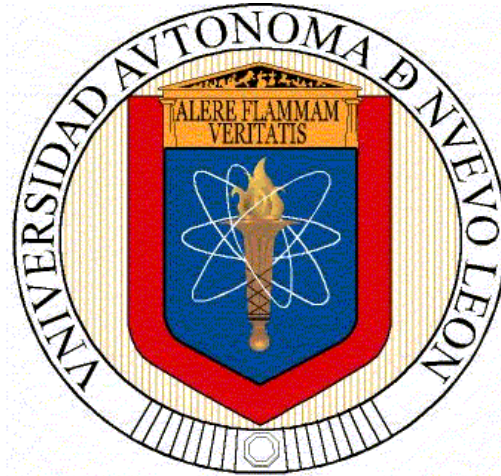


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**“RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN EL MOSQUITO
VECTOR DEL DENGUE AEDES AEGYPTI (L) EN DOS ÉPOCAS
DE TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD EN MÉRIDA,
YUCATÁN.”**

POR

GABRIELA GONZÁLEZ OLVERA

TESIS

**EN OPCIÓN AL GRADO DE DOCTORADO EN CIENCIAS CON
ACENTUACIÓN EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA**

OCTUBRE DE 2013

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
INDICE DE FIGURAS.....	vi
INDICDE DE TABLAS.....	vii
DEDICATORIA.....	xi
AGRADECIMIENTOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPOTESIS.....	4
3. OBJETIVOS.....	5
4. ANTECEDENTES.....	7
4.1 Ae. aegypti: Ciclo Biológico, Importancia como Vector.....	7
4.2 Insecticidas.....	11
4.2.1 Insecticidas Organofosforados.....	14
4.2.2 Modo de Acción de los Organofosforados.....	16
4.2.3 Insecticidas Piretroides.....	16
4.2.4 Modo de Acción de los Piretroides.....	18
4.3 Resistencia y su Detección en una Población: Bioensayos.....	20
4.4 Mecanismos de Resistencia.....	24
4.4.1 Resistencia Metabólica.....	26
4.4.1.1 Carboxil-Estersas.....	26
4.4.1.2 Monoxidasas del Citocromo P-450.....	29
4.4.1.3 Glutation-s-Transferasas.....	30
4.4.2 Resistencia por Sitio Blanco.....	32
4.4.2.1 Acetilcolinesterasa Insensible.....	32
4.4.2.2 Receptores GABA.....	33
4.4.2.3 Canales de Sodio.....	34
4.5 Resistencia a Insecticidas en Vectores.....	36
4.6 Situación Epidemiológica del Dengue en Yucatán.....	43
5. METODO.....	48
5.1 Área de Estudio.....	48
5.2 Material Biológico.....	50
5.2.1 Establecimiento de colonias en el laboratorio.....	50
5.3 Susceptibilidad a temefos en larvas.....	52
5.4 Determinación de la Susceptibilidad a piretroides en adultos de Ae. Aegypti	53
5.4.1 Preparación de botellas.....	54
5.4.2 Bioensayos.....	55
5.5 Mecanismos Enzimáticos de Resistencia.....	57
5.5.1 Prueba α y β -estersas.....	58
5.5.2 Prueba hemo-peroxidasas.....	58
5.2.3 Prueba Glutstion-S-Transferasas.....	58
5.6 Análisis de Resultados.....	59

5.6.1 Dosis, Tiempo-Mortalidad.....	59
5.6.2 Calculo del Factor de Resistencia (FR) en Larvas y Adultos.....	59
5.6.3 Análisis de varianza con diseño de bloques al azar y prueba de Tukey con valores de FRCK50 y FRCL50 mostrados por poblaciones adultas Ae. aegypti de época de secas y lluvias.....	60
5.6.4 Análisis de datos de los mecanismos Enzimáticos de Resistencia....	
6. RESULTADOS.....	62
6.1 Susceptibilidad a temefos.....	62
6.1.1 CL50 para temefos en las poblaciones de Ae. aegypti de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	62
6.2. Susceptibilidad a permetrina.....	65
6.2.1 CK50 para permetrina en las poblaciones de Ae. aegypti de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	65
6.2.2 CL50 para permetrina en las poblaciones de Ae. aegypti de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	67
6.2.3 Tiempo knock-down medio (TCK50) y Tiempo letal medio (TL50) de poblaciones de Ae.aegypti ante permetrina.....	68
6.3. Susceptibilidad a deltametrina.....	70
6.3.1 CK50 para deltametrina en las poblaciones de Ae. aegypti de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	70
6.3.2 CL50 para deltametrina en las poblaciones de Ae. aegypti de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	72
6.3.3 Tiempo knock-down medio (TCK50) y Tiempo letal medio (TL50) ante deltametrina en las diferentes poblaciones de Ae. aegypti.....	74
6.4. Susceptibilidad a fenotrina.....	76
6.4.1 CK50 para fenotrina en las poblaciones de Ae. aegypti de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	76
6.4.2 CL50 para fenotrina en las poblaciones de Ae. aegypti de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	78
6.4.3 Tiempo knock-down medio (TCK50) y Tiempo letal medio (TL50) de poblaciones de Ae.aegypti a fenotrina.....	80
6.5 Análisis de varianza con diseño de bloques al azar y prueba de Tukey con valores de FRCK50 y FRCL50 mostrados por poblaciones adultas Ae. aegypti recolectadas en Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán y correspondientes a época de lluvias y secas del año 2007 al 2010.....	81
6.6 Resultados de pruebas bioquímicas.....	85

6.6.1 Caracterización de mecanismos enzimáticos de resistencia encontrados en larvas de <i>Ae. aegypti</i> (L) que supervivieron a la exposición con CL ₅₀ de temefos, pertenecientes a Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos temporadas climáticas de los años 2007 al 2010.....	85
6.6.1.1 Umbral de resistencia.....	85
6.6.1.2 Análisis y comparaciones de medias.....	87
6.6.2 Caracterización de mecanismos enzimáticos de resistencia encontrados en adultos de <i>Ae. aegypti</i> (L) expuestas a la CL ₅₀ de permetrina, pertenecientes a Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos temporadas climáticas de los años 2007 al 2010.....	89
6.6.2.1 Umbral de resistencia.....	89
6.6.2.2 Análisis de varianza y comparación múltiple de medias.....	91
6.6.3 Caracterización de mecanismos enzimáticos de resistencia encontrados en adultos de <i>Ae. aegypti</i> (L) expuestas a la CL ₅₀ de deltametrina, pertenecientes a Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos temporadas climáticas de los años 2007 al 2010.....	93
6.6.3.1 Umbral de resistencia.....	93
6.6.3.2 Análisis de varianza y comparación múltiple de medias.....	94
6.6.4 Caracterización de mecanismos enzimáticos de resistencia encontrados en adultos de <i>Ae. aegypti</i> (L) expuestos a la CL ₅₀ de fenotrina, pertenecientes a Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos temporadas climáticas de los años 2007 al 2010.....	97
6.6.4.1 Umbral de resistencia.....	97
6.6.4.2 Análisis de varianza y comparación múltiple de medias.....	99
6.6.5 Regresión Línea Simple: valores de CL ₅₀ y medias de absorbancia....	101
6.6.6 Presencia de mecanismos enzimáticos de resistencia de acuerdo a tres criterios: criterio de Montella et al. 2007, comparación múltiple de medias y regresión lineal simple con CL ₅₀ -valores medios de absorbancia.....	104
7. DISCUSION.....	108
8. CONCLUSION.....	119
9. LITERATURA CITADA.....	120
RESUMEN BIOGRAFICO.....	156

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Cronología del descubrimiento de insecticidas.....	13
2. Estructura química del temefos.....	15
3. Patrones de resistencia cruzada.....	21
4. Casos de dengue clásico y dengue hemorrágico presentados en el estado de Yucatán del año 2008 al 2013.....	46
5. Área de estudio, Poblado de Chuburná de Hidalgo, Zona metropolitana de la ciudad de Mérida, Yucatán.....	49
6. Bolsas Whirl-Pak Nasco® para transporte de larvas.....	50
7. Charolas de plástico para cría de larvas.....	51
8. Vasos con papel filtro para recolectar huevos.....	52
9. Recipientes con 99ml de agua deionada correctamente etiquetados para la realización de bioensayo en larvas.....	53
10. Material necesario para impregnar las botellas.....	55
11. Mosquitos aspirados y transferidos a las botellas.....	55
12. Cámaras de recuperación.....	56
13. Concentración letal media (CL50), de las diferentes poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> a temefos.....	64
14. Concentración knock-down media (CK50), de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> a permetrina.....	66
15. Concentración letal media (CL50), de las diferentes poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> a permetrina.....	68
16. Concentración knock-down media (CK50), de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> a deltametrina.....	71
17. Concentración letal media (CL50), de las diferentes poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> a deltametrina.....	73
18. Concentración knock-down media (CK50), de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> a fenotrina.....	77
19. Concentración letal media (CL50), de las diferentes poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> a fenotrina.....	80
20. Valores medios de absorbancia en larvas <i>Ae. aegypti</i> (L.) de la cepa susceptible New Orleans y Chuburná de Hidalgo en la Ciudad de Mérida, Yucatán, que sobrevivieron a la exposición con temefos, correspondientes a	

	dos épocas del año, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	88
21.	Valores medios de absorbancia en adultos <i>Ae. aegypti</i> (L.) de la cepa susceptible New Orleans y Chuburná de Hidalgo en la Ciudad de Mérida, Yucatán, que sobrevivieron a la exposición con permetrina, correspondientes a dos épocas del año, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	92
22.	Valores medios de absorbancia en adultos <i>Ae. aegypti</i> (L.) de la cepa susceptible New Orleans y Chuburná de Hidalgo en la Ciudad de Mérida, Yucatán, que sobrevivieron a la exposición con deltametrina, correspondientes a dos épocas del año, secas y lluvias del año 2007 al 2010...	98
23.	Valores medios de absorbancia en adultos <i>Ae. aegypti</i> (L.) de la cepa susceptible New Orleans y Chuburná de Hidalgo en la Ciudad de Mérida, Yucatán, que sobrevivieron a la exposición con fenotrina, correspondientes a dos épocas del año, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	100

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Descripción de insecticidas piretroides utilizados.....	54
2. Valores de CL50 para temefos en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de Chuburná de Hidalgo, en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias de los años 2007 al 2010.....	63
3. Valores de CK50 en µg/botella de permetrina sobre adultos de <i>Ae. aegypti</i> de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	65
4. Valores de CL50 en µg/botella de permetrina sobre adultos de <i>Ae. aegypti</i> de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	67
5. Valores de TCK50 y TL50 en horas y minutos obtenidos para cada población de <i>Ae. aegypti</i> ante permetrina.....	69
6. Valores de CK50 en µg/botella de deltametrina sobre adultos de <i>Ae. aegypti</i> de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	70
7. Valores de CL50 para deltametina en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de Chuburná de Hidalgo, en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	72
8. Valores de TCK50 y TL50 en horas y minutos obtenidos para cada población de <i>Ae. aegypti</i> ante deltametrina.....	75
9. Valores CK50 en µg/botella de fenotrina sobre adultos de <i>Ae. aegypti</i> de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	76
10. Valores de CL50 para fenotrina en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de Chuburná de Hidalgo, en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.....	79
11. Valores de TCK50 y TL50 en horas y minutos obtenidos para cada población de <i>Ae. aegypti</i> ante fenotrina.....	81
12. Análisis de varianza con valores de FRCK50 mostrados por poblaciones adultas de <i>Ae. aegypti</i> pertenecientes a época de lluvias y secas del año 2007 al 2010.....	82
13. Tabla de medias de Prueba de Tukey con valores de FRCK50 mostrados por poblaciones adultas de <i>Ae. aegypti</i> pertenecientes a época de lluvias y secas del año 2007 al 2010.....	83
14. Análisis de varianza con valores de FRCL50 mostrados por poblaciones	

	adultas de <i>Ae. aegypti</i> pertenecientes a época de lluvias y secas del año 2007 al 2010.....	83
15	Tabla de medias de Prueba de Tukey con valores de FRCL50 mostrados por poblaciones adultas de <i>Aedes. aegypti</i> pertenecientes a época de lluvias y secas del año 2007 al 2010.....	84
16	Porcentaje de individuos <i>Ae. aegypti</i> (L) que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans al tener selección previa con temefos.....	86
17	Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas mediante análisis de varianza, utilizando absorbancias mostradas por mosquitos <i>Ae. aegypti</i> (L.) que sobrevivieron a la exposición con temefos y comparación de medias con respecto a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$)....	87
18	Porcentaje de adultos <i>Ae.aegypti</i> (L.) que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans al tener selección previa con permetrina.....	90
19	Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas mediante análisis de varianza, utilizando absorbancias mostradas por mosquitos <i>Ae. aegypti</i> (L.) que sobrevivieron a la exposición con permetrina y comparación de medias con respecto a la cepa de referencia New Orleans. (Prueba Tukey $p \leq 0.05$).....	91
20	Porcentaje de adultos <i>Ae.aegypti</i> (L.)que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans al tener selección previa con deltametrina.....	94
21	Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas mediante análisis de varianza, utilizando absorbancias mostradas por mosquitos <i>Ae. aegypti</i> (L.) que sobrevivieron a la exposición con deltametrina y comparación de medias con respecto a la cepa de referencia New Orleans. (Prueba Tukey $p \leq 0.05$).....	95
22	Porcentaje de adultos <i>Ae.aegypti</i> que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans al tener selección previa con fenotrina.....	98
23	Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas mediante análisis de varianza, utilizando absorbancias mostradas por mosquitos <i>Ae. aegypti</i> (L.) que sobrevivieron a la exposición con fenotrina y comparación de medias con respecto a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$).....	99
24	CL ₅₀ , valores medios de absorbancia de enzimas y coeficiente de determinación de poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> que supervivieron a la exposición con permetrina.....	102
25	CL ₅₀ , valores medios de absorbancia de enzimas y coeficiente de determinación de poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> que supervivieron a la	

	exposición con a deltametrina.....	102
26	CL ₅₀ , valores medios de absorbancia de enzimas y coeficiente de determinación de poblaciones de Ae. aegypti que sobrevivieron a la exposición con fenotrina.....	103
27	CL ₅₀ , valores medios de absorbancia de enzimas y coeficiente de determinación de poblaciones de Ae. aegypti que sobrevivieron a la exposición con temefos.....	103
28	Tres criterios para definir la presencia de mecanismos enzimáticos en adultos de Ae. aegypti seleccionados con permetrina.....	104
29	Tres criterios para definir la presencia de mecanismos enzimáticos en adultos de Ae. aegypti seleccionados con deltametrina.....	105
30	Tres criterios para definir la presencia de mecanismos enzimáticos en adultos de Ae. aegypti seleccionados con fenotrina.....	106
31	Tres criterios para definir la presencia de mecanismos enzimáticos en larvas de Ae. aegypti seleccionadas con temefos.....	107

DEDICATORIA

A mi padre Sr. Ruben González González.

A mi madre Sra. Gabriela Olvera Navarro.

A mis Hermanos Rubén Yurieli, José Roberto y familias.

Mi mayor bendición y mejores amigos, mi familia. Mis Padres y guías de vida, les expreso mi agradecimiento infinito, siempre dispuestos a todo, gracias por su inagotable amor, su apoyo incondicional me ha nutrido el alma y me han hecho fuerte en los momentos más débiles. Papí, nadie como tu, tu amor y apoyo en todos los aspectos han hecho posible mis logros. Mamí, mi ángel precioso, mi gurú de vida. Con todo mi corazón, GRACIAS. Continuaremos cosechando éxitos, los amo profundamente.

Dios gracias por mostrarme que todo es posible bajo Tu nombre, por enseñarme el camino de la sabiduría y la felicidad, saber de ti le da sentido a todo. Como hasta este instante, ilumina mi camino siempre.

AGRADECIMIENTOS

Basta un poco de espíritu aventurero para estar siempre satisfechos, pues en esta vida, gracias a Dios, nada sucede como deseábamos, como suponíamos, ni como teníamos previsto. Dios nos dio la capacidad de dormir y soñar, y no es para que se quede solo en sueños, es para cuando despiertes te levantes con más ánimo y digas lo voy a conseguir.

N.C. & J.G.A.M.

Mi más sincero agradecimiento y aprecio a la Dra. Adriana E. Flores Suárez, por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio, por su amistad, confianza, apoyo e infinita paciencia.

Dra. Susana Favela Lara por su amistad y empatía, porque sus consejos han sido clave y fortaleza para continuar lo emprendido. Gracias.

Al Dr. Gustavo Ponce García, por su amistad y asesoramiento durante mi estancia en el posgrado.

A mis amigos, todos son una extensión de mi familia, gracias por aguantar mis ausencias, gracias por estar en las buenas y no tan buenas. Los quiero.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

RESUMEN

La ciudad de Mérida, Yucatán cuenta con estaciones climáticas anuales bien definidas, lluvias y secas, propiciando el desarrollo del mosquito *Aedes aegypti*, vector del virus dengue. El aumento en el número de mosquitos trae consigo el extensivo uso del control químico, con periodos prolongados de una misma molécula insecticida contra la fase aérea y acuática del mosquito, favoreciendo el desarrollo de resistencia a los mismos. Por lo anterior, se determinó la susceptibilidad de adultos *Ae. aegypti* a permetrina, deltametrina, fenotrina, y de larvas al temefos. Se caracterizaron los mecanismos enzimáticos de resistencia en poblaciones de *Ae. aegypti* de Mérida, Yucatán, recolectadas en época de lluvias (año 2007 y 2009) y secas (año 2007, 2008, 2009 y 2010). Para los bioensayos con larvas se usó la metodología de la OMS (1981). Para los adultos se utilizó la técnica de botella impregnada (Brogdon y McAllister 1998) con la cual se determinaron los parámetros de: concentración knockdown media CK_{50} , concentración letal media CL_{50} , tiempo knockdown medio TK_{50} y tiempo letal medio TL_{50} . Se utilizó la técnica de Brogdon et. al. (1997a, 1998b) para determinar enzimas detoxificativas. Las poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* mostraron alta resistencia al temefos, tanto las poblaciones de época de secas del 2007(38X), 2008(18.4X), 2009(20X), 2010(19X), como lluvias del 2007 (18X) y 2009(19.6X). Todas las poblaciones de adultos de *Ae. aegypti*, mostraron alta resistencia al derribo a la permetrina (secas 2007-12.5X, 2008-18.3X, 2009-19.6X y 2010-30.4X, lluvias 2007-20.2X y 2009-20.8X) y fenotrina (secas 2007-37.5X, 2008-182.2X, 2009-173.6X y 2010-178.4X, lluvias 2007-43.9X y 2009-180.1X). En todas las poblaciones también se encontró alta resistencia post-recuperación con permetrina (época de secas 2007-25X, 2008-30X, 2009-30.8X, 2010-44X, época de lluvias 2007-31X y 2009-31.4X) y fenotrina (época de secas 2007-41X, 2008-158X, 2009-220X y 2010-229X, época de lluvias 2007-50X y 2009-226X). Con deltametrina se encontró variación en la resistencia, mostrándose poblaciones con resistencia alta a moderada al derribo (época de secas 2007-21.6X, 2008-8.2X, 2009-12X, 2010-9.7X, época de lluvias 2007-10.2X, 2009-10.2X). Lo mismo con la resistencia post-recuperación (época de secas 2007-33X, 2008-8X, 2009-9.5X, 2010-8.5X y lluvias 2007-9.5X, 2009-9X). Los niveles de resistencia al derribo y post-recuperación exhibidos por las poblaciones adultas de *Ae. aegypti* correspondientes a la época de lluvias fueron significativamente diferentes a los niveles presentados por las poblaciones de adultos de las épocas de secas. La presencia de enzimas de resistencia fue variable en las poblaciones, las enzimas α -esterasas se presentaron elevadas significativamente en los mosquitos expuestos a permetrina y temefos, α y β -esterasas en mosquitos expuestos a deltametrina, α -esterasas y oxidasas de función múltiple en mosquitos expuestos a fenotrina. Al no encontrar correlación entre la variación de la susceptibilidad de las poblaciones de una temporada a otra y los mecanismos enzimáticos de resistencia encontrados como alterados, no pueden relacionarse llevando a cabo una función detoxificativa, por lo que es posible que se encuentren realizando otra función. Los resultados sugieren que las poblaciones estudiadas han estado sometidas a una fuerte presión de selección en el campo, resultado de una aplicación continua de temefos por más de 30 años y permetrina por más de 10 años, aunado al efecto de insecticidas aplicados para el control de plagas agrícolas y otras plagas urbanas.

ABSTRACT

The city of Merida, Yucatan has well-defined annual seasons, rainy and dry, facilitating the development of *Aedes aegypti*, vector of dengue virus. The increase in number of mosquitoes result in extensive use of chemical control over a long period of time against larvae and adult stages, favouring the development of insecticide resistance. We determined the susceptibility of adults of *Ae. aegypti* to permethrin, deltamethrin, phenothrin, and larvae to temephos. Enzymatic mechanisms of resistance were characterized in *Ae. aegypti* from Merida, Yucatan, collected in rainy season of 2007 and 2009, and dry season of 2007, 2008, 2009 and 2010. Larval bioassays were carried out using the WHO (1981) method. Bottle bioassays were done to determinate adult susceptibility (Brogdon and McAllister 1998), calculating: median knockdown concentration (CK₅₀), median lethal concentration (LC₅₀), median knockdown time (TK₅₀) and median lethal time (TL₅₀). Brogdon et. al. (1997a, 1998b) technique was used to determine detoxificative enzymes. Larval populations of *Ae. aegypti* showed high resistance levels to temephos, in both dry season of 2007 (38X), 2008 (18.4X), 2009 (20X), 2010 (19X) and rainy season of 2007 (18X) and 2009 (19.6X). Adult populations of *Ae. aegypti*, showed high levels of knockdown resistance to permethrin (dry season 2007-12.5X, 2008-18.3X, 2009-19.6X y 2010-30.4X, rainy season 2007-20.2X y 2009-20.8X) and phenothrin (dry season 2007-37.5X, 2008-182.2X, 2009-173.6X y 2010-178.4X, rainy season 2007-43.9X y 2009-180.1X). All populations showed high post-recovery resistance to permethrin (dry season 2007-25X, 2008-30X, 2009-30.8X, 2010-44X, rainy season 2007-31X y 2009-31.4X) and phenothrin (dry season 2007-41X, 2008-158X, 2009-220X y 2010-229X, rainy season 2007-50X y 2009-226X). Populations showed levels of knock-down resistance to deltamethrin high to moderate (dry season 2007-21.6X, 2008-8.2X, 2009-12X, 2010-9.7X, rainy season 2007-10.2X, 2009-10.2X). The same with post-recovery resistance (dry season 2007-33X, 2008-8X, 2009-9.5X, 2010-8.5X, and rainy season 2007 9.5X, 2009-9X). Knock-down and post-recovery resistance levels exhibited by *Ae. aegypti* adult populations corresponding to rainy season were significantly different from dry season. α -esterases enzymes were significantly elevated in mosquitoes exposed to permethrin and temephos, α and β -esterases in mosquitoes exposed to deltamethrin, α -esterases and multiple function oxidases in mosquitoes exposed to phenothrin. In examining the association between the LC₅₀ values and over-expressed enzyme levels in surviving populations from one season to another, there were no significant correlation values thereby no fulfilling the criteria proposed to associate an enzyme mechanism with resistance to insecticide. The results suggest that the studied populations have been subject to strong selection pressure in the field, result of continuous application of temephos for over 30 years and permethrin for over 10 years, coupled with the effect of insecticides applied to agricultural and urban pests.

1. INTRODUCCION

El dengue se ha considerado en años recientes la enfermedad transmitida por vectores más importante a nivel mundial (OMS, 2012). En nuestro país, la prevención y control del mosquito vector del dengue *Aedes aegypti* (L.) ha tomado relevancia, considerándosele uno de los programas prioritarios en salud pública. Las estrategias básicas de prevención están enfocadas al control del vector y éstas se fundamentan en la bionomía del mosquito.

En México como en otros países el control de vectores transmisores de enfermedades se ha hecho basado principalmente en el uso de insecticidas, ejemplo de esto es el DDT, el cual fue usado indiscriminadamente en la década de los 60's para el control de la malaria, eventualmente se siguieron utilizando otros insecticidas como malatión como adulticida y temefos como larvicida. Para el control de *Ae. aegypti* se utilizó hasta 1999 el malatión como adulticida en aplicaciones espaciales ULV y en presentación de gránulo el temefos como larvicida sobre contenedores de agua que pudieran representar criaderos para las larvas de *Ae. aegypti* (Fernández 1999), siendo hasta la fecha el uso de este último interrumpido. A partir de 1999 el principal insecticida utilizado en México para control del mosquito adulto *Ae. aegypti* fue la permetrina junto con el sinergista piperonil butóxido en una formulación acuosa (Aquareslin ®) (Norma Oficial Mexicana, S.S.A 2002), usándose por más de 10 años consecutivos. El primero de junio del 2011 una nueva versión de la norma de control de vectores fue publicada (NOM-032-SSA2-2010), la misma establece las características que los insecticidas deben tener para el control de mosquitos vectores en México, sin

especificar cuáles insecticidas deben usarse pero uno de los puntos importantes es que la población sobre la cual se aplicará no exhiba resistencia a los mismos.

La aplicación de plaguicidas constituye una poderosa fuerza evolutiva, al permitir la sobrevivencia de aquellos individuos que poseen una o varias características fenotípicas de resistencia y éstos heredan esa capacidad a sus descendientes. Por tal motivo, podemos afirmar que el uso correcto de un plaguicida efectivo sobre una población susceptible, produce cambios génicos, genotípicos y fenotípicos que se traducen tarde o temprano en la falta de control en campo a la dosis empleada (Rodríguez, 2005). La resistencia a insecticidas puede deberse principalmente al incremento en la actividad metabólica y/o alteraciones en el sitio blanco. Tres familias de enzimas están mayormente involucradas en la resistencia metabólica: las carboxilesterasas, las monoxidasas del citocromo P450 y las glutatión-s-transferasas (GST) cuya amplificación genética es inducida en los organismos por exposición a los insecticidas pudiendo generar resistencia a la mayoría ellos (Hemingway y Ranson, 2000). Por otro lado, mutaciones puntuales en el gen que codifica para el canal del sodio han sido descritas y asociadas con la resistencia a DDT y piretroides en *Ae. aegypti* (Bregues et al, 2003; Saavedra et al., 2007; Yanola et al., 2011), donde el aminoácido resultante ocasiona una reducción en la unión al insecticida sin pérdida de la función primaria del sitio blanco.

La distribución del dengue obedece a determinantes de tipo geográficos, que condicionan su aparición e incidencia estacional, su afección universal a grupos humanos, al vector y a su patrón de transmisión (CDC, 1995). La ciudad de Mérida en el estado de Yucatán cuenta con dos estaciones climáticas anuales bien definidas, lluvias y secas, además de fenómenos hidrometeorológicos el resto del año. Lo anterior propicia el desarrollo del mosquito *Ae. aegypti*. El aumento en el número de mosquitos va seguido de un reforzamiento del control químico, eliminando aquellos individuos

susceptibles, sobreviviendo los resistentes y favoreciendo el desarrollo de resistencia a insecticidas.

2. HIIPOTESIS

La presión de selección ejercida en las poblaciones de *Ae. aegypti* en función a dos épocas de transmisión de dengue afectará la magnitud y mecanismos de resistencia a insecticidas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar susceptibilidad y mecanismos de resistencia a temefos, permetrina, deltametrina y fenotrina en poblaciones de *Aedes aegypti* (L.) de dos épocas del año, coincidentes con las temporadas de brote de dengue en Mérida, Yucatán.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

3.2.1 Determinar la concentración letal cincuenta (CL_{50}) para temefos en poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* recolectadas en la localidad de Chuburna de Hidalgo en Mérida, Yucatán correspondientes a época de secas y lluvias de los años 2007 al 2010.

3.2.2 Determinar el nivel de resistencia al temefos (FR_{CL50}) en poblaciones larvarias de *Ae. aegypti*.

3.2.3 Determinar la CK_{50} , TK_{50} y CL_{50} y TL_{50} para permetrina, deltametrina y fenotrina en adultos *Ae. aegypti* recolectadas en la localidad de

Chuburna de Hidalgo en Mérida, Yucatán correspondientes a época de secas y lluvias de los años 2007 al 2010.

3.2.6 Determinar el nivel de resistencia al derribo (knockdown) FR_{DK50} y post-recuperación FR_{CL50} a permetrina, deltametrina y fenotrina

3.2.7 Caracterizar mecanismos enzimáticos de resistencia asociados a temefos, permetrina, deltametrina y fenotrina recolectadas en la localidad de Chuburna de Hidalgo en Mérida, Yucatán correspondientes a época de secas y lluvias de los años 2007 al 2010.

4. ANTECEDENTES

4.1 *Aedes aegypti*: Biología, importancia como vector y control.

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

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

La etapa adulta consiste en un insecto volador pequeño. Las hembras poseen una probóscis larga, adaptada para succionar sangre a través de la piel. Los machos, por otro lado, presentan una probóscis larga adaptada para succionar jugos de plantas y otras

fuentes de azúcar. En forma general ambos requieren carbohidratos como principal fuente de energía, sin embargo, las hembras dependen de sangre para obtener la energía necesaria para la producción de huevos. Las hembras comienzan la búsqueda de sangre y la principal fuente de atracción son las trazas de dióxido de carbono y ácido láctico emanadas por el hospedero. Las horas con mayor actividad alimenticia, ocurren entre las 6:00 am a 8:00 am y de 4:00 pm a 7:00 pm (Fernández-Salas, 1999). Durante la alimentación, las hembras producen anticoagulantes, antihistamínicos y analgésicos que le permiten ingerir sangre a repleción. Después de la alimentación, las hembras entran en un periodo de reposo y las ovarios comienzan un proceso de oogénesis que después de 3 a 4 días culmina en la oviposición de 50 a 120 huevos.

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

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

Actualmente, *Ae. aegypti* es considerado el principal vector del virus del dengue a nivel mundial, esto se debe a su amplia distribución geográfica, su alto grado de susceptibilidad a infectarse con el virus, así como su cercana asociación con las habitaciones humanas. Este mosquito es considerado completamente antropofílico, más

aún, el hábito de tomar más de una alimentación de sangre durante su ciclo gonotrófico incrementa su capacidad vectorial dramáticamente (Platt et al., 1997). La transmisión del dengue ocurre en forma particular durante los meses del año con más lluvia y altas temperaturas, lo que propicia condiciones necesarias para el desarrollo larval en los hábitats donde se almacena agua (Gubler y Trent, 1994).

El aumento en la actividad de epidemias por dengue, el desarrollo de hiperendemicidad y la emergencia de epidemias por dengue hemorrágico, han sido generados por diversos factores, entre ellos, cambios demográficos y sociales, reducción de recursos para prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores, así como cambios en las estrategias de salud pública (Gubler, 1998a).

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

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

La región de las Américas ha sido una de las más afectadas por el dengue y su forma más grave, la fiebre hemorrágica por dengue. La primera epidemia conocida de dengue en territorio americano ocurrió en el siglo XVIII. A partir de entonces, esta enfermedad ha afectado a casi todos los países de la región, aunque en la actualidad el mayor número de casos se concentra en América Latina y el Caribe. Mientras que la primera gran epidemia de fiebre hemorrágica por dengue en América ocurrió en Cuba en 1981, con miles de enfermos y 158 fallecidos (Kouri, 2006). De 1980 a 1998 se reportaron 302, 330 casos de FHD en 24 países de las Américas, siendo Colombia el país con el mayor número de casos reportados (80, 310), seguido por Brasil (55, 150), Venezuela (54, 514), Puerto Rico (41, 942), Nicaragua (36, 257) y Cuba (10, 517) (Escobar-Mesa et al., 2003).

Actualmente, las campañas de control de *Ae. aegypti* consisten en la eliminación de criaderos de estadios larvarios y en casos de brotes de dengue, la aplicación espacial de insecticidas. Usualmente, la eliminación de pequeños utensilios que tienden a acumular agua en los patios de las casas, así como el tratamiento de larvicidas en los contenedores de agua necesarios para las actividades diarias, son realizados durante las campañas de prevención. En México, el principal insecticida utilizado para controlar a los estadios larvarios es el organofosforado temefos (Abate®). La medida de emergencia durante brotes o epidemias de dengue, consiste en la aplicación de insecticidas en nubes de gotas de ultrabajo-volumen (ULV). Los principales insecticidas utilizados para esta finalidad son el organofosforado malatión y varios piretroides, entre ellos, deltametrina, permetrina y lambda-cialotrina.

En México, en los últimos 11 años, los principales insecticidas utilizados para control del mosquito *Ae. aegypti*, han sido el larvicida organofosforado temefos (Abate®) y el adulticida permetrina junto con el sinergista piperonil butóxido (Aquareslin ®) según la norma oficial mexicana para la vigilancia y control de vectores, NOM-032-SSA2-2002 (Diario Oficial de la Federación, México 2003). El 8 de

septiembre del 2008 se publicó una norma emergente, NOM-EM-003-SSA2-2008 que establece las características que deben tener los insecticidas para el control de vectores en México incluyendo *Ae. aegypti* sin especificar que moléculas deben usarse estableciendo que dependerá de la probada efectividad, no resistencia y características de seguridad relacionadas con la exposición (Diario Oficial de la Federación, México 2008).

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

De acuerdo a la Secretaría de Salud, México ocupa el cuarto lugar en la transmisión del dengue hemorrágico en América después de Brasil, Colombia, Venezuela y Honduras, que son los países más afectados en los últimos años. Desde 1994 se han desarrollado brotes de dengue hemorrágico registrándose desde 30 hasta 2000 casos en el 2004, en diferentes estados del país. Actualmente la relación de casos de dengue hemorrágico es 1:4, a diferencia de hace 5 años que era 1:25.

4.2 Insecticidas.

En el siglo XIX ya se conocían los insecticidas naturales para el control de plagas en animales. En el siglo XX es a partir de la década del 40 donde aparecen los pesticidas de síntesis. El más relevante para aquel momento fue el DDT, un insecticida que

pertenece a la familia de los clorados, descubierto por Muller en 1939. El uso de este insecticida trajo aparejado una serie de inconvenientes, ya que no presenta selectividad, se acumula en tejidos grasos del hombre y animales y persiste en el medio ambiente. En estos momentos su uso está restringido y para algunos países prohibido. En Alemania Schrader y otros descubrieron a los compuestos organofosforados, que por su poder insecticida, su metabolismo en animales y su comportamiento bioquímico reemplazan rápidamente a los clorados. Los primeros insecticidas organofosforados fueron muy tóxicos, tal es el caso del paration. En la actualidad los últimos insecticidas fosforados tienen una toxicidad más moderada, son ejemplo de ello el diazinon y el clorpirifos. Si bien no presentan los mismos problemas de persistencia, ni de acumulación en tejidos grasos que tienen los clorados, los insecticidas fosforados deben ser utilizados con cierto control.

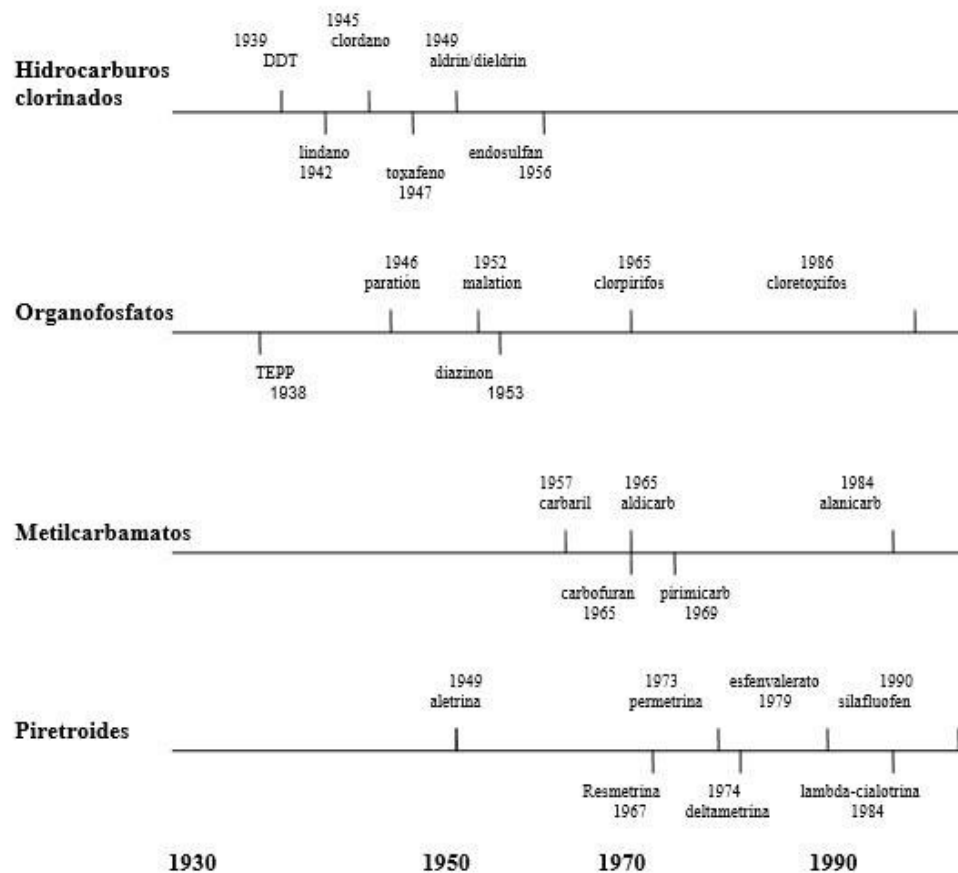


Figura 1. Cronología del descubrimiento de insecticidas.

En conjunción con los fosforados aparecen los insecticidas carbámicos y más comúnmente carbamatos. Los carbamatos por su carácter selectivo, que se logra mediante modificaciones en la estructura del ácido carbámicos pueden ser activos contra algunos insectos e inactivos contra otros. Esta característica hace que el uso de muchos fosforados sea reemplazado por el uso de carbamatos, tales como el propoxur y el bendiocarb.

Un capítulo aparte dentro de esta evolución histórica de los insecticidas es el de los piretroides. En el mundo, desde el año 1850 se utiliza el piretro o su extracto vegetal por su acción insecticida. A partir de la década del 70 del siglo pasado se sintetizan los piretroides (piretrinas sintéticas). Estos son insecticidas de tercera generación, con una acción análoga a la de las piretrinas.

Los piretroides históricamente se los puede clasificar en dos grandes categorías:

- a. Piretroides foto lábiles: se descomponen por acción de la luz y la temperatura muy rápidamente, por lo tanto su uso está restringido en general a aplicaciones domesticas (aerosoles, espirales, mats). Son ejemplo de este grupo la aletrina y la resmetrina.
- b. Piretroides fotoestables: se caracterizan por ser más estables a la acción de la luz y temperatura, esto ha permitido que sean utilizados en aplicaciones residuales, en tareas de saneamiento ambiental (ej. deltametrina, ciflutrina, etc.)

Los piretroides son químicamente esteres, es decir que surgen de la combinación de ácido y un alcohol. Presentan una alta potencia insecticida (para algunas especies) junto con una gran seguridad toxicológica. Por su estructura química los piretroides son degradados con facilidad por los diferentes organismos. Las principales reacciones de degradación son la hidrólisis del grupo éster, oxidación, descarboxilación y conjugación. En suelos y sedimentos se adsorben fuertemente y no se ha demostrado que tengan tendencia a movilizarse con el agua. Por lo tanto, no persisten en el ambiente por largo tiempo y tampoco tienden a biomagnificarse a través de las redes tróficas (Albert et al. 1990).

4.2.1 Insecticidas Organofosforados.

Los organofosforados son todos aquellos insecticidas químicamente constituidos por ésteres de ácido fosfórico. Son más tóxicos para los vertebrados que los organoclorados y no son persistentes en el ambiente, ya que los enlaces éster son muy susceptibles a la descomposición biótica y abiótica. Dentro de este grupo se encuentran

los insecticidas usados en salud pública, tales como: malatión, fenitrotión, clorpirifos, fentión, temefos, entre otros (Casida and Quistad, 1998). Temefos comúnmente conocido como ABATE® es el insecticida que ha tenido mayor uso en las Américas, particularmente en salud pública para el control larval de *Ae. aegypti*.

El nombre científico del temefos es 0,0,0,0'-tetrametil-0,0'-tio-di-p-fenileno, fórmula empírica $C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$ y Peso molecular: 466.48. Se presenta en cristales blancos o incoloros. Tiene tres presentaciones: líquido al 50%, cápsulas de liberación lenta al 5% y granos de arena al 1%.

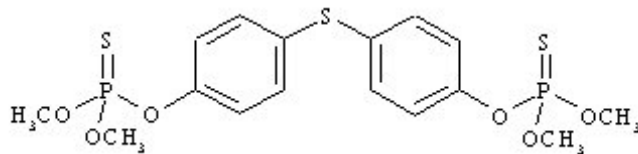


Figura 2. Estructura química del temefos.

Está clasificado como ligeramente peligroso con una dosis letal aguda en conejos de 1.300 mg/kg. Los seres humanos pueden absorber el temefos por inhalación, ingestión, por la piel y por los ojos.

Una característica de este insecticida es la baja solubilidad en agua razón, por la cual puede ser aplicado sin riesgos de toxicidad en humanos, sin necesidad de mediciones estrictas del volumen de los recipientes tratados, por lo que es recomendado para aplicarse en aguas de consumo humano por la Organización Mundial de la Salud. La dosis de aplicación generalmente es 1 parte por millón cada seis semanas o 2 partes por millón si la re-aplicación se hace posterior a las seis semanas. La aplicación del temefos se efectúa en recipientes positivos a larvas como una medida preventiva básica con periodicidad bimestral y en situaciones de emergencia o brotes, previo a estudios entomológicos evaluados con criterios operativos de control.

4.2.2 Modo de acción de los organofosforados.

Estos insecticidas ejercen su acción tóxica a nivel del sistema nervioso inhibiendo la enzima acetilcolinesterasas, dando como resultado la acumulación de acetilcolina (ACh), lo cual interfiere con la transmisión neuromuscular provocando una sobreexcitación de los músculos voluntarios y finalmente la parálisis.

4.2.3 Insecticidas piretroides.

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

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

para controlar plagas), y por su baja toxicidad para los mamíferos. Los primeros piretroides con actividad insecticida adecuada eran la resmetrina y cismetrina, sin embargo eran inestables en el ambiente. En la década de 1970 se logró la síntesis de otros piretroides, entre ellos: la fenotrina, permetrina y deltametrina. Los piretroides son compuestos lipofílicos, insolubles en agua, de estabilidad variable ante la luz o calor, son degradables fácilmente por los microorganismos. Por la variedad de sus estructuras, los piretroides pueden variar considerablemente en sus propiedades (Albert et al. 1990). Los piretroides para su clasificación han sido colocados en cuatro categorías o generaciones. La primera generación contiene solo un piretroide: la aletrina. Comercialmente disponible en 1949, marcó el comienzo de una era de síntesis complejas, involucrando más de 22 reacciones químicas para producir un insecticida; la aletrina es meramente un duplicado de la cinerina I (un componente del piretro), con un lado en la cadena más estable y más persistente que el piretro. Igualmente efectivo contra moscas y mosquitos, pero menos efectivo contra cucarachas y otros insectos. La segunda generación incluye tetrametina. La cual apareció en 1965; esta poseía una fuerza más grande de derribo que la aletrina y era fácilmente sinergizada.

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

de este periodo fue la fenotrina, introducida en 1973, también es intermedia en cuanto a calidad y ligeramente incrementado por sinergistas. La tercera generación incluye fenvalerato y permetrina, los cuales aparecieron en 1972 y 1973, respectivamente. Estos se convirtieron en los primeros piretroides agrícolas debido a su actividad insecticida excepcional y su foto estabilidad. Al parecer no son afectados por la luz solar y son residuales de 4-7 días sobre las hojas de los cultivos. La cuarta generación aún sigue en desarrollo y registro, en esta generación los porcentajes de aplicación se han reducido en comparación a la generación anterior. Ejemplos de insecticidas piretroides de cuarta generación son la cipermetrina, fenopropatrina, flucitrinato, fluvalinato y decametrina. Todos estos insecticidas son fotoestables y proveen efectividad residual en el campo (Bowman et al. 2004).

4.2.4 Modo de acción de los piretroides.

Los piretroides interfieren con las funciones del sistema nervioso y actúan sobre el axón en los sistemas central y periférico mediante la interacción con los canales de sodio y/o desplazando al ácido kainico de sus uniones específicas en los mamíferos y en los insectos. A semejanza de las piretrinas, bloquean los impulsos nerviosos en el nivel de su transmisión final. Los efectos de estos compuestos pueden ser de cuatro tipos:

I. Sobre-excitación nerviosa sin contracciones musculares, se cree que esta etapa los efectos son sobre los nervios sensoriales. II. Afección de los nervios motores que, en consecuencia presentan excitaciones sucesivas las que causan contracciones musculares III. Contracciones musculares de larga duración (30 – 60 segundos) que se deben quizá a efectos directos de los piretroides sobre los músculos. IV. Obstrucción total de los impulsos nerviosos.

La muerte puede sobrevenir a causa de la combinación de dos o más de estos mecanismos o de la sucesión de los cuatro. Estudios sobre la interacción de los piretroides con las células nerviosas de los insectos han demostrado que al inicio estos

compuestos estimulan cargas repetidas en dichas células y después las paralizan. La membrana de las células nerviosas es el sitio en donde los piretroides causan mayor efecto; en condiciones normales, la célula nerviosa restablece el equilibrio mediante procesos fisicoquímicos que regulan la relación sodio-potasio; sin embargo, se ha establecido que la presencia de piretroides bloquea la conductividad de estos cationes y provoca parálisis nerviosa en los insectos intoxicados (efecto de derribo o Knockdown). Con base a los síntomas de su toxicidad, recientemente los piretroides se han clasificado en dos grupos: de Tipo I y de Tipo II (Albert et al. 1990). Los signos típicos de intoxicación por los piretroides del Tipo I incluyen hiperexcitabilidad y convulsiones, mientras que los piretroides del Tipo II causan principalmente ataxia y descoordinación. En insectos, los efectos de los piretroides, especialmente los del Tipo I, pueden desarrollarse en 1-2 minutos después del tratamiento y pueden resultar en la caída, es decir, en la pérdida de la postura normal y de la locomoción. La intoxicación con piretroides resulta de sus potentes efectos sobre la generación de impulsos nerviosos tanto dentro del sistema nervioso central como del periférico. En condiciones normales, las neuronas poseen un voltaje que traspasa las membranas, de unos -60mV, en el lado interno. El impulso nervioso o potencial de acción consiste en una despolarización transitoria (onda positiva) cuya onda de ascenso es impulsada por un influjo de iones Na⁺, seguidos por un descenso del flujo hacia afuera de iones K⁺, estos flujos de iones ocurren debido a la apertura y cierre de canales iónicos de proteínas que están empotradas dentro de la membrana nerviosa. El potencial de acción se propaga a lo largo del axón hasta que llega a las terminales nerviosas, donde estimula la liberación de los transmisores químicos. Los compuestos del Tipo I inducen picos múltiples de las descargas en los nervios sensoriales periféricos y de los nervios motores, lo mismo que las interneuronas dentro del sistema nervioso central. En contraste, los piretroides del Tipo II despolarizan el potencial de las membranas de los axones, lo cual reduce la amplitud del potencial de acción y eventualmente lleva a la pérdida de excitabilidad

eléctrica. Todos estos efectos ocurren porque los piretroides prolongan la corriente que fluye por los canales de sodio al hacer más lento o impedir el cierre de los canales. La sinapsis neuromuscular de los insectos es un blanco especialmente importante para los piretroides (Blomquist, 2003). Sin embargo a pesar del éxito de este grupo de insecticidas y de que sólo se ha autorizado un número reducido de piretroides, ya se han registrado casos de resistencia en campo y laboratorio.

4.3 Resistencia y su detección en una población: bioensayo.

John Smith en 1887 reconoció la susceptibilidad diferencial de los insectos a productos químicos, dando la noticia acerca de variaciones en el control de la escama de San José *Aspidiotus perniciosus* Comstock (Lagunes, 1974). Sin embargo el primer dato formal sobre resistencia en insectos lo proporcionó Melander en 1914, registrando el fracaso del sulfuro de calcio al no controlar dicha escama. A partir de entonces se han conocido muchos casos similares, donde cualquier organismo puede generar resistencia a infinidad de plaguicidas bajo condiciones adecuadas (Georghiou, 1971). Es entonces cuando surge el concepto de resistencia a insecticidas, el cual es complejo y controvertido, pues es un fenómeno muy relativo (Brattsten, 1989). Existen varias definiciones sobre resistencia, como la que da Brown en 1941, quien la definió como el desarrollo de una habilidad adicional de una raza de insectos a tolerar dosis de tóxicos que son letales para la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie.

También se ha definido como la capacidad natural que existe en determinadas poblaciones de insectos de soportar la acción de un veneno. La definición más aceptada en la actualidad es la propuesta por la FAO (1979) que enmarca a la resistencia como la capacidad desarrollada por una población determinada de insectos a no ser afectada por la aplicación de insecticidas. Técnicamente se define como la habilidad complementaria y hereditaria propia de un individuo o conjunto de ellos, que los capacita fisiológica y

etiológicamente, 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. Existen otros términos sobre resistencia, tal es el caso de “Resistencia Cruzada” (Georghiou, 1965) la cual se define como el fenómeno por el cual una población de artrópodos, sometida a presión de selección con un plaguicida, adquiere resistencia a este y a otros insecticidas relacionados toxicológicamente que han sido aplicados, pero que son afectados, al menos, por un mecanismo de resistencia común (figura 4). De este último concepto se desprende el término de “Resistencia Cruzada Negativa”, la cual se presenta cuando una población que ha adquirido resistencia a un insecticida, regresa a una susceptibilidad cercana a la original, como consecuencia de la aplicación de otro insecticida que es toxicológicamente diferente (Lagunes, 1994). Otra forma de resistencia es la múltiple, la cual se presenta en una población que ha adquirido resistencia a varios insecticidas, tanto ha insecticidas a los cuales se haya expuesto como a los que no haya sido expuesto. En este caso, la población posee varios mecanismos de resistencia de forma simultánea (Georghiou, 1965).

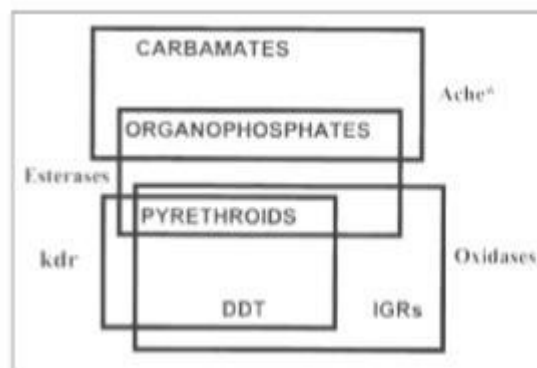


Figura 3. Patrones de resistencia cruzada.

Los genes de los principales sitio blancos: canales de sodio (para), receptores del ácido amino-butírico (GABA) y acetilcolinesterasa (AchE), han sido clonados y sus

secuencias han sido comparadas entre insectos resistentes y susceptibles. Algunas mutaciones han sido asociadas con resistencia a insecticidas, aunque en muchos casos no se ha elucidado el mecanismo de resistencia a nivel molecular.

La resistencia se ha detectado mediante la utilización de pruebas de susceptibilidad a insecticidas, conocidas también como bioensayos, basados principalmente en pruebas de dosis-mortalidad. El bioensayo es considerado como cualquier método por medio del cual alguna propiedad de alguna sustancia o material, es medida en términos de la respuesta biológica que produce. Entre los objetivos de mayor importancia al realizar un bioensayo, se encuentran: la determinación de varios tóxicos contra una población de insectos, la determinación de la susceptibilidad de diferentes especies de artrópodos a un tóxico, así como la cantidad de un tóxico en un sustrato. Esta detección en la diferencia de la susceptibilidad se realiza mediante la relación R/S (colonia resistente sobre colonia susceptible) de los valores de CL50, a la que se le denomina “Fracción de resistencia” (FR) ó “Proporción de resistencia” (PR). La FR ó PR permiten comparar dos poblaciones de insectos con base a una dosis de un insecticida, sea esta a nivel de DL50, DL95 o la de interés para el estudio, con la finalidad de conocer cuantas veces es necesario aumentar dicha dosis para alcanzar la mortalidad deseada, con respecto a la considerada como línea base, la cual esta integrada por una población que no ha sido expuesta previamente a insecticidas, de modo que servirá como punto de referencia. Los bioensayos también permiten detectar la homogeneidad genética de la población en su respuesta al tóxico, la cual puede observarse en los valores de la pendiente de la recta de regresión, que es obtenida en el procedimiento del programa Probit (Finney 1971); entre mayor es la pendiente, la población o colonia es genéticamente más homogénea, es decir, que poseen los mismos genes de resistencia y está en las mismas proporciones en los individuos. Los mecanismos participantes en la resistencia de una población, también pueden ser identificados indirectamente en los bioensayos, esto es mediante la utilización de

sustancias sinergistas, es decir, sustancias que se unen a las enzimas que ocasionan la resistencia, por lo que permiten actuar libremente a los tóxicos, hecho que queda reflejado en los valores de susceptibilidad en los insectos resistentes (Lagunes, 1994).

Existen dos tipos de bioensayos, aquellos denominados directos y los denominados indirectos. Los bioensayos directos consisten en la aplicación de una dosis única a un animal, o el incremento del estímulo en un período de tiempo; y los bioensayos indirectos consisten en la aplicación de una dosis a una muestra representativa de la población, de manera que los resultados son atribuidos a la población de donde ese extrajo la muestra. Los bioensayos para la detección de resistencia a insecticidas en mosquitos adultos han estado basados en un método estandarizado recomendado por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1981), el cual consiste en exponer mosquitos susceptibles a papeletas impregnadas con una dosis diagnóstico de un insecticida dado, por un período de tiempo definido, esta dosis era dos veces experimentalmente derivada del 100% del valor de concentración letal (CL100). Sin embargo esta metodología llegó a tener un costo económico elevado y muchas papeletas impregnadas con cierto tipo de insecticidas no estaban disponibles, además de que las dosis diagnóstico disponibles no aplicaban a todas las especie de vectores. Fue entonces hasta los años 90 cuando Brogdon y sus colaboradores logran cambiar el protocolo original, utilizando botellas de vidrio impregnadas con soluciones de un grado estándar del insecticida en lugar de las papeletas impregnadas. La ventaja de este procedimiento es que se obtiene una respuesta toxicológica directa de un insecto a una dosis de insecticida dado, además el método provee resultados considerablemente más rápidos al propuesto por la OMS, identificando el mecanismo involucrado en los cambios de susceptibilidad, pues los datos obtenidos son integrados a una serie de pruebas bioquímicas aplicados a la misma población de mosquitos, además de ser mucho más sensible y versátil en cuanto a la capacidad toxicológica en los cambios de la susceptibilidad en las poblaciones (Brogdon,1998).

4.4 Mecanismos de resistencia.

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

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

Por sí sola, la penetración reducida confiere un bajo nivel de resistencia, sin embargo, en combinación con otros mecanismos de resistencia, puede potencializar la resistencia en forma no aditiva. Por otro lado, al disminuir el grado en el cual el insecticida alcanza su sitio blanco, permite que otro mecanismo pueda detoxificar más efectivamente al insecticida.

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

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

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

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

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

individuos resistentes en la ausencia de selección. Este costo en la viabilidad tiene importantes implicaciones en la persistencia de la resistencia en el campo.

4.4.1. Resistencia metabólica

4.4.1.1. Carboxil-Esterasas

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

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

En los insectos resistentes, existe una mayor frecuencia de la interacción esterasa-insecticida, evitando que el insecticida alcance su sitio blanco (la acetilcolinesterasa). Cuando las esterasas están presentes en la misma proporción molar que el insecticida, estas son capaces de secuestrar efectivamente a los insecticidas e hidrolizarlos lentamente (Scott, 1995).

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

espectrofotométricos de homogenizados o tejidos de insectos, o bien, por electroforésis y tinción de geles (Hemingway y Karunaratne, 1998).

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

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

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

En este mosquito, la sobreproducción de enzimas se debe a la amplificación de uno o más genes de esterasas, variando entre 20 a 250 copias en el genoma (Mouches et al, 1990; Callaghan et al, 1998). Existen varios alelos de esterasas asociados con la resistencia, sin embargo, el genotipo más común es la co-amplificación de dos genes de esterasas: *est α* y *est β* . Alrededor del 90% de las poblaciones resistentes de *Culex* presentan un genotipo *est α 2/est β 2* (Coleman et al, 2002) aunque otras combinaciones han sido identificadas, por ejemplo la cepa *Cyprus* tiene entre 40 a 60 copias de los

genes $est\alpha-5$ y $est\beta-5$, mientras que la cepa TEM-R de California solo presenta amplificación en el locus $est\beta-1$. Se ha encontrado muy poca variación en la cinética de inhibición entre los distintos alelos de esterasas, por lo cual la ventaja selectiva del genotipo $est-\alpha 2/est-\beta 2$ podría estar ligada a un tercer gen (aldehído oxidasa) que se co-eleva solamente con este fenotipo (Hemingway et al, 2000b).

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

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

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

4.4.1.2. Monoxidasas del citocromo-P450

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

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

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

En la mayoría de los casos donde se ha correlacionado la actividad elevada de las monoxidasas-P450 con la resistencia a insecticidas, se ha identificado el rol de los genes

Cyp pertenecientes a la familia Cyp6. La enzima CYP6D se sobreproduce en una cepa de *M. domestica* resistente a piretroides debido a la transcripción regulada, por otro lado, la CYP6A se ha asociado con la resistencia a organofosforados en la misma especie (Feyereisen et al, 1995).

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

4.4.1.3. Glutación-s-Transferasas

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

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

Las glutatión-s-transferasas pertenecientes a las clases Delta y Epsilon han sido identificadas en insectos y se han asociado con la resistencia a insecticidas en mosquitos y otras especies. En *Ae. aegypti* al menos dos grupos de GSTs se encuentran en altos niveles en insectos resistentes al DDT (Lumjuan et al, 2005), mientras que en *An. gambiae* un gran número de GSTs se encuentran elevadas y algunas de ellas pertenecen a la clase-1 de GSTs (Ranson et al, 1997).

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

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

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

DDT y algunos de estos genes son regulados para activar el metabolismo en mosquitos resistentes (Enayati et al, 2005).

4.4.2. Resistencia por Sitio Blanco

4.4.2.1. Acetilcolinesterasa insensible

Los organofosforados y carbamatos tienen su sitio blanco en la acetilcolinesterasa (AChE). La AChE hidroliza al neurotransmisor excitatorio acetilcolina en la membrana post-sináptica del nervio. La AChE de los insectos tiene una especificidad de sustrato intermedio entre la AChE de los vertebrados y la butiril-colinesterasa.

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

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

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

Hasta ahora, no ha sido registrada la resistencia basada en AChE en *An stephensi*, y debido a que ninguno de los casos de resistencia registrada han estado ligados al sexo, se

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

Cinco mutaciones puntuales asociadas con la resistencia a organofosforados y carbamatos han sido identificadas en el gen de la acetilcolinesterasa en *D. melanogaster* (Mutero et al, 1994) y estudios dirigidos por mutagénesis del AChE ligado al sexo de *Ae. aegypti*, han demostrado que estas mutaciones también confieren resistencia en mosquitos (Vaughan et al, 1997). Sin embargo, ninguna de estas mutaciones ha sido identificada en mosquitos colectados en campo o seleccionados en laboratorio.

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

4.4.2.2. Receptores GABA

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

fenilpirazole y que el efecto de la ivermectina en neuronas cultivadas puede revertirse con el pre-tratamiento con picrotoxina, sugiriendo que estos insecticidas interactúan con el ionóforo de cloro asociado con el receptor GABA de insectos.

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

Se ha encontrado que una substitución de alanina a serina en el dominio que envuelve al canal del receptor GABA, confiere resistencia a ciclodienos tales como el dieldrín. La mutación fue identificada por primera vez en *Drosophila*, y desde entonces ha mostrado estar en un amplio rango de insectos resistentes a dieldrín, incluyendo *Ae. aegypti* (L.) (French-Constant et al, 1994). La única variación en insectos resistentes es que el residuo substituido cambia a glicina en vez de serina. A pesar de que se ha detenido el uso de insecticidas ciclodienos para agricultura y salud pública, los alelos resistentes pueden ser encontrados en relativamente altas frecuencias en poblaciones de insectos en campo.

4.4.2.3. Canales de sodio

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

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

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

La mutación *kdr* consistió en un cambio de nucleótidos de adenina a timina en el residuo Leucina1014, confiriendo un cambio de aminoácidos de leucina (Leu) a fenilalanina (Phe). Posteriormente, la misma mutación fue identificada en varias especies de mosquitos, tales como *An. gambiae*, *An. stephensi*, *An. sacharovi* y *Culex pipiens* (Martínez-Torres et al, 1998; Enayati et al, 2003; Martínez-Torres et al, 1999; Luleyap et al, 2002).

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

Por otro lado, algunos insectos dípteros (múscidos) con el fenotipo “super *kdr*”, además de contener la mutación Leu1014Phe, presentaron una segunda mutación (Met918Thr) que ocurre en el puente de unión de los segmentos transmembranales 4 y 5, del dominio II (Williamson et al, 1996; Guerrero et al, 1997). Se ha sugerido que la segunda mutación intensifica el fenotipo *kdr* en cepas de moscas resistentes, sin

embargo, esta mutación no ha sido identificada en poblaciones de moscas de campo, ni en mosquitos vectores. En forma interesante, las alteraciones del canal de sodio asociado con la resistencia, son mucho más variables que las alteraciones identificadas en los receptores GABA, sin embargo, se siguen limitando a un pequeño número de regiones en la proteína. La mayoría de las alteraciones de la proteína del canal de sodio ocurren en una región que forma parte de la cobertura del canal de sodio (DIIS6). Se ha sugerido que los canales de sodio alterados permiten una rápida disociación del insecticida, confiriendo resistencia a los efectos tóxicos del insecticida (Soderlund y Knipple, 2003).

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

4.5 Resistencia a Insecticidas en vectores.

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

control de la oncocercosis en África, casi eliminaron la ceguera de los ríos durante las décadas de los 70's y 80's (Curtis, 1989).

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

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

A pesar de que el uso del BHC y dieldrín fue restringido desde hace muchos años, la resistencia a estos insecticidas sigue dispersada en poblaciones de insectos. El uso del DDT en algunos países ha sido restringido o vetado, sin embargo, la resistencia al DDT en muchas especies de mosquitos vectores es persistente (WHO, 1992). Actualmente, existe un debate sobre la continuación del uso de este insecticida, la presión pública debida a los efectos adversos del DDT hacia el ambiente, exigen su retiro del mercado en salud pública. Por otro lado, el retiro del DDT en las campañas de control de vectores en países del tercer mundo, ha sido relacionado con el aumento en la incidencia de la malaria en países de África. (Roberts et al, 1997). Ambos puntos de vista están siendo cautelosamente evaluados, antes de tomar una decisión definitiva sobre el uso de este insecticida.

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

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

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

Uno de los obstáculos más serios en los programas de control de vectores de enfermedades humanas es el desarrollo de resistencia a los insecticidas usados. El primer caso reportado de insectos resistentes a insecticidas sintéticos fue en 1946 cuando se detectó resistencia a DDT en moscas domésticas de Suiza y Dinamarca (Picollo, 2006), a partir de entonces, según la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente el 40% de los 506 artrópodos de importancia médica presentan algún grado de resistencia a insecticidas, de estas especies, alrededor del 50% son especies de mosquitos vectores de malaria, dengue, fiebre amarilla y filariasis (Fonseca et al. 2005).

Los insecticidas utilizados en las campañas contra plagas se han incluido a los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. La resistencia a organofosforados ha sido documentada en vectores importantes como *An. culicifacies*, *An. stephensi*, *An. albimanus*, *An. arabiensis* y *An. sacharovi*; así como el género *Culex*.

La resistencia a piretroides ha sido registrada para el género *Cx. quinquefasciatus*, así como en *An. albimanus*, *An. stephensi* y *An. gambiae* entre otros, mientras que la resistencia a carbamatos se presenta en *An. sacharovi* y *An. albimanus*. La resistencia a piretroides es amplia en *Ae. aegypti* y casos de resistencia a organofosforados y carbamatos han sido registradas en estas especies (Hemingway y Ranson 2000).

En México, como en la mayoría de los Países, se han utilizado diversos insecticidas para el control del vector, por ejemplo el DDT, el cual fue usado intensivamente en los 60's para el control de la malaria, eventualmente se siguieron utilizando insecticidas organofosforados como el malatión (adulticida) y temefos (larvicida). El malatión se utilizó en aplicaciones espaciales de tipo ULV mientras que temefos en gránulos sobre contenedores de agua que podrían ser criaderos de larvas de *Ae. aegypti* (L) (Fernández 1999). De manera similar, y a partir de 1981 se ha llevado la aplicación intensiva de temefos como larvicida al 1%. Esto trae a la sospecha de que puede estar presente la resistencia a este organofosforado. En 1960 se reportaron los primeros casos de resistencia a insecticidas organofosforados y carbamatos en *Ae. aegypti*. Fox y García-Mola (1961) reportaron en Puerto Rico una cepa resistente 10X a diazinón y malatión. Se han realizado numerosos trabajos que determinan el grado de resistencia en poblaciones de *Ae. aegypti* (L) y otros culícidos. Fox (1973) desarrollo un trabajo para determinar el grado de resistencia a malation en adultos de *Ae. aegypti* (L) cepa Arrecife, en la ciudad de Puerto Rico, utilizando las concentraciones de 0.8, 1.6 y 3.22%, sobre padres y hasta la generación 12, exponiéndolos por una hora, registrando los resultados a las 24 hrs. Los resultados obtenidos fueron de 34% de mortalidad en

padres y 3% de mortalidad en la F12 a la concentración de 0.8; en la concentración de 1.6 los padres presentaron 72% y la F12 presentó el 14% de mortalidad, por último en la concentración más alta se encontró 100% de mortalidad en padres y 57% en la F12. Posteriormente utilizaron malation 0.4% y expusieron los padres a diferentes tiempos (60, 120, 180 y 240 min.) observando 11, 65, 78 y 91% de mortalidad respectivamente.

A su vez Mazzarri y Georghiou (1995) determinaron la resistencia a otros organofosforados (OP), tales como: temefos, malatión, metil-pirifos y clorpirifos; y al carbamato propoxur en 3 poblaciones de *Ae. aegypti* de los estados de Falcón y Aragua, Venezuela. En ambos estados la resistencia fue baja (< 5 veces) excepto para clorpirifos, el cual presentó una resistencia moderada (7 veces) y las pruebas bioquímicas demostraron la presencia elevada de esterasas. Mekurian et al. (1991) en un estudio de seguimiento por cuatro años, trabajo con *Ae. aegypti* (larvas de 3° y 4° instar temprano y adultos), determinó la susceptibilidad a malation (dosis de 0.6245 mg/L), a temefos (0.0375 y 0.025 mg/L) y fention (0.025 mg/L) en larvas, las cuales mostraron mortalidad del 100% para el malatión, 100% de mortalidad para temefos en la concentración de 0.0375 mg/mL (tanto en larvas de campo como de laboratorio) y en la concentración 0.025 en larvas de campo solo se observó un 78.2%, para fention se observó mortalidad de 99.3% en la colonia de laboratorio, mientras que la de campo presentó el 19% de mortalidad. En las pruebas que se realizaron sobre adultos se utilizó DDT al 4% W, malatión al 5% A y W, resmetrina al 2.13% A, propoxur al 0.1% A, permetrina al 0.025% W y deltametrina al 0.025 %W usando el método de la OMS. Los resultados obtenidos mostraron que las concentraciones de los insecticidas empleadas eran en un inicio eficientes mostrando porcentajes de mortalidad altos, sin embargo, conforme se utilizaron al paso de los años, estas se mostraron menos eficientes al final de los cuatro años de estudio (1987-1990), disminuyendo hasta la mitad del porcentaje de mortalidad inicial. Para DDT al 4% se mostró una disminución del 5.7% a 1%, en malation al 5% del 98% al 62.9%, en permetrina al 0.025% de 90.1% a 41.5%.

El DDT juega un papel muy importante en la resistencia cruzada a otros insecticidas. Rohani et al. (2000) hace mención sobre cierto grado de resistencia en mosquitos a DDT y permetrina, confirmando en su estudio que el fenómeno de resistencia cruzada está ocurriendo entre estos dos insecticidas. Es decir, existe resistencia cruzada a piretroides en poblaciones de campo por selección con DDT.

Hay numerosos reportes de resistencia a piretroides in *Ae. aegypti* (Ziv et al.1969; Malcolm & Wood, 1982 ; Hemingway et al. 1989 ; Mebrahtu et al. 1997). Muchos de los reportes hablan de la resistencia cruzada de la selección en campo por DDT, implicando los mecanismos de Dkr. (Hemingway et al. 1989), sin embargo algunos reportes sobre resistencia a DDT en larvas sugieren un incremento en los niveles del metabolismo. El DDT y los piretroides poseen un coeficiente térmico invertido.

Como se observa en el trabajo de Cutkcomp y Subramanyam (1986) en el cual determino la CL50 en larvas de 3º instar de *Ae. aegypti* , utilizando diferentes piretroides a 20 y 30°C, comprobando que a mayor temperatura menor es el efecto tóxico de los piretroides. Las CL50 para cipermetrina a 20 y 30 °C fue de 0.16 y 0.34 ppb, respectivamente, para la permetrina fueron de 0.27 y 0.98, para el fenvalerato; 0.46 y 0.88, para la fenotrina; 0.56 y 1.52, para el flucitrinato; 1.00 y 1.33.

Xiao y sus colaboradores (1992) determinaron la susceptibilidad a diferentes insecticidas y los mecanismos de resistencia al DDT en poblaciones de *Ae. aegypti* de China, para ello colectaron 12 cepas de ciudades que han desarrollado altos niveles de resistencia al DDT, así mismo dos cepas susceptibles en una zona rural. Xiao et al. (1992) determinó con base en este estudio, que los mecanismos de resistencia al DDT fueron debido a la actividad de DDT-deshidroclorinasa, además observaron que la penetración de DDT en el cuerpo del mosquito fue diferente entre la cepas resistentes y susceptibles, siendo esto una posibilidad que puede influir en los niveles de resistencia en algunas cepas, más sin embargo, parece improbable que este sea el principal mecanismo de resistencia a DDT.

Rodríguez et.al. (1997) estudio el comportamiento de resistencia a diferentes insecticidas, entre estos el malation, clorpirifos y pirimifos-metil (organofosforados), deltametrina, lambdacialotrina y cipermetrina (piretroides) y propoxur (carbamato) en poblaciones de *Culex quinquefasciatus* provenientes de 2 municipios de Santiago de Cuba. Los valores del factor de resistencia (FR) determinaron que existe diferencia para malation y clorpirifos, sin embargo, a pesar de la existencia de una alta frecuencia de los mecanismos de esterasas elevadas y acetilcolinesterasa alterada, no se observó diferencia para pirimifos-metil, comprobándose así que el insecticida no afecta a la población de *Culex quinquefasciatus* por esos mecanismos. Se observó resistencia a los insecticidas piretroides; deltametrina y lambdacialotrina en Santiago de Cuba y resistencia moderada para cipermetrina en ambos municipios, Santiago de Cuba y San Luis, en este último también se encontró resistencia a deltametrina, pero moderada a lambdacialotrina. Los resultados que se obtuvieron a partir del uso de sinergistas S,S,S, tributilfosforotritioato (DEF) y butóxido de piperonilo (PBO), indicaron que los mecanismos de resistencia de esterasas inespecíficas y las oxidasas de función múltiple están involucradas en la resistencia a piretroides en ambas cepas de Santiago de Cuba y San Luis.

Tiempo después Rodríguez y sus colaboradores (1998) nuevamente trabajaron con *Culex quinquefasciatus*, pero ahora con una cepa de campo resistente a lambdacialotrina (insecticida piretroide) con el objetivo de poder utilizarla como cepa de referencia en el laboratorio (en las pruebas bioquímicas y estudios de genética), para evaluar la utilidad de este insecticida para el control de mosquitos en Cuba y determinar así si existe resistencia cruzada a insecticidas organofosforados, piretroides y carbamatos. Se obtuvo una alta resistencia a lambdacialotrina después de 6 generaciones de presión de selección, sin embargo se observó baja o nula resistencia cruzada a otros piretroides (deltametrina y cipermetrina), al carbamato propoxur y a los insecticidas organofosforados, clorpirifos y pirimifos-metil, sin embargo si se presentó alta resistencia cruzada a malatión (organofosforado).

Ese mismo año Rodríguez y colaboradores determinaron el estado de resistencia nuevamente en *Culex quinquefasciatus* pero ahora procedente de Colombia. Para determinar los niveles de susceptibilidad utilizaron 5 insecticidas organofosforados (malation, pirimifos-metil, clorpirifos, temefos y fention), 4 piretroides (cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambdacialotrina) y un carbamato (propoxur). *Culex quinquefasciatus* se mostró resistente a todos los insecticidas organofosforados, aunque con valores relativamente menores para metil-pirimifos y fention. No se encontró resistencia a los piretroides lambdacialotrina y cipermetrina ni al carbamato propoxur. Mediante el uso del sinergista PBO se demostró que las oxidasas de función múltiple desempeñan una función importante en la resistencia a los insecticidas organofosforados y piretroides.

4.6 Situación Epidemiológica del dengue en Yucatán.

El virus del Dengue reapareció en México en 1968 y se expandió casi en todo México cuando el mosquito *Aedes aegypti* se movió al área central de las regiones costeras. Desde ese momento, los mosquitos han sido endémicos en la península de Yucatán, con casos de Dengue confirmados aumentando en los últimos años en Yucatán (PAHO, 2001).

Si bien la enfermedad existió en el país desde hace muchos años, en los años 60's se logró la desaparición de la misma gracias a las acciones emprendidas para eliminar la fiebre amarilla, y con ello al mosquito transmisor, que es el mismo del dengue, en todo el territorio nacional. Esta enfermedad resurgió en nuestro país a fines del año de 1979 como consecuencia de la disminución de las acciones, a los cambios demográficos y a otros factores de riesgo, como han sido las migraciones de poblaciones del campo a las ciudades, que se concentraron en áreas semiurbanas o conurbadas, con el establecimiento de viviendas precarias, hacinamiento, deficientes servicios públicos de agua y recolección de basuras, así como de importantes brotes de dengue en América del

Sur, por virus importados de otros continentes. Entrando así al país, por la circulación habitual de personas, a través de Chiapas y extendiéndose hacia todo el país con predominio en las regiones de las Costas del Atlántico y Pacífico en donde prácticamente ha permanecido hasta la presente fecha en forma endémica (Servicios de Salud de Yucatán, 2013).

En la península de Yucatán la incidencia fue mayor durante el primer quinquenio de los años ochenta con un repunte importante de la transmisión en 1984, asociado a un brote en el estado de Yucatán donde se identificó la introducción del serotipo 4 y se notificaron los primeros casos de dengue hemorrágico en esa región. A partir de este segundo pico epidémico, se nota un descenso constante en la curva hasta 1994, pero dicho año sugiere un nuevo y discreto incremento en la incidencia (PAHO, 2001).

En cuanto a la distribución geográfica de los casos, Narro Robles reporta en 1995 que el 64% se concentra en sólo ocho entidades federativas: Veracruz (13%), Guerrero (10%), Oaxaca (8%), Sinaloa (7%), Chiapas (7%), Yucatán (7%), Coahuila (6%) y Tamaulipas (6%). En lo que se refiere a la tasa por cada 100 000 habitantes, en cambio, sobresalen los estados de Colima, Nayarit, Yucatán y Baja California Sur, con tasas cuatro veces por arriba de la nacional promedio durante el periodo 1978-1994, que fue de 19 por 100 000.

En la Península de Yucatán, el dengue clásico fue documentado, por primera vez, en 1979; a su vez, el dengue hemorrágico lo fue en 1984. Desde entonces, los brotes epidémicos de dengue se han sucedido en esta región del sureste mexicano: 1979-1982 (DEN-1), 1984 (DEN-1 y DEN-4), 1991 (DEN-2 y DEN-4), 1994 (DEN-1, DEN-2 y DEN-4), 1995-1997 (todos los serotipos) (Loroño-Pino et al., 2004).

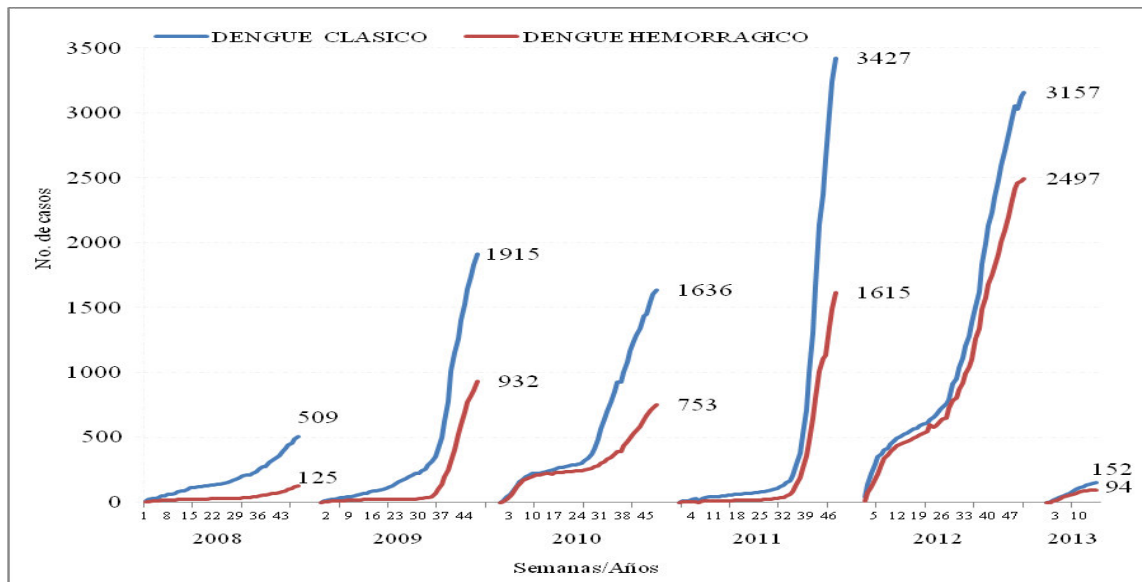
Debido a que son 4 los serotipos que conforman la enfermedad, la introducción de cada uno de ellos ha significado la presencia de brotes con un número mayor o menor de casos, haciéndose más notorio en los años de 1996-97 en donde se introdujo el

serotipo III, con más de 5000 casos. En el 2001 y 2002 este fenómeno similar fue mejor contenido debido a cambios en el programa de prevención y control y la vigilancia epidemiológica, en cuanto a la oportunidad de las acciones, la confirmación o descarte de los casos presentados y al involucramiento de los municipios en términos de tratarse de un problema con grandes rasgos de mal saneamiento ambiental derivado de las carencias o rezagos de servicios de recoja de basuras, quienes contrataron personas para las acciones de intervención específicas. A partir del 2000, se ha comenzado a tener otra situación epidemiológica, al encontrar una proporción cada vez mayor de casos con manifestaciones hemorrágicas y otros de mayor severidad y en grupos de edad más jóvenes, con relación al número de casos de dengue clásico, como ocurre en otros países en donde existe la endemidad del padecimiento. Lo cual quiere decir que se está permanentemente expuestos a brotes de casos complicados si no se mantienen y mejoran las acciones de todos los niveles institucionales, municipales y de las familias para controlar la presencia de los factores de riesgo (patios limpios de vectores, de criaderos, etc.) que derivan en casos en el estado (Servicios de Salud de Yucatán, 2013).

En la figura 4 se muestra el número de casos por dengue clásico (DC) y dengue hemorrágico (DH) en los últimos 6 años en Yucatán. Se observa como los casos tanto de DC como DH han ido a la alza. En 2008, al cierre del año se registraron 509 casos por DC y 125 por DH. A partir del año 2009 se observa un incremento notable en el número de casos, cerrando el 2011 con 3425 casos por DC y 1615 por DH. Incremento notorio se mostro en los casos por DH, observándose al cierre del 2012, 2497 personas con este padecimiento. Para la semana 15 del 2013, se habían registrado 152 casos por DC y 94 por DH. La época de secas de ubica aproximadamente entre la semana 14 a la 24 de cada año, mientras que la época de lluvias entre la semana 25 a la 40. En esta misma figura se puede observar cómo meses después de la época de lluvias el número de casos aumenta a pesar de las estrategias aplicadas para el control de la enfermedad. El 3 de enero del 2013, el secretario de salud del estado de Yucatán anuncio la puesta en marcha

de programas emergentes para combatir al mosquito trasmisor *Ae. aegypti*. A partir de esa fecha, ya no será una campaña, sino un programa permanente de recolección de cacharros, abatización y fumigación.

Figura 4. Casos de dengue clásico y dengue hemorrágico presentados en el estado de Yucatán del año 2008 al 2013



En el mes de febrero del 2012, autoridades del sector salud informaron que Yucatán se concentraba el 57% de los casos de personas infectadas por dengue a nivel nacional. Anunciaron también una inversión de 20 millones de pesos en acciones para eliminar criaderos del mosquito *Ae. aegypti* en la ciudad de Mérida y Valladolid. En todo el país se habían confirmado mil 112 casos de personas con dengue desde 2011, de los cuales 635 se reportaron en Yucatán, y de estos 445 fueron de Mérida. (SSA, 2012). Para los primeros meses del 2013, el estado de Yucatán se encuentra liderando la lista nacional de casos de acuerdo con el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades.

En resumen, durante los últimos años esta enfermedad se ha caracterizado por presentar en Yucatán un número de enfermos mayor, en los menores de 15 años de edad, tal como ocurre en los países del Continente Asiático en donde es endémica. No obstante la mejora del programa de prevención y control en los últimos años y la consecuente reducción del número de casos, el riesgo de la presentación de casos graves se ha incrementado porque la mayor parte de la población ya tuvo el padecimiento y en estos es mayor la probabilidad de tener complicaciones.

5. METODOS

5.1. Área de estudio

El área de estudio corresponde a la ciudad de Mérida, se ubica en la península de Yucatán, la cual pertenece a la zona sureste de México. Se encuentra a 20 minutos de la playa más próxima, que la enlaza con el Golfo de México; y el sitio más distante del Estado de Yucatán a solamente tres horas por carretera, y a cuatro horas el punto más lejano de la Península. Su superficie es de 858.41 kilómetros cuadrados, representa el 2% del territorio estatal y el 0.04% del territorio nacional. El Municipio cuenta con 12 pueblos: Candel, Cosgaya, Chablekal, Cholul, Chuburná de Hidalgo, Dzityá, Dzununcán, Komchén, Molas, San José Tzal, Sierra Papacal y Sitpach. El área de estudio se enfoca en el poblado de Chuburná de Hidalgo, ubicado en la zona metropolitana de la ciudad, en las coordenadas 21° 1' latitud norte y 89° 38' longitud oeste, con una altura sobre el nivel del mar, de 9 metros (Figura 5).

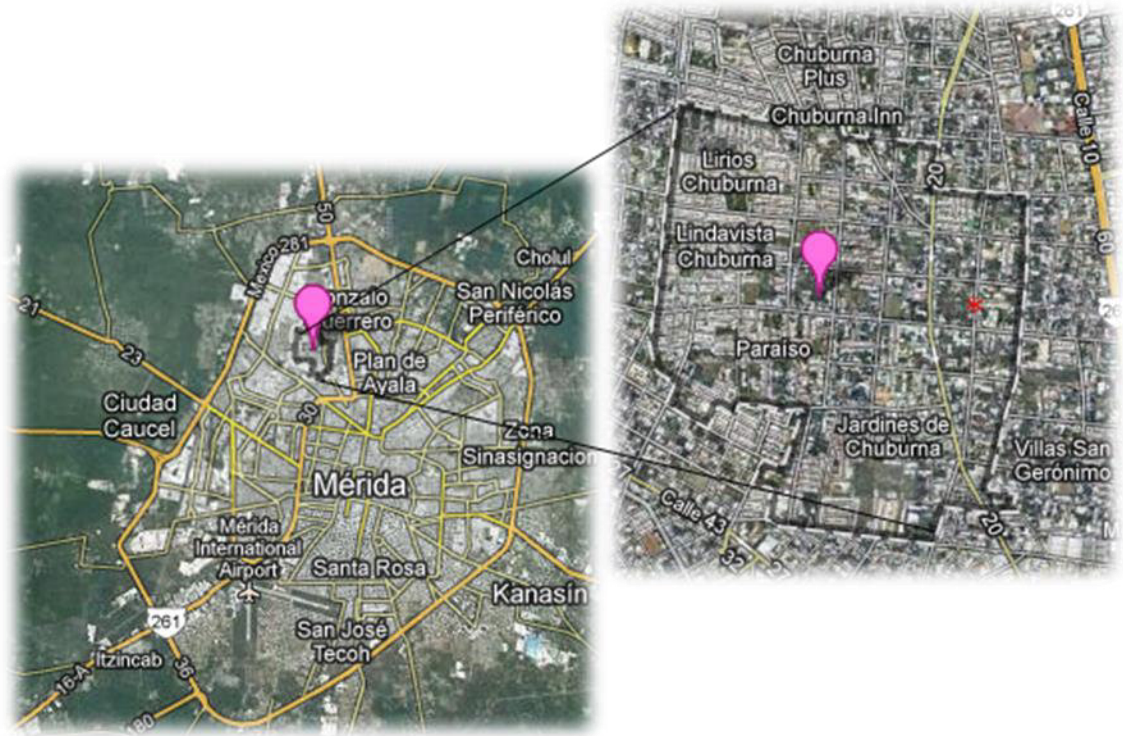


Figura 5. Área de estudio, Poblado de Chuburná de Hidalgo, Zona metropolitana de la ciudad de Mérida, Yucatán.

La ciudad de Mérida, cuenta con un clima cálido, muestra un gradiente térmico con temperaturas menores a 32° C en la costa y que va en aumento hacia el interior del municipio, donde se registran valores promedio al año mayor a 36° C. En general, la temperatura dominante está entre el rango de los 32° C a 36° C, lo anterior de acuerdo a los registros de la Comisión Nacional del Agua. Otros registros muestran los valores de las temperaturas máximas, media y mínima obtenidos en la cabecera son 40.2° C, 26.2° C y 14° C respectivamente. Respecto a las lluvias en el municipio Mérida, de acuerdo a su geografía, geología y su ubicación tropical, se ve afectado casi todo el año por fenómenos hidrometeorológicos (depresiones tropicales, tormentas tropicales, huracanes), excepto en abril y mayo, que son los meses considerados como temporada

de secas. Por otra parte, los meses de mayor incidencia de estos fenómenos son: agosto, septiembre y octubre. Sin embargo, el período de ocurrencia para toda la Península de Yucatán, se extiende desde junio hasta noviembre. La precipitación pluvial en la ciudad de Mérida, Yucatán, ha variado en los últimos años, registrándose una mínima de 200 mm hasta los 1500 mm como máxima en 2003.

5.2. Material biológico

Se llevaron a cabo dos recolectas de mosquitos por año, la primera en la temporada de secas, y la segunda en la temporada considerada de lluvias. Lo anterior fue realizado del año 2007 al año 2010. Se recolectaron larvas de distintos estadios, las cuales se obtuvieron de criaderos naturales mediante el uso de caladores estándares. El material recolectado fue transportado en bolsas Whirl-Pak Nasco® dentro de termos conteniendo agua para minimizar el estrés causado por el traslado (Figura 6).



Figura 6. Bolsas Whirl-Pak Nasco® para transporte de larvas.

5.2.1. Establecimiento de colonias en el laboratorio.

Las larvas fueron distribuidas en charolas de plástico de 35 x 25 cm conteniendo agua de clorada. Cada charola fue identificada indicando la localidad de (figura 7). Las

larvas fueron alimentadas periódicamente con polvo de hígado en solución con agua al 50%. Una vez que las larvas pasaron al estadio de pupa, estas se transfirieron a cámaras de emergencia, al emerger los mosquitos se trasladaron a jaulas de cría de 30 x 30 cm.



Figura 7. Charolas de plástico para cría de larvas

Los mosquitos adultos se alimentaron con una solución azucarada al 10% utilizando como matriz algodones impregnados. Las hembras fueron alimentadas con sangre de rata para la producción de huevos. Las colonias se mantuvieron en condiciones de temperatura y humedad controladas: 24 +/- 2°C y 70% HR.

Dentro de las jaulas se colocaron vasos de agua conteniendo papel filtro como superficie de ovoposición, éstos se mantuvieron de 3-5 días para permitir la embrionación. Las papeletas con huevos, se dejaron secar sobre charolas para su posterior almacenamiento figura 8.



Figura 8. Vasos con papel filtro para recolectar huevos.

Los huevos contenidos en papeletas fueron puestos a eclosionar para la obtención de larvas y adultos, continuando el ciclo hasta obtener las generaciones F_1 y F_2 con las cuales se realizan los bioensayos.

5.3. Susceptibilidad a temefos en larvas.

La susceptibilidad de las poblaciones de *Ae. aegypti* (L.) ante el organofosforado temefos se determinó mediante el método de OMS (1981).

Para los bioensayos se utilizaron larvas de tercer estadio tardío, cuarto temprano. Se utilizó temefos (O,O,O´O´-tetrametil – O,O´-tiodi p-fenilen difosforotionato), comúnmente conocido como “Abate”, (97.5% de pureza del i.a. Chem Service, Westchester, PA)

Se prepararon recipientes con capacidad 250 ml, correctamente etiquetados identificando el control, nombre del producto en evaluación, concentración número de repetición, completando 3 repeticiones por concentración (figura 9). En cada recipiente se colocaron 20 larvas de III o IV estadio. Para los controles se colocaron 99 ml de agua corriente declorada o agua destilada más 1 ml de alcohol (etanol). Se prepararon soluciones stock del larvicida temefos y se hicieron diluciones que constituyeron las diferentes dosis; se agregó el insecticida temefos a cada vaso y se registró la mortalidad cada 15min hasta completar 2hrs, 4 hrs, 6hrs, 8hrs y 24hrs de exposición.

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



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

Como todos los bioensayos de resistencia, los datos obtenidos por este método necesitan una comparación con larvas susceptibles, utilizamos la cepa de referencia New Orleans (obtenida originalmente del CDC de Atlanta).

5.4. Determinación de la susceptibilidad a piretroides en adultos de *Ae. aegypti*

La susceptibilidad poblaciones de adultos de *Ae. aegypti* (L.) se determinó mediante el método de “Botella impregnada” (Nrogdon y McAllister 1998b) ante diferentes dosis de los insecticidas: permetrina ,deltametrina, fenotrina.

Tabla 1. Descripción de insecticidas piretroides utilizados.

Nombre	Nombre químico	Cantidad (mg)	Pureza
fenotrina	d-(cis-trans)-Phenotrin	50	6% cis-1R 94% trans-1R
permetrina	Trans-permethrin (mezcla isomerica)	50	92% trans 6% cis
deltametrina	(RS)-alfa-ciano-fenoxibencil- (1RS,3RS;1SR,3SR)3- (2,2- diclorovinil)-2.2- dimetilciclopropanocarboxilato	100	99.00%

5.4.1. Preparación de las botellas.

Se utilizaron botellas de vidrio Wheaton de boca angosta (3 cm) y 250 ml de capacidad, con tapón de rosca, limpios y secos (figura 10). A cada botella debidamente identificada se le agregó 1 ml de acetona e inmediatamente después el volumen de la solución stock adecuado para obtener la concentración deseada en µg/botella, se tapó, se agitó la mezcla suavemente y se rotó la botella en varias direcciones con la finalidad de que toda la superficie de la botella incluyendo la tapa quedara completamente impregnada con la solución. Posteriormente se retiró la tapa, se continuó rotando hasta que se observó poco líquido y se dejó evaporar el solvente restante durante 24 h a temperatura ambiente en oscuridad.



Figura 10. Material necesario para impregnar las botellas.

5.4.2. Bioensayos

Contando con el material preparado y los mosquitos se procede al bioensayo. Para ello se utilizaron mosquitos donde no hubo discriminación entre hembras y machos. Se colectaron en un tubo o aspirador bucal 20 mosquitos adultos de 1-3 días de edad, en el caso de las hembras, alimentados sin ingesta de sangre y se transfirieron a las botellas impregnadas. Se tapa rápidamente la botella para impedir el escape de los mosquitos y se examinan (figura 11). Las dosis por botella empleadas para cada insecticida variaron según la respuesta obtenida en los mosquitos de cada una de las poblaciones.



Figura 11. Mosquitos aspirados y transferidos a las botellas.

Una vez que los mosquitos fueron expuestos a la dosis de cada insecticida se hicieron observaciones cada 10 minutos, así hasta completar 1 hora. Cada 10 min se registró la cantidad de mosquitos derribados hasta completar 60min. El criterio para determinar el estado de derribe se basó en: 1) el mosquito se encontraba con el dorso en el fondo de la botella (o con las patas hacia arriba), 2) es incapaz de volar, 3) tiene movimientos aberrantes y es incapaz de mantenerse en posición erguida. Después de una hora de exposición, los mosquitos (derribados o no) fueron transferidos a vasos de recuperación. con una tapa de gasa, y a los cuales se les colocó en la parte superior un algodón humedecido con solución azucarada al 10% para su alimentación (figura 12).

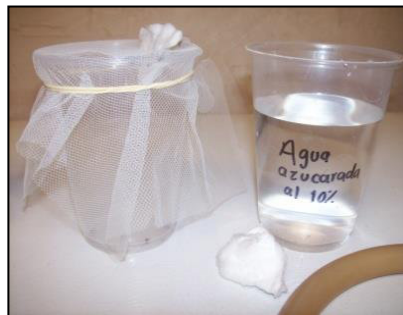


Figura 12. Cámaras de recuperación

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

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

5.5. Mecanismos enzimáticos de resistencia.

Lotes de 60 larvas fueron expuestas a la CL_{50} de temefos, una vez obtenido el 50% de mortalidad se separaron las larvas vivas y se congelaron. Para el caso de los adultos, estos expuestos previamente a los piretroides para la cuantificación de enzimas detoxificativas. Lotes de 60 hembras de cada población sin ingesta sanguínea y 1 a 3 días de emergidas fueron sometidas a la respectiva CL_{50} durante el tiempo que ocasionó el 50 % de mortalidad, el cual correspondió al momento cuando el 50% de los insectos expuestos estaban derribados o muertos dentro de la botella. Posteriormente fueron separados los supervivientes de los muertos y almacenados individualmente a $-70^{\circ}C$. Finalmente un total de 30 mosquitos supervivientes y 30 muertos fueron usados para la cuantificación de enzimas detoxificativas.

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

Para la determinación de los mecanismos de resistencia se aplicó el método del CDC de Atlanta, GA, USA. Se homogenizó el individuo completo (larva o adulto) individualmente en 100 μ l de 0.01 M ph 7.2 de buffer de potasio, y posteriormente se re suspendió con el mismo buffer hasta tener un volumen de 2 ml. Se tomaron alícuotas de

100 µl del homogenato y se transfirieron a pocillos de una microplaca. Los individuos fueron analizados por triplicado. Se evaluaron las 6 diferentes enzimas de resistencia para cada mosquito: acetilcolinesterasa (AChE), acetilcolinesterasa insensible (iAChE), α y β esterasas, oxidasas microsómicas de función múltiple (MFO) y glutatión s-transferasas (GST) según lo describe Brogdon y McAllister (1998, 1997), Brogdon y Barber (1990); Brogdon (1989) y Brogdon et al., (1988 a, b)

5.5.1. Prueba α y β - esterasas

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

5.5.2. Prueba hemo-peroxidasas

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

5.5.3. Prueba Glutatión-S-Transferasa

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

5.6. Análisis de resultados.

5.6.1. Dosis, tiempo- mortalidad.

Las mortalidades obtenidas en los bioensayos con temefos y malatión tanto en las sub-poblaciones bajo estudio como en la cepa de referencia NO, fueron analizadas por medio log-probit software basado en Finney (1971) para determinar la concentración letal media (CL_{50}) y tiempo letal medio (TL_{50}).

La Concentración knockdown CK_{50} o de derribo fue determinada con los insectos caídos durante la hora de exposición a los piretroides, así como el Tiempo Knockdown cincuenta (TK_{50}) y las CL_{50} y TL_{50} con estos valores y con los obtenidos luego 1h, 2h, 4h de exposición y 24 h posteriores a la exposición de los mosquitos.

Se determinó diferencia significativa al comparar los valores de CL_{50} y TK_{50} para temefos y CK_{50} , CL_{50} , TK_{50} y TL_{50} para piteroides con base en la comparación de los intervalos de confianza. Traslape entre los mismos indica no diferencia entre los mismos.

5.6.2. Cálculo del Factor de Resistencia (FR) en larvas y adultos.

Los Factores de Resistencia (FR_{50}) fueron calculados dividiendo los valores de las CL_{50} en el caso de larvas y CK_{50} y CL_{50} de las poblaciones bajo estudio entre los obtenidos en la cepa susceptible New Orleans.

Este valor nos permite caracterizar las poblaciones de acuerdo al criterio propuesto por Mazzarri y Georghiou (1995) como: alta resistencia cuando el valor de $FR > 10$, moderada resistencia cuando el valor de FR cae entre 5 y 10 y baja resistencia cuando el $FR < 5$.

5.6.3. Análisis de varianza con diseño de bloques al azar y prueba de Tukey con valores de FRCK50 y FRCL50 mostrados por poblaciones adultas *Ae. aegypti* de época de secas y lluvias.

Para establecer si existe diferencia significativa entre las poblaciones de época de lluvias y secas con respecto a los niveles de resistencia al derribo o post-recuperación ante los piretroides en estudio, se realizó un ANOVA ($\alpha = 0.05$) en diseño de bloques al azar y prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) utilizando los valores de FRCK50 y FRCL50 de cada población.

5.6.4. Análisis de datos de los Mecanismos Enzimáticos de resistencia.

Obtenidos los datos de absorbancia para cada enzima, se creó una base de datos en Excel y se calculó el promedio de los valores de absorbancia por insecto. Se realizó una prueba de ANOVA ($\alpha = 0.05$) y la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para determinar diferencias significativas entre los niveles enzimáticos de las poblaciones, tanto en de larvas, como en adultos luego de ser expuestas al insecticida. Los datos de absorbancia para la cepa susceptible se obtienen de la misma forma que para las poblaciones bajo estudio. Estos valores fueron empleados para comparar dichas poblaciones con respecto a la cepa de referencia.

El umbral de resistencia correspondió a la máxima absorbancia de la enzima en los especímenes supervivientes de la cepa NO, el cual fue comparado con los supervivientes de las poblaciones estudiadas y usado para clasificar los mecanismos enzimáticos como no alterado (NA), incipientemente alterado, o alterado si menos del 15% de los especímenes exceden el umbral, entre 15 y 50% o cuando más del 50% excede este umbral, respectivamente (Montella et al., 2007).

Análisis de regresión lineal fueron realizados entre los valores de las CL_{50} y los niveles enzimáticos (promedio de absorbancia) de los individuos supervivientes y los niveles enzimáticos. La prueba de R^2 fue llevada a cabo para conocer el grado de

asociación entre ambas variables.

Finalmente tres criterios fueron considerados para determinar si un mecanismo enzimático estuvo involucrado con la resistencia encontrada: 1) más del 50% de los especímenes supervivientes de la sub-población estudiada excedieran el umbral de resistencia, 2) el valor promedio de la absorbancia de la enzima sea superior en los especímenes supervivientes que en los muertos dentro de una población y a su vez superior a los supervivientes de la cepa NO ($p < 0.05$); y 3) que exista alta correlación significativa entre los valores de CL_{50} y los niveles enzimáticos.

6.- RESULTADOS

6.1 Susceptibilidad a temefos.

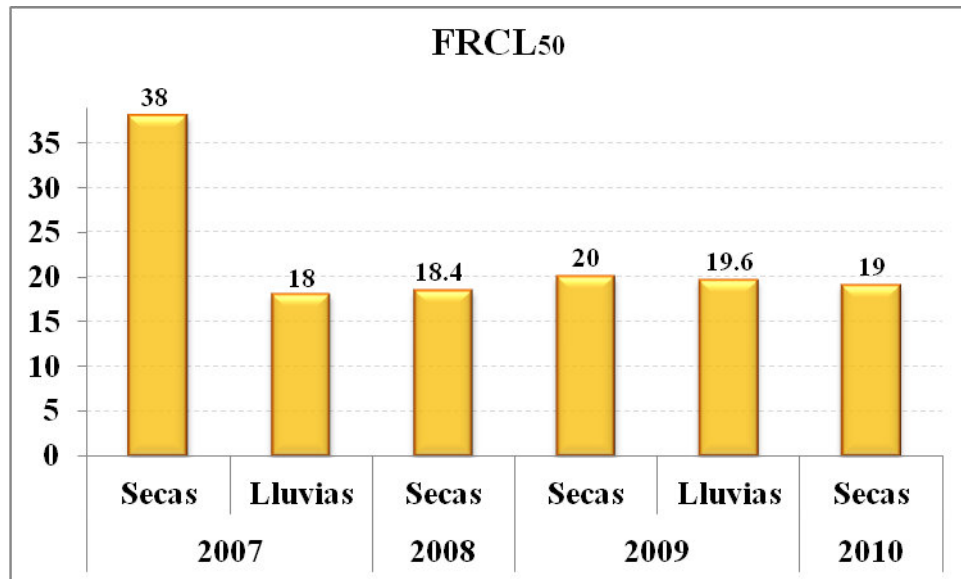
6.1.1 CL_{50} para temefos en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

El organofosforado temefos fue probado en poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* del poblado de Chuburná de Hidalgo, pertenecientes a la temporada de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010. Así mismo en poblaciones de época de lluvias de los años 2007 y 2009. Los resultados de toxicidad con base en la CL_{50} , se obtiene registrando la mortalidad de la población pasadas 24 horas del bioensayo. Los resultados se muestra en la tabla 2. El traslape de los límites de confianza nos permiten determinar diferencia significativa entre los valores de CL_{50} de cada población. A excepción de la CL_{50} calculada en la población larvaria de la época de secas del 2007, para el resto de las poblaciones se presentó traslape entre los límites de confianza (95%).

Tabla 2. Valores de CL₅₀ para temefos en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Chuburná de Hidalgo, en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias de los años 2007 al 2010.

Población		CL ₅₀	(LC95%)
2007	Secas	0.190	0.17-0.20
	Lluvias	0.090	0.09-0.10
2008	Secas	0.092	0.08-0.09
2009	Secas	0.100	0.09-0.15
	Lluvias	0.098	0.09-0.012
2010	Secas	0.095	0.07-0.014

Se calculó el factor de resistencia (FR) de la CL₅₀ (FRCL₅₀) para cada población, esto al dividir el valor de CL₅₀ de la población en estudio sobre el de la cepa susceptible. En la figura 13 se muestran los FR's para cada población. Este valor nos permite caracterizar las poblaciones de acuerdo al criterio propuesto por Mazzarri y Georghiou (1995) como: alta resistencia cuando el valor de FR > 10, moderada resistencia cuando el valor de FR cae entre 5 y 10 y baja resistencia cuando el FR < 5. Los valores de FR en las poblaciones de época de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, fueron de 30X, 18.4X, 20X y 19X, respectivamente; mientras que para la época de lluvias del 2007 y 2009 los factores de resistencia fueron 18X y 19.6X. De acuerdo a estos criterios las poblaciones larvarias de ambas épocas del año presentan alta resistencia al larvicida temefos.



Cráterios propuesto por Mazzari y Georghiou (1995): alta resistencia cuando el valor de FR > 10, moderada resistencia cuando el valor de FR cae entre 5 y 10 y baja resistencia cuando el FR < 5.

Figura 13. Concentración letal media (CL₅₀), de las diferentes poblaciones de *Ae. aegypti* a temefos.

6.2. Susceptibilidad a permetrina.

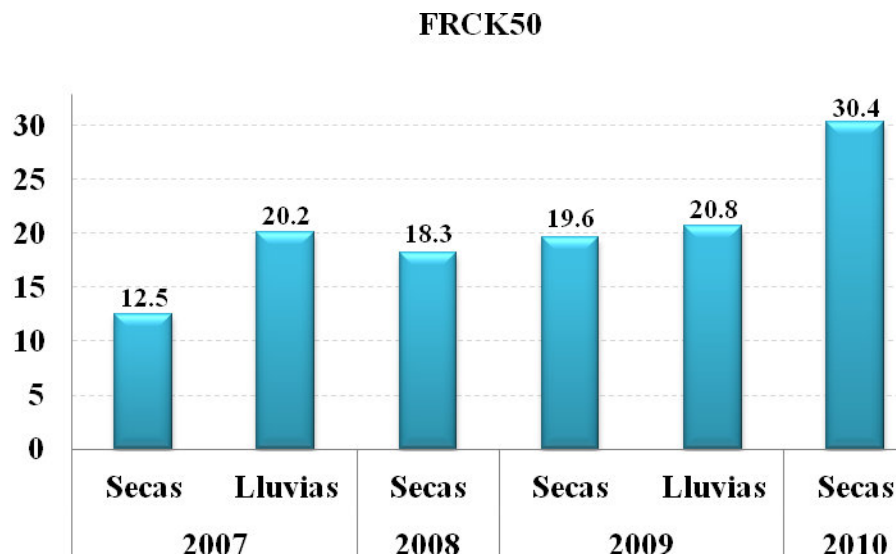
6.2.1 CK₅₀ para permetrina en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

La permetrina fue probada en poblaciones adultas de *Ae. aegypti* del poblado de Chuburná de Hidalgo, éstas pertenecientes a la temporada de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010. Así mismo en poblaciones de época de lluvias de los años 2007 y 2009. Los resultados de toxicidad con base a la CK₅₀, se calculan registrando la mortalidad a la hora de haber sido expuestos al insecticida. El traslape de los límites de confianza del 95% nos permiten determinar la existencia de diferencia significativa entre los valores de CK₅₀ de cada población. Los datos calculados se muestra en la tabla 3. Los valores de los límites de confianza de CK₅₀ para permetrina nos indican diferencia significativa solamente entre las poblaciones de secas de 2010 y 2007. No se encontró diferencia para el resto de las poblaciones

Tabla 3. Valores de CK₅₀ en µg/botella de permetrina sobre adultos de *Ae. aegypti* de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

Población		CK ₅₀	(LC95%)
2007	Secas	5.66	0.51-17.40
	Lluvias	9.1	7.10-11.50
2008	Secas	8.23	6.56-10.49
2009	Secas	8.84	7.41-9.35
	Lluvias	9.37	8.10-11.01
2010	Secas	13.69	11.68-15.66

Se calculó el factor de resistencia con los valores de CK_{50} ($FRCK_{50}$) para cada población, esto al dividir el valor de CK_{50} de la población en estudio y el de la cepa susceptible. En la figura 14 se observan los valores de $FRCK_{50}$ de las poblaciones de época de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, siendo éstos 12.5X, 18.3X, 19.6X y 30.4X, respectivamente; mientras que para la época de lluvias del 2007 y 2009 los factores de resistencia fueron 20.2X y 19.6X. De acuerdo a estos criterios las poblaciones adultas del mosquito de ambas épocas del año presentan alta resistencia al derribo a la permetrina.



Mazzarri y Georghiou (1995) como: alta resistencia cuando el valor de $FR > 10$, moderada resistencia cuando el valor de FR cae entre 5 y 10 y baja resistencia cuando el $FR < 5$.

Figura 14. Concentración knock-down media (CK_{50}), de las poblaciones de *Ae. aegypti* a permetrina.

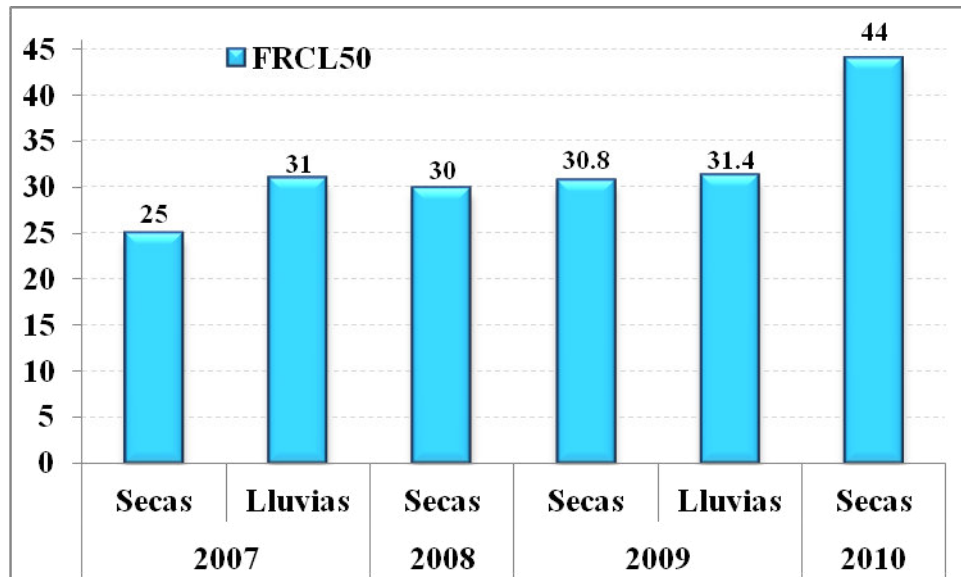
6.2.2 CL₅₀ para permetrina en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

Los resultados de toxicidad con base en la CL₅₀, se calculan registrando la mortalidad a las 24 horas de haber sido expuestos al insecticida y transferidos los mosquitos a vasos de recuperación libres de insecticida. No se encontró diferencia significativa entre los valores de CL₅₀ para permetrina entre las poblaciones bajo estudio.

Tabla 4. Valores de CL₅₀ en µg/botella de permetrina sobre adultos de *Ae. aegypti* de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

Población		CL ₅₀	(LC95%)
2007	Secas	7.19	5.96-8.59
	Lluvias	8.94	6.99-11.26
2008	Secas	8.57	6.76-10.59
2009	Secas	8.64	6.51-10.23
	Lluvias	8.81	6.62-10.55
2010	Secas	12.4	10.33-14.49

Los valores de FRCL₅₀ para cada población se muestran en la figura 15. Los resultados correspondientes a la temporada de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, fueron 25X, 30X, 30.8X y 44X, respectivamente. Para las poblaciones de época de lluvias de los años 2007 y 2009, fueron 31x y 31.4X. Los valores de FRCL₅₀ indican una alta resistencia post-recuperación a la permetrina.



Criterios propuesto por Mazzarri y Georghiou (1995) : alta resistencia cuando el valor de FR > 10, moderada resistencia cuando el valor de FR cae entre 5 y 10 y baja resistencia cuando el FR < 5.

Figura 15. Concentración letal media (CL₅₀), de las diferentes poblaciones de *Ae. aegypti* a permetrina.

6.2.3 Tiempo knock-down medio (TCK₅₀) y Tiempo letal medio (TL₅₀) de poblaciones de *Ae. aegypti* ante permetrina.

Los valores de TCK₅₀ y TL₅₀ se muestran en tabla 5. Estos valores están representados en horas:minutos (hr:min). Los valores de TCK₅₀ en las poblaciones de época de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, fueron de 0:27, 0:31, 0:38, 0:21 respectivamente; mientras que para la época de lluvias del 2007 y 2009 fueron 0:25, 0:32, respectivamente. Comparando los límites de confianza (95%) para los valores de TCK₅₀ de cada población, se encontró traslape entre los mismos, indicando que no existe diferencia significativa. Los valores de TL₅₀ para las poblaciones de época de secas de

los años 2007, 2008, 2009 y 2010, fueron de 25:03, 31:59, 50:38, 17:48 respectivamente; mientras que para la época de lluvias del 2007 y 2009 fueron 23:02, 35:29. El valor de TL₅₀ presentado por la población de la época de secas del 2010 solo presenta traslape con el valor de la población de secas del 2007 y es diferente significativamente al resto de las poblaciones.

Tabla 5. Valores de TCK₅₀ y TL₅₀ en horas y minutos obtenidos para cada población de *Ae. aegypti* ante permetrina.

Población		TCK ₅₀ hr:min	(LC95%)	TL ₅₀ hr:min	(LC95%)
2007	Secas	0:27	0:20-0:33	25:03	12:59-44:11
	Lluvias	0:25	0:20-0:29	23:02	15:11-31:46
2008	Secas	0:31	0:26-0:33	31:59	23:29-42:23
2009	Secas	0:38	0:35-43:04	50:38	40:48-61:41
	Lluvias	0:32	0:27-0:36	35:29	30:15-39:45
2010	Secas	0:21	0:18-0:24	17:48	13:22-21:56

6.3. Susceptibilidad a deltametrina.

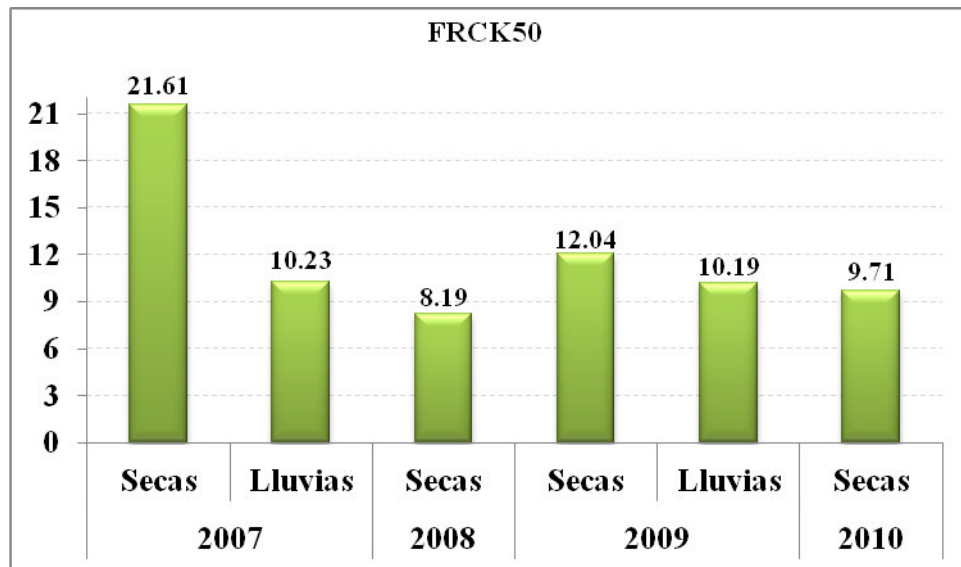
6.3.1 CK₅₀ para deltametrina en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

Los resultados de CK₅₀ en poblaciones adultas de *Ae. aegypti* del poblado de Chuburná de Hidalgo, expuestas a deltametrina se muestran en la tabla 6. En la temporada de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, los valores de CK₅₀ fueron 0.45, 0.17, 0.25, 0.20, respectivamente. En las poblaciones de época de lluvias de los años 2007 y 2009, los valores fueron 0.21, 0.21, respectivamente. Los límites de confianza del valor de CK₅₀ de la población de secas del 2007 no presenta traslape con respecto a los valores de CK₅₀ del resto de las poblaciones.

Tabla 6. Valores de CK₅₀ en µg/botella de deltametrina sobre adultos de *Ae. aegypti* de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

Población		CK ₅₀	(LC95%)
2007	Secas	0.45	0.35-0.56
	Lluvias	0.21	0.18-0.29
2008	Secas	0.17	0.13-0.22
2009	Secas	0.25	0.21-0.28
	Lluvias	0.21	0.17-0.29
2010	Secas	0.20	0.16-0.25

Se calculó el factor de resistencia con los valores de CK_{50} ($FRCK_{50}$) para cada población, esto al dividir el valor de CK_{50} de la población en estudio y el de la cepa susceptible. En la Figura 16 se observan los valores de $FRCK_{50}$ en las poblaciones de época de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, siendo éstos: 21.61X, 8.19X, 12.4X y 9.71X, respectivamente; mientras que para la época de lluvias del 2007 y 2009 los factores de resistencia fueron 10.23X y 10.19X. De acuerdo al criterio mencionado anteriormente para caracterizar la resistencia en las poblaciones, todas las poblaciones estudiadas presentan resistencia al derribo a la deltametrina a excepción de las poblaciones de secas del 2008 y 2010, cuyos valores indican resistencia moderada.



Criterios propuesto por Mazzarri y Georghiou (1995): alta resistencia cuando el valor de $FR > 10$, moderada resistencia cuando el valor de FR cae entre 5 y 10 y baja resistencia cuando el $FR < 5$.

Figura 16. Concentración knock-down media (CK_{50}) de las diferentes poblaciones de *Ae. aegypti* a deltametrina.

6.3.2 CL₅₀ para deltametrina en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

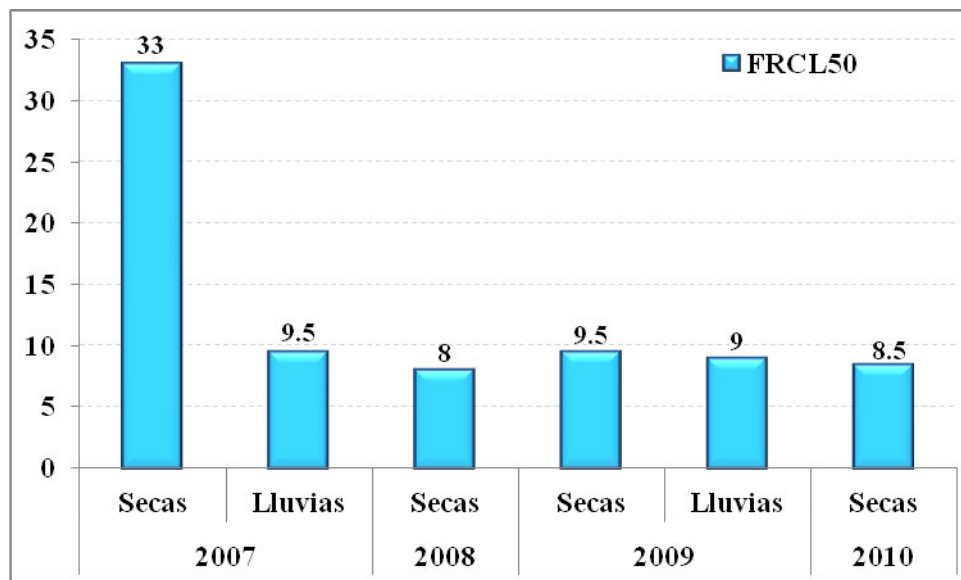
Los resultados de toxicidad con base a la CL₅₀, se muestra en la tabla 7. Las poblaciones de mosquitos adultos de época de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, mostraron valores de 0.468, 0.162, 0.191, respectivamente; mientras que para la época de lluvias del 2007 y 2009 mostraron valores de 0.19 y 0.180, respectivamente. De acuerdo a los límites de confianza (95%), el valor de CL₅₀ para deltametrina de la época de secas del año 2007, fue la única que no mostró traslape con respecto al resto de las poblaciones, indicando diferencia significativa.

Tabla 7. Valores de CL₅₀ para deltametrina en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Chuburná de Hidalgo, en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

Población		CL ₅₀	(LC95%)
2007	Secas	0.468	0.41-0.49
	Lluvias	0.19	0.16-0.23
2008	Secas	0.162	0.12-0.21
2009	Secas	0.191	0.18-0.21
	Lluvias	0.180	0.17-0.19
2010	Secas	0.177	0.15-0.20

Los valores de FRCL₅₀ para cada población se muestran en la figura 17. Los resultados correspondientes a la temporada de secas de los años 2007, 2008, 2009 y

2010, fueron 33X, 8X, 9.5X y 8.5X, respectivamente. Para las poblaciones de época de lluvias de los años 2007 y 2009, fueron 9.5X y 9X, respectivamente. De acuerdo al criterio de Mazzarri y Georghiou (1995) los valores de FRCL₅₀ indican que las poblaciones de la época de secas del año 2007 presentaron alta resistencia post-recuperación (33X, FR>10), mientras que para el resto de las poblaciones la resistencia fue moderada, con valores entre 8 y 9.5X.



Criterios propuesto por Mazzarri y Georghiou (1995) : alta resistencia cuando el valor de FR > 10, moderada resistencia cuando el valor de FR cae entre 5 y 10 y baja resistencia cuando el FR < 5.

Figura 17. Concentración letal media (CL₅₀), de las diferentes poblaciones de *Ae. aegypti* a deltametrina.

6.3.3 Tiempo knock-down medio (TCK₅₀) y Tiempo letal medio (TL₅₀) ante deltametrina en las diferentes poblaciones de *Ae.aegypti*.

Los valores de TCK₅₀ y TL₅₀ se muestran en tabla 8. Estos valores están representados en horas:minutos (hr:min). Los valores de TCK₅₀ en las poblaciones de época de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, fueron de 0:15, 0:30, 0:44, 0:32 respectivamente; mientras que para la época de lluvias del 2007 y 2009 fueron 0:25, 0:42. Comparando los límites de confianza del 95 % para los valores de TCK₅₀ de cada población, no se encontró traslape en los valores correspondientes a la época de secas del 2007 y 2009 con respecto a los valores del resto de las poblaciones, lo que indica que hay diferencia significativa entre los mismos. Por otra parte, Los valores de TL₅₀ para las poblaciones de época de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, fueron : 1:40, 50:47, 66:06, 32:43, respectivamente ; mientras que para la época de lluvias del 2007 y 2009 fueron 29:09, 50:47. Los valores de TL₅₀ para las poblaciones de la época de secas y lluvias del 2007 no presenta traslape entre sus límites de confianza, tampoco con el resto de las poblaciones, lo que indica diferencia significativa. Los valores de los límites de confianza dados por la población de secas del 2010 de la misma forma, no presenta traslape con ninguna población excepto con los obtenidos para la época de lluvias del 2007.

Tabla 8. Valores de TCK₅₀ y TL₅₀ en horas y minutos obtenidos para cada población de *Ae. aegypti* ante deltametrina.

Población		TCK ₅₀	(LC95%)	TL ₅₀	(LC95%)
2007	Secas	0:15	0:11-0:19	1:40	0:00-6:00
	Lluvias	0:25	0:20-0:30	29:09	25:10-33:25
2008	Secas	0:30	0:22-0:35	50:47	46:22-58:46
2009	Secas	0:44	0:40-0:49	66:06	60:58-73:55
	Lluvias	0:42	0:39-0:46	50:47	42:41-64:44
2010	Secas	0:32	0:24-0:39	32:43	27:03-39:15

6.4 Susceptibilidad a fenotrina.

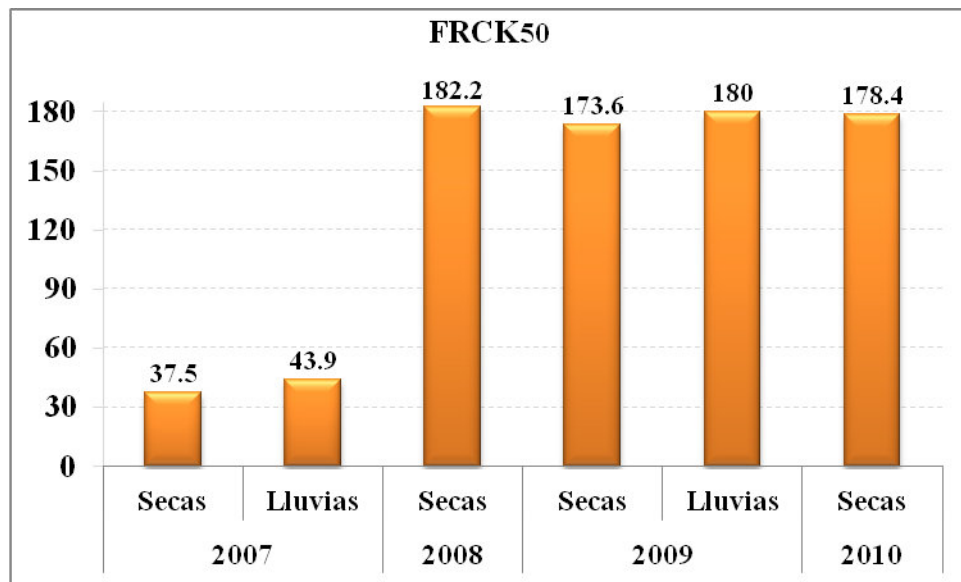
6.4.1 CK₅₀ para fenotrina en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

En la tabla 9 se muestran los valores de CK₅₀ en µg/botella. Los valores de CK₅₀ de las poblaciones de las temporadas de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010 fueron: 16.5, 80.20, 76.42 y 78.5, respectivamente. Las poblaciones de época de lluvias de los años 2007 y 2009, mostraron valores de 19.34, 79.23. Los valores de CK₅₀ para fenotrina nos indican que existe traslape entre los límites de confianza (95%) de las poblaciones de época de lluvias y secas del año 2007, mas no con respecto al resto de las poblaciones. Existe traslape entre los límites de confianza de las poblaciones de época de secas de los años 2008, 2009 y 2010, al igual que los valores para la población de lluvias del 2009.

Tabla 9. Valores CK₅₀ en µg/botella de fenotrina sobre adultos de *Ae. aegypti* de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

Población		CK ₅₀	(LC95%)
2007	Secas	16.5	13.20-22.1
	Lluvias	19.34	17.31-21.41
2008	Secas	80.2	76.43-85.10
2009	Secas	76.42	72.33-79.89
	Lluvias	79.23	75.00-83.54
2010	Secas	78.5	72.80-85.32

Se calculó el factor de resistencia con los valores de CK_{50} ($FRCK_{50}$) para cada población, esto al dividir el valor de CK_{50} de la población en estudio y el de la cepa susceptible. En la figura 18 se observan los valores de $FRCK_{50}$ de las poblaciones de época de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, siendo éstos: 37.5X, 182.2X, 173.6X y 178.4X, respectivamente; mientras que para la época de lluvias del 2007 y 2009 los factores de resistencia fueron 43.9X y 180X. De acuerdo a los criterios mencionados anteriormente, las poblaciones presentan resistencia al derribo a la fenotrina.



Criterios propuesto por Mazzari y Georghiou (1995): alta resistencia cuando el valor de $FR > 10$, moderada resistencia cuando el valor de FR cae entre 5 y 10 y baja resistencia cuando el $FR < 5$.

Figura 18. Concentración knock-down media (CK_{50}), de las poblaciones de *Ae. aegypti* a fenotrina.

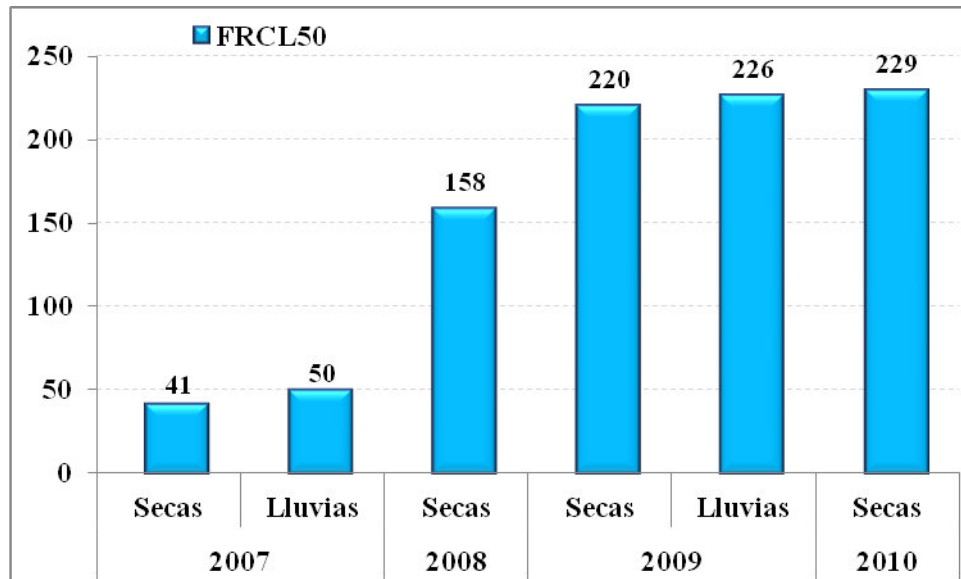
6.4.2 CL₅₀ para fenotrina en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

Los resultados de susceptibilidad a las 24h (CL₅₀), se muestra en la tabla 10. Las poblaciones de mosquitos adultos de época de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, mostraron valores de CL₅₀ de 14.3, 78, 74.4 y 78.32 µg/botella, respectivamente; Mientras que para las poblaciones de época de lluvias del 2007 y 2009 mostraron los valores fueron de 17.6 y 77.0, respectivamente. De acuerdo a los límites de confianza (95%), el valor de CL₅₀ para fenotrina de la época de secas del año 2007 no mostró traslape con respecto a los límites de confianza de los valores de CL₅₀ del resto de las poblaciones, indicando diferencia significativa. Los valores de CL₅₀ para fenotrina fueron significativamente iguales para las poblaciones de las épocas de lluvias y secas del año 2007, pero diferentes con respecto al resto de las poblaciones. Los valores de CL₅₀ de las poblaciones de secas del 2008, 2009 y 2010 y de lluvias 2009 no presentaron diferencia significativa.

Tabla 10. Valores de CL₅₀ para deltametina en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Chuburná de Hidalgo, en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos épocas, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

Población		CL ₅₀ µg/bot.	(LC95%)
2007	Secas	14.3	10.21-18.32
	Lluvias	17.6	11.82-24.63
2008	Secas	78.0	74.5-81.9
2009	Secas	75.4	71.2-80.01
	Lluvias	77.0	72.51-81.08
2010	Secas	78.3	74.58-82.95

Los valores de FRCL₅₀ para cada población se muestran en la figura 19. Los datos correspondientes a la temporada de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, fueron 41X, 158X, 220X y 229X, respectivamente. Para las poblaciones de época de lluvias de los años 2007 y 2009, fueron 50X y 226X. De acuerdo a los valores obtenidos todas las poblaciones presentan resistencia post-recuperación a la fenotrina



Criterios propuesto por Mazzari y Georghiou (1995): alta resistencia cuando el valor de FR > 10, moderada resistencia cuando el valor de FR cae entre 5 y 10 y baja resistencia cuando el FR < 5.

Figura 19. Concentración letal media (CL₅₀), de las diferentes poblaciones de *Ae. aegypti* a fenotrina.

6.4.3 Tiempo knock-down medio (TCK₅₀) y Tiempo letal medio (TL₅₀) de poblaciones de *Ae. aegypti* ante fenotrina.

En la tabla 11 se muestran los valores de TCK₅₀ en las poblaciones de época de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, estos fueron 0:37, 0:53, 0:60, 0:62 de respectivamente; mientras que para la época de lluvias del 2007 y 2009 fueron 0:45 y 0:58. Comparando los límites de confianza del 95 % para los valores de TCK₅₀ de cada población, no se encontró traslape en los valores correspondientes a la época de secas y lluvias del 2007 con respecto a los valores del resto de las poblaciones, lo que indica que hay diferencia significativa entre los mismos. Por otra parte, los valores de TL₅₀ para las poblaciones de época de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, fueron:

26:00, 32:52, 40:25, 38:31, respectivamente; mientras que para la época de lluvias del 2007 y 2009 fueron 29:05 y 35:22. Los valores de TL₅₀ para las poblaciones de la época de secas del 2007 no presenta traslape entre sus límites de confianza con el resto de las poblaciones, lo que indica diferencia significativa. Los valores de los límites de confianza dados por el resto de las poblaciones si presentan traslape entre ellos lo que indica que no existe diferencia significativa entre los valores de TL₅₀.

Tabla 11. Valores de TCK₅₀ y TL₅₀ en horas y minutos obtenidos para cada población de *Ae. aegypti* ante fenotrina.

Población		TCK ₅₀ hr:min	(LC95%)	TL ₅₀ hr:min	(LC95%)
2007	Secas	0:37	0:30-0:40	26:00	22:00-34:14
	Lluvias	0:45	0:40-0:50	29:05	25:31-34:26
2008	Secas	0:53	0:48-0:60	32:52	28:39-35:23
2009	Secas	0:60	0:55-0:63	40:25	38:28-43:31
	Lluvias	0:58	0:52-0:62	35:22	30:35-39:35
2010	Secas	0:62	0:58-0:66	38:31	36:23-41:46

6.5. Análisis de varianza con diseño de bloques al azar y prueba de Tukey con valores de FRCK₅₀ y FRCL₅₀ mostrados por poblaciones adultas *Ae. aegypti* recolectadas en Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán y correspondientes a época de lluvias y secas del año 2007 al 2010.

A fin de encontrar diferencia significativa entre las poblaciones de adultos recolectadas en época de lluvias y secas respecto a los niveles de resistencia al derribo o post-recuperación, se realizó un ANOVA ($\alpha = 0.05$) con diseño de bloques al azar y

prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) con los valores de FRCK50 y FRCL50 mostrados por cada población.

En la tabla 12 se muestran los valores del ANOVA, donde los tratamientos están representados por las épocas, lluvias o secas, y los bloques por los valores de FRCK50 correspondientes para los insecticidas probados. Se encontró diferencia significativa entre los valores de FRCK50 mostrados por las poblaciones adultas de *Ae. aegypti* de época de secas con respecto a las poblaciones lluvias ($p < 0.05$).

Tabla 12. Análisis de varianza con valores de FRCK50 mostrados por poblaciones adultas de *Ae. aegypti* pertenecientes a época de lluvias y secas del año 2007 al 2010.

Factor de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F	P>F
EPOCAS	5	1295.984375	2459.196777	0.9056	0.515
FRCK50	2	70291.648438	35145.8242219	12.9424	0.002
ERROR	10	27155.515625	2715.9424		
TOTAL	17	109743.148438			

Coefficiente de variación 78.5%.

Para identificar cuales poblaciones difieren en los niveles de resistencia al derribo, se realizó la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los tratamientos uno (secas 2007, tres (secas 2008), cuatro (secas 2009) y seis (secas 2010), corresponden a las épocas de secas, mientras los tratamientos dos (lluvias 2007) y cinco (lluvias 2009) a las épocas de lluvias, siendo las repeticiones (tres) los valores de FRCK50. Las poblaciones de adultos de época de lluvias del 2007 y 2009 resultaron diferentes significativamente en los niveles de resistencia al derribo de poblaciones de adultos pertenecientes a la época de secas del 2008, 2009 y 2010 (tabla 13).

Tabla 13. Tabla de medias de Prueba de Tukey con valores de FRCK50 mostrados por poblaciones adultas de *Ae. aegypti* pertenecientes a época de lluvias y secas del año 2007 al 2010.

Tratamiento	Media	
4	50.0000	*A
1	41.0000	AB
2	31.0000	B
5	30.0000	B
3	9.0000	C
6	8.0000	C

Nivel de significancia = 0.05. Tukey = 9.0182. Valores de tablas <0.05>, <0.01> = 4.42, 5.45

*diferente letra indica diferencia significativa entre los tratamientos.

Mismo análisis se realizó para identificar diferencia significativa entre los niveles de resistencia post-recuperación de las poblaciones bajo estudio. Los resultados del análisis de varianza se muestran en la tabla 14, donde se observa diferencia significativa entre los valores de FRCL50 mostrada por cada población.

Tabla 14. Análisis de varianza con valores de FRCL50 mostrados por poblaciones adultas de *Ae. aegypti* pertenecientes a época de lluvias y secas del año 2007 al 2010.

Factor de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	P>F
EPOCAS	5	8484.81	1696.96	0.9861	0.527
FRCL50	2	54480.25	27240.07	15.8296	0.001
Error	10	17208.30	1720.83		
Total	17	80173.26			

Coefficiente de variación = 75.4%

Se encontró que las poblaciones de adultos de *Ae. aegypti* de la época de lluvias del 2007 y 2009, fueron diferentes significativamente en los niveles de resistencia al derribo a las correspondientes a la época de secas del 2008, 2009 y 2010 (tabla 15).

Tabla 15. Tabla de medias de Prueba de Tukey con valores de FRCL₅₀ mostrados por poblaciones adultas de *Aedes aegypti* pertenecientes a época de lluvias y secas del año 2007 al 2010.

Tratamiento	Media	
4	43.9	*A
1	37.9	A
2	20.2	B
5	18.2	BC
3	10.2	CD
6	8.2	D

Nivel de significancia: 0.05. Tukey: 12.35. Valores de tablas: <0.05>, <0.01> = 4.28, 5.20.

*diferente letra indica diferencia significativa entre los tratamientos.

6.6 Resultados de pruebas bioquímicas.

6.6.1. Caracterización de mecanismos enzimáticos de resistencia encontrados en larvas de *Ae. aegypti* que supervivieron a la exposición con CL_{50} de temefos, pertenecientes a Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos temporadas climáticas de los años 2007 al 2010.

6.6.1.1 Umbral de resistencia.

En el bioensayo enzimático con la cepa susceptible se obtiene un valor máximo de absorbancia para cada enzima, dichos valores nos permiten calcular el umbral de resistencia en cada población. Dicho umbral, se determina calculando el porcentaje de individuos que sobrepasan el valor máximo de absorbancia observado en la cepa susceptible. El porcentaje nos permite clasificar la actividad enzimática como no alterada, cuando el porcentaje es menor al 15%, incipientemente alterada, si el porcentaje cae entre el 15% y 50% y alterada si sobrepasa el 50% (Montella et al. 2007).

En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos siguiendo el criterio de Montella et al. (2007). De acuerdo a la clasificación, las enzimas α -esterasas se encuentran alteradas tanto en época de secas como en época de lluvias. En la época de secas de los años 2008, 2009 y 2010 se encontraron valores del 100% de individuos por encima del valor máximo dado por la cepa de referencia, mientras que en la época de secas y lluvias del 2007 se presentaron porcentajes de 96 y 93, respectivamente. Las β -esterasas se presentaron incipientemente alterados en época de secas de los años 2007, 2008, 2009 y 2010, con porcentajes de 26 para los primeros tres años, y 30 para el 2010. Las MFO se mostraron alteradas únicamente en la época de secas del 2009, mientras que en la época de secas de los años 2007, 2008 y 2010, así como en la época

de lluvias de los años 2007 y 2009, se encontraron incipientemente alteradas, con porcentajes de 20, 46 y 46 respectivamente para época de secas y para la época de lluvias 20 y 7 por ciento. Las GST se mostraron alteradas tanto en época de secas como en lluvias de todos los años muestreados. Aunque se encontró alterado el mecanismo de GST en ambas épocas, los porcentajes máximos para este mecanismo enzimático se encontraron en la época de secas (2007-63%, 2008-73%, 2009-66%, 2010-80%), en tanto en la época de lluvias se exhibieron porcentajes iguales o ligeramente menores (2007-60%, 2009-66%).

Tabla 16. Porcentaje de individuos *Ae. aegypti* que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans al tener selección previa con temefos.

Población	α -esterasas	β -est	MFO	GST
Secas 2007	96	26	30	63
Lluvias 2007	93	0	20	60
Secas 2008	100	26	46	73
Secas 2009	100	26	50	66
Lluvias 2009	100	0	7	73
Secas 2010	100	30	40	80

Clasificación de la actividad enzimática de acuerdo a Montella et al. 2007: no alterada, (blanco) cuando los porcentajes fueron menores al 15%, incipientemente alterada, (gris claro) los porcentajes están entre el 15% y 50% y alterada (gris oscuro) si sobrepasan el 50%.

6.6.1.2. Análisis y comparaciones de medias de absorbancia obtenidas entre las poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* de época de secas y lluvias expuestas a temefos.

Los valores de absorbancia se sometieron a un análisis de varianza y comparación múltiple de medias, prueba de Tukey con un nivel de significancia $p \leq 0.05$. Las comparaciones se realizaron entre los individuos de cada población contra los pertenecientes a la cepa de referencia New Orleans tabla (tabla 17).

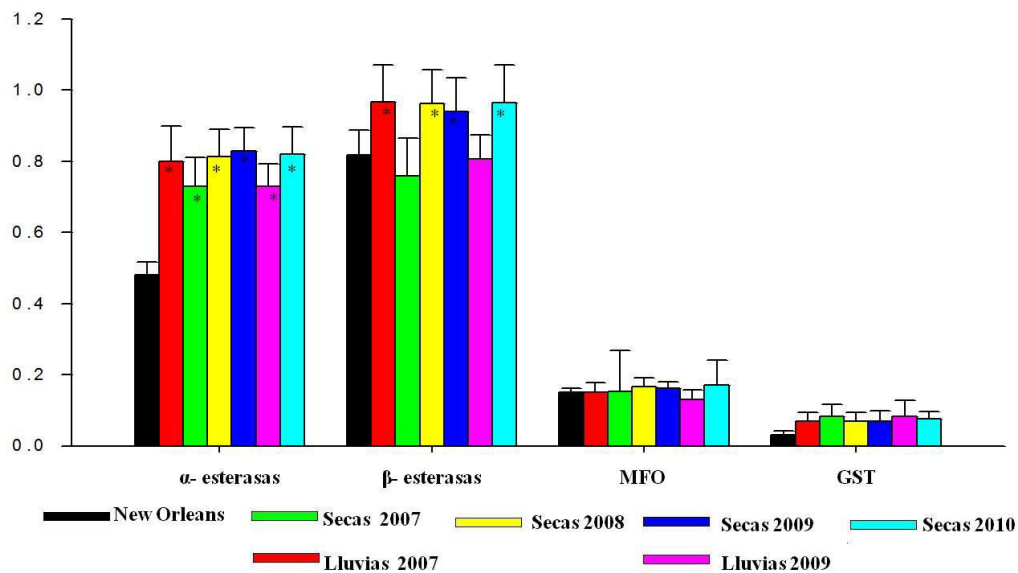
Tabla 17. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas mediante análisis de varianza, utilizando absorbancias mostradas por mosquitos *Ae. aegypti* (L.) que sobrevivieron a la exposición con temefos y comparación de medias con respecto a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$).

población	α -esterasas		β -esterasas		MFO		GST	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
New Orleans	0.480 ^a	0.036	0.818 ^a	0.070	0.150 ^a	0.012	0.032 ^a	0.009
Secas 2007	0.800 ^b	0.100	0.968 ^b	0.103	0.150 ^a	0.027	0.068 ^a	0.026
Lluvias 2007	0.730 ^c	0.082	0.760 ^a	0.106	0.154 ^a	0.114	0.082 ^a	0.035
Secas 2008	0.814 ^d	0.075	0.962 ^c	0.095	0.167 ^a	0.023	0.070 ^a	0.024
Secas 2009	0.829 ^e	0.066	0.939 ^d	0.095	0.163 ^a	0.018	0.069 ^a	0.030
Lluvias 2009	0.730 ^f	0.062	0.807 ^a	0.069	0.130 ^a	0.027	0.084 ^a	0.043
Secas 2010	0.820 ^g	0.076	0.965 ^c	0.105	0.171 ^a	0.070	0.076 ^a	0.021

Letras diferentes significa diferencia significativa

Las absorbancias medias arrojadas por el análisis estadístico fueron graficadas como se muestra en la figura 20. Las enzimas α -esterasas en las poblaciones de época de secas y lluvias de todos los años, mostraron diferencia significativa con respecto a la cepa susceptible. En el caso de las β -esterasas, se encontró diferencia significativa con

respecto a la cepa susceptible en la época de secas del 2007, 2008 y 2009, mientras que en la época de lluvias no se encontró diferencia significativa. Con respecto a las enzimas oxidadas y GST, no se encontró diferencia significativa entre los valores medios de absorbancia de ninguna de las poblaciones con respecto a la cepa susceptible.



Diferencia significativa en los valores de absorbancias medias de cada población por encima de la cepa susceptible se indica con asterisco.

Figura 20. Valores medios de absorbancia en larvas *Ae. aegypti* (L.) de la cepa susceptible New Orleans y Chuburná de Hidalgo en la Ciudad de Mérida, Yucatán, que sobrevivieron a la exposición con temefos, correspondientes a dos épocas del año, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

6.6.2. Caracterización de mecanismos enzimáticos de resistencia encontrados en adultos de *Ae. aegypti* expuestas a la CL_{50} de permetrina, pertenecientes a Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos temporadas climáticas de los años 2007 al 2010.

6.6.2.1 Umbral de resistencia.

De acuerdo a la clasificación propuesta por Montella et al. 2007, los adultos que sobrevivieron a la exposición con permetrina mostraron principalmente alterado el mecanismo de α -estresas (Tabla 18). En la época de secas de los años 2007 y 2008, se mostraron porcentajes del 100% de individuos que sobrepasaron el valor máximo dado por la cepa susceptible para esta enzima, del mismo modo que las poblaciones de época de lluvias del año 2007 y 2009. Un porcentaje de 80 y 96, resultaron para la época de secas del 2009 y secas del año 2010, respectivamente. Las β -esterasas se observaron alteradas en la época de secas de los años 2009 y 2010. Incipientemente alterada se encontraron en la época de secas del 2007 con un porcentaje del 26% de los individuos que rebasaron el valor máximo de absorbancia presentado por la cepa susceptible para estas enzimas. Las poblaciones correspondientes a la época de secas del 2008 y lluvias del 2007 y 2009, las β -esterasas se mostraron como no alteradas. Las oxidasas se observaron como no alteradas, en la época de lluvias se encontraron porcentajes del 10% (año 2007) y 13% (año 2009), mientras que en las épocas de secas el porcentaje fue 0, excepto en el año 2010 con el 3%. El mecanismo de las GST se exhibió alterado en la época de secas del año 2007 y 2010, con porcentajes de 76 y 100, respectivamente. Este mecanismo se presentó incipientemente alterado en época de lluvias del 2009. En contraste con lo anterior, en la época de secas del 2009 y lluvias del 2007 y 2008 dicho

mecanismo se manifestó como no alterado, con porcentajes de 10, 0 y 0, correspondientemente

Tabla 18. Porcentaje de adultos *Ae.aegypti* que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans al tener selección previa con permetrina.

Población	α -esterasas	β -est	MFO	GST
Secas 2007	100	26	0	76
Lluvias 2007	100	0	10	0
Secas 2008	100	0	0	0
Secas 2009	80	96	0	10
Lluvias 2009	100	0	13	23
Secas 2010	96	70	3	100

Clasificación de la actividad enzimática de acuerdo a Montella et al. 2007: no alterada, (amarillo) cuando los porcentajes fueron menores al 15%, incipientemente alterada, (verde) los porcentajes están entre el 15% y 50% y alterada (naranja) si sobrepasan el 50%.

6.6.2.2 Análisis de varianza y comparación múltiple de medias.

En la tabla 19 se muestran los valores de absorbancia media de las poblaciones con respecto a la cepa susceptible, de acuerdo al análisis de varianza y la comparación múltiple de medias.

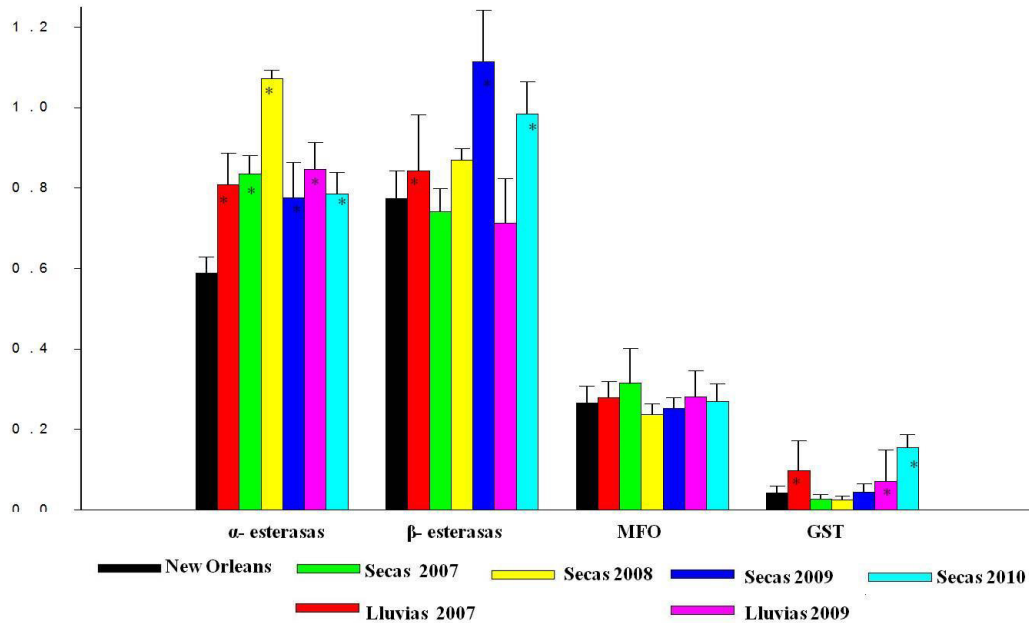
Tabla 19. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas mediante análisis de varianza, utilizando absorbancias mostradas por mosquitos *Ae. aegypti* que sobrevivieron a la exposición con permetrina y comparación de medias con respecto a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$).

población	permetrina							
	α -esterasas		β -esterasas		MFO		GST	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
New Orleans	0.588 ^a	0.040	0.772 ^a	0.070	0.264 ^a	0.043	0.042 ^a	0.016
Secas 2007	0.808 ^b	0.076	0.842 ^b	0.138	0.278 ^a	0.040	0.097 ^b	0.073
Lluvias 2007	0.835 ^c	0.045	0.740 ^c	0.057	0.313 ^a	0.086	0.026 ^a	0.011
Secas 2008	1.07 ^d	0.021	0.869 ^d	0.029	0.237 ^a	0.026	0.025 ^a	0.008
Secas 2009	0.776 ^c	0.087	1.113 ^e	0.129	0.251 ^a	0.026	0.043 ^a	0.021
Lluvias 2009	0.845 ^f	0.066	0.712 ^a	0.111	0.279 ^a	0.066	0.070 ^a	0.077
Secas 2010	0.784 ^g	0.053	0.984 ^f	0.079	0.268 ^a	0.043	0.154 ^c	0.032

Letras diferentes significa diferencia significativa

En la figura 21 se representan las absorbancias medias, se observa que las α -esterasas en las poblaciones que supervivieron a la exposición con permetrina de ambas épocas y todos los años muestreados, presentaron valores mayores significativos con respecto a la cepa de referencia. En la época de secas del 2007, 2009 y 2010, se encontró diferencia significativa de los valores de absorbancia promedio para las enzimas β -

esterasas siendo superiores con respecto a la cepa susceptible. Las oxidasas no presentaron diferencia significativa. Con referencia a las enzimas GST, las poblaciones correspondientes a la época de secas del 2007, 2010 y lluvias del 2009, presentan diferencia significativa y valores mayores por arriba de la cepa susceptible.



Diferencia significativa en los valores de absorbancias medias de cada población por encima de la cepa susceptible se indica con asterisco.

Figura 21. Valores medios de absorbancia en adultos *Ae. aegypti* de la cepa susceptible New Orleans y Chuburná de Hidalgo en la Ciudad de Mérida, Yucatán, que sobrevivieron a la exposición con permetrina, correspondientes a dos épocas del año, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

6.6.3 Caracterización de mecanismos enzimáticos de resistencia encontrados en adultos de *Ae. aegypti* expuestas a la CL_{50} de deltametrina, pertenecientes a Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos temporadas climáticas de los años 2007 al 2010.

6.6.3.1. Umbral de resistencia.

En la tabla 20 se aprecia que los adultos que sobrevivieron a la exposición con deltametrina, exhibieron el mecanismo de α -esterasas alterado en la época de secas del año 2007 y ambas épocas de lluvias muestreadas. Este mismo mecanismo se observó incipientemente alterado en la época de secas de los años 2008 y 2009 con porcentajes de 16 y 30, respectivamente, mientras que en la época de secas del año 2010, con un porcentaje de 13, se mostró no alterado. Las enzimas β -esterasas se encontraron alteradas únicamente en la época de secas del 2007 (83%), en contraste con las poblaciones restantes donde se observaron no alteradas. El mecanismo de las oxidasas fue categorizado como no alterado tanto en la época de lluvias como en la de secas de todos los años muestreados. El mecanismo de GST se encontró alterado solo en el año 2007 en la época de secas y lluvias. La época de secas del año 2008 y 2009 se mostró este mecanismo como no alterado con porcentajes de 6 y 10, respectivamente. Mientras que esta enzima se exhibió incipientemente alterada en la época de lluvias del 2009 y secas del 2010, con porcentajes de 23 y 26, correspondientemente

Tabla 20. Porcentaje de adultos *Ae.aegypti* que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans al tener selección previa con deltametrina.

Población	α -esterasas	β -esterasas	MFO	GST
Secas 2007	100	83	0	60
Lluvias 2007	93	13	0	60
Secas 2008	16	0	0	6
Secas 2009	30	0	0	10
Lluvias 2009	96	0	0	23
Secas 2010	13	0	0	26

Clasificación de la actividad enzimática de acuerdo a Montella et al. 2007: no alterada, (amarillo) cuando los porcentajes fueron menores al 15%, incipientemente alterada, (verde) los porcentajes están entre el 15% y 50% y alterada (naranja) si sobrepasan el 50%.

6.6.3.2. Análisis de varianza y comparación múltiple de medias.

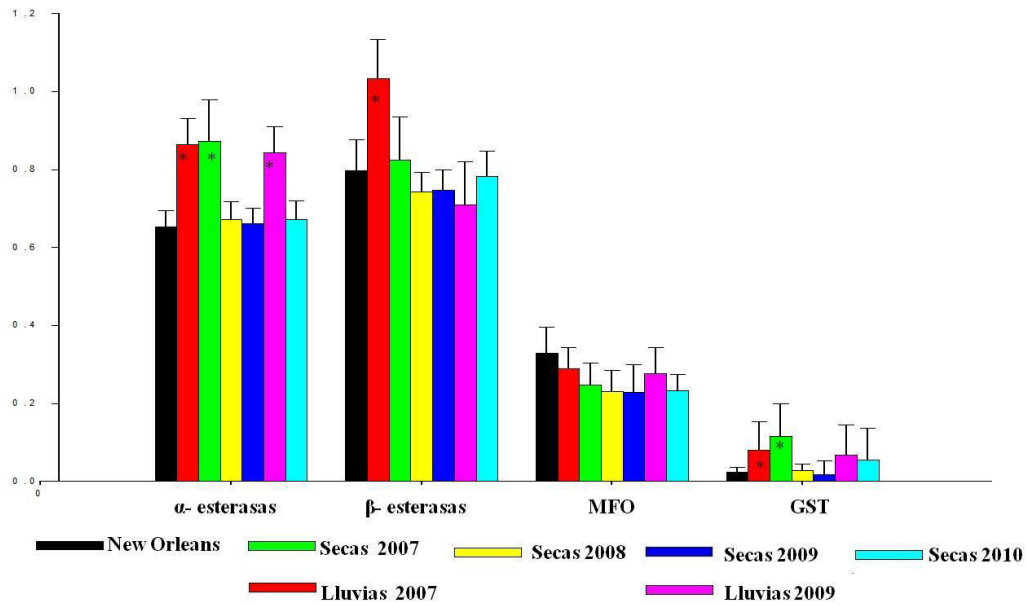
En la tabla 21 se muestran los valores de absorbancia media de las poblaciones con respecto a la cepa susceptible de acuerdo al análisis de varianza y la comparación múltiple de medias. Estas poblaciones supervivieron a la exposición con deltametrina

Tabla 21. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas mediante análisis de varianza, utilizando absorbancias mostradas por mosquitos *Ae. aegypti* que sobrevivieron a la exposición con deltametrina y comparación de medias con respecto a la cepa de referencia New Orleans. (Prueba Tukey $p \leq 0.05$).

población	deltametrina							
	α -esterasas		β -esterasas		MFO		GST	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
New Orleans	0.652 ^a	0.040	0.264 ^a	0.043	0.264 ^a	0.043	0.042 ^a	0.016
Secas 2007	0.865 ^b	0.067	1.034 ^b	0.099	0.288 ^a	0.054	0.079 ^b	0.073
Lluvias 2007	0.872 ^c	0.107	0.824 ^a	0.110	0.247 ^b	0.056	0.116 ^c	0.084
Secas 2008	0.672 ^a	0.047	0.742 ^a	0.050	0.231 ^c	0.054	0.028 ^a	0.016
Secas 2009	0.662 ^a	0.039	0.747 ^a	0.052	0.227 ^d	0.073	0.017 ^a	0.036
Lluvias 2009	0.842 ^d	0.067	0.709 ^b	0.111	0.277 ^c	0.066	0.067 ^a	0.078
Secas 2010	0.672 ^a	0.049	0.782 ^a	0.065	0.233 ^f	0.042	0.054 ^a	0.083

Letras diferentes significa diferencia significativa

La tabla anterior es representada en la figura 22. Las α -esterasas de las poblaciones correspondientes a la época de secas del 2007 y lluvias del 2007 y 2009 mostraron diferencia significativa por encima de la cepa susceptible. La población perteneciente a la época de secas del 2007 fue la única encontrada con diferencia significativa por encima de la media de la cepa susceptible. Se encontró diferencia significativa en los valores medios de absorbancia para las enzimas oxidadas de todas las épocas, sin embargo esta fue por debajo de la cepa susceptible. El mecanismo enzimático de las GST, se encontró alterado significativamente solo en época de lluvias y secas del 2007.



Diferencia significativa en los valores de absorbancias medias de cada población por encima de la cepa susceptible se indica con asterisco.

Figura 22. Valores medios de absorbancia en adultos *Ae. aegypti* de la cepa susceptible New Orleans y Chuburná de Hidalgo en la Ciudad de Mérida, Yucatán, que sobrevivieron a la exposición con deltametrina, correspondientes a dos épocas del año, secas y lluvias del año 2007 al 2010

6.6.4. Caracterización de mecanismos enzimáticos de resistencia encontrados en adultos de *Ae. aegypti* expuestos a la CL_{50} de fenotrina, pertenecientes a Chuburná de Hidalgo en Mérida, Yucatán, correspondientes a dos temporadas climáticas de los años 2007 al 2010.

6.6.4.1. Umbral de resistencia.

En la tabla 22 se muestra que los mecanismos enzimáticos que se encuentran alterados de acuerdo a Montella, et al. (2007), son las oxidasas en la época de secas de los años 2007 y 2009, con porcentajes de 63 y 56, respectivamente. Las enzimas encontradas como incipientemente alteradas fueron las α -esterasas en la época de secas de los años 2007 (23%), 2008 (46%), 2009 (40%), secas 2010 (30%) y lluvias del 2007(16%), mientras que en lluvias del 2009 (10%) se mostraron no alteradas. Las β -esterasas únicamente en época de secas del 2007 se encontraron incipientemente alteradas con un porcentaje de 20, mientras que en el resto de las temporadas muestreadas se encontraron como no alteradas. Las oxidasas en la época de secas de los años 2008 (16%) y 2010 (43%), así como en lluvias del 2007 (16%), mientras que en lluvias del año 2009 se observaron cómo no alteradas. Por otra parte, las GST exhibieron porcentajes entre 30 y 46, encontrando valores de 46% en la época de secas de los años 2008 y 2009, en la misma temporada pero del 2007 y 2010, 40 y 30%, respectivamente. En la época de lluvias de los años 2007 y 2009, presentaron valores del 30%.

Tabla 22. Porcentaje de adultos *Ae.aegypti* que sobrepasaron el umbral de tolerancia establecido por la cepa de referencia New Orleans al tener selección previa con fenotrina.

Población	α -esterasas	β -esterasas	MFO	GST
Secas 2007	23	20	63	40
Lluvias 2007	16	3	16	30
Secas 2008	46	0	43	46
Secas 2009	40	0	56	46
Lluvias 2009	10	3	3	30
Secas 2010	30	3	20	30

Clasificación de la actividad enzimática de acuerdo a Montella et al. 2007: no alterada, (amarillo) cuando los porcentajes fueron menores al 15%, incipientemente alterada, (verde) los porcentajes están entre el 15% y 50% y alterada (naranja) si sobrepasan el 50%.

6.6.4.2 Análisis de varianza y comparación múltiple de medias.

Los valores de absorbancia media de las poblaciones con respecto a la cepa susceptible de acuerdo al análisis de varianza y la comparación múltiple de medias, se muestran en la tabla 23. Estas poblaciones supervivieron a la exposición con fenotrina.

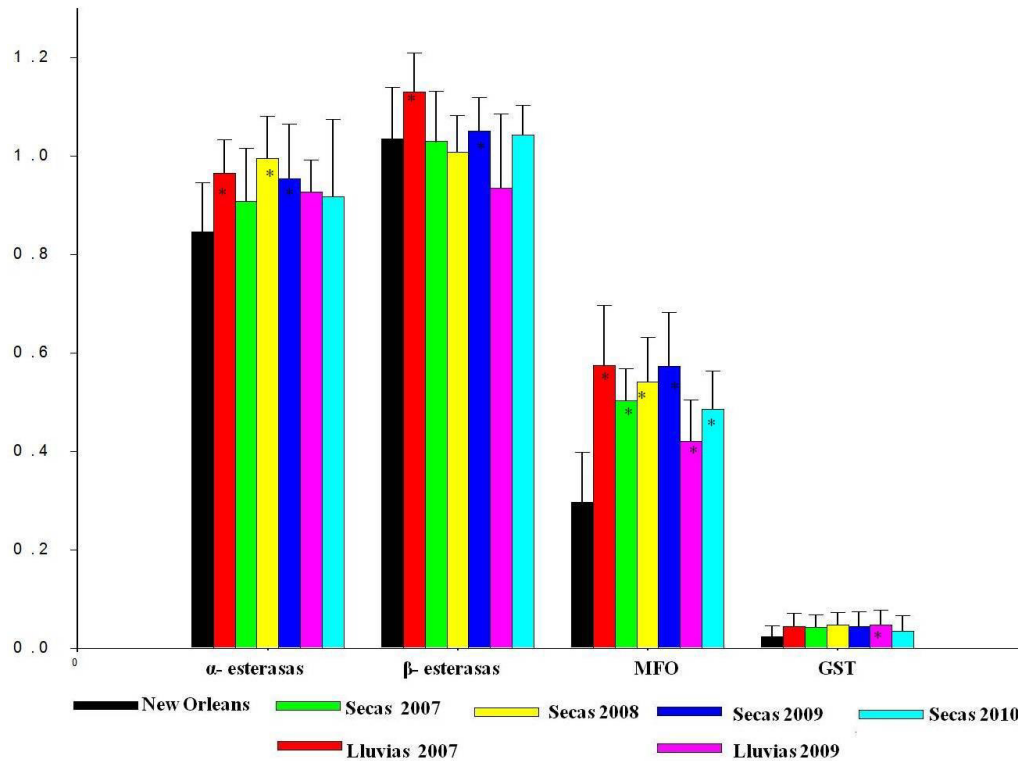
Tabla 23. Medias de absorbancia y desviaciones estándar obtenidas mediante análisis de varianza, utilizando absorbancias mostradas por mosquitos *Ae. aegypti* que sobrevivieron a la exposición con fenotrina y comparación de medias con respecto a la cepa de referencia New Orleans (Prueba Tukey $p \leq 0.05$).

población	fenotrina							
	α -esterasas		β -esterasas		MFO		GST	
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS
New Orleans	0.845 ^a	0.101	1.034 ^a	0.104	0.296 ^a	0.103	0.024 ^a	0.022
Secas 2007	0.964 ^b	0.069	1.130 ^b	0.078	0.574 ^b	0.123	0.045 ^a	0.026
Lluvias 2007	0.907 ^a	0.107	1.029 ^a	0.102	0.503 ^c	0.065	0.042 ^a	0.026
Secas 2008	0.995 ^c	0.084	1.008 ^a	0.073	0.541 ^d	0.091	0.047 ^a	0.027
Secas 2009	0.953 ^d	0.110	1.050 ^a	0.067	0.572 ^e	0.110	0.044 ^a	0.030
Lluvias 2009	0.927 ^a	0.064	0.935 ^c	0.150	0.421 ^f	0.084	0.048 ^a	0.029
Secas 2010	0.916 ^a	0.158	1.042 ^a	0.060	0.486 ^g	0.077	0.034 ^a	0.032

Letras diferentes significa diferencia significativa

En la figura 23 podemos observar que las poblaciones correspondientes a la época de secas de los años 2007, 2008 y 2009, presentaron diferencia significativa con valores medios por encima de los valores de la cepa de referencia. Las poblaciones pertenecientes a época de secas del 2007 y 2009 mostraron las β -esterasas con diferencia significativa por encima de los valores dados por la cepa susceptible. Las oxidasas

exhibieron diferencia significativa con valores por encima de los valores de la cepa susceptible, en ambas épocas, para todas las poblaciones bajo estudio. Para el mecanismo de GST no se encontró diferencia significativa con respecto a la cepa susceptible.



Diferencia significativa en los valores de absorbancias medias de cada población por encima de la cepa susceptible se indica con asterisco.

Figura 23. Valores medios de absorbancia en adultos *Ae. aegypti* de la cepa susceptible New Orleans y Chuburná de Hidalgo en la Ciudad de Mérida, Yucatán, que sobrevivieron a la exposición con fenotrina, correspondientes a dos épocas del año, secas y lluvias del año 2007 al 2010.

6.6.5. Regresión Línea Simple: valores de CL_{50} y medias de absorbancia.

Los valores medios de absorbancia correspondientes a cada enzima y su respectiva población, fueron correlacionados con la CL_{50} calculada para éstas. Lo anterior con la finalidad de encontrar si la variación en la CL_{50} de una época a otra puede estar correlacionada con los cambios en los valores de absorbancia media, es decir con cambios en la actividad enzimática. Una correlación significativa establecerá que el mecanismo enzimático está involucrado en la resistencia al insecticida. El coeficiente de correlación o R^2 mide la variación en la variable dependiente debido a la variación de la variable independiente. Se definió una significancia de 0.05.

En las tablas 24, 25, 26 y 27 se muestra la población con el correspondiente valor de CL_{50} y los valores medios de absorbancia enzimática resultado de los individuos que sobrevivieron a la CL_{50} de permetrina, deltametrina, fenotrina en adultos y temefos en larvas, respectivamente. No se encontró correlación significativa entre alguno de los mecanismos enzimáticos y la CL_{50} con excepción para β - esterases ante deltametrina en época de secas del 2007.

Tabla 24. CL₅₀, valores medios de absorbancia de enzimas y coeficiente de determinación de poblaciones de *Ae. aegypti* que supervivieron a la exposición con permetrina.

población	CL50 (µg/bot)	Valores medios de absorbancia			
		α	β	MFO	GST
Secas 2007	7.19	0.809	0.842	0.279	0.098
Lluvias 2007	8.94	0.835	0.741	0.314	0.027
Secas 2008	8.57	1.071	0.869	0.237	0.025
Secas 2009	8.64	0.776	1.113	0.252	0.044
Lluvias 2009	8.81	0.845	0.712	0.280	0.070
Secas 2010	12.40	0.785	0.984	0.269	0.155
R ²		0.05	0.085	0.001	0.381
Sig.		0.6	0.5	0.9	0.2

Tabla 25. CL₅₀, valores medios de absorbancia de enzimas y coeficiente de determinación de poblaciones de *Ae. aegypti* que supervivieron a la exposición con a deltametrina.

población	CL50 (µg/bot)	Valores medios de absorbancia			
		α	β	MFO	GST
Secas 2007	0.470	0.865	1.034	0.288	0.079
Lluvias 2007	0.190	0.872	0.824	0.247	0.116
Secas 2008	0.160	0.672	0.742	0.231	0.028
Secas 2009	0.190	0.662	0.747	0.227	0.017
Lluvias 2009	0.180	0.842	0.709	0.277	0.067
Secas 2010	0.170	0.672	0.782	0.233	0.054
R ²		0.26	0.89	0.52	0.09
Sig.		0.3	0.004	0.1	0.5

Tabla 26. CL₅₀, valores medios de absorbancia de enzimas y coeficiente de determinación de poblaciones de *Ae. aegypti* que sobrevivieron a la exposición con fenotrina.

población	CL50 (µg/bot)	α	β	MFO	GST
Secas 2007	14	0.964	1.130	0.574	0.045
Lluvias 2007	17.3	0.908	1.029	0.503	0.042
Secas 2008	54.4	0.995	1.008	0.541	0.047
Secas 2009	75.4	0.954	1.051	0.572	0.044
Lluvias 2009	77	0.927	0.935	0.421	0.048
Secas 2010	78	0.917	1.043	0.486	0.034
R ²		0.003	0.32	0.16	0.24
Sig.		0.9	0.2	0.4	0.7

Tabla 27. CL₅₀, valores medios de absorbancia de enzimas y coeficiente de determinación de poblaciones de *Ae. aegypti* que sobrevivieron a la exposición con temefos.

población	CL50 (µg/bot)	Valores medios de absorbancia			
		α	β	MFO	GST
Secas 2007	0.19	0.800	0.968	0.150	0.082
Lluvias 2007	0.09	0.730	0.760	0.154	0.070
Secas 2008	0.092	0.814	0.962	0.167	0.069
Secas 2009	0.1	0.829	0.939	0.163	0.084
Lluvias 2009	0.098	0.730	0.807	0.130	0.076
Secas 2010	0.095	0.820	0.965	0.171	0.068
R ²		0.02	0.14	0.04	0.03
Sig.		0.75	0.45	0.68	0.23

6.6.6. Presencia de mecanismos enzimáticos de resistencia de acuerdo a tres criterios: criterio de Montella et al. 2007, comparación múltiple de medias y regresión lineal simple con CL₅₀-valores medios de absorbancia.

En las siguientes tablas se muestran identificados (•) los criterios en cada población. El criterio de Montella et al. 2007, comparación múltiple de medias y regresión lineal simple con CL₅₀-valores medios de absorbancia, se identifican con el número I, II y III, respectivamente. En la tabla 27 se observa que para el mecanismo de α -esterasas el criterio I se encontró en todas las poblaciones en estudio. Para este mismo mecanismo, el criterio de II aplicó en las poblaciones de época de secas de los años 2008, 2009 y 2010. Para el mecanismo de GST, se ajustaron los criterios I y II, solo en época de secas de los años 2007 y 2010 (tabla 28).

Tabla 28. Tres criterios para definir la presencia de mecanismos enzimáticos en adultos de *Ae. aegypti* seleccionados con permetrina.

población	α			β			MFO			GST		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Secas 2007	•				•					•	•	
Lluvias 2007	•				•							
Secas 2008	•	•										
Secas 2009	•	•		•								
Lluvias 2009	•											
Secas 2010	•	•		•						•	•	

(I) Criterio de Montella et al; 2007. (II) Comparación Múltiple de Medias. (III) Regresión Lineal Simple.

En la tabla 29 se muestra que para adultos que supervivieron a la exposición con deltametrina, el mecanismo de las α -esterasas le correspondió los criterios I y II en las poblaciones de la época de secas del 2007 y 2010 y lluvias del 2007 y 2009. La población de época de secas del 2007 cumplió los tres criterios en el mecanismo de β -esterasas. En época de lluvias del 2009 se cumplen los criterios II y III. Para oxidasas se identifico el criterio II en las poblaciones de época de secas del 2008, 2009, 2010 y época de lluvias del 2007 y 2009. El mecanismo de GST en época de secas y lluvias del año 2007 cumplió el criterio I y II.

Tabla 29. Tres criterios para definir la presencia de mecanismos enzimáticos en adultos de *Ae. aegypti* seleccionados con deltametrina.

población	α			β			MFO			GST		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Secas 2007	●	●		●	●	●				●	●	
Lluvias 2007	●	●				●		●		●	●	
Secas 2008						●		●				
Secas 2009						●		●				
Lluvias 2009	●	●			●	●		●				
Secas 2010		●				●		●				

(I) Criterio de Montella et al; 2007. (II) Comparación Múltiple de Medias. (III) Regresión Lineal Simple.

En la tabla 30 se observa que para adultos que supervivieron a la exposición con fenotrina, el mecanismo de las α -esterasas cumple el criterio II en poblaciones de la época de secas de los años 2007, 2008, 2009. Para β -esterasas el criterio II se cumplió en poblaciones de época de secas del 2007. Las oxidasas cumplieron el criterio I en

poblaciones de época de secas de los años 2007 y 2008, mientras que el criterio II se cumple en todas las poblaciones bajo estudio. Para el mecanismo de GST se ajusto únicamente el criterio II en la población de época de lluvias del 2009.

Tabla 30. Tres criterios para definir la presencia de mecanismos enzimáticos en adultos de *Ae. aegypti* seleccionados con fenotrina.

población	α			β			MFO			GST		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Secas 2007		●			●		●	●				
Lluvias 2007								●				
Secas 2008		●						●				
Secas 2009		●					●	●				
Lluvias 2009								●			●	
Secas 2010								●				

(I) Criterio de Montella et al; 2007. (II) Comparación Múltiple de Medias. (III) Regresión Lineal Simple.

En la tabla 31 se observa que para larvas que supervivieron a la exposición con temefos, el mecanismo de las α -esterasas cumple con los criterios I y II en todas las poblaciones. Para β -esterasas el criterio II se cumple poblaciones de época de secas, más no en las de lluvias, el criterio I Y II, no se cumplen. Para las oxidasas el criterio I se ajusto en poblaciones de época de secas del 2009 únicamente. Para el mecanismo de GST se identificó el criterio I todas las poblaciones en estudio, es decir, en ambas épocas, no así los criterios II Y III.

Tabla 31. Tres criterios para definir la presencia de mecanismos enzimáticos en larvas de *Ae. aegypti* seleccionadas con temefos.

Población	α			β			MFO			GST		
	I	II	II	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Secas 2007	●	●			●					●		
Lluvias 2007	●	●								●		
Secas 2008	●	●			●					●		
Secas 2009	●	●			●		●			●		
Lluvias 2009	●	●								●		
Secas 2010	●	●			●					●		

(I) Criterio de Montella et al; 2007. (II) Comparación Múltiple de Medias. (III) Regresión Lineal Simple.

7. DISCUSION

Las poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* pertenecientes a dos épocas del año, secas y lluvias, correspondientes a la localidad de Chuburná de Hidalgo en la ciudad de Mérida, Yucatán mostraron en condiciones de laboratorio, resistencia al organofosforado temefos. Factores de resistencia en función de CL_{50} de la cepa susceptible New Orleans y de acuerdo a los criterios de Mazzarri y Georghiou (1995), colocaron a las poblaciones en estudio como resistentes a este insecticida, mostrando valores de $FRCL_{50} > 10X$, tanto en época de secas como en lluvias. Los ensayos bioquímicos en larvas que supervivieron a la exposición con temefos mostraron actividad enzimática elevada de α -esterasas, apoyada la presencia de este mecanismo al cumplir el criterio de Montella, 2007 y diferencia significativa en la comparación múltiple de medias respecto a la cepa susceptible. Mientras que el mecanismo de β -esterasas se encontró en poblaciones correspondientes a la época de secas de todos los años muestreados, no así en época de lluvias.

Diversos fenómenos climáticos se hacen presentes en la ciudad de Mérida, principalmente aquellos que involucran precipitación pluvial. Existen una vasta cantidad de reportes evaluando los daños por inundaciones durante el transcurso de un año. Cada año en la entidad Yucateca se desarrollan un promedio de 10 ciclones tropicales hasta convertirse en tormentas, de las cuales seis alcanzan el grado de huracanes y de ellos dos son de gran intensidad. Fenómenos climáticos en conjunto con los hábitos inadecuados de acumulación de basura en casas, representan un importante problema. Consecuencia

de lo anterior es el aumento de criaderos naturales y artificiales propicios para el desarrollo larval de *Ae. aegypti*. En Mérida, Yucatán se reportó que la presencia de las cubetas de plástico (5-10 litros) ubicadas en los patios fue consistente, por lo que se demostró que este tipo de criadero fue el más abundante y responsable de producir 34% del total de pupas (Manrique-Saide et al., 2008). La presencia de un gran número criaderos potenciales para este mosquito, se traduce en un intensivo control químico de las poblaciones larvarias. Tomando en cuenta que a partir de 1981 se aplicó intensivamente temefos como larvicida al 1%, conlleva a una presión de selección prolongada, esto podría explicar los valores altos de $FRCL_{50}$ a este organofosforado en las poblaciones estudiadas. En México, en los últimos años, los principales insecticidas utilizados para control del mosquito *Ae. aegypti*(L.), han sido el larvicida organofosforado temefos (Abate®) y el adulticida permetrina en mezcla con el sinergista butóxido de piperonilo (Aquareslin®) (NOM032-SSA-2002). Diversos reportes indican que el uso prolongado del organofosforado temefos por más de 30 años ha generado resistencia en poblaciones del vector *Ae. aegypti* (L.) (Bisset et al. 2004, Rodríguez et al. 2004, Montella et al. 2007) y aun en México donde se ha sugerido resistencia cruzada con permetrina mediada por esterasas por Flores et al. (2005, 2006, 2009).

En el presente estudio las poblaciones larvarias presentaron valores de $FRCL_{50} > 10$ a temefos (38X, 18.4X, 20X, 19X, 18X y 19.6X) y el mecanismo enzimático de desintoxicación de esterasas presente. Mismo caso de alta resistencia reporta Bisset y colaboradores en 2009, mostrando valores $FRCL_{50}$ de 24.16X y 191X en poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* del municipio de Soyapango en el Salvador, San Salvador. El valor de FR más alto encontrado en nuestra investigación fue de 38X a diferencia de los resultados encontrados por Bisset, donde el FR más alto es de 191 veces. Igualmente en 1995, Mazzarri y Georghiou en Venezuela encuentran poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes al temefos en las localidades de Coro y Maracay. También, Rodríguez y

colaboradores reportan en el 2010 resistencia a siete insecticidas organofosforados (entre ellos temefos) en larvas de Santiago de Cuba, colectadas en 2009 y su variación con respecto a un estudio previo en 1997. Respecto al estudio previo en 1997, se observó un aumento en la resistencia de las poblaciones larvarias, mostrando alta resistencia a temefos (26.94X) y alta actividad de esterases.

Rodríguez et al. (2002) en su estudio de resistencia cruzada que provoca temefos a otros insecticidas organofosforados y piretroides como: malation y deltametrina en poblaciones de *Ae. aegypti* de Cuba, observaron que temefos causó resistencia cruzada negativa a malation, sin embargo no fue así para deltametrina para la cual las poblaciones mostraron un aumento de FR de 4.75, hasta 337.5 veces en comparación con la cepa susceptible Rockefeller. Los valores de CL_{50} de deltametrina en la cepa de Mérida fueron significativamente más altos a los reportados por Rodríguez et al. (2002), siendo estos entre 0.0162 y 0.468 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para las de Santiago de Cuba se obtuvieron valores de CL_{50} de 0.00038 (en SanF0), 0.0081 (en SanF3) y 0.027 mg/L (en SanF6), sin embargo para la cepa susceptible empleada por ellos obtuvieron una CL_{50} de 0.00008 mg/L, muy inferior (casi 100 veces) a la que se obtuvo en la cepa New Orleans que se utilizó en el presente estudio ($CL_{50} = 0.009$), por ello los factores de resistencia mostrados superan a los obtenidos en las poblaciones de Mérida, siendo el FR más alto de 337.5X en la cepa Santiago de Cuba.

Las poblaciones de adultos de *Ae. aegypti*, mostraron alta resistencia al derribo, y post-recuperación, encontrándose FR's $>10X$ para los piretroides permetrina y fenotrina. Para el piretroide deltametrina, la población adulta perteneciente a la época de secas del 2007, 2009 y lluvias del 2007 presentaron resistencia al derribo ($FRCK_{50} > 10$), mientras el resto de las poblaciones mostraron resistencia moderada. Flores y colaboradores en 2013 determinaron la resistencia a ocho piretroides (entre ellos permetrina, deltametrina y fenotrina) en mosquitos adultos de *Ae. aegypti* pertenecientes a siete localidades del estado de Veracruz; ellos reportan resistencia al derribo baja (Cosoleacaque 1.51X,

Tantoyuca 3.29X), moderada (Panuco 5.07X, Veracruz 5.91X, Coatzacoalcos 6.53X) y alta (Martínez de la Torre 12.42X, Poza Rica 18.42X) a la permetrina, mientras que para fenotrina reportan resistencia moderada al derribo (Tantoyuca 7.41X, Cosoleacaque 8.59X) y alta (Panuco 18.48X, Martínez de la Torre 31.84X, Coatzacoalcos 41.82X, Veracruz 57.89X, Poza Rica 62.02X). A diferencia de los resultados obtenidos en esta investigación donde la resistencia al derribo fue mayor, siendo el valor más bajo de $FRCK_{50}$ de 12.5X, mientras que el más alto fue 30.4X, ellos encuentran el $FR's$ al derribo mínimo en 1.5X y el más alto en 18.24X a permetrina. Mayor diferencia encontramos al comparar los resultados obtenidos para fenotrina, donde ellos obtienen el menor valor de resistencia al derribo en 7.1X y el más alto en 62.02X, mientras que en el presente estudio el valor menor mostrado es de 37.5X y el mayor 182.2X. Con deltametrina, Flores et al. (2013) reportan poblaciones con resistencia al derribo baja (Panuco 3X, Tantoyuca 0.81X, Martínez de la Torre 0.90X, Cosoleacaque 1.43X) y moderada (Poza Rica 6.95X, Veracruz 7.33X, Coatzacoalcos 8X). En el presente trabajo, los valores de $FRCK_{50}$ a la deltematrina estuvieron entre 8.2 y 21.6 X, mayores a los reportados por Flores et al (2013). En el mismo trabajo reportan resistencia post-recuperación a la permetrina baja (Panuco 2.88X, Cosoleacaque 1.95X), moderada (Tantoyuca 5.64 y Coatzacoalcos 8.91X) y alta para Veracruz 10.95X, Martínez de la Torre 22X y Poza Rica 33.23X. Nuestros resultados muestran valores de resistencia post-recuperación de entre 25X a 44X, ellos encuentran el $FR's$ al derribo mínimo en 1.95X y el más alto en 33.23X, frente a permetrina.

Con fenotrina Flores et al. (2013) encuentran resistencia post-recuperación baja en las poblaciones de la localidad de Panuco (0.71X) y Tantoyuca (2.88X), mientras que resistencia moderada en la población de Cosoleacaque (6.41X) y alta en las poblaciones de Martínez de la Torre (13.94X), Coatzacoalcos (29.32X), Veracruz (43.29X) y Poza Rica (51.18X). En el mismo trabajo obtienen el menor valor de resistencia al derribo de

7.1X y el más alto en 62.02X, mientras que en el presente estudio el valor menor mostrado es de 41X y el mayor 229X.

Con deltametrina las poblaciones de *Ae. aegypti* recolectadas en Martínez de la Torre (0.11X), Tantoyuca (1.59X), Panuco (2.56X) y Cosoleacaque (2.78X) mostraron resistencia baja post-recuperación, en tanto resistencia moderada se encontró en las poblaciones de mosquitos recolectadas en Poza Rica (16.67X), Veracruz (17.67X), Coahuila (19.44X) (Flores et al., 2013). En el presente trabajo se encontró resistencia moderada al derribo con deltametrina, oscilando los valores de FR entre 8 y 9.5 veces, se encontró alta únicamente en una población con valor de 33X, los valores reportados por Flores son menores que los obtenidos para las poblaciones de Mérida en todos los años y estaciones.

En un estudio realizado por Canyon et al. (1999) sobre la susceptibilidad de larvas y mosquitos de *Ae. aegypti* en Australia, para permetrina obtuvo valores de $CL_{50} = 0.0028$ (en 1989) y $.0025$ mg/L (en 1995), y comparado con una cepa susceptible ROCK, su factor de resistencia fue de 0.5 (en larvas), mientras que en los resultados se muestran FR superiores a este (pero en mosquitos), siendo el más pequeño el de 25X para DL_{50} (en base a la cepa susceptible New Orleans). Canyon et al. realizó pruebas de dosis diagnóstico para deltametrina a 0.025% (método de la OMS) entre la misma población en dos años distantes (1959 y 1995) obteniendo un incremento en la resistencia, con un factor de 1 en comparación a la cepa original, y para el DDT al 4% 0.2 veces. El DDT también ha influido en la resistencia a muchos insecticidas en diferentes partes de mundo, en donde los piretroides han mostrado más frecuentemente resistencia cruzada con este organoclorado (Rohani et al. 2000).

En comparación con diferentes estudios que reportan valores de CL_{50} para piretroides, los resultados obtenidos en este trabajo reportan concentraciones más altas para los tres insecticidas. Por ejemplo en un estudio de Ocampo et al. (2000) en Colombia sobre poblaciones de *An. pseudopunctipennis*, en donde determinan la

susceptibilidad a permetrina (también para propoxur y malation) obtuvieron valores de CL_{50} de 0.0007 a 0.00141 mg/L de permetrina, y tiempos letales medios de 29-38 min (TL_{50}), mientras que para nuestras poblaciones de *Ae. aegypti* de Mérida, los valores de CL_{50} obtenidos para este mismo insecticida oscilaron entre 7.19 y 12.4 μ g/botella y TL_{50} de 25:03 a 50:38 horas.

El tiempo también es una determinante importante en la resistencia, sobre todo en el efecto knock-down de los piretroides. Vargas et al. (2006) en su estudio sobre realizado en Perú, determino el tiempo knock-down medio para diferentes poblaciones de *Ae. aegypti* expuestas a deltametrina a una dosis de 0.025%, obteniendo valores de TL_{50} entre 59.28-107.20 min, mientras que para deltametrina en poblaciones de Mérida se obtuvieron valores de TL_{50} de 15-44 min. De modo que el efecto knock-down se produjo con mayor rapidez en las poblaciones de Mérida comparado a lo obtenido por Vargas et al (2006).

Todas las poblaciones de Mérida analizadas presentan valores de $FRCK_{50}$ a fenotrina y permetina mayores que 10, esto podría sugerirnos la presencia de resistencia tipo knock-down. En un estudio realizado por Gracia et al., (2009), mosquitos *Ae. aegypti* recolectados en la ciudad de Mérida, Yucatán, mostraron la mutación Ile 1,016 en todas las colecciones con una frecuencia de 57.6%

En relación a los mecanismos enzimáticos destoxificativos, en las poblaciones adultas de *Ae. aegypti* de la época de secas que supervivieron a la exposición con permetrina, se encontraron alterados los mecanismos enzimáticos: α -esterasas, β -esterasas, GST. Mientras que en épocas de lluvias, se encontraron los mecanismos α -esterasas y β -esterasas. Los principales mecanismos enzimáticos encontrados en los mosquitos adultos supervivientes a deltametrina fueron: MFO, α -esterasas, β -esterasa y GST para la época de secas, mientras que en épocas de lluvias fueron α -esterasas, GST, MFO y β -esterasas. Los mosquitos supervivientes a fenotrina en épocas de secas

mostraron: MFO, α -estresas y β -esterasas. Sin embargo, para la época de lluvias se encontraron, MFO y GST.

Flores y colaboradores en el 2006 evaluaron los mecanismos enzimáticos de resistencia en poblaciones de *Ae. aegypti* recolectadas en cinco localidades de Quintana Roo, México en machos y hembras por separado. Ellos encontraron las enzimas α -esterasas elevadas con respecto a la cepa susceptible New Orleans, en hembras recolectadas en el municipio de Benito Juárez y Cozumel, y en machos correspondientes al municipio de Lázaro Cárdenas. Las β -esterasas se mostraron elevadas en hembras del municipio de Benito Juárez y Cozumel, machos de Lázaro Cárdenas y Cozumel. Las oxidasas de función múltiple se encontraron ligeramente elevadas en hembras de Lázaro Cárdenas, y machos de Cozumel, Isla Mujeres y Solidaridad. Los valores medios de absorbancia de α -esterasas mostradas por poblaciones de hembras de *Ae. aegypti* de Quintana Roo oscilaron entre 0.371 y 0.963, mientras que los machos mostraron absorbancias medias entre 0.471 y 0.754. Por otra parte, los valores medios de absorbancia para β -esterasas se encontraron entre 0.601 y 1.190 en las poblaciones de hembras, mientras que los machos oscilaron entre 0.808 y 1.198. En cuanto al mecanismo de oxidasas de función múltiple, las absorbancias medias en hembras se mostraron entre 0.080 y 1.170, en tanto en los machos entre 0.075 y 0.120. Respecto a GST, los valores medios de absorbancia en hembras estuvieron entre 0.003 y 0.120, mientras que en los machos 0.003 y 0.109. A diferencia del presente trabajo, donde las poblaciones fueron sometidas con el insecticida, los valores medios de absorbancia para α -esterasas en las poblaciones se encontraron entre 0.776 y 1.071, en individuos que supervivieron a la permetrina, con deltametrina entre 0.672 y 0.872 y con fenotrina 0.908 y 0.964. Referente al mecanismo de β -esterasas los valores estuvieron entre 0.712 y 1.113 en mosquitos que supervivieron a la selección con permetrina, 0.709 y 1.034 con deltametrina y 0.935 a 1.113 con fenotrina. Para las oxidasas de función múltiple los valores medios de absorbancia mostrados por las poblaciones se encuentran entre 0.237

y 314 con permetrina, 0.231 y 0.288 con deltametrina y 0.421 a 0.574 con fenotrina. En cuanto a GST, en mosquitos que sobrevivieron a permetrina los valores medios de absorbancia estuvieron entre 0.025 y 0.155, con deltametrina entre 0.017 y 0.116, mientras que para fenotrina entre 0.034 y 0.048. Al comparar los valores medios de absorbancia reportados por Flores y colaboradores en 2006, se observa que las poblaciones de Mérida, Yucatán, presentan promedios de absorbancia más altos a diferencia de las poblaciones del estado de Quintana Roo.

La mayoría de los reportes de resistencia a piretroides incluyen a la permetrina y deltametrina, ya que son insecticidas que más se han utilizado para el control de *Ae. aegypti* en Latinoamérica, sin embargo aun cuando fenotrina se ha utilizado para el control de otros insectos, existe muy poca información sobre susceptibilidad en mosquitos. Picollo (2006) reporta el uso de la fenotrina sobre el control de piojos al igual que permetrina y deltametrina. En su estudio menciona que piojos que desarrollaron resistencia a permetrina, también desarrollaron resistencia a deltametrina y fenotrina. Los mosquitos han demostrado desarrollar resistencia a permetrina y deltametrina, ya sea por tener exposiciones largas al efecto del insecticida o por mecanismos de resistencia cruzada con otros insecticidas, tales como temefos y malation (OP) (Rodríguez et al. 1997, 1999, 2002, 2003). Debido a que temefos y malation se han utilizado para el control de *Ae. aegypti* en México, puede deducirse entonces que las poblaciones de este vector en la ciudad de Mérida, Yucatán, pueden presentar resistencia cruzada con permetrina y deltametrina, inclusive fenotrina ya que participan los mismos mecanismos de resistencia (gen *kdr*, citocromo P450, enzimas esterasas y Glutación-S-transferasa) (Hemingway et al. 1989, Rodríguez et al. 2003, Bisset et al. 1996, Chandre et al. 1999).

Tanto en poblaciones larvarias como adultas, los mecanismos metabólicos detoxificativos se mostraron activos uno más en época de secas que en la época de

lluvias. Esto podría estar relacionado con el “fitness cost”. Este fenómeno ha sido estudiado en *Culex quinquefasciatus* (McCarroll et al, 2000, McCarroll y Hemingway 2002), *Culex pipiens* (Bourguet et al, 2004), *Anopheles gambiae* (Randall et al, 2006), *Bemisia tabaci* (Campuzano-Martinez et al, 2010).

Esto da pie a nuevos cuestionamientos; si las poblaciones de mosquitos de época de lluvias (época en la que se presentan las mayores precipitaciones pluviales) se encuentran comprometidos con la reproducción al detectar mayor número de criaderos y las condiciones climáticas ideales, o transmitiendo el virus. Los mayores casos de fiebre por dengue en el estado de Yucatán se reportan en los meses de lluvias, según los boletines emitidos por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (www.sinave.gov.mx).

En México, como en la mayoría de los Países, se han utilizado diversos insecticidas para el control de vectores, por ejemplo el DDT, el cual fue usado intensivamente en los 60's para el control de la malaria, eventualmente se siguieron utilizando insecticidas organofosforados como el malatión (adulticida) y temefos (larvicida). Para el control de *Ae. aegypti* se utilizó el malatión hasta 1989 en aplicaciones espaciales de tipo ULV mientras que temefos en gránulos sobre contenedores de agua que podrían ser criaderos de larvas de *Ae. aegypti* (Fernández 1999), siendo el uso de temefos ininterrumpido hasta la fecha. Numerosos reportes han indicado que el DDT ha influido en la resistencia a piretroides (Hemingway et al 1989). En áreas como el Caribe y Sudamérica, existen reportes de resistencia a piretroides en poblaciones de *Ae. aegypti* en Venezuela (Field et al. 1984, Mazarri and Georgiouh 1995), Puerto Rico (Hemingway et al. 1989) y República Dominicana (Mekuria et al. 1991) asociadas con resistencia cruzada al DDT. Reportes han mostrado que la resistencia asociada a piretroides no se debe únicamente a mutaciones en el canal de sodio dependiente de voltaje, sino que están involucrados mecanismos enzimáticos (Bregues et al 2003, Rodríguez et al. 2005). De igual manera, existen numerosos

reportes en donde el uso prolongado del temefos por más de 30 años ha generado resistencia en poblaciones de *Ae. aegypti* (Paeporn et al. 2003, Bisett et al. 2004, Braga et al. 2004, Rodríguez et al. 2004, Saelim et al. 2005, Montella et al. 2007) y aun en México en donde se ha sugerido resistencia cruzada con permetrina mediada por esterases (Flores et al. 2005, 2006).

Los mosquitos son capaces de desarrollar resistencia a la mayoría de los insecticidas usados para su control, de modo que la dosis inicial del tóxico que resultaba efectiva no logra controlar la población resistente, generalmente la respuesta inmediata es aumentar la frecuencia del tratamiento o la concentración del insecticida, agravando el problema del fracaso del control químico, de modo que la estrategia racional para manejar la resistencia requiere el conocimiento de los mecanismos involucrados en dicho fenómeno (Picollo, 2006).

La resistencia a piretroides está surgiendo a pesar del optimismo que causó debido a su acción tóxica rápida y por ser uno de los grupos insecticidas más nuevos, por estas razones, se pensaba que no produciría resistencia en un lapso corto de tiempo (Malcom, 1988).

Los resultados sugieren que las poblaciones estudiadas en el presente trabajo han estado sometidas a una presión de selección en campo, evidencia de resistencia a permetrina en poblaciones de *Ae. aegypti* en México por mecanismos enzimáticos (Flores et al, 2005, 2006, 2009) y “kdr” (Saavedra et al. 2007, 2008) y Ponce et al. (2009) sugieren que el uso intensivo de este insecticida está ocasionando la pérdida de susceptibilidad no solo a este insecticida piretroide, si no a otros, aun cuando no son de uso común para el control de mosquitos en el País.

Las estrategias de manejo de resistencia desarrolladas actualmente se basan en el estudio toxicológico, bioquímico y genético del fenómeno de resistencia detectada. Uno de los requerimientos de estas estrategias es mantener un constante monitoreo de la susceptibilidad de las poblaciones de insectos expuestos a los compuestos utilizados para

su control, con el objetivo de prevenir el incremento no controlado de la resistencia realizando un diagnóstico precoz de su desarrollo. La detección temprana como método preventivo, debe complementarse con una estrategia de rotación de activos que permita la utilización de un compuesto alternativo para evitar el desarrollo de resistencia o generar resistencia cruzada o bien con el desarrollo de nuevas formulaciones que reduzcan la resistencia o potencien la acción del insecticida (Picollo, 2006).

8. CONCLUSION

Se logró determinar la susceptibilidad en poblaciones larvarias y adultas de *Ae. aegypti* recolectadas en la localidad de Chuburná de Hidalgo en la ciudad de Mérida Yucatán, de los años 2007 al 2010. Las poblaciones larvarias presentaron alta resistencia post-recuperación tanto en época de secas, como en época de lluvias de los años 2007 al 2010. Así mismo, todas las poblaciones de adultos de *Ae. aegypti* que supervivieron a la exposición con los piretroides permetrina y fenotrina resultaron con alta resistencia al derribo, así como alta resistencia post-recuperación. Las poblaciones adultas supervivientes a la deltametrina, mostraron resistencia moderada y alta al derribo, mientras que solo una población mostro alta resistencia post-recuperación y el resto de las poblaciones resistencia moderada. Los niveles de resistencia al derribo y post-recuperación exhibidos por las poblaciones adultas de *Ae. aegypti* correspondientes a la época de lluvias fueron significativamente diferentes a los niveles presentados por las poblaciones de adultos de las épocas de secas. Al no encontrar correlación entre la variación de la susceptibilidad de las poblaciones de una temporada a otra y los mecanismos enzimáticos de resistencia encontrados como alterados, no pueden relacionarse llevando a cabo una función destoxicativa, por lo que estas se encuentran realizando otra función. Los resultados sugieren que las poblaciones estudiadas han estado sometidas a una fuerte presión de selección en el campo, resultado de una aplicación continua de temefos por más de 30 años y permetrina por más de 10 años, aunado al efecto de insecticidas aplicados para el control de plagas agrícolas y otras plagas urbanas.

9. LITERATURA CITADA

- Albert LA, Alpuche L, Aranda HE, Badillo F, Bárcenas PC, Chediack R, Loera GR, Pomares TG, Rendón von OJ, Viveros RA. 1990. Los plaguicidas, el ambiente y la salud. Centro de Ecodesarrollo; México. Pp. 157-173.
- Anthony N., Rocheleau T., Mocelin G., Lee Hwa-Jung, R. French-Constant. 1995. Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. FEBS Letters 368: 461-465
- Apperson and Georghiou. 1975. Changes in Cross-Resistance Spectrum Resulting from Methyl Parathion Selection of *Culex tarsalis* Coq. Am J Trop Med Hyg.; 24: 698- 703
- Ayesa P, Harrington LC, and JG. Scott. 2006. Evaluation of Novel Insecticides for Control of Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 43(1): 55-60
- Bennett KE., Olson KE, Munoz MdeL, Fernandez-Salas I. and JA. Farfan-Ale. 2002. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. Am. J. Trop. Med. Hyg. 67: 85-92.
- Bisset, J.A, Rodríguez MM, Fernández D, Pérez O. 2004. Estado de la resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en larvas del municipio Playa, colectadas durante la etapa intensiva contra el *Aedes aegypti* en Ciudad de La Habana, 2001-2002 Rev. Cuba. Med. Trop. 56: 61-66.
- Bisset JA. 2006. Uso correcto de insecticidas: Control de la resistencia. Revista Cubana Medicina Tropical 54 (3): 202-219

- [Bloomquist](#) J. R. 1999. Insecticides: Chemistries and Characteristics. E. B. Radcliffe and W. D. Hutchison Editors. Radcliffe's IPM World Textbook, URL:<http://ipmworld.umn.edu>, University of Minnesota, St. Paul, MN.
- Bowman D, Randy Carl Lynn, Mark L , Eberhard, Jay R Georgi. 2004. Parasitología Veterinaria de Georgi, Publicado por Elsevier España. Pp. 257-258.
- Bourguet D., Guillemaud T, Chevillon C, and M Raymond. 2004. Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution*. 58(1):128-135.
- Brattsen, LB. 1989. Insecticide resistance: Research and Management. *Pestic. Sci.* 26: 329-332.
- Bregues, C., Hawkes, N.J., Chandre, F., McCarroll, L., Duchon, S., Guillet, P., Manguin, S., Morgan, J.C., Hemingway, J., 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med. Vet. Entomol.* 17, 87–94.
- Brogdon G. W., McAllister J., Corwin A. M. and C. Cordon-Rosales. 1999. Oxidase-Based DDT-Pyrethroid Cross-Resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 64:101-111.
- Brogdon GW and Janet McAllister. 1998a. Insecticide Resistance and Vector Control. *Emerging Infectious Diseases*. 4: 605-613
- Brogdon GW. 1989. Biochemical Resistance Detection: an alternative to bioassay. *Parasitology Today*. 5(1):56-60
- Brogdon, W. G. & McAllister, J. C. (1998b) Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14, 159-164
- Brown AWA, 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2:123-140.
-

- Brown, AWA., and R. Pal. 1971. Insecticide resistance in arthropods. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- Callaghan A., T. Guillemaud, N. Makate and M. Raymond. 1998. Polymorphisms and Fluctuations in copy number of amplified esterase genes in *Culex pipiens* mosquitoes. *Insect Molecular Biology* 7(3), 295-300
- Canyon DV y Hii JLK. 1999. Insecticide susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) from Townsville. *Australian Journal of Entomology* 38, 40-43.
- Casida J, and G. Quistad. 1998 Golden Age of Insecticide Research: Past, Present or Future ?. *Annu. Rev. Entomol.* 43:1-16
- Chandre F, Darriet F, Darder M, Cuani A and JMC Doannio. 1998. Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from West Africa. *Med. Vet. Entomol.* 12:356-366.
- Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P. 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae sensu lato*. *Bull World Health Organ*, 77:230-234.
- Coleman M., Vontas J.G. and J. Hemingway. 2002. Molecular characterization of the amplified aldehyde oxidase from insecticide resistant *Culex quinquefasciatus* *Eur. J. Biochem.* 269, 768-779.
- Curtis, CF. 1989. *Appropriate technology in vector control*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ding, Y., Ortelli, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J. and Ranson, H. 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase family: annotation, phylogeny and gene expression profiles. *BMC Genomics* 13: 35.
- Eldridge BF. 2005. Mosquitoes, the Culicidae. pp 95-11 en *Biology of Disease Vectors* (2nd ed) editado por W. C. Marquardt et al . Elsevier Academic Press.
- Enayati A.A., Ranson H. and J. Hemingway. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology.* 14(1): 3-8.
-

- Enayati, A.A., Vatandoost, H., Ladonni, H., Townson, H., J Hemingway. 2003. Molecular evidence for a kdr-like pyrethroid resistance mechanism in the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Med. Vet. Ent.* 17, 138–144
- Farfán-Alé JA, Loroño-Pino MA, Incidencia de infección por virus dengue en niños de 8 a 14 años de edad radicados en las áreas urbanas y rural del municipio de Mérida, Yucatán. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1991;48:780-784.
- Fernández-Salas I.1999. *Biología y Control de Aedes aegypti. Manual de Operaciones.* Editorial UANL. ISBN 968 7808 88 8, Monterrey, Mexico.
- Feyereisen R, Anderson JF, Carino FA, Cohen MB, Koener JF. 1995. Cytochrome P450 in the house fly: Structure, catalytic activity and regulation of expression of CYP6A1 in an insecticide-resistant strain. *Pestic Sci*,43: 233–239
- French-Constant, R. H. Rocheleau, T. A., Steichen, J. C., and A. E. Chalmers, 1993. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363, 449–451
- French-Constant, R. H., Steichen J. C., and F. Shotkoski, 1994. Polymerase chain reaction diagnostic for cyclodiene insecticide resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology*, 8:99-100.
- Flores Adriana E., Albeldano-Vazquez Walter, Ildefonso Fernandez Salas, Mohammad H. Badii, Haydee Loaiza Becerra, Gustavo Ponce Garcia, Saul Lozano Fuentes, William G. Brogdon, William C. Black IV and Barry Beaty. 2005. Elevated α -esterases levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.82: 66-78.
- Flores Adriana E., Grajales JS, Fernandez-Salas I, Ponce-Garcia G, Loaiza-Becerra Ma. H, Lozano S, Brogdon WG, Black IV WC, and B. Beaty. 2006. Mechanisms Of Insecticide Resistance In Field Populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico *Journal of the American Mosquito Control Association*: Vol. 22 (4): pp. 672–677.
-

- Flores Adriana E., Reyes Solis Guadalupe, Fernandez-Salas I, Sanchez Ramos Francisco J. and Ponce-Garcia G.: 2009. Resistance to Permethrin in *Aedes aegypti* (L.) in Northern Mexico. *Southwestern Entomologist*: Vol. 34 (2): pp. 167–177.
- Gong M, Yan Gu, X Hu, Y Sun, L Ma, X Li, L Sun, J Sun, J Qian, and C Zhu. 2005. Cloning and Overexpression of CYP6F1, a Cytochrome P450 Gene, from Deltamethrin-resistant *Culex pipiens pallens*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(5): 317–326
- Gordon J. 1988. Health Education Research: Mixed strategies in health education and community participation: an evaluation of dengue control in the Dominican Republic. *Oxford University Press* 3(4): 399-419.
- Gubler DJ. 1989. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. *Am J Trop Med Hyg*;40:571-578.
- Gubler DJ. 1998 (b). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(3): 480–496.
- Gubler, D.J. & Trent, DW. 1994. Emergence of epidemic Dengue: Dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infectious Agents and Disease* 2, 383-393.
- Gubler, DJ. 1998 (a). Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 442–450.
- Guerrero, F.D., Jamroz, R.C., Kammlah, D.M., Kunz, S.E., 1997. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of kdr and superkdr point mutations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, 745–755.
- Hardy, J.L., 1988 Susceptibility and resistance of vector mosquitoes, pp. 87–126 in *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, edited by T. P. Monath. CRC Press, Boca Raton, FL
-

- Hemingway and Ranson, 2000. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45:371-391
- Hemingway J and H. Ranson. 2005. Chemical control of Vectors and Mechanisms of Resistance. pp 627-647 in *Biology of Disease Vectors* (2nd ed) edited by W. C. Marquardt et al . Elsevier Academic Press.
- Hemingway J, 1982. The biochemical nature of malathion resistance in *Anopheles stephensi* froma Pakistan. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 17, 149-155.
- Hemingway J., Coleman M., M. Paton, L. McCarroll, A. Vaughan and D. DeSilva. 2000b. Aldehyde oxidase is co-amplified with the World's most common *Culex* mosquito insecticide resistance associated esterases. *Insect Molecular Biology.* (1), 93–99
- Hemingway, J. 1983. The genetics of malathion resistance in *Anopheles stephensi* from Pakistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* 77, 106-108.
- Hemingway, J. and Karunaratne, S.H.P.P. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 12: 1–12.
- Hemingway, J., R. G. Boddington, and J. Harris. 1989. Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. *Bull. Entomol.Res.* 79: 123-130
- Hemingway, NJ Hawkes, L McCarroll, H Ranson. 2004 The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34:653-665
- Narro-Robles José, Héctor Gómez-Danté. 1995. El Dengue En México: Un Problema Prioritario De Salud Pública. *Salud Pública Méx;* Vol. 37(sup 1):12-20s.
- J Schneider, 2001 A Timeline for Dengue in the Americas to December 31, 2000 and Noted First
-

- Occurrences". MPH and D Droll, Pan American Health Organization: Division of Disease Prevention and Control, June. 99 1-20.
- Kroeger A, Lenhart A, Ochoa M, Villegas, Alexander N, Catillo CE, Levy M and P McCall. 2006. Effective dengue vector control with insecticide treated curtains and water container covers: cluster randomized trials in Mexico and Venezuela. *British Medical Journal* 332:1247-1252
- Lagunes-Tejeda A. and Villanueva-Jiménez JA. 1994. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados. México. 264 pp.
- Lines, J.D., Myamba, J. and Curtis, C.F., 1987. Experimental hut trials of permethrin-impregnated mosquito nets and curtains against malaria vectors in Tanzania. *Med. Vet. Entomol.* 1, pp. 37–51.
- Loroño-Pino et al., 2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 71:485-492.
- Luleyap, H.U., Alptekin, D., Kasap, H., M. Kasap. 2002. Detection of knockdown resistance mutations in *Anopheles sacharovi* (Diptera: Culicidae) and genetic distance with *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) using cDNA sequencing of the voltage-gated sodium channel gene. *J. Med. Ent.* 39, 870–874.
- Lynd A, Ranson H, McCall P J, Randle N P, Black IV W, Walker E D and M J Donnelly. 2005. A simplified high-throughput method for pyrethroid knock-down resistance (kdr) detection in *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 4:16
- Malcom CA. 1988. Current status of pyrethroid resistance in anophelines. *Parasitology Today* ;4:S13-S6.
- Martinez-Torres D., F. Chandre, M. S. Williamson, F. Darriet, J. B. Bergé, A. L. Devonshire, P. Guillet, N. Pasteur, D. Pauron, 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* 7:179-184.
-

- Martinez-Torres, D., Chevillon, C., Brun-Barale, A., Berge', J.B., Pasteur, N., Pauron, D., 1999a. Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. *Pestic. Sci.* 55:1012–1020.
- Mbogo, C.N.M., Baya, N.M., Ofulla, A.V.O., Githure, J.I. and Snow, R.W., 1996. The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. *Med. Vet. Entomol.* 10, pp. 251–259.
- Mebrahtu YB, Norem J y Taylor M. 1997. Inheritance of larval resistance to permethrin in *Aedes aegypti* and association with sex ratio distortion and life history variation. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 56, 456-465.
- Mekurian YT, Gwinn DC. Williams y Tidwell MA. 1991. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* from Santo Domingo. Dominican Republic. *J Am Mosq Control Assoc.* 7(1):69-72.
- Ming An Shi,² Lougarre A., Alies C., Frémaux I., Tang Z. H, J. Stojan and D. Fournier. 2004. Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BMC Evolutionary Biology*, 4(5).
- Mouches, C., Pauplin, Y., Agarwal, M., Lemieux, L., Herzog, M., Abadon, M., Beyssat-Arnaouty, V., Hyrien, O., De SaintVincent, B.R., Georghiou, G.P. and N. Pasteur. 1990. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87: 2574–2578.
- Nikou, D., Ranson, H. and J. Hemingway. 2003 An adult specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene* 318: 91–102
- Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA-2-2002 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector (D.O.F. 21 julio del 2003). Mexico.
-

- Norma Emergente NOM-EM-SSA2-2008 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector (D.O.F.8 septiembre del 2008). Mexico.
- Picollo, Ma. I. 2006. Manejo de la Resistencia en plagas sanitarias. Revista de la Sociedad Entomológica de Argentina.
- Philip CB, Rozenboom LE. 1973. Medico-veterinary entomology: a generation of progress. In: Smith RF, Mittler TE, Smith CN, editors. History of entomology. Palo Alto (CA): Annual Reviews Inc.
- Phillips, RS. 1983. Malaria. Camelot Press, Southampton, United Kingdom.
- Platt KB., Linthicum KJ., Myint KS., Innis BL., Lerdthusnee K., Vaughn, DW. 1997. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *Am Jour Trop Med Hyg.* 57(2):119-25.
- Ranson H, Claudianos C, Orтели F., Abgrall C, Hemingway J, Sharvakhova M, Unger M, Collins F,H, and Rene Freyereisen. 2002. Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance. *Science* 298: 170-181
- Ranson H, Paton M. G, Jensen B, McCarroll L, Vaughan A, Hogan J. R, Hemingway J, and FH Collins. 2004. Genetic mapping of genes conferring permethrin resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 13(4), 379–386
- Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Hemingway, J., Collins, F.H., 2000b. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol. Biol.* 9:491–497
- Ranson, H., Jensen, B., Wang, X., Prapanthadara, L., Hemingway, J., Collins, F.H., 2000a. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect. Mol. Biol.* 9, 499–507.
-

- Ranson, H., Prapanthadara, L., J., Hemingway. 1997. Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* 324 (1):97–102.
- Rawlins, S. C. 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Pan Am. J. Public Health* 4: 243–251.
- Raymond, M., Fournier, D., Bride, J.-M., Cuany, A., Berge, J., Magnin, M., and Pasteur, N. 1986. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Journal of Economic Entomology* 79: 1452–1458.
- Rodríguez M, Bisset J, Rodríguez I, Díaz C. 1997. Determinación de la resistencia a insecticidas y sus mecanismos bioquímicos en 2 cepas de *Culex quinquefasciatus* procedentes de Santiago de Cuba. *Rev Cub Med Tropical.* 1997;49(3):209-14
- Rodríguez M, Bisset J, Díaz C y Soca A. 1998. Selección de una cepa de *Culex quinquefasciatus* resistente a lambda-cialotrina y su espectro de resistencia cruzada a otros insecticidas. *Rev Cubana Med Trop* 1998. v.50 n.2
- Rodríguez M, Bisset J, Ruiz M, and A Soca. 2002. Cross-Resistance to Pyrethroid and Organophosphorus Insecticides Induced by Selection with Temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J. Med. Entomol.* 39(6): 882-888 (2002)
- Rodríguez, M. M., Bisset, J. A., De Armas, Y. and F. Ramos. 2005. Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **21**, 437-445
- Rodríguez, M. M., J. Bisset, D. Molina, L. Lauzan, and Soca A. 2001. Detection of resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from Cuba and Venezuela. *J. Med. Entomol.* 38: 623-628.
-

- Rohani A, Bugor H, Nazni WA, y Lee HL. 2000. Evaluation of the insecticide introduction susceptibility of urban and rural *Aedes albopictus*. Division of Medical Entomology, Institute of Medical Research, 50588 Kuala Lumpur.
- Scott J. A. 1995. The molecular Genetics of Resistance: Resistance as a Response to Stress. *Florida Entomologist*. 78 (3): 399-414.
- Secretaria de Salud del estado de Yucatán. Informe de Pablo Kuri Morales, subsecretario de Prevención y Protección de la Secretaria de Salud federal. Febrero del 2012.
- Soderlund D. and J. Bloomquist, 1990. Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance. pp58-96 en *Pesticide Resistance in Arthropods* editada por Roush R. T. and Tabashnik B.E.. Routledge Chapman & Hall Inc. Great Britain
- Soderlund D.M. and Knipple D.C., 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 563–577.
- Vaughan, A., and R. H. French-Constant. 1998. Biochemical monitoring of organophosphorous and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. *Med. Vet. Entomol.* 12: 318-321.
- Vaughan, A., Rocheleau, T. and French-Constant, R. 1997. Site-directed mutagenesis of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* confers insecticide insensitivity. *Exper Parasit* 87: 237–244.
- Vargas F, Cordova O y Alvarado A. 2006. Determinación de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* Y *Lutzomyia peruensis* procedentes del norte peruano. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* 23(4). Pp: 1-6.
- Villani F, Hemingway J. 1987. The detection and interaction of multiple organophosphorus and carbamate insecticide resistance genes in populations of *Culex pipiens* from Italy. *Pest Bioche Physiol.* 27:218-228
- Vulule, J.M., Beach, R.F., Atieli, F.K., McAllister, J.C., Brogdon, W.G., Roberts, J.M., Mwangi, R.W., Hawley, W.A. (1999) Elevated oxidase and esterase levels

- associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Med Vet Ent* 13: 239–244
- WHO, 1981. Instruction for Determining the Susceptibility or Resistance of Adult Mosquitoes to Organochlorine, Organophosphate and Carbamate Insecticide-Diagnostic Test. WHO/VBA/ 81.806, Geneva, Switzerland.
- WHO, 1997. Dengue hemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control, 2nd edition. Geneva.
- WHO, 1992. Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the expert committee on vector biology and control. In WHO Tech. Rep. Ser. 818:1-55.
- WHO, 1998. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual). Geneva, Switzerland.
- WHO, 2002. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet No. 117. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization. 1992. Vector resistance to pesticides. Technical Report Series 818, Geneva.
- Xiao YW, Fuming H and Dazong C. 1992. Susceptibility of *Aedes albopictus* from China to insecticides, and mechanism of DDT resistance. *J Am Mosq Control Assoc*; 8(1):394-397.
- Ziv M , Brown NJ y Brown AWA. 1969. Resistance Potentialities of *Aedes aegypti* and *Culex fatigans* to organophosphorus and other insecticides. WHO/VBC/869.148. World Health Organization, Geneva

RESUMEN BIOGRAFICO

Gabriela González Olvera

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Entomología Médica

Tesis: RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN EL MOSQUITO VECTOR DEL
DENGUE, *Aedes aegypti* (L.) EN DOS EPOCAS DE TRANSMISION DE LA
ENFERMEDAD EN MERIDA, YUCATAN.

Campo de Estudio: Epidemiología y Salud Pública

Datos Personales: Nacido en Nuevo Laredo, Tamaulipas el 8 de julio de 1983, hija de
Rubén González González y Gabriela Olvera Navarro.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido
Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2007.