Attardo (2023) han demostrado la plasticidad en la expresión génica de *Ae. aegypti* tras la exposición a permetrina, donde genes de enzimas como CyP450, GST y peroxidasas se regulan de

manera positiva (sobreexpresión) dentro de las primeras 24 horas post-exposición. Aunque la sobreexpresión de genes no garantiza una traducción inmediata en enzimas útiles para la degradación de insecticidas, ciertos genes como CYP6P3 han sido funcionalmente caracterizados, mostrando su capacidad para metabolizar piretroides como la deltametrina y la permetrina en *An. gambiae* (Müller et al. 2008). En poblaciones con sobre-activación de OFM, como la cepa MTY, la OFM desempeña un papel central en la degradación de xenobióticos como la permetrina.

En contraste, en *Musca domestica*, se ha determinado que la exposición subletal a clorfenapir y fipronil no induce una alteración en la actividad de OFM y GST, sino una reducción en la actividad de acetilcolinesterasas y carboxilesterasas (Kinareikina y Silivanova, 2023). Estos patrones de reducción o estabilidad en la actividad enzimática también han sido reportados en otros estudios, como los de Farooq y Freed (2018) en *M. domestica* y GST, *Bradysia odoriphaga* y GST (Zhao et al. 2018), y OFM y GST en *Chilo suppressalis* (Xiao et al. 2017). Esta discrepancia en los resultados puede deberse a que, a diferencia de los piretroides como la permetrina, que son metabolizados directamente por OFM, la metabolización de fenilpirazoles (fipronil) o pirroles (clorfenapir) no es mediada por las enzimas estudiadas. Además, en las poblaciones susceptibles, la ausencia de diferencias estadísticas en la actividad de OFM puede ser resultado de la falta de sobre-activación basal, lo que permite que insecticidas como la permetrina sigan siendo efectivos.

Desafío viral

En relación con el efecto univariado del desafío viral con DENV-2, nuestros resultados indican que, a excepción de la cepa NO en cuanto a la actividad de OFM, el desafío viral induce un incremento en la actividad enzimática. Esto podría estar relacionado con la regulación del estado redox en las células de los mosquitos mediante la reducción de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Por ejemplo, además de OFM y GST, otras enzimas degradativas como la catalasa, que ayudan a mitigar el impacto negativo de las ROS, han sido vinculadas directamente con la supervivencia de las células de insectos durante infecciones por arbovirus (Chen et al. 2018). Investigaciones han demostrado que la infección con DENV-2 en mosquitos activa las defensas antioxidantes;

por ejemplo, en células C6/36 (derivadas de *Ae. albopictus*), las células infectadas con DENV-2 mostraron un aumento significativo en GST, mientras que la inactivación de GST incrementó los efectos adversos, como la muerte celular (Chen et al. 2011; Chen et al. 2012). De manera indirecta, factores transcripcionales asociados a elementos de respuesta antioxidante como AeNrf2 son cruciales en la detección y eliminación de ROS. Se ha observado que al silenciar AeNrf2, los niveles de ROS aumentan, resultando en un decrecimiento en el crecimiento de la microbiota y una reducción en la infección viral por Zika (Bottino-Rojas et al. 2018). Siguiendo esta línea, Kumar et al. (2023) encontraron que al silenciar genes asociados al metabolismo de L-cisteína, la actividad de GST se incrementa después de la infección con CHIKV en *Ae. aegypti*, incluso más allá de las 6 horas posteriores al inicio de la infección. Sin embargo, hay estudios que indican que el silenciamiento de ciertos genes de GST como GSTT2 en *An. gambiae* conduce a un incremento en la infección por *P. falciparum* (Jamarillo-Gutierrez et al. 2009). Esta discrepancia puede atribuirse a interacciones específicas entre el parásito y su vector.

Con respecto a la actividad de OFM e infección con DENV-2, se ha demostrado que diversos miembros de la familia Cyp450 están implicados en la defensa inmune de células de mamíferos, ya que la inflamación mediada por factores como TNF- α provoca un aumento en el estrés oxidativo, afectando los patrones de transcripción y actividad de este grupo enzimático (Stavropoulou et al. 2018; Sigle y McGraw 2019). En insectos, la evidencia sugiere una dinámica similar. Londono-Rentería et al. (2015) reportaron que al silenciar un conjunto de genes, incluyendo uno de la familia CYP450, la infección por DENV-2 en *Ae. aegypti* se redujo hasta un 40%. Además, Barón et al. (2010) mostraron que los transcritos de CYP450 se encuentran en el intestino medio de mosquitos susceptibles a DENV-2, pero no en los refractarios. Por otro lado, Bonizzoni et al. (2012) demostraron que los transcritos de CYP450 se acumulan en carcasas de *Ae. aegypti* alimentados con sangre adicionada con el virus DENV-2. Contrariamente, investigaciones que encontraron una menor expresión de CYP450 en *Ae. albopictus* no observaron efectos sobre la infección por Zika (Jia et al. 2023).

A diferencia de las células de mamíferos, donde la infección con DENV-2 puede causar la muerte celular (Castillo y Urcuqui-Inchima 2018), en células de insectos este efecto no se produce. La compleja regulación del estado redox en células de *Ae. aegypti*

juega un papel crucial en la supervivencia y proliferación viral, y la sobre-activación de elementos de regulación de la respuesta antioxidante como Nrf2 o el metabolismo de otros elementos como la L-cisteína, que involucra la actividad de enzimas como GST, proporciona los mecanismos necesarios para 1) mantener los niveles de ROS dentro de un umbral permisible evitando daño celular, 2) prevenir consecuencias adicionales como la muerte celular, y 3) crear un microambiente favorable para la replicación viral. Así, enzimas como OFM y GST contribuyen a crear un entorno adecuado tanto para la replicación y supervivencia viral como para la supervivencia de las células de los mosquitos. Nuestros resultados muestran que la sobre-activación basal de OFM en la cepa de campo resistente a permetrina se asoció con una mayor actividad de esta enzima durante el desafío viral. Dado que tanto OFM como GST contrarrestan los efectos negativos de las ROS y en general de moléculas xenobióticas, su sobre-activación basal en cepas resistentes puede favorecer la supervivencia y replicación viral.

Carga viral, actividad enzimática de OFM y GST, y exposición a permetrina

Además de lo anterior, en esta investigación evaluamos la carga viral de DENV-2 en intestino y saliva de *Ae. aegypti* resistentes y susceptibles a permetrina, y su relación con la actividad de GST, OFM y la pre-exposición a dosis subletales de permetrina. En general, los resultados no mostraron diferencias en la carga viral entre mosquitos expuestos y no expuestos en ninguna de las cepas analizadas. Sin embargo, la cepa MTY presentó una carga viral significativamente mayor en el intestino medio de ambos grupos comparada con la cepa NO. Aunque de OFM se asoció con un efecto protector contra el DENV-2 en la cepa NO, no se observó este efecto en la cepa MTY. Asimismo, la actividad de GST no mostró una relación clara con la carga viral en ninguna de las cepas.

Actividad de OFM y GST y su efecto sobre la carga viral

La actividad de enzimas degradativas se relaciona, principalmente, a la regulación de agentes oxidantes como ROS originados a partir compuestos xenobióticos como los insecticidas. Además, diversas investigaciones mencionadas anteriormente asocian el incremento de las ROS a desafíos e infecciones virales ocasionadas por distintos patógenos como DENV. De las dos enzimas analizadas en esta investigación, la

contribución de GST a la reducción de los agentes oxidantes en desafío viral fue explicada anteriormente. No obstante, la implicación de la actividad de OFM sobre la competencia vectorial es menos estudiado. Xie et al. (2023) demostraron que la expresión de CYP4C21 (perteneciente a la familia de CyP450) disminuye a consecuencia de la infección con DENV-2 en células y adultos de *Ae. aegypti*. Al eliminar completamente este gen la replicación de DENV-2 y ZIKV se reduce. De manera similar, Li et al. (2024) demostraron que otro gen de la familia de CyP450, E20MO, incrementa su expresión a causa de la infección con DENV mientras que su supresión incrementa la carga viral de DENV-2.

Si bien, el incremento o decremento en la expresión de un gen no indica la inducción de la actividad enzimática de manera inmediata debido a mecanismos de regulación transcripcional o traduccional, es posible observar que ambas enzimas participan en el proceso de infección. Las investigaciones de Xie et al. y Li et al. mencionadas en este apartado evaluaron genes específicos de enzimas que pertenecen a la familia de CyP450 y las cuales tienen efectos contrarios en procesos de infección. Lo anterior indica que, a pesar de estar involucradas, la activación/desactivación de ciertas enzimas es controlada de manera diferencial. Otra de las limitantes de este estudio es que dentro de nuestro esquema experimental se cuantificó la actividad general de OFM y no enzimas específicas individuales como las mencionadas Xie et al. o Li et al.

Nuestros resultados indican que la actividad de OFM se asoció a un efecto protector (es decir, reducción de la carga viral) en la cepa susceptible, pero no así en la cepa resistente a permetrina. Es posible que en la cepa resistente, la sobre-activación basal de OFM promueva la creación de un microambiente facilitador para la replicación del DENV-2. El mismo efecto protector asociado a la actividad enzimática fue reportado por McCarroll y Hemingway (2002) para *Wuchereria bancrofti* en *Cx. quinquefasciatus*.

Por último, la actividad de GST no se relacionó a algún efecto en la carga viral de DENV-2 en *Ae. aegypti*. Gui et al (2009) observaron que la expresión de GST bajo infección con el virus de polihedrosis nuclear de *Bombix mori* (BmNPV) y el virus denonuclear de *Bombix mori* (BmDNV), en combinación con la aplicación de insecticidas, provoca una activación diferencial. Por un lado, el primer virus activa GST a las 24 h en el intestino de individuos susceptibles y decrece después de 72h, mientras que una cepa tolerante a este virus tiene un decremento en la expresión de GST a las 24 h

y aumenta a las 72 h. En cuerpo graso se encontró que se incrementa la actividad a las 24 h y decrece hasta alcanzar las 72 h. En contraste, BmNPV indica un decremento significativo de GST en cuerpo graso e intestino mientras que el efecto contrario ocurre para BmNPV en individuos susceptibles. Como se mencionó anteriormente, es posible que la actividad de GST se asocie a tejidos específicos en los mosquitos al igual que patrones de activación temporales que no fueron analizados en esta investigación.

Pre-exposición con insecticidas y su impacto en la competencia vectorial

El impacto de la exposición a insecticidas en la prevalencia e intensidad de infecciones patógenas en insectos vectores es controversial, debido a resultados contradictorios en diversas investigaciones. Por ejemplo, dos de tres estudios realizados en *An. gambiae s.s.* muestran que la pre-exposición con deltametrina y permetrina tiene un efecto negativo sobre la infección por *P. falciparum*, mientras que solo un estudio muestra que la pre-exposición con DDT produce un incremento en la infección de esta especie para *P. falciparum* (Kristan et al. 2016; Hauser et al. 2020; Alout et al. 2014). Por otro lado, en *An. gambiae s.l.* se mostró que la pre-exposición a alfa-cipermetrina, deltametrina y permetrina no afectó sobre la infección de esta especie por *P. falciparum* (Collins et al. (2019)

Para el género *Aedes*, se han documentado tanto efectos positivos como neutros sobre la carga viral (CV). En *Ae. aegypti*, se ha demostrado un aumento en la CV después de la pre-exposición a malathion y al virus del Sindbis, así como a DENV y Bti (Muturi y Alto 2011; Moltini-Conclois et al. 2018). Otros estudios indicaron una interacción neutral al evaluar la exposición de *aegypti* a DDT y DENV-2, Bti y DENV-1 y ZIKV y piriproxifeno (Yadav et al. 2005, Alto y Lord 2016; Alomar et al. 2020). En el caso de *Ae. albopictus*, la evidencia sugiere que el efecto de la exposición a insecticidas varía según el patógeno estudiado; la exposición a bifentrina aumenta la CV para ZIKV incrementa la CV de esta especie para este arbovirus mientras que disminuye la CV para DENV (Knecht et al. 2018; Richards et al. 2017).

En otras especies de importancia agrícola, como *Myzus persicae*, se determinó que la exposición a lambda-cihalotrina incrementa la CV para el virus de la papa Y (Fenton et al. 2015). Además, al exponer *Bemisia tabaci* a insecticidas sistémicos como

clorantraniliprol, flupiradifurona y pimetrozina, la adquisición y transmisión del virus del rizado amarillo del tomate disminuyeron, mientras que en *M. persicae*, solo la pre-exposición con sulfoxaflor y flonicamid redujeron la tasa inoculación y transmisión del virus del amarillamiento del nabo, mientras que el spirotretamat no tuvo el mismo efecto reductor (Garzo et al. 2020). Los resultados obtenidos de nuestros experimentos apoyan la evidencia que indica que la pre-exposición a insecticidas no altera ni a favor ni en contra la CV. No obstante, es importante señalar que los estudios de la relación entre la infección por patógenos o la CV y pre-exposición a insecticidas, mencionados en este apartado, se llevaron a cabo en organismos portadores de mutaciones que confieren resistencia a los insecticidas evaluados. Sin embargo, ningún exploró los efectos de interacción entre la CV, la exposición a insecticidas y mutaciones. De manera similar, ninguna investigación evaluó el efecto aislado o en conjunto de la actividad enzimática y la exposición a insecticidas sobre la CV.

Efecto de interacción entre carga viral, exposición y actividad de OFM

Los efectos de interacción entre resistencia, exposición a insecticidas y CV solo han sido reportados por Birnbaum et al. (2022). En su estudio, compararon la expresión génica de cepas de *Tribolium castaneum* no seleccionadas y seleccionadas en laboratorio con malatión (organofosfato) o cipermetrina (piretroide) y *Bacillus thuringiensis* (Bt). La exposición a malatión o cipermetrina y el subsiguiente desafío con Bt demostró que en ambas cepas (susceptibles y resistentes a organofosforados o piretroides) exhiben respuesta inmune disminuida, asociada a una menor cantidad de transcritos de genes que confieren inmunidad, incluidas las OFM y GST. Nuestros resultados muestran que, para la cepa susceptible, la interacción entre elementos ocasiona un efecto protector, reduciendo la carga viral en los mosquitos. Por otro lado, en la cepa MTY este efecto reductor no se presenta.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran como la sobre-activación de OFM en una cepa de *Ae. aegypti* resistente a la permetrina incrementa la competencia vectorial para DENV-2 y su relación con los tipos de alimentación, edad, exposición a permetrina, y desafío viral. Se observó que la actividad de OFM se incrementa con la alimentación sanguínea, la pre-exposición a permetrina, y el desafío viral en la cepa resistente, asimismo, siendo siempre superior en comparación con la cepa susceptible a permetrina. Por otro lado, la actividad de GST se incrementa en respuesta al desafío viral y la pre-exposición a permetrina, pero no por la edad o el tipo de alimentación.

En cuanto a los efectos de interacción, la actividad de OFM muestra un decremento en respuesta a la edad, alimentación con sangre adicionada con virus para la cepa NO, no obstante, el efecto contrario se observó para la cepa resistente. En cuanto a GST, los efectos de interacción elucidaron que esta enzima mantiene una activación homogénea en ambas cepas, observándose un incremento solo en la cepa resistente tras la exposición a permetrina.

Respecto a la competencia vectorial, la carga viral de DENV-2 fue mayor en mosquitos resistentes a permetrina en comparación con la cepa susceptible. Sin embargo, la pre-exposición a permetrina no alteró la carga viral en la saliva o el intestino. Finalmente, es posible evidenciar una tendencia en donde la actividad de MFO se relaciona al incremento en la carga viral de DENV-2 en la cepa resistente, sugiriendo que la sobre-activación de esta enzima podría estar vinculada a una mayor capacidad de transmisión del virus.

10.PERSPECTIVAS

Los hallazgos de esta investigación revelan que los mecanismos metabólicos mediados por la sobre-activación de enzimas como la OFM en *Ae. aegypti* resistente a piretroides se asocia a un incremento en la competencia vectorial para DENV-2 de *Ae. aegypti*. Este incremento en la competencia vectorial podría elevar el riesgo de transmisión de esta arbovirosis, dado el contexto global de la creciente resistencia a insecticidas. No obstante, es importante señalar, que una de las limitantes de este estudio es la presencia de otros mecanismos de resistencia como las mutaciones KDR, en la población resistente analizada. Para discernir el efecto específico de las enzimas degradativas en la competencia vectorial, es necesario establecer poblaciones de mosquitos o individuos modelo que presenten exclusivamente mecanismos de resistencia enzimática.

Actualmente, la mayoría de los estudios relacionados a la interacción entre competencia vectorial y resistencia a insecticidas presentan diseños experimentales contrastantes, lo que dificulta realizar comparaciones directas entre los resultados obtenidos. Es necesario establecer guías o esquemas experimentales comparables para esclarecer la contribución de los mecanismos de resistencia a insecticidas sobre la capacidad de los vectores para adquirir y transmitir patógenos.

Por último, en esta investigación se evaluaron dos familias de enzimas asociadas a la resistencia metabólica, GST y OFM. En futuros escenarios, la consideración de otras familias enzimáticas con actividad de degradativas, como las esterasas, catalasas, o superóxido dismutasas, deben de ser estudiadas. Además, la distinción de enzimas específicas dentro de estas familias permitirá obtener una comprensión más detallada de la compleja regulación de la infección por DENV-2 en *Ae. aegypti*.

11.BIBLIOGRAFÍA

Alomar AA, Eastmond BH, Alto BW. 2020. The effects of exposure to pyriproxyfen and predation on Zika virus infection and transmission in *Aedes aegypti*. Plos Neglected Tropical Disease, 14:e0008846.

Alout H, Dabiré RK, Djogbénu LS, Abate L, Corbel V, Chandre F, Cohuet A. 2016. Interactive cost of *Plasmodium* infection and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Scientific Reports, 6.

Alout H, Djègbè I, Chandre F, Djogbénu LS, Dabiré RK, Corbel V, Cohuet A. 2014. Insecticide exposure impacts vector–parasite interactions in insecticide-resistant malaria vectors. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 281:20140389.

Alout H, Ndam NT, Sandeu MM, Djégbé I, Chandre F, Dabiré RK, Djogbénu LS, Corbel V, Cohuet A. 2013. Insecticide Resistance Alleles Affect Vector Competence of *Anopheles gambiae* s.s. for *Plasmodium falciparum* Field Isolates. PLoS ONE, 8:e63849.

Alout H, Roche B, Dabiré RK, Cohuet A. 2017. Consequences of insecticide resistance on malaria transmission. PLOS PATHOGENS, 13:e1006499.

Alout H, Yameogo B, Djogbenou LS, Chandre F, Dabire RK, Corbel V, Cohuet A. 2014. Interplay Between Plasmodium Infection and Resistance to Insecticides in Vector Mosquitoes. Journal of Infectious Diseases, 210:1464–1470.

Alto BW, Lord CC. 2016. Transstadial Effects of Bti on traits of *Aedes aegypti* and infection with dengue virus. PLoS Neglected Tropical Diseases, 10:e0004370.

Alvarez-Gonzalez LC, Briceño A, Ponce-Garcia G, Villanueva-Segura OK, Davila-Barboza JA, Lopez-Monroy B, Gutierrez-Rodriguez SM, Contreras-Perera Y, Rodriguez-Sanchez IP, Flores, A. E. 2017. Assessing the effect of selection with deltamethrin on biological parameters and detoxifying enzymes in *Aedes aegypti* (L.). Pest Management Science, 73:2287–2293.

Angleró-Rodríguez YI, Talyuli OAC, Blumberg BJ, Kang S, Demby C, Shields A, Carlson J, Jupatanakul N, Dimopoulos G. 2017. An *Aedes aegypti*-associated fungus increases susceptibility to dengue virus by modulating gut trypsin activity. *Microbiology and Infectious Disease*, 6:1-20:e28844.

Araujo-Diniz DFA, de-Melo-Santos MAV, de-Mendonca-Santos EM, Beserra-Barbosa E, Helvecio E, de-Carvalho-Leandro D, Santana-dos-Santos B, de-Menezes-Lima VL, Junqueira-Ayres CF. 2015. Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Parasites & Vectors*, 8:662.

Arunachalam N, Tyagi BK, Samuel M, Krishnamoorthi R, Manavalan R, Tewari SC, Ashokkumar V, Kroeger A, Sommerfeld J, Petzold M. 2012. Community-based control of *Aedes aegypti* by adoption of eco-health methods in Chennai City, India. *Pathogens and Global Health*, 106:488–496.

Atyame CM, Alout H, Mousson L, Vazeille M, Diallo M, Weill M, Failloux AB. 2019. Insecticide resistance genes affect *Culex quinquefasciatus* vector competence for West Nile virus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286:20182273.

Baldacchino F, Caputo B, Chandre F, Drago A, della-Torre A, Montarsi F, Rizzoli A. 2015. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. *Pest Management Science*, 71:1471–1485.

Barnett HC. 1962. The incrimination of arthropods as vectors of disease. In *Proceedings of 714 the XIth International Congress of Entomology, Vienna*, pp. 341–345.

Barón OL, Ursic-Bedoya RJ, Lowenberger CA, Ocampo CB. 2010. Differential Gene Expression from Midguts of Refractory and Susceptible Lines of the Mosquito, *Aedes aegypti*, Infected with Dengue-2 Virus. *Journal of Insect Science*, 10: 1-23.

Barrera-Pérez MB, Ruz NP, Mézquita JEM, Arcila NT, Hernández RH, Gamboa FC, Geded-Moreno E, Cohuo-Rodríguez A, Medina-Barreiro A, Koyoc-Cardena E, Gómez-Dantés H, Kroeger A, Vázquez-Prokopec G, Saide PM. 2015. Control de criaderos de

Aedes aegypti con el programa Recicla por tu bienestar en Mérida, México. *Salud Pública de México*, 57:201.

Beerntsen BT, James AA, Christensen BM. 2000. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 64:115–137.

Bellini R, Zeller H, Van-Bortel W. 2014. A review of the vector management methods to prevent and control outbreaks of West Nile virus infection and the challenge for Europe. *Parasites & Vectors*, 7:323.

Bern C. 2015. Chagas' Disease. *The New England Journal of Medicine*, 373:456–466.

Bharati M, Saha D. 2018. Multiple insecticide resistance mechanisms in primary dengue vector, *Aedes aegypti* (Linn.) from dengue endemic districts of sub-Himalayan West Bengal, India. *PLoS ONE*, 13:e0203207.

Bharati M, Saha D. 2021. Insecticide resistance status and biochemical mechanisms involved in *Aedes* mosquitoes: A scoping review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 14:52-63.

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

Birnbaum SSL, Schulz NKE, Tate AT. 2022. Interactions between evolved pesticide resistance and pesticide exposure influence immunity against pathogens. *bioRxiv*.

Blanc S, Gutiérrez S. 2015. The specifics of vector transmission of arboviruses of vertebrates and plants. *Current Opinion in Virology*, 15:27–33.

Bonizzoni M, Dunn WA, Campbell CL, Olson KE, Marinotti O, James AA. 2012. Complex modulation of the *Aedes aegypti* transcriptome in response to dengue virus infection. *PLoS ONE*, 7:e50512.

Bonizzoni M, Gasperi G, Chen X, James AA. 2013. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends in Parasitology*, 29:460–468.

Bottino-Rojas V, Talyuli OAC, Carrara L, Martins AJ, James AA, Oliveira PL, Paiva-Silva GO. 2018. The redox-sensing gene Nrf2 affects intestinal homeostasis, insecticide resistance, and Zika virus susceptibility in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Biological Chemistry*, 293:9053–9063.

Brito LP, Linss JGB, Lima-Camara TN, Belinato TA, Peixoto AA, Lima JBP, Valle D, Martins AJ. 2013. Assessing the Effects of *Aedes aegypti* kdr Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost. *PLoS ONE*, 8:e60878.

Brown AW. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: A pragmatic review. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2:123-140.

Caragata EP, Tikhe CV, Dimopoulos G. 2019. Curious entanglements: interactions between mosquitoes, their microbiota, and arboviruses. *Current Opinion in Virology*, 37:26–36.

Castillo JA, Urcuqui-Inchima S. 2018. Mechanisms of monocyte cell death triggered by dengue virus infection. *Apoptosis*, 23:576–586.

Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de enfermedades. 2024. Lista de insumos Recomendados por el CENAPRECE. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud%7Ccenaprece/documentos/productos-recomendados-por-cenaprece-para-el-combate-de-insectos-vectores-2024>.

Chamberlain RW, Sudia WD. 1961. Mechanism of Transmission of Viruses by Mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 6:371–390.

Chang KS, Kim HC, Klein TA, Ran-Ju Y. 2016. Insecticide resistance and cytochrome-P450 activation in unfed and blood-fed laboratory and field populations of *Culex pipiens pallens*. *Journal of Pest Science*, 90:759–771.

Che-Mendoza A, Penilla RP, Rodríguez DA. 2009. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. *African Journal of Biotechnology*, 8:Ch 1386-1397.

Chapman, R.F. 2013. *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press.

Chen M, Du Y, Wu S, Nomura Y, Zhu G, Zhorov BS, Dong K. 2019. Molecular evidence of sequential evolution of DDT- and pyrethroid-resistant sodium channel in *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13:e0007432.

Cheng G, Liu Y, Wang P, Xiao X. 2015. Mosquito Defense Strategies against Viral Infection. *Trends in Parasitology*, 32:177–186.

Coen E, Strachan T, Dover G. 1982. Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA Histone Gene Families in the *Melanogaster* Species Subgroup of *Drosophila*. *Journal of Molecular Biology*, 158:17-35.

Collins E, Vaselli NM, Sylla M, Beavogui AH, Orsborne J, Lawrence G, Wiegand RE, Irish SR, Walker T, Messenger LA. 2019. The relationship between insecticide resistance, mosquito age and malaria prevalence in *Anopheles gambiae* s.l. from Guinea. *Nature Scientific Reports*, 9:8846.

Conway MJ, Colpitts TM, Fikrig E. 2014. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Annual Review of Virology*, 1:71–88.

Dabiré KR, Diabaté A, Namountougou M, Toé KH, Ouari A, Kengne P, Simard F, Baldet T. 2010. Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F kdr mutation in *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa). *PloS ONE*, 104:751–757.

Dantas F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152:173-185.

Darsie RF, Jr. & Ward RA. 2005. *Identification and geographical distribution of the mosquitoes of North America, north of Mexico* (2nd ed.). University Press of Florida.

David JP, Ismail HM, Chandor-Proust A, Inagraham-Paine MJ. 2013. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368:20120429.

Davidson G, Hughes PB, Caveney S. 1954. Detoxification of DDT by the housefly. *Nature*, 174:358–359.

Day JF. 2016. Mosquito Oviposition behavior and vector control. *Insects*, 7:65.

Dong K, Du Y, Rinkevich F, Nomura Y, Xu P, Wang L, Silver K, Zhorov BS. 2014. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 50:1–17.

Doyle MS, Swope BN, Hogsette JA, Burkhalter KL, Savage HM, Nasci RS. 2011. Vector Competence of the Stable Fly (Diptera : Muscidae) for West Nile Virus. *Journal of Medical Entomology*, 48:656–668.

Du Y, Nomura Y, Satar G, Hu Z, Nauen R, He SY, Boris SZ, Dong K. 2013. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110:11785–11790.

Du Y, Nomura Y, Zhorov B, Dong K. 2016. Sodium channel mutations and pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. *Insects*, 7:60.

Dupont M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, Gourinat AC. 2015. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 21:381-382.

Enayati AA, Ranson H, Hemingway J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14:3-8.

Esquivel CJ, Cassone BJ, Piermarini PM. 2016. A de novo transcriptome of the Malpighian tubules in non-blood-fed and blood-fed Asian tiger mosquitoes *Aedes albopictus*: insights into diuresis, detoxification, and blood meal processing. *PeerJ*, 4:e1784.

Farooq M, Freed S. 2018. Mortality, Biological, and Biochemical response of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) to selected insecticides. *Journal of Entomological Science*, 53:27–45.

Fenton B, Salter WT, Malloch G, Begg G, Anderson E. 2014. Stopped in its tracks: How λ -cyhalothrin can break the aphid transmission of a potato potyvirus. *Pest Management Science*, 71:1611–1616.

Fernando SD, Hapugoda M, Perera R, Saavedra-Rodriguez K, Black WC, De Silva NK. 2018. First report of V1016G and S989P knockdown resistant (kdr) mutations in pyrethroid-resistant Sri Lankan *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & Vectors*, 11.

Field LM, Emyr-Davies TG, O'Reilly AO, Williamson MS, Wallace BA. 2017. Voltage-gated sodium channels as targets for pyrethroid insecticides. *European Biophysics Journal*, 46:675–679.

Flores AE, Albeldaño-Vázquez W, Salas IF, Badii MH, Becerra HL, Garcia GP, Fuentes SL, Brodgon WG, Black-IV WC, Beaty B. 2005. Elevated α -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82:66–78.

Flores AE, Grajales JS, Salas IF, Garcia GP, Becerra HL, Lozano S, Brodgon WG, Black-IV WC, Beaty B. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) From Quintana Roo, Southern Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22:672–677.

Fournier D. 2005. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chemico-Biological Interactions*, 157–158:257–261.

- Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. 2015. Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses*, 7:3741–3767.
- Frentiu FD, Robinson J, Young PR, McGraw EA, O’Neill SL. 2010. *Wolbachia*-mediated resistance to dengue virus infection and death at the cellular level. *PLoS ONE*, 5:e13398.
- Fukuto RT. 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87:245-254.
- Garzo E, Moreno A, Plaza M, Fereres A. 2020. Feeding behavior and virus-transmission ability of insect vectors exposed to systemic insecticides. *Plants*, 9:895.
- Graczyk TK, Knight R, Tamang L. 2005. Mechanical transmission of human protozoan parasites by onsects. *Clinical Microbiology Reviews*, 18:128-132.
- Granada Y, Mejía-Jaramillo AM, Strode C, Triana-Chavez O. 2018. A point mutation V419L in the sodium channel gene from natural populations of *Aedes aegypti* is involved in resistance to λ -cyhalothrin in Colombia. *Insects*, 9:23.
- Gratz NG. 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 18:215-227.
- Gu W, Regens JL, Beier JC, Novak RJ. 2006. Source reduction of mosquito larval habitats has unexpected consequences on malaria transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:17560–17563.
- Gui Z, Hou C, Liu T, Qin G, Li M, Jin B. 2009. Effects of insect viruses and pesticides on Glutathione-S-Transferase activity and gene expression in *Bombyx mori*. *Journal of Economic Entomology*, 102:1591–1598.
- Gulia-Nuss M, Nuss AB, Meyer JM, Sonenshine DE, Roe RM, Waterhouse RM, Hill, C. A. eta al. 2016. Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nature Communications*, 7.

- Haddi K, Tomé HVV, Du Y, Valbon WR, Nomura Y, Martins GF, Dong K, Oliveira EE. 2017. Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. *Scientific Reports*, 7.
- Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. 1983. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual Review of Entomology*, 28:229-262.
- Hauser G, Thiévent K, Koella JC. 2020. Consequences of larval competition and exposure to permethrin for the development of the rodent malaria *Plasmodium berghei* in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Parasites Vectors* 13:107.
- Hemingway J, Ranson H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45:371–391.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. 1992. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34:653–665.
- Hernandez EP, Kusakisako K, Talactac MR, Galay RL, Hatta T, Fujisaki K, Tsuji N, Tanaka T. 2018. Glutathione S-transferases play a role in the detoxification of flumethrin and chlorpyrifos in *Haemaphysalis longicornis*. *Parasites & Vectors*. 11:460
- Hidari KIPJ, Suzuki T. 2011. Dengue virus receptor. *Tropical Medicine and Health*, 39:S37–S43.
- Hill CL, Sharma A, Shouche Y, Severson DW. 2014. Dynamics of midgut microflora and dengue virus impact on life history traits in *Aedes aegypti*. *Acta Tropica*, 140:151–157.
- Howard AFV, Koenraadt CJM, Farenhorst M, Knols BGJ, Takken W. 2010. Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Malaria Journal*, 9:168

Hu Z, Du Y, Nomura Y, Dong K. 2011. A sodium channel mutation identified in *Aedes aegypti* selectively reduces cockroach sodium channel sensitivity to type I, but not type II pyrethroids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41:9–13.

Insecticide Resistance Action Committee. 2019. Introduction to Resistance. [Online] Disponible en: <https://www.irac-online.org/about/resistance/>

Ishak IH, Riveron JM, Ibrahim SS, Stott R, Longbottom J, Irving H, Wondji CS. 2016. The Cytochrome P450 gene CYP6P12 confers pyrethroid resistance in *kdr*-free Malaysian populations of the dengue vector *Aedes albopictus*. *Scientific Reports*, 6:24707.

Jaramillo-Gutierrez G, Rodrigues J, Ndikuyeze G, Povelones M, Molina-Cruz A, Barillas-Mury C. 2009. Mosquito immune responses and compatibility between Plasmodium parasites and anopheline mosquitoes. *BMC Microbiology* 9:154.

Martins AJ, Ribeiro CDeM, Bellinato DF, Peixoto AA, Valle D, Lima JBP. 2012. Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLoS ONE*, 7:e31889.

Jia N, Jiang Y, Jian X, Cai T, Liu Q, Liu, Y, Xing D, Dong Y, Guo X, Zhao T. 2023. Transcriptome analysis of response to zika virus infection in two *Aedes albopictus* strains with different vector competence. *International Journal of Molecular Sciences* 24:4257.

Jupatanakul N, Sim S, Angleró-Rodríguez YI, Souza-Neto J, Das S, Poti KE, Rossi SL, Bergren N, Vasilakis N, Dimopoulos G. 2017. Engineered *Aedes aegypti* JAK/STAT pathway-mediated immunity to dengue virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11:e0005187.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 2000. Principios de Neurociencia 4a Ed. Editorial McGraw Hill Interamericana: Madrid.

Kay JF, MacNeil JD, Wang J. 2016. Chemical Analysis of Non-antimicrobial Veterinary Drug Residues in Food. John Wiley & Sons, Inc.

- Kinareikina A, Silivanova E. 2023. Impact of insecticides at sublethal concentrations on the enzyme activities in adult *Musca domestica* L. *Toxics* Vol. 11:47.
- Knecht H, Richards S, Balanay J, White A. 2018. Impact of mosquito age and insecticide exposure on susceptibility of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to infection with Zika virus. *Pathogens* 7:67.
- Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne A, Shearer FM, Brady OJ, Messina JP, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG, Coelho GE, Van Bortel W, Hendrickx G, Schaffner F, Wint GR, Elyazar IR, Teng HJ, Hay SI. 2015. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Scientific Data* 2:150035.
- Kramer LD, Ciota AT. 2015. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Current Opinion in Virology* 15:112–118.
- Kristan M, Lines J, Nuwa A, Ntege C, Meek SR, & Abeku TA. 2016. Exposure to deltamethrin affects development of *Plasmodium falciparum* inside wild pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* s.s. mosquitoes in Uganda. *Parasites & Vectors* 9:100.
- Kumar A, Shrinet J, & Sunil S. 2023. Chikungunya virus infection in *Aedes aegypti* is modulated by L-cysteine, taurine, hypotaurine and glutathione metabolism. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 17:e0011280.
- Kumar A, Srivastava P, Sirisena P, Dubey SK, Kumar R, Shrinet J, & Sunil S. 2018. Mosquito Innate Immunity. *Insects* 9:95.
- Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp B. 1998. Phylogeny of the Genus *Flavivirus*. *Journal of Virology*, 72:73-83.
- Kushwah RBS, Kaur T, Dykes CL, Kumar RH, Kapoor N, Singh OP. 2019. A new knockdown resistance (kdr) mutation, F1534L, in the voltage-gated sodium channel of *Aedes aegypti*, co-occurring with F1534C, S989P and V1016G. *Parasites & vectors* 1: 327.

Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. 2010. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4:e646.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30:545–551.

Lehane, M. 2005. *The Biology of blood-sucking in insects* (2nd Ed). Cambridge:New York.

Leong CS, Vythilingam I, Liew JWK, Wong ML, Wan-Yusoff WS, Lau YL. 2019. Enzymatic and molecular characterization of insecticide resistance mechanisms in field populations of *Aedes aegypti* from Selangor, Malaysia. *Parasites & Vectors* 12:236

Lequime S, Lambrechts L. 2014. Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: A historical perspective. *Infection, Genetics and Evolution* 28:681–690.

Lequime S, Pau, RE, Lambrechts L. 2016. Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. *PLOS Pathogens*, 12:e1005548

Leyria, J, Orchard I, Lange, AB. 2020. What happens after a blood meal? A transcriptome analysis of the main tissues involved in egg production in *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14:e0008516).

Li B, Wang D, Xie X, Chen X, Liang G, Xing D, Zhao T, Wu J, Zhou X, Li C. 2024. Mosquito E-20-Monooxygenase Gene Knockout Increases Dengue Virus Replication in *Aedes aegypti* Cells. *Viruses* 16:525.

Liu N. 2015. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annual Review of Entomology*, 60:537–559.

Londono-Renteria B, Troupin A, Conway MJ, Vesely D, Ledizet M, Roundy CM, Cloherty E, Jameson S, Vanlandingham D, Higgs S, Fikrig E, Colpitts TM. 2015. dengue

virus infection of *Aedes aegypti* requires a putative cysteine rich venom protein. PLOS Pathogens 11:e1005202.

Lumjuan N, Rajatileka S, Changsom D, Wicheer J, Leelapat P, Prapanthadara L, Somboon P, Lycett G, Ranson, H. 2011. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. Insect Biochemistry and Molecular Biology 41:203–209.

Machani MG, Ochomo E, Sang D, Bonizzoni M, Zhou G, Githeko AK, Yan G, Afrane YA. 2019. Influence of blood meal and age of mosquitoes on susceptibility to pyrethroids in *Anopheles gambiae* from Western Kenya. Malaria Journal 18:112.

Maciel-de-Freitas R, Lourenço-de-Oliveira R. 2011. Does targeting key-containers effectively reduce *Aedes aegypti* population density?. Tropical Medicine & International Health, 16:965–973.

Mack LK, Attardo GM. 2023. Time-series analysis of transcriptomic changes due to permethrin exposure reveals that *Aedes aegypti* undergoes detoxification metabolism over 24 h. Scientific Reports 13:16564

Manjarres A, Olivero J. 2013. Chemical Control of *Aedes aegypti*: a historical perspective. Revista Costarricense de Salud Pública 22:68-75.

Marra PP, Griffing S, Caffrey C, Kilpatrick MA, McLean R, Brand C, Saito E, Dupuis AP, Kramer L, Novak R. 2004. West Nile Virus and wildlife. BioScience, 54:393–402.

McKenzie BA, Wilson AE, Zohdy S. 2019. *Aedes albopictus* is a competent vector of Zika virus: A meta-analysis. PLOS ONE, 14:e0216794.

Mota-Sanchez D, Wise JC. 2023. The Arthropod Pesticide Resistance Database. Michigan State University. Disponible en: <http://www.pesticideresistance.org>

Moltini-Conclois I, Stalinski R, Tetreau G, Després L, Lambrechts L. 2018. Larval exposure to the bacterial insecticide bti enhances dengue virus susceptibility of adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insects* 9:193.

Mourya DT, Gokhale MD, Banerjee K. 1994. Effect of sublethal dosages of insecticides on chikungunya virus susceptible and refractory strains of *Aedes aegypti*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 25:536-542.

Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dusfour I, Raghavendra K, Pinto J, Corbel V, David JP, Weetman, D. 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11:e0005625.

Mukherjee D, Das S, Begum F, Mal S, Ray U. 2019. The mosquito immune system and the life of dengue virus: what we know and do not know. *Pathogens* 8:77.

Mullen GR, Durden LA. 2009. *Medical and veterinary entomology* (2nd ed.). Amsterdam: Elsevier.

Müller P, Warr E, Stevenson BJ, Pignatelli PM, Morgan JC, Steven A, Yawson AE, Mitchell SN, Ranson H, Hemingway J, Paine MJ, Donnelly MJ. 2008. Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genetics* 4:e1000286.

Muthusamy R, Shivakumar MS. 2015. Susceptibility status of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to temephos from three districts of Tamil Nadu, India. *Journal Vector Borne Diseases* 52:159-165.

Muturi EJ, Alto BW. 2011. Larval environmental temperature and insecticide exposure alter *Aedes aegypti* competence for arboviruses. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11:1157–1163.

Natal D. 2002. Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico*, 64:205–207.

Secretaría de Salud. 2014. NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. Disponible en:

https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5389045&fecha=16/04/2015#gsc.tab=0

O'Brien RD. 1969. Phosphorylation and carbamylation of cholinesterase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 160:204–214.

O'Reilly AO, Khambay BPS, Williamson MS, Field LM, Wallace BA, Davies TGE. 2006. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochemical Journal*, 396:255–263.

Olagnier D, Peri S, Steel C, van Montfoort N, Chiang C, Beljanski V, Slifker M, He Z, Nichols CN, Lin R, Balachandran S, Hiscott J. 2014. Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in dengue virus-infected dendritic cells. *PLoS Pathogens* 10:e1004566.

Oliveira JHM, Gonçalves RLS, Lara FA, Dias FA, Gandara ACP, Menna-Barreto RFS, Edwards MC, Laurindo FRM, Silva-Neto MAC, Sorgine MHF, Oliveira PL. 2011. Blood meal-derived heme decreases ros levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. *PLoS Pathogens* 7:e1001320.

Oliver SV, Brooke BD. 2014 The effect of multiple blood-feeding on the longevity and insecticide resistant phenotype in the major malaria vector *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors* 7:390.

Oppold, AM, Müller R. 2017. Epigenetics: A Hidden Target of Insecticides. In *Advances in Insect Physiology*. Verlinden H. (eds), Academic Press Elsevier. pp. 313–324.

Organización Mundial de la Salud. 2011. The Use of DDT in Malaria Vector Control. Global Malaria Programme. WHO position statement, pp 9.

Organización Mundial de la Salud. 2012. Handbook for Integrated Vector Management, pp 67.

Organización Mundial de la Salud. 2012. Report of the Fifteenth WHOPES working group meeting. Geneva, pp 99.

Organización Mundial de la Salud. 2016. Test Procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. 2nd Ed. Global Malaria Programme, pp 48.

Paddock CD, Childs JE. 2003. The ascendancy of *Amblyomma americanum* as a vector of pathogens affecting humans in the United States. Annual Reviews of Entomology, 48:307-337.

Paiva MHS, Lovin DD, Mori A, Melo-Santos MAV, Severson, DW, Ayres CFJ. 2016. Identification of a major quantitative trait locus determining resistance to the organophosphate temephos in the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. Genomics, 107:40–48.

Palmquist K, Salatas J, Fairbrother A. 2012. Pyrethroid Insecticides: Use, Environmental Fate, and Ecotoxicology. In Insecticides - Advances in Integrated Pest Management. Perveen F. (eds). InTech, pp. 251-278.

Pan American Health Organization (PAHO). 2022. Dengue, Zika y Malaria. [Online] Disponible en: <http://www.paho.org/data/index.php/en/>

Pang YP, Brimijoin S, Ragsdale DW, Yan Zhu K., Suranyi R. 2012. Novel and Viable Acetylcholinesterase Target Site for Developing Effective and Environmentally Safe Insecticides. Current Drug Targets, 13:471–482.

Patterson J, Sammon M, Garg M. 2016. Dengue, Zika, and chikungunya: emerging arboviruses in the new world. Western Journal of Emergency Medicine, 17:671-679.

Polson KA, Brogdon WG, Rawlins SC, Chadee DD. 2011. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. Acta Tropica 117:31–38.

Ponce G, Flores AE, Fernández-Salas I, Saavedra-Rodríguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, Bond JG, Casas-Martínez M, Ramsey JM, García-Rejón J, Domínguez-Galera M, Ranson H, Hemingway J, Eisen L, Black, WC IV. 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. PLoS Neglected Tropical Diseases 3:e531.

Powell JR, Tabachnick WJ. 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* a review. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 108:11–17.

Quintero DC, Osorio JE, Martínez-Gutierrez M. 2010. Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del dengue. IATREIA, 23:146-156.

Ramirez JL, Muturi EJ, Barletta ABF, Rooney AP. 2019. The *Aedes aegypti* IMD pathway is a critical component of the mosquito antifungal immune response. Developmental & Comparative Immunology 95:1–9.

Ramirez JL, Short SM, Bahia AC, Saraiva RG, Dong Y, Kang S, Tripathi A, Mlambo G, Dimopoulos, G. 2014. *Chromobacterium* Csp_P reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities. PLoS Pathogens 10:e1004398.

Reeves WK, Loftis AD, Sanders F, Spinks MD, Wills W, Denison AM, Dasch GA. 2006. *Borrelia*, *Coxiella*, and *Rickettsia* in *Carios capensis* (Acari: Argasidae) from a brown pelican (*Pelecanus occidentalis*) rookery in South Carolina, USA. Experimental and Applied Acarology 39:321-329.

Reinhold JM, Lazzari CR, Lahondère C. 2018. Effects of the environmental temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes: A Review. Insects 9:158.

Rey JR, Lounibos P. 2015. Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y la transmisión de enfermedades. Biomédica 35:177-185.

Ribera I, Melic A, Torralba A. 2015. Introducción y guía visual de los artrópodos. Revista IDE@ - SEA 2:1–30.

Richards SL, White AV, Balanay JAG. 2017. Potential for sublethal insecticide exposure to impact vector competence of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) for dengue and Zika viruses. Research and Reports in Tropical Medicine 8:53–57.

Rinkevich FD, Du Y, Dong K. 2013. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. Pesticide Biochemistry and Physiology, 106:93–100.

Rinkevich FD, Hedtke SM, Leichter CA, Harris SA, Su C, Brady SG, Taskin V, Qiu X, Scott JG. 2012. Multiple origins of kdr-type resistance in the house fly, *Musca domestica*. PLoS ONE 7:e52761.

Rivero A, Vézilier J, Weill M, Read AF, Gandon S. 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? PLoS Pathogens, 6:e1001000.

Rodrigues de Oliveira S, Tait RR, Conte H. 2017. Chemical control of *Aedes aegypti*: a review on effects on the environment and human health. REGET/UFSM 21:240-247.

Saavedra-Rodriguez K, Maloof FV, Campbell CL, Garcia-Rejon J, Lenhart A, Penilla P, Rodriguez A, Sandoval AA, Flores AE, Ponce G, Lozano S, Black WC. 2018. Parallel evolution of vgsc mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. Scientific Reports 8:6747.

Saavedra-Rodriguez K, Strode C, Flores Suarez A, Fernandez Salas I, Ranson H, Hemingway J, Black WC IV. 2008. Quantitative trait loci mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. Genetics 180:1137–1152.

Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway J, Black WC IV. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene

associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 16:785–798.

Salvatella R. 1996. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay. *Revista Médica del Uruguay* 12:28-36.

Santana ME. 2018. Alteración del metabolismo energético durante el ciclo de infección de monocitos (U937 DC-SIGN) con el virus dengue. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 2018. Tesis de Licenciatura.

Santana-Román ME, Maycotte P, Uribe-Carvajal S, Uribe-Alvarez C, Alvarado-Medina N, Khan M, Siddiqui A, Pando-Robles V. Monitoring Mitochondrial Function in *Aedes albopictus* C6/36 Cell Line during Dengue Virus Infection. *Insects*. 2021 Oct 14;12(10):934.

Saraiva RG, Fang J, Kang S, Angleró-Rodríguez YI, Dong Y, Dimopoulos G. 2018. Aminopeptidase secreted by *Chromobacterium* sp. Panama inhibits dengue virus infection by degrading the E protein. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 12:0006443.

Schaffner F, Kaufmann C, Vazeille M, Failloux AB, Mathis A. 2011. Vector competence of *Aedes japonicus* for chikungunya and dengue viruses. *European Mosquito Bulletin* 29:141-142

Scharf ME, Parimi S, Meinke LJ, Chandler LD, Siegfried BD. 2000. Expression and induction of three family 4 cytochrome P450 (cyp4) genes identified from insecticide-resistant and susceptible western corn rootworms, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Molecular Biology*, 9:635–643.

Schleier JJ, Peterson RKD. 2011. Pyrethrins and Pyrethroid Insecticides. In: *Green Trends in Insect Control*, Lopez O, Fernandez JG (eds). RSC publishing, pp. 94-121.

Scott JG. 2019. Life and death at the voltage-sensitive sodium channel: evolution in response to insecticide use. *Annual Review of Entomology*, 64:243–257.

Secretaría de Salud. 2023. Boletín epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información. Número 52, Volumen 35, Semana 54 Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/878786/Pano_dengue_52_2023.pdf

Service MW. 1978. A short history of early medical entomology. *Journal of Medical Entomology*. 14:603-626.

Sigle LT, McGraw EA. 2019. Expanding the canon: Non-classical mosquito genes at the interface of arboviral infection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 109:72–80.

Sim S, Jupatanakul N, Ramirez JL, Kang S, Romero-Vivas CM, Mohammed H, Dimopoulos G. 2013. Transcriptomic profiling of diverse *Aedes aegypti* strains reveals increased basal-level immune activation in dengue virus-refractory populations and identifies novel virus-vector molecular interactions. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7:2295.

Simoy MI, Simoy MV, Canziani GA. 2015. The effect of temperature on the population dynamics of *Aedes aegypti*. *Ecological Modelling* 314:100–110.

Slama D, Haouas N, Mezhoud H, Babba H, Chaker E. 2015. Blood meal analysis of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Central Tunisia. *PLoS ONE* 10:e0120528.

Soderlund DM, Bloomquist JR. 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Entomology*, 34:77–96.

Sogorb MA, Vilanova E. 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 128: 215–228.

Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. 2009. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:17841–17846.

Spillings BL, Coetzee M, Koekemoer LL, & Brooke BD. 2008. The effect of a single blood meal on the phenotypic expression of insecticide resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Malaria Journal* 7:226

Stavropoulou E, Pircalabioru GG, Bezirtzoglou, E. 2018. The role of cytochromes P450 in infection. *Frontiers in Immunology* 9:1-7

Tabachnick WJ. 2016. Ecological Effects on arbovirus-mosquito cycles of transmission. *Current Opinion in Virology* 21:124-131.

Thatheyus AJ, Gnana Selvam AD. 2013. Synthetic pyrethroids: toxicity and biodegradation. *Applied Ecology and Environmental Sciences* 1:33–36.

Tisgratog R, Tananchai C, Juntarajumnong W, Tuntakom S, Bangs MJ, Corbel V, Chareonviriyaphap T. 2012. Host feeding patterns and preference of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) in a malaria endemic area of western Thailand: baseline site description. *Parasites & Vectors* 5:1–11.

Tripathy A, & Kar SK. 2015. Feeding stage, species, body part and sex-specific activity of glutathione S-transferase in mosquito. *Tropical Biomedicine* 32:65-75.

van den Berg H, Zaim M, Yadav RS, Soares A, Ameneshewa B, Mnzava A, Hii J, Dash AP, Ejov M. 2012. Global trends in the use of insecticides to control vector-borne diseases. *Environmental Health Perspectives* 120:577–582.

Vega-Rua A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenco-de-Oliveira R. 2014. High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten american countries as a crucial factor in the spread of chikungunya virus. *Journal of Virology*, 88:6294–6306.

Velandia ML, Castellanos JE. 2011. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Asociación Colombiana De Infectología* 15: 33–43.

Venkatachalam P, Mohamed SMB, Prasad MP, Valsala K, Saha T., James J. 2010. Molecular characterization of chikungunya virus in febrile patients from central Kerala by RT-PCR assay. *Current science* 98:962–966.

Vera-Maloof FZ, Saavedra-Rodriguez K, Elizondo-Quiroga AE, Lozano-Fuentes S, Black IV WC. 2015. Coevolution of the Ile1,016 and Cys1,534 mutations in the voltage gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9:e0004263.

Vijverberg HP, van der Zalm JM, van der Bercken J. (1982). Similar mode of action of pyrethroids and DDT on sodium channel gating in myelinated nerves. *Nature* 295:601-603.

Villanueva-Segura OK, Ontiveros-Zapata KA, Lopez-Monroy B, Ponce-Garcia G, Gutierrez-Rodriguez SM, Davila-Barboza JA, Mora-Jasso EJ, Flores AE. 2019. Distribution and frequency of the kdr mutation v410l in natural populations of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from eastern and southern Mexico. *Journal of Medical Entomology* 57:218-223.

Wilson AJ, Morgan ER, Booth M, Norman R, Perkins SE, Hauffe HC, Mideo N, Antonovics J, McCallum H, Fenton A. 2017. What is a vector? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372:20160085.

Wu P, Yu X, Wang P, Cheng G. 2019. Arbovirus lifecycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 21:e1

Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathogens* 4:e1000098.

Xiao C, Luan S, Xu Z, Lang J, Rao W, Huang Q. 2017. Tolerance potential of *Chilo suppressalis* larvae to fipronil exposure via the modulation of detoxification and GABA responses. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 20:1287–1293.

Xie X, Wang D, Li B, Li M, Xing DZ, Zhao T, Zhou X, Li C. 2023. Mosquito CYP4C21 reduces dengue virus and Zika virus replication in *Aedes aegypti* cells. *Biosafety and Health*. 5:144–151.

Yadav P, Barde PV, Gokhale MD, Vipat V, Mishra AC, Pal JK, Mourya DT. 2005. Effect of temperature and insecticide stresses on *Aedes aegypti* larvae and their influence on the susceptibility of mosquitoes to dengue-2 virus. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 36:1139–1144.

Yañez-Arenas C, Rioja-Nieto R, Martín GA, Dzul-Manzanilla F, Chiappa-Carrara X., Buenfil-Ávila A, Manrique-Saide P, Correa-Morales F, Díaz-Quinónez JA, Pérez-Rentería C, Ordoñez-Álvarez J, Vazquez-Prokopec G, Huerta H. 2017. Characterizing environmental suitability of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Mexico based on regional and global niche models. *Journal of Medical Entomology* 55:69–77.

Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Prapanthadara L. 2010. A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96:127–131.

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

Yu SJ. 2015. *The toxicology and biochemistry of insecticides*. 2 Edición. CRC Press: New York. pp. 248

Zhao Y, Wang Q, Ding J, Wang Y, Zhang Z, Liu F, Mu W. 2018. Sublethal effects of chlorfenapyr on the life table parameters, nutritional physiology and enzymatic properties of *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 148:93-102.

Zhu YC, Caren J, Reddy GVP, Li W, Yao J. 2020. Effect of age on insecticide susceptibility and enzymatic activities of three detoxification enzymes and one invertase in honey bee workers (*Apis mellifera*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 238:108844

Zimdahl, RL. 2015. DDT: An Insecticide. In: *Six Chemicals That Changed Agriculture*. Academic Press Elsevier. pp. 115–133.

12.Anexo

Tabla 12. Comparaciones múltiples de medias marginales estimadas de la actividad de OFM entre diferentes cepas de *Ae. aegypti*, estado de exposición a insecticidas y tipo de alimentación sanguínea.

Grupo 1	Grupo 2	Estimado	SE	t ratio	P value
No expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Sangre MTY 6	0.3729	0.8014	0.4653	1
No expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 6	0.4496	0.9364	0.4801	1
No expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 6	7.4704	0.8810	8.4798	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Sangre NO 6	-56.0910	3.4600	-16.2111	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Sangre NO 6	-55.2170	3.4423	-16.0408	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre NO 6	-43.3887	2.6009	-16.6819	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre NO 6	-43.6335	2.6028	-16.7639	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Sangre MTY 12	-0.2459	0.8736	-0.2815	1
No expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Sangre MTY 12	0.1270	1.2046	0.1054	1
No expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 12	1.6331	0.9196	1.7759	0.985470089
No expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 12	8.6539	0.8377	10.3306	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Sangre NO 12	-31.3205	2.5022	-12.5171	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Sangre NO 12	-30.4466	3.2852	-9.2678	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre NO 12	-13.5322	1.5531	-8.7131	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre NO 12	-13.7771	1.5477	-8.9016	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Sangre MTY 19	-2.4962	0.9823	-2.5413	0.643639034
No expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Sangre MTY 19	-2.1233	1.4085	-1.5075	0.998398155
No expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	0.9702	0.9242	1.0497	0.999996352
No expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	7.9910	0.8563	9.3317	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Sangre NO 19	-29.8361	3.2515	-9.1762	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Sangre NO 19	-28.9621	2.3964	-12.0858	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre NO 19	-14.1936	1.5601	-9.0978	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre NO 19	-14.4385	1.5550	-9.2852	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 6	0.0767	0.7819	0.0981	1
Expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 6	7.0975	0.7145	9.9332	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Sangre NO 6	-56.4639	3.4215	-16.5029	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Sangre NO 6	-55.5899	3.4035	-16.3332	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre NO 6	-43.7616	2.5494	-17.1656	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre NO 6	-44.0065	2.5513	-17.2486	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Sangre MTY 12	-0.6188	1.1661	-0.5307	1
Expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Sangre MTY 12	-0.2459	0.8736	-0.2815	1
Expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 12	1.2602	0.7617	1.6546	0.994103012
Expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 12	8.2810	0.6604	12.5387	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Sangre NO 12	-31.6935	2.4486	-12.9436	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Sangre NO 12	-30.8195	3.2445	-9.4989	1.91E-10

Expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre NO 12	-13.9051	1.4651	-9.4909	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre NO 12	-14.1500	1.4594	-9.6958	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Sangre MTY 19	-2.8692	1.1092	-2.5866	0.608054796
Expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Sangre MTY 19	-2.4962	0.9823	-2.5413	0.643639034
Expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	0.5973	0.7672	0.7785	0.999999999
Expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	7.6181	0.6839	11.1390	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Sangre NO 19	-30.2090	3.2104	-9.4099	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Sangre NO 19	-29.3350	2.3403	-12.5346	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre NO 19	-14.5665	1.4726	-9.8920	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre NO 19	-14.8114	1.4671	-10.0955	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 6	7.0208	0.4255	16.4983	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Sangre NO 6	-56.5406	3.3967	-16.6455	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Sangre NO 6	-55.6666	3.3786	-16.4760	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre NO 6	-43.8383	2.5161	-17.4230	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre NO 6	-44.0831	2.5181	-17.5068	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Sangre MTY 12	-0.6955	0.9688	-0.7179	0.999999998
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Sangre MTY 12	-0.3226	0.8477	-0.3806	1
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 12	1.1835	0.3983	2.9715	0.316856147
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 12	8.2043	0.5446	15.0642	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Sangre NO 12	-31.7701	2.4139	-13.1611	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Sangre NO 12	-30.8962	3.2185	-9.5996	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre NO 12	-13.9818	1.4064	-9.9414	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre NO 12	-14.2267	1.4005	-10.1584	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Sangre MTY 19	-2.9458	0.9519	-3.0946	0.241753318
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Sangre MTY 19	-2.5729	1.0086	-2.5510	0.636122482
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	0.5206	0.4302	1.2100	0.999953069
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	7.5414	0.5883	12.8190	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Sangre NO 19	-30.2857	3.1840	-9.5118	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Sangre NO 19	-29.4117	2.3040	-12.7653	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre NO 19	-14.6432	1.4142	-10.3545	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre NO 19	-14.8881	1.4085	-10.5699	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Sangre NO 6	-63.5614	3.3819	-18.7948	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Sangre NO 6	-62.6874	3.3637	-18.6365	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre NO 6	-50.8591	2.4960	-20.3762	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre NO 6	-51.1039	2.4980	-20.4582	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Sangre MTY 12	-7.7163	0.9153	-8.4306	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Sangre MTY 12	-7.3434	0.7860	-9.3429	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 12	-5.8373	0.6187	-9.4340	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 12	1.1835	0.3983	2.9715	0.316856147
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Sangre NO 12	-38.7909	2.3930	-16.2104	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Sangre NO 12	-37.9170	3.2028	-11.8388	1.91E-10

Expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre NO 12	-21.0026	1.3701	-15.3291	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre NO 12	-21.2475	1.3640	-15.5772	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Sangre MTY 19	-9.9666	0.8974	-11.1061	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Sangre MTY 19	-9.5937	0.9573	-10.0214	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	-6.5002	0.6215	-10.4587	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	0.5206	0.4302	1.2100	0.999953069
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Sangre NO 19	-37.3065	3.1681	-11.7755	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Sangre NO 19	-36.4325	2.2821	-15.9648	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	No expuestos Virus-Sangre NO 19	-21.6640	1.3781	-15.7204	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 6	Expuestos Virus-Sangre NO 19	-21.9089	1.3723	-15.9653	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 6	Expuestos Sangre NO 6	0.8740	3.0592	0.2857	1
No expuestos Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre NO 6	12.7023	4.1744	3.0429	0.271805503
No expuestos Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre NO 6	12.4575	4.1756	2.9834	0.30905838
No expuestos Sangre NO 6	No expuestos Sangre MTY 12	55.8451	3.4689	16.0986	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 6	Expuestos Sangre MTY 12	56.2180	3.4371	16.3563	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 12	57.7241	3.3921	17.0170	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 12	64.7449	3.3709	19.2073	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 6	No expuestos Sangre NO 12	24.7705	3.8049	6.5102	4.95E-08
No expuestos Sangre NO 6	Expuestos Sangre NO 12	25.6444	5.3376	4.8045	0.000514032
No expuestos Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre NO 12	42.5588	3.6157	11.7707	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre NO 12	42.3139	3.6134	11.7104	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 6	No expuestos Sangre MTY 19	53.5948	3.4643	15.4707	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 6	Expuestos Sangre MTY 19	53.9677	3.4803	15.5068	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	57.0612	3.3934	16.8153	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	64.0820	3.3755	18.9842	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 6	No expuestos Sangre NO 19	26.2549	3.7478	7.0054	2.34E-09
No expuestos Sangre NO 6	Expuestos Sangre NO 19	27.1289	4.3241	6.2739	2.06E-07
No expuestos Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre NO 19	41.8974	3.6187	11.5780	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre NO 19	41.6525	3.6165	11.5174	1.91E-10
Expuestos Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre NO 6	11.8283	4.1597	2.8435	0.406780467
Expuestos Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre NO 6	11.5835	4.1609	2.7839	0.451965988
Expuestos Sangre NO 6	No expuestos Sangre MTY 12	54.9711	3.4512	15.9280	1.91E-10
Expuestos Sangre NO 6	Expuestos Sangre MTY 12	55.3440	3.4192	16.1862	1.91E-10
Expuestos Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 12	56.8502	3.3740	16.8494	1.91E-10
Expuestos Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 12	63.8710	3.3526	19.0511	1.91E-10
Expuestos Sangre NO 6	No expuestos Sangre NO 12	23.8965	4.3797	5.4562	2.03E-05
Expuestos Sangre NO 6	Expuestos Sangre NO 12	24.7705	3.8049	6.5102	4.95E-08
Expuestos Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre NO 12	41.6848	3.5987	11.5834	1.91E-10
Expuestos Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre NO 12	41.4399	3.5963	11.5228	1.91E-10
Expuestos Sangre NO 6	No expuestos Sangre MTY 19	52.7208	3.4465	15.2968	1.91E-10
Expuestos Sangre NO 6	Expuestos Sangre MTY 19	53.0937	3.4626	15.3334	1.91E-10

Expuestos Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	56.1872	3.3753	16.6467	1.91E-10
Expuestos Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	63.2080	3.3573	18.8269	1.91E-10
Expuestos Sangre NO 6	No expuestos Sangre NO 19	25.3809	5.3020	4.7870	0.000557421
Expuestos Sangre NO 6	Expuestos Sangre NO 19	26.2549	3.7478	7.0054	2.34E-09
Expuestos Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre NO 19	41.0234	3.6017	11.3900	1.91E-10
Expuestos Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre NO 19	40.7785	3.5995	11.3290	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre NO 6	-0.2449	1.4788	-0.1656	1
No expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Sangre MTY 12	43.1428	2.6128	16.5123	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Sangre MTY 12	43.5157	2.5703	16.9300	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 12	45.0218	2.5099	17.9377	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 12	52.0426	2.4811	20.9760	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Sangre NO 12	12.0681	3.4227	3.5259	0.07570237
No expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Sangre NO 12	12.9421	4.0307	3.2109	0.18248231
No expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre NO 12	29.8565	2.6017	11.4755	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre NO 12	29.6116	2.9882	9.9094	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Sangre MTY 19	40.8924	2.6065	15.6883	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Sangre MTY 19	41.2653	2.6278	15.7035	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	44.3589	2.5116	17.6616	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	51.3797	2.4874	20.6559	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Sangre NO 19	13.5526	4.0032	3.3854	0.114388296
No expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Sangre NO 19	14.4266	3.3461	4.3114	0.00446045
No expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre NO 19	29.1950	2.6060	11.2029	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre NO 19	28.9502	2.9921	9.6756	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Sangre MTY 12	43.3876	2.6146	16.5941	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Sangre MTY 12	43.7605	2.5722	17.0127	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 12	45.2667	2.5119	18.0212	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 12	52.2875	2.4830	21.0579	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Sangre NO 12	12.3130	3.4242	3.5959	0.060909378
Expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Sangre NO 12	13.1870	4.0319	3.2706	0.156434113
Expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre NO 12	30.1013	2.9971	10.0435	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre NO 12	29.8565	2.6017	11.4755	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Sangre MTY 19	41.1373	2.6084	15.7709	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Sangre MTY 19	41.5102	2.6297	15.7854	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	44.6037	2.5136	17.7453	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	51.6245	2.4894	20.7379	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Sangre NO 19	13.7974	4.0045	3.4455	0.096241171
Expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Sangre NO 19	14.6714	3.3476	4.3827	0.003318893
Expuestos Virus-Sangre NO 6	No expuestos Virus-Sangre NO 19	29.4399	3.0007	9.8111	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 6	Expuestos Virus-Sangre NO 19	29.1950	2.6060	11.2029	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 12	Expuestos Sangre MTY 12	0.3729	0.8014	0.4653	1
No expuestos Sangre MTY 12	No expuestos Virus-Sangre MTY 12	1.8791	0.9525	1.9727	0.952519907

No expuestos Sangre MTY 12	Expuestos Virus-Sangre MTY 12	8.8999	0.8737	10.1862	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 12	No expuestos Sangre NO 12	-31.0746	2.5145	-12.3581	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 12	Expuestos Sangre NO 12	-30.2006	3.2946	-9.1668	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 12	No expuestos Virus-Sangre NO 12	-13.2863	1.5728	-8.4475	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 12	Expuestos Virus-Sangre NO 12	-13.5312	1.5675	-8.6324	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 12	No expuestos Sangre MTY 19	-2.2503	1.0224	-2.2010	0.86820064
No expuestos Sangre MTY 12	Expuestos Sangre MTY 19	-1.8774	1.4208	-1.3214	0.999793345
No expuestos Sangre MTY 12	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	1.2161	0.9570	1.2707	0.999891824
No expuestos Sangre MTY 12	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	8.2369	0.8916	9.2384	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 12	No expuestos Sangre NO 19	-29.5902	3.2609	-9.0742	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 12	Expuestos Sangre NO 19	-28.7162	2.4092	-11.9194	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 12	No expuestos Virus-Sangre NO 19	-13.9477	1.5798	-8.8291	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 12	Expuestos Virus-Sangre NO 19	-14.1926	1.5747	-9.0129	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 12	No expuestos Virus-Sangre MTY 12	1.5062	0.8291	1.8167	0.980929002
Expuestos Sangre MTY 12	Expuestos Virus-Sangre MTY 12	8.5270	0.7372	11.5671	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 12	No expuestos Sangre NO 12	-31.4475	2.4704	-12.7298	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 12	Expuestos Sangre NO 12	-30.5735	3.2610	-9.3754	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 12	No expuestos Virus-Sangre NO 12	-13.6592	1.5013	-9.0985	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 12	Expuestos Virus-Sangre NO 12	-13.9041	1.4957	-9.2961	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 12	No expuestos Sangre MTY 19	-2.6232	1.1647	-2.2523	0.841245092
Expuestos Sangre MTY 12	Expuestos Sangre MTY 19	-2.2503	1.0224	-2.2010	0.86820064
Expuestos Sangre MTY 12	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	0.8432	0.8342	1.0108	0.999998204
Expuestos Sangre MTY 12	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	7.8640	0.7583	10.3710	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 12	No expuestos Sangre NO 19	-29.9631	3.2270	-9.2851	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 12	Expuestos Sangre NO 19	-29.0891	2.3631	-12.3096	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 12	No expuestos Virus-Sangre NO 19	-14.3206	1.5085	-9.4931	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 12	Expuestos Virus-Sangre NO 19	-14.5655	1.5032	-9.6895	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 12	Expuestos Virus-Sangre MTY 12	7.0208	0.4255	16.4983	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 12	No expuestos Sangre NO 12	-32.9537	2.4075	-13.6882	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 12	Expuestos Sangre NO 12	-32.0797	3.2136	-9.9824	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 12	No expuestos Virus-Sangre NO 12	-15.1654	1.3953	-10.8691	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 12	Expuestos Virus-Sangre NO 12	-15.4102	1.3893	-11.0922	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 12	No expuestos Sangre MTY 19	-4.1294	0.9354	-4.4147	0.002900001
No expuestos Virus-Sangre MTY 12	Expuestos Sangre MTY 19	-3.7565	0.9930	-3.7830	0.032877851
No expuestos Virus-Sangre MTY 12	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	-0.6630	0.3434	-1.9308	0.962137533
No expuestos Virus-Sangre MTY 12	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	6.3578	0.5675	11.2040	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 12	No expuestos Sangre NO 19	-31.4692	3.1791	-9.8988	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 12	Expuestos Sangre NO 19	-30.5953	2.2973	-13.3182	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 12	No expuestos Virus-Sangre NO 19	-15.8268	1.4031	-11.2799	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 12	Expuestos Virus-Sangre NO 19	-16.0716	1.3974	-11.5011	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 12	No expuestos Sangre NO 12	-39.9745	2.3774	-16.8145	1.91E-10

Expuestos Virus-Sangre MTY 12	Expuestos Sangre NO 12	-39.1005	3.1911	-12.2528	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 12	No expuestos Virus-Sangre NO 12	-22.1862	1.3427	-16.5234	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 12	Expuestos Virus-Sangre NO 12	-22.4310	1.3365	-16.7837	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 12	No expuestos Sangre MTY 19	-11.1502	0.8550	-13.0417	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 12	Expuestos Sangre MTY 19	-10.7773	0.9177	-11.7442	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 12	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	-7.6838	0.5253	-14.6266	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 12	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	-0.6630	0.3434	-1.9308	0.962137533
Expuestos Virus-Sangre MTY 12	No expuestos Sangre NO 19	-38.4900	3.1564	-12.1944	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 12	Expuestos Sangre NO 19	-37.6161	2.2657	-16.6024	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 12	No expuestos Virus-Sangre NO 19	-22.8476	1.3508	-16.9137	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 12	Expuestos Virus-Sangre NO 19	-23.0924	1.3449	-17.1702	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 12	Expuestos Sangre NO 12	0.8740	3.0592	0.2857	1
No expuestos Sangre NO 12	No expuestos Virus-Sangre NO 12	17.7883	2.7133	6.5558	3.74E-08
No expuestos Sangre NO 12	Expuestos Virus-Sangre NO 12	17.5435	2.7103	6.4729	6.21E-08
No expuestos Sangre NO 12	No expuestos Sangre MTY 19	28.8243	2.5081	11.4927	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 12	Expuestos Sangre MTY 19	29.1972	2.5301	11.5398	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 12	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	32.2907	2.4092	13.4029	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 12	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	39.3115	2.3840	16.4897	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 12	No expuestos Sangre NO 19	1.4844	3.4443	0.4310	1
No expuestos Sangre NO 12	Expuestos Sangre NO 19	2.3584	3.4440	0.6848	0.999999999
No expuestos Sangre NO 12	No expuestos Virus-Sangre NO 19	17.1269	2.7174	6.3027	1.73E-07
No expuestos Sangre NO 12	Expuestos Virus-Sangre NO 19	16.8820	2.7144	6.2193	2.84E-07
Expuestos Sangre NO 12	No expuestos Virus-Sangre NO 12	16.9143	3.4487	4.9045	0.00032145
Expuestos Sangre NO 12	Expuestos Virus-Sangre NO 12	16.6695	3.4463	4.8369	0.000442012
Expuestos Sangre NO 12	No expuestos Sangre MTY 19	27.9503	3.2897	8.4964	1.91E-10
Expuestos Sangre NO 12	Expuestos Sangre MTY 19	28.3232	3.3065	8.5659	1.91E-10
Expuestos Sangre NO 12	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	31.4167	3.2149	9.7721	1.91E-10
Expuestos Sangre NO 12	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	38.4375	3.1961	12.0265	1.91E-10
Expuestos Sangre NO 12	No expuestos Sangre NO 19	0.6105	5.5301	0.1104	1
Expuestos Sangre NO 12	Expuestos Sangre NO 19	1.4844	3.4443	0.4310	1
Expuestos Sangre NO 12	No expuestos Virus-Sangre NO 19	16.2529	3.4519	4.7084	0.000799472
Expuestos Sangre NO 12	Expuestos Virus-Sangre NO 19	16.0081	3.4496	4.6406	0.001085519
No expuestos Virus-Sangre NO 12	Expuestos Virus-Sangre NO 12	-0.2449	1.4788	-0.1656	1
No expuestos Virus-Sangre NO 12	No expuestos Sangre MTY 19	11.0360	1.5625	7.0632	1.66E-09
No expuestos Virus-Sangre NO 12	Expuestos Sangre MTY 19	11.4089	1.5976	7.1411	1.07E-09
No expuestos Virus-Sangre NO 12	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	14.5024	1.3983	10.3712	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre NO 12	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	21.5232	1.3544	15.8912	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre NO 12	No expuestos Sangre NO 19	-16.3039	3.4166	-4.7720	0.000597593
No expuestos Virus-Sangre NO 12	Expuestos Sangre NO 19	-15.4299	2.6161	-5.8981	1.82E-06
No expuestos Virus-Sangre NO 12	No expuestos Virus-Sangre NO 19	-0.6614	1.5573	-0.4247	1
No expuestos Virus-Sangre NO 12	Expuestos Virus-Sangre NO 19	-0.9063	2.1478	-0.4220	1

Expuestos Virus-Sangre NO 12	No expuestos Sangre MTY 19	11.2808	1.5571	7.2447	6.34E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 12	Expuestos Sangre MTY 19	11.6538	1.5924	7.3183	4.61E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 12	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	14.7473	1.3924	10.5916	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 12	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	21.7681	1.3482	16.1456	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre NO 12	No expuestos Sangre NO 19	-16.0590	3.4141	-4.7037	0.000816839
Expuestos Virus-Sangre NO 12	Expuestos Sangre NO 19	-15.1850	2.6129	-5.8116	2.95E-06
Expuestos Virus-Sangre NO 12	No expuestos Virus-Sangre NO 19	-0.4165	2.1474	-0.1940	1
Expuestos Virus-Sangre NO 12	Expuestos Virus-Sangre NO 19	-0.6614	1.5573	-0.4247	1
No expuestos Sangre MTY 19	Expuestos Sangre MTY 19	0.3729	0.8014	0.4653	1
No expuestos Sangre MTY 19	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	3.4664	0.9399	3.6880	0.045247622
No expuestos Sangre MTY 19	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	10.4872	0.8732	12.0098	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 19	No expuestos Sangre NO 19	-27.3399	3.2559	-8.3969	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 19	Expuestos Sangre NO 19	-26.4659	2.4025	-11.0161	1.91E-10
No expuestos Sangre MTY 19	No expuestos Virus-Sangre NO 19	-11.6974	1.5695	-7.4531	2.99E-10
No expuestos Sangre MTY 19	Expuestos Virus-Sangre NO 19	-11.9423	1.5644	-7.6339	2.22E-10
Expuestos Sangre MTY 19	No expuestos Virus-Sangre MTY 19	3.0935	0.9973	3.1019	0.237698161
Expuestos Sangre MTY 19	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	10.1143	0.9347	10.8209	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 19	No expuestos Sangre NO 19	-27.7128	3.2730	-8.4672	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 19	Expuestos Sangre NO 19	-26.8388	2.4255	-11.0653	1.91E-10
Expuestos Sangre MTY 19	No expuestos Virus-Sangre NO 19	-12.0703	1.6045	-7.5229	2.58E-10
Expuestos Sangre MTY 19	Expuestos Virus-Sangre NO 19	-12.3152	1.5995	-7.6994	2.10E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 19	Expuestos Virus-Sangre MTY 19	7.0208	0.4255	16.4983	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 19	No expuestos Sangre NO 19	-30.8063	3.1804	-9.6862	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 19	Expuestos Sangre NO 19	-29.9323	2.2991	-13.0191	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 19	No expuestos Virus-Sangre NO 19	-15.1638	1.4061	-10.7840	1.91E-10
No expuestos Virus-Sangre MTY 19	Expuestos Virus-Sangre NO 19	-15.4087	1.4005	-11.0026	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 19	No expuestos Sangre NO 19	-37.8271	3.1614	-11.9654	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 19	Expuestos Sangre NO 19	-36.9531	2.2727	-16.2599	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 19	No expuestos Virus-Sangre NO 19	-22.1846	1.3625	-16.2827	1.91E-10
Expuestos Virus-Sangre MTY 19	Expuestos Virus-Sangre NO 19	-22.4295	1.3566	-16.5337	1.91E-10
No expuestos Sangre NO 19	Expuestos Sangre NO 19	0.8740	3.0592	0.2857	1
No expuestos Sangre NO 19	No expuestos Virus-Sangre NO 19	15.6425	3.4198	4.5741	0.001458022
No expuestos Sangre NO 19	Expuestos Virus-Sangre NO 19	15.3976	3.4175	4.5056	0.001966397
Expuestos Sangre NO 19	No expuestos Virus-Sangre NO 19	14.7685	2.6202	5.6363	7.74E-06
Expuestos Sangre NO 19	Expuestos Virus-Sangre NO 19	14.5236	2.6172	5.5493	1.24E-05
No expuestos Virus-Sangre NO 19	Expuestos Virus-Sangre NO 19	-0.2449	1.4788	-0.1656	1