

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**NIVEL DE SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS Y MECANISMOS DE
RESISTENCIA DE *Aedes aegypti* (L.) EN PUERTO RICO**

POR

SAMANTA LUCÍA DEL RÍO GALVÁN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA**

JULIO, 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



TESIS

**NIVEL DE SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS Y MECANISMOS DE
RESISTENCIA DE *Aedes aegypti* (L.) EN PUERTO RICO**

POR

SAMANTA LUCÍA DEL RÍO GALVÁN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA**

JULIO, 2016

**Nivel de susceptibilidad a insecticidas y mecanismos de resistencia de
Aedes aegypti (L.) en Puerto Rico**

Comité de tesis

Director: Dr. Gustavo Ponce García

Secretario: Dr. Eduardo Rebollar Tellez

Vocal: Dra. Beatriz López Monroy

Vocal: Dra. Adriana E. Flores Suárez

Vocal: Dr. Roberto Mercado Hernández

**Nivel de susceptibilidad a insecticidas y mecanismos de resistencia de
Aedes aegypti (L.) en Puerto Rico**

Director: Dr. Gustavo Ponce García

Director Externo: Dr. Roberto Barrera

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca (193257) otorgada para la realización de este posgrado.

A mis asesores Dr. Gustavo Ponce García, Dr. Roberto Barrera y Dra. Adriana E. Flores Suárez, por su asesoramiento y apoyo para el desarrollo de esta investigación.

A los miembros de mi comité por su orientación, sugerencias y aportaciones para la conclusión de esta tesis.

A todos los que contribuyeron con su sangre, tiempo, paciencia, compañía, enseñanzas y esfuerzo para la realización esta tesis.

DEDICATORIA

A toda mi familia que siempre está a mi lado, que me da su apoyo y amor incondicional y que siempre me anima a iniciar y culminar los proyectos que emprendo.

A mis amigos: a los que están lejos, a los nuevos, a los que siempre están conmigo, por su ayuda, su “buena vibra”, su paciencia, sus risas y su confianza.

A Alejandro Gaitán B. por su apoyo incondicional y por esos buenos momentos.

Índice

RESUMEN	- 1 -
ABSTRACT.....	- 2 -
1. INTRODUCCIÓN.....	- 3 -
2. ANTECEDENTES	- 5 -
Bionomía de <i>Aedes aegypti</i> (L.)	- 5 -
Huevos	- 5 -
Larvas	- 6 -
Pupas.....	- 6 -
Adultos	- 7 -
Ecología de <i>Ae. aegypti</i>	- 7 -
Importancia de dengue, chikungunya y zika.....	- 8 -
Control de <i>Ae. aegypti</i>	- 9 -
Control Físico y manejo del ambiente	- 9 -
Educación comunitaria	- 10 -
Control Biológico.....	- 10 -
i. Depredadores	- 11 -
ii. Bioinsectidas:	- 11 -
a. Entomopatógenos.....	- 11 -
b. Insecticidas alternativos.....	- 12 -
Control Químico	- 13 -
Organofosforados	- 16 -
Piretroides.....	- 17 -
Resistencia a insecticidas	- 19 -
Bioensayos con mosquitos.....	- 27 -
Situación actual en Puerto Rico	- 28 -
3. JUSTIFICACIÓN	- 30 -
4. HIPÓTESIS.....	- 31 -
5. OBJETIVO GENERAL.....	- 32 -
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 32 -

6.	METODOLOGÍA	- 33 -
	Área de estudio	- 33 -
	Material biológico	- 34 -
	Establecimiento de la colonia en el laboratorio	- 34 -
	Pruebas de susceptibilidad a temefos y spinosad (Natular® EC) en larvas	- 35 -
	Preparación de soluciones stock.....	- 35 -
	Pruebas de susceptibilidad para a permetrina en mosquitos adultos	- 35 -
	Preparación de soluciones stock.....	- 35 -
	Impregnación de botellas	- 35 -
	Pruebas de susceptibilidad a permetrina en adultos de mosquitos.....	- 36 -
	Factor de resistencia	- 36 -
	Pruebas bioquímicas	- 36 -
	Umbral de resistencia	- 37 -
	Análisis Estadístico	- 37 -
	Determinación de las frecuencias alélicas de la mutación "kdr".....	- 37 -
	Amplificación de los alelos Ile1,016 y Val1,016	- 37 -
	Amplificación de los alelos Cys1535 y Phe1534	- 39 -
	Frecuencia de alelos Ile 1016 y Cys 1534.....	- 40 -
7.	RESULTADOS	- 42 -
	Susceptibilidad de larvas a Temefos y Spinosad.....	- 42 -
	Susceptibilidad de adultos a permetrina	46
	Concentración Knockdown cincuenta (CK ₅₀) y Factor de Resistencia de la concentración Knockdown Cincuenta (FRCK ₅₀)	46
	Concentración Letal Cincuenta (CL ₅₀) y Factor de Resistencia de la Concentración Letal Cincuenta FRCL ₅₀	47
	Tiempo de derribo cincuenta (TK ₅₀) y Tiempo Letal (TL ₅₀).....	48
	Mecanismos de resistencia enzimática	49
	Mecanismo de Resistencia kdr	52
	Frecuencia de la mutación Ile1016 en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de Puerto Rico	52
	Frecuencia de la mutación Cys 1534 en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de Puerto Rico...	55
8.	DISCUSIÓN	57
9.	CONCLUSIONES.....	63
10.	LITERATURA CITADA	64
11.	RESUMEN BIOGRAFICO.....	82
12.	ANEXO	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de Larvicidas (IRAC, 2015)	- 14 -
Tabla 2. Adulticidas (IRAC, 2015)	- 15 -
Tabla 3. Mutaciones detectadas en los canales de sodio dependientes de voltaje en mosquitos confiriendo resistencia a insecticidas.....	- 26 -
Tabla 4. Susceptibilidad a insecticidas en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i>	- 27 -
Tabla 5. Amplificación de los alelos Ile1,016 y Val1,016.....	- 38 -
Programa de termociclador (alelos Ile1016 y Val1,016).....	- 38 -
Tabla 6. Amplificación de los alelos Cys1535 y Phe1534	- 39 -
Programa de termociclador (alelos Cys1534 y Phe1534)	- 40 -
Tabla 7. CL ₅₀ , y factor de resistencia de larvas de <i>Ae. aegypti</i> expuestas a spinosad y temefos.	- 42 -
Tabla 8. Porcentaje de individuos de las poblaciones de campo que rebasan el Umbral de Resistencia a insecticidas determinado a partir de la cepa susceptible New Orleans.....	- 44 -
Tabla 9. Medias de las absorbancias de las ocho cepas de <i>Ae. aegypti</i> de Puerto Rico.....	45
Tabla 10. Regresión Resultados de las regresiones lineales y R de los valores de CL ₅₀ de spinosad y temefos correlacionados con el promedio de las absorbancias en larvas de <i>Ae. aegypti</i> de Puerto Rico.	46
Tabla 11. CK ₅₀ , y factor de resistencia de hembras de <i>Ae. aegypti</i> expuestas a permetrina.	47
Tabla 12. CL ₅₀ , y factor de resistencia de hembras de <i>Ae. aegypti</i> expuestas a permetrina.	48
Tabla 13. Valores de TCK50 y TL50 en horas y minutos obtenidos para cada población de <i>Ae. aegypti</i> expuestas a permetrina.	49
Tabla 14. Porcentaje de individuos de las poblaciones de campo que rebasan el Umbral de Resistencia determinado a partir de la cepa susceptible New Orleans.....	50
Tabla 15. Medias de las absorbancias de las ocho cepas de <i>Ae. aegypti</i> de Puerto Rico.....	51
Tabla 16. Regresión lineal y R de los valores de CL ₅₀ de permetrina correlacionados con el promedio de las absorbancias en hembras de <i>Ae. aegypti</i> de Puerto Rico.....	52

Tabla 17 Localidades, año de colecta, tamaño de muestra y número de mosquitos para cada genotipo.	54
Tabla 18. Frecuencia del alelo Ile1,016, intervalos de confianza 95% y coeficientes de endogamia en ocho poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de Puerto Rico.	54
Tabla 19. Localidades, año de colecta, tamaño de muestra y número de mosquitos para cada genotipo.	56
Tabla 20. Frecuencia del alelo Cys1534, intervalos de confianza 95% y coeficientes de endogamia en ocho poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de Puerto Rico.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Ciclo biológico de <i>Ae. aegypti</i> . 1) Huevo. 2) Larva I. 3) Larva II. 4) Larva III. 5) Larva IV. 6) Pupa. 7) Adulto.....	- 5 -
Fig. 2. Clasificación de insecticidas de acuerdo al sitio de acción.....	- 14 -
Molécula básica es un éster del ácido fosfórico.	- 16 -
Fórmula estructural del temefos 0,0,0',0'-tetramethyl-O,O'-thiodi-p-phenylene phosphorothioate	- 17 -
Fórmula estructural de la permetrina 3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid (3-phenoxyphenyl)	- 18 -
Fig. 3. Ubicación geográfica aproximada, del sitio de muestreo en los municipios de Puerto Rico en donde se realizaron las colectas de <i>Ae. aegypti</i>	- 33 -
Fig. 4. Gráfica de Meltcurve, que muestra las curvas con sus temperaturas correspondientes: un pico a 80 °C, (Phe1534) (susceptibles), un pico a 85 °C (Cys1534) (resistentes) y ambos picos, 80°C y 85°C, heterocigotos	- 40 -
Fig. 5. CL ₅₀ ± intervalos de confianza de larvas expuestas a spinosad de poblaciones de Puerto Rico y la cepa susceptible NO.	- 43 -
Fig. 6. CL ₅₀ ± intervalos de confianza de larvas expuestas a temefos de poblaciones de Puerto Rico y la cepa susceptible NO.	- 43 -
Fig.6. CK ₅₀ e intervalos de confianza de adultos expuestos a permetrina. ...	47
Fig.7. CL ₅₀ e intervalos de confianza de adultos expuestos a permetrina. ...	48
Fig. 8. Geles de agarosa al 3% mostrando los genotipos de la mutación Ile1,016 en <i>Ae. aegypti</i> de Puerto Rico	53

RESUMEN

El uso sostenido de insecticidas como el temefos y la permetrina, para el control del mosquito *Aedes aegypti* ha propiciado el desarrollo de resistencia a los mismos. Por lo cual en el presente estudio se determinó por medio de la metodología de bioensayos propuesta por la World Health Organization (WHO, 2005), el nivel de susceptibilidad a los larvicidas temefos y spinosad (Natular® EC), y al adulticida permetrina, en ocho poblaciones de Puerto Rico. Mecanismos enzimáticos de resistencia, alfa y beta esterasas, oxidasas y glutatión-s-transferasas fueron determinados y correlacionados con los niveles de susceptibilidad a los insecticidas mencionados anteriormente. Así también fueron determinados los niveles de acetilcolinesterasa insensible y la presencia de las mutaciones tipo kdr *Ile1016* y *Cys1534*. Los resultados obtenidos, demostraron que todas las poblaciones fueron susceptibles a spinosad y temefos ($FRCL_{50} < 5$), y las enzimas no mostraron estar correlacionadas con la desintoxicación de éstos dos larvicidas. Por otro lado, todas las poblaciones resultaron resistentes a permetrina, teniendo Factores de Resistencia para la Concentración de Derribo ($FRCK_{50}$) en un intervalo de 37.69 a 195.62 y de 33.64 a 214.46 en los Factores de Resistencia para la Concentración de Letal ($FRCL_{50}$). El análisis estadístico demostró que la sobreexpresión de enzimas no están correlacionadas con la resistencia a permetrina. Se encontraron presentes las mutaciones tipo kdr *Ile 1016* y *Cys1534* con frecuencias de 0.65 a 1 y de 0.8 a 1, respectivamente.

ABSTRACT

The sustained use of insecticides such as temephos and permethrin for *Aedes aegypti* population control has caused them to develop resistance. Therefore the susceptibility levels of eight Puerto Rico populations to temephos, spinosad (Natular® EC) and permethrin were evaluated in his study with standard methods (WHO, 2005). Enzymatic resistance mechanisms alpha and beta esterases, mixed function oxidases, glutathione-s-transferases and insensitive acetylcholine esterase were measured and correlated with insecticide susceptibility levels. Point mutations *kdr Ile1016* and *Cys1534* were also determined. The results establish all populations as susceptible to spinosad and temephos ($FRCL_{50} < 5$) with no significant correlation to enzyme levels. However, every populations was found resistant to permethrin with resistance factors to knockdown ($FRCK_{50}$) between 37.69 and 195.62; the resistance factor to the lethal concentration ($FRCL_{50}$).ranged from 33.64 to 214.46. Statistical analysis of this data revealed that the over expression of detoxification enzymes is not correlated with permethrin resistance. The *kdr Ile 1016* and *Cys1534* point mutations measured had frequencies ranging from 0.65 to 1 and 0.8 to 1, respectively.

1. INTRODUCCIÓN

Aedes aegypti juega un rol importante como vector en la transmisión de virus como fiebre amarilla, dengue, chikungunya y Zika (Monath, 1988, Rodríguez-Morales, 2015), siendo el dengue el que tiene mayor impacto en la salud humana. El dengue es uno de los virus transmitidos por vectores de más rápida propagación, ya que por lo menos 390 millones de infecciones ocurren anualmente (Bhatt, *et al.*, 2013). En las últimas décadas se han incrementado los casos de dengue en América, incluyendo Puerto Rico (Barrera, 2010). Desafortunadamente no existen tratamientos específicos para atacar esta enfermedad, por lo que el control del mosquito es la mejor herramienta para prevenirla (Bisset, 2002). En este sentido, los insecticidas juegan un papel determinante en el manejo del dengue, por lo que en los últimos años en América se han empleado, principalmente, organofosforados (temefos, malatión, fenitrotión) y piretroides (permetrina, deltametrina) (WHO, 2011) para el control poblacional de *Ae. aegypti*, sin embargo, la mayoría de los programas de control de vectores se ven afectados por la aparición del fenómeno de resistencia a insecticidas (Ponce, *et al.*, 2009).

Debido a la amplia distribución geográfica de *Ae. aegypti* en el continente Americano y a la reciente entrada de los virus chikungunya y Zika al continente, obligan a prestar mayor atención al control y por lo tanto determinar los niveles de susceptibilidad a -insecticidas (Vega-Rúa, 2014; Mattar, y González, 2015). A pesar de que *Ae. albopictus* ha sido incriminado como vector de dengue y chikungunya y que ha invadido otros países del Caribe, éste aún no se ha encontrado en Puerto Rico (Barrera, 2010). *Ae. aegypti* ha sido un problema importante de salud pública en este país por estar fuertemente incriminado en la transmisión de dengue y por la interacción de diversos factores como la circulación simultánea de diferentes serotipos, el clima, la ecología, su control y la temprana aparición de resistencia a insecticidas (Barrera, 2010, Barrera, *et. al.*, 2014). El manejo de *Ae. aegypti* inicia en la década de los 50's con inspecciones casa por casa y con la aplicación de DDT (Fox, 1960), lo cual mantuvo las poblaciones bajas de mosquitos, por algún tiempo, hasta que en 1959 se reportó resistencia a DDT, lindano, clordano y dieldrin (Fox, 1960; Khan and Brown, 1961). En 1963 se confirma resistencia a DDT, no sólo en Puerto Rico sino también en las Islas Vírgenes (Flynn, *et al.*, 1964). Años después

se detecta resistencia a malatión en Guánica y Arecibo (Fox and Bayona, 1972). En 1973, de acuerdo con las pruebas de susceptibilidad, el temefos seguía siendo efectivo para el control larval (Lee and More, 1973). Sin embargo, en 1987 se reportó resistencia a temefos y a otros insecticidas como malation, fention, clorpirifos y permetrina (Fox, 1980, Sutherland, *et al.*, 1987; Hemingway, *et al.*, 1989). Desafortunadamente desde la década de los 90's hasta la fecha, se desconocen los niveles de susceptibilidad de *Ae. aegypti* a insecticidas en Puerto Rico.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la susceptibilidad de larvas y adultos de *Ae. aegypti* a insecticidas como temefos, spinosad y permetrina, usados constantemente para su control y de spinosad (Natular® EC), como un larvicida alternativo; además de identificar los mecanismos enzimáticos de resistencia y determinar las frecuencias de mutación para kdr Cys 1534 e Ile1016.

2. ANTECEDENTES

Bionomía de *Aedes aegypti* (L.)

Aedes aegypti se ubica dentro del orden Diptera, suborden Nematocera y pertenece a la familia Culicidae. Es una especie tropical y subtropical que se encuentra distribuida entre la franja geográfica del paralelo 35° al norte y 35° al sur. Generalmente se ubica a menos de 1,000 msnm, sin embargo, existe registro de haberse encontrado a 2100 msnm en México y 2,200 msnm en Colombia (Lozano.Fuentes, *et al.*, 2012)

Ae. aegypti es transmisor de enfermedades virales como el dengue, la fiebre amarilla, chikungunya y Zika. por lo que es necesario conocer su ciclo biológico y bionomía para aplicar adecuadamente un control.

Las fases del ciclo biológico son huevo, larva (con cuatro estadios), pupa y adulto (Figura 1.)

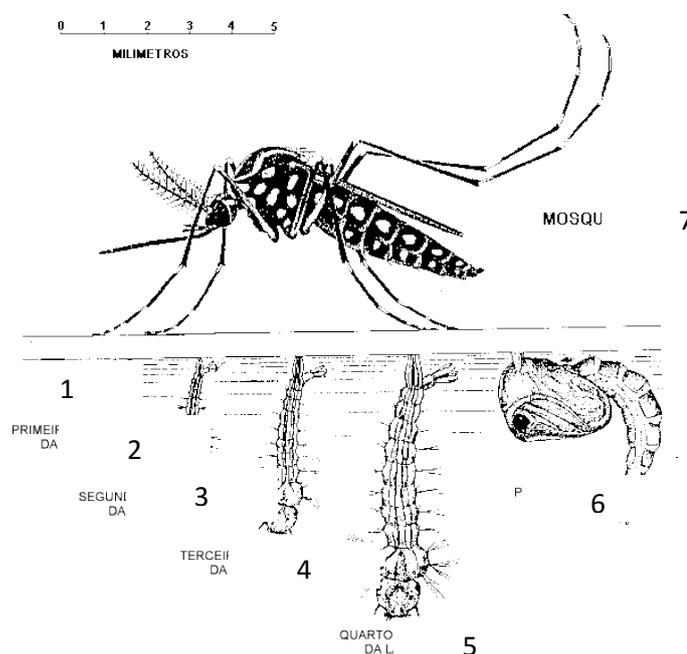


Fig. 1. Ciclo biológico de *Ae. aegypti*. 1) Huevo. 2) Larva I. 3) Larva II. 4) Larva III. 5) Larva IV. 6) Pupa. 7) Adulto. (Tomada de Fernández, 2009)

Huevos

Presentan una coloración negra y la cantidad de huevecillos por ovipostura varía de 20 a 120, lo cual va a depender del tamaño y edad de la hembra que los coloca,

cantidad de sangre ingerida y su calidad proteica, etc. Se requieren hasta 48 horas para que embrionen (Christophers, 1960).

Esta etapa es considerada como el principal mecanismo a través del cual *Ae. aegypti* se ha dispersado, ya que soporta largos periodos de desecación, como semanas, meses e incluso años, adheridos a diferentes superficies (Fernández, 2009). Posteriormente requieren de un estímulo para eclosionar, usualmente es el agua, pero la disminución de oxígeno disuelto en ésta, es un factor más específico, por lo que es común encontrar altas poblaciones larvales después de la estación de lluvias, en que son humedecidos los huevecillos que fueron colocados en llantas, botellas vacías, floreros, latas abiertas, etc.

Larvas

Las larvas pasan por cuatro mudas y la diferencia entre cada una de ellas es el tamaño. Éstas se alimentan de protozoarios de vida libre y microalgas y lo hacen tanto en el fondo del criadero como en la columna intermedia de agua (Clement, 1992), lo cual es destacable principalmente para el control, ya que debe considerarse el tipo de formulación y producto a emplear. Dentro de un mismo criadero varían en instar, número, tamaño y a veces en su origen maternal. El número de organismos favorece la competencia entre éstos, que posteriormente se ve reflejado en el tamaño de los adultos. Es fundamental hacer hincapié en que el tamaño de la hembra está relacionado con su potencialidad para transmitir el virus del dengue, ya que ingerirán mayor volumen de sangre por picadura y su longevidad será mayor. Se considera como un criadero positivo si se tiene al menos una larva de *Ae. aegypti* (Fernández, 2009).

Pupas

Después del cuarto instar se forma la pupa, la cual es móvil y utiliza las aletas caudales para flotar y nadar. Ésta etapa dura de 24 a 48 horas. Un criadero con densidades altas de pupas, es un indicativo de los futuros mosquitos adultos que se tendrán, asimismo, demuestran que fue un lugar con alta calidad nutricional y fisicoquímica para que sobrevivieran las larvas (Fernández, 2009).

Adultos

La emergencia del mosquito adulto de la cubierta pupal es crepuscular y al salir, reposa sobre la película de agua. Antes de una hora hace su primer vuelo y se posa en un lugar seco. La proporción de hembras y machos es cercana a 1:1. El macho se diferencia de la hembra por sus antenas plumosas y se alimenta de carbohidratos que los obtiene del néctar de las flores o frutos (Clement, 1992). El macho es atraído por el sonido que hace la hembra por el movimiento de sus alas y en el aire la engancha con sus genitales y la fecunda (Christopher, 1960). Por otro lado, para producir huevecillos la hembra debe alimentarse de sangre, la cual, en el mayor de los casos, es tomada del humano. Generalmente su alimentación es diurna, información que es importante de considerar para entender la epidemiología de transmisión de las enfermedades, además de ejecutar los programas de control.

Los vuelos de los mosquitos son considerados como “apetitivos” porque son orientados hacia un objetivo, como la alimentación, la actividad sexual y la oviposición. Éstos vuelos son cortos y se dispersan en una distancia de entre 8 y 120 metros (Ordoñez, 1997).

Ecología de *Ae. aegypti*

Aedes. aegypti se encuentra en los trópicos y subtrópicos y su intervalo geográfico se está ampliando, en parte por la rápida urbanización y por el movimiento global de las personas (Kyle y Harris, 2008). Está fuertemente asociado con el hábitat humano, reposa preferentemente, dentro de edificios y utiliza criaderos artificiales como llantas, botellas, floreros, etc., debido a que su originalmente ovipositaba en huecos de árboles, axilas de plantas, huecos en rocas, etc. con agua de lluvia en la selva tropical de África (Tabachnick, 1991). Sin embargo, la deforestación e invasión de hábitats propios de los mosquitos, por el hombre, ha “obligado” a los mosquitos a utilizar sitios, además de botellas, recipientes pequeños, llantas, piletas, aljibes, barriles, tambos, etc. para ovipositar (Fernández, 2009).

Importancia de dengue, chikungunya y zika

Dengue

El dengue es una de las enfermedades transmitidas por vectores de más rápida propagación y está considerada como la enfermedad viral más importante transmitida por artrópodos, más de 2.5 billones de personas viven en áreas en donde el virus del dengue puede ser transmitido y se estiman que entre 50 y 100 millones de infecciones ocurren anualmente (OPS, 2013). Las infecciones por dengue suceden en más de 100 países de Asia-Pacífico, América, Medio Oriente y África y continúa en aumento alrededor del mundo. En América Latina y el Caribe en las últimas 3 décadas, los casos han aumentado dramáticamente con cifras de hasta 2 millones (OPS, 2013). Aunque *Ae. aegypti* es el principal vector hay otras especies importantes como *Ae. albopictus*.

Chikungunya

La fiebre de chikungunya (CHIK) es una enfermedad transmitida tanto por *Ae. aegypti*, como por *Ae. albopictus*, al igual que el dengue (OPS, 2011). El virus de chikungunya es un alfa virus que históricamente sólo se encontraba en el viejo mundo, fue aislado por primera vez en Tanzania en 1953. Sin embargo, en el año 2004, se expandió geográficamente a Comoros, La Reunión, y otras Islas del Océano Índico (Weaver, *et al.*, 2009). Posteriormente en el año 2010 se detecta en la India, Indonesia, Myanmar, Tailandia, las Maldivias, Italia, Francia y EUA (OPS, 2011). En el año de 2014 CHIK es reportada en América, expandiéndose rápidamente por Sudamérica, Centroamérica, el Caribe y México (

Es una enfermedad que causa temperatura alta y severas artralgias además de dolor de cabeza, mialgias, vómito, náuseas, etc. La mayoría de los pacientes al inicio presenta dolores severos o incluso incapacitantes (OPS, 2011).

Las epidemias de CHIK en muchos países han sido detectadas tardíamente, debido entre otras razones a la dificultad en la identificación de los primeros casos, desestimación del impacto clínico y discreción política y económica por cuestiones de turismo (Simon, *et al.*, 2008).

Zika

En abril de 1947 se descubrió a través de un modelo experimental animal en el bosque de Zika (Uganda). En 1956 se comprobó la transmisión del ZIKV en mosquitos *Ae. aegypti*. Posteriormente el ZIKV fue aislado de humanos en Nigeria entre 1968 y 1975; el 40% de los pacientes tuvieron anticuerpos comprobados por PRNT (Hayes, 2009). El ZIKV es un flavivirus, a la cual también pertenecen el dengue, fiebre amarilla y Oeste del Nilo. El ZIKV es un virus ARN estrechamente relacionado con los virus Spondweni, Ilheus, Rocío y encefalitis de San Louis. En 2007 en Yap, una de las islas Carolinas en el océano Pacífico occidental (Polinesia), el ZIKV causó un brote que afectó a más de 20.000 personas. Las manifestaciones clínicas son similares a las del dengue y del chikungunya. El período de incubación es de 3-6 días y se presenta con exantema macular o papular, fiebre, artritis o artralgia, conjuntivitis no purulenta, mialgias y cefalea. La fiebre es auto limitada, en tanto que el rash se generaliza y puede prolongarse hasta por 14 días. El ZIKV al parecer no desencadena hemorragias como el dengue y el chikungunya. La hospitalización generalmente no se requiere y hasta la presente no se ha reportado mortalidad. Tampoco existe vacuna para este virus y el tratamiento es sintomático. El brote en la isla de Yap fue el primero descrito fuera de África y Asia y desde allí saltó a las Américas y a Europa (Roth, *et al.*, 2014). Un aspecto epidemiológico alarmante del ZIKV es que también puede ser transmitido por vía sexual (Musso, *et al.*, 2015).

Actualmente no existen vacunas ni una terapia exitosa para estas enfermedades, por lo que la mejor forma de controlarlas es manejando al vector y manteniendo sus poblaciones a niveles bajos (OPS, 2013).

Control de *Ae. aegypti*

Actualmente el control de este artrópodo está basado en el manejo de los adultos, principalmente en situaciones de emergencia epidemiológica y de las poblaciones larvales, mediante la reducción de criaderos, a través de control físico, de educación a la población con campañas de limpieza y descacharrización y de aplicación de productos químicos (Fernández, 2009).

Control Físico y manejo del ambiente

Un amplio tipo de contenedores son usados por *Ae. aegypti* para oviponer y para el desarrollo de las larvas, desde los más comunes como tanques, piletas, llantas, etc.

hasta los más atípicos como tanques sépticos o letrinas (Arana-Guardia, *et al.*, 2014). Una de las medidas más útiles es la educación a la población para disminuir los criaderos, evitar acumulación de recipientes, instalación de mosquiteros en ventanas y/o puertas, uso de pabellones para dormir, etc. Sin embargo, aunque la eliminación de criaderos es útil, la búsqueda de éstos a veces es difícil porque los habitats son pequeños, dispersos y no es fácil de encontrarlos (Kroeger, 2006; Vontas, *et al.*, 2012).

Otra estrategia que se ha puesto en práctica es el uso de ovitrampas letales, porque son baratas y sensitivas, además de que sirven como herramienta de monitoreo. Generalmente se utilizan tiras tratadas con insecticidas como la permetrina o deltametrina o también utilizan tiras con la superficie pegajosa (Zeichner y Debboun, 2011). El uso de estas en Brasil, Perú y Tailandia, demostraron su eficacia reduciendo las poblaciones de *Ae. aegypti*, posiblemente debido a que se colocaron numerosos trampas alrededor de las casas (Zeichner y Debboun, 2011; Perich, *et al.*, 2003)

Educación comunitaria

Se alienta a los miembros de la familia y la comunidad a que participen en la eliminación y control de criaderos de mosquitos, pero no sólo como una convocatoria, si no transformando los hábitos para que los individuos sean capaces de reconstruir y transformar su espacio y prevenir enfermedades. Asimismo se realizan campañas de difusión en radio, en escuelas, en eventos políticos, además de talleres de capacitación a técnicos de salud y a los miembros de las comunidades (Eiman, *et al.*, 2010).

Control Biológico

El control biológico de *Ae. aegypti* consiste en la introducción de otros organismos vivos que depreden o parasiten a las larvas o a los adultos del mosquito, como alternativa al control químico. Por ejemplo; depredadores como larvas de otros insectos, peces, etc.; entomopatógenos, como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisoplae*, etc.

i. Depredadores

En la naturaleza las larvas y pupas de mosquitos tienen diferentes depredadores como peces, larvas de insectos como coleópteros, hemípteros, odonatos, copépodos, malacostracos, anacostracos, renacuajos, etc. (Kumar y Hwang, 2006).

Bowatte, *et al.*, (2013) demostraron que los anfibios juegan un papel importante en la depredación de huevos y larvas de *Ae. aegypti*.

Los peces se han determinado como los depredadores más eficaces como los de los géneros *Gambusia* y *Poecilia* (Harwood y James, 1987).

En el caso de los adultos se consideran como depredadores a arañas, sapos, ranas, lagartijas, aves y murciélagos, aunque la alimentación de éstos no es específicamente de mosquitos (Harwood y James, 1987).

ii. Bioinsectidas:

a. Entomopatógenos

El uso de entomopatógenos también se ha utilizado en el control, usando más comúnmente hongos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, tanto en huevos, como larvas y adultos (Alcalde-Mosqueira, *et al.* 2014). La susceptibilidad de *Ae. aegypti* a ser infectado por *Beauveria bassiana* se reporta por primera vez en la década de los 60's (Clark, *et al.*, 1968). Geetha y Balaraman (1999), demostraron la efectividad de *Beauveria bassiana* sobre larvas de *Ae. aegypti*, mientras que Silva y Silva (2004), lo hicieron con *Metarhizium anisopliae*. Pero no únicamente estos hongos han sido empleados en forma aislada, sino también con la combinación de insecticidas como el imidacloprid dando buenos resultados, con altas mortalidades en adultos en cortas exposiciones de tiempo (Paula, *et al.*, 2011), por lo que el interés en el uso de hongos para el control se ha ido incrementando, porque la producción es relativamente barata y altamente efectivos como biocidas, además que se ha encontrado que reducen la capacidad vectorial en la transmisión del virus dengue (DENV-2) (Garza-Hernández, *et al.*, 2013). Por otro lado, nematodos del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* son una alternativa segura al ambiente y razonablemente económica, que se usan en el control de plagas, entre las cuales se encuentran los mosquitos (Kobylinski, *et al.*, 2012, Peschiutta, *et al.*, 2014).

b. Insecticidas alternativos

Asimismo, en los últimos años, el uso de insecticidas alternos como el spinosad ha tomado un gran auge, por la necesidad de contar con productos amigables para el ambiente y de bajo impacto para la salud humana y animal. Algunas formulaciones han sido aprobadas para larvicida de mosquitos en agua para consumo humano (WHO, 2010). Spinosad es un insecticida que se produce durante la fermentación del actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* Mertz & Yao y su descubrimiento y caracterización marcó una nueva clase de productos para el control (Thompson, *et al.*, 1997). Está compuesto de una mezcla de dos espinosinas con propiedades insecticidas, la A y la D. Muestra actividad contra lepidópteros, tisanópteros y dípteros. Actúa primariamente en los receptores postsinápticos nicotínicos de acetilcolina y secundariamente en los receptores GABA y no se ha descrito ningún modo de resistencia cruzada con algún insecticida neurotóxico en poblaciones resistentes de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* (Baldacchino, *et al.*, 2015).

El larvicida microbial *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*), ha sido ampliamente usado para el control de mosquitos por su eficacia. Es una bacteria gram-positiva, que forma una espora entomopatógena descubierta en 1977 (Goldberg y Margalit, 1977). Su acción es citotóxica y el modelo clásico indica que la endotoxina es ingerida por el insecto, posteriormente la proteasa es activada y la toxina Cry se adhiere a los receptores de la membrana celular. Esto causa cambios estructurales y daños en el balance osmótico (Almeida-Melo, *et al.*, 2014). En comparación con spinosad tiene menor efecto residual (Baldacchino, *et al.*, 2015).

Otro método para el control de mosquitos, amigable con el ambiente, es el basado en extractos de plantas. Muestran una alta efectividad y su bajo costo de producción (Oliveira *et al.*, 2012), sin embargo, aún no hay características definidas para la colecta, extracción y químicos de las plantas, así como tampoco la estandarización de metodologías para la evaluación de los larvicidas contra *Ae. aegypti* (Noletto, *et al.*, 2014). La mayoría de los aceites esenciales con propiedades larvicidas se derivan de plantas de la familia Myrtaceae, Lamiaceae y Rutaceae (Noletto, *et al.*, 2014).

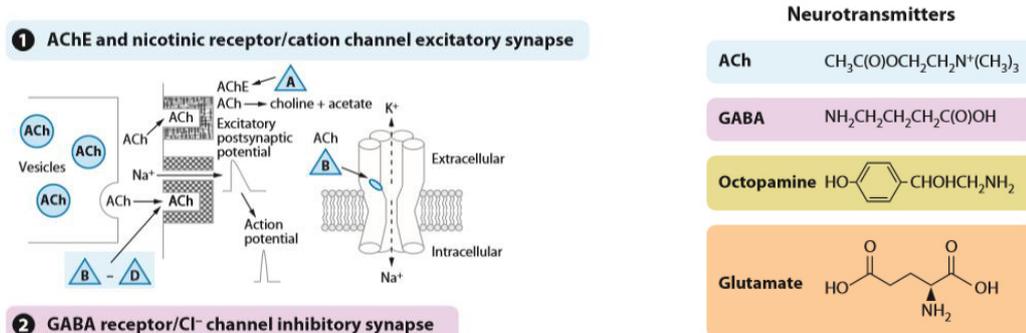
Control Químico

Los insecticidas son usados en el control de este vector, ya sea como larvicidas agregándolos a los criaderos o por aplicaciones de adulticidas espaciales residuales o con el tratamiento e impregnación de materiales (Vontas, *et al.*, 2012).

Los cuatro principales grupos de insecticidas usados para el control han sido los organoclorados, introducidos en la década de 1940; organofosforados, en la década de 1950; metilcabarmatos, en 1960 y piretroides, en los años 1970's. Aunque actualmente también se utilizan productos microbianos o reguladores de crecimiento (Ranson, *et al.*, 2010).

Muchos de los insecticidas atacan el sistema nervioso y esto es por distintas razones: tienen diferentes sitios sensibles que pueden causar una leve interrupción que los hace letales; una capa lipídica protege los nervios de los insectos de tóxicos ionizados, pero no de insecticidas lipofílicos; además de que pobres mecanismos de detoxificación en los nervios proveen prolongados efectos tóxicos (Casida y Durkin, 2013).

Los insecticidas de acuerdo a su modo de acción es mostrado en la figura 2.



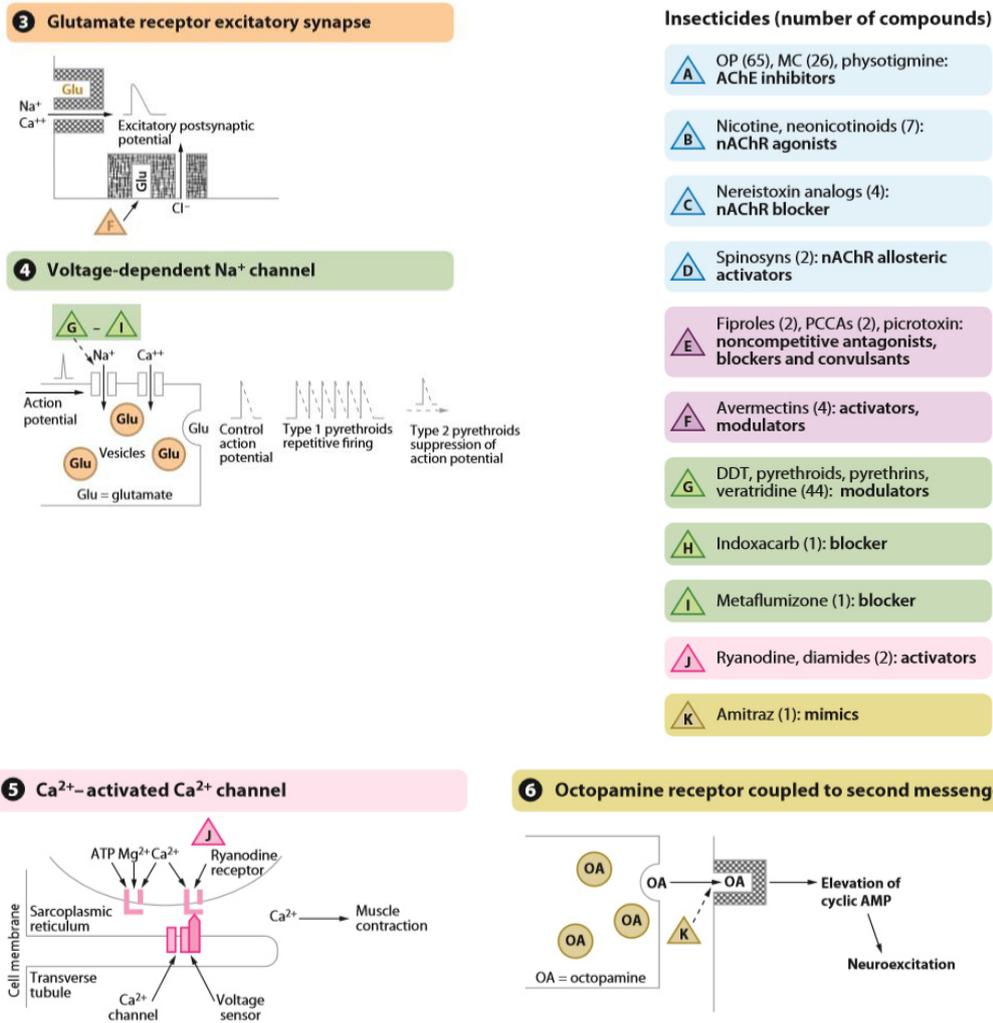


Fig. 2. Clasificación de insecticidas de acuerdo al sitio de acción. Sitios propuestos de acción neurotóxica de insecticidas en impulsos nerviosos, transmisión muscular y receptores sinápticos (tomado de Casida y Durkin, 2013). ACh, acetilcolina; DDT, diclorodifeniltricloroetano; MC, metilcarbamato; nAChR, receptor nicotínico acetilcolina; OP, organofosfato; PCCA, policlorocicloalcano.

Por otro lado la Insecticide Resistance Action Committee (IRAC), clasifica los modos de acción de los insecticidas usados en vectores de enfermedades, de acuerdo a la mejor evidencia de este en los insecticidas disponibles, dividiéndolos en forma general en larvicidas o adulticidas (IRAC, 2015) (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Clasificación de Larvicidas (IRAC, 2015)

Grupo principal y sitio primario de acción	Subgrupo Químico o ejemplificación de ingrediente activo	Ingredientes activos
Inhibidores de acetilcolinesterasa (ACTH)	Organofosforados	Fention, Pirimifos-metil, Temefos

Acción nerviosa		
Receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) moduladores alostéricos Acción nerviosa	Espinosinas	Spinosad
Mímicos de hormona juvenil Reguladores de crecimiento	Análogo de hormona juvenil	Metopreno, Hidropreno
	Piriproxifen	Piriproxifen
Disruptores microbianos de las membranas digestivas de insectos.	<i>Bacillus thuringiensis</i> o <i>Bacillus sphaericus</i> y las proteínas insecticidas que producen.	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> cepa AM65-52
Inhibidores de la biosíntesis de quitina. Regulación del crecimiento.	Benzoilureas	Diflubenzurón, flufenoxurón, lufenurón, teflubenzurón, triflumurón.

Los aduictidas aplicados generalmente como rociados residuales, rociados espaciales o en tratamiento de pabellones (Tabla 2).

Tabla 2. Aduictidas (IRAC, 2015)

Grupo principal y sitio primario de acción	Subgrupo Químico o ejemplificación de ingrediente activo	Ingredientes activos
Inhibidores de acetilcolinesterasa (ACTH) Acción nerviosa	Organofosforados	Fention, Malation Pirimifos-metil,
	Carbamatos	Bendiocarb Propoxur
Moduladores del canal de sodio Acción nerviosa	Piretroides	Bifentrina
	Piretrinas	Ciflutrina
		lambda-Cialotrina
		alpha-Cipermetrina
		Deltametrina
		Etofenprox
	Permetrina	
d,-d transcifenotrina		
DDT	DDT	

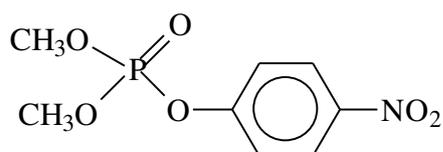
Estos insecticidas pueden penetrar al cuerpo de los insectos por diferentes vías (Bisset, 2002):

1. Por contacto: El insecticida entra por la cutícula.
2. Vía oral: El insecticida es ingerido y absorbido en el intestino.
3. Por los espiráculos: Por fumigaciones el insecticida entra al sistema respiratorio.

Organofosforados

Se desarrollan en la Segunda Guerra Mundial, sintetizándose una gran cantidad de compuestos orgánicos del fósforo. El químico alemán Gerhard Schrader comprobó su alta toxicidad contra insectos plaga en el área agrícola (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1999). La mayoría actúan como insecticidas de contacto,

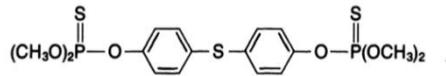
fumigantes y de acción estomacal. Se derivan del ácido fosfórico y fosfónico. La molécula básica es un éster del ácido fosfórico:



Molécula básica es un éster del ácido fosfórico. (Tomado de Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1999)

Son más tóxicos para vertebrados que los insecticidas organoclorados. No son persistentes en el ambiente (Casida y Quistad, 1998). Esta característica ocasionó que los OF desplazaran a los OC en muchos usos agrícolas.

Los organofosforados más usados para el control de insectos vectores son el malation, fenitrothion y temefos (WHO, 2007). Temefos es usado ampliamente como larvicida para el control de mosquitos en zonas endémicas de dengue, en donde es común que las personas almacenen agua en contenedores, siendo lugares ideales para la producción de *Ae. aegypti* (Ranson, 2010). También es conocido como Abate, Difos, Biothion, Abathion, AC-52160, Nimitex, Swebate y fue introducido en el año de 1965 (Opong-Mensah, 1984). Tiene baja toxicidad en mamíferos, poco olor, es barato y usualmente el agua tratada con este insecticida es para uso doméstico (Ranson, *et. al.*, 2010).



Fórmula estructural del temefos 0,0,0',0'-tetramethyl-0,0'-thiodi-p-phenylene phosphorothioate (Tomada de Opong-Mensah, 1984).

Modo de acción de los organofosforados

Inhiben la acetilcolinesterasa (ACTH) en las uniones sinápticas (que es la responsable de la hidrólisis de la acetilcolina) por fosforilación, formando enlaces covalentes muy estables con la enzima fosforilada (Fig. 1). Lo que provoca actividad continua entre las neuronas con pérdida de coordinación nerviosa y tetanización muscular (Lagunes-Tejeda y Vilanueva-Jiménez, 1999).

Piretroides

Son los más usados a mayor escala en el ambiente urbano para el control de *Ae. aegypti* por su baja toxicidad al hombre y animales. Se han aplicado satisfactoriamente por más de 50 años no sólo en la lucha contra el dengue sino también contra la malaria, debido a que actúan rápidamente (efecto knockdown), son fáciles de aplicar y son poco dañinos para el ambiente, los animales y el hombre (Linss, *et al.*, 2014). Son utilizados en aplicaciones ultrabajo volumen y en el tratamiento de materiales como pabellones o cortinas (Davies, *et al.*, 2007).

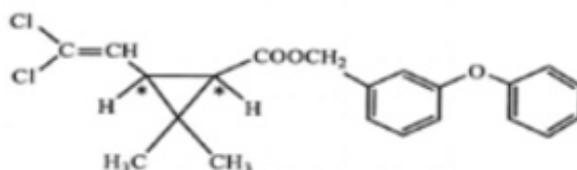
Son ésteres carboxílicos y tanto su parte alcohólica, como su parte ácida pueden tener varios isómeros, pero no todos muestran los mismos niveles de actividad biológica y dependiendo de la presencia o ausencia del grupo ciano en la parte alcohólica, se clasifican en tipo 1 (actúan en los nervios periféricos) y tipo 2 (actúan en el sistema nervioso central) respectivamente (Bisset, 2002).

El origen de los piretroides se remonta al uso del piretro como insecticida de contacto obtenido de las flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Compositae) desde el año 400 a.C. Los componentes del piretro con actividad insecticida son 6; piretrina I, piretrina II, cinerina I, cinerina II, jasmolina I y jasmolina II. Las piretrinas tienen baja estabilidad en condiciones de campo ya que son degradadas

rápidamente por la luz y el calor y debido a esta inestabilidad en 1945 se sintetizó la retrolona a partir de la piretrina I, surgiendo el primer piretroide sintético (Lagunes-Tejeda y Vilanueva-Jiménez, 1999). La primera generación de piretroides comprende sólo la aletrina, que aparece en 1949. Ésta, es muy sensible a la luz del sol. La segunda generación comprende una amplia diversidad de análogos más fotoestables que la aletrina como la tetrametina, que aparece en 1965; seguida de la resmetrina y la bioresmetrina, que surgen en 1967; posteriormente la bioaletrina y la fenotrina, en el año 1973. La tercera generación incluye al fenvalerato y la permetrina, que aparecen de 1972 a 1973. Estos son los primeros piretroides utilizados en el área agrícola por su eficiente actividad insectida y por su fotoestabilidad. En la cuarta generación encontramos piretroides muy efectivos, aquí se incluyen bifentrina, la lambdacialotrina, la cipermetrina, ciflutrina, deltametrina, esfenvalerato, fenopropatrina, flucitrinato, fluvalinato y decametrina. Todos son fotoestables y por su baja volatilidad proveen residualidad por arriba de 10 días en condiciones óptimas (Ware, 1999)

Permetrina

La permetrina es un piretroide sintético tipo I, es fuertemente usado en los programas de control de *Ae. aegypti*, ya sea en aplicaciones espaciales, rociados residuales intradomiciliares o en la impregnación de materiales como cortinas, pabellones, etc. Tiene cuatro isómeros (\pm), cis/trans que proveen actividad insecticida por varias semanas con una simple aplicación (Abou-Donia, *et al.*, 1996)



Fórmula estructural de la permetrina 3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylic acid (3-phenoxyphenyl) (Tomado de -Donia, *et al.*, 1996)

Modo de acción de los piretroides

Los piretroides afectan el sistema nervioso central y el periférico, lo que ocasiona descargas continuas, seguidas de convulsiones. Actúan en la neurotransmisión axonal, en el sitio de reconocimiento en los canales dependientes de Sodio, para

bloquear el transporte de sodio, potenciar la inactivación del canal, prolongar la apertura del canal durante la despolarización e inducir una corriente residual de actividad lenta (Fig. 1). (Casida y Durkin, 2013)

Sin embargo el uso sostenido de temefos y de piretroides, como la permetrina, han generado resistencia en *Ae. aegypti* (Rodríguez, *et al.*, 2007; Jirakanjanakit, *et al.*, 2007; Conde, *et al.*, 2015, Vontas, *et al.*, 2012).

Resistencia a insecticidas

La FAO define la resistencia, como la capacidad desarrollada por una población determinada de insectos, a no ser afectada por la aplicación de insecticidas (FAO, 1979) Sin embargo, también puede definirse como “la habilidad complementaria y hereditaria propia de un individuo o conjunto de ellos, que los capacita fisiológica y etológicamente, para bloquear la acción tóxica de un insecticida por medio de mecanismos metabólicos, y en consecuencia, sobrevivir a la exposición de dosis que para otros sería letal” (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1999). El desarrollo de resistencia en una población de insectos ocurre por la selección de individuos que pueden sobrevivir a la presión por un insecticida.

Hay diferentes tipos de resistencia:

1. Múltiple: La población posee varios mecanismos de resistencia en forma simultánea, por lo que adquiere resistencia a varios insecticidas, aunque no hayan sido aplicados (Bisset, 2000).
2. Cruzada negativa: Se presenta cuando una población resistente, regresa a una susceptibilidad cercana a la original, al aplicar otro insecticida toxicológicamente diferente (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1999).
3. Cruzada: Al aplicar un insecticida la población desarrolla resistencia tanto a este insecticida, como a otros que no hayan sido aplicados, pero que estén relacionados toxicológicamente por al menos un mecanismo de resistencia común (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1999). Por ejemplo el caso de los organoclorados y los piretroides.

La resistencia en *Ae. aegypti*, como en otros insectos, es un fenómeno multifacético que envuelve principalmente dos tipos de mecanismos: El primero de tipo metabólico o enzimático, que consiste en la sobreproducción de enzimas detoxificativas que metabolizan y detoxifican el insecticida o lo secuestran, inhibiendo o previniendo que actúe sobre el sitio blanco (Hemingway, *et al.*, 2004). El segundo mecanismo es el de tipo knockdown resistance o *kdr*, que resulta de la selección de los insecticidas, produciéndose mutaciones en los genes que codifican las proteínas que son el sitio blanco de los plaguicidas (Stenhouse, *et al.*, 2013). Los piretroides se fijan en los canales de sodio dependientes de voltaje de las neuronas, induciendo la apertura del canal (Bisset, 2002). *Kdr* usualmente limita la efectividad de los piretroides, ya que al estar presente una mutación se reduce la sensibilidad de unión del piretroide con los aminoácidos en el canal de sodio (Stenhouse, *et al.*, 2013). Estos mecanismos serán descritos más detalladamente a continuación.

Mecanismos de resistencia

1. Resistencia por comportamiento
2. Penetración reducida
3. Metabólica
4. Insensibilidad en el sitio de acción o *kdr* (“knock-down resistance o resistencia al derribo)

Resistencia por comportamiento

Se refiere a la serie de comportamientos que ayudan reducir la exposición de los insectos ante algún compuesto tóxico en un ambiente que podría ser fatal. Se presentan cambios en la actividad que modifican el contacto con hábitats tratados con insecticidas, como por ejemplo, mosquitos que cambiaron sus hábitos endófilos por exófilos. Sin embargo, este tipo de resistencia es difícil de comprobar y relacionar (Sparks, *et al.* 1989).

Penetración reducida.

Ésta depende de las propiedades físico-químicas del insecticida, de la formulación del insecticida, de la polaridad del insecticida y de la naturaleza del solvente. Por ejemplo, la penetración de los piretroides a través de la cutícula, puede ocurrir por

los canales anastomosados formados en la capa de cera dentro de la cutícula o a través de las regiones intersegmentales que no están esclerotizadas o por los espiráculos a través del revestimiento traqueal lipofílico (Bisset, 2002; Badii y Garza, 2007). Los insectos en general tienen menor penetración del tóxico y en el caso de *Ae. aegypti* se ha registrado penetración reducida por sí sola, confiriendo resistencia 5X a malatión (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1999).

Resistencia metabólica

Normalmente los insectos están expuestos a toxinas en sus dietas o a través de la aplicación de xenobióticos como los insecticidas (Chapman, 2013). En la mayoría de los insectos los tóxicos son excretados, no sin antes ser metabolizados. La resistencia metabólica envuelve alteraciones más sutiles en la expresión de un complejo arreglo de enzimas y vías de detoxificación, sin embargo, estos mecanismos son menos entendidos (Philippe, *et al.*, 2013). La resistencia metabólica ocurre con el incremento de enzimas detoxificativas como oxidasas de función múltiple, glutatión-S-transferasas (GST) y esterasas (Bisset, 2002).

Función Oxidativa Mixta (P450s). También conocido como citocromo P-450. Son uno de los grupos más grandes de enzimas que se encuentran en todos los organismos como bacterias, hongos, plantas y animales. Las monooxigenasas y sus reductasas NADPH P450 se encuentran en el retículo endoplásmico (P450s microsomal) o dentro de las membranas mitocondriales (P450s mitocondrial). Son inespecíficas y se encargan de catalizar una reacción de oxidación que depende de NADPH, de la flavoproteína NADPH-citocromo P450 reductasa, de una ferroproteína y del citocromo P450 (Rodríguez-Coto, 2008). Se encargan de metabolizar insecticidas a través de O-, S- e hidroxilación N-alquil, hidroxilaciones alifáticas y epoxidaciones, hidroxilaciones aromáticas, oxidación éster y oxidación nitrógeno y tio-éter (Wilkinson, 1976). Es uno de los mecanismos más importantes en la detoxificación o activación de xenobióticos, (como los insecticidas) y compuestos endógenos. Al menos hay 4 familias de enzimas P450 reconocidas para insectos (4, 6, 9 y 18), de las cuales las pertenecientes a la familia 6 son responsables de la resistencia (Brogdon y McAllister, 1998a).

Se han reportado diversos genes P450 sobreexpresados en cepas resistentes a mosquitos, incluyendo genes P450 para deltametrina en *Anopheles albimanus*, piretroides en *Anopheles funestus*, pemetrina en *Culex quiquefasciatus* y deltametrina en *Culex pipiens pallens* (Liu, *et al.*, 2015). Comúnmente se usan inhibidores de las P450s como el butóxido de piperonilo (PBO) junto con el insecticida.

Glutation-S-Transferasas (GST). Son proteínas diméricas solubles relacionadas con el metabolismo, detoxificación y excreción de un gran número de compuestos exógenos y endógenos. Se dividen en tres principales grupos: Citosólicas, microsomales y mitocondriales; de las cuales los mosquitos contienen tanto las citosólicas como las microsomales (Lumjuan, *et al.*, 2007).

Las GST citosólicas, están agrupadas en tres clases: I, II y III. En insectos hay una gran variedad que se han clasificado de acuerdo a letras griegas. Por ejemplo la Clase I corresponde a las tipo Delta, la Clase II a las Epsilon y la III a las Sigma. La mayoría de las GST implicadas en el metabolismo de xenobióticos en insectos pertenecen a las Delta y Epsilon (Li, *et al.*, 2007).

Participan en la resistencia a organofosforados, organoclorados y piretroides. Desempeñan un rol en la detoxificación y antioxidación celular conjugando la glutatión reducida con los centros electrofílicos de xenobióticos naturales o sintéticos, incluyendo los insecticidas. Conjugación, dehidrocloración, secuestro del xenobiótico pueden ser los responsables de resistencia a insecticidas, como organoclorados, organofosforados y piretroides (Singh, 2007). El mayor papel de las GST en respecto a organofosforados es la detoxificación del insecticida por la reacción de conjugación con el glutatión resultando en una O-dealquilación u O-dearilación (Lumjuan, *et al.*, 2007)

Algunas GST catalizan la dehidrocloración del DDT, al metabolito DDE, usando el glutatión reducido como cofactor y no como una conjugación. En adición a la dehidrocloración y a la conjugación, las GST están involucradas en la circulación y transporte celular de compuestos endofílicos, unión y secuestro de xenobióticos. Se ha determinado que en la cepa GG de *Ae. aegypti* resistente a DDT existen dos de

tres isoenzimas de GST distintas bioquímica e inmunológicamente, que se encuentran sobre expresadas 2-5 veces y de 25-50 veces respectivamente dependiendo de la edad y el sexo del individuo (GST1a y GST2 o AaGSTD1) (Li, *et al.* 2007).

Esterasas. El mecanismo de resistencia más común en insectos es a través de esterasas, las cuales detoxifican un gran número de insecticidas, metabolizándolos, ya que hidrolizan las uniones éster (Brogdon y McAllister, 1998a). Las esterasas comprenden 6 familias de proteínas pertenecientes a las α y β hidrolasas, encontrándose solas o en conjunto (Hemingway y Ranson, 2000). Las α hidrolizan preferentemente el 1-naftilacetato y las β 2-naftilacetato, por lo que al ser aplicado un insecticida se eliminan los individuos con pocas de éstas enzimas (Bisset, 2002; Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1999).

La resistencia a organofosforados y carbamatos producto de la acción de las esterasas es común en diferentes insectos. Se ha determinado una alta actividad de carboxilesterasas en insectos resistentes a organofosforados (Ling, *et al.*, 1999). Asimismo, los piretroides por ser ésteres pueden ser metabolizados por sus esterasas respectivas.

Se ha reportado que las esterasas desarrollan un papel importante en el metabolismo de permetrina, malatión, temefos, clorpirifos en *Ae. aegypti*, *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Anopheles stefensi* (Flores, *et al.* 2005, Rodríguez, *et al.*, 1999, Brogdon y McAllister, 1998b).

Diferentes mecanismos moleculares son responsables del incremento en la actividad de las esterasas. Por ejemplo, la amplificación de genes es una modificación genómica que puede incrementar el número de copias de genes o el cambio de un aminoácido por otro, da la especificidad en las hidrolasas hacia un insecticida (Li, *et al.*, 2007). En mosquitos como *Culex* se ha observado la amplificación de genes en cepas resistentes (Hemingway y Ranson 2000).

Insensibilidad en el sitio de acción.

Resulta de la modificación estructural o mutaciones puntuales de genes que codifican proteínas que interactúan con insecticidas (Casida y Durkin, 2013). El sitio blanco de insecticidas como el DDT y los piretroides son los canales de sodio causando descargas repetitivas y despolarización de las membranas causando la muerte. La acetilcolinesterasa es una enzima que actúa en el sistema nervioso hidrolizando la acetilcolina y deteniendo el impulso nervioso y es el blanco tanto para organofosforados como para carbamatos (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1999).

Acetilcolinesterasa insensible (iAChE)

La acetilcolinesterasa es una enzima crítica para la hidrólisis de la acetilcolina en la sinapsis neuronal. La toxicidad de insecticidas como los organofosforados y carbamatos depende de la inhibición de la Acetilcolinesterasa (AChE) en las regiones terminales de los nervios colinérgicos. Su inhibición causan la acumulación de acetilcolina y por lo tanto la estimulación continua y excesiva de los receptores colinérgicos (Liu, 2015).

Hay dos tipos de Acetilcolinesterasa, identificadas en mosquitos, la AChE1 y la AChE2, codificadas por los genes *ace-1* y *ace-2*, pero únicamente la AChE1 se ha relacionado con la resistencia a organofosforados y carbamatos. (Weill, *et al.*, 2003). Se han reportado mutaciones en el gen *ace-*, como la G119S confiriendo resistencia en mosquitos como *An. gambiae*, *Anopheles albimanus*, *Culex vishnui*, *Culex pipiens* y *Cx. quinquefasciatus*, pero no en *Ae. aegypti* (Vontas, *et al.*, 2012).

Mutación en receptores GABA

El sitio de acción de ciclodienos y fenilpirazoles son los receptores GABA. Estos receptores responden al neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA) llevando a cabo la transmisión nerviosa entre la célula nerviosa activadora y los músculos (Brogdon y McAllister, 1998a). El modo de acción de como los ciclodienos es el bloqueo del flujo clorinado dependiente del GABA hacia el receptor clorinado de GABA (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1999).

La resistencia a ciclodienos como el dieldrín, es conferida por el cambio de alanina por serina o glicina en el codón 302 del gen *Rdl* (resistance to dieldrin) (ffrench-Constant, *et al.*, 2004).

Canales de sodio y Knockdown resistance

El término knock down resistance (kdr) es usado para describir el mecanismo de resistencia no metabólico, que confiere resistencia a la acción de parálisis rápida ocasionada por el DDT y los piretroides, reduciendo la sensibilidad en los canales de sodio (Linss, *et al.* 2014). Los piretroides actúan en los canales de sodio dependientes de voltaje, los cuales están compuestos por cuatro dominios homólogos (I-IV), con seis segmentos hidrofóbicos cada uno (S1-S6) (Catterall, 2000). Se han identificado una serie de mutaciones en diferentes ordenes de insectos que afectan la susceptibilidad a piretroides. Estas mutaciones consisten en cambios conformacionales en los canales de sodio confiriendo resistencia al derribo o kdr.

De acuerdo con Burton, *et al.*, (2011) el clásico kdr, resulta de la sustitución de Leucina por Fenilalanina (L1014F) en los canales de sodio dependiente de voltaje en un gran número de insectos, reportándose por primera vez en *Musca domestica*. Han sido reportadas otras dos sustituciones L1014S y L1014H, las cuales, al caracterizar estas tres mutaciones se observó que hay resistencia a DDT, permetrina y piretroides respectivamente. No únicamente estas sustituciones han sido registradas modificando la susceptibilidad a piretroides, por ejemplo *Heliothis virescens* presenta resistencia a piretroides por la mutación Leu1014His (Park, *et. al.*, 1999). Al menos otras 20 sustituciones han sido registradas presentándose principalmente en los segmentos S4 y S5 o en los segmentos S5 y S6 del dominio II.

Respecto a mosquitos, la mutación F1014 ha sido identificada en *An. gambiae* y *Culex*, pero no en *Ae. aegypti*, debido a que en el sitio 1014 del canal dependiente de sodio, es codificado por CTA, en lugar de TTA, codón presente en la mayoría de los otros insectos (Tabla 3). Para que se presentara sería necesario que se substituyeran 2 nucleótidos simultáneamente (Saavedra-Rodriguez, *et al.*, 2007). Sin embargo, se han encontrado otras mutaciones como la Val016Ile y la Phe1534Cys reduciendo la susceptibilidad a piretroides, en los segmentos IIS6 y IIIS6 respectivamente

(Saavedra-, *et al.*, 2007, Harris, *et al.*, 2010). La frecuencia se ha visto incrementada en lugares con intenso uso de piretroides como México, Brasil (Ile1016), Gran Caimán, Martinica y Tailandia (Cys1534) (Ponce, *et al.*, 2009, Harris, *et al.*, 2010, Stenhouse, *et al.*, 2013). Estas mutaciones se han encontrado en poblaciones resistentes a permetrina, mientras que la V1016G se determinó confiriendo resistencia a deltametrina (Stenhouse, *et al.*, 2013).

Tabla 3. Mutaciones detectadas en los canales de sodio dependientes de voltaje en mosquitos confiriendo resistencia a insecticidas.

Mutación	Especie	Autor
L1014S	<i>An. gambiae</i>	Brooke, 2008
L1014F	<i>An. gambiae</i>	Brooke, 2008
I1011M	<i>Ae. aegypti</i>	Brengues, <i>et al.</i> , 2003
I1011M	<i>An. gambiae</i>	Brengues, <i>et al.</i> , 2003
F1269C	<i>Ae. aegypti</i>	Saavedra, <i>et al.</i> , 2007
V1016I	<i>Ae. aegypti</i>	Saavedra, <i>et al.</i> , 2007
F1534C	<i>Ae. aegypti</i>	Yanola, <i>et al.</i> , 2011

Se ha desarrollado un modelo para predecir el lugar de los sitios de unión para los piretroides y el DDT en los canales de sodio dependientes, dicho modelo aborda la afinidad de los piretroides, su mecanismo de acción y el rol que juegan las mutaciones de los canales de sodio en la resistencia (O'Really, *et al.*, 2006). Saavedra, *et al.* (2007) reportan la presencia de dos mutaciones en los codones 1,011 y 1,016, codificando un cambio a Valina y uno a Isoleucina respectivamente, mientras que en 2009, Ponce *et al.* reportaron el análisis de la frecuencia de la mutación Ile 1,016 en 3,808 *Ae. aegypti* de 78 colecciones de los años 1996 a 2008 en México y determinaron que un análisis de regresión lineal basado en 7 de las colecciones de 2007 revelaron que la frecuencia de homocigotos Ile1,016 predicen con precisión el rango de kdr para mosquitos expuestos a bioensayos de permetrina.

Hu, *et al.*, (2011, citado en Burton, 2011) reportaron la mutación IIS6 (F1515C, numeración dada en cucaracha) debido a que confirió resistencia a permetrina en *Ae. aegypti*. La detección de kdr en campo tiene consecuencias en el uso de los piretroides para el control de mosquitos.

Bioensayos con mosquitos

Actualmente se realizan bioensayos, pruebas bioquímicas y moleculares, además de diagnósticos genéticos para detectar y cuantificar la resistencia a los insecticidas (Brogdon *et al.*, 1998, Morou, *et. al.*, 2010).

Tabla 4. Susceptibilidad a insecticidas en poblaciones de *Ae. aegypti* (Lagunes-Tejeda, *et al.*, 2009)

Insecticida	DL ₅₀	Referencia	Insecticida	DL ₅₀	Referencia
<i>B. t. israelensis</i>	0.0026 mg/L	Vejar, 1994	Permetrina+S-bioaletrina	0.003 mg/L	Vejar, 1994
<i>B. t. israelensis</i>	0.015 mg/L	Vejar, 1994	Permetrina+S-bioaletrina	0.0015 mg/L	Vejar, 1994
<i>B. t. israelensis</i>	0.0012 mg/L	Vejar, 1994	Permetrina+S-bioaletrina	0.0026 mg/L	Vejar, 1994
<i>B. t. israelensis</i>	0.002 mg/L	Vejar, 1994	Permetrina+S-bioaletrina	0.003 mg/L	Vejar, 1994
<i>B. t. israelensis</i>	0.0013 mg/L	Vejar, 1994	Pirimifós metílico	0.014 mg/L	Sánchez, 1995.
Diclorvós	0.012 mg/L	Sánchez, 1995.	Propoxur	0.7 mg/L	Sánchez, 1995.
Fentión	0.003 mg/L	Sánchez, 1995.	Temefós	0.0002 mg/L	Sánchez, 1995.
Fenvalerato, 1994	0.012 mg/L	Sánchez, 1995.	Temefós	0.0008 mg/L	Vejar
Malatión	0.066 mg/L	Sánchez, 1995.	Temefós	0.011 mg/L	Vejar, 1994
Naled	0.03 mg/L	Sánchez, 1995.	Temefós	0.006 mg/L	Vejar, 1994
Permetrina.	0.003 mg/L	Sánchez, 1995	Temefós	0.009 mg/L	Vejar, 1994
Permetrina+S-bioaletrina	0.002 mg/L	Vejar, 1994	Temefós	0.006 mg/L	Vejar, 1994

El bioensayo es una herramienta útil para determinar si la población es susceptible o resistente, por lo que Lagunes, *et al.*, (2009), se dieron a la tarea de presentar los valores de las DL₅₀ para 64 insecticidas o acaricidas en 33 especies de artrópodos, para la utilización en la determinación en la susceptibilidad o resistencia de estas poblaciones, datos entre los cuales se encuentra *Ae. aegypti*. (Tabla 4).

Estudios recientes con bioensayos y pruebas bioenzimáticas revelan que en países del Caribe, como Trinidad y Tobago, existe resistencia en *Ae. aegypti* a diferentes insecticidas utilizados para el control, tales como DDT, temefós, bendiocarb y permetrina y que en la mayoría de las poblaciones estudiadas tienen actividad por oxidasas (Función oxidasa mixta). Los niveles de actividad enzimática altos, muestran que un papel importante en la manifestación de resistencia en este mosquito. Los bioensayos y las pruebas bioquímicas utilizados como parte de los programas de control de vectores juegan un papel importante en el seguimiento de la eficacia de los insecticidas, lo que permite la detección temprana de resistencia y contribuye a tomar las medidas necesarias para realizar un manejo adecuado (Polson, *et al.*, 2011).

Situación actual en Puerto Rico

Puerto Rico inicia el control de *Ae. aegypti* alrededor de 1950 y se basó inspecciones domiciliarias y en la aplicación perifocal de organoclorados como el DDT y el dieldrín, sin embargo, en 1959 se detecta resistencia de *Ae. aegypti* a estos insecticidas, la cual es confirmada en 1963 en Puerto Rico y las Islas Vírgenes, lo que se considera como un factor que contribuyó al fracaso en la erradicación de este mosquito en dicho país; en 1960 se reportaron los primeros casos de resistencia a organofosforados y carbamatos, encontrándose una cepa en Puerto Rico resistente 10x a malatión y Diazinón (Fox, 1961).

Años después, en 1969, se detecta resistencia al malatión y a partir de ese año se abandona la campaña de erradicación de *Ae. aegypti* en Puerto Rico (Barrera, 2010). En 1988 se reporta resistencia a temefos, malatión, fentiión y clorpirifos en una cepa de *Ae. aegypti* de Puerto Nuevo (Rawlings y Ragoonansingh, 1990, citado en Barrera

2010). En la actualidad el manejo de este mosquito se realiza con Cipermetrina, para uso residual en llantas; piretrinas más butóxido de piperonilo, en aplicaciones intradomiciliarias y permetrina más butóxido de piperonilo, para aplicaciones Ultra Bajo Volumen. Desafortunadamente desde la década de los 90's hasta la fecha, no se conocen los niveles de susceptibilidad de *Ae. aegypti* a insecticidas en Puerto Rico y tampoco se ha determinado si efectivamente un programa sostenido de control combinado con un enfoque basado en la participación comunitaria pudiera resolver el problema de la transmisión de los virus del dengue en este país.

3. JUSTIFICACIÓN

Aedes aegypti en Puerto Rico, está fuertemente incriminado en la transmisión de dengue, chikungunya y zika lo que representa un problema de salud pública en este país. Debido a la interacción de diversos factores como la circulación simultánea de diferentes serotipos, el clima, la ecología, su control, la temprana aparición de resistencia a insecticidas (Barrera, 2010, Barrera, *et. al.*, 2014), la ausencia de programas de control de vectores en Puerto Rico basados en la prevención, además del desconocimiento de los niveles de susceptibilidad a insecticidas de *Ae. aegypti*, desde la década de los 90's hasta la fecha, permitió plantear como objetivo, determinar la susceptibilidad a insecticidas de uso común como temefos y permetrina y mecanismos de resistencia de poblaciones larvarias y adultas *Ae. aegypti* así como también a spinosad como un larvicida alternativo; además de detectar mutaciones asociadas a la resistencia tipo kdr como la Cys 1534 e Ile 1016.

4. HIPÓTESIS

El uso continuo de insecticidas organofosforados y piretroides para el control de *Ae. aegypti* en Puerto Rico, lo ha llevado a generar resistencia a los mismos.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el grado de susceptibilidad de *Ae. aegypti* en ocho poblaciones de Puerto Rico a los insecticidas organofosforados y a los piretroides, así como determinar los mecanismos de resistencia enzimática y la mutación knock-down resistance (kdr) Ile1,016 y Cys 1534.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la Concentración Letal 50 (CL₅₀) a temefos y spinosad en larvas de ocho poblaciones de Puerto Rico
2. Evaluar el grado de susceptibilidad a permetrina en adultos de ocho poblaciones de Puerto Rico mediante la determinación de la Concentración Letal 50 (CL₅₀).
3. Determinar la CK50, TK50 y TL50 para permetrina, en adultos de ocho poblaciones de Puerto Rico y la cepa susceptible New Orleans.
4. Determinar el grado de susceptibilidad a temefos y spinosad en larvas y a permetrina en adultos en la cepa susceptible New Orleans mediante la determinación de la Concentración Letal 50 (CL₅₀).
5. Determinar la presencia de los mecanismos enzimáticos de resistencia asociados a temefos, spinosad y permetrina.
6. Determinar la frecuencia de mutación knock-down resistance (kdr) Ile1,016 y Cys 1534 en poblaciones adultas.

6. METODOLOGÍA

Área de estudio:

Ocho localidades de diferentes regiones geográficas de Puerto Rico fueron seleccionadas para este estudio (Fig. 3):

Región Noreste: Guaynabo 18°22'19.66" N 66°6'11.34" W.

Región Este: Canovanas 18°22'41.41" N 65°53'50.31" W; Carolina (Villa Carolina) 18°23'23.97" N 65°57'17.23" W;

Región interior Este: Caguas 18°14'27.06" N 66°1'29.47" W

Región Sur: Salinas 17° 58'47.99" N 66°17'24.56" W, Guayama 17°59'14.40" N 66°6'40.83" W, Ponce 17°58'58.77" N 66°37'31.41" W y Peñuelas 18° 3'48.37" N 66°43'52.95" W.

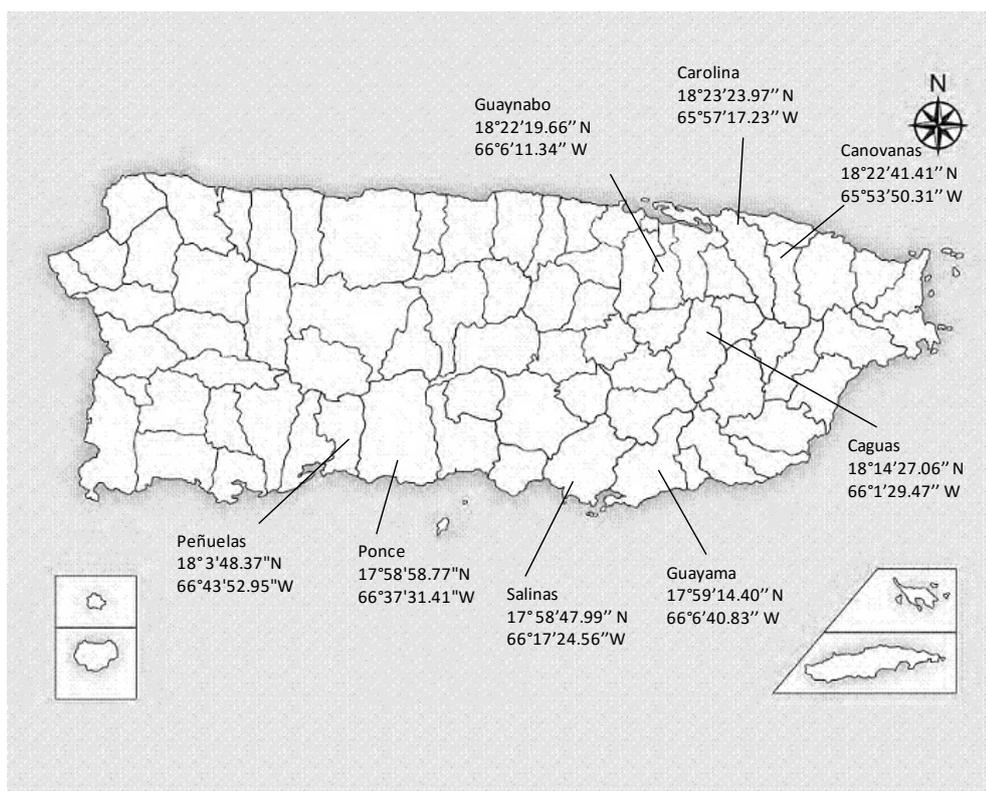


Fig. 3. Ubicación geográfica aproximada, del sitio de muestreo en los municipios de Puerto Rico en donde se realizaron las colectas de *Ae. aegypti*.

Estos municipios se distribuyen a lo largo de Puerto Rico, por lo que representan los diferentes tipos de clima en la isla.

Material biológico: Huevos de *Ae. aegypti* fueron colectados utilizando 30 ovitrampas de plástico negras (450 mL) colocadas en viviendas de cada localidad. Las ovitrampas contenían una infusión de heno hasta la mitad del recipiente y papel filtro como sustrato para la ovoposición. Los huevos colectados se condicionaron manteniéndolos húmedos por tres días para permitir el desarrollo embrionario de *Ae. aegypti* en el Dengue Branch, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), San Juan, Puerto Rico. Posteriormente los huevos (estos se consideraron como los parentales) se colocaron en charolas con agua declorada y levadura para su eclosión y las larvas fueron alimentadas con alimento para conejo (Breeder's Choice® Rabbit Feed) hasta la emergencia de los adultos. Para la producción de huevos (F₁), las hembras se alimentaron con alimentadores artificiales que contenían sangre de res.

Establecimiento de la colonia en el laboratorio

Los huevos (F₁), fueron enviados al área de Fisiología y Toxicología del Laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), México, para llevar a cabo los bioensayos de susceptibilidad y ensayos bioquímicos.

En el insectario los huevos (F₁) se colocaron en charolas con agua declorada y las larvas fueron alimentadas con proteína de hígado en polvo al 50%. Las pupas obtenidas fueron transferidas a vasos, los cuales se colocaron en jaulas (30x30x30 cm) para la emergencia de los adultos. Las jaulas se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (27°C±1°C) y humedad relativa (80% ±2), y los machos fueron alimentados con una solución azucarada al 10% y las hembras con sangre de *Rattus norvegicus* para la producción de huevos (F₂). Con las larvas obtenidas, siguiendo la metodología de la WHO (2005), se realizaron los bioensayos con ambos larvicidas para obtener la concentración letal media (CL₅₀) para cada población, usando como referencia la cepa susceptible New Orleans (NO).

El uso de vertebrados para la alimentación de los mosquitos fue bajo el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y de la U.S. Department of Health and Human Services (OLAW A5884-01).

Pruebas de susceptibilidad a temefos y spinosad (Natular® EC) en larvas

Las pruebas de susceptibilidad se realizaron siguiendo la metodología propuesta por la WHO (2005): Se colocaron 20 larvas de tercer estadio en envases de plástico que contenían 99 mL de agua destilada y se les adicionó 1 mL de la solución stock del insecticida. Se evaluaron 5 o más concentraciones de cada uno de los larvicidas por triplicado, tanto en las poblaciones de Puerto Rico, como en la cepa susceptible NO. Asimismo se incluyó un control (también por triplicado) al cual se le añadió 1 mL de etanol. Se registró la mortalidad 24 horas después de la exposición.

Preparación de soluciones stock:

- a) Temefos (O,O,O´O´-tetrametil – O,O´-tiodi p-fenilen difosforotionato): Una solución stock diluida en etanol (100 µg/µl) fue preparada a partir de temefos (97.5% i.a. Chem Service), de la cual posteriormente se seleccionaron concentraciones que produjeron mortalidades entre 2 y 98%. b)
- b) Spinosad: Una solución stock diluida en agua destilada (100 µg/µl) fue preparada a partir del producto comercial Natular® EC, Clarke, (239g/L), de la cual posteriormente se seleccionaron concentraciones que produjeron mortalidades entre 2 y 98%.

Pruebas de susceptibilidad para a permetrina en mosquitos adultos

Las pruebas de susceptibilidad se realizaron siguiendo la metodología de “botella impregnada”, propuesta por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta, USA (Brogdon y McAllister, 1998b).

Preparación de soluciones stock

- c) Permetrina: Una solución stock diluida en acetona (100 µg/µl) fue preparada a partir de permetrina (40.1% de pureza cis-58.7% trans, Chem Service), de la cual posteriormente se seleccionaron concentraciones que produjeron mortalidades entre 2 y 98%.

Impregnación de botellas

Se emplearon botellas de vidrio de 250 mL de capacidad de la marca Wheaton con tapón de rosca. Cada botella fue impregnada con 1 mL de acetona y la cantidad de insecticida calculada de la solución stock anteriormente preparada. Posteriormente la botella se tapó y la mezcla se dispersó con movimientos suaves, por toda la botella incluyendo la tapa. En seguida se quitó la tapa y la botella se dejó a temperatura

ambiente, en un lugar oscuro y seco, por 24 horas para que se evaporara el exceso de acetona.

Pruebas de susceptibilidad a permetrina en adultos de mosquitos

Se realizaron bioensayos que con hembras (F₂) de 1 a 3 días de edad, alimentadas sólo con una solución azucarada al 10%. Las cuales fueron colocadas en las botellas previamente impregnadas con permetrina. Se expusieron por 60 minutos, periodo durante el cual se hicieron observaciones cada 10 minutos, registrándose los mosquitos derribados. Se consideró como mosquito derribado a aquel que era incapaz de volar, el que estaba dorsalmente en el fondo de la botella o el que no se mantenía erguido. Posteriormente los mosquitos se colocaron en envases libres sin insecticida en donde se mantuvieron por 24 horas para registrar la mortalidad al término de este tiempo. Se siguió esta metodología para las cepas de Puerto Rico y para la cepa susceptible New Orleans. Los mosquitos muertos se mantuvieron a -70°C.

Factor de resistencia

El Factor de Resistencia (FR) fue determinado siguiendo los criterios de Mazarri y Georghiou (1995), este se calcula dividiendo los valores de la variable a determinar como la CL₅₀ o TL₅₀ de las poblaciones bajo estudio entre los obtenidos en la cepa susceptible New Orleans. Los resultados indican, que si el FR es menor a 5, la población es susceptible, mayor o igual a 5, tolerante y un FR mayor a 10, la población es considerada como resistente.

Pruebas bioquímicas

Se realizaron pruebas bioquímicas para medir la respuesta enzimática de las larvas o de los mosquitos adultos. Cada una de 30 larvas (F₂) o mosquitos fueron homogeneizados individualmente en 100 µl de buffer fosfato de potasio 0.01 M pH 7.2 y suspendidos en 2 mL del mismo buffer. Alícuotas de 100 µL, por triplicado, se transfirieron a placas de microtitulación. Se cuantificaron las enzimas acetilcolinesterasa insensible (iAChE), alfa y beta-esterasas, oxidasas de función múltiple (MFO), y glutatión-S-transferasas (GST) (Brogdon and Dickinson, 1983; Brogdon, *et al.*, 1997; Brogdon and Barber, 1990; Brogdon, 1988; Brogdon and McAllister, 1998), usando como referencia la cepa NO. Las absorbancias se midieron con un espectrofotómetro ASYS UVM-340, (Austria, Europa) y fueron promediadas. (Anexo I)

Umbral de resistencia

El umbral de resistencia a insecticidas se determinó con el valor promedio máximo de absorbancia de la cepa NO para cada enzima, y se categorizaron los mecanismos enzimáticos como no alterado (NA) cuando menos del 15% de las absorbancias de los especímenes analizados rebasa el umbral, incipientemente alterado (IA) entre 15 y 50% o alterado (A) cuando más del 50% rebasa dicho umbral.

Análisis Estadístico

Una vez obtenidos los resultados de mortalidad, fueron analizados para la determinación de la concentración letal media (CL₅₀) mediante el software IRMA de dosis-respuesta (Lozano-Fuentes, *et al.*, 2010).

La prueba *U*-Mann Whitney, fue empleada para determinar diferencia significativa entre las medianas de los niveles enzimáticos en las larvas de las poblaciones estudiadas con respecto a la cepa de referencia; también fue determinado el grado de asociación entre los valores de CL₅₀ a la cual fue sometida cada población y los niveles enzimáticos (valores promedio de absorbancias), mediante un análisis de regresión lineal con el programa SPSS versión 22.

Se utilizó la fórmula de corrección de mortalidad en el testigo de Abbot (1925) en caso de que haya mortalidad en el testigo para cada insecticida probado.

Determinación de las frecuencias alélicas de la mutación "kdr"

Se determinaron las frecuencias alélicas de la mutación *Ile1016* y *Cys1534* en hembras de *Ae. aegypti* de las poblaciones de Puerto Rico antes mencionadas. Se extrajo el ADN genómico de la cabeza de los mosquitos siguiendo la técnica de extracción de sales (Coen, *et al.*, 1982) (Anexo I)

Amplificación de los alelos *Ile1,016* y *Val1,016*

Se realizó una sola reacción de PCR en tubo, para lo cual se preparó un Máster mix con Buffer 10x, Agua destilada ultrapurificada, Cloruro de Magnesio 1.5 mM, dNTP's 25nM, 2 primers "alelo específicos" a 500 pM/μl: Val1,016 5' - [GCGGGCAGGGCGGGCGGGGGCGGGGCCACAAATTGTTTCCCACCCGCACCG] 3' y Ile1,016 (5' -[GCGGGCACAAAT TGTTTCCCACCCGCACTGA]-3' y un primer anti sentido Ile1,016r 5' - TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC y Taq polimerasa 5U/μL. En cada tubo de PCR se colocó 1.5 μL de ADN y se le agregó 23.5 μL del Master Mix, se mezclaron por pipeteo y se colocaron en un

termociclador Biocycler BIORAD ® programado a 4 ciclos: 1er ciclo: 95 °C x 5 min, 2do Ciclo: 95°C x 1min, 60°C x 1min, 72 °C x 1.15 min 29x, 3er Ciclo: 72°C x 10min, 4to Ciclo x 4°C 24 horas

Tabla 5. Amplificación de los alelos Ile1,016 y Val1,016

Agua bidestilada
10x Buffer
dNTPs (el sustrato para nuevo ADN)
Primer 1 Val1016fGCGGGCAGGGCGGGGGCGGGGCCACAAATTGTTTCCCACCC GCACCGG Primer 2 Ile1016f GCGGGCACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA Primer 3 Ile1016r TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC
Taq Polimerasa
DNA 3 µl

Programa de termociclador (alelos Ile1016 y Val1,016)

Pasos	Temp.	Tiempo
1.	95°C	5 min.
2.	95°C – 30 seg, 63°C – 30 seg, 72 °C - 1 min 30x.	
3.	72°C	5 min
4.	4°C	∞.

La identificación de genotipos se realizó siguiendo la metodología descrita por Álvarez, 2012: Los productos de PCR, un marcador de peso molecular de 12 bandas (de 25bp a 500 pb HyperLadderTMV, Bionline) y el control negativo se revisaron en geles de agarosa al 3% disueltos en TBE. Las muestras en el gel se mezclaron 3 µL de buffer de carga (azul de bromophenol disuelto en TBE 1X y glicerol) y 6 µL de los productos de PCR y se colocaron en los pozos del gel. La electroforesis se corrió por 20 minutos a 100 voltios y se visualizó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta para lo genotipificación.

Amplificación de los alelos Cys1535 y Phe1534

Se mezcló iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad 170-8880), más ddH₂O y los primers Cys1534+GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCTCTACTTTGTGTTCTTC ATCA GTG. Phe1534 + GCGGGCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATATT 1534 – TCTGCTCGTTGAAGTTGTCGAT. Se utilizaron placas multidisco para PCR tiempo real (BioRad MLL9651), a los cuales se les colocó 19 µL del Mix y 1 µL de la muestra de ADN.

Las condiciones del termociclador fueron: 95 ° C 3 min, 95 ° C 10 seg, 57 ° C 10 seg, 72 ° C 30 seg, 39 veces más a la etapa 2, 95 ° C 10 seg. La curva de fusión 65 ° C a 95 ° C Incremento de 0,5 ° C por 5 segundos + Placa leído.

Tabla 6. Amplificación de los alelos Cys1535 y Phe1534

Agua bidestilada
iQSyber Green Supermix
ddH ₂ O
Primer 1 Cys1534+GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCTCTACTTTGTGTTCTTC ATCA GTG. Primer 2 Phe 1534 + GCGGGCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATATT Primer 3 Phe 15341534 – TCTGCTCGTTGAAGTTGTCGAT TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC
DNA 1 µl

Programa de termociclador (alelos Cys1534 y Phe1534)

Pasos	Temp.	Tiempo
1.	95°C	3 min.
2.	95°C – 10 seg, 57°C – 10 seg, 72 °C - 30 seg 39x, 95°C	
3.	65°C-95°C	
4.	0.5°C	5 seg.

Los resultados fueron leídos a través de la técnica de Melt Curve en la que:

Un pico a 80 °C (Phe1534) correspondió a susceptibles. Un pico a 85 °C (Cys1534), corresponde a resistentes y ambos picos, 80°C y 85°C, heterocigoto Fig 4

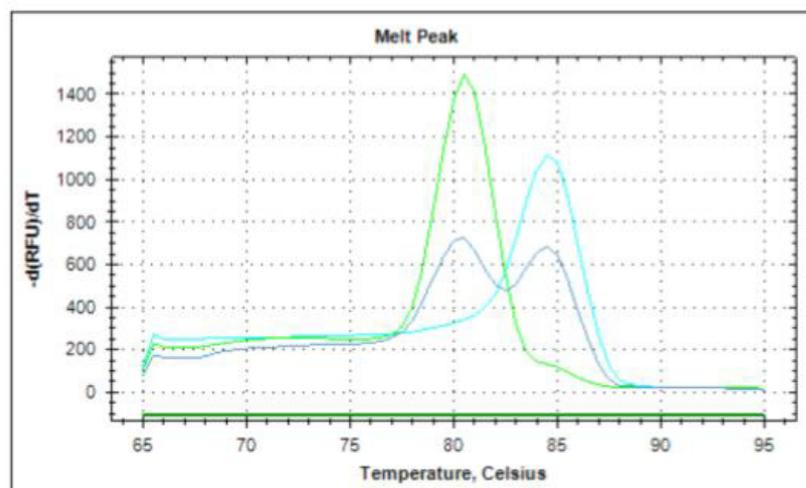


Fig. 4. Gráfica de Meltcurve, que muestra las curvas con sus temperaturas correspondientes: un pico a 80 °C, (Phe1534) (susceptibles), un pico a 85 °C (Cys1534) (resistentes) y ambos picos, 80°C y 85°C, heterocigotos

Frecuencia de alelos Ile 1016 y Cys 1534

Las frecuencias genotípicas f fueron calculadas dividiendo el número de mosquitos con el genotipo a calcular entre el total de mosquitos analizados:

1.- Frecuencia del genotipo homocigoto susceptible

f_{GG} (f_{GG} Número de mosquitos / Numero de mosquitos analizados 2.- Frecuencia del genotipo homocigoto resistente Ile1,016/Ile1,016 f_{AA} (f_{AA} Número de mosquitos / Numero de mosquitos analizados . 3.- Frecuencia del genotipo heterocigoto Val1,016/Ile1,016 f_{GA} (f_{GA} Número de heterocigotos / Número de mosquitos analizados.

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

$$1.- p = f_{GG} + f_{GA}/2 \quad \text{Frecuencia alélica de Val1,016}$$

$$2.- q = f_{AA} + f_{GA}/2 \quad \text{Frecuencia alélica de Ile1,016}$$

La comprobación del Equilibrio Hardy-Weinberg se suele llevar a cabo utilizando la prueba de χ^2 $\chi^2 = \sum (O-E)^2/E$

donde: O son los genotipos observados y E los genotipos esperados, los cuales se calcularon según fórmula de Hedrick (2011):

- Homocigotos Val1,016/Val1,016 esperados $GG_{esp} = p^2(n)$
- Homocigotos Ile1,016/Ile1,016 esperados $AA_{esp} = q^2(n)$
- Heterocigotos Val1,016/Ile1,016 esperados $G/A_{esp} = 2pq(n)$

Si el valor de χ^2 calculado es $< \chi^2$ tabulado (1 d.f) = 3.84 y una $P < 0.05$ aceptamos la H_0 : la sub-población bajo estudio se encuentra en equilibrio Hardy- Weinberg.

El Coeficiente endogámico de Wright's FIS (1921) fue calculado mediante la siguiente fórmula: $FIS = 1 - (H_{obs}/H_{exp})$ donde: H_{obs} es el número de heterocigotos observados y H_{exp} esperados, es igual a $= 2\tilde{p}(1 - \tilde{p})$ donde \tilde{p} es la frecuencia del alelo mutante.

El intervalo de confianza 95% alrededor de \tilde{p} , fue calculado como el intervalo Wald: $\tilde{p} \pm z_{\alpha/2} \sqrt{\tilde{p}(1 - \tilde{p})/n}$, : el cual fue ajustado por adición de la mitad del cuadrado del valor crítico Z (1.96), para el numerador y el cuadrado entero del valor crítico en el denominador antes calculando el intervalo (Agresti y Coull, 1998).

7. RESULTADOS

Susceptibilidad de larvas a Temefos y Spinosad

Los valores de la CL_{50} para temefos y spinosad se muestran en el Tabla 4. De acuerdo con los los factores de resistencia (FR), todas las poblaciones resultaron susceptibles a ambos larvicidas ($FR < 5$). Spinosad presentó valores entre 0.26 - 1.37, mientras que para temefos fluctuaron entre 1.12 - 4.32. Con respecto a spinosad la población con el mayor valor de CL_{50} fue Caguas con 0.26 $\mu\text{g/mL}$ y el menor el de Peñuelas 0.05 $\mu\text{g/mL}$. Con base en el traslape de los intervalos de confianza se determinó que los valores de CL_{50} de las poblaciones de Canovanas, Caguas, Salinas, Guayama y Peñuelas, resultaron significativamente diferentes respecto a la cepa susceptible NO; mientras que Caguas resultó ser significativamente diferente en comparación con las otras poblaciones (Fig. 5).

Tabla 7. CL_{50} , y factor de resistencia de larvas de *Ae. aegypti* expuestas a spinosad y temefos.

Población	Spinosad		Temefos	
	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$) LC	Factor de Resistencia	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$) LC	Factor de Resistencia
New Orleans	0.193 (0.178-0.209)		0.0081 (0.007-0.009)	
Canovanas	0.16 (0.15-0.17)	0.83	0.033 (0.031-0.035)	4.07
Guaynabo	0.21 (0.2-0.22)	1.09	0.035 (0.033-0.036)	4.32
Caguas	0.26 (0.24-0.28)	1.37	0.024 (0.022-0.026)	2.47
Carolina	0.18 (0.16-0.19)	0.92	0.017 (0.016-0.018)	2.10
Salinas	0.14 (0.12-0.16)	0.73	0.024 (0.023-0.025)	3.05
Guayama	0.15 (0.14-0.16)	0.78	0.028 (0.026-0.029)	3.46
Ponce	0.19 (0.18-0.21)	1.01	0.011 (0.011-0.012)	1.43
Peñuelas	0.05 (0.04-0.053)	0.26	0.0091 (0.008-0.009)	1.12

LC: Límites de confianza.

Con relación a temefos, el mayor valor de CL_{50} se presentó en la población de Guaynabo (0.035 $\mu\text{g/mL}$), en contraste con Peñuelas de 0.0091 $\mu\text{g/mL}$; de acuerdo

con el traslape de los intervalos de confianza, sólo el valor obtenido para la población de Peñuelas no presentó diferencia significativa con respecto a la cepa NO, ni a las otras poblaciones. Sin embargo, los valores de CL_{50} obtenidos para las poblaciones de Caguas, Carolina y Salinas no mostraron diferencia significativa (Fig. 6).

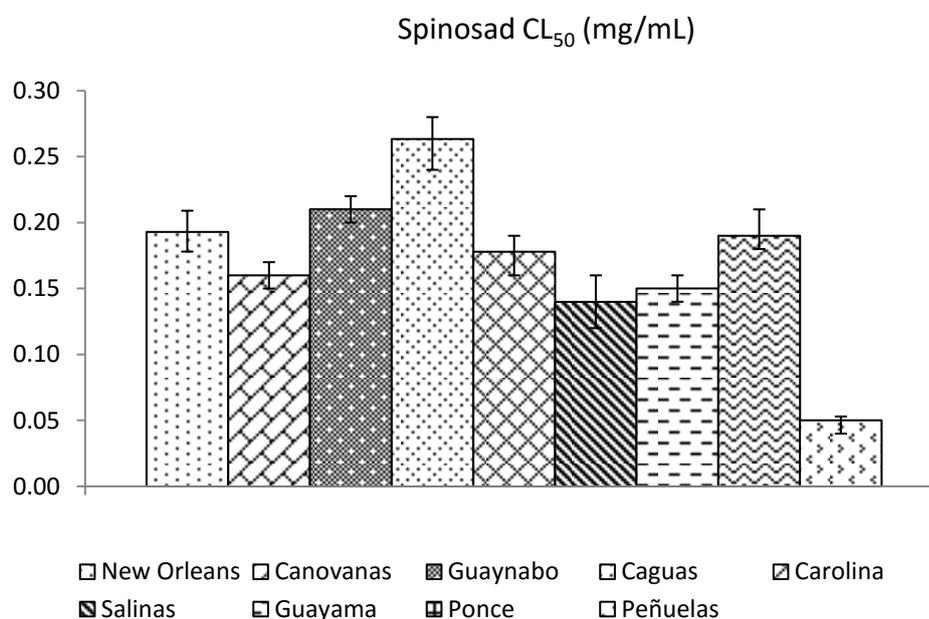


Fig. 5. $CL_{50} \pm$ intervalos de confianza de larvas expuestas a spinosad de poblaciones de Puerto Rico y la cepa susceptible NO.

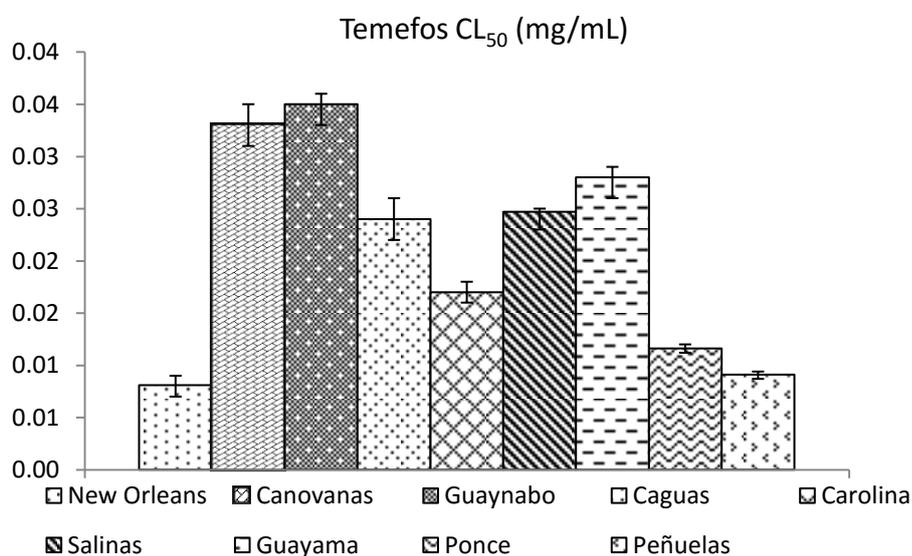


Fig. 6. $CL_{50} \pm$ intervalos de confianza de larvas expuestas a temefos de poblaciones de Puerto Rico y la cepa susceptible NO.

En el Tabla 5 se muestran los valores de umbral de resistencia obtenidos para la cepa NO y el porcentaje que sobrepasa el umbral para cada enzima y población. Las enzimas alfa esterases se presentaron alteradas para las poblaciones de Caguas,

Guaynabo y Guayama (70%-100%), incipientemente alteradas para Canovanas, Peñuelas y Ponce (23.3%-43.3%) y no alteradas para Carolina y Salinas (6.6%-13.3%). Respecto a beta esterases las poblaciones de Caguas, Guaynabo, Salinas, Guayama y Peñuelas presentaron enzimas alteradas (76.6%-100%), incipientemente alteradas Canovanas y Ponce (40%) y no alteradas Carolina (13.3%). Todas las poblaciones presentaron oxidasas alteradas (66.6%-90%) excepto Guayama y Peñuelas (20%-33.3%). Las GST resultaron alteradas para Canovanas, Caguas, Salinas, Guayama, Peñuelas y Ponce (66.6%-100%) e incipientemente alteradas para las poblaciones restantes, Carolina (43.3%) y Guaynabo (26.6%). Ninguna de las poblaciones presentó la enzima (0%-13.3%) acetilcolinesterasa insensible elevada a nivel de alterada o incipientemente a excepción de la población de Ponce con un porcentaje de 53.3%.

Tabla 8. Porcentaje de individuos de las poblaciones de campo que rebasan el Umbral de Resistencia a insecticidas determinado a partir de la cepa susceptible New Orleans.

Población	α- est	UR	β-est	UR	FOM	UR	GST	UR	iAChE	UR
New Orleans	0.80		1.13		0.13		0.04		0.026	
Carolina	6.6	NA	13.3	NA	76.6	A	43.3	IA	6.6	NA
Canovanas	26.6	IA	40	IA	86.6	A	66.6	A	6.6	NA
Caguas	100	A	100	A	86.6	A	100	A	13.3	NA
Guaynabo	90	A	90	A	90	A	26.6	IA	10	NA
Salinas	13.3	NA	86.6	A	80	A	100	A	3	NA
Guayama	70	A	76.6	A	33.3	IA	76.6	A	13.3	NA
Peñuelas	23.3	IA	86.6	A	20	IA	76.6	A	0	NA
Ponce	43.3	IA	40	IA	66.6	A	76.6	A	53.3	A

Umbral de Resistencia= UR. A= Alterado (>50%). IA= Incipientemente alterado (15%-50%)
NA= Alterado (<15%)

Con respecto a las enzimas alfa-esterasas, las poblaciones Carolina, Caguas, Guaynabo, Guayama y Ponce presentaron diferencia significativa con respecto a la cepa NO, mientras que para beta-esterasas, lo fueron Caguas, Guaynabo, Salinas, Guayama, Peñuelas y Ponce. Las enzimas GST y MFO se mostraron con diferencias estadísticamente significativas en todas las poblaciones en comparación con la cepa susceptible NO, situación contraria se presentó con iAChE (Tabla 6).

Tabla 9. Medias de las absorbancias de las ocho cepas de *Ae. aegypti* de Puerto Rico.

Enzima	α -esterases			β -sterases			GST			FOM			iAChE		
	Media	Z	P	Media	Z	P	Media	Z	P	Media	Z	P	Media	Z	P
New Orleans	0.6923			0.9274			0.0207			0.089			0.0155		
Carolina	0.5632	13.067	0.000	0.9598	0.267	0.606	0.0538	23.121	0.000	0.1901	32.267	0.000	0.0084	3.866	0.049
Canovanas	0.6655	0.267	0.606	1.0212	1.067	0.302	0.0495	21.806	0.000	0.2039	45.067	0.000	0.0128	2.785	0.095
Caguas	1.0793	60.000	0.000	1.4339	60.000	0.000	0.0932	49.531	0.000	0.252	45.067	0.000	0.0214	0.111	0.739
Guaynabo	0.9574	45.067	0.000	1.5057	60.000	0.000	0.0403	4.697	0.030	0.2159	45.067	0.000	0.0206	1.203	0.273
Salinas	0.7323	1.067	0.302	1.3392	45.067	0.000	0.0754	49.531	0.000	0.1656	38.400	0.000	0.0157	0.005	0.946
Guayama	0.9268	21.600	0.000	1.2825	26.660	0.000	0.0496	24.160	0.000	0.1304	21.600	0.000	0.0155	0.001	0.975
Peñuelas	0.7164	1.067	0.302	1.3274	32.267	0.000	0.0614	24.160	0.000	0.1111	11.270	0.001	0.0316	0.808	0.369
Ponce	0.8222	17.060	0.000	1.0884	6.667	0.010	0.0668	30.611	0.000	0.1835	32.267	0.000	-	-	-

No se encontró correlación significativa entre los valores de CL_{50} y las enzimas ($p < 0.05$) (Tabla 7).

Tabla 10. Regresión Resultados de las regresiones lineales y R de los valores de CL_{50} de spinosad y temefos correlacionados con el promedio de las absorbancias en larvas de *Ae. aegypti* de Puerto Rico.

Enzima	Spinosad		Temefos	
	R	Significancia	R	Significancia
α - est	0.217	0.573	0.126	0.743
β -est	0.239	0.535	0.089	0.819
FOM	0.212	0.583	0.477	0.193
Gst	0.071	0.856	0.205	0.594
Iache	–	–	0.688	0.06

Susceptibilidad de adultos a permetrina

Concentración Knockdown cincuenta (CK_{50}) y Factor de Resistencia de la concentración Knockdown Cincuenta ($FRCK_{50}$)

Los valores de la CK_{50} permetrina se muestran en el Tabla 8. Los resultados muestran que de acuerdo a los valores de los $FRCK_{50}$, todas las poblaciones son resistentes al derribo de la permetrina, fluctuando entre 37.69 y 195.62. Respecto a la CK_{50} las poblaciones de Caguas y Carolina tuvieron los valores más altos, con 50.86 $\mu\text{g/mL}$ y 34.38 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 8) y los valores más bajos Peñuelas y Ponce, con 10.93 $\mu\text{g/mL}$ y 9.8 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. En base al traslape de los intervalos de confianza se determinó que todas las poblaciones son significativamente diferentes respecto a la cepa susceptible NO (Fig. 6). Canovanas fue significativamente diferente a todas las poblaciones. La CK_{50} de Carolina, Canovanas y Salinas, no fueron diferentes significativamente entre sí. Guayama y Guaynabo, presentaron diferencias significativa respecto a las otras poblaciones y entre ellas mismas (Fig. 6).

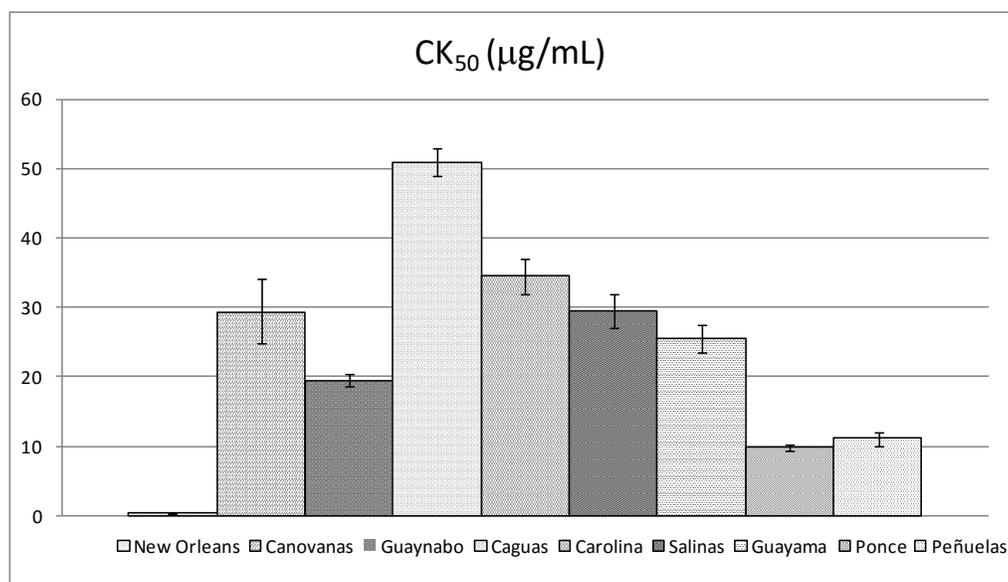


Fig.6. CK₅₀ e intervalos de confianza de adultos expuestos a permetrina.

Tabla 11. CK₅₀, y factor de resistencia de hembras de *Ae. aegypti* expuestas a permetrina.

Población	CK ₅₀ (µg/mL)	LI-LS	FRCK ₅₀
New Orleans	0.26	(0.24-0.29)	
Canovanas	29.29	(24.91-34.22)	112.65
Guaynabo	19.53	(18.58-20.52)	75.12
Caguas	50.86	(48.94-52.86)	195.62
Carolina	34.38	(32-36.94)	132.23
Salinas	29.45	(27.17-31.99)	113.27
Guayama	25.35	(23.43-27.43)	97.50
Ponce	9.8	(9.45-10.17)	37.69
Peñuelas	10.93	(9.94-12.02)	42.04

Concentración Letal Cincuenta (CL₅₀) y Factor de Resistencia de la Concentración Letal Cincuenta FRCL₅₀

Los valores de la CL₅₀ para permetrina se muestran en el Tabla 9. Los resultados muestran que de acuerdo a los valores de los FRCL₅₀, todas las poblaciones son resistentes a permetrina, fluctuando de 33.64 a 214.46. Respecto a la CL₅₀ las poblaciones de Caguas, Carolina y Guayama tuvieron los valores más altos, con 39.46 µg/mL, 26.31 µg/mL y 19.53 µg/mL (Tabla 9). En base al traslape de los intervalos de confianza se determinó que todas las poblaciones son significativamente diferentes respecto a la cepa susceptible NO (Fig. 7). Caguas y Carolina presentaron diferencia significativa respecto a las otras poblaciones y entre

sí. Guayama y Salinas no fueron diferentes significativamente. Salinas, Guaynabo y Canovanas, no presentaron diferencia significativa entre sí (Fig. 7).

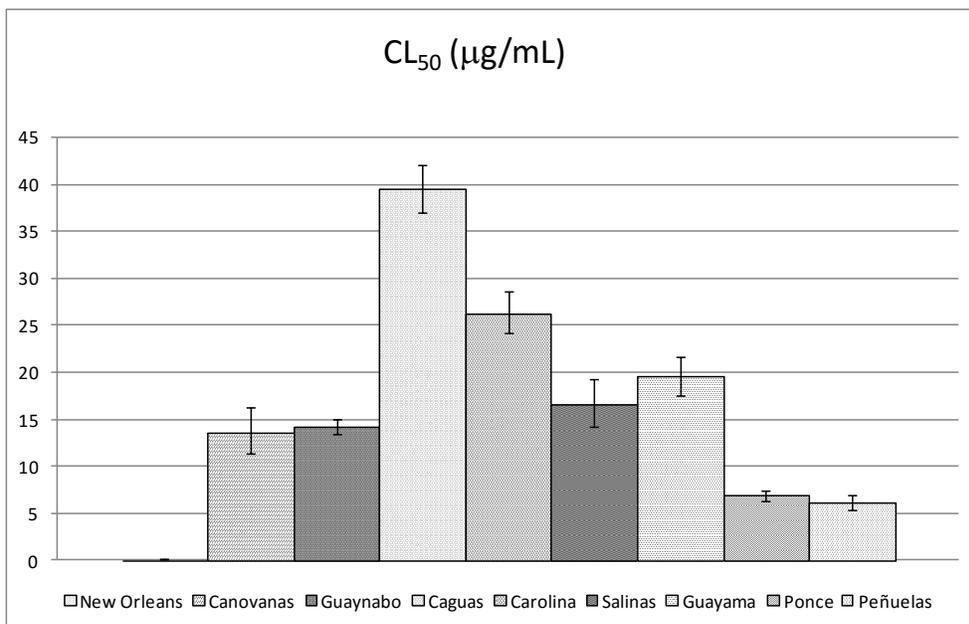


Fig.7. CL₅₀ e intervalos de confianza de adultos expuestos a permetrina.

Tabla 12. CL₅₀, y factor de resistencia de hembras de *Ae. aegypti* expuestas a permetrina.

Población	CL ₅₀ (µg/mL)	(LI-LS)	FRCL ₅₀
New Orleans	0.184	(0.16-0.21)	
Canovanas	13.58	(11.31-16.3)	73.80
Guaynabo	14.2	(13.47-14.98)	77.17
Caguas	39.46	(37.05-42.02)	214.46
Carolina	26.31	(24.24-28.56)	142.99
Salinas	16.53	(14.23-19.22)	89.84
Guayama	19.53	(17.61-21.66)	106.14
Ponce	6.86	(6.28-7.48)	37.28
Peñuelas	6.19	(5.45-7.02)	33.64

LI=Límite inferior. LS=Límite superior

Tiempo de derribo cincuenta (TK₅₀) y Tiempo Letal (TL₅₀)

El Tabla 10 Muestra los valores de TK₅₀ y de TL₅₀ obtenidos con permetrina para las ocho poblaciones de *Ae. aegypti* de Puerto Rico. El TK₅₀ osciló entre 48 minutos y 60 minutos, determinándose el valor más alto para la cepa susceptible y para la población de Guayama. En

base al traslape de los límites de confianza, se determinó que no hay diferencia significativa entre los valores de las poblaciones, de NO (01:00 hora) con Canovanas (00:58 min), Guaynabo (00:57 min), Caguas (00:56 min), Carolina (00:54 min), Guayama (01:00 hora), Ponce (00:57 min) y Peñuelas (00:55 min) excepto Salinas que es significativamente diferente a NO y a las poblaciones de Canovanas, Guaynabo y Ponce, con un tiempo de derribo menor (00:48 min), pero igual a Caguas, Carolina, Guayama y Peñuelas.

Respecto al TL₅₀ los valores oscilaron entre 01:16 horas y las 06:49 horas, teniendo el valor más alto la cepa susceptible NO, seguido por la población de Ponce con 05:08 horas. Las poblaciones con los valores más bajos fueron Salinas y Peñuelas con 01:16 y 01:23 horas respectivamente. El traslape de los límites de confianza determina que las poblaciones de Guayama (02:11), Ponce (05:08), Canovanas (02:41), Guaynabo (03:21), Caguas (02:01) y Carolina (02:00) no presentan diferencia significativa respecto a la cepa susceptible. Por otro lado las poblaciones de Salinas (01:16) y Peñuelas (01:23) no fueron significativamente diferentes entre ellas, pero sí respecto a las otras poblaciones.

Tabla 13. Valores de TCK₅₀ y TL₅₀ en horas y minutos obtenidos para cada población de Ae. aegypti expuestas a permetrina.

Población	TK₅₀ (horas:minutos)	(LI-LS)	TL₅₀ (minutos)	(LI-LS)
New Orleans	01:00	(00:54-01:08)	06:49	(03:54-11:00)
Canovanas	00:58	(00:53-01:00)	02:41	(01:01-03:44)
Guaynabo	00:57	(00:53-01:05)	03:21	(02:07-05:00)
Caguas	00:56	(00:50-01:04)	02:01	(01:01-04:52)
Carolina	00:54	(00:51-00:58)	02:00	(01:01-04:19)
Salinas	00:48	(00:43-00:52)	01:26	(01:19-02:40)
Guayama	01:00	(00:52-01:19)	02:11	(01:01-04:34)
Ponce	00:57	(00:53-01:00)	05:08	(03:24-09:01)
Peñuelas	00:55	(00:50-01:00)	01:23	(01:19-02:54)

Mecanismos de resistencia enzimática

Los valores de los umbrales de resistencia se muestran en el Tabla 11, concluyendo que las enzimas alfa esterases se presentaron alteradas para las poblaciones de Salinas, Guayama, Peñuelas y Ponce (73.3%-90%), incipientemente alteradas para Guaynabo (20%) y no alteradas para Carolina, Canovanas y Caguas (0%-3.3%). Respecto a beta esterases todas las poblaciones las presentaron como no alteradas (0%). Todas las poblaciones presentaron oxidasas no alteradas, siendo Guayama la población que presentó el valor más alto (10%). Las glutatión-s-

transferasas resultaron incipientemente alteradas para Canovanas (33.33%) y no alteradas para el resto de las poblaciones. La enzima acetilcolinesterasa insensible se presentó alterada en las poblaciones de Salinas y Peñuelas (53.3% y 90%) y no alteradas en las otras poblaciones.

Tabla 14. Porcentaje de individuos de las poblaciones de campo que rebasan el Umbral de Resistencia determinado a partir de la cepa susceptible New Orleans.

Población	α - est	UR	β -est	UR	FOM	UR	GST	UR	iAChE	UR
New Orleans	0.6412		1.04824		0.191		0.09		0.035	
Carolina	0%	NA	0%	NA	3.33%	NA	6.66%	NA	3.3%	NA
Canovanas	0%	NA	0%	NA	3.33%	NA	33.33%	IA	0%	NA
Caguas	3.3%	NA	0%	NA	0%	NA	0%	NA	0%	NA
Guaynabo	20%	IA	0%	NA	0%	NA	0%	NA	0%	NA
Salinas	73.3%	A	0%	NA	0%	NA	0%	NA	53.3%	A
Guayama	90%	A	0%	NA	10%	NA	0%	NA	0%	NA
Peñuelas	93.3%	A	0%	NA	0%	NA	0%	NA	90%	A
Ponce	83.3%	A	0%	NA	0%	NA	0%	NA	0%	NA

Umbral de Resistencia= UR. A= Alterado (>50%). IA= Incipientemente alterado (15%-50%) NA= Alterado (<15%)

Respecto a las enzimas alfa-esterasas, beta-esterasas y oxidasas todas las poblaciones fueron significativamente diferentes respecto a NO. Sólo la población de Canovanas, no fue diferente significativamente respecto a la cepa susceptible y Carolina no presentó diferencia significativa en la acetilcolinesterasa insensible respecto a NO, todas las demás poblaciones presentaron diferencias significativas para las enzimas antes nombradas (Tabla 12).

Tabla 15. Medias de las absorbancias de las ocho cepas de *Ae. aegypti* de Puerto Rico.

Enzimas	Alfa esterases			Beta esterases			GST			Oxidasas			iACTH		
	Media	Z	P	Media	Z	P	Media	Z	P	Media	Z	P	Media	Z	P
New Orleans	0.5515			0.8196			0.0593			0.1423			0.0165		
Carolina	0.3955	60.000	0.000	0.6013	32.267	0.000	0.0439	9.583	0.002	0.1223	6.667	0.010	0.011	3.186	0.740
Canovanas	0.4193	60.000	0.000	0.4193	60.000	0.000	0.075	0.018	0.895	0.1133	24.093	0.000	0.1225	6.500	0.011
Caguas	0.5866	6.667	0.010	0.612	45.067	0.000	0.0156	7.467	0.006	0.0627	60.000	0.000	0.0038	19.876	0.000
Guaynabo	0.5749	4.267	0.039	0.5989	32.267	0.000	0.0241	20.170	0.000	0.0677	60.000	0.000	0.0052	17.422	0.000
Salinas	0.6862	52.267	0.000	0.5107	60.000	0.000	0.03	45.067	0.000	0.1051	13.067	0.000	0.0143	17.134	0.000
Guayama	0.7352	45.067	0.000	0.5366	52.267	0.000	0.0119	25.524	0.000	0.106	9.600	0.002	-	-	-
Peñuelas	0.6743	52.267	0.000	0.6211	32.267	0.000	0.0063	4.912	0.027	0.0934	38.400	0.000	0.0456	28.800	0.000
Ponce	0.6698	52.267	0.000	0.4916	52.267	0.000	0.0336	26.667	0.000	0.0562	60.000	0.000	0.0022	18.427	0.000

Al realizar la correlación de las enzimas con respecto a la CL_{50} se determinó que la sobreexpresión de α - esterases, β -esterases, oxidasas y glutatión-s-transferasas, no están involucradas como un mecanismo de resistencia a la permetrina en este estudio ($p < 0.05$) (Tabla 13).

Tabla 16. Regresión lineal y R de los valores de CL_{50} de permetrina correlacionados con el promedio de las absorbancias en hembras de *Ae. aegypti* de Puerto Rico.

Permetrina		
Enzima	R	Significancia
α- est	0.179	0.641
β-est	0.214	0.577
GST	0.290	0.449
FOM	0.293	0.442
iAChE	0.214	0.645

Mecanismo de Resistencia kdr

Frecuencia de la mutación Ile1016 en poblaciones de *Ae. aegypti* de Puerto Rico

Un total de 236 muestras de mosquitos fueron analizadas de ocho localidades de Puerto Rico anteriormente mencionadas, del año 2013 (Fig. 8). El genotipo que predominó fue el resistente Ile1016/Ile1016, oscilando entre el 30%-100%. En las poblaciones de Canovanas, Caguas, Carolina y Ponce el genotipo mutante se presentó en un 100%, seguido de Guaynabo y Peñuelas con 93.1% y 86.6% respectivamente. Salinas y Guayama tuvieron los valores más bajos para este genotipo con 60% y 30% respectivamente. El genotipo heterocigoto Val1016/Ile1016 se presentó en las poblaciones de Guayama, en un 70%, seguido de Salinas, con un 36.6% y Peñuelas, con 13.33%. El genotipo susceptible sólo se detectó en la población de Guaynabo y Salinas, con un 6.9% y 3.3% respectivamente.

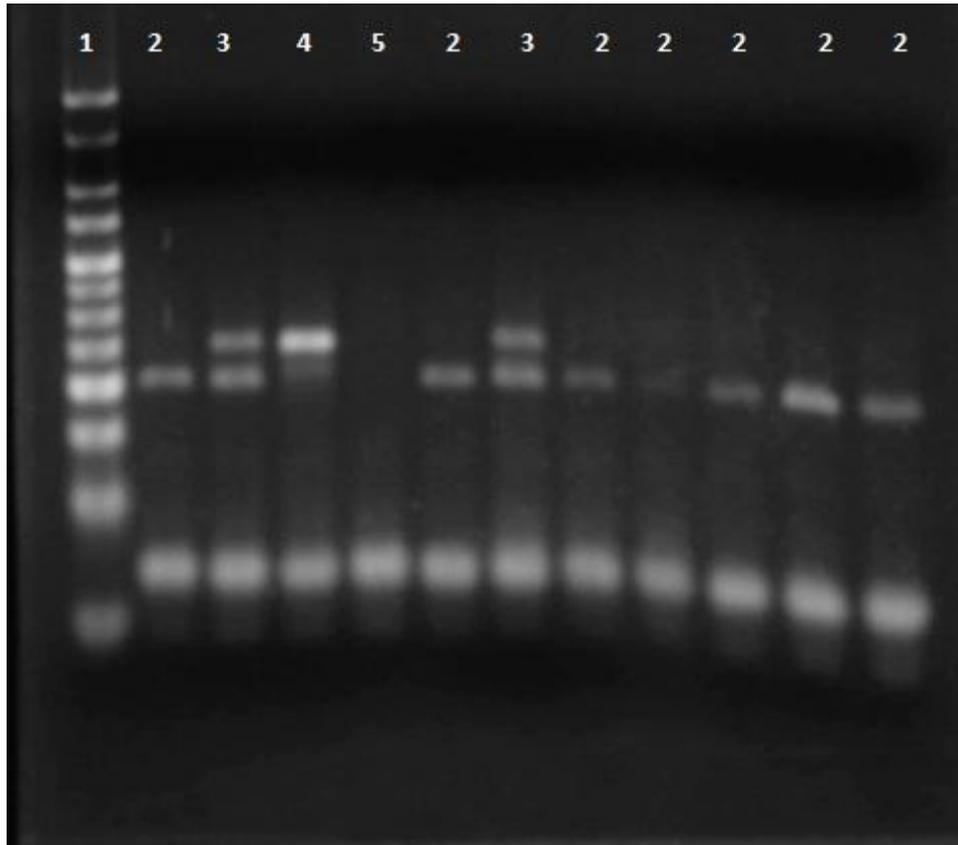


Fig. 8. Geles de agarosa al 3% mostrando los genotipos de la mutación *Ile1,016* en *Ae. aegypti* de Puerto Rico

1. Marcador de peso molecular de 25-500pb.
2. Genotipo homocigoto mutante *Ile1,016/Ile1,016*.
3. Genotipo homocigoto mutante *Ile1,016/Ile1016*,
4. Genotipo heterocigoto *Val1,016/Ile1,016*.
4. Genotipo susceptible *Val1,1016/Val1,016* (New Orleans).
5. Control negativo (agua ultrapurificada)

La Tabla 14 muestra los resultados obtenidos en las ocho poblaciones observándose las frecuencias del alelo *Ile1016* con valores de 1 en las poblaciones de Canovanas, Caguas, Carolina y Ponce, seguidas de Guaynabo con 0.97, Peñuelas con 0.93, determinándose las frecuencias más bajas en las poblaciones de Salinas (0.78) y Guayama (0.65). Las poblaciones de Caguas y Carolina presentaron frecuencias de 1, la cual estuvo en concordancia con los $FRCK_{50}$ más altos, 195.62 y 132.23 respectivamente.

Tabla 17 Localidades, año de colecta, tamaño de muestra y número de mosquitos para cada genotipo.

Ile 1016						
Población	Año	n	AA	AG	GG	Frecuencia Ile1016
Canovanas	2013	29	29	0	0	1
Guaynabo	2013	29	27	0	2	0.97
Caguas	2013	29	29	0	0	1
Carolina	2013	30	30	0	0	1
Salinas	2013	30	18	11	1	0.78
Guayama	2013	30	9	21	0	0.65
Ponce	2013	29	29	0	0	1
Peñuelas	2013	30	26	4	0	0.93
Total		236	197	36	3	0.91

n= número de mosquitos. AA=Ile1016/Ile1016, AG= genotipo Val1016/Ile1016, GG= genotipo Val1016/Val1016.

Tabla 18. Frecuencia del alelo Ile1,016, intervalos de confianza 95% y coeficientes de endogamia en ocho poblaciones de *Ae. aegypti* de Puerto Rico.

Población	Hardy Weinberg X^2	Wald 95% CI	F_{IS}
Canovanas	NA	(0.858-1.021)	-
Guaynabo	0.04	(0.811-1.01)	-0.036
Caguas	NA	(0.858-1.021)	-
Carolina	NA	(0.862-1.020)	-
Salinas	3.68	(0.604-0.896)	-0.350
Guayama	0.93	(0.470-0.794)	-0.176
Ponce	NA	(0.858-1.021)	-
Peñuelas	0.08	(0.774-0.001)	-0.072

NA=No aplica

Todas las poblaciones estuvieron en equilibrio de acuerdo con la Ley de Hardy-Weinberg, basándonos en la prueba de X^2 de Pearson ya que los valores calculados

fueron menores al valor tabulado (3.84). Asimismo al determinar los coeficientes de endogamia (F_{IS}) se obtuvieron valores menores a 0 en las poblaciones de Guaynabo, Salinas, Guayama y Peñuelas indicando un exceso de heterocigotos. (Tabla 15).

Frecuencia de la mutación Cys 1534 en poblaciones de *Ae. aegypti* de Puerto Rico

Un total de 235 muestras de mosquitos fueron analizadas de ocho localidades de Puerto Rico anteriormente mencionadas, del año 2013. El genotipo que predominó fue el resistente Cys1534/Cys1534, oscilando de 63.33%-100%. El genotipo resistente se presentó en un 100% en las poblaciones de Guaynabo, Caguas y Carolina, seguido del 96.66%, 96.55% y 85.71% en Canovanas, Ponce y Guayama respectivamente. El valor más bajo para este genotipo fue de 63.33% en la población de Salinas. El genotipo heterocigoto Phe1534/Cys1534 se presentó en las poblaciones de Salinas (33.33%), Guayama (10.71% , Peñuelas (10%), Ponce (3.44%) y Canovanas (3.33%). Únicamente el genotipo susceptible se detectó en las poblaciones de Guayama y Salinas, en un 3.57% y 3.33% respectivamente (Tabla 16).

Las frecuencias del alelo Cys1534 se presentaron con un valor de 1 en las poblaciones de Guaynabo, Caguas y Carolina, seguidas de Ponce con 0.98, Canovanas 0.98, Peñuelas 0.95, Guayama 0.91 y Salinas 0.8 (Tabla 16). En concordancia con los $FRCK_{50}$ más altos, 195.62 de Caguas y 132.23 de Carolina que presentaron las frecuencias con un valor de 1.

Al analizar las poblaciones se determinó que todas se encontraron en equilibrio de acuerdo con la Ley de Hardy-Weinberg, ya que los valores en la prueba de X^2 de Pearson fueron menores a 3.84, que fue el tabulado. Los coeficientes de endogamia (F_{IS}) menores a 0 se presentaron en las poblaciones de Canovanas, Salinas, Ponce y Peñuelas indicando un exceso de heterocigotos y mayor a 0 en la población de Guayama, lo que indica un exceso de homocigotos (Tabla 17).

Tabla 19. Localidades, año de colecta, tamaño de muestra y número de mosquitos para cada genotipo.

Cys 1534						
Población	Año	N	AA	AG	GG	Frecuencia <i>Ile1016</i>
Canovanas	2013	30	29	1	0	0.98
Guaynabo	2013	30	30	0	0	1
Caguas	2013	29	29	0	0	1
Carolina	2013	29	29	0	0	1
Salinas	2013	30	19	10	1	0.8
Guayama	2013	28	24	3	1	0.91
Ponce	2013	29	28	1	0	0.98
Peñuelas	2013	30	27	3	0	0.95
Total		235	215	18	2	0.95

n= número de mosquitos. AA=Cys1534/ Cys1534, AG= genotipo Phe1534/ Cys1534, GG= genotipo Phe1534/ Phe1534.

Tabla 20. Frecuencia del alelo Cys1534, intervalos de confianza 95% y coeficientes de endogamia en ocho poblaciones de *Ae. aegypti* de Puerto Rico.

Población	Hardy Weinberg X^2	Wald 95% CI	F_{IS}
Canovanas	0.01	(0.838-1.014)	-0.02
Guaynabo	NA	(1.02-0.862)	
Caguas	NA	(1.02-0.857)	
Carolina	NA	(1.02-0.857)	
Salinas	0.05	(0.907-0.622)	-0.041
Guayama	3.26	(0.979-0.738)	0.34
Ponce	0.01	(1.014-0.833)	-0.02
Peñuelas	0.08	(0.999-0.794)	-0.05

NA=No aplica

8. DISCUSIÓN

Debido al constante uso de temefos para el control de larvas de *Ae. aegypti*, países como Brasil, Cuba, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Jamaica, Perú, Colombia y El Salvador han reportado resistencia a este insecticida (Bisset, *et al.*, 2001; Rodríguez, *et al.*, 2001; Aparecida-Braga, *et al.*, 2004; Pereira, *et al.*, 2006; Rodríguez, *et al.*, 2007; Maestre, *et al.*, 2009; Bisset, *et al.*, 2009), sin embargo, en el presente estudio se determinó que las poblaciones evaluadas no presentaron resistencia al larvicida.

El uso de temefos en Puerto Rico se remonta a 50 años atrás, reportándose los primeros casos de resistencia en 1987 y 1988 (Sutherland, *et al.*, 1987; Rawlins and Ragoonansingh, 1990), sin embargo, no existen estudios recientes sobre la resistencia de *Ae. aegypti* a insecticidas en Puerto Rico. En nuestra investigación, todas las poblaciones evaluadas fueron susceptibles a temefos, teniendo valores del FR por debajo de 5, lo cual puede verse influenciado por la ausencia del uso sostenido y generalizado de este plaguicida para la prevención de enfermedades como dengue y chikungunya y para el control de *Ae. aegypti* (Barrera, 2010). En Brasil, Montella, *et al.* (2007), sugieren que el temefos sea reemplazado cuando el FR sea mayor a 3, debido a que valores por arriba de éste reduce su eficacia a tan sólo 4 semanas. Por lo que es de suma importancia mantener la vigilancia, para poder tomar decisiones y disminuir la presión por el uso continuo de este larvicida. En nuestro estudio las poblaciones de Guayama, Canovanas y Guaynabo, presentaron FR de 3.46, 4.07 y 4.32 respectivamente, por lo que el cambio de temefos por spinosad podría ser una opción viable.

Los valores de CL₅₀ para temefos variaron entre 0.0091 µg/mL y 0.035 µg/mL y se asemejan a los reportados por Chavez *et al.* (2005) en cuatro poblaciones de Perú, las cuales también fueron susceptibles a este insecticida, usando como referencia la cepa Rockefeller. En dicho estudio los valores de CL₅₀ fluctuaron entre 0.026 µg/mL y 0.037 µg/mL, siendo más altos que los obtenidos en nuestro estudio. Álvarez *et al.* (2014) evaluaron en Venezuela en dos años distintos, 2008 y 2010, la susceptibilidad a

temefos y se determinaron valores de CL_{50} de 0.0130 $\mu\text{g/mL}$ para la población de Pampanito y 0.0134 $\mu\text{g/mL}$ para Lara. Dos años después, determinaron que la CL_{50} en la población de Lara se había incrementado a 0.0376 $\mu\text{g/mL}$, lo que pone de manifiesto que se deben hacer monitoreos frecuentes para detectar cambios en la susceptibilidad de las poblaciones. Para mantener la susceptibilidad de las poblaciones a este insecticida se debe alternar su uso con otros productos, como la toxina de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* o spinosad, que actúan con mecanismos insecticidas únicos (Tikar, *et al.*, 2009, Kovendan, *et al.*, 2012).

Terán-Zavala, *et al.*, (2014) reportaron a las esterasas como el mecanismo metabólico de resistencia para temefos en Guayaquil, Ecuador, sin embargo, el análisis estadístico en este estudio demostró que no existe una relación entre la CL_{50} y el mecanismos de resistencia enzimático, con los insecticidas probados (Fig. 3), tal y como lo reportó Álvarez, *et al.* (2014). Bisset *et al.*, (2001) determinaron que las oxidasas (MFO) no juegan un papel importante en la resistencia a temefos, al igual que lo encontrado en el presente estudio. La expresión de MFO, fue reportada en lepidópteros como mecanismo de resistencia a spinosad, sin embargo, en el presente estudio no se determinó que hubiera alguna relación entre este insecticida y dicho mecanismo de resistencia (Fig. 4) (Reyes, *et al.*, 2012). Excepto en la población de Ponce, tampoco hubo evidencia de alteraciones en la enzima acetilcolinesterasa insensible, como lo reportado por Wirth y Georgihou (1999).

Los FR fueron menores para spinosad que para temefos, por lo que se deduce que es eficiente para el control de larvas de *Ae. aegypti*, al igual que lo observado por Chino-Cantor, *et al.*(2014). Múltiples estudios han reportado a spinosad como un larvicida eficaz no sólo contra *Ae. aegypti*, sino también contra otros mosquitos como *Anopheles gambiae* y *Culex quinquefasciatus*, todos de importancia médica (Chino-Cantor, *et al.*, 2014; Kemabonta and Nwankwo, 2013; Marina, *et al.* , 2012; Garza-Robledo, 2011; Darriet, *et al.*, 2005; Bond, *et al.* 2004). Se han considerado ciertas ventajas de éste sobre otros insecticidas sintéticos, tales como: alta acción larvicida, ser biodegradable, no tener efectos sobre insectos no blanco, por lo que no inhibe el desarrollo de enemigos naturales como *Toxorhynchites* sp. (Kemabonta and Nwankwo, 2013; Garza-Robledo, *et al.*, 2011); permitiendo la aplicación de un manejo integral de vectores. Sin embargo, es importante que se realicen pruebas en campo, debido a que la eficacia del

spinosad se ve negativamente afectada por adsorción a partículas y la exposición a la luz (por fotólisis) (Baldacchino, *et al.*, 2015).

Respecto a la susceptibilidad de las poblaciones a permetrina, los resultados demostraron FRCL₅₀ por arriba de 10, lo que indica que son resistentes a permetrina, siendo las poblaciones de Caguas, Carolina y Guayama las que obtuvieron valores más altos, 214.46, 142.99 y 106.14, respectivamente. El control de adultos de *Ae. aegypti* en Puerto Rico se ha basado principalmente en el uso de piretroides, como la permetrina o permetrina mas butóxido de piperolino en aplicaciones ultra bajo volumen, sin embargo, cada vez más se han necesitado concentraciones más altas para un control exitoso (Reid, *et al.*, 2014).

Se considera que la detección temprana de resistencia a organoclorados en el año de 1959 ha sido la clave en el fracaso de la erradicación de *Ae. aegypti* (Barrera, 2010) afectando en los siguientes años el control por piretroides, ya que estos grupos de insecticidas presentan resistencia cruzada. Como se ha mencionado anteriormente el monitoreo constante de los insecticidas utilizados es de suma importancia y realmente existen pocos estudios de susceptibilidad a piretroides en Puerto Rico. En el año de 1986 se reporta por primera vez resistencia a temephos y permetrina y no es hasta el año 2014 en que se vuelve a analizar la susceptibilidad de *Ae. aegypti* en la isla, reportándose, una vez más, resistencia a permetrina, en una cepa de San Juan Puerto Rico, con un FR de 73 (Reid, *et al.*, 2014). En el presente estudio la población de Canovanas es la que presenta un valor del FRCL₅₀ más cercano (73.80) al reportado en el 2014. Los valores de FRCL₅₀ reportados en el presente estudio (33.64-214.46) son los más altos determinados en América, por ejemplo se reportaron FRCL₅₀ de *Ae. aegypti* en Guerrero, México, de 2.38 a 5.31 y en Colombia de 1.8 a 13.5 (Chino-Cantor, *et al.*, 2014, Maestre *et al.*, 2009).

Al determinar los mecanismos de resistencia enzimática, se observó que las poblaciones Guaynabo, Salinas, Guayama, Peñuelas y Ponce, presentaron α - esterasas incipientemente alteradas y alteradas. Por otro lado, Canovanas presentó las GST incipientemente alteradas. El análisis estadístico en este estudio demostró que no existe relación entre la CL₅₀ y los mecanismos de resistencia enzimático, con los insecticidas probados (Tabla 13). En el año de 1989 se reporta resistencia a piretroides en Río

Piedras, pero las pruebas bioquímicas indicaron que no era de tipo metabólico (Hemingway, et al., 1989); al igual que lo reportado en poblaciones de Yucatán, México en donde tampoco se pudieron correlacionar los mecanismos enzimáticos de resistencia determinados como alterados, con los niveles de resistencia (González-Olvera, 2013). En las Islas Gran Cayman, se detecta el incremento de GST, FOM, α -esterasas y β -esterasas respecto a la cepa susceptible, pero no se pudo determinar que este incremento confiriera resistencia a piretroides como la permetrina y deltametrina (Harris, et al., 2010). Sin embargo, la presencia de altos niveles de α -esterasas y GST en poblaciones de *Ae. aegypti* presionadas con permetrina, sugiere que actúan confiriendo resistencia a este insecticida, como lo registrado en poblaciones de Baja California y Quintana Roo, México (Flores, et al., 2005, 2006, Lumjuan, et al., 2005). y en Bandung, Indonesia, en donde también se sugiere la participación de β -esterasas en la resistencia a permetrina (Ahmad, et al., 2007).

Las poblaciones de Salinas y Peñuelas presentaron las acetilcolinesterasas insensibles como alteradas, lo que al igual que lo reportado en las Islas Cayman se sugiere que este no actúa como un mecanismo de resistencia (Harris, et al. 2010). Los resultados anteriormente descritos, sugieren que es otro mecanismo de resistencia el que está actuando.

Aunque la resistencia metabólica es uno de los mecanismos de resistencia en piretroides, no se determinó que éste es el que estuviera actuando en las poblaciones estudiadas. Sin embargo, frecuentemente se encuentran mutaciones de tipo *kdr* en el canal de Sodio dependiente de voltaje que confieren resistencia a DDT y a piretroides. La mutación más común es la L1014P determinada en *Musca domestica* seguida de la L1014S en *Ae. aegypti*, *Anopheles* y *Culex* (Davies, et al., 2007). Se han determinado una serie de mutaciones en *Ae. aegypti* como la I1011M/V, V1016G/I y F1534C, confiriendo resistencia a piretroides y a DDT (Bregues, et al., 2003; Saavedra, et al., 2007) y la S989P asociada únicamente a resistencia a piretroides (Kawada, et al., 2014); pero únicamente la Ile1016 y la Cys1534 son las que claramente disminuyen la susceptibilidad a piretroides (Hu, et al., 2011). Estas mutaciones se ubican en las regiones IIS6 y IIS6 de los canales en donde se conoce que es en donde se realiza la interacción con los piretroides (O'Reilly, et al, 2006). En nuestro estudio se encontraron ambas mutaciones en las diferentes localidades estudiadas en Puerto Rico.

La mutación *Ile1016* está distribuida ampliamente. Se describe por primera vez en una población de Isla Mujeres, Quintana Roo, México (Saavedra-Rodriguez, *et al.*, 2007), sin embargo, se ha encontrado también en otros lugares de México (Ponce, *et al.*, 2009; Aponte,*et al.*, 2014) y en otros países de Latinoamérica como Venezuela, Brasil, Gran Cayman, Colombia, (Alvarez,*et al.*, 2014; Linss, *et al.*, 2014; Harris, *et al.*, 2010; Maestre-Serrano, *et al.*, 2014). Es importante señalar que no sólo se ha determinado su presencia, sino también su incremento a lo largo de los años (Ponce, *et al.*, 2009), poniendo de manifiesto la importancia de monitorear la susceptibilidad de *Ae. aegypti* a los insecticidas, para tener programas de control exitosos. En Puerto Rico se determinó su ocurrencia en las ocho poblaciones estudiadas, distribuyéndose en las regiones Noreste, Este, interior Este y Sur, representando gran parte del país, dejando sin evaluar la región Oeste, por lo que se sugiere determinar si está presente en esta región de la isla.

La presencia de la mutación *Cys1534* no es una mutación nueva en América Latina, se ha reportado en Gran Cayman, México, Venezuela y Brazil (Harris, *et al.*; 2010, Aponte, *et al.*, 2013; Álvarez, *et al.*; 2014, Linss,*et al.*, 2014) . En el presente estudio, la mutación *Cys 1534* se encontró con una frecuencia promedio mayor, 0.95, que la *Ile1016* con una frecuencia promedio de 0.91. Las frecuencias determinadas fueron más altas que las encontradas en Vietnam (0.21) (Kawada, *et al.*, 2009), Gran Cayman (0.68) (Harris, *et al.*, 2010) y Tailandia (0.77) (Yanola, *et al.*, 2011). La mutación *Cys1534* está fuertemente relacionada con la resistencia a piretroides tipo I como la permetrina, pero no al tipo II (Harris, *et al.*, 2010), sin embargo, un estudio reciente reveló que una población presionada con deltametrina, selecciona más rápidamente esta mutación que la *Ile1016* (Álvarez, *et al.*, 2014).

Aún no se conoce claramente si la presencia de ambas mutaciones actúan individualmente o sinérgicamente confiriendo resistencia a piretroides aunque se sugiere que su co-existencia podría actuar dando mayor resistencia (Aponte, *et al.*, 2013; Linss, *et al.*, 2014), sin embargo, Ishak, *et al.* (2015), determinan que la presencia de las mutaciones *Cys1534* y *Gly1016* actúan de forma aditiva confiriendo resistencia a piretroides, además que la mutación *Cys1534* relacionada a piretroides tipo I, en conjunto con la *Gly1016* confiere resistencia a piretroides tipo II, sin embargo, esto sólo fue observado en una localidad en Malasia, en la cual se encontraron ambas mutaciones. Por otro lado se demostró que la co-ocurrencia de los genotipos *Ile1016 kdr + Cys1534*

kdr y de *Gly1016 + Cys1534* tienen un alto costo en el *fitness* de *Ae. aegypti*, respecto a desarrollo y reproducción (Brito, *et al.*, 2013, Ishak, *et al.*, 2015).

Todas las poblaciones se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg para ambos loci estudiados. Este equilibrio también fue observado en poblaciones de Venezuela (Álvarez, *et al.*, 2014), y en algunas poblaciones de Brasil (Linss, *et al.*, 2014); de México, del estado de Guerrero, para ambas mutaciones y en Veracruz, Nuevo León, Chiapas, y Yucatán para la mutación *Ile1016* (Aponte, *et al.*, 2013; Siller, *et al.*, 2011, Saavedra, *et al.*, 2007).

9. CONCLUSIONES

- a) Se determinó que todas las poblaciones resultaron susceptibles a ambos larvicidas probados, spinosad y temefos (FR<5). Spinosad presentó valores entre 0.26 - 1.37, mientras que para temefos fluctuaron entre 1.12 - 4.32.
- b) No se encontró correlación significativa entre los valores de CL₅₀ de los insecticidas spinosad y temefos y las enzimas (p< 0.05).
- c) De acuerdo a los valores de los FRCK₅₀, todas las poblaciones son resistentes al derribo de la permetrina.
- d) Los resultados mostraron que de acuerdo a los valores de los FRCL₅₀, todas las poblaciones fueron resistentes a permetrina. En base al traslape de los intervalos de confianza se determinó que todas las poblaciones fueron significativamente diferentes respecto a la cepa susceptible NO.
- e) Se determinó que la sobreexpresión de α -esterasas, β -esterasas, oxidasas y glutatión-s-transferasas, no están involucradas como un mecanismo de resistencia a la permetrina en este estudio.
- f) La mutación *Ile* 1016 que confiere resistencia a piretroides fue observada en casi todas las poblaciones estudiadas. El genotipo que predominó fue el mutante *Ile*1016/*Ile*1016, oscilando entre el 30%-100% y el genotipo susceptible sólo se presentó en las poblaciones de Guaynabo y Salinas, en un 6.9% y 3.3% respectivamente.
- g) La mutación Cys 1534 se presentó en la mayoría de las poblaciones, siendo el genotipo mutante Cys1534/Cys1534, el predominante, el cual osciló entre 63.33%-100%. El genotipo susceptible Phe1534/Phe1534, se detectó en las poblaciones de Guayama y Salinas.
- h) Para ambas mutaciones, todas las poblaciones se encontraron en equilibrio de acuerdo con la Ley de Hardy-Weinberg

10. LITERATURA CITADA

Abbott WS.1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J Econ Entomol 18: 265–267

Abou-Donia, M.B., Wilmarth, K.R., Jensen, K.F., Oehme, F.W. and Kurt, T.1996. Neurotoxicity resulting from coexposure to Pyridostigmine Bromide, Deet, and Permethrin: Implications of gulf war chemical exposures. Journal of Toxicology and Environmental Health, 48:35–56.

Ahmad, I., Astari, S. and Tan, M. 2007. Resistance of *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) in 2006 to pyrethroid insecticides in Indonesia and its association with oxidase and esterase levels. Pak. J. Biol. Sci. 10 (20): 3688-3692.

Alcalde-Mosqueira, J.G., Roldán-Rodríguez, J. E., Saravia-Cueva, V. P., Collantes-Silva, L.2011. Efecto BIOCIDA de diferentes concentraciones de *Metarhizium anisopliae* CCB-LE302 y *Beauveria bassiana* CCB-LE265 sobre larvas III de *Aedes aegypti*. UCV - Scientia 6(1): 33-41.

Almeida-Melo, A.L., Soccol, V.T. and Soccol, C.R. 2014. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. Crit Rev Biotechnol. 1-10.

Alvarez, L.C., Ponce, G. Saavedra-Rodriguez, K. Lopez, B. and Flores, A.E. 2014. Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. Pest Manag Sci.71:863–869
DOI10.1002/ps.3846

Arana-Guardia, Baak-Baak, C.M., Loroño-Pino, M.A., Machain-Williams, C., Beaty, J.B., Eisen, L. and García-Rejón, J.E. 2014. Storm water drains and catch basins as sources, for production of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Acta Tropica. 134: 33-42.

Aparecida-Braga, I. , Pereira-Lima, J. B., da Silva-Soares, S., Valle, D. 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the States of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. MemInst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 99(2): 199-203.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Braga%20IA%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15250476"

Aponte HA, Penilla PR, Dzul-Manzanilla F, Che-Mendoza A, Lopez A, Solis F. 2013. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. Pestic Biochem Physiol 107(2):226–234.

Badii, M.H. y Garza, A.V. 2007. Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. CULCyT, Impacto Ecológico. 4(18): 9-25.

Baldacchino, F., Caputo, B., Chandre, F., Drago, A., dellaTorre, A., Mortazi, F. and Rizzoli, A. 2015. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. Pest Manag Sci 10.1002/ps.4044

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. 2013. The global distribution and burden of dengue. Nature. 25;496(7446):504-7

Barrera, R. 2010. Dinámica del dengue y *Aedes aegypti* en Puerto Rico. Rev Biomed 21: 179-195.

Barrera, R., Amador, M., Acevedo, V., Caban, B., Felix, G. and Mackay, A.J. 2014. Use of the CDC Autocidal Gravid Ovitrap to Control and Prevent Outbreaks of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Vector control, pest management, resistance, repellents. J. Med. Entomol. 51(1): 145-154

Bisset, J. A. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la Resistencia. Rev. Cubana Med. Trop. 54(3): 202-219.

Bisset, J, Rodriguez, M., Molina D, Soca L.2001. Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. Rev. Cubana Med Trop. 53: 1.

Bisset J, Rodriguez, M., San Martín, J.L. Romero, J.E. and Montoya, R. 2009. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 26(3).

Bowatte, G., Perera, P., Senevirathne, G., Meegaskumbura, S. and Meegaskumbura, M. 2013. Tadpoles as dengue mosquito (*Aedes aegypti*) egg predators. Biological Control. 67: 469–474

Bregues C, Hawkes NJ, Chandre F et al. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. Medical and Veterinary Entomology. 17: 87–94.

Brito LP, Linss JGB, Lima-Camara TN, Belinato TA, Peixoto AA, et al.2013. Assessing the Effects of *Aedes aegypti* kdr Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost. PLoS ONE 8(4): e60878. doi:10.1371/journal.pone.0060878

Brogdon, W. G. 1988. Microassay of acetylcholinesterase activity in small portions of single mosquito homogenates. Comparative Biochemistry and Physiology 90: 145-150.

Brogdon, W. G. and Barber. 1990. Microplate assay of glutathione S-transferase activity for resistance detection in single mosquito triturates. Comparative Biochemistry and Physiology 96: 339-342.

Brogdon, W. G. and Dickinson, C. M. 1983. A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high-pressure liquid chromatography evaluate fractions. Analytical Biochemistry 131: 499-503.

Brogdon, W. G., Mcallister, J. C., Vulule, J. 1997. Hemeperoxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. Journal of the American Mosquito Control Association 13: 233-237.

Brogdon W.G. and McAllister J.C.1998a. Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases*. 4(4): 605-613.

Brogdon, W.G. and McAllister J.C. 1998b. Simplification of adult mosquito bioassay through use of time-mortality determinations in glass bottles. *J. Am. Mosq Control Assoc.* 14: 159-164.

Brooke, B.D. 2008. kdr: can a single mutation produce an entire insecticide resistance phenotype?. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102: 524—525

Burton, M.J., Mellor, I.R., Duce, I.R, Davies, E. T.G., Field, L.M. b, Williamson, M.S. 2011. Differential resistance of insect sodium channels with kdr mutations to deltamethrin, permethrin and DDT. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41: 723-732

Casida, J. E. and Durkin, K.A. 2013. Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annu. Rev. Entomol.* (58):99–117 .

Casida J, and G. Quistad. 1998 Golden Age of Insecticide Research: Past, Present or Future ?. *Annu. Rev. Entomol.* 43:1-16

Catterall, W.A. 2000. From ionic currents to molecular mechanism: the structure and function of voltage gated sodium channels. *Neuron*. 26: 13-25

Chapman, R.F. 2013. *The insects. Structure and Function*. 5th. Edition. Cambridge University Press

Chávez, J. Córdova, O. y Vargas, F. 2005. Niveles de susceptibilidad a temefos en el vector transmisor del dengue en Trujillo, Perú. *An. Fac. Med. Lima* 2005; 66(1): 53-56.

Chino-Cantor, A. Sánchez-Arroyo, H., Ortega-Arenas, L.D. y Castro-Hernández, E. 2014. Insecticide Susceptibility of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) in Guerrero, Mexico *Southwestern Entomologist*, 39(3):601-612.

Clark TB, Kellen WR, Fukuda T, Lindgren JE. 1968. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *J Invertebr Pathol* 11: 1–7.

Clement, A.N. (1992). *The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction*. Chapman & Hall, London.

Coen, E., Strachan, T. and Dover, G. 1982. Dynamics of Concerted Evolution of Ribosomal DNA and Histone Gene Families in the melanogaster Species Subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Biol.* 158: 17-35.

Conde, M., Orjuela, L.I., Castellanos, C.A., Herrera-Varela, M., Licastro, S. y Quiñones, M.L. 2015. Evaluación de la sensibilidad a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Caldas, Colombia, en 2007 y 2011. *Biomédica*. 35:43-52

David J-P, Ismail HM, Chandor-Proust A, Paine MJI. 2013 Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Phil Trans R Soc B* 368: 20120429.
<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0429>

Davies TG, Field LM, Usherwood PN, Williamson MS. 2007. A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Mol Biol* . 16:361–375.

Diaz-Gonzalez, E.E., Kautz, T.F. Dorantes-Delgado, A., Malo-Garcia, Weaver, S.C. Fernández-Salas, I. 2015. First report of *Aedes aegypti* transmission of chikungunya virus in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 93(6), pp. 1325-1329.

Eiman, M., Introini, M.V. Y Ripoll, C. 2010. Directrices para la prevención y control de *Aedes aegypti*. Dirección de Enfermedades Transmisibles por Vectores - Ministerio de Salud de la Nación. República Argentina.

- FAO, 1979. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. FAO Plant Protection Bulletin. 27: 29-32.
- Fernández, S., I. 2009. Biología y control de *Aedes aegypti*. Manual de Operaciones. Universidad Autónoma de Nuevo León. Pgs. 130.
- Flores, A. E., V. W. Albeldaño, S. I. Fernandez, M. H. Badii, H. Loaiza, G. G. Ponce, F. S. Lozano, W. G. Brogdon, W. C. Black, and B. J. Beaty. 2005. Elevated a-esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. Pest. Biochem. Physiol. 82: 66-78.
- Flores, A. E., J. S. Grajales, S. I. Fernandez, G. G. Ponce, H. Loaiza, M. H. Badii, F. S. Lozano, W. G. Brogdon, W. C. Black, and B. J. Beaty. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. J. Am. Mosq. Control Assoc. 22: 672-677.
- Flynn AD, Schoof HF, Morlan HB, Porter JE. 1964. Susceptibility of seventeen strains of *Aedes aegypti* (L.) from Puerto Rico and the Virgin Islands to DDT, dieldrin, and malathion. Mosq News. 24:118-23
- Fox I, García-Mola I. 1961. Multi-resistant *Aedes aegypti* in Puerto Rico and Virgin islands. Science.233:646.
- Fox, I., Boike, A.H., Garcia-Moll, I. 1960. Notes on rock hole breeding and resistance of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. Am J Trop Med Hyg. (9):425-429.
- Fox, I. and Bayona, I.G.1972.*Aedes aegypti* feeds on lizards in Puerto Rico. J Econ Entomol.(57):417-418. Fox I, Bayona, I.G. Malathion resistant strains of *Aedes aegypti* in Puerto Rico in 1969. Mosq News; 32:157-60.
- Fox I.1980. Evaluation of ultra-low volume aerial and ground applications of malathion against natural populations of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. Mosq News; 40:280-83.
- French-Constant, R.H., Daborn, P.J. and Le Goff, G. 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. Trends in Genetics. 20(3):163-170 doi:10.1016/j.tig.2004.01.003

Garza-Hernández, J. A., Rodríguez-Pérez, M.A., Salazar, M.A., Russell, T.L., Adeleke, M.A., Luna-Santillana, E.J., Reyes-Villanueva, F. 2013. Vectorial capacity of *Aedes aegypti* for dengue virus type 2 is reduced with co-infection of *Metarhizium anisopliae*. PLOS Neglected Tropical Diseases. 7(3): 1-5.

Garza-Robledo A. A., J. F. Martínez-Perales, V. A. Rodríguez-Castro, and H. Quiroz-Martínez. 2011. Effectiveness of spinosad and temefos for the control of mosquito larvae at a tire dump in Allende, Nuevo Leon, Mexico. J. Am. Mosq. Control Assoc. 27: 404-407

Geetha I, Balaraman K. Effect of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on larvae of three species of mosquitoes. India J Experiment Biol 1999; 37: 1148-1150.

Goldberg L & Margalit J (1977) A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*, *Culex univittatus*. Mosquito News, 37, 355–358.

Gonzalez-Olvera. 2013. Resistencia a insecticidas en el mosquito vector del dengue *Aedes aegypti* (L.) en dos épocas de transmisión de la enfermedad en Mérida, Yucatán. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Harris, A.F., Rajatileka, S. y Ranson, H. 2010. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman . Am. J. Trop. Med. Hyg., 83(2): 277–284.

Harwood, H.F. y James, M. 1987. Entomología Médica y Veterinaria. Limusa.

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

Hayes E. 2009. Zika Virus Outside Africa. Emerg Infect Dis. 15(9):1347-1360.

Hemingway J, Boddington, Harris J. 1989. Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. Bull Ent Res. (79):123-30.

Hemingway, J. and Ranson, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 371-391. doi:10.1146/annurev.ento.45.1.371

Hu Z, Du Y, Nomura Y and Dong K, A sodium channel mutation identified in *Aedes aegypti* selectively reduces cockroach sodium channel sensitivity to type I, but not type II pyrethroids. *Insect Biochem Mol Biol.* 41(1): 9–13. doi:10.1016/j.ibmb.2010.09.005.

IRAC. 2015. IRAC MoA Classification for Mosquito Vectors of Disease. En línea: www.ircac-online.org. Consultado: 20 Julio 2015.

Ishak, H.I., Jaal, Z., Ranson, H. and Wondji, C.S. 2015. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (*kdr*) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasites & Vectors* 8:181 DOI 10.1186/s13071-015-0797-2

Jirakanjanakit N, Saengtharatip S, Rongnoparut P, Duchon S, Bellec C, Yoksan S. 2007. Trend of temefos resistance in *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes in Thailand during 2003-2005. *Environ Entomol.*;36(3):506-11.

Kawada H, Higa Y, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Kawada H, Higa Y, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Thi Yen N, Loan LL, Sánchez RA, Takagi M. 2009. Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3, e527 1–7

Kawada H, Oo S.Z.M., Thaug S., Kawashima E., Maung Y.N.M., Myat Thu, H.M. Zin, K. Thant, Z. Minakawa, N. 2014. Co-occurrence of Point Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel of Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* Populations in Myanmar. *PLoS Negl Trop Dis* 8(7): e3032. doi:10.1371/journal.pntd.0003032

Kemabonta, K. A. and Nwankwo A. E. Larvicidal effectiveness of spinosad and temefos on *Anopheles gambiae* & *Aedes aegypti*. 2013. International Journal of Science and Nature. 4(2)2013:214-222

Khan, N.H. and Brown, A. W. A. 1961. Genetical studies on dieldrin resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance to DDT. Bull World Health Org.(24):519-526

Kyle JL, Harris E (2008). Global spread and persistence of dengue. Annu Rev Microbiol; 62:71-92.

Kroeger, A., A. Lenhart, M. Ochoa, E. Villegas, M. Levy, N. Alexander, and P. J. McCall (2006). Effective control of dengue vectors with curtains and water container covers treated with insecticide in Mexico and Venezuela: cluster randomised trials. BMJ 332.

Kobylinski, K.C., M.S., Black, W. and Foy, D.F. (2012). Mermithid nematodes found in adult *Anopheles* from southeastern Senegal. Parasites & Vectors (5)131:1-7.

Kovendan, K., Murugan, K., Kumar, A. N., Vincent, S., Hwang, J.S. 2012. Bioefficacy of larvicidal and pupicidal properties of *Carica papaya* (Caricaceae) leaf extract and bacterial insecticide, spinosad, against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 110:669–678

Kumar, R., and J. S. Hwang (2006). Larvicidal efficiency of aquatic predators: A perspective for mosquito biocontrol. Zoological Studies 45.

Lagunes-Tejeda, A. y Villanueva-Jiménez, J.A. 1999. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados. México.

Lagunes-Tejeda, A., Rodríguez-Maciel, J.C. y De Loera-Barocio, J. C. 2009. Susceptibilidad a insecticidas en poblaciones de artrópodos de México. Agrociencia. 43: 173-196.

Lee, D. and Moore, C.G. 1973. Mosquito studies during an interepidemic outbreak of dengue in Puerto Rico. Mosq News; 33: 506-509

Li, X., Schuler, M.A., and Berenbaum, M.R. 2007b. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 52, 231-253.

Ling, C. Q., Qing, Z.S. y Liu, J.E. 1999. New Esterase Enzymes Involved in Organophosphate Resistance in *Culex Pipiens* (Diptera: Culicidae) from Guang Zhou, China. *J. Med. Entomol.* 36(6): 666-670.

Linss, J.G.B., Brito, L.P. Azambuja G. G., Saori A. A.2014. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasites & Vector.* 7:25

Liu, N. 2015. Insecticide resistant in mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annu. Rev. Entomol.* 60:537–5

Lozano-Fuentes, Saavedra-Rodriguez, K., Black, W.C. y Eisen, L. 2010. QCal: A Software Application for the Calculation of Dose–Response Curves In Insecticide Resistance Bioassays. *Journal of the American Mosquito Control Association.* 28(1):59-61. DOI: 10.2987/11-6192.1

Lozano-Fuentes, S., Hayden, M.H, Welsh-Rodriguez, C., Ochoa-Martinez, C., Tapia-Santos, B., Kobylinski, K.C., Uejio, C.K., Zielinski-Gutierrez, E., Delle, M., L., Monaghan, A.J., Steinhoff, D.F. y Einsen, L. 2012. The Dengue Virus Mosquito Vector *Aedes aegypti* at High Elevation in México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 87(5), pp. 902–909.

Lumjuan, N., Stevenson, Prapanthadara, L., Somboon, P., Brophy, P.M., Loftus, B.J., Severson, D.W. y Ranson, H. 2007. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family.

Lumjuan, McCarollo, L., Prapanthadara, L., Hemingway, J. and Ranson, H. 2005. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector *Ae. aegypti*. *Insect Biochesmitry and Molecular Biology.* 35: 861-871.

- Maestre, S.R., Rey, V.G., De las Salas, J.A., Vergara, S.C., Santacoloma, V.L., Goenaga, O.S. y Carrasquilla, F.M.C. 2009. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a temefos en Atlántico-Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. 35(2):202-205.
- Marina, C. F., J. G. Bond, J. Muñoz, J. Valle, N. Chirino, and T. Williams. 2012. Spinosad: a biorational mosquito larvicide for use in car tires in southern Mexico. *Parasite Vector* 5: 1-10
- Mattar, S. y González, T. M. 2015. Now is the time for the Zika virus. *Revista MVZ Córdoba*. 20(2): 4511-4512
- Montella IR, Martins AJ, Fernández VP, Pereira JB, Braga IA,ValleD. 2007. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg* 77: 467-477.
- Morou, E., Dowd, A.J., Rajatileka, S., Steven, A., Hemingway, J., Ranson, H., Paine, M. and Vontas, J. 2010. A Simple Colorimetric Assay for Specific Detection of Glutathione-S Transferase Activity Associated with DDT Resistance in Mosquitoes. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 4 (8): 1-6
- Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VA. 2015. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerg Infect Dis*; 21:359-361.
- Noletto, D. N., Coutinho, M.D.F. 2014. Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitol Res* 113:565–592.
- Oliveira, P. V., Ferreira J. C., Moura, F.S., Lima, G.S., Oliveira, F.M., Oliveira, P.M.S., Conserva, L.M., Giuliatti, A.M., Lyra, L. R.P.2012. Larvicidal activity of 94 extracts from ten plant species of northeastern of Brazil against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 107:403–407.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2011. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas. OPS/CDC.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2013. Los casos de dengue en las Américas se quintuplicaron en diez años, según nuevos datos de la OPS/OMS. [http://www.paho.org/arg/index.php?option=com_content&view=article&id=1328%](http://www.paho.org/arg/index.php?option=com_content&view=article&id=1328%26)

[3Alos-casos-de-dengue-en-las-americas-se-quintuplicaron-en-diez-anos-segun-nuevos-datos-de-la-opsoms&catid=332%3Aarg02epidemiologia-prevencion-y-control-de-enfermedades&Itemid=510](#)

Opong-Mensah, K. 1984. A review of temephos with particular reference to the West African Onchocerciasis Control Program. Residue Reviews. 91: 48-63.

Ordoñez, J. 1997. Use of sticky ovitraps and mark-release-recapture method to determine *Aedes aegypti* females flight dispersal. 62nd Annual Meeting of the American Mosquito Control Association, Salt Lake City, Utah.

O'Reilly AO, Khambay BPS, Williamson MS, Field LM, Wallace BA, *et al.* (2006) Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. Biochem J 396: 255–263.

Park, Y., Taylor, M.F.J., & Feyereisen, R. (1999). Voltage-gated sodium channel genes hscp and hDSC1 of *Heliothis virescens* F-genomic organization. Insect Molecular Biology, Vol.8, No. 2, (May), pp. 161-170, ISSN 0962-1075.

Paula, A. R., Carolino, A.T., Paula, C.A. and Samuels, R.I. 2011. The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasites & Vectors 4-8

Pereira, L. E., Oliveira, F. A. M., Oliveira, L. J. W., Novaes, R. Jr. A., Luciano Pamplona de Góes, C. L.P. e Soares, P. R. J. 2006. Resistência do *Aedes aegypti* ao Temefós em Municípios do Estado do Ceará *Aedes aegypti* resistance to temefos in counties of Ceará State. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39(3):259-263

Perich MJ, Kardec A, Braga IA, Portal IF, Burge R, Zeichner BC, Brogdon WA and Wirtz RA, Field evaluation of a lethal ovitrap against dengue vectors in Brazil. Med Vet Entomol 17:205-210 (2003).

Peschiutta, M., Cagnolo, S.R. y Almirón, W.R. 2014. Susceptibility of larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) to entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 73 (3-4): 99-108

Polson, K. A., Brogdon, W.A., Rawlins, S.C. y Chadee, D.D. 2011. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Tropica*. 117:31-38.

Ponce-García, G., Flores, A. E., Fernández- Salas, I., Saavedra- Rodríguez K., Reyes- Solís, G., Lozano-Fuentes, S., Bond, J. G., Casas-Martínez, M., Ramsey, J. M., García- Rejón, J., Domínguez-Galera, M., Ranson, H., Hemingway, J., Eisen, L., Black, W. C. 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México. *PLOS Neglected Tropical Diseases* (3) 10: 1-10 .

Powell, R.J. and Tabachnic, W.J. 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*.108(I): 11-17.

Ranson, H. , Burhani, J. , Lumjuan, N. y Black IV, W.C. 2010. Insecticide resistance in dengue vectors. *Review. TropIKA.net*. 1:12. <http://journal.tropika.net>

Rawlins, S.C. and Ragoonansingh, R. 1990.Comparative organophosphorus insecticide susceptibility in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and *Toxorhynchites moctezuma*.6(2):315-7.

Reid, W.R., Thornton, A., Pridgeon, J.W., Becnel, J.J., Tang, F., Estep, A., Clark, G.G., Allan, S. and Liu, N. Transcriptional Analysis of Four Family 4 P450s in a Puerto Rico Strain of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Compared With an Orlando Strain and Their Possible Functional Roles in Permethrin Resistance. *J. Med. Entomol.* 51(3):605-615. DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/ME13228>

Reyes, M., Rocha, K., Alarcón, L., Siegwart, M., Sauphanor, B. 2012. Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta*

(Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 102: 45–50 doi:10.1016/j.pestbp.2011.10.008

Rodríguez, M.M., Bisset, J.A., Fernández, D., Lauza, L. y Soca, A. 2001. Detection of Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. 38(5):623-8.

Rodríguez-Coto, M. M. 2008. Estudio de la Resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Tesis Doctorado. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. La Habana Cuba. Pags. 1-128.

Rodriguez, M.M., Bisset, J.A., Fernández, D. Milá, L.H., Calvo, E., Díaz, C. y Soca, L. A. 1999. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 51:2

Rodríguez, M.M., Bisset, J.A. and Fernández, D. 2007. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some latinamerican countries. *J Am Mosq Control Assoc.* 23(4):420-9.

Rodríguez-Morales, A.J. 2015. *Aedes*: un eficiente vector de viejos y nuevos arbovirus (dengue, chikungunya y zika) en las Américas. *Rev. cuerpo méd. HNAAA* 8(2): 50-52

Rodríguez-Morales, A.J. 2015. *Aedes*: un eficiente vector de viejos y nuevos arbovirus (dengue, chikungunya y zika) en las Américas. *Rev. cuerpo méd. HNAAA* 8(2): 50-52

Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, Guillaumot L, Souarès Y. 2014. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections—an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Euro Surveill.* 19(41):pii=20929. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20929>

Saavedra, R. K. , G. Ponce, G., I. Fernández, S., R., Torres, Z., A. E., Flores, S. 2008. Mutación asociada a la resistencia a insecticidas piretroides en el mosquito transmisor de dengue (*Aedes aegypti*). Ciencia, UANL. 11 (4): 393-402.

Saavedra K, Urdaneta L, Rajatilekat S, Moulton M, Flores, AE, Fernández I, Bisset J, Rodríguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway J, Black WC 4th. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. Insect Mol Biol. 16: 785798.

Sánchez S., S. 1995. Susceptibilidad a insecticidas en una población de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) procedente de la Chontalpa, Tabasco". Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 55 p.

Siller, Q., Ponce, G., Lozano, S. and Flores, A.E. 2011. Update on the frequency of Ile1016 mutation in voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. Journal of the American Mosquito Control Association, 27(4):357–362.

Silva R and Silva H, Luz C. 2004. Effect of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil samples of the central Brazilian Cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. Rev Patol Trop 33 (2): 207-216.

Singh, K.D. 2007. Applied Entomology Toxicology Of Insecticides. Department of Zoology University of Delhi Delhi-110007 India

Sparks, T.C., Lockwood, J.A., Byford, R.L., Graves, J.B. and Roger, B.L. The Role of Behavior in Insecticide Resistance. Pesric. Sci., 26, 383-399 '

Stenhouse, S.A., Plernsub, S., Yanola, J., Lumjuan, N., Dantrakool, A., Choochote, W. y Soombon, P. 2013. Detection of the V1016G mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by allele-specific PCR assay, and its distribution and effect on deltamethrin resistance in Thailand. Parasites&Vectors 6:253.

Sutherland, D.J., Khoo, B.K., Kent, R.B. 1987. The value of laboratory studies to operational control of mosquitoes. Proc Proceedings - Annual Meeting, New Jersey Mosq Control Assoc, Inc. 74: 71-4.

Tabachnick, W.J. 1991. Evolutionary genetics and arthropod-borne disease: The yellow fever.

Terán-Zavala, M.C., Rodríguez-Coto, M.M., Ricardo-Leyva, Y., Bisset-Lazcano, J.A.- Evaluación de temefos y pyriproxifeno en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Guayaquil, Ecuador. *Revista Cubana de Medicina Tropical*.66(1):71-83.

Tikar, S. N., Kumar, A., Prasad, G. B. K. S. and Prakash, S. 2009. Temephos-induced resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance studies to certain insecticides from India. *Parasitol Res.* 105:57–63

Thompson GD, Michel KH, Yao RC, Mynderse JS, Mosburg CI Worden TV, Chio EH, Sparks TC, Hutchins SH. 1997. The discovery of *Saccharopolyspora spinosa* and a new class of insect control products. *Down Earth* 52:1-5.

Vega-Rúa, A., Zouache, K., Girod, R. Failloux, A.B., Lourenço-de-Oliveira, R. 2014. High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *J. Virol.* 88(11):6294-6306.

Vejar C., G. 1994. Pruebas de campo y laboratorio con Temefós, Permetrina + S-bioaletrina y *Bacillus thuringiensis israelensis* en mosquitos (Diptera: Culicidae) de cinco desarrollos turísticos de México y Chapingo, Edo. de México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. De México. 82 p

Vontas, J. , Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., della Torre, A. y Ranson, H. 2012. Insecticide resistance in the major vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 104: 126-131.

Vega-Rúa, A., Zouache, K., Girod, R. Failloux, A.B., Lourenço-de-Oliveira, R. 2014. High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *J. Virol.* 88(11):6294-6306.

Ware, G.W. 1999. An introduction to insecticides. 3rd. ed. University of Minnesota. Tucson, Arizona,

Weaver, S. C. and Reisen, W.K. 2010. Present and future arboviral threats . Antiviral Research. 85: 328-345.

Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, et al. 2003. Insecticide resistance in mosquito vectors. Nature 423:136–37

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

Wirth, M.C. y Georgiou, G.P.1999. Selection and characterization of temefos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. J. Amer. Mosq. Control. Assoc. 15:315-320.

World Health Organization (WHO). 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. En línea, consultado: 24 octubre 2012. http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf?ua=1

World Health Organization, 2007. Report of the Scientific Working Group meeting on Dengue. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, 1-5 October Geneva, Switzerland.

World Health Organization (WHO). 2008. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet 117

WHO. 2010. Spinosad DT in drinking-water: use for vector control in drinking-water sources and containers., Geneva, Switzerland.

World Health Organization. 2011. Global Insecticide Use for Vector-Borne Disease Control. A 10-years Assessment (2000-2009). Fifth Edition. WHO/HTM/NTD/VEM/WHOPES/2011.6

Yanola, J., Somboon, P., Walton, C., Nachaiwieng, W., Somwang, P., y
Prapanthadara, L. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in
the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and
the distribution of this mutation throughout Thailand. 2011. *Tropical Medicine and
International Health*. 16 (4): 501–509.

Zeichner BC and Debboun M. 2011. The lethal ovitrap: a response to the resurgence
of dengue and chikungunya. *U.S. Army Med Dep J*:4-11

11.RESUMEN BIOGRAFICO

Samanta Lucía Del Río Galván

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con acentuación en Entomología Médica

Tesis: NIVEL DE SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA DE *Aedes aegypti* (L.) EN PUERTO RICO

Campo de estudio: Entomología Médica

Datos personales: Nacida en Querétaro, Qro. México, el 9 de febrero de 1980, hija de Miguel Del Río Torres y Lucía Galván Maldonado.

Educación: Egresada de Instituto Politécnico Nacional, grado obtenido Licenciatura Biólogo, 2002.

Egresada del Colegio de Postgraduados, grado obtenido Maestría en Ciencias con orientación en Entomología y Acarología, 2007.

Experiencia profesional: Salud Ambiental Mexicana: Supervisor de Calidad en servicios de control de plagas, así como también, revisión de condiciones que propicien el desarrollo de plagas. Encargada de impartir cursos de inducción sobre manejo integral de plagas y temas básicos de entomología.

Walmart de México y Centroamérica: Jefe de Control de Plagas. Coordinación de servicios y de proveedores de control de plagas a nivel nacional. Auditorías a restaurantes, autoservicios y centros de distribución, respecto a plagas. Identificación de organismos “plaga”. Elaboración de procedimientos y evaluación de los mismos para la aplicación de técnicas y plaguicidas en Wal-Mart México. Gestión con proveedores de control de plagas y autoridades. Impartición de cursos de manejo integral de plagas. Manejo de facturación para el pago oportuno a proveedores.

12.ANEXO

Pruebas bioquímicas

La resistencia a los insecticidas se asocia con frecuencia a la degradación metabólica o el secuestro del plaguicida. La degradación implica a las enzimas responsables de la detoxificación de xenobióticos en los organismos vivos.

Se determinarán los mecanismos bioquímicos de resistencia, empleando las metodologías propuestas por Brogdon (1998) en donde se determinará la presencia de las alfa y beta esterasas, oxidasas, glutatión-s-transferasas, acetilcolinesterasa. Se utilizarán 30 larvas y 30 mosquitos adultos para dichas pruebas, los cuales en primer lugar tendrán que ser homogenizados. Todas las pruebas se realizarán por triplicado.

Ensayos de Microplaca.

Los bioensayos se realizarán por triplicado en las microplacas.

- 1.- Los mosquitos se colocarán en el congelador para poder inmovilizarlos.
- 2.- Se prepararon todos los reactivos antes de las pruebas; preparándose material para 3 pruebas distintas, corriéndose cada una por triplicado.

Preparación de mosquito

- 1.- Homogenizar un mosquito (adulto o larva) en 100 μ L de del buffer (K_3PO_4).
- 2.- Diluir a 1 mL con 900 μ L del buffer.

Para incrementar el de número de pruebas: diluir el homogenato.

- 1.- Remover 500 μ L del homogenato del mosquito y colocarlo en un tubo por separado.
- 2.- Diluir a 1 mL con 500 μ L del buffer a cada tubo.
- 3.- Duplicar el tiempo de aplicación y diluir el control.

Preparación de los buffer

Buffer de fosfato de potasio (K_3PO_4)

Mezclar: 6.6 g de fosfato de potasio dibásico

1.7 g de fosfato de potasio monobásico

1000 mL de agua bidestilada

Ajustar el pH a 7.2

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

Buffer de acetato de sodio ($NaC_2H_3O_2$) 0.05 M

Mezclar: 83 mL de acetato de sodio 3 M

900 mL de agua bidestilada

Ajustar el pH a 5 con ácido acético glacial.

Ajustar el volumen final a 1 L.

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

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

Procedimientos a seguir:

α y β esterasas:

Preparar β -naphthyl acetato:

Disolver: 56mg de β -naphthyl acetato

20ml de acetona

adherir: 80 ml de K_3PO_4

Se puede almacenar a 4 °C y antes de usarse se puede colocar a temperatura ambiente.

Preparar dianisidina inmediatamente antes usarse ya que es fotolabil. o antes de que el color se degrade o se puede preparar y almacenar por varias semanas a 4 °C en botes oscuros. Observar el color de la dianisidina antes de usar. El color debe ser amarillo pálido. Si el color es ámbar, se debe descartar y preparar nuevo.

Pesar 100 mg de 0-dianisidina tetrazotized. Adherir 100 mL de agua bidestilada inmediatamente antes de usar.

1. Colocar 100 μ L del homogenato del mosquito en cada pozo.
2. Agregar 100 μ L de α naftil acetato
3. Incubar 20 min a temperatura ambiente.
4. Agregar 100 μ L dianisina.
5. Incubar por 4 minutos.
6. Leer usando el filtro de 540 nm.
7. Controles:
 - a. Positivo: 1200 μ L de buffer fosfato, más 17.5 μ L de stock α naftil acetato.
 - b. Negativo: 100 μ L de buffer fosfato.

*** β esterasas:**

1. Se realiza el procedimiento anterior, sólo que se usa el β naftil acetato como sustrato.

Glutation S-transferasas:

Se emplea para medir el nivel de glutatión S –transferasas

Preparar glutatión reducido:

Mezclar: 61mg de glutatión reducido

100 mL del buffer de K_3PO_4

Su caducidad puede es de 3 o 4 días a 4 °C

Preparar cDNB

Disolver: 20 mg 1-cloro-2-4'-dinitrobenceno

10 mL Acetona

90 mL del buffer K_3PO_4

Su caducidad es de 3 o 4 días a 4 °C

Procedimiento:

1. Colocar 100 μ L del homogenato del mosquito en cada pozo.
2. Agregar 100 μ L de glutatión reducido.
3. Agregar 100 μ L cDNB.
4. Leer la placa inmediatamente (T_0) a 340nm.
5. Leer la placa a los 10 min (T_{10}) a 340nm.
6. Restar la lectura del T_0 al T_{10} , para análisis estadístico.
7. Control: en blanco.

Reacción de oxidasas:

Mide los niveles de peroxidasas

Preparar TMBZ: 50 mg 3,3', 5,5'-tetrametil-benzidina

Dihidrocloride* (TMBZ (2HCL) o TMBZ) en

25 mL de metanol

Agregar: 75 mL de 0.25m del buffer acetato de Na**

*TMBZ (2HCl) se debe disolver por pocos minutos, el TMBZ se puede disolver con agua caliente, no aplicar la flama directamente y no agitar fuertemente.

**Es muy importante que el pH del buffer acetato de sodio sea exactamente 5. Se debe usar ácido acético para ajustar el pH.

Procedimiento:

1. Colocar 100 μL del homogenato del mosquito en cada pozo.
2. Agregar 100 μL de TMBZ (3,3,5,5,-Tetramethyl Benzidine Dihydrochloride)
3. Agregar 1 gota (25 μL de peróxido de hidrógeno H_2O_2 al 3%).
4. Incubar por 10 min y leer la micro placa usando el filtro de 620 nm.
5. Control positivo = 100 μL :
 - a. 11 μL de solución stock Citocromo C
 - b. 1200 μL de buffer fostato.
6. Control negativo = 100 μL Buffer (KPO_4)

Acetil colinesterasa (ACTH):

Mide la cantidad de acetil colinesterasa presente.

Preparar ATCH:

Disolver: 75mg de acetilcolina iodide (ATCH) iodizada

10mL de acetona

Agregar: 90mL del buffer K_3PO_4

Su caducidad puede ser de 3 o 4 días a 4 °C.

Preparar DNTB:

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

100mL del buffer K_3PO_4

Su caducidad puede ser por 3 o 4 días a 4 °C.

Procedimiento

1. Colocar 100 μL del homogenato del mosquito en cada pozo.
2. Agregar 100 μL de ACTH en cada pozo.
3. Agregar 100 μL de DNTB en cada pozo.
4. Leer la placa inmediatamente (T_0) a 414 nm.
5. Incubar por 20 minutos.
6. Leer la placa a los 20 min (T_{20}) a 414nm.

7. Restar la lectura del T_0 al T_{20} .
8. Control positivo y negativo: 100 μL buffer KPO_4 .

Acetil colinesterasa insensible (iACTH):

Determinar si está presente la acetil colinesterasa, cuando el color es amarillo pálido, no hay sitios alterados y son homocigotos dominantes; cuando el color es amarillo oscuro existen sitios alterados, son homocigotos recesivos; cuando se encuentra el color intermedio, los individuos son heterocigotos.

Procedimiento:

1. Colocar 100 μL del homogenato del mosquito en cada pozo.
2. Agregar 100 μL de ATCH en cada pozo.
3. Agregar 100 μL de DNTB en cada pozo.
4. Leer la placa inmediatamente (T_0) a 414 nm.
5. Incubar por 20 minutos.
6. Leer la placa a los 20 min (T_{20}) a 414nm.
7. Restar la lectura del T_0 al T_{20} .
8. Control positivo y negativo: 100 μL buffer KPO_4 .

ANEXO II

Grinding Buffer

Colocar:

1. 0.584 g de NaCl
2. 6.85 g de Sucrosa.
3. 1.211 g de Tris-HCl (9.1 pH).
4. 1.861 g de EDTA.
5. 1 g de SDS en 10 mL de Agua ultrapura.

Disolver todo a 50 mL de agua deslada mezclar lentamente para evitar espuma después aforar a 100 mL, asegurarse que el pH esté a 9.1, ajustar con pellets de NaOH. Posteriormente pasar el buffer por membranas millipore 0.22 μ . Hacer alícuotas de 1mL y almacenar en el congelador.

Extracción de DNA: Técnica de extracción de sales (Coen, *et al.*, 1982)

1. Limpiar la mesa con etanol 70%.
2. Encienda el baño seco a 65°C
3. Descongelar el Grinding Buffer (GB) a temperatura ambiente cuidando de que esté transparente y homogéneo.
4. Colocar 50 mL de GB en cada tubo que contiene el mosquito.
5. Macerar un pistilo estéril cada pistilo con cada tubo. Manualmente o con el macerador automático.
6. Lavar el pistilo adicionando 50 mL de GB para descartar todo el mosquito restante. Tirar cada pistilo.
7. Tapar los Eppendorf®.
8. Ponerlo rápidamente por el vórtex.
9. Centrifugar 1 minuto a 13,000 rpm por 5 min.
10. Colocar los tubos en la plancha a 65°C por 30 min.
11. Colocar 15 mL de acetato de potasio para detener la acción del buffer.
12. Ponerlo rápidamente por el vórtex.
13. Colocar en hielo por 30 minutos mínimo.
14. Centrifugar 15 minutos a 14,000 rpm.
15. Transferir el sobrenadante a otro tubo (80 µL). y desechar lo restante.
16. Colocar 200 µL de alcohol etílico al 100%.
17. Dejar 10 minutos y colocarlo rápidamente en el vórtex.
18. Centrifugar 5 minutos a 13,000 rpm.
19. Decantar el alcohol y lavar de nuevo con alcohol al 100%.
20. Centrifugar.
21. Decantar todo el alcohol y secar el exceso.
22. Colocar en el desecadero o vaporizador, por 15 minutos a 55°C.

Esta prueba nos permite detectar a individuos susceptibles con genotipo homocigoto *g/g*, individuos con genotipo resistente *a/a* e individuos heterocigotos con genotipo *a/g*. Los productos de PCR son detectados realizando electroforesis en un gel de agarosa. Se recomienda utilizar 50 mosquitos por sitio de colecta, por lo general se emplean 25 hembras y 25 machos del mismo sitio de colecta. Las frecuencias alélicas de la mutación *kdr* se calculan

al dividir el número de veces que aparece el alelo mutante, sobre el número de alelos totales (esto corresponde al número de individuos analizados multiplicados por 2, ya que cada individuo contiene dos copias de cada alelo) (Saavedra *et al.*, 2007).

Se utilizaron los siguientes primers:

1.Val1016f GCGGGCAGGGCGGGGGCGGGGCCACAAATTGTTTCCCACCCGCAC
CGG

2.Ile1016f GCGGGCACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA

3.Ile1016r TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC