

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN KDR ILE1,016 EN *Aedes aegypti* (DIPTERA:  
CULICIDAE) EN ZONAS DE RIESGO DE DENGUE EN MÉXICO

Por

QUETZALY KARMY SILLER RODRÍGUEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS con Acentuación en Entomología Médica

Noviembre, 2011

FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN KDR ILE1,016 EN *Aedes aegypti* (DIPTERA:  
CULICIDAE) EN ZONAS DE RIESGO DE DENGUE EN MÉXICO

Comité de tesis

---

Director de tesis: Dr. Gustavo Ponce Garza

---

Secretaria: Dra. Adriana E. Flores Suárez

---

Vocal: Dr. Roberto Mercado Hernández

---

Vocal: Dr. Raúl Torres Zapata

---

Vocal: Dr. Eduardo A. Rebollar Téllez



## AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi familia por apoyarme en todo momento para la realización de esta investigación, especialmente a mis padres Otila Rodríguez Garza y Juan Manuel Siller Peña por ser un ejemplo de trabajo y superación, a mi esposo Aldo I. Ortega Morales por su apoyo y colaboración en las recolectas del material biológico, a mi princesita Anna Karmy por alimentar mis deseos de ser mejor profesionista y de ser mejor persona.

Agradezco a todos mis maestros por sus enseñanzas, al Dr. Gustavo Ponce por todas sus recomendaciones, a la Dra. Adriana E. Flores por darme la oportunidad de trabajar en este interesante tema de investigación, así como su apoyo, sus regaños y sus consejos, a CONACYT por el soporte económico brindado durante la realización de esta investigación, a mis amigos Roberto, Gaby, Bety, Brenda, Selene y Leslie por todos esos momentos que pasamos entre risas, llantos y discusiones así como su compañía, apoyo y ayuda tanto en mi trabajo de investigación como en lo personal.

Agradezco también la colaboración de Iram Rodríguez, Cristina Bobadilla y Antonio Cortez por su apoyo tanto con el material biológico, recolectas y reactivos. A Carmen y Yadira de posgrado por su ayuda en los tramites doctorales y papelería.

Pero sobre todo agradezco a Dios por cuidarme y por regalarme la oportunidad de conocer a todas estas maravillosas personas.

## DEDICATORIA

Dedicada a mi princesita Anna Karmy ♥

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1.RESUMEN.....	1
1 ABSTRACT .....	2
2. INTRODUCCIÓN .....	3
3. ANTECEDENTES .....	5
3.1 Género <i>Aedes</i> .....	5
3.2 <i>Aedes aegypti</i> .....	6
3.3 Control de dengue .....	8
3.4 Control químico en <i>Ae. aegyptien</i> México .....	8
3.5 Piretroides .....	9
3.6 Resistencia a insecticidas .....	10
3.6.1 Resistencia por Sitio Blanco .....	12
3.6.2 La biología molecular de la resistencia knockdown ( <i>kdr</i> ) ...	13
3.6.3 Mecanismo de acción de los piretroides .....	14
3.6.4 Mutaciones asociadas con la resistencia <i>kdr</i> ayudan a definir cuáles son los sitios de unión de los piretroides en el canal de sodio .....	15
3.6.5 Resistencia a insecticidas en <i>Ae. aegypti</i> .....	19
3.6.6 Mutaciones en el canal de sodio dependiente del voltaje asociados con resistencia a insecticidas piretroides y DDT en <i>Ae. aegypti</i> .....	19
3.6.7 Mutación Ile1,016 en <i>Ae. aegypti</i> .....	22
HIPÓTESIS .....	25

Sección	Página
OBJETIVOS.....	26
Objetivo General	
Objetivos particulares	
MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
6.1 Área de estudio .....	27
6.1.2 Coordenadas de los sitios de colecta.....	28
6.1.3 Nuevo León .....	28
6.1.4 Veracruz .....	28
6.1.5 Yucatán .....	28
6.1.6 Guerrero .....	29
6.2 Recolecta de larvas de <i>Ae. aegypti</i> .....	29
6.3 Cría de Mosquitos .....	31
6.4 Extracción de ADN .....	32
6.5 Prueba PCR para la amplificación de los alelos Ile1,016 y Val1,016... 33	
6.5.1 Procedimiento .....	35
6.5.2 Programa del termociclador para la amplificación de los alelos Ile1016 y Val1,016 .....	36
6.5.3 Identificación de genotipos en <i>Ae. aegypti</i> .....	36
6.6 Cálculo de frecuencias genotípicas y alélicas .....	38
6.7 Equilibrio de Hardy- Weinberg utilizando la prueba de $X^2$ .....	40
6.8 Coeficiente de Wrigth (endogamia) .....	40
6.9 Intervalo de Confianza Agresti-Coull .....	41
7. RESULTADOS .....	42
7.1 Genotipos y frecuencia alélica de Ile1,016 por Estados y por localidades .....	42
7.1.1 Nuevo León .....	42
7.1.2. Veracruz .....	44
7.1.3 Guerrero y Yucatán .....	47
7.1.4 Frecuencia de la mutación <i>Ile1016</i> en México .....	48
7.2 Equilibrio de Hardy – Weinberg .....	49
7.2.1 Nuevo León .....	49

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
7.2.2 Veracruz .....	50
7.2.3 Guerrero y Yucatán .....	51
7.3 Endogamia o Coeficiente de Wrigth ( $F_{IS}$ ) .....	52
8. DISCUSIONES .....	54
9. CONCLUSIONES .....	59
10. LITERATURA CITADA .....	61
11. Anexo .....	69
11.1 Buffer de extracción .....	69
11.2 Buffer TE 1x .....	70
11.3 Buffer de carga .....	71
11.4 Buffer TBE (Tris/Boric/EDTA) 5x .....	71
11.5 TBE 1x .....	72
11.6 Acetato de potasio al 8M .....	72
11.7 Alcohol etílico al 70% .....	73
11.8 EDTA 0.5 M Ph 8 (1 litro) .....	73
11.9 Tris HCl 1M pH8 .....	74
RESUMEN CURRICULAR .....	75

## LISTA DE TABLAS

Tablas	Páginas
I. Coordenadas de los sitios de colecta de <i>Aedes aegypti</i> en México del año 2007 al 2009 .....	28
II. Frecuencia de la mutación Ile1016 de <i>Ae. aegypti</i> recolectados en cuatro localidades del Estado de Nuevo León en el año 2009 .....	42
III. Frecuencia de la mutación Ile1016 en 10 cepas de <i>Ae. aegypti</i> recolectadas en el Estado de Veracruz en el año 2007 y 2009.....	45
IV. Frecuencia de la mutación Ile1016 en 3 cepas de <i>Ae. aegypti</i> recolectadas en el Estado de Guerrero y Yucatán en el año 2008 y 2009 .....	47
V. Resultados de la prueba de $X^2$ de Pearson para el Equilibrio de Hardy-Weinberg en 4 cepas de <i>Ae. aegypti</i> recolectados en el Estado de Nuevo León en el año 2009 .....	50
VI. Resultados de la prueba de $X^2$ de Pearson para el Equilibrio de Hardy-Weinberg en 10 cepas de <i>Ae. aegypti</i> recolectados en el Estado de Veracruz en los años 2007 y 2009 .....	51
VII. Resultados de la prueba de $X^2$ de Pearson para el Equilibrio de Hardy-Weinberg en 3 cepas de <i>Ae. aegypti</i> recolectados en el Estado de Guerrero y Yucatán en los años 2008 y 2009 .....	52
VIII. Muestra los gramos de Kac y los ml de agua bidestilada que se deben colocar para obtener una molaridad de 8 .....	72

## LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Proceso selectivo de los individuos resistentes a insecticidas en una población de insectos .....	11
2. Localización e identificación de mutaciones asociadas a <i>kdr</i> en el canal de sodio .....	18
3. Mapa donde se muestran los lugares de colecta en 4 estados de México.....	27
4. Colecta de <i>Ae. aegypti</i> en criaderos .....	30
5. Material para colecta de larvas de mosquitos .....	31
6. Material para crianza de mosquito y separación de adultos .....	32
7. Preparación del gel agarosa para electroforesis .....	34
8. ADN de <i>Ae. aegypti</i> en gel agarosa al 1.4% con bromuro de ethidio .....	34
9. Gel agarosa al 3% donde se observan 3 genotipos del sistema Val1,1016Ile encontrados en <i>Ae. aegypti</i> .....	37
10. Equipo empleado para crianza de mosquitos, extracción de ADN y PCR .....	38
11. Distribución de las frecuencias de la mutación Ile1016 en <i>Ae. aegypti</i> colectados en 4 localidades del Estado de Nuevo León en el año 2009 .....	43
12. Incremento de la frecuencia de la mutación <i>Ile1,016</i> en <i>Ae. aegypti</i> del año 2007 al 2009 de 3 localidades del estado de Veracruz	
13. Frecuencias de la mutación Ile1016 de <i>Ae. aegypti</i> de 7 localidades del Estado de Veracruz del año 2009.....	46

14. Frecuencias del alelo Ile1,016 en <i>Ae. aegypti</i> de Yucatán y Guerrero .....	48
15. Frecuencia de la mutación <i>Ile1016</i> en 14 cepas de <i>Ae. aegypti</i> recolectadas en el año 2009 en México .....	49
16. Coeficiente de Wright ( $F_{IS}$ ) en 17 cepas de <i>Ae. aegypti</i> recolectados en el año 2007, 2008 y 2009 en cuatro estados de la República Mexicana.....	53
17. Reactivos para la preparación del buffer de extracción (ADN) .....	69
18. Reactivos para la preparación de buffer TE 1x .....	70
19. Glycerol, USP Grade.....	71
20. Reactivos para utilizados para elaborar buffer TBE .....	72
21. Acetato de potasio .....	72
22. Reactivos para la elaboración de EDTA pH 8 .....	73
23. Tris Hydrochloride .....	74

## NOMENCLATURA

ACA9	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Acapulco en el 2009
ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>Ae</i>	<i>Aedes</i>
Ala	Alanina
<i>An.</i>	<i>Anopheles</i>
<i>B.</i>	<i>Blatella</i>
CENAVECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
CIF9	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Ciénega de Flores en el 2009
COS9	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Cosoleacaque en el 2009
COA9	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Coatzacoalcos en el 2009
<i>Cx.</i>	<i>Culex</i>
DDT	DicloroDifenilTricloroetano
dNTP's	Desoxirribonucleótidostrifosfatos
F	Generación
FAO	Food and Agriculture Organization
$F_{IS}$	Coefficiente de Wright
$f_{SS}$	Frecuencia de homocigotos $V_{1,016}$
$f_{SR}$	Frecuencia de heterocigotos
$f_{RR}$	Frecuencia de homocigotos $I_{1,016}$
g	Gramos
GABA	Ácido gamma- amino butírico (neurotransmisor)
gl	Grados de libertad
Gly	Glicina
GST	Glutathione S - Transferase
Ha	Hectárea

$H_{\text{esp}}$	Heterocigótosesperádos
His	Histidina
$H_{\text{obs}}$	Heterocigotos observados
HWE	Hardy – Weinberg equilibrium
l	Litro
IGU9	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Iguala en el 2009
Ile	Isoleucina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística
<i>Kdr</i>	Knock Down Resistance
Km	Kilometro
Leu	Leucina
MAT7	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Martínez de la Torre en el 2007
MAT9	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Martínez de la Torre en el 2009
MER8	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Mérida en el 2008
min	Minuto
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
ml	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
MSP	Ministerio de Salud Pública
MTY9	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Monterrey en el 2009
$n$	Número de muestra
$\tilde{n}$	Número de muestra corregida
OMS	Organización mundial de la salud
OPS	Organización panamericana de la salud
OPs	Organofosforado
$P$	Probabilidad

<i>p</i>	Alelo dominante
PAN7	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Pánuco en el 2007
PAN9	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Pánuco en el 2009
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pb	Pares de bases
PBO	Butóxido de piperonilo
Phe	Fenilalanina
pM	Picomoles
POR9	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Poza Rica en el 2009
<i>q</i>	Alelo recesivo
<i>R</i>	Mutación Ile1,016
rev/min	Revoluciones por minuto
RR	Homocigoto Ile1,016
<i>S</i>	Alelo Val1,016
SAH9	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Sabinas Hidalgo en el 2009
SAN9	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en San Nicolás de los Gza. en el 2009
Ser	Serina
SR	Heterocigoto Val1,016/Ile1,016
TAN9	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Tantoyuca en el 2009
TBE	Buffer Triz base/ ácido bórico / EDTA
ULV	Ultra bajo volumen
uv	Ultra violeta
U/ $\mu$ l	Unidades por microlitro
Val	Valina
VER7	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Veracruz en el 2007
VER9	Cepa <i>Ae. aegypti</i> colectada en Veracruz en el 2009
Vssc	Canal de sodio

WHO	World Health Organization
$\chi^2$	Prueba de Pearson
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{m}$	Micrometro
®	Marca registrada
IIIS6	Dominio II segmento transmembranal 6 del canal de sodio

## 1. RESUMEN

En la presente investigación fueron analizados 17 cepas mosquitos *Ae. aegypti* recolectada en 14 localidades de México en el año 2007 al 2009 con la finalidad de obtener información sobre la frecuencia de la mutación “kdr” *Ile1,016* localizada en el gen que codifica el canal de sodio que confiere resistencia a permetrina y DDT, encontrándose que la mutación *Ile1,106* se presentó en las 17 cepas analizadas de las cuales 3 obtuvieron una frecuencia alélica (*Ile1,016*) elevada Acapulco 2009 (0.97), Iguala 2009 (0.93) y San Nicolás de los Garza 2009 (0.90), con respecto al equilibrio genético para el locus *Ile1,016* las cepas Monterrey 2009, Pánuco 2007, Veracruz 2009, Cosoleacaque 2009, Coatzacoalcos 2009 y Tantoyuca 2009 no presentaron equilibrio genético según la ley de Hardy Weinberg, también se observó que las cepas de mosquito Pánuco 2007, Pánuco 2009, Veracruz 2007, Veracruz 2009, Martínez de la Torre 2009, Cosoleacaque 2009, Coatzacoalcos 2009, Poza Rica 2009, Tantoyuca 2009, Sabinas Hidalgo 2009, Monterrey 2009 y Mérida 2008 mostraron un exceso de homocigotos. Las altas frecuencias de la mutación *Ile1,016* son probablemente provocadas por la alta presión de selección ejercida por el insecticida piretroide permetrina que ha sido aplicado como adulticida por más de 10 años en México.

## ABSTRACT.

We collected and analyzed 790 *Ae. aegypti* mosquitoes from 14 localities of Mexico in 2009 to update information on the frequency of the *Ile1,016* allele in the voltage-gated sodium channel gene that confers resistance to pyrethroids and DDT. The *Ile1,016* mutation was present in all 17 collections, and was close to fixation in Acapulco 2009 (frequency= 0.97), Iguala 2009 (0.93) and San Nicolas 2009 (0.90). Genotypes at the 1,016 locus were not in Hardy-Weinberg proportions in collections from Panuco 2007, Veracruz 2009, Cosoleacaque 2009, Coatzacoalcos 2009, Tantoyuca 2009 and Monterrey 2009 due in every case to an excess of homozygotes. The high frequencies of the *Ile1,016* mutation in *Ae. aegypti* are probably mainly due to selection pressure from pyrethroid insecticides, particularly permethrin which has been used in mosquito control programs for more than 10 years in Mexico.

## 2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad del dengue y el dengue hemorrágico representan un problema cada vez más grave para los países de América Latina, esto debido a que el control de esta enfermedad es costosa y además las epidemias producen un impacto negativo en el desarrollo socioeconómico de los países (Rodríguez, 2002), otra cuestión preocupante es que desafortunadamente la mayoría de los programas de control de vectores en todo el mundo están enfrentándose con desafíos operacionales a causa de la emergencia y desarrollo de resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti* principal transmisor del dengue (Yaicharoenet. *al.*, 2005). Existen reportes sobre la presencia de la resistencia en *Ae. aegypti* en diferentes regiones, por ejemplo en Asia (Jirakanjanakit *et al.*, 2007), América Latina y el Caribe (Flores *et al.*, 2006; Rawlins *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2005, Saavedra *et al.*, 2007, Ponce *et a.*, 2009).

Existen dos tipos de mecanismos de resistencia a insecticidas con bases bioquímicas: 1) detoxificación por parte de enzimas como lo son Glutación S transferasas (GST), esterasas y oxidasas, previniendo que las moléculas de los insecticidas lleguen al sitio blanco, 2) alteración en el sitio blanco o sitio de acción el

cual es donde la molécula se asocia para ejercer su acción tóxica que generalmente es a nivel del sistema nervioso (Brogdon and McAllister, 1998). Uno de los mecanismos de resistencia por sitio blanco es el llamado knockdownresistance (*kdr*), el cual es un término usado en insectos que no pierden la coordinación inmediata ante la exposición de insecticidas piretroides y DDT, esto debido a una mutación puntual en el gen que codifica a la membrana del canal de sodio (gen *para* en *Drosophila melanogaster*) la cual disminuye la asociación del insecticida en la membrana del canal.

En *Ae. aegypti* un total de 4 mutaciones han sido reportadas en IIS6 (Bregueset. *al.*, 2003; Saaverdaet *al.*, 2007); una de estas mutaciones llamada *Ile1,016* fue descubierta en cepas de *Ae. aegypti* resistentes a permetrina en Isla Mujeres, Q. Roo, México (Saavedra *et al.*, 2007) donde una sustitución de valina por isoleucina en la misma posición del codón produce un cambio en la proteína de la membrana del canal de sodio.

Un estudio reciente ha reportado la presencia de la mutación *Ile1,016*, así como un aumento en la frecuencia en cepas de *Ae. aegypti* recolectadas en diferentes localidades de México de 1996 al 2009 (Ponce *et al.*, 2009).

La información genético-molecular es cada vez más necesaria en los programas de control de vectores. Por esta razón, este trabajo se planteó con la finalidad de actualizar los datos sobre la frecuencia de la mutación *Ile1,016* en 17 cepas de *Ae. aegypti* recolectadas en 14 localidades de México en el 2007 al 2009.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Género *Aedes*:

La mayoría de los mosquitos de Norteamérica pertenece al género *Aedes*. Por lo general las hembras tienen uñas dentadas, presentan sedas postestigmales, faltan los pulvilos o son filamentosos, y el abdomen de la hembra tiende a ser puntiagudo con los cercos más largos que otros grupos; las larvas tienen sifones con un par de penachos o sedas posteroventrales y casi siempre un pecten bien diferenciado. Depositán los huevecillos individualmente en la superficie del agua, sobre el lodo, justo arriba del nivel del agua, si son especies que se crían en estanques o hasta en situaciones donde hay poca humedad pero probabilidad de que se sumerjan. Frecuentemente las hembras son picadoras agresivas. Muchas especies tienen actividad diurna y la mayoría pican cerca del atardecer (Harwood y James, 1993). Rai y Hartberg (King, 1975) han estudiado la genética de *Aedes*, incluyendo la genética formal, citogenética, habilidad para desarrollar patógenos de vertebrados, resistencia a insecticidas, quimioesterilización y otros temas relacionados.

### 3.2 *Aedes aegypti*

Su distribución es mundial, generalmente entre los 45° latitud N y 35° latitud S. se acepta que *Ae. aegypti* fue introducido desde África a América en los barcos que transportaban esclavos y atracaban en las costas americanas durante la época de la conquista y la Colonia. Esta teoría era respaldada por el hecho que *Ae. aegypti* era la única especie perteneciente al subgénero *Stegomyia* que se encontraba en América antes de 1985 y 1986 cuando encontraron en los Estados Unidos y Brasil, respectivamente, a otro mosquito representante de este subgénero, *Aedes (Stegomyia) albopictus*, Skuse 1984. (Chester *et al.*, 1997).

*Ae. aegypti* fue introducido en América durante no bien definidos tiempos de la colonización europea, motivando reiteradas epidemias de fiebre amarilla urbana, que ya se registraban previamente de forma focal en América precolombiana mediante otros mosquitos vectores autóctonos y de diversas áreas del continente (OPS, 1995). Con excepción de Canadá y de áreas donde la altitud, temperatura u otras condiciones climáticas han impedido su colonización, *Ae. aegypti* infesta o a infestado todos los países del continente.

En 1881 Finlay establece en Cuba (Leonard J, 1990) la modalidad vectorial de transmisión de la virosis por parte de *Ae. aegypti* que es fehacientemente demostrada mediante los célebres experimentos del Campamento Leazar. Los trabajos de Gorgas (Leonard J, 1992), en Cuba y Panamá, y los de Cruz en Brasil, sentaron las bases para los futuros programas de control del vector. La fiebre amarilla y su control, y

lógicamente el de *Ae. aegypti*, después se constituye en tema de la Primera Convención Sanitaria Internacional de las Repúblicas Americanas (Washington 1902) y el tema se mantiene en la atención sanitaria internacional hasta que con varios éxitos de control vectorial nacionales la obtención de la vacuna antiamarílica 17D y su producción masiva y estratégica, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en 1947 efectúa el lanzamiento formal de la Campaña Continental de Erradicación de *Ae. aegypti* (OPS, 1992). El plan continental de erradicación logra a lo largo de los años, con cada vez más renovadas tecnologías (petrolización, descacharrización, larvicidas organofosforados, etcétera), la erradicación del vector de un gran número de países.

En 1958, Uruguay alcanza el objetivo de erradicación (MSP, 1981). El avance de los logros continentales llevó al Consejo Directivo de la OPS en 1961, a fijar la meta de completa erradicación de *Ae. aegypti*, en el año 1966. Unos años después la primera evidencia directa del papel que juega *Ae. aegypti* en la transmisión del virus del dengue lo constituyó el aislamiento del virus dengue – 2 de mosquitos *Ae. aegypti* recolectados en Puerto Rico, en 1969 (Chappellet *al.*, 1971).

La situación continental, durante las décadas del 60, 70 y 80 en lo social, económico y sanitario, junto a la pérdida de continuidad y prioridad a los programas nacionales de lucha antivectorial, motivaron que no se alcanzara la meta propuesta. Hasta 1980, el avance del control/eliminación de este culicido le había restringido a áreas del Caribe, Centroamérica y las Antillas, y a partir de este máximo resultado de control, sobreviene la reinfestación de países con erradicación concluida, la resistencia del mosquito a insecticidas, el agravamiento de la situación con dengue y una grave coyuntura económica a nivel regional, propician el deterioro de la situación alcanzada.

Hoy, son muchos los países re-infestados, restando Bermudas, Chile, Islas Caimán y Uruguay como los únicos países que aún mantienen su condición de erradicación concluida para el vector (Salvatella, 1996).

### 3.3 Control de dengue

Según la guía paso a paso de la planificación y movilización del Planificación de la movilización y comunicación social para la prevención y el control del dengue (Parks and Lloyd, 2004) la manera de controlar esta enfermedad es controlar al mosquito vector. Hay tres tipos de control del vector: control físico (modificación del medio), biológico (*Bacillusturingensis*, *sarsaelensis*, *Toxorinquitessp.*, etc) y químico.

### 3.4 Control químico en *Ae. aegypti* en México

Durante muchos años en México el insecticida permetrina se usó con fines de controlar a *Ae. aegypti* en su etapa adulta, esto por establecimiento de la Norma Oficial Mexicana 032 (NOM-032-SSA2-2002), sin embargo la existencia de nueva información basada en evidencia científica hizo necesaria la modificación y actualización de la mayoría de los conceptos, métodos y estrategias de la de la Norma Oficial Mexicana 032, estas modificaciones fueron aprobadas por el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Prevención y Control de Enfermedades quedando como Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector.

La norma 032-SSA2-2010 establece que para proteger la salud de la población, y para evitar, en la medida de lo posible, el riesgo de transmisión de una o más enfermedades transmitidas por vector (ETV), la Secretaría de Salud, por conducto

del CENAPRECE, recomendará el uso de insecticidas que sean eficaces para el objetivo de salud pública que persiguen.

Las condiciones que deben reunir los insecticidas que serán recomendados para su uso en los programas de salud pública, son las siguientes:

- Que cuenten con las autorizaciones sanitarias que emita la COFEPRIS
- Que se demuestre su eficacia a través de evaluación satisfactoria mediante protocolos estandarizados de investigación al menos por dos Instituciones de Investigación Mexicanas que cuenten con los conocimientos necesarios en la materia, de probada honradez y reconocido prestigio, para la evaluación de insumos y equipos para el control de insectos vectores.

### 3.5 Piretroides

El piretro natural rara vez ha sido usado con fines agrícolas debido a su costo y a su inestabilidad en presencia de luz solar. En décadas recientes, muchos materiales sintéticos parecidos a las piretrinas han aparecido en el mercado. Originalmente fueron llamados piretroides sintéticos. Actualmente la mejor nomenclatura simplemente es piretroides. Éstos son estables en presencia de luz solar y generalmente son efectivos contra la mayoría de los insectos plagas de la agricultura y se usan a dosis muy bajas de 0.01 a 0.1 kilogramos por hectárea.

Los piretroides han tenido una evolución interesante, que ha sido dividida convenientemente en cuatro generaciones, estas generaciones están agrupadas por orden de aparición.

Los piretroides comparten modos de acción similares que se parecen a los del DDT, y se los considera venenos axónicos. Aparentemente funcionan manteniendo abiertos los canales de sodio en las membranas de las neuronas. Hay dos tipos de piretroides. El Tipo I, entre otras respuestas fisiológicas, tiene un coeficiente de temperatura negativa, pareciéndose al DDT. En contraste, en el Tipo II, hay un coeficiente de temperatura positiva, que muestra un aumento de la mortalidad con el incremento de la temperatura ambiental. Los piretroides afectan tanto el sistema nervioso central como el periférico del insecto. Inicialmente ellos estimulan las células nerviosas a que produzcan descargas repetitivas y eventualmente causan parálisis. Tales efectos son causados por su acción sobre el canal de sodio, un diminuto hueco que le permite a los iones de sodio entrar al axón para causar excitación. El efecto estimulante de los piretroides es mucho más pronunciado que el del DDT.

Otros grupos insecticidas son los nicotinoideos, spinosas, fripoles, pirroles, pirazoles, quinazolinas, benzoilúreas, botánicos como el piretro y los insecticidas biorracionales que son agrupados bien sea como bioquímicos (hormonas, enzimas, feromonas y agentes naturales, tales como reguladores del crecimiento de las plantas y los insectos), o microbiales (virus, bacterias, hongos, protozoarios, y nematodos) (Ware y Whitacre, 2004).

### 3.6 Resistencia a insecticidas

A través del tiempo la definición de resistencia ha cambiado, por ejemplo según Crow (1960) la resistencia es el cambio genético en respuesta a la selección por insecticidas, la OMS (Brown y Pal, 1971) la define como el desarrollo de la habilidad de

una raza de insectos para tolerar dosis de tóxicos que has probado ser letales a la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie. Otra definición la dio la FAO en 1970 en donde dice que es una respuesta disminuida de la población de una especie de animales o plantas a un plaguicida o agente control como resultado de su aplicación, 9 años después, la FAO enmarca a la resistencia como la capacidad desarrollada por una población determinada de insectos al no ser afectada por la aplicación de insecticidas. Brattsten en 1989 manifiesta que la resistencia se puede considerar como un proceso inevitable, esto debido a la presión de selección continua que se sigue ejerciendo con las aplicaciones de insecticidas. Así mismo Moberg (1990) sugiere adoptar la definición propuesta por Sawicki (1987): *“resistencia marca un cambio genético en respuesta a la selección por tóxicos que pueden disminuir el control en el campo”*. A esta definición Moberg (1990) la completa agregándole: *“a dosis recomendadas”*.

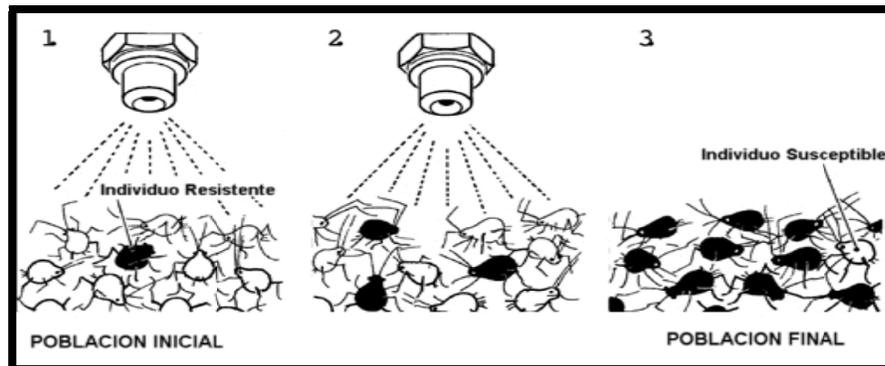


Fig. 1. Proceso selectivo de los individuos resistentes en una población

De acuerdo con Monge (1986), la resistencia cruzada positiva se define como *“la resistencia que se genera en los insectos a un determinado plaguicida y a otros que no se han aplicado, pero que tienen forma de acción o de detoxificación similares”*. Siendo la resistencia cruzada negativa lo contrario, cuando al aplicar un plaguicida aumenta la resistencia a ésta pero disminuye a otros. Resistencia múltiple se da cuando el genotipo confiere resistencia a un amplio rango de grupos plaguicidas (Moberg, 1990). WHO (1992): *“característica hereditaria que imparte una tolerancia incrementada a los plaguicidas, de tal forma que los individuos resistentes sobreviven a concentraciones de los compuestos que normalmente serían letales para la especie”*. Lagunes y Villanueva, 1995 la definen como la habilidad complementaria y hereditaria propia de un individuo o conjunto de ellos, que los capacita fisiológica y etológicamente, para bloquear la acción tóxica de un insecticida por medio de mecanismos metabólicos y no metabólicos, y en consecuencia, sobrevivir a la exposición de dosis que para otros sería letal.

### 3.6.1 Resistencia por Sitio Blanco

Alteraciones en aminoácidos son responsables de la asociación del insecticida con su sitio de acción teniendo como consecuencia una menor efectividad o incluso inefectividad. Los insecticidas organofosforados, carbamatos, organoclorados y piretroides actúan a nivel del sistema nervioso. El sitio blanco de los insecticidas organofosforados (malatión, fenotrión) y carbamatos (propoxur, sevin) es la acetilcolinesterasa en la sinapsis y el sitio blanco de los organoclorados (DDT) y los piretroides sintéticos es en la membrana celular específicamente el canal de sodio. Esto puede producir una resistencia cruzada. De manera similar la resistencia a los

ciclodienos (dieldrin) es producida por un solo cambio de nucleótido en el mismo codón del gen para los receptores de GABA. Al menos cinco mutaciones puntuales en los sitios de acción de la acetilcolinesterasa se tienen identificados los cuales producen diferentes grados en la reducción de la sensibilidad de los insecticidas organofosforados y los carbamatos (Brogdon y McAllister, 1998).

### 3.6.2 La biología molecular de la resistencia knockdown (*kdr*)

La principal amenaza en el uso de insecticidas piretroides para control de plagas, es la selección de resistencia en poblaciones de insectos de importancia agrícola, ganadera o en salud pública. La resistencia knockdown es un término genérico que se refiere a uno de los dos principales tipos de resistencia a piretroides y es ocasionado por la reducción en la sensibilidad del sistema nervioso del insecto a estos insecticidas. Debido a que la resistencia knockdown disminuye la efectividad de todos los piretroides, la presencia de este mecanismo en el campo tiene severas consecuencias, al limitar el número y clases de insecticidas disponibles para control. La detección temprana y caracterización de la resistencia knockdown son de crítica importancia en el desarrollo de estrategias de manejo de la resistencia. La mayoría de la investigación sobre éste mecanismo de resistencia ha sido realizado en el sistema de la mosca doméstica *Musca doméstica*. La resistencia knockdown (designada *kdr*) fue primero descrita y aislada en la mosca doméstica en 1950. Posteriormente, la característica *kdr* fue mapeada al cromosoma 3 y fue documentada la sensibilidad reducida del sistema nervioso en los insectos con *kdr* para piretroides. La característica *kdr* confiere resistencia para ambos efectos, parálisis rápida y acción letal de todos los piretroides conocidos, piretrinas y DDT, sin disminuir la eficacia de otras clases de insecticidas. Una segunda

característica, designada resistencia super-*kdr*, confiere mucha más resistencia hacia DDT y algunos piretroides. Esta característica fue aislado genéticamente y mapeado al cromosoma 3 (Williamson *et al.*, 1993).

Mecanismos de resistencia similares a *kdr* han sido inferidos en un número de plagas agrícolas y vectores de enfermedades, en base a los patrones de resistencia cruzada y a la ausencia de sinergismo por compuestos que se conoce disminuyen las actividades de esterasas y monoxidasas envueltas en el metabolismo de piretroides. Evidencia electrofisiológica confirma la reducida sensibilidad neuronal a piretroides en al menos seis especies: *Heliothis virescens*, *Spodoptera littoralis*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi*, *Blattella germanica* y *Plutella xylostella* (Soderlund y Knipple, 2003). La resistencia knockdown ha sido investigada por más de 40 años, sin embargo, fue en la década pasada cuando se lograron avances significativos en la identificación de los mecanismos genéticos y moleculares que la ocasionan.

### 3.6.3 Mecanismo de acción de los piretroides

El sitio blanco de los piretroides y DDT es el canal de sodio dependiente de voltaje ( $V_{ssc}$ ). Este canal se compone de cuatro dominios (I-IV) y cada dominio consiste de seis hélices transmembranales (S1-S6). Para conducir información eléctrica a lo largo del sistema nervioso, deben generarse potenciales de acción a través de la membrana. Los canales de sodio pasan por tres estados: cerrado (C), abierto (O) o inactivado (I). En un estado inactivo, la membrana se encuentra en potencial de descanso y el canal de sodio se encuentra cerrado. Durante la activación del canal, la membrana se despolariza, causando la apertura del canal de sodio y la generación de un flujo de iones de sodio entrando al citoplasma. Después de un milisegundo, ocurre la inactivación debido al cambio conformacional del canal de sodio, bloqueando el paso de iones a través de la

membrana. Cuando el potencial de membrana regresa al estado de descanso, el canal cierra nuevamente (Vais *et al.*, 2001).

Los piretroides modifican la cinética de apertura del canal de sodio, al retardar la activación e inactivación. Los insecticidas piretroides se dividen en dos grupos y cada uno de éstos tiene un efecto distinto. Los piretroides tipo I (permetrina, cismetrina) carecen del grupo ciano, en contraste, los piretroides tipo II (deltametrina) contienen un grupo ciano en la posición alfa-benzilica. Los piretroides tipo II prolongan por mayor tiempo el flujo de sodio durante el potencial de acción, en comparación con el grupo I. El potencial de activación medio (potencial de membrana en el cual 50 % de los canales disponibles se abren) es más negativo cuando se usan los piretroides tipo I. Esto resulta en la abertura del canal en el potencial de descanso, con la consecuente despolarización de la membrana neuronal y la iniciación de descargas repetitivas en los axones motoras y sensores, ocasionando parálisis y muerte. Todos los piretroides tienen un modo similar de acción, pero los estudios neurofisiológicos de algunas especies de insectos, indican que la insensibilidad por mutaciones *kdr* pueden conferir distintos niveles de resistencia a varios grupos de piretroides (Hemingway *et al.*, 2004).

#### 3.6.4 Mutaciones asociadas con la resistencia *kdr* ayudan a definir cuáles son los sitios de unión de los piretroides en el canal de sodio

Varias líneas de evidencia son consistentes con la hipótesis de que al menos algunas de las mutaciones asociadas a la resistencia *kdr*, ocurren en residuos que forman el sitio de unión de los piretroides. Se ha demostrado que la mayoría de las mutaciones que reducen la sensibilidad a piretroides *in-vitro* están localizadas en los segmentos transmembranales S6 de los dominios homólogos I, II y III. Modelos recientes de la estructura del canal de sodio, colocan a los cuatro segmentos S6 en íntimo contacto,

dirigidos hacia la boca citoplasmática del canal y sugieren que el movimiento de las regiones S6 forma parte del puente de activación(Lipkind and Fozzard, 2000; Yellen, 1998). Más aún, se ha implicado en estudios de mutagénesis dirigida, que la batratoxina se une a algunos residuos presentes en las regiones S6(Linford *et al.*, 1998; Wang and Wang, 1998; Wang and Wang, 1999; Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001) un ligando que muestra exhibir interacción de uniones alostéricas positivas con los piretroides (Brown *et al.*, 1988; Lombet *et al.*, 1988; Rubin and Soderlund, 1993; Trainer *et al.*, 1993) Estas observaciones permiten proponer un modelo en que el receptor de los piretroides se forma por los segmentos IS6 y IIS6 en la interface entre los dominios homólogos I y II(Lee and Soderlund, 2001). Sin embargo, este modelo no enbonaría con las mutaciones que ocurren en el lazo S4-S5 del dominio II, la región S5 del dominio II o el segmento S6 del dominio III. Dada la agrupación de las mutaciones asociadas a la resistencia *kdren* el dominio II, es posible que el sitio de unión de los piretroides se forme principalmente de residuos en el dominio II en asociación con elementos adyacentes del IS6 y IIS6 (Soderlund DM y Knipple DC, 2003).

Existe una hipótesis que asume la existencia de un solo sitio de unión a piretroides en cada canal de sodio. Sin embargo, estudios estequiométricos infieren la presencia de dos sitios de unión para la deltametrina. Las mutaciones *L1014F/M918T*, *M918T* y *T929I* tienen el efecto de eliminar uno de los dos sitios de unión para la deltametrina en los canales de sodio, comúnmente, el sitio perdido es aquel que tiene mayor afinidad por la deltametrina. En contraste, los canales que contienen la mutación *L1014F* mantienen dos sitios de unión, aunque la afinidad del sitio más sensible se reduce cuando se compara con los canales silvestres. La única anomalía en esta serie de experimentos es la mutación *L1014F/T929I*, la cual produce canales de sodio altamente

resistentes y una estequiometría de menos de un sitio por canal. Hasta ahora, el análisis estequiométrico de las interacciones se limita a los efectos de la deltametrina en el canal de sodio para/tipE. Las acciones de la cismetrina en cualquiera de los canales de sodio Vssc1/tipE o ratNa 1.8, son consistentes con la existencia de un solo sitio por canal, una interpretación que contradice ambos hallazgos con la deltametrina y lo efectos comunes de las mutaciones resistentes en la sensibilidad del canal tanto para la cismetrina como deltametrina. Sin embargo, la comparación de los efectos de las mutaciones *L1014F*, *M918T* y *L1014F/M918T* en la modificación del canal por deltametrina o cismetrina sugiere una interpretación que resuelve esta aparente contradicción. La mutación *L1014F* acelera los descensos de corrientes terminales para ambos insecticidas, mientras que las mutaciones *M918T* y *L1014F/M918T* eliminan un sitio de unión para la deltametrina y producen canales que no son detectados y modificados por la cismetrina aún a concentraciones más altas. Si se postula la existencia de dos sitios por canal, con diferente afinidad por los piretroides, la eliminación del sitio con mayor afinidad por las mutaciones *M918T* y *L1014F/M918T* podría dejar libre al sitio con baja afinidad. La modificación de éste último por la deltametrina podría ser detectado a altas concentraciones, pero podría exhibir tan baja afinidad por la cismetrina que sus efectos no podrían ser detectados. Puede esperarse que el sitio con alta afinidad corresponda con el sitio de mayor relevancia toxicológica, ya que de esa forma, podría mediarse la modificación de los canales de sodio por concentraciones muy bajas de piretroides. Es por esta razón que las mutaciones que confieren resistencia knockdown modifican selectivamente la sensibilidad de los sitios de alta afinidad.

A pesar de que estos análisis indican la existencia de un sitio de alta afinidad localizado cercanamente a los segmentos S6 de los dominios I, II, y III, la identificación

del sitio específico de acción de los piretroides se complica debido al hecho que otras regiones de la proteína de canal de sodio subunidad- $\alpha$  también influyen significativamente la sensibilidad a piretroides. Esto implica la existencia de regiones adicionales en el canal de sodio, además de las que se han identificado por mutaciones resistentes que determinan la sensibilidad a piretroides (Soderlund, DM y Knipple DC, 2003).

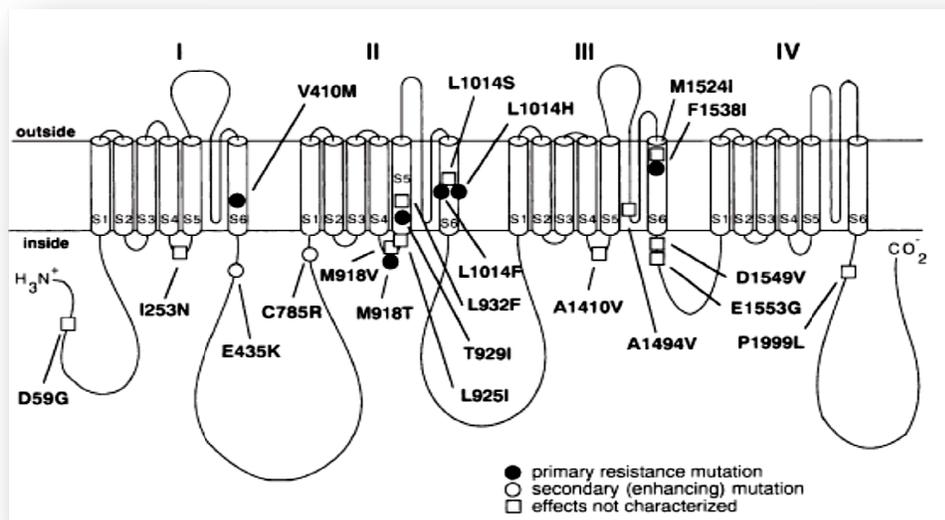


Fig. 2. Localización e identificación de mutaciones asociadas a *kdr* en el canal de sodio(Soderlund, DM y Knipple DC, 2003).

Estudios recientes del uso alternativo de exones en el locus *Vssc1* de la mosca doméstica y el locus *para* de *B. germanica* identifica una región adicional en la proteína del canal de sodio que contiene exones exclusivos. En ambas especies, la región del canal de sodio que se extiende desde la mitad del segmento IIIS3 hasta el segmento IIIS4 son codificados por dos exones alternativos que difieren en su secuencia de aminoácidos. La expresión de los canales de sodio conteniendo uno u otro de estos

exones revelan una diferencia de más de 10 veces en la sensibilidad a deltametrina en los canales expresados. Próximos experimentos de mutagénesis son requeridos para identificar nuevos residuos de aminoácidos que determinen la sensibilidad a piretroides en los canales de sodio y puedan contribuir al sitio de unión de los piretroides (Soderlund, DM y Knipple DC, 2003).

#### 3.6.5 Resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti*.

La resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti* ha sido documentada alrededor del mundo, por ejemplo en Tailandia se ha reportado la presencia de resistencia a insecticidas piretroides tales como permetrina y deltametrina (Jirakanjanakit *et al.*, 2007), en otras regiones como China se han realizado estudios en diferentes especies de mosquitos vectores que transmiten enfermedades en ese país, entre ellos se encuentra *Ae. aegypti* (Cui *et al.*, 2006). Otros reportes de resistencia a insecticidas tales como temefos y malatión en *Ae. aegypti* se ha difundido en todo el Caribe y en algunos países de América Central y América del Sur, además de la resistencia a fenotrión desarrollada en otras regiones de América (OPS, 1995). Los principales mecanismos involucrados en la resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti* son por medio de enzimas detoxificativas y alteraciones en el sitio blanco (Knipple DC, 2003; Montella *et al.*, 2007; Soderlund DM y Bloomquist JR, 1989; Soderlund DM y Vargas *et al.*, 2006). En algunas áreas, la evolución de la resistencia a insecticidas ha estado ligada a la falla en los programas de control del dengue (Camacho *et al.*, 2004; Coto *et al.*, 2000).

#### 3.6.6 Mutaciones en el canal de sodio dependiente del voltaje asociados con resistencia a insecticidas piretroides y DDT en *Ae. aegypti*.

Brengues *et al.* examinaron la resistencia al DDT y piretroides en *Ae. aegypti* de trece localidades y encontraron evidencia de resistencia al DDT y piretroides de cepas

provinientes de Semarang en Java Central, Belem en Brazil y Long Hoa, en Vietnam. Obtuvieron la secuencia de la región que codifica al segmento hidrofóbico 6 del dominio II del gen del canal de sodio dependiente de voltaje de diez mosquitos de las trece cepas. Analizaron los exones 19 a 21 que codifican los aminoácidos 908–1036. El exón 19 contenía aminoácidos asociados con la resistencia ‘superkdr’, e incluía: la metionina en la posición 918, leucina en la 925, treonina en la 929 y leucina en la 932 (Soderlund, DM y Knipple DC, 2003). El exón 20 contenía la sustitución de leucina a fenilalanina en la posición 1014, la cual confiere insensibilidad nerviosa a los piretroides en un amplio rango de especies de insectos, incluyendo *Anophelesgambiae* (Soderlund DM y Knipple DC, 2003). Brengues *et. al.* descubrieron siete nuevas mutaciones en *Ae. aegypti* en relación con *An. gambiae*. La cepa de Belem tuvo una valina en la posición 923 (exón 19), mientras que tres cepas de *Ae. aegypti* y *An. gambiae* tuvieron una glicina en el mismo sitio (se refiere como Val923). Todas las cepas de *Ae. aegypti* contienen una isoleucina en la posición 952 (exón 20) y una lisina en la 961 (exón 20), mientras que *An. gambiae* contiene una valina e histidina en las mismas posiciones, respectivamente. La cepa de Long Hoa contiene un triptófano en la posición 982 (exón 20), mientras que las otras tres cepas de *Ae. aegypti* y *An. gambiae* tienen una leucina en el mismo sitio (*Trp982*). La sustitución en la posición 1014 de leucina a fenilalanina estuvo ausente en todas las cepas de *Ae. aegypti*. Sin embargo, la cepa de Belem tuvo una metionina en la posición 1011 (exón 20), mientras que tres cepas de *Ae. aegypti* y *An. gambiae* presentaron una isoleucina en el mismo sitio (*Met1011*). Más aún, la cepa de Tailandia presentó una glicina en la posición 1016 (exón 21), mientras tres cepas de *Ae. aegypti* y *An. gambiae* codificaron una valina en el mismo sitio (*Gly1016*). Ensayos neurofisiológicos directos sobre larvas individuales de cepas con estas mutaciones

mostraron una reducción en la sensibilidad nerviosa a la permetrina o lambda cialotrina al ser comparadas con las cepas susceptibles.

Otra mutación fue descubierta por Saavedra *et al.* (2007) en una cepa resistente a la permetrina en Isla Mujeres Q. Roo México, en este estudio se encontró que en el exón 20-21 en del gen que codifica para el canal de sodio dependiente del voltaje se encontraba una sustitución de una base nitrogenada (Gly →Ala) la cual daba un cambio de valina a isoleucina en el codón 1016 del gen *para*. La mutación se encontró en el segmento transmembranal 6 del dominio V del canal de sodio. Esta mutación está altamente relacionada con la resistencia a permetrina ya que estudios posteriores mostraron que el 100% de los homocigotos *Ile1,016* sobreviven a exposiciones de permetrina en dosis de 5 µg a 10 µg por botella (Ponce *et al.*, 2009).

Consecuentemente nuevas mutaciones fueron descubiertas, por ejemplo Kawada *et al.* (2009) descubrieron una mutación puntual en el canal de sodio del sistema nervioso en *Ae. aegypti* en Vietnam llamada *F1269C*. Esta mutación fue analizada en el locus *para* el cual causa insensibilidad en el canal de sodio debido a una sustitución de un aminoácido en el área del segmento 6 en el dominio III. *F1269C* se distribuye de manera silvestre con una alta frecuencia en el sureste de Vietnam. Lo cual sugiere que esta mutación juega un papel importante en la resistencia a piretroides en ese país. Otros estudios realizados en Taiwan por Chang *et al.* (2009), demostraron la presencia de una mutación localizada en el ligamento extracelular entre el dominio IV segmento transmembranal 5 y 6 (*D1794Y*), esta mutación es concurrente con otra llamada *V1012G* in *Aa-para* de una cepa resistente (Per-R) a permetrina. La alta frecuencia y la coexistencia de las dos mutaciones en Per-R puede ejercer un efecto sinérgico que provee una resistencia Knockdown a la permetrina. Después se reportó la mutación

*F1552C* en el dominio III en una cepa resistente al DDT y a la permetrina (Yanolaet *et al.*, 2010), Otro estudio realizado en Tailandia demuestra la presencia de dos mutaciones (*S989P* y *V1016G*) que se encuentran localizadas en el DIIS5 y S6 en una cepa de *Ae. aegypti* resistente a deltametrina, lo que sugiere que en conjunto haya un refuerzo en la resistencia a piretroides, este descubrimiento indica a las dos mutaciones como posibles responsables de la emergencia de la resistencia a la deltametrina en KhuBua Tailandia (Srisawat R *et al.*, 2010).

### 3.6.7 Mutación *Ile1,016* en *Ae. aegypti*

Se ha documentado que la mutación *Ile1,1016* está altamente relacionada con la resistencia a piretroides específicamente permetrina en *Ae. aegypti* (Saavedra *et al.* 2007).

Saavedra *et al.* en 2008 en su trabajo sobre la mutación *Ile1016* asociada a la resistencia a insecticidas reporta que las colecciones de campo de *Ae. aegypti* presentaban una frecuencia que varió de 0.00 en colecciones de Tapachula, México y en cinco colecciones de Venezuela a una frecuencia de 0.293 en la Habana. Saavedra también realizó pruebas en colecciones de *Ae. aegypti* de Santiago de Cuba, estas pruebas mostraron un incremento significativo en la frecuencia de *Ile1016* desde 0.033 en la colección original hasta 0.567 en la generación F12 y 0.883 después de una selección adicional con deltametrina.

En este trabajo también se reportó que la frecuencia de *Ile1016* se incrementó de 0.259 hasta la fijación después de cinco generaciones de selección con permetrina de la cepa Isla Mujeres.

Saavedra *et al* también analizaron un total de 420 descendientes F3 generados de una cruce entre una hembra P1 de Isla Mujeres y un macho de la cepa susceptible New Orleans. En este experimento las descendencia F3 fue expuesta a 1.2 µg de permetrina en bioensayos de botella, después a los mosquitos sobrevivientes y muertos se les realizó una prueba PCR para identificar su genotipo, encontrándose que los mosquitos que presentaban el genotipo *Ile1,016/Ile1,016* tuvieron un 100% de sobrevivencia, el genotipo *Vall,016/Ile1,016* solo presentó un 9.4% de sobrevivencia mientras que los mosquitos que presentaban el genotipo *Vall,016/Vall,016* tuvieron un 0% de sobrevivencia, lo que concluye que *Ile1,016* actúa como alelo recesivo y condiciona la sobrevivencia de *Ae. aegypti* al ser expuesta a la permetrina.

Debido a este descubrimiento nuevas investigaciones se realizaron en países como México y Brasil donde la resistencia a piretroides se hizo presente después de años de aplicación de permetrina (Martinet *et al.*, 2009; Ponce *et al.*, 2009).

En Brasil se ha estado empleando piretroides en el control de *Ae. aegypti* desde el 2000 como una alternativa ante la aparición de resistencia a insecticidas organofosforados, la cual fue documentada en 1998 después de tres décadas de uso en contra de larvas y adultos (Lima *et al.*, 2003; Macoriset *et al.*, 1999). Sin embargo la resistencia a piretroides fue detectada pocos años después de su introducción (da-Cunha *et al.*, 2005). Las enzimas involucradas tales como GSTs y esterasas fueron probablemente las causantes de la resistencia cruzada (Montella *et al.*, 2007). Estudios posteriores demuestran que los mecanismos involucrados en la resistencia a piretroides no son solo eran detoxificativos, ya que se identificó la presencia de la mutación *Ile1,016* distribuida en diferentes zonas de Brasil (Martinet *et al.*, 2009).

Ponce *et al.* (2009) realizaron un estudio más completo, en el cual se analizaron colecciones de *Ae. aegypti* del año 1996 al 2008, este estudio reveló la presencia de *Ile1,016* en la colección de Nuevo Laredo Tamaulipas de 1997 (frecuencia de 0.01), después encontraron que la frecuencia de *Ile1,106* se incrementó menos del 1% en 1996 al 2000, del 2 % al 5% en el 2003 al 2006 y un 38.3% a 88.3% del 2002 al 2009. Las colecciones que presentaron estos incrementos en la frecuencia de la mutación fueron principalmente de los estados de Veracruz, Quintana Roo, Chiapas, Nuevo León y Yucatán.

#### 4. HIPÓTESIS

La mutación *Ile1,016* sigue presente en *Ae. aegypti*, debido a la presión de selección ejercida por insecticidas piretroides específicamente permetrina que ha sido aplicada en México como adulticida por más de 10 años.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Determinar la frecuencia de la mutación “*kdr*” *Ile1,016* que confiere resistencia a piretroides y DDT en 17 cepas de *Ae. aegypti* recolectadas en áreas de riesgo de dengue en México.

### 5.2 Objetivos Particulares

Determinar para cada cepa:

- La frecuencia alélica de *Ile1,016* y *Val1,016*
- Las frecuencia genotípica de *Val1016/Val1,016*, *Val1,016/Ile1,016* e *Ile1,016/ile1,016*.
- El equilibrio genético según los principios de Hardy – Weinberg
- El coeficiente de endogamia

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Área de estudio

Se analizaron 790 mosquitos *Ae. aegypti* de 17 cepas de campo en el año 2007 y al 2009 en 4 estados de México.



Fig. 3. Mapa donde se muestran los lugares de colecta en 4 estados de México: 1) Nuevo León; Sabinas Hidalgo, Ciénega de Flores, San Nicolás de los Garza y Monterrey. 2) Veracruz; Pánuco, Tantoyuca, Poza Rica, Martínez de la Torre, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque. 3) Yucatán; Mérida. 4) Guerrero; Iguala y Acapulco.

### 6.1.2 Coordenadas de los sitios de colecta

Tabla I. Coordenadas de los sitios de colecta de *Aedes aegypti* en México del año 2007 al 2009.

Localidad	Año	N	O
Pánuco	2009	22° 2'40.08 - 98°11'44.52''	
Martínez de la Torre	2009	20° 4'25.04 - 97° 2'29.45''	
Cosoleacaque	2009	18° 0'24.06 - 94°37'44.88''	
Coatzacoalcos	2009	18° 8'35.22 - 94°25'26.28''	
Poza Rica	2009	20°34'27.00 - 97°25'52.14''	
Veracruz	2009	19°10'1.74 - 96°13'12.90''	
Tantoyuca	2009	21°20'26.58 - 98°13'18.12''	
San Nicolás de los G.	2009	25°43'46.03 - 100°18'27.41''	
Ciénega de Flores	2009	25°56'50.60 - 100°10'1.38''	
Monterrey	2009	25°36'32.65 - 100°16'32.41''	
Sabinas Hidalgo	2009	26°30'14.65 - 100°10'57.09''	
Mérida	2008	20°57'49.90 - 89°35'9.29''	
Iguala	2009	18°20'25.74 - 99°32'7.20''	
Acapulco	2009	16°52'33.44 - 99°51'34.56''	

### 6.1.3 Nuevo León

El clima de Nuevo León es en su mayor parte estepario semiseco y las lluvias son comunes entre mayo y setiembre. El territorio tiene una extensión de 64.210 km<sup>2</sup> y se puede dividir en tres regiones: una planicie seca en el norte, una templada en las regiones de la sierra y un altiplano semidesértico-fresco en el sur (INEGI, 2000).

### 6.1.4 Veracruz

El Estado tiene una extensión territorial de 71.699 km<sup>2</sup>. Veracruz goza de climas muy variados que van desde el tropical y subtropical (en las extensas zonas costeras), hasta el frío (en las zonas serranas y de montaña, como en Huayacocotla y Zongolica), pasando por el templado (en la zona montañosa central), (<http://cuentame.inegi.org.mx>).

### 6.1.5 Yucatán

La superficie del estado es de 43.379 km<sup>2</sup>. El clima en Yucatán es uno de los más cálidos en México; esto se debe a la ubicación geográfica (se encuentra al sur del

Trópico de Cáncer) y la escasa altitud del estado. Las altas temperaturas, sumadas a la precipitación anual (con su mayor intensidad en verano), dan como resultado un dominio mayoritario del clima cálido subhúmedo con aproximadamente el 85% del territorio total del estado donde la temperatura media anual es de 24°C a 28 °C. (e-local, SEGOB)

#### 6.1.6 Guerrero

Tiene una superficie territorial de 64.281 km<sup>2</sup>. Más del 60% de la superficie estatal es ocupada por el clima cálido subhúmedo con precipitación en verano. El segundo lugar lo ocupa el clima semicálido con lluvias en verano, con casi la quinta parte del territorio. El resto lo ocupan climas menores, entre los que destacan semicálidos y templados, todos con lluvias moderadas. Según datos del INEGI.

#### 6.2 Recolecta de larvas de *Ae. aegypti*

La recolecta se llevó a cabo en el 2007 en Pánuco, Martínez de la Torre y Veracruz, en el 2008 en Mérida Yucatán y el 2009 en Sabinas Hidalgo, Ciénega de Flores, San Nicolás de los Garza y Monterrey Nuevo León, de Veracruz las recolectas fueron en Pánuco, Martínez de la Torre, Tantoyuca, Poza Rica, Veracruz, Coatzacoalcos y Cosoleacaque, en Guerrero se recolectaron en Acapulco e Iguala.



Fig. 4.Recolecta de *Ae. aegypti* en criaderos artificiales tales como llantas, tambos, floreros con agua y cubetas.

Se recolectaron larvas de mosquito *Ae. aegypti* en criaderos artificiales tales como llantas, floreros con agua, piletas y tambos. Para esto se utilizaron pipetas Pasteur graduadas de 5 ml, bolsas WhirlPakNasco® de 120 ml, termos 2 l, caladores Clark®, ducos, charolas, y cámaras de emergencia Bioquip®.

Se obtuvieron muestras con los caladores en los criaderos como: llantas, piletas y otros depósitos, las muestras se colocaron en charolas para separar las larvas de *Ae. aegypti* de otras especies, la separación de larvas se llevó a cabo con las pipetas pasteur y con las ducos, después se colocaron en las bolsas WhirlPakNasco® debidamente etiquetadas, las bolsas se colocaron en los termos para evitar cambios bruscos en la temperatura. Las pupas se colocaron en cámaras de emergenciaBioquip®.



Fig. 5. Material para colecta de larvas de mosquitos: Charola, pipetas Pasteur, bolsas Whirl Pack Nasco®, termo, ducyas y caladores

Las larvas se trasladaron al laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

### 6.3 Cría de Mosquitos

Las larvas se colocaron en charolas especiales con agua reposada a una temperatura de 26 a 27 °C, y se alimentaron con LiverPowder. Al llegar la pupación los mosquitos se colocaron en vasos de plástico dentro de una jaula entomológica, las hembras emergidas se alimentaron con sangre de rata y los machos con naranja. Para poder obtener la siguiente generación de mosquitos, se colocó dentro de la jaula un vaso de plástico con agua reposada y con una papeleta de papel filtro, los huevos depositados en el papel filtro se dejaron en un lugar húmedo por 3 días con el fin de que se lleve a cabo la embrionación. Después de 3 días se colocan las papeletas en charolas con agua reposada a una temperatura de 26 a 27 °C y se le colocó una pizca de levadura de cerveza, después de que eclosionaron los huevecillos se colocó alimento de alta proteína (LiverPowder) este procedimiento se repitió hasta obtener la F deseada.



Fig. 6. Material para crianza de mosquito y separación de adultos: jaulas, charola, cámara de emergencia, aspirador bucal, tubos 10 ml falcon, y tubos eppendorf de 1.5ml.

Después las pupas de la F deseada se colocaron en cámaras de emergencia, se separaron 60 adultos recién emergidos de cada cepa y se colocaron en un tubo Falcon® esterilizado a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  por 5 min para provocarles la muerte, después cada mosquito se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.4 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó según la técnica de sales (Black y Musterman, 1996).

Se colocó un mosquito por tubo y después se agregó  $50\ \mu\text{l}$  de Grinding Buffer (GB) o buffer de extracción, se maceró con un pistilo hasta que quedara un homogenato, se agregó otros  $50\ \mu\text{l}$  de GB y se pasó por el vortex. Después se centrifugaron los tubos a 14000 rev/min por 1 minuto, luego se colocaron a baño seco por 30 min a una temperatura de  $65^{\circ}\text{C}$ , se colocó a cada tubo  $15\ \mu\text{l}$  de acetato de potasio, después se colocó a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  por al menos 30 min, luego se centrifugó a 14000 rev/min por 15 min, se sacó  $80\ \mu\text{l}$  de sobrenadante de cada tubo y se colocó  $200\ \mu\text{l}$  de alcohol etanol al 100% y se dejó reposar por 10 min, se colocaron los tubos en el vortex y se pusieron en la centrífuga a 14000 rev/min por 5 min, después se sacó todo el

alcohol y se colocó alcohol etanol al 70%, se centrifugó a 14000 rev/min por 5 min, luego se sacó el alcohol y se volvió a colocar alcohol etanol al 100% , se centrifugó por 5 min y se quitó el alcohol. Los tubos se colocaron en un evaporador VapDNyA a 50°C por 10 min para quitar restos de alcohol y secar el ADN. Para resuspender el ADN, se le colocó 50 µl de Buffer TE1x a cada tubo y se guardó a -70 °C para evitar la degradación de ADN.

#### 6.5 Prueba PCR para la amplificación de los alelos *Ile1,016* y *Val1,016*

Para la amplificación de los dos alelos se realizó en una sola reacción de pcr en un tubo conteniendo : Buffer 10x, Cloruro de Magnesio 1.5 mM, dNTP's 25mM, 2 primers “alelos específicos” a 500 pM/ µl Val1,016 (5'-[GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCC]ACAAATTGTTTCCCGCACCCGG-3') y *Ile1,016* (5'[GCGGGC]ACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA-3') y el primer anti sentido *Ile1,016r* 5'-GGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC-3' , agua bidestiladaultrapurificada, taq polimerasa 5U/µl, aceite mineral y ADN 3µl.

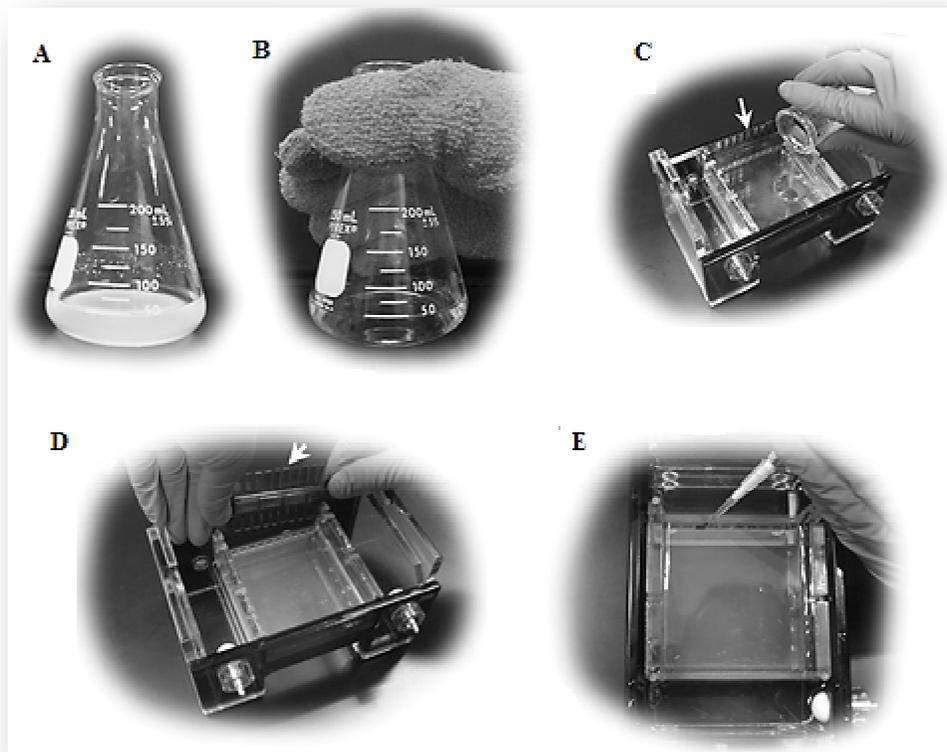


Fig. 7. Preparación del gel agarosa para electroforesis A) buffer TBE1x con agarosa B) calentamiento de la agarosa y el buffer TBE1x C) agarosa en el molde de la cámara de electroforesis D) Retiro de peines E) Carga de las muestras en el gel.

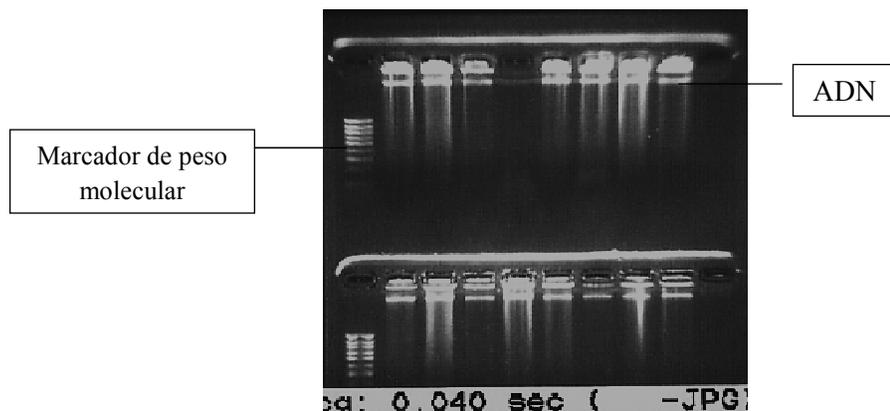


Fig . 8. ADN de *Ae. aegypti* en gel agarosa al 1.4% con bromuro de ethidio.

### 6.5.1 Procedimiento

Parar reacciones de 50  $\mu$ l/muestra:

- Dentro de un tubo eppendorf de 1.5 ml se colocó 41 $\mu$ l de agua bidestiladaultrapurificada, después se colocó 5  $\mu$ l de buffer 10x con MgCl<sub>2</sub>, se añadió 0.5  $\mu$ l de dNTP's y 0.1  $\mu$ l de cada primer (V1016f, I1016r y I1016f).
- El tubo con la mezcla se colocó en la cámara UV por 10 min. para eliminar cualquier enzima.
- Después la mezcla se volvió a introducir en la campana PCR y se colocó 0.2  $\mu$ l de taq polimerasa.
- La muestra se colocó a un tubo para PCR y se añadió 3  $\mu$ l de ADN.
- Para evitar la evaporación del master mix dentro del termociclador se colocó 10  $\mu$ l de aceite mineral.

Las cantidades de los reactivos en el master mix fueron variables y dependieron del número de muestras de ADN a procesar junto con los controles positivos (homocigoto Val1016 y homocigoto Ile1,016) y el control negativo que fue realizado con agua. Por ejemplo, si se procesaron 20 muestras de ADN, más las de los controles positivos y control negativo (3) entonces las cantidades de los reactivos se multiplicaron por 23, después en cada tubo de PCR (23 tubos) se colocó la cantidad de 43  $\mu$ l de master mix, y se añadió 3  $\mu$ l de ADN y 10  $\mu$ l de aceite mineral a cada tubo.

### 5.5.2 Programa del termociclador para la amplificación de los alelos *Ile1016* y *Val1,016*

Los tubos de PCR se colocaron en un termociclador Biocycler BioRad ® programado para 4 ciclos:

- 1er ciclo: 95 °C - 5 min.
- 2do Ciclo: 95°C – 1min, 60°C – 1min, 72 °C - 1.15 min 29x.
- 3er Ciclo: 72°C – 10min
- 4to Ciclo – 4°C ∞.

Después de terminado los ciclos, el producto de PCR se cargó en un gel agarosa al 3% con bromuro de ethidio por 40 min a 90 voltios.

### 6.5.3 Identificación de genotipos en *Ae. aegypti*

La identificación de genotipos se realizó según el método señalado por Saavedra *et.al.* (2008) mediante la fragmentación de productos de PCR de alelos específicos del sistema Val1016Ile, como se puede observar en la fig. x. Esta figura muestra la identificación de genotipos mediante en un gel agarosa al 3% con bromuro de ethidio.

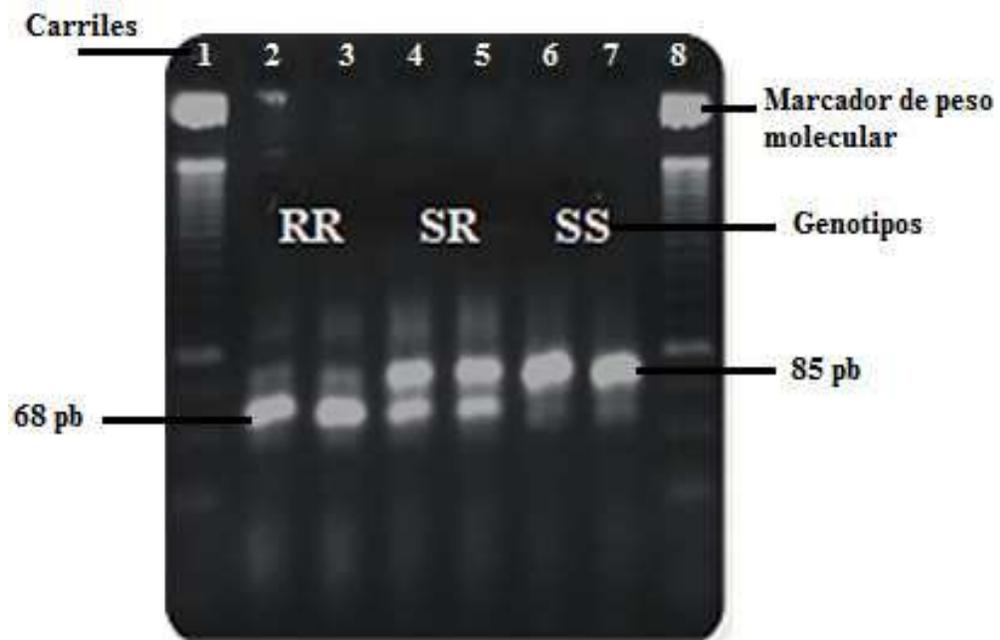


Fig. 9. Gel agarosa al 3% donde se observan 3 genotipos del sistema Val1,016Ile encontrados en *Ae. aegypti* : carril 1 y 8 marcador de peso molecular de 25 - 2000 pb, carril 2 y 3 corresponden al genotipo homocigoto Ile1,016 (RR) de 68 pb, carril 4 y 5 corresponden al genotipo heterocigotos (SR) de 85 pb/68pb y los carriles 6 y 7 corresponden al homocigoto Val1,016 (SS) de 85 pb.



Fig.10. Equipo empleado para crianza de mosquitos, extracción de ADN y PCR : 1. Chilltable, 2. Microcentrífuga, 3. Baño seco, 4. Vortex, 5. Evaporador, 6. Termocilador, 7. Microondas, 8. Campana para PCR, 9. Cámara Bioclimática.

#### 6.6 Cálculo de frecuencias genotípicas y alélicas

El cálculo de frecuencias genotípicas y alélicas fueron realizados según el principio de Hardy-Weinberg (también conocido por una variedad de nombres: el equilibrio de Hardy-Weinberg, el teorema de Hardy-Weinberg, HWE, o ley de Hardy-Weinberg) el cual establece que tanto el alelo y genotipo de frecuencias en una población se mantienen constantes, es decir, que se encuentran en equilibrio, de

generación en generación a menos específicas influencias perturbadoras se introducen (Edwards, A.W.F. 1977).

Debido a que en esta investigación se analizaron dos alelos, la fórmula utilizada en el PHW es las siguientes:

$$p + q = 1$$

En donde  $p$  representa la frecuencia del alelo dominante, en el caso de la presente investigación es representado por  $S$  (Val1,016),  $q$  muestra la frecuencia del alelo recesivo el cual es representado con la letra  $R$  (Ile1,016), la suma de estas frecuencias debe ser uno, esto debido a que las frecuencias son proporciones en la población o cepa estudiada.

Las proporciones de Hardy-Weiberg en las frecuencias genotípicas son representadas con la siguiente fórmula:

$$p^2 + q^2 + 2pq = 1 \text{ que también se puede representar en este estudio como } S^2 + R^2 + 2SR = 1$$

El cálculo de las frecuencias ( $f$ ) genotípicas observadas se realizó dividiendo el número de mosquito con el genotipo a calcular entre el total de mosquitos analizados.

1.  $f_{SS} = N^{\circ} \text{ de } SS / n$  frecuencia del genotipo Val1,016/Val1,016
2.  $f_{SR} = N^{\circ} \text{ de } SR / n$  frecuencia del genotipo Val1,016/Ile1,016
3.  $f_{RR} = N^{\circ} \text{ de } RR / n$  frecuencia del genotipo Ile1,016/Ile1,016

Las frecuencias alélicas se calcularon sumando la frecuencia genotípica de los heterocigotos entre dos más la frecuencia de los homocigotos:

1.  $p = fSS + (fSR/2)$  Frecuencia alélica de Val1,016 (**S**)

2.  $q = fRR + (fSR/2)$  Frecuencia alélica de Ile1,016 (**R**)

### 6.7 Equilibrio de Hardy- Weinberg utilizando la prueba de $X^2$

La comprobación del desequilibrio del PHW se suele llevar a cabo utilizando la prueba  $\chi^2$  de Pearson, utilizando las frecuencias genotípicas observadas que se han obtenido de los datos y las frecuencias genotípicas esperadas obtenidas mediante el PHW. Para esto se necesitó calcular los genotipos esperados basándose en la frecuencias alélicas calculadas (**p** y **q**) con la siguiente fórmula (Hedrick, 2011):

$$SS \text{ esp} = S^2(n)$$

$$RR \text{ esp} = R^2(n)$$

$$SR \text{ esp} = 2SR(n)$$

Después del cálculo de los genotipos esperados se calculó el equilibrio de Hardy – Weinberg siguiendo la fórmula de  $X^2$ , la cual probó la hipótesis nula que dice que en la cepa estudiada se encuentra en equilibrio genético. El nivel de significancia es de 3.84, 1 grado de libertad, Probabilidad de 0.96.

### 6.8 Coeficiente de Wrigth (endogamia)

El coeficiente de Wrigth o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) se calculó con la siguiente fórmula:

$$F_{IS} = 1 - (H_{obs}/H_{esp})$$

Donde  $F_{IS}$  es el coeficiente de endogamia  $H_{obs}$  son los heterocigotos observados y  $H_{esp}$  so los heterocigotos esperados (*SR esp*).

Cuando  $F_{IS}$  es mayor de 0 significa que existe un exceso de homocigotos y cuando es menor de 0 significa que existe un exceso de heterocigotos.

#### 6.9 Intervalo de Confianza Agresti-Coull

Para corregir el tamaño de muestra se usó la siguiente fórmula:

$$\tilde{n} = n + 4$$

donde  $\tilde{n}$  es el tamaño de muestra corregido. Para corregir la frecuencia alélica ( $\tilde{p}$ ) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\tilde{p} = \frac{X + 2}{\tilde{n}}$$

Ya corregido se procedió a calcular el intervalo de confianza utilizando el tamaño de muestra y la frecuencia alélica corregida:

$$\tilde{p} \pm z_{1-\alpha/2} \sqrt{\frac{\tilde{p}(1-\tilde{p})}{\tilde{n}}}$$

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Genotipos y frecuencia alélica de *Ile1,016* por Estados y localidades

Se analizaron 790 mosquitos *Ae. aegyptide* 17 cepas de campo en el año 2007 al 2009 en 4 estados de México.

#### 7.1.1 Nuevo León

Se analizaron 213 mosquitos *Ae. aegypti* recolectados en cuatro localidades del Estado de Nuevo León (Sabinas Hidalgo, Ciénega de Flores, San Nicolás de los Garza y Monterrey) en el año 2009, de esto se obtuvo una frecuencia total de la mutación *Ile1016* de 0.631, el genotipo predominante en total fue el RR.

Tabla II. Frecuencia de la mutación *Ile1016* de *Ae. aegypti* recolectados en cuatro localidades del Estado de Nuevo León en el año 2009.

Cepa	F	Localidad	N	RR	SR	SS	f <i>Ile1016</i>
CIF9	F0	Ciénega de Flores	51	0	1	50	0.01
SAH9	C	Sabinas Hidalgo	59	33	21	5	0.738
MTY9	F0	Monterrey	53	41	9	3	0.865
SAN9	F1	San Nicolás de los Garza	50	40	10	0	0.90
<b>Total</b>			213	114	41	58	0.631

F= generación de la cepa, n= número de mosquitos, RR = genotipo *Ile1016/Ile1016*,

SR= genotipo *Val1016/Ile1016*, SS= genotipo *Val1016/Val1016*, f= frecuencia.

En la tabla II se muestran las frecuencias de la mutación *Ile1,016* en 4 cepas de mosquitos *Ae. aegypti* recolectados en el año 2009 en el Estado de Nuevo León, siendo la cepa SAN9 con la frecuencia más alta (0.90), seguido de la cepa MTY9 con 0.865 y la cepa SAH9 con 0.738, la cepa que registró la frecuencia más baja fue CIF9 con 0.01. La cepa SAN9 muestra el porcentaje más alto de **RR**(homocigotos *Ile1016*) con el 80%, seguido de MTY9 con el 77%, la cepa que no presentó este genotipo fue CIF9. La cepa con mayor porcentaje de **SR**(heterocigotos) fue SAH9 con 35% y la cepa con menor porcentaje de **SR** fue CIF9 con solo el 2%. El genotipo silvestre **SS** (homocigoto Val1016) predominó en la cepa CIF9 con un 98% al contrario de la cepa SAN9 que no presentó este genotipo.

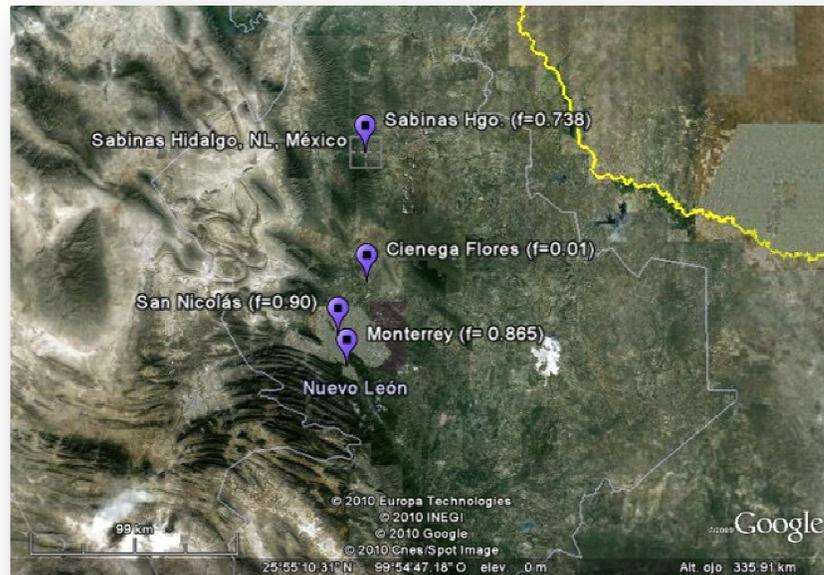


Fig. 11. Distribución de las frecuencias de la mutación *Ile1016* en *Ae. aegypti* recolectados en 4 localidades del Estado de Nuevo León en el año 2009.

### 7.1.2. Veracruz

Se analizaron 310 mosquitos recolectados en 7 localidades del Estado de Veracruz (Pánuco, Martínez de la Torre, Tantoyuca, Coatzacoalcos, Cosoleacaque, Veracruz y Poza Rica) en el año 2009, de los cuales se obtuvo una frecuencia de la mutación *Ile1016* de 0.578, siendo el genotipo RR el más predominante.

La tabla III muestra los resultados de 10 cepas de *Ae. aegypti* (PAN7, PAN9, VER7, VER9, MAT7, MAT9, COS9, COA9, POR9, TAN9) de 7 localidades del Estado de Veracruz recolectadas en el año 2007 y 2009. La cepa con la mayor frecuencia de la mutación *Ile1016* registrada en el Estado fue VER9 con 0.83, seguido de la cepa POR9 con 0.69, al contrario de la cepa COS9 la cual mostró la frecuencia más baja en el Estado con 0.186. El genotipo **RR** predominó en la mayoría de las cepas siendo VER9 con el mayor porcentaje (70%), mientras que MAT9 obtuvo el menor (10%). Dentro de los heterocigotos analizados la cepa MAT9 obtuvo el mayor porcentaje con el 55% y el menor lo obtuvo la cepa PAN7 con solo 12%. El genotipo silvestre **SS** predominó en COS9 con un 75% seguido de VER9 con un 67%, mientras que la cepa con el menor porcentaje fue VER9 con un 4%.

Tabla III. Frecuencia de la mutación *Ile1016* en 10 cepas de *Ae. aegypti* recolectadas en el Estado de Veracruz en el año 2007 y 2009.

Cepa	F	Localidad	Año	n	RR	SR	SS	f <i>Ile1016</i>
PAN7	F3	Pánuco	2007	50	25	6	19	0.56
PAN9	F0	Pánuco	2009	51	18	24	9	0.589
VER7	F2	Veracruz	2007	27	4	5	18	0.24
VER9	F0	Veracruz	2009	46	32	12	2	0.83
MAT7	F2	Martínez de la Torre	2007	61	6	34	21	0.377
MAT9	F0	Martínez de la Torre	2009	41	16	15	10	0.573
COS9	F0	Cosoleacaque	2009	43	5	6	32	0.186
COA9	F0	Coatzacoalcos	2009	42	16	14	12	0.55
POR9	F0	Poza Rica	2009	42	22	14	6	0.69
TAN9	F0	Tantoyuca	2009	45	25	6	14	0.625
<b>Total ( solo el año 2009)</b>		→		310	134	91	85	0.578

F= generación de la cepa, n= número de mosquitos, RR = genotipo *Ile1016/Ile1016*, SR= genotipo *Val1016/Ile1016*, SS= genotipo *Val1016/Val1016*, f= frecuencia.

En los resultados también se observó un incremento en la frecuencia de la mutación *Ile1016* del año 2007 al 2009 (Fig. 14) en mosquitos recolectados en Pánuco, Veracruz y Martínez de la Torre, siendo los mosquitos de Veracruz los que presentaron un mayor incremento en la frecuencia de la mutación con un 245.8%, seguido de los de Martínez de la Torre con un incremento de 54.8%, el incremento más bajo se presentó en mosquitos de Pánuco con un 5%.

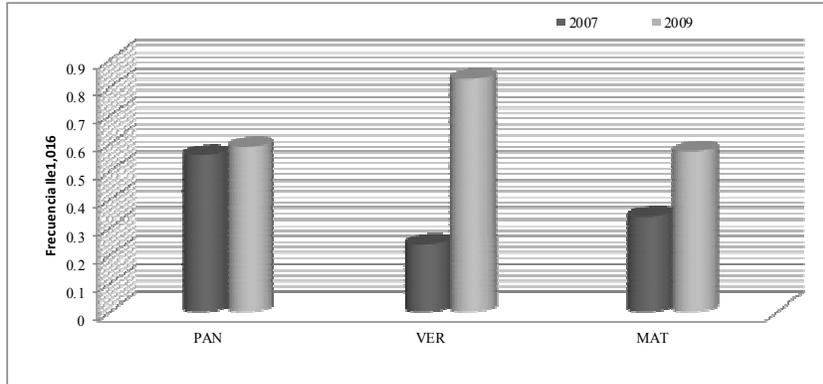


Fig. 12. Incremento de la frecuencia de la mutación *Ile1,016* en *Ae. aegypti* del año 2007 al 2009 de 3 localidades del estado de Veracruz (PAN = Pánuco, VER = Veracruz, MAT = Martínez de la Torre).



Fig. 13. Frecuencias de la mutación *Ile1016* de *Ae. aegypti* de 7 localidades del Estado de Veracruz del año 2009.

### 7.1.3 Guerrero y Yucatán

Se analizaron 82 mosquitos *Ae. aegypti* en el Estado de Guerrero pertenecientes a dos localidades (Iguala y Acapulco), con respecto al Estado de Yucatán solo se analizaron 50 mosquitos de la localidad de Mérida.

Tabla IV. Frecuencia de la mutación Ile1016 en 3 cepas de *Ae. aegypti* recolectadas en el Estado de Guerrero y Yucatán en el año 2008 y 2009.

Cepa	F	Localidad	Año	n	RR	SR	SS	f Ile1016
IGU9	C	Iguala, Grrro.	2009	48	41	7	0	0.926
ACA9	F1	Acapulco, Grrro.	2009	34	33	1	0	0.97
MER8	F1	Merida, Yuc.	2008	50	26	20	4	0.72

F= generación de la cepa, n= número de mosquitos, RR = genotipo *Ile1016/Ile1016*, SR= genotipo *Val1016/Ile1016*, SS= genotipo *Val1016/Val1016*, f= frecuencia.

La tabla IV muestra las frecuencias de la mutación *Ile1016* en 3 cepas de *Ae. aegypti* recolectadas en 2 Estados (Guerrero y Yucatán) en el año 2009, en donde se muestra que la frecuencia más alta es de 0.97 correspondiente a la cepa ACA9, seguida de la cepa de IGU9 con 0.926. El genotipo predominante en estas dos cepas es **RR**, no se reportaron mosquitos con el genotipo **SS**, la mayoría de los heterocigotos se reportaron en IGU9 con un 15% y la cepa ACA9 solo reportó un mosquito heterocigoto (**SR**).

En Yucatán solo se obtuvo resultados de una cepa (MER9) recolectada en el año 2008, la cual muestra una frecuencia de la mutación *Ile1016* de 0.72. El genotipo **RR** fue el predominante con un 52%.

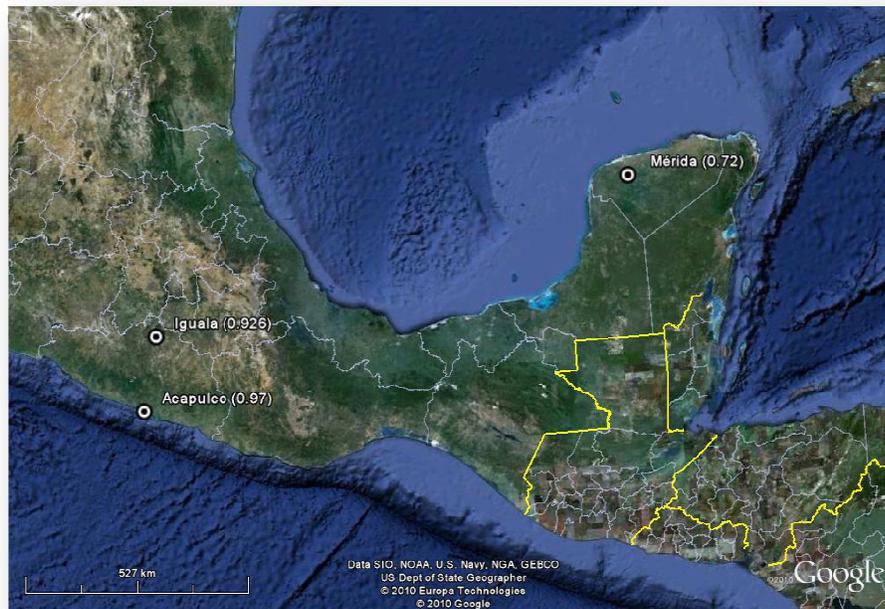


Fig. 14. Frecuencias del alelo *Ile1,016* en *Ae. aegypti* de Yucatán y Guerrero

#### 7.1.4 Frecuencia de la mutación *Ile1016* en México

La mutación *Ile1016* estuvo presente en todas las cepas procesadas mostrando resultados heterogéneos aún en cepas cercanas, también puede observar que la frecuencia más alta de esta mutación la presenta las 2 cepas de Guerrero (ACA9 con 0.97, seguido de IGU9 con 0.926) al contrario de la cepa CIF9 que mostró la menor frecuencia de la mutación con 0.01 (Fig. 17).

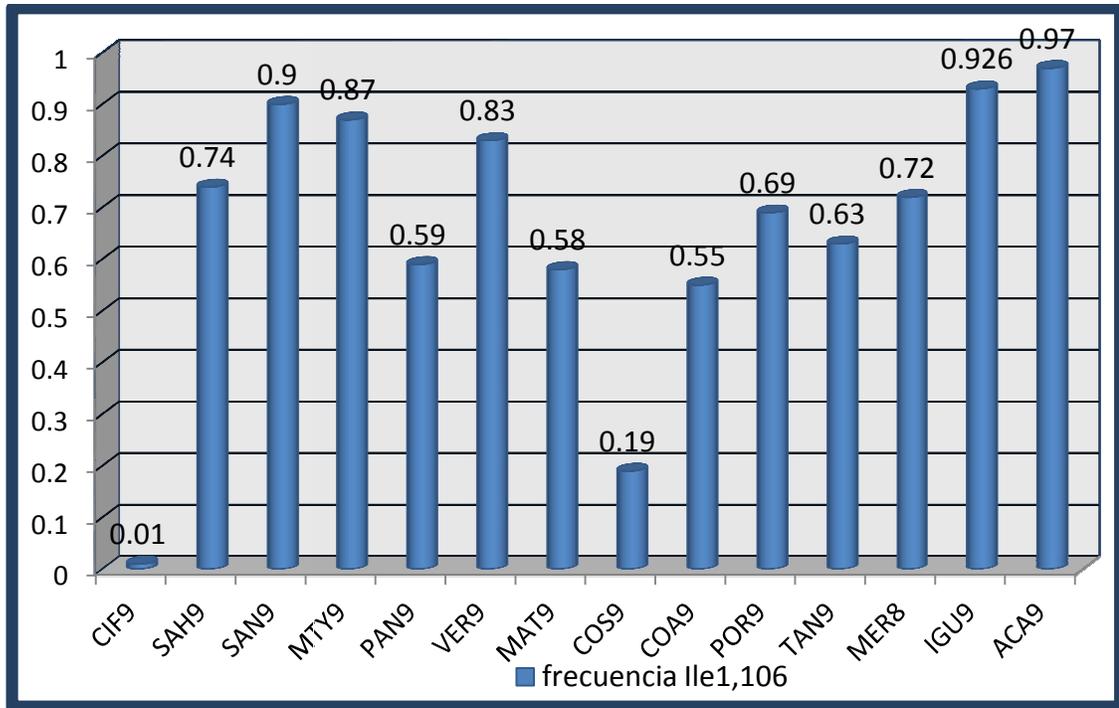


Fig. 15. Frecuencia de la mutación *Ile1016* en 14 cepas de *Ae. aegypti* recolectadas en el año 2009 en México (solo Mérida es del 2008).

## 7.2 Equilibrio de Hardy – Weinberg

De acuerdo con la prueba  $\chi^2$  de Pearson se probó la significancia de los valores. La hipótesis nula indica que existe equilibrio genético para este locus. Cuando los valores pasan el nivel de significancia 3.84 ( $P = 0.05$ ,  $gl = 1$ ) se rechaza la hipótesis nula, esto significa que uno o más de los supuestos del modelo de Hardy-Weinberg no se cumplen para el locus estudiado.

### 7.2.1 Nuevo León

De las 4 cepas de mosquitos (CIF9, SAH9, SAN9 y MTY9) recolectadas en el Estado de Nuevo León en el año 2009 solamente la cepa MTY9 no se encontraba en

equilibrio genético según las Ley de Hardy-Weinberg, debido a que la prueba de  $X^2$  mostró resultados mayores al nivel de significancia (Tabla V).

Tabla V. Resultados de la prueba de  $X^2$  de Pearson para el Equilibrio de Hardy-Weinberg en 4 cepas de *Ae. aegypti* recolectados en el Estado de Nuevo León en el año 2009.

Cepa	n	F	Localidad	IC Agresti-Coull	$X^2$ Hardy-Weinberg
CIF9	51	F0	Ciénega de Flores	-.009-.102	1.00
SAH9	59	C	Sabinas Hidalgo	.611-.833	0.3902
MTY9	53	F0	Monterrey	.736-.930	*5.3
SAN9	50	F1	San Nicolás de los Garza	.780-.960	0.617

F= generación de la cepa, n= número de mosquitos, \*Desequilibrio genético, grados de libertad 1, Nivel de significancia 3.84 ( $P=0.5$ ).

### 7.2.2 Veracruz

Se analizaron 10 cepas (PAN7, PAN9, VER7, VER9, MAT7, MAT9, COS9, COA9, POR9, y TAN9) recolectadas en 7 localidades del Estado de Veracruz en el año 2007 y 2009 teniendo como resultados según la prueba de  $X^2$  de Pearson que las cepas PAN7, VER7, COS9, COA9 y TAN9 se encontraban en desequilibrio genético según la Ley de Hardy-Weinberg debido a que los resultados obtenidos sobrepasaban el nivel de significancia (3.84).

Tabla VI. Resultados de la prueba de  $\chi^2$  de Pearson para el Equilibrio de Hardy-Weinberg en 10 cepas de *Ae. aegypti* recolectados en el Estado de Veracruz en los años 2007 y 2009.

Cepa	N	F	año	Localidad	IC Agresti-Coull	$\chi^2$ *Hardy-Weinberg
PAN7	50	F3	2007	Pánuco	.423-.688	*28.6
PAN9	51	F0	2009	Pánuco	.457-.743	0.0421
VER7	27	F2	2007	Veracruz	.117-.431	*9.78
VER9	46	F0	2009	Veracruz	.689-.910	0.4030
MAT7	61	F2	2007	Martínez de la Torre	.266-.503	2.1215
MAT9	41	F0	2009	Martínez de la Torre	.422-.711	2.604
COS9	43	F0	2009	Cosoleacaque	.095-.329	*12.58
COA9	42	F0	2009	Coatzacoalcos	.399-.687	*4.507
POR9	42	F0	2009	Poza Rica	.538-.809	2.09
TAN9	45	F0	2009	Tantoyuca	.476-.748	*23.26

F= generación de la cepa, n= número de mosquitos, \*Desequilibrio genético, grados de libertad 1, Nivel de significancia 3.84 ( $P=0.05$ ).

### 7.2.3 Guerrero y Yucatán

Se analizaron 82 mosquitos correspondientes a 2 cepas de *Ae. aegypti* (IGU9 y ACA9) del Estado de Guerrero colectados en el año 2009, las cuales muestran según los resultados de la prueba de  $\chi^2$  de Pearson que estas cepas se encuentran en equilibrio según los principios de Hardy-Weinberg. La cepa MER8 correspondiente al estado de Yucatán recolectada en el 2008 muestra que sus resultados están por debajo del nivel de significancia (3.84), el cual indica que esta cepa se encontraba en equilibrio genético.

Tabla VII. Resultados de la prueba de  $X^2$  de Pearson para el Equilibrio de Hardy-Weinberg en 3 cepas de *Ae. aegypti* recolectados en el Estado de Guerrero y Yucatán en los años 2008 y 2009.

Cepa	N	F	año	Localidad	Estado	IC Agresti-Coull	$X^2$ *Hardy-Weinberg
IGU9	48	C	2009	Iguala	Guerrero	.810-.977	0.3005
ACA9	34	F1	2009	Acapulco	Guerrero	.855-1.01	.0079
MER8	50	F1	2008	Mérida	Yucatán	.581-.825	.003

F= generación de la cepa, n= número de mosquitos, grados de libertad 1, Nivel de significancia 3.84 ( $P=0.5$ ).

### 7.3 Endogamia o Coeficiente de Wrigth ( $F_{IS}$ )

Si el coeficiente de Wrigth o endogamia ( $F_{IS}$ ) es mayor de cero un exceso de homocigotos se ha presentado en la cepa, al contrario si  $F_{IS}$  es menor de cero un exceso de heterocigotos.

12 cepas (PAN7, PAN9, VER7, VER9, MAT9, COS9, COA9, POR9, TAN9, SAH9, MTY9 y MER8) de las 17 tuvo un  $F_{IS}$  significativamente mayor que cero, lo cual indica un exceso de homocigotos. Las cepas que mostraron un  $F_{IS}$  menor de 0 fueron tres (MAT7, IGU9 y SAN9) esto indica un exceso de heterocigotos (Fig. 18).

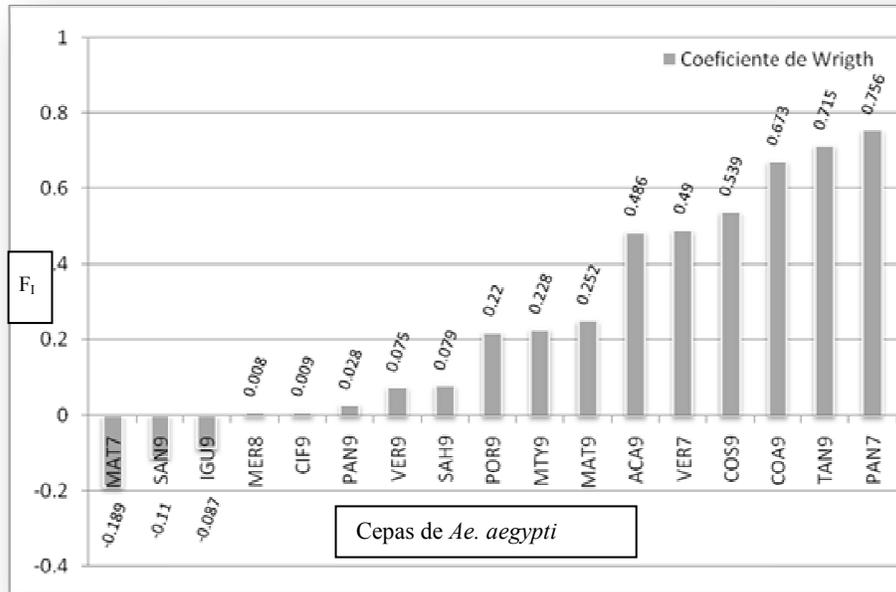


Fig. 16. Coeficiente de Wrigth ( $F_{IS}$ ) en 17 cepas de *Ae. aegypti* recolectados en el año 2007, 2008 y 2009 en cuatro estados de la República Mexicana.

## 8. DISCUSIONES

La mutación *Ile1,016* el cual se encuentra en el gen que codifica al canal de sodio específicamente en el dominio II segmento transmembranal número 6 (IIS6) que confiere resistencia a permetrina fue descubierta en México en el 2006 en cepas de mosquitos *Ae. aegypti* de Isla Mujeres, Quintana Roo (Saavedra *et al.*, 2007, 2008), sin embargo en estudios recientes en diferentes colecciones de mosquitos de esta especie revelaron la presencia de esta mutación en Nuevo Laredo, Tamaulipas (1997) con una frecuencia de .01, consecuentemente otras cepas recolectadas en diferentes puntos de la República Mexicana y en diferentes años se procesaron en la búsqueda de esta mutación, este estudio no solo revela la presencia de la mutación *Ile1016* sino un incremento de la frecuencia (Ponceet *al.*, 2009).

En el presente estudio se muestran las frecuencias de la mutación *Ile1,016* en 17 cepas de *Ae. aegypti* recolectados en 14 localidades del año 2007 al 2009 mostrando la presencia de esta mutación en todas las cepas procesadas, siendo las cepas ACA9 e IGU9 las que obtuvieron las frecuencias de *Ile1016* más elevadas (Fig. 17), ¿Cuáles pueden ser las causas que mantienen la presencia de esta mutación en las localidades de México? En estudios previos, (Saavedra *et al.*, 2007) muestran que en botellas usadas en bioensayos impregnadas con 5 o 10 µg de permetrina segregaba al 100% mosquitos con el genotipo homocigoto recesivo (*Ile1016/III106*), también se observó un 86 – 96% de mortalidad en heterocigotos y una mortalidad al 100% en mosquitos homocigotos

*Val1016*, la aparición de la resistencia a insecticidas según Hamminway y Ranson (2000) es causada por aplicaciones extensivas y frecuentes con un mismo insecticida y debido a las características inherentes de la especie, o sea la resistencia a insecticidas aumenta cuando la especie expuesta tiene ciclos de vida cortos y alta fecundidad. Esto nos da una probable respuesta ya que en México la aplicación de piretroides como adulticida específicamente permetrina fue establecida por la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA-2002(Flores *et al.*, 2006), la cual se puso en vigor desde 2002 hasta el 2008, la presión de selección de este insecticida pudiera considerarse muy probablemente como la causa principal por la que las poblaciones de *Ae. aegypti* mantuvieran la presencia de la mutación *Ile1,016* en México, aunado con las características que presenta este mosquito la cual son la alta fecundidad y ciclo de vida corto. El ciclo completo de *Ae. aegypti*, de huevo a adulto, varía según la temperatura y disponibilidad de alimento, pero en condiciones favorables se completa en 10 días. La ovogénesis se completa en 2 a 3 días, luego de la ingesta de sangre. La ovoposición ocurre cada 3 o 4 días después de la ingesta de sangre. La primera ovoposición es de 80 a 100 huevecillos, pero en las siguientes se reduce de 25 a 30. El total de ovoposiciones por hembra es de 12 a 15, lo que teóricamente da un total de 300 a 450 huevecillos (Vargas, 1998).

Otros estudios realizados en Brasil muestran que la mutación *Ile1,016* se encuentra presente en *Ae. aegypti* recolectados en diferentes puntos del país, también muestra que esta mutación es altamente segregada por el piretroide deltametrina (Martinet *et al.*, 2009), lo que nos indica que posiblemente otros insecticidas piretroides utilizados en México pudieran segregar esta mutación después de dejar de aplicar permetrina.

Con respecto al aumento en la frecuencia de la mutación *Ile1,016* se puede observar que estas son muy variables aun dentro del mismo estado como por ejemplo Veracruz que presenta una frecuencia que va desde .186 (COS9) a .830 (VER9), esto puede ser debido a que en las localidades la aplicación de insecticidas no es homogénea aún en el mismo estado, otro ejemplo lo muestran las cepas de Nuevo León CIF9 con 0.01 de frecuencia y SAN9 con 0.90, las localidades en las que fueron recolectadas estas cepas están separadas solo por alrededor de 20 km y la diferencia en las entre las frecuencias es muy alta con respecto a otras cepas de otras localidades, esto nos muestra que las frecuencias son puntuales y pueden cambiar en tiempo y espacio, como lo muestran los mosquitos recolectados en la localidad de Veracruz los cuales presentaron un incremento en la frecuencia de 245.84% en el año 2009 con respecto al 2007, sin embargo no en todas las localidades se registró un aumento, un ejemplo es el caso de los mosquitos de Cosoleacaque los cuales presentaron una disminución en la frecuencia que va de .35 en el 2008 (Ponce *et al.*, 2009) a .186, esta disminución puede ser causada por la reintroducción de mosquitos silvestres, disminución de presión de selección o deriva genética, otra causa es la presencia de genes letales asociados en el gen *para* (Feng *et al.*, 1995; Foster *et al.* 2003; Lilly *et al.* 1990, 1994a, 1994b; Tompkins *et al.* 1982; Tompkins and Hall 1983) según reportes de Kernan MJ *et al.* (1991) en donde muestra que las mutaciones puntuales del gen *para* en *Drosophila melanogaster* están ligadas a disturbios en el comportamiento, por ejemplo la parálisis en la sensibilidad de la temperatura exhibida por individuos que poseen la mutación puntual *naps* (no actionpotential, temperaturesensitive) es resultado de una reducción en la expresión de gen *para*.

Los mosquitos de las localidades que presentaron desequilibrio genético para el locus estudiado son PAN7, VER7, COS9, COA9, TAN9 y MTY9, esto nos indica que estas poblaciones de mosquitos han sufrido ya sea selección natural, deriva genética y/o migración (Hendrick, 2011). Está demostrado que existe un flujo genético en mosquitos en 130 km de un punto a otro en la región México y 180 kilómetros uno de otro en el estado de Yucatán (Gorrochoteguiet *al.*, 2002) así como en el estado de Veracruz (Lozano *et al.*, 2005), de esta manera la reintroducción de los alelos ya sea Val1,016 e Ile1,016 puede provocar desequilibrio en las poblaciones de mosquitos *Ae. aegypti*, esto aunado a el transporte de criaderos artificiales con fines comerciales como es el caso de compra venta de depósitos de agua usados, llantas, floreros y otros criaderos potenciales (Ponceet *al.*, 2009).

La importancia de este tipo de investigaciones radica en la detección de poblaciones de mosquitos vectores resistentes a insecticidas con la finalidad de tener mejores estrategias para el control de enfermedades transmitidas por vectores, de hecho la búsqueda de mejoramiento de técnicas para el control de insectos resistentes de importancia agrícola y médica es nueva, en 1986 NationalResearch Council sugiere propuestas en el monitoreo, control y prevención de la resistencia el cual concluye que la susceptibilidad a los insecticidas debe de ser visto como un recurso natural con riesgo de depleción, ante esto debe tener un manejo apropiado, investigaciones posteriores muestran técnicas que pueden detectar y monitorear la resistencia a insecticidas (Brogdon and McAllister, 1998; Curtis *et al.*, 1998; Coleman and Hemingway, 2007) .

En el sureste de México se han hecho pruebas a gran escala en donde la rotación de insecticidas (carbamatos, orgnophosporados y piretroides) e insecticidas aplicados en mosaico (organofosforado y piretoroide) puede reducir la presencia de resistencia a

piretroides en Anophelinos comparado con el uso de un insecticida como piretroides o DDT (Hemingway *et al.*, 1997, 2004; Penilla *et al.*, 1998, 2006, 2007).

Existe una extensa información acerca de las propiedades que tienen los piretroides como repelentes (Achee *et al.*, 2009; Ansari y Razdan, 1997; Brown y Heberth, 1997; Curtis y Mnzava 2000; Depariset *et al.*, 2004; Sholdt *et al.*, 1988), debido a esto se han desarrollado materiales tratados con este insecticida tales como cortinas y pabellones esto con la finalidad de disminuir el contacto del vector con el hospedero (Igarashi A, 1997; Kroeger A *et al.*, 2006; Nam V *Set al.*, 1993; Nguyen H *Tet al.*, 1996). La hembra *Ae. aegypti* es endofágica y endofílica a esto se le agrega su alto grado de antropofilia lo que aumenta el riesgo de transmisión del virus del dengue (Scott *et al.*, 1993) sin embargo los materiales tratados con piretroides pueden repeler las hembras *Ae. aegypti* infectadas de los hogares y por lo tanto bloquear la transmisión del dengue, ante todo esto se asoma la interrogante de que si la mutación Ile1,016 reduce la sensibilidad del sitio blanco ¿también podrá reducir la repelencia a piretroides? Debido a esto no se conoce el impacto en la abundancia en hembras *Ae. aegypti* infectadas con el virus del dengue que poseen la mutación Ile1016 y la incidencia del dengue. Tampoco se sabe si el material tratado con piretroides promueve la evolución de este tipo de mutaciones en *Ae. aegypti*. (Ponce *et al.*, 2009).

El constante monitoreo de la mutación *Ile1,016* en *Ae. aegypti* es clave para la toma de decisiones en la aplicación de insecticidas, esto debido a que la resistencia puede cambiar con el paso del tiempo y de una localidad a otra, las decisiones para la aplicación de cualquier insecticida debe estar basado en estudios, los cuales puedan detectar el mecanismo de resistencia involucrado en las poblaciones de mosquitos de las localidades de alto riesgo de incidencia de dengue.

## 9. CONCLUSIONES

La mutación *Ile1,016* se presentó en las 17 cepas de *Ae. aegypti* que fueron recolectadas en el año 2007 al 2009, los análisis estadísticos nos muestran que la frecuencia de esta mutación es muy variada entre las cepas analizadas, siendo la cepa ACA9 e IGU9 las que mostraron una frecuencia de la mutación *Ile1,016* mayor a .9 con respecto a las demás cepas, al contrario de las cepa de la cepa CIF9 en donde mostró la frecuencia menor de todas las cepas analizadas y obviamente con la mayor frecuencia (0.99) del alelo silvestre o el alelo no mutado *Val1,016*.

Dentro de esta investigación también se observó que la frecuencia de *Ile1,016* aumentó con respecto al año 2007 al 2009 en cepas de una misma localidad en el estado de Veracruz, siendo los mosquitos de la localidad de Veracruz los que mostraron un incremento más alto en la frecuencia de *Ile1,016* (245.8%) con respecto a los mosquitos de Pánuco y Martínez de la Torre recolectados en el año 2007 y 2009.

El equilibrio genético o equilibrio Hardy-Weinberg estudiado para este locus por medio de los cálculos para estimar frecuencias genotípicas y alélicas junto con análisis estadísticos nos muestran que no todas las cepas de moquitos se encontraron en equilibrio genético, estas cepas fueron MTY9, PAN7, VER9, COS9, COA9 y TAN9, al contrario de las cepas CIF9, SAH9, SAN9, PAN9, VER9, MAT9, MAT7, POR9, IGU9, ACA9 y MER8 que si mostraron equilibrio genético.

Otro elemento importante que se midió fue el nivel de endogamia o índice de Wright el cual nos indica que tan emparentados se encuentran los mosquitos de una cepa, las cepas de mosquito PAN7, PAN9, VER7, VER9, MAT9, COS9, COA9, POR9, TAN9, SAH9, MTY9 y MER8 mostraron un exceso de homocigotos y las cepas de mosquitos MAT7, IGU9 y SAN9 mostraron un exceso de heterocigotos.

## 10. LITERATURA CITADA

Achee NL, Sardelis MR, Dusfour I, Chauhan KR, Grieco JP. 2009. Characterization of Spatial Repellent, Contact Irritant, and Toxicant Chemical Actions of Standard Vector Control Compounds. *J Am MosqContAssoc* 25: 156–167.

Ansari MA, Razdan RK. 2000. Relative efficacy of insecticide treated mosquito nets (Diptera :Culicidae) under field conditions. *J Med Entomol* 37: 201–204.

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

Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltagegated sodium channel gene. *Med Vet Entomol* 17: 87-94.

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

Brown AWA, Pal. 1971. Pest resistance to pesticides, in “Pesticides in the Environment” (R. White-Stevens, Ed), Vol. 1, Part II , Dekker, New York, p. 457-552

Brown GB, Gaupp JE, Olsen RW. 1988. Pyrethroid insecticides: stereospecific allosteric interaction with the batrachotoxinin-A benzoate binding site of mammalian voltage-sensitive sodium channels. *Mol. Pharmacol.* 34, 54–59.

Brown M, Hebert AA. 1997. Insect repellents: An overview. *J AmerAcadDermatol* 36: 243–249.

Camacho T de la Hoz, Cárdenas F, Sánchez V, Calderón C, Pérez L, Bermúdez L, Feyereisen MR, Oakesshott R. 2006. Incomplete surveillance of Dengue - 2 epidemic in Ibague, Colombia 1995 – 1997. *Biomedica* 24, 174 – 182.

Chang C, Shen WK, Wang TT, Lin YH, Hsu EL and Dai SM. 2009. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem.Molec.* 39: 272–278.

Chappell WA, Calister CH, Toole RA, Maness KC, Sasso DR, Henderson BE. 1971. Comparison of three methods used to insolate viruses type 2. *ApplMicrobiol*; 22: 1100-3

Chester G, Moore C, Mitchell J. 1997. *Aedes albopictus* in the United States: Ten-Year presence and Public health implications. *EmergInf Diseases* 3(3):1-8.  
Coleman M, Hemingway J. 2007. Insecticide resistance monitoring and evaluation in disease transmitting mosquitoes. *J Pest Sci* 32: 69–76.

Coto MM, Lazacano JA, Fernandez DM, Soca A. 2000. Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after its use in *Aedes aegypti* control programs. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 16, 324 – 330.

Crow J F. 1960. Genetics of insecticide resistance: general considerations. *Miscellaneous Publication of the Entomological Society of America* 2:69-74.

Cui F, Raymond M, Qiao CL. 2006. Review Insecticide resistance in vector mosquitoes in China, *Pest ManagSci* 62:1013–1022

Curtis CF, Miller JE, Hodjati MH, Kolaczinski JH, Kasumba I. 1998. Can anything be done to maintain the effectiveness of pyrethroid-impregnated bednets against malaria vectors? *Philos Trans Roy Soc Lond B-BiolSci* 353: 1769–1775.

Curtis CF & Mnzava AEP. 2000. Comparison of house-spraying and insecticide treated nets for malaria control. *Bulletin of the World Health Organization* 78, 1389–1400.

da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE & Valle D. 2005. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera :Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, pp. 441–444.

Deparis X, Frere B, Lamizana M, N'Guessan R, Leroux F, et al. 2004. Efficacy of permethrin-treated uniforms in combination with DEET topical repellent for protection of French military troops in Cote d'Ivoire. *J Med Entomol* 41:914–921.

Edwards A. W. F. 1908. G. H. Hardy and Hardy–Weinberg Equilibrium, *Genetics*. Disponible en el sitio red <http://www.genetics.org/content/179/3/1143.short> [Revisado en Septiembre del 2011]

e-local, SEGOB Disponible en el sitio red: <http://e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/yucatan/medi.htm> [Revisado en Septiembre del 2011]

Flores AE, Grajales JS, Salas IF, Garcia GP, Becerra MH, Lozano S, Brogdon WG, Black WC 4th, Beaty B. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. *J Am Mosq Control Assoc.* Dec 22(4):672-677.

Foster SP, Young S, Williamson MS, Duce I, Denholm I. 2003. Analogous pleiotropic effects of insecticide resistance genotypes in peach-potato aphids and houseflies. *Heredity* 91: 98–106.

George W. Ware, David M. Whitacre. 2004. Introducción a los insecticidas, por MeisterPro Information Resources Unadivisión de Meister Media Worldwide Willoughby, Ohio. Disponible en el sitio red: <http://ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/W&WinsectSP.htm> [Revisado en Septiembre del 2011]

Gorrochotegui-Escalante N, Gomez-Machorro C, Lozano-Fuentes S, Fernandez-Salas I, Munoz MD. 2002. Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. *Am J Trop Med Hyg* 66: 213–222.

Harwood RF, James MT. 1993. *Entomología Médica y Veterinaria*, UTHEA, Noriega Editores. México D.F.

Hedrick Philip W. 2011. *Genetics of populations*. 4th edition. Jones & Bartlett Learning. Pp 93.

Hemingway J, Hawkes N., McCarroll L. and H. Ranson. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 34:653-665.

Hemingway J, Penilla RP, Rodriguez AD, James BM, Edge W. 1997. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. A largescale field trial in southern Mexico. *Pest Sci* 51: 375–382.

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

Igarashi A .1997. Impact of dengue virus infection and its control. *FEMS Immunol Med Micro* 18: 291–300.

INEGI. 2000, Marco Geoestadístico. Disponible en el sitio red: [http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/datosgeogra/basicos/estados/nl\\_geo.cfm](http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/datosgeogra/basicos/estados/nl_geo.cfm) [Revisado en Septiembre del 2011]

INEGI, Disponible en el sitio red: <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/ver/territorio/default.aspx?tema=me&e=30> [Revisado en Septiembre del 2011]

Jirakanjanakit N, Rongnoparut P, Saengtharatip S, Chareonviriyaphap T, Duchn S, Bellec C, Yoksan S. 2007. Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005. *J Econ Entomol*, 100(2):545-550.

Kawada H, Higa Y, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Thi Yen N, Loan LL, Sánchez R, Takagi M .2009. Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3: e0000527.

Kernan MJ, Kuroda MI, Kreber R, Baker BS, Ganetzky B. 1991. Naps, a Mutation Affecting Sodium-Channel Activity in *Drosophila*, Is an Allele of Mle, a Regulator of X-Chromosome Transcription. *Cell* 66: 949–959.

King RC. 1975. *Handbook of Genetics*. Vol.3 Plenum, Nueva York, p. 874.

Kroeger A, Lenhart A, Ochoa M, Villegas E, Levy M, et al. (2006) Effective control of dengue vectors with curtains and water container covers treated with insecticide in Mexico and Venezuela: Cluster randomised trials. *BMJ* 332:1247–1252.

Lagunes A., y J. Villanueva 1995 *Toxicología y Manejo de Insecticidas*. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. 264 pp.

Lima JBP, da-Cunha MP, Da Silva RC. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68, 329–333.

Lee SH, Soderlund DM. 2001. The V410M mutation associated with pyrethroid resistance in *Heliothis virescens* reduces the pyrethroid sensitivity of house fly sodium channels expressed in *Xenopus oocytes*. *InsectBiochem. Mol. Biol.* 31, 19–29.

Leonard J. 1990. La vida de Carlos Finlay y la derrota de la bandera amarilla. *Bol Of SanitPanam* 108(3): 229-44

Leonard J, William G. 1992. Soldado de la salud pública. *BolOfSanitPanam*; 112(3): 223-43.

Lilly M, Carlson J. 1990. Smellblind - a Gene Required for *Drosophila* Olfaction. *Genetics* 124: 293–302.

Lilly M, Kreber R, Ganetzky B, Carlson JR. 1994. Evidence That the *Drosophila* Olfactory Mutant Smellblind Defines a Novel Class of Sodium-Channel Mutation. *Genetics* 136: 1087–1096.

Lilly M, Riesgoescovar J, Carlson J. 1994. Developmental Analysis of the Smellblind Mutants - Evidence for the Role of Sodium-Channels in Drosophila Development. *DevBiol* 162: 1–8.

Linford, NJ, Cantrell, AR, Qu, Y, Scheuer, T, Catterall, WA. 1998. Interaction of batrachotoxin with the local anesthetic receptor site in transmembrane segment IVS6 of the voltage-gated sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13947–13952.

Lipkind, G.M., Fozzard, H.A., 2000. KcsA crystal structure as framework for a molecular model of the Na<sup>+</sup> channel pore. *Biochemistry* 39, 8161–8170.

Lombet A, Mourre C, Lazdunski M. 1988. Interactions of insecticides of the pyrethroid family with specific binding sites on the voltage-dependent sodium channel from mammalian brain. *Brain Res.* 459, 44–53.

Lozano-Fuentes S, Gorrochotegui-Escalante N, Bennett KE, Black WC. 2005. *Aedes aegypti* vector competence and gene flow in the state of Veracruz, Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 73: 148–148.

Macoris M, Andrighetti MT, Takaku L. 1999. Changes in susceptibility of *Aedes aegypti* to organophosphates in municipalities in the state of Sao Paulo, Brazil. *Revista de Saúde Pública* 33, 521–522.

Martins AJ, Lins RMMA, Linss JGB, Peixoto AA, Valle D. 2009. Voltage gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81, 108–115.

Ministerio de Salud Pública (Uruguay). 1981. Campaña anti-*Aedes aegypti* del Uruguay. Informe VIII Reunión de la Cuenca del Plata. Montevideo: MSP.

Moberg, W.K. 1990. Understanding and combating agrochemical resistance. In: *Managing resistance to agrochemicals*; Green, M. N., LeBaron, H. M. y W. K. Moberg (eds.), American Chemical Society, Washintong, D. C, pp. 1-15

Monge L A. 1986. Manejo Racional de Insecticidas. Resistencia y rotación. Editorial tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. p. 74.

Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF. 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 467–477.

Nam VS, Nguyen HT, Tien TV, Niem TS, Hoa NT. 1993. Permethrin treated bamboo curtains for dengue vector control - field trial, Viet Nam. *Dengue Newsletter* 18: 23–28.

NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/032ssa202.html>

NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. Disponible en el sitio red: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5192591&fecha=01/06/2011](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5192591&fecha=01/06/2011) [Revisado en Septiembre del 2011]

Nguyen HT, Tien TV, Tien NC, Ninh TU, Hoa NT .1996. The effect of Olyset net screen to control the vector of dengue fever in Viet Nam. *Dengue Bull* 20: 87–92.

Organización Panamericana de la Salud. 1995. Dengue y Dengue hemorrágico en las Américas. Washington D.C. OPS, Publicación Científica N° 548.

Organización Panamericana de la Salud. 1992. La batalla contra *Aedes aegypti*. *Bol Of SanitPanam*; 113(5-6): 462-5.

Penilla RP, Rodríguez AD, Hemingway J, Torres JL, Arredondo-Jimenez JI, et al. 1998. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in Mexico. *Med Vet Entomol* 12: 217–233.

Penilla RP, Rodríguez AD, Hemingway J, Torres JL, Solis F, et al. 2006. Changes in glutathione S-transferase activity in DDT resistant natural Mexican populations of *Anopheles albimanus* under different insecticide resistance management strategies. *Pest BiochemPhysio* 86: 63–71.

Penilla RP, Rodríguez AD, Hemingway J, Trejo A, Lopez AD, et al. 2007. Cytochrome P450-based resistance mechanism and pyrethroid resistance in the field *Anopheles albimanus* resistance management trial. *Pest BiochemPhysio* 89: 111–117.

Ponce G, Flores A, Fernández I, Saavedra K, Reyes G, Lozano S, Bond J, Casas M, Ramsey J, García J, Domínguez M, Ranson H, Hemingway J, Eisen L, and Black WC. 2009. Recent Rapid Rise of a Permethrin Knock Down Resistance Allele in *Aedes aegypti* in México. *PLoS Negl Trop Dis*. October [Internet] 3(10): e531. [accessed Oct 13 2009 ]

Rawlins SC, Martinez R, Wiltshire S, Legall G. 1998. A comparison of surveillance systems for the dengue vector *Aedes aegypti* in Port of Spain, Trinidad. *J Am Mosq Control Assoc*, 14(2):131-136.

Rodríguez C. 2002. Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas, Oficina Sanitaria Panamericana de la Salud, Rev Cubana Med Trop;54(3):189-201,

Rodríguez MM, Bisset JA, De Armas Y, Ramos F. 2005. Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. J Am Mosq Control Assoc, 21(4):437-445.

Rubin JG, Soderlund DM. 1993. Binding of [3H]batrachotoxinin A-20- $\alpha$ -benzoate and [3H]saxitoxin to receptor sites associated with sodium channels in trout brain synaptoneuroosomes. Comp. Biochem. Physiol. 105C, 231–238.

Saavedra RK, Urdaneta ML, Rajatileka S, Moulton M, Flores A E, Fernandez SI, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway, Black 4th WC. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. Insect Mol. Biol. 16: 785–798.

Saavedra R K, Strode C, Flores SA, Fernandez I, Hemingway J, Ranson H. Black CW. 2008. Quantitative Trait Loci Mapping of Genome Regions Controlling Permethrin Resistance in the Mosquito *Aedes*, Genetics October 2008 vol. 180 no. 2 1137-1152

Salvatella R. 1996. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas: la situación de Uruguay. Rev. méd. Urug; 12(1):28-36

Sawicki RM. 1987. Definition, detection and documentation of insecticide resistance. In: Combating resistance to xenobiotics: Biological and chemical approaches. Ford, M. G., Holloman. D. W., Khambay, B. P. S. y R. M. Sawicki (eds.), Ellis Horwood, Chichester, p. 105-11.

Scott TW, Chow E, Strickman D, Kittayapong P, Wirtz RA, et al. (1993) Bloodfeeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. J Med Entomol 30: 922–927.

Sholdt LL, Schreck CE, Qureshi A, Mammino S, Aziz A, et al. 1988. Field Bioassays of Permethrin-Treated Uniforms and a New Extended Duration Repellent against Mosquitos in Pakistan. J Am MosqContAssoc 4: 233–236.

Soderlund DM, Bloomquist JR. 1989. Neurotoxic Actions of Pyrethroid Insecticides. Annu Rev Entomol 34: 77–96.

Soderlund DM, Knipple DC. 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect Biochem.MolBiol 33: 563–577.

Srisawat R, Komalamisra N, Eshita Y. 2010. Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Applied Entomology and Zoology* 45, 275–282.

Trainer VL, Moreau E, Baden DG, Catterall WA. 1993. Neurotoxin binding and allosteric modulation at receptor sites 2 and 5 on purified and reconstituted rat brain sodium channels. *J. Biol. Chem.* 268, 17114–17119.

Tompkins L, Gross AC, Hall JC, Gailey DA, Siegel RW. 1982. The Role of Female Movement in the Sexual-Behavior of *Drosophila-Melanogaster*. *Behav Genetics* 12: 295–307.

Vais H, Williamson MS, Devonshire A, Usherwood P. 2001. The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. *Pesticide Management Sciences.* 57:877-888

Vargas V. 1998. Mosquito un enemigo peligroso (Diptera: Culicidae), Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José CR. pp 116 – 127.

Wang, SY, Barile M, Wang GK. 2001. Disparate role of Na<sup>+</sup>channel D2-S6 residues in batrachotoxin and local anesthetic action. *Mol. Pharmacol.* 59, 1100–1107.

Wang, SY, Nau C, Wang GK, 2000. Residues in Na<sup>+</sup> channel D3-S6 segment modulate both batrachotoxin and local anesthetic affinities. *Biophys. J.* 79, 1379–1387.

Wang SY, Wang GK. 1999. Batrachotoxin-resistant Na<sup>+</sup> channels derived from point mutations in transmembrane segment D4-S6. *Biophys. J.* 76, 3141–3149.

Wang SY, Wang GK. 1998. Point mutations in segment I-S6 render voltage-gated Na<sup>+</sup> channels resistant to batrachotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2653–2658.

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

Williamson MS, Denhold I, Bell CA, Devonshire AL. 1993. Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene in the housefly (*Musca domestica*). *Mol Gen Genet* 240:17-22.

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. *Pestic. Biochem. Phys.* 96: 127–131.

Yaicharoen R, Kiatfuengfoo R, Chaeronviriyaphap T, Rongnoparut P. 2005. Characterization of deltamethrin, resistance in field populations of *Aedes aegypti* in Thailand. *J VectEcol*, 30(1):144-150.

Yellen, G., 1998. The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q. Rev. Biophys.* 31, 239–295.

## 11. ANEXO

### Preparación de reactivos para extracción de ADN y PCR

#### 11.1 Buffer de extracción

- 0.584 g de NaCl
- 6.85 g de Sucrosa
- 1.211 g de Tris HCl (9.1pH)
- 1.861 g de EDTA
- 1 g de SDS en 10 ml de agua bidestiladaultrapurificada

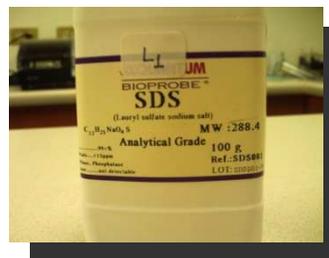
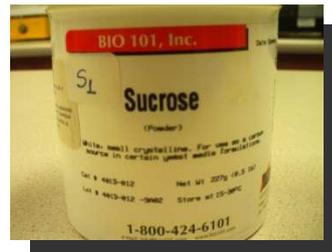


Fig.17. Reactivos para la preparación del buffer de extracción (ADN)

Disolver los primeros cuatro reactivos en 50 ml de agua bidestiladaultrapurificada, después añadir lentamente los 10ml de agua bidestilada con el SDS, disolver lentamente el SDS con los demás reactivos con cuidando de no hacer espuma, después aforar con agua bidestilada hasta llegar a los 100 ml, pasar el buffer por membranas milipore de .22  $\mu\text{m}$ , alícuotar en tubos eppendorf de 2 o 1.5 ml y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 11.2 Buffer TE 1x

- 100  $\mu\text{l}$  de Tris HCl
- 20  $\mu\text{l}$  de EDTA



Fig.18. Reactivos para la preparación de buffer TE 1x

Se mezcla el Tris HCl con el EDTA, después se afora con agua destilada a un volumen de 10 ml, al terminar se autoclavea y se alícuota (se recomienda refrigerar).

### 11.3 Buffer de carga

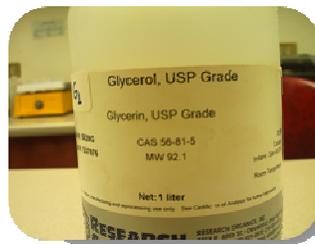


Fig. 19. Glycerol, USP Grade.

Se coloca 30 ml de glicerol y 70 de TBE 1x, después se coloca una pizca de bromofenol azul, se alícuota y se coloca en el refrigerador.

### 11.4 Buffer TBE (Tris/Boric/EDTA) 5x

- 54 g de Tris Ultrapure
- 27.5 g de ácido bórico
- 20 ml de EDTA 0.5 M Ph 8



Fig. 20. Reactivos para utilizados para elaborar buffer TBE

Se colocan el Tris Ultrapure en 500 ml de agua destilada autoclaveada, después de disolverse se coloca el ácido bórico y al final los 20 ml de EDTA, se afora con agua destilada autoclaveada a 1 litro.

Nota: Para evitar la precipitación de sales en el buffer se recomienda hacer 500 ml.

#### 11.5 TBE 1x

Se coloca 160 ml de TBE 5x en un matraz, después se afora a 800 ml con agua destilada autoclaveada.

#### 11.6 Acetato de potasio al 8M



Fig. 21. Acetato de potasio

Tabla VIII. Muestra los gramos de Kac y los ml de agua bidestilada que se deben colocar para obtener una molaridad de 8.

Acetato de potasio Kac Aforar con agua bidestilada autoclaveada	
78.52 g	100 ml
39.26 g	50 ml
19.63 g	25 ml

### 11.7 Alcohol etílico al 70%

Se coloca 70 ml de alcohol etílico (absoluto) y se afora a 100 ml con agua destilada autoclaveada.

Nota: Para utilizar el alcohol etílico al 70 % y al 100% en pruebas de extracción de ADN se recomienda refrigerar.

### 11.8 EDTA 0.5 M Ph 8 (1 litro)

- 186.1 g de EDTA
- 20 a 25 g de NaOH (hidróxido de sodio)



Fig. 22. Reactivos para la elaboración de EDTA pH 8

Se coloca el EDTA poco a poco en 500 ml de agua bidestilada, después se afora a 800 ml de agua, colocar hidróxido de sodio hasta llegar a Ph8, alícuotar y autoclavar.

Nota: Al mezclarse el EDTA con el agua queda de color blanco lechoso, cuando se les va adicionando el hidróxido de sodio poco a poco va cambiando a un color cristalino.

### 11.9 Tris HCl 1M pH 8



Fig. 23. Tris Hydrochloride

Se coloca 121.1 g de Tris Hcl en 800 ml de agua bidestilada, para obtener un Ph de 8 se adiciona HCl absoluto, después se alícuota y se autoclavea.

## **RESUMEN CURRICULAR**

Quetzaly Karmy Siller Rodríguez

Candidato para el Grado de Doctor

En Ciencias Biológicas con acentuación en Entomología Médica.

Campo de estudios: Entomología Médica

### **Datos personales:**

- Dirección: Sabinas Hidalgo, N. L.
- Teléfono móvil : 8113136094
- Correo electrónico : qksr@hotmail.com
- Fecha de nacimiento: 29 de diciembre de 1975
- RFC: SIRQ751229N86
- CURP: SIRQ751229MNLLDT01
- Licencia de Conducir: Chofer N°: 0261-003284
- Cédula Profesional: 4105954

### **Formación Académica**

- Bióloga – 1997 – Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Maestra en Ciencias Biológicas con acentuación en Entomología Médica – 2007 – Facultad de Ciencias Biológicas (Unidad de Posgrado) – Universidad Autónoma de Nuevo León.

## **Formación extra académica**

- Curso de Etología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., febrero de 1997- agosto de 1997.
- Curso de Inglés, Harmon Hall, Galerías, septiembre de 1995 – septiembre de 1997.
- Curso de Motivación Personal, relaciones humanas .INED septiembre de 1998.
- “Taller Teórico – Práctico de Entomología, Programa de Control y prevención De Dengue” Servicios de Salud de Nuevo León Departamento de Zoonosis y Control de Vectores. Mayo 2000.
- Curso Taller de Dengue, Aventis CropsScienceMex. ,14 – 16 mayo del 2001.
- Taller internacional de selección asistida con marcadores moleculares, Universidad Autónoma de Chapingo, del 3 al 5 de diciembre del 2008.

## **Publicaciones**

### *Artículos*

- Año de Publicación: 2010 Volumen: 11 No. de Volumen: 1 Título artículo: PREFERENCIA DE *Aedes aegypti* Y *Culexquinquefasciatus* POR SITIOS DE REPOSO INTRA Y PERIDOMICILIO EN MONTERREY, N. L., MEXICO Tipo de artículo: Revistas Arbitradas Revista Publicación: RESPYN De la página: 0 A la página: 0 Autor:Total Autores: 4 Posición Autor: 1 Lista Autores: Quetzaly K. Siller-Rodríguez, Roberto Mercado-Hernández, Adriana E. Flores-Suárez y Héctor Orta-Pesina

- Año de Publicación: 2010 Volumen: 26 No. de Volumen: 1 Título artículo: THE MOSQUITOES OF QUINTANA ROO STATE MEXICO (DIPTERA: CULICIDAE) Tipo de artículo: Revistas Indizadas Revista Publicación: Acta Zoologica De la página: 33 A la página: 46 Autor: Total Autores: 6 Posición Autor: 5 Lista Autores: Aldo I. ORTEGA MORALES, Pedro MIS AVILA, Armando ELIZONDO-QUIROGA, Ralph E. HARBACH, Quetzaly K. SILLER-RODRÍGUEZ and Ildefonso FERNÁNDEZ-SALAS.
- Año de Publicación: 2009 Volumen: 25 No. de Volumen: 1 Título artículo: FIRST RECORD OF *Culisetamelanura* IN MEXICO, WITH ADDITIONAL MEXICAN RECORDS FOR *Aedes sollicitans* Tipo de artículo: Revistas Indizadas Revista Publicación: Journal of the American Mosquito Control Association De la página: 100 A la página: 102 Autor: Total Autores: 6 Posición Autor: 4 Lista Autores: Aldo I. Ortega-Morales, Armando Elizondo-Quiroga, David A. Gonzalez-Villarreal, Quetzaly K. Siller-Rodriguez, Filiberto Reyes-Villanueva, and Ildefonso Fernandez-Salas
- Año de Publicación: 2009 Volumen: 23 No. de Volumen: 4 Título artículo: PREFERRED RESTING INDOOR AND OUTDOOR PLACES OF *Aedes aegypti* AND *Culex quinquefasciatus* IN MONTERREY, NORTHEAST MEXICO Tipo de artículo: Memorias de congresos Revista Publicación: Journal of the American Mosquito Control Association De la página: 450 A la página: 0 Autor: Total Autores: 5 Posición Autor: 1 Lista Autores: Quetzaly K. Siller-Rodríguez, Aldo Ortega-Morales, Roberto Mercado-Hernández, Adriana E. Flores, and Ildefonso Fernández-Salas

### **Actividad de Investigación**

- Título del trabajo: FREQUENCY OF THE KDR ILE1,016 MUTATION IN *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) IN MEXICO Año: 2011, Nombre del Congreso : AMCA Anaheim 2011, Tipo de Congreso: Extranjero, Tipo de Trabajo: Conferencia Magistral, País: USA
- Título del trabajo: ALTOSID XRG AGAINST *Aedes aegypti* (L.) IN LABORATORY AND OUTDOOR CONDITIONS Año: 2010 Nombre Congreso: 20 Latin American Symposium at the 76th AMCA annual Meeting, Tipo Congreso: Extranjero, Tipo de Trabajo: Conferencia Magistral País: USA

- Título del trabajo: FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN “KDR” ILE1,016 EN *Aedes aegypti* EN CUATRO MUNICIPIOS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN Año: 2010 Nombre Congreso: XIII CONCURSO ESTATAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD 2010 Tipo Congreso: Nacional, Tipo de Trabajo: Poster País: México
- Título del trabajo: KNOCKDOWN RESISTENCE (KDR) ASSOCIATED WITH PERMETHRIN RESISTENCE IN *Aedes aegypti* (L.) FROM GUERRERO STATE OF THE WEST COAST OF MEXICO Año: 2009 Nombre Congreso: 19 Latin American Symposium at the 75th AMCA annual Meeting, New Orleans, Louisiana. Tipo Congreso: Extranjero, Tipo de trabajo: Poster País: USA
- Título del trabajo: MECANISMO DE RESISTENCIA KDR EN *Aedes aegypti* DE NUEVO LEÓN Año: 2009 Nombre Congreso: XII CONCURSO ESTATAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD 2009 Tipo Congreso: Nacional Tipo de Trabajo: Poster País: México
- Título del trabajo: PREFERRED RESTING INDOOR AND OUTDOOR PLACES OF *Aedes aegypti* AND *Culex quinquefasciatus* IN MONTEREY NORTHEAST MEXICO Año: 2007 Nombre Congreso: 17 Latin American Symposium at the 73th AMCA annual Meeting, Tipo Congreso: Extranjero Tipo de Trabajo: Ponencia, País: USA

### **Experiencia Laboral**

- Maestro Catedrático de Física I, II, III, en el Centro de Estudios Universitarios a nivel bachillerato, Unidad Carlos Salazar, febrero de 1998 a diciembre de 1998.
- Técnico en Investigación de invertebrados por proyecto de CONABIO, Laboratorio de Zoología de Invertebrados no Artrópoda, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. agosto de 1999 a diciembre de 1999.
- Entomólogo, Programa de Dengue, Control de Vectores de Secretaria de Salud. Jurisdicción Sanitaria N° 3, Servicios de Salud de Nuevo León, del 2000 al 2003.
- Maestro a nivel medio-superior de Química, Valores, Orientación Vocacional e Inglés en la Preparatoria INSUCO Unidad la Fe Guadalupe N. L. 3er Trimestre del 2006.

- Maestro Catedrático de Metodología de la Investigación y Transformación de Alimentos a nivel Superior en el Instituto Culinario de México de Enero del 2007 a Junio del 2007.