



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

“FLUCTUACIÓN DE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762),
SUSCEPTIBILIDAD A INSECTICIDAS Y EL EFECTO
DE ATRAYENTES, PARA SU POSIBLE MANEJO EN
BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO”

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Ecología de Zonas Áridas)

P r e s e n t a

IVONNE TOVAR ZAMORA

La Paz, Baja California Sur, Febrero de 2016

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 15 del Mes de Febrero del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Fluctuación de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), susceptibilidad a insecticidas y el efecto de atrayentes, para su posible manejo en Baja California Sur, México”

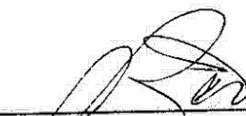


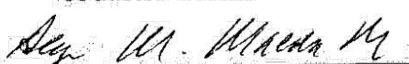

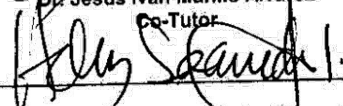
Presentada por la alumna:

Ivonne Tovar Zamora

Aspirante al Grado de DOCTORA EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Ecología de Zonas Áridas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

 _____ Dra. Rosalia Servín Villegas Co-Director de Tesis	 _____ Dra. Rosa Patricia Penilla Navarro Co-Director de Tesis
 _____ Dra. Vanía Verónica Serrano Pinto Co-Tutor	 _____ Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez Co-Tutor
 _____ Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez Co-Tutor	
 _____ Dra. Norma Yolanda Hernández Seavedra, Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos	

Conformación de Comités

Comité tutorial

Dra. Rosalía Servín Villegas	Co-Director	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Dr. Rosa Patricia Penilla Navarro	Co-Director	Centro Regional de Investigación en Salud Pública.
Dra. Vania Verónica Serrano Pinto	Co-Tutor	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez	Co-Tutor	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez	Co-Tutor	Centro de Investigaciones Interdisciplinario de Ciencias Marinas.

Comité revisor de tesis

Dra. Rosalía Servín Villegas
Dra. Rosa Patricia Penilla Navarro
Dra. Vania Verónica Serrano Pinto
Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez
Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez

Jurado de examen de grado

Dra. Rosalía Servín Villegas
Dra. Rosa Patricia Penilla Navarro
Dra. Vania Verónica Serrano Pinto
Dr. Alejandro Manuel Maeda Martínez
Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez

Suplentes

Dr. Javier Caraveo Patiño.
Dr. Gustavo Arnaud Franco.

Resumen

El control de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) en México, requiere ser atendido y optimizado para disminuir la incidencia de las enfermedades conocidas como dengue, chikungunya y más recientemente zika. En la Región Sur de la Península de Baja California, se desconocen varios aspectos biológicos de este vector cuyo conocimiento ayudaría a mejorar su control. Por lo anterior los objetivos de este estudio fueron evaluar, estimar y determinar en poblaciones provenientes de La Paz (LAP), San José del Cabo (SJC) y Cabo San Lucas (CSL), la fluctuación poblacional de *Ae. aegypti* a lo largo de tres años de estudio, así también su estado de susceptibilidad a seis insecticidas usados para su control, los mecanismos de resistencia desarrollados hacia los insecticidas usados para su combate y, la atracción de las formas adultas de esta especie hacia cuatro sales sódicas derivadas de ácidos orgánicos, bajo condiciones de laboratorio para su posible uso en trampas. La fluctuación mensual en el número de huevos colectados fue significativamente más alta en LAP ($p \leq 0.0001$) de mayo a diciembre, no así en los colectados en SJC y SLC ($p \leq 0.7924$). Se obtuvo una correlación significativa entre el número de huevos y la temperatura mínima $Rho \leq 0.60\%$ ($p \leq 0.01$). La población de CSL fue menos susceptible a temefos ($FR_{50} = 8.25X$), con mortalidades registradas de 69% a permetrina y 65.41% a bifentrina; mientras que las registradas de SJC fueron de 72.20% a bifentrina y 94.50% a malatión. En los mosquitos obtenidos de las tres localidades las concentraciones de esterasas y las glutatión-S-transferasas fueron significativamente más elevadas con respecto a la cepa susceptible ($p \leq 0.000$), así también las mutaciones *kdr* V1016I y F1534C estuvieron presentes con una frecuencia alélica $\geq 0.6\%$ y $\geq 0.81\%$, respectivamente. En las pruebas de atracción, la mayor respuesta antenal se registró con el propionato de sodio ($p < 0.5$) a una concentración de 250 ppm. Con los resultados obtenidos, se aporta nuevo conocimiento para el control de *Ae. aegypti* en Baja California Sur, sobre la fluctuación el comportamiento y estado de susceptibilidad a insecticidas, que podría ser considerado para el Programa Estatal de manejo de este vector.

Palabras claves: *Ae. aegypti*, fluctuación, susceptibilidad, mecanismos de resistencia, atrayentes.



Dra. Rosalía Servín Villegas

Vo. Bo.





Dra. Rosa Patricia Penilla Navarro

Abstract

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) control in Mexico needs to be optimized to reduce dengue, chikungunya and zika incidence. In the Southern Region of the Peninsula of Baja California, knowledge and comprehension of several biological aspects of this vector could improve their control. Therefore the objectives of this study were to evaluate, estimate and determine the population fluctuation over three years of study, the susceptibility to six insecticides used to control, the resistance mechanisms to insecticides, and the effect of four different organic acids as attractants of the adult forms under laboratory conditions for its possible use in traps from field mosquito populations collected in La Paz (LAP), San José del Cabo (SJ) and Cabo San Lucas (SL). The monthly fluctuation in the number of eggs collected was significantly higher in LAP ($p \leq 0.0001$) from May to December, not in those collected in SJ and SL ($p \leq 0.7924$). A significant correlation between the number of eggs and the minimum temperature $Rho \leq 0.60\%$ ($p \leq 0.01$) was obtained. SL's population was less susceptible to temephos ($FR_{50} = 8.25X$), with mortalities recorded from 69% to 65.41% to permethrin and bifenthrin; whereas registered SJ were 72.20% to 94.50% bifenthrin and malathion. Esterases and glutathione-S-transferases were significantly higher compared to the susceptible strain ($p \leq 0.000$), and both *kdr* mutations V1016I and F1534C, were present with an allelic frequency of $\geq 0.6\%$ and $\geq 0.81\%$, respectively, in mosquitoes collected from the three localities. Most electroantennographic studies response was recorded with sodium propionate ($p < 0.5$) at a concentration of 250 ppm. These results provide important information about the behavior and status of insecticide resistance in *Ae. aegypti* from Baja California Sur that could be considered by the state program to optimize vector control.

Keywords: *Ae. aegypti*, fluctuation, susceptibility, resistance mechanisms, attractants.

 Dra. Rosalia Servin Villegas	Vo. Bo.	 Dra. Rosa Patricia Penilla Navarro
---	---------	--

Dedicatoria

A Dios, Rosa María, Leila, Iker e Israel

Alguien que te ama
Cree en ti, incluso
Cuando tú has dejado
De creer en ti mismo.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado mediante una beca de estudios (260342).

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, S. C), a la Dirección de Estudios de Posgrado (Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra, Lic. Osvelia, Tania, Horacio y Claudia), al Departamento de Control Escolar, al Laboratorio de Cómputo.

A el M en C. Israel Guerrero, Franco Cota y José Abelino Cota, por su apoyo en campo, así también a el Biol. Armando Tejas Romero por su invaluable colaboración en campo y en laboratorio, a el personal del taller de maquinados del CIBNOR, Carlos Soto, Alfonso Álvarez, Jorge Cobos y Guillermo García, por su apoyo en la elaboración de los prototipos para evaluar atrayentes y al personal del Bioterio Dr. Amaury Cordero y Guadalupe Sánchez.

Al Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP) de Tapachula, Chiapas, en especial a el Dr. Américo Rodríguez y al personal técnico del Laboratorio de Resistencia de Insecticidas por su invaluable apoyo en laboratorio (Alma Lopez, Francisco Solis, Jeovany Roblero, Gabriel Fuentes, Don Robert^t, así como al personal técnico del insectario Tavi Perez y Lisbeth Maldonado.

Al Dr. Jose Luis Torres Estrada del Centro Interdisciplinario de Investigación en Salud Pública (CRISP), así también al personal técnico del Laboratorio de Etología Química (Alejandra Maldonado, Sandra Robles y Crecencio Díaz) por su gran apoyo en los ensayos conductuales con atrayentes a todos y cada uno de ellos mil gracias,

Quiero agradecer inmensamente a mi comité de tesis, que sin ellos no hubiese sido posible dicha investigación:

Dra. Rosalía Servín Villegas (Co-Directora de tesis) gracias por su valioso apoyo, paciencia, cariño y consejos, y por motivarme en todo momento.

Dra. Rosa Patricia Penilla Navarro (Co-Directora de tesis) gracias por su apoyo, motivación, confianza, guía y paciencia.

Dra. Vania Verónica Serrano Pinto (Co-Tutora) gracias por todo su apoyo, por guiarme en la redacción y escritura de la tesis, por los consejos y la paciencia.

Dr. Alejandro Maeda Martínez (Co-Tutor) por su apoyo y acertadas observaciones.

Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez (Co-Tutor) gracias por todo su apoyo durante el desarrollo de la investigación.

Al Dr. Javier Caraveo Patiño, por su apoyo estadístico y al Dr. Jorge Méndez Galván por los conocimientos compartidos los cuales fueron pieza fundamental en el desarrollo de este trabajo mi sincero agradecimiento.

A mis compañeros de LESP (Karla, Ovelia, Estelita, Eva, Tere, Martha, Jesica, Ana, Paty, Angy, Dulce, Keny, Mario, Celina, Alejandro, Mónica, Varinia, Blanquita, Clarita, Amor, y Todos aquellos a quienes sin querer deje de mencionar, mil gracias por su comprensión, paciencia, apoyo y tolerancia mil gracias.

A todos mis amigos y compañeros de estudio del programa de doctorado (Ana Claudia, Karol, Polo, Elio, Emilio, Roberto, Cristina, Janeth, Tony, Oskar, Claudia, Nidia, Ana Ruth, Federico y Fernando por su apoyo, entusiasmo y hacer el trayecto más ligero.

Contenido	No. De pág.
Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos	iv
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Descripción de la especie	6
2.1.1 Taxonomía	6
2.1.2 Ciclo de vida.....	7
2.1.3 Autoecología de <i>Ae. aegypti</i>	8
2.2 Análisis de los métodos para estimar la densidad y abundancia del mosquito <i>Ae. aegypti</i> y su control	10
2.3 Estrategias de manejo de <i>Ae. aegypti</i>	13
2.3.1 Combate químico de <i>Ae. aegypti</i>	14
2.3.2 Uso de atrayentes como una alternativa de manejo para <i>Ae. aegypti</i>	15
2.3.3 Combate biológico de <i>Ae. aegypti</i>	16
2.3.4 Manejo cultural para la disminución poblacional de <i>Ae. aegypti</i>	17
2.4 Mecanismos de resistencia en <i>Ae. aegypti</i> hacia el combate químico	18
2.4.1 Mecanismos de resistencia de mayor importancia en <i>Ae. aegypti</i>	21
2.5 Susceptibilidad y resistencia de <i>Ae. aegypti</i> a insecticidas.....	24
2.5.1 Uso de insecticidas y susceptibilidad de <i>Ae. aegypti</i> en México	26
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	30
5.1 OBJETIVO GENERAL	30
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1 Área de estudio.....	31
6.2 Fluctuación espacio temporal de <i>Ae. aegypti</i>	33
6.2.1 Estimación de la abundancia de <i>Ae. aegypti</i> utilizando indicadores entomológicos larvales (ICP, IRP e IB)	33
6.2.2 Estimación de la abundancia de <i>Ae. aegypti</i> utilizando indicadores entomológicos de ovitrampas (IOP e IDH)	34
6.2.3 Análisis estadístico de la abundancia poblacional de <i>Ae. aegypti</i>	36
6.3 Colecta de larvas de <i>Ae. aegypti</i> para los bioensayos de susceptibilidad, mecanismos de resistencia y detección de mutaciones de genes de resistencia	37

6.4	Bioensayos de susceptibilidad a temefos en larvas	39
6.5	Bioensayos de susceptibilidad a insecticidas en adultos de <i>Ae aegypti</i> ..	40
6.5.1	Análisis estadísticos de la susceptibilidad de adultos de <i>Ae. aegypti</i> a diversos grupos de insecticidas.....	43
6.6	Ensayos bioquímicos para determinar mecanismos de resistencia de <i>Ae. aegypti</i> a insecticidas.....	43
6.6.1	Ensayo bioquímico para evaluar acetilcolinesterasa (AChE)	44
6.6.2	Ensayo bioquímico para evaluar enzimas α y β esterasas.....	44
6.6.3	Ensayo bioquímico para evaluar esterasas que usan paranitrofenilacetato (pNPA)	45
6.6.4	Ensayo bioquímico para evaluar glutatión-s-transferasas (GSTs).....	45
6.6.5	Ensayo bioquímico para evaluar monooxigenasas citocromos P ⁴⁵⁰ ..	45
6.6.6	Ensayo bioquímico para evaluar proteínas totales.....	46
6.6.7	Análisis estadísticos de ensayos bioquímicos para determinar mecanismos de resistencia	46
6.7	Determinación de las mutaciones V1016I y F1534C del gen del canal de sodio dependiente de voltaje, como posibles mecanismos de resistencia basados en el sitio blanco de los insecticidas en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> en B.C.S.	47
6.7.1	Extracción de ADN para <i>Ae. aegypti</i>	47
6.7.2	Amplificación de los alelos Val1016 e Ile1016.....	48
6.7.3	Amplificación de los alelos Cis1534	49
6.7.4	Reacción de PCR.....	50
6.7.5	Lectura de resultados.....	51
6.7.6	Análisis de los datos.....	51
6.8	Bioensayos para evaluar cuatro sales sódicas como posibles atrayentes para hembras de <i>Ae. aegypti</i> en condiciones de laboratorio	52
6.8.1	Sales sódicas utilizadas para los bioensayos con <i>Ae. agypti</i>	52
6.8.2	Estudios electrofisiológicos	53
6.8.3	Estudios conductuales.....	54
6.8.4	Análisis estadístico de bioensayos con atrayentes orgánicos en laboratorio para captura de adultos de <i>Ae. aegypti</i>	56
7.	RESULTADOS	57
7.1	Fluctuación espacio temporal de <i>Ae. aegypti</i>	57
7.1.1	Abundancia de <i>Ae. aegypti</i> evaluada con indicadores entomológicos larvales. (ICP, IRP e IB)	57
7.1.2	Abundancia de <i>Ae. aegypti</i> utilizando indicadores entomológicos de ovitrampas (IOP e IDH)	63
7.1.3	Análisis interanual e intermensual de la abundancia de huevos de <i>Ae. aegypti</i>	64
7.1.4	Análisis interanual e intermensual de las variables ambientales.....	65

7.1.5	Análisis de correlación entre el número total de huevos <i>Ae. aegypti</i> y las variables ambientales	68
7.1.6.	Patrones intermensuales del número total de huevos de <i>Ae. aegypti</i> y las variables ambientales.....	71
7.2	Susceptibilidad en larvas de <i>Ae. aegypti</i> expuestas a temefos.....	71
7.3	Susceptibilidad de adultos de <i>Ae. aegypti</i> a insecticidas	74
7.3.1	Susceptibilidad a piretroides permetrina, deltametrina y, bifentrina....	74
7.3.2	Susceptibilidad de <i>Ae. aegypti</i> a organofosforados malatión y clorpirifós	78
7.3.1	Susceptibilidad de <i>Ae. aegypti</i> al carbamato propoxur.....	81
7.4	Identificación de mecanismos de resistencia de <i>Ae. aegypti</i> a insecticidas	82
7.4.1	Acetil colinesterasa (AChE).....	83
7.4.2	α y β esterasas	84
7.4.3	<i>p</i> -NPA esterasas	87
7.4.1	Monoxigenasas Citocromo P ⁴⁵⁰	88
7.4.2	Glutación-S-transferasas (GSTs)	91
7.1	Frecuencia de las mutaciones V1016I y F1534C en <i>Ae. aegypti</i> en B.C.S.	93
7.2	Respuesta de <i>Ae. aegypti</i> a cuatro sales sódicas como atrayentes para adultos en condiciones de laboratorio.....	95
7.2.1	Estudios electrofisiológicos	95
7.2.2	Estudios conductuales.....	97
8.	DISCUSIÓN	99
8.1	Fluctuación espacio-temporal de <i>Ae. aegypti</i>	99
8.1.1	Abundancia de <i>Ae. aegypti</i> utilizando indicadores entomológicos larvales (ICP, IRP e IB)	99
8.1.2	Abundancia de <i>Ae. aegypti</i> utilizando indicadores entomológicos de ovitrampas (IOP e IDH) y su fluctuación poblacional.....	101
8.2	Susceptibilidad de <i>Ae. aegypti</i> a insecticidas.....	104
8.3	Temefos en larvas	104
8.4	Susceptibilidad a piretroides (permetrina, deltametrina y bifentrina).....	105
8.5	Susceptibilidad a malatión y clorpirifós	107
8.6	Susceptibilidad a propoxur.....	108
8.7	Actividad enzimática	108
8.7.1	Acetilcolinesterasa.....	108
8.7.2	Esterasas α , β y <i>p</i> -NPA	109
8.7.3	Glutación -S - transferasas	110
8.7.4	Citocromo <i>p</i> ⁴⁵⁰	111
8.7.5	Frecuencia de las mutaciones V1016I Y F1534C.....	111

8.8	Sales sódicas como atrayentes de hembras de <i>Ae. aegyptii</i>	114
9.	CONCLUSIONES	118
9.1	Perspectivas.	119
10.	LITERATURA CITADA	121
11.	ANEXOS	150

Lista de figuras

Figura 1. Resistencia cruzada entre diferentes grupos toxicológicos de uso más frecuente (Brogdon y McAlliester, 1998).....	20
Figura 2. Principales mecanismos bioquímicos que confieren resistencia a las clases importantes de los insecticidas en los mosquitos (Nauen, 2007).	21
Figura 3. Localidades de estudio: La Paz, San José Cabo y Cabo San Lucas, ubicadas en el Sur de la Península de Baja California.	32
Figura 4. Ovitrampas utilizadas para evaluar la densidad de huevos de <i>Ae. aegypti</i> en el Sur de la Península de Baja California.....	35
Figura 5. Sistema High Throughput Screening System Showing (HITSS) (Grieco <i>et al.</i> , 2007).....	55
Figura 6. Valores anuales de los tres indicadores entomológicos (ICP, IRP e IB) previos a la intervención de control larvario de <i>Ae. aegypti</i> (a, c y e) y posterior a la intervención (b, d y f) en tres localidades (La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas, B.C.S.) durante el período de estudio 2011-2013.	58
Figura 7. Valores mensuales para el Índice de casas positivas a la frecuencia de larva de <i>Ae. aegypti</i> en las tres localidades del estudio (La Paz, San José del Cabo, Cabo San Lucas, B.C.S.) en el período 2011-2013.	60
Figura 8. Valores mensuales para el Índice de recipientes positivos (IRP) a la frecuencia de larvas de <i>Ae. aegypti</i> en las tres localidades del estudio (La Paz, San José del Cabo, Cabo San Lucas, B.C.S.) en el período 2011-2013.	61
Figura 9. Valores mensuales para el Índice de Breteau (IB) a la frecuencia de larvas de <i>Ae. aegypti</i> en las tres localidades del estudio (La Paz, San José del Cabo, Cabo San Lucas, B.C.S.) en el período 2011-2013.	62
Figura 10. Número de huevos de <i>Ae. aegypti</i> por año en La Paz (LAP) y Los Cabos (LC) para el periodo enero 2011 – diciembre 2013.	64
Figura 11. Número de huevos de <i>Ae. aegypti</i> por mes en: a) La Paz (LAP) y b) Los Cabos (LC) para el periodo de estudio enero 2011-diciembre 2013.....	66
Figura 12. Promedio de valores de variables ambientales en dos áreas: a) promedio de temperatura mínima en La Paz, b) promedio de temperatura mínima en Los Cabos, c) promedio de temperatura máxima en La Paz, d) promedio de temperatura máxima en Los Cabos, e) promedio de precipitación y valores de humedad relativa en La Paz, f) promedio de precipitación y valores de humedad relativa en Los Cabos, durante el periodo de estudio de enero 2011 a diciembre 2013.	70
Figura 13. Línea base calculada para las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas para el insecticida temefos, en B.C.S, México.	73
Figura 14. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad, en adultos de <i>Ae. aegypti</i> expuestos a botellas tratadas con el insecticida piretroide permetrina y, dosis discriminante de 15 µg/mL.....	75

Figura 15. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad, en adultos de <i>Ae. aegypti</i> expuestos a botellas tratadas con el insecticida piretroide deltametrina y, dosis discriminante de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	76
Figura 16. Susceptibilidad de <i>Ae. aegypti</i> de la cepa New Orleans a 15 mg bifentrina/mL en botellas de CDC.	77
Figura 17. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad en adultos de <i>Ae. aegypti</i> expuestos a botellas tratadas con el insecticida piretroide bifentrina y, dosis discriminante de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$	78
Figura 18. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad, en adultos de <i>Ae. aegypti</i> expuestos a botellas tratadas con el insecticida organofosforado malatión y, dosis discriminante de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	79
Figura 19. Curvas de regresión logística para la línea base de clorpirifós para <i>Ae. aegypti</i> de la cepa susceptible New Orleans.	80
Figura 20. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad, en adultos de <i>Ae. aegypti</i> expuestos a botellas tratadas con el insecticida organofosforado clorpirifós y, dosis discriminante de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$	81
Figura 21. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad, en adultos de <i>Ae. aegypti</i> expuestos en botellas tratadas con el insecticida propoxur y, dosis discriminante de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$	82
Figura 22. ANOVAS de los porcentajes de inhibición de la AChE por el insecticida propoxur en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México. Tukey <i>Post hoc</i> ($\alpha= 0.05$).	84
Figura 23. Porcentajes de inhibición de la AChE por el insecticida propoxur en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.	85
Figura 24. ANOVAS de la actividad de esterasas que utilizan α y β -naftil acetato en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México. Tukey <i>Post hoc</i> ($\alpha= 0.05$).	86
Figura 25. Actividad de esterasas que utilizan α -naftil acetato en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.....	87
Figura 26. Actividad de esterasas que utilizan β -naftil acetato en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.....	88
Figura 27. ANOVAS de la actividad de la enzima p-NPA evaluada en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México. Tukey <i>Post hoc</i> ($\alpha= 0.05$).	89
Figura 28. Actividad de pNPA en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.....	90

Figura 29. ANOVAS del contenido de las enzimas monoxigenasas citocromos P ⁴⁵⁰ evaluada en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México. Tukey <i>Post hoc</i> ($\alpha= 0.05$).....	91
Figura 30. Contenido de Citocromos P ⁴⁵⁰ en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.....	92
Figura 31. ANOVAS de la actividad de la enzima glutatión-S-transferasas (GSTs) evaluada en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México. Tukey <i>Post hoc</i> ($\alpha= 0.05$).....	93
Figura 32. Actividad de las GSTs en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.....	94
Figura 33. Respuesta electrofisiológica de <i>Ae. aegypti</i> a aire, 1-octen-3-ol y sales sódicas (citrato, fumarato, succinato, propionato) utilizando agua (H ₂ O) y alcohol (OH) como solventes.....	96
Figura 34. Respuesta electrofisiológica de <i>Ae. aegypti</i> a las concentraciones utilizadas con las sales sódicas (citrato, fumarato, succinato y propionato), el control positivo fue 1-octen-3-ol y como negativo aire. Tukey <i>Post hoc</i> ($\alpha= 0.05$).....	96
Figura 35. Amplitud de la señal en minivolt observada en antenas de <i>Ae. aegypti</i> a diferentes concentraciones de sales sódicas y solventes así como sus controles.....	97

Lista de tablas

Tabla I. Estudios sobre resistencia a diversos insecticidas en <i>Ae. aegypti</i> en el continente Americano.	25
Tabla II. Estudios de Susceptibilidad de <i>Ae. aegypti</i> a diversos insecticidas en México.	27
Tabla III. Insecticidas empleados para la determinación de susceptibilidad en larvas y adultos de <i>Ae. aegypti</i>	41
Tabla IV. Cantidades de reactivos para preparar la mezcla maestra para la reacción de PCR.	50
Tabla V. Condiciones del termociclador.	51
Tabla VI. Compuestos evaluados como atrayentes de alimentación en <i>Ae. aegypti</i>	53
Tabla VII. Indicadores Entomológicos de <i>Ae. aegypti</i> : número promedio de huevos (NMH), índice de ovitrampas positivas (IOP) e índice de huevos (IDH) y número de huevos colectados en ovitrampas en dos regiones de Baja California Sur, México	63
Tabla VIII. Resultados del análisis de varianza realizado a las variables ambientales entre años en La Paz (LAP) y Los Cabos (LC) para el periodo de estudio enero 2011- diciembre 2013.	67
Tabla IX. Valores del coeficiente de correlación calculado entre el número de huevos de <i>Ae. aegypti</i> y parámetros ambientales para La Paz (LAP) y Los Cabos (LC)	69
Tabla X. Concentración Letal media (CL ₅₀) calculada para el insecticida temefos en las poblaciones de campo y susceptible de <i>Ae. aegypti</i>	72
Tabla XI. Susceptibilidad a Temefos en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de las localidades: La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas de B.C.S., México.	73
Tabla XII. Resultados de las pruebas de susceptibilidad de acuerdo a la WHO (2013) de <i>Ae. aegypti</i> colectados en tres localidades: La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.	74
Tabla XIII. Línea base calculada para el insecticida bifentrina en <i>Ae. aegypti</i> , cepa susceptible New Orleans.	77
Tabla XIV. Línea base calculada para el insecticida clorpirifós en <i>Ae. aegypti</i> , cepa susceptible New Orleans.	80
Tabla XV. Media \pm desviación estándar de las pruebas bioquímicas de <i>Ae. aegypti</i> colectados en las localidades de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas, B.C.S., México.	83
Tabla XVI. Frecuencia del alelo V1016I y C1534 en poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de las localidades de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.	95
Tabla XVII. Resultados obtenidos en los estudios conductuales de la respuesta de <i>Ae. aegypti</i> a sales sódicas utilizando el sistema HITSS, mediante la prueba U-de Mann-Whitney.	98

1. INTRODUCCIÓN

Los mosquitos son insectos que ocupan una posición importante como transmisores de enfermedades de importancia económica y social alrededor del mundo, donde el hombre es de los más afectados (Reinert *et al.*, 2004; Manorenjitha, 2006). Se han descrito en el mundo aproximadamente 40 géneros y 3600 especies de la familia Culicidae (Toma *et al.*, 2000), entre las que destaca el género *Aedes*, en particular *Ae. albopictus* (Skuse) de origen asiático y *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762), de origen africano, esta última distribuida alrededor del mundo especialmente en países tropicales y subtropicales (Fernández, 2009).

En la actualidad se ha documentado la presencia de estos insectos en diversos países de América entre ellos México (Fernández, 2009), en donde las especies mencionadas son vectores de la fiebre amarilla y fiebre por dengue (Kettle, 1984; Harwood y James 1988; Pratt, 1993; Holick, 2002), además de la transmisión de la fiebre de chikungunya y más recientemente zika (Roth *et al.*, 2014) por *Ae. aegypti* (Sanabria *et al.*, 2009; Yanola *et al.*, 2011). Actualmente, la fiebre por dengue es considerada de mayor trascendencia, en la salud pública de diversos países (López *et al.*, 2008) por ser una enfermedad aguda infecciosa, de etiología viral generada por un arbovirus de la familia *Flaviviridae* y del género *Flavivirus dengue* (WHO, 2009), con cinco serotipos estrechamente relacionados: Den-1, Den-2, Den-3, Den-4 y Den-5 (Leitmeyer, 1999; Normile, 2013). La infección en humanos surge por la picadura de hembras de *Ae. aegypti* infectadas con dicho virus, que con base en el tipo de serotipo, puede manifestarse solamente como fiebre por dengue (FD), verse acompañado por hemorragias (FHD) o presentarse en su forma más grave como síndrome de choque por dengue (SCD) (Chiparelli y Schelotto, 2002).

Debido a su alta morbilidad y rápida expansión, la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2012), ha estimado alrededor de 50 millones de infecciones debidas a dengue anualmente en el mundo, y se calcula que 2,500 millones de

personas se encuentran en riesgo de ser infectadas por esta enfermedad (WHO, 2009). Con base en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue, 2014), en el año 2013 se registraron un total de 2.2 millones de casos en el Continente Americano, de los cuales se generaron 1, 276 muertes y 37, 475 se consideraron graves (OPS y OMS, 2014). En la semana epidemiológica número 46 del 2014, solo después de Colombia, México fue el segundo país con más número de casos registrados de FD (OPS y WHO, 2014) al presentar 21, 769 casos, de los cuales 15, 818 fueron clasificados como FD, 5, 951 casos de FHD y 27 defunciones por este padecimiento en diferentes estados, ocupando el primer lugar Baja California Sur, con 3 887 casos de FD, 85, casos de FHD y una defunción.

Si bien se han realizado esfuerzos para prevenir y controlar el dengue, a través de campañas para disminuir sus abundancias dentro de los hogares y sus alrededores (Lacey y Lacey, 1990; Rodríguez *et al.*, 2002; Kyle y Harris 2008; Bobadilla, 2010; NOM-032-SSA-2010), no ha sido suficiente, ya que la transmisión del virus dengue (DENV) se ha presentado con periodicidad (WHO, 2009), lo que sugiere que el vector se ha adaptado a diferentes condiciones ambientales, al estar asociado con casas habitación, en donde la higiene es fundamental así como el estilo de vida de cada familia, factores que afectan directamente la reproducción y la supervivencia de las larvas en las viviendas (Bisset, 2006; WHO, 2009).

Al respecto varios autores consideran que *Ae. aegypti* cuenta con varios sitios favorables para la crianza, reproducción y alimento para los estadios inmaduros, como son: depósitos de agua para consumo humano, pequeños embalses artificiales, bebederos de animales, jarrones, floreros, tambos, pilas, tanques, cubetas, neumáticos, entre otros, así también, las hembras disponen de la sangre necesaria con los habitantes de las casas afectadas (Tun-Lin *et al.*, 1996; Thirión, 2002; Focks, 2003; Morrison *et al.*, 2008; Fernández, 2009). Por lo tanto, para disminuir la presencia de este mosquito en los hogares, es necesario

modificar los hábitos de las personas para eliminar los criaderos potenciales en las viviendas, particularmente por la ausencia de vacunas comercialmente disponibles y productos químicos ambientalmente amigables para abatir las poblaciones de los mosquitos (CDC, 2013).

Dada la envergadura del problema, el control de *Ae. aegypti* se basa en el manejo integrado de vectores (MIV), en donde es necesaria la colaboración de la comunidad local y otros sectores públicos y privados, a través de la movilización social, gestión ambiental, vigilancia epidemiológica de la enfermedad y vigilancia entomológica del mosquito, así como varias estrategias de control químico y biológico del mismo, permitan mejorar la eficacia costo-efectividad, el nivel de impacto ambiental y sostenibilidad para el control de *Ae. aegypti* (Focks, 2003; WHO, 2009; Tapia-Conyer *et al.*, 2012). El MIV incluye también la vigilancia entomológica, una herramienta que permite determinar los cambios en la distribución geográfica de esta especie, sus abundancias y fluctuaciones poblacionales, a fin de contar con el conocimiento necesario para implementar las medidas de manejo más eficientes (Ibáñez y Gómez, 1995), en donde es necesario considerar también las condiciones ambientales que determinan la fluctuación poblacional de este insecto (Nelson, 1986; Stein *et al.*, 2005).

Entre los parámetros ambientales determinantes para la reproducción de *Ae. aegypti* se encuentra la temperatura al influir de manera directa sobre la biología del vector. Los valores óptimos para su reproducción van de 25 °C a 30 °C y a 40 °C estos pueden morir por deshidratación. Los valores de humedad relativa más apropiados pueden variar de 70 a 75%, sin embargo, pueden tener un buen desempeño con valores más elevados (Christophers, 1960; Gómez-Dantés y Rodríguez 1994; Stein *et al.*, 2005; Eiras y Carvallio, 2009). Otro factor que presenta una relación directa con la distribución y abundancia de este mosquito es la precipitación, ya que favorece a las hembras con una mayor disponibilidad de recipientes con agua para depositar sus huevos y el subsecuente desarrollo de su progenie (Gómez-Dantés y Rodríguez, 1994).

Con referencia al manejo dado el éxito reproductivo de algunas plagas, se utilizan varios insecticidas de diferentes grupos toxicológicos para su control, (Georghiu, 1983; Brogdon y McAllister 1998; Nauen, 2007). En el caso de *Ae. aegypti* se utilizan a nivel mundial piretroides (permetrina, resmetrina, y fenotrina), organofosforados (Temefos y clorpirifós), carbamatos (propoxur y carbosulfán) y, en algunos países, se usan reguladores de crecimiento de insectos como el metopreno, una hormona análogo-estructural que presenta un estrecho parecido con las hormonas juveniles, que actúa sobre la muda, permitiendo que la larva aumente de tamaño sin evolucionar a crisálida (Sawby *et al.*, 1992; Ritchie *et al.*, 1997), sin embargo, es necesario aplicar este producto directamente en los criaderos para lograr tal efectividad (Curtis, 1990; Gubler, 1989; WHO, 1982; Fernández, 2009). Como respuesta a la presión ambiental ejercida por los insecticidas usados para el manejo de estos insectos (Nkya *et al.*, 2014), se han desarrollado varios mecanismos de resistencia a los insecticidas en los insectos, entre ellos se consideran los más importantes, la alteración en el sitio blanco y la resistencia metabólica que involucra un incremento de la concentración de enzimas (α y β esterasas, oxidasas de función múltiple, glutatión-s-transferasas) los cuales les permiten bloquear la actividad tóxica de estos productos (Georghiou, 1965; Brogdon y McAllister, 1998; Bisset, 2001; Flores *et al.*, 2005; Nauen, 2007). Con base en lo anterior, es importante identificar los mecanismos de resistencia activados en estos mosquitos para realizar programas de manejo más efectivos en cada región afectada. Por tal situación se requieren altos costos operativos, por lo que con este escenario, las herramientas de control ecológicas son una prioridad (Udaiyan *et al.*, 2015). Entre ellas se encuentra el conocer las preferencias que pueden tener estos insectos por sustancias químicas emanadas por sus hospederos o las presentes en los sitios de oviposición. Dichas sustancias pueden tener dos atributos “atraer y matar” exitosamente a las hembras de *Ae. aegypti* ya sean maduras (Allan y Kline 1998; Ganesan *et al.*, 2006; Santana *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2010) o recién emergidas (Acree *et al.*, 1968; Smith *et al.*, 1970; Eiras y Jepson 1991; Geier *et al.*, 1996; Geier *et al.*, 1999a). Entre los atrayentes

alimentos identificados para esta especie se encuentran el CO₂, que es liberado durante el proceso respiratorio de sus hospederos (Gillies y Wilkes, 1968), sustancias provenientes de la transpiración de la piel (Gillies, 1980; Geier *et al.*, 1996; Takken y Knols, 1999; Smallegange *et al.*, 2005), el ácido láctico, amonio y ácido caprónico (Geier *et al.*, 1999b; Chakraborty *et al.*, 2010) y ácidos carboxílicos (Geier *et al.*, 1996; Bosch *et al.*, 2000; Smallegange *et al.*, 2005). Se ha demostrado también que existen compuestos volátiles que pueden estimular la picadura de estos insectos, por lo que dichos atrayentes ocasionalmente mezclados con insecticidas se han utilizado en trampas para el control de *Ae. aegypti* y otras especies de mosquitos (Torres y Rodríguez, 2003; Alarcón *et al.*, 2014). Por tal razón, varios científicos se dedican a la identificación de compuestos químicos que puedan ser utilizados como atrayentes, así como al desarrollo de nuevos productos basados en semioquímicos para el monitoreo y control de mosquitos (Gillies y Wilkes, 1968; Takken, 1991, 1996; Geier *et al.*, 1999; Bosch *et al.*, 2000; Torres y Rodríguez, 2003; Smallegange *et al.*, 2005; Chakraborty *et al.*, 2010).

En Baja California Sur, la prevención del dengue se realiza mediante el MIV, sin embargo, aún es poco el conocimiento disponible sobre la autoecología de *Ae. aegypti*, así como la susceptibilidad a varios insecticidas utilizados para su manejo en dicha entidad, que son algunos de los objetivos considerados en el presente trabajo.

2. ANTECEDENTES

El interés científico sobre los mosquitos del género *Aedes*, comenzó a finales del siglo XIX, debido a su papel como vectores en la transmisión de la fiebre amarilla (Harbach y Kitching 1998), cuyo centro de origen según Harwood y James (1988) se encuentra en el cinturón tropical de África, de donde se dispersó a diversas partes del mundo. Este género agrupa dos especies relacionadas con la transmisión de la fiebre del dengue al humano *Ae. albopictus* (Skuse), especie silvestre exótica de origen asiático y *Ae. aegypti*, una especie sinantrópica responsable del 99% de casos de dengue en el mundo.

2.1 Descripción de la especie

2.1.1 Taxonomía

En la actualidad *Ae. aegypti* se encuentra ampliamente distribuida en el Continente Americano (Ibáñez *et al.*, 1995; Fernández, 2009; García *et al.*, 2011).

La clasificación taxonómica de esta especie de acuerdo con Bates (1970), es la siguiente:

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Diptera

Familia: Culicidae

Subfamilia: Culicinae

Género: *Aedes* (Meigen, 1818)

Subgénero: *Stegomyia* (Theobald, 1901)

Especie: *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)

2.1.2 Ciclo de vida

Son insectos holometábolos que presentan dentro de su ciclo de vida huevos, cuatro estadios larvales y un estadio pupal e imago (Bates, 1970; Kettle, 1993). La hembra una vez que ha madurado sexualmente coloca entre 20 y 120 huevos en contenedores con agua, miden aproximadamente 1.0 mm, el desarrollo embrionario transcurre en las primeras 48 horas, siempre y cuando el huevo tenga la humedad requerida, aunque bajo condiciones no propicias, el embrión puede sobrevivir varios meses al entrar en diapausa, una vez que entra en contacto con el agua, se reinicia su desarrollo hasta formar el estadio de larva (Nelson, 1986).

Las formas larvales para sobrevivir dependen de la temperatura, la disponibilidad de alimento y la densidad en que se encuentran en los criaderos (Nelson, 1986). En condiciones óptimas, se requieren entre siete y catorce días, se alimentan de protozoarios de vida libre y microalgas, que se encuentran disponibles en la columna de agua y las paredes de los criaderos. El tiempo requerido desde la eclosión de los huevos hasta pupa puede ser de 7 a 14 días (Nelson, 1986; Eldridge, 2005). La pupa se forma después del cuarto estadio, es móvil y utiliza las sedas caudales para flotar y nadar; presenta reacciones inmediatas a estímulos como vibraciones y cambios en la intensidad de la luz, cuando ésta es intensa se mantienen en el fondo para protegerse. El estadio de pupa dura aproximadamente de 24 a 48 horas, de ahí emergen los adultos con un éxito alrededor del 88% (Méndez *et al.*, 1996).

La proporción sexual en adultos de *Ae. aegypti* es de 1:1, se distinguen de otros culícidos por la terminación delgada de su abdomen y por la ausencia de sedas espiraculares, la probocis de las hembras está representada por un pico adaptado para alimentarse de sangre de cualquier vertebrado, aunque con marcada preferencia por la sangre humana. Si bien dicho alimento es necesario para la maduración de los ovocitos y viabilidad de los huevos, también pueden alimentarse del néctar de flores y frutos para la obtención de carbohidratos como complemento, que en los machos constituye la dieta principal al no ser

hematófagos. Se diferencian de las hembras por ser más pequeños, con antenas plumosas y palpos maxilares más largos. Después de emergidos, ambos sexos se posan en lugares secos hasta endurecer su exoesqueleto e iniciar su primer vuelo nupcial para la fecundación, localizar el alimento y sitios de oviposición, una actividad que realizan preferencialmente por la tarde (Nelson, 1986; Martínez 1987). Se ha demostrado que pueden recorrer desde distancias cortas (8 m), hasta distancias por arriba de 100 m, lo que favorece su dispersión (Nelson, 1986; Torres y Rodríguez 2003)

Es importante indicar que el tamaño de la hembra (por lo general de 5 mm), está relacionado con su capacidad para transmitir el virus dengue (DENV), ya que al ser más grandes ingerirán mayor volumen de sangre por picadura y su longevidad será mayor, lo que favorece la transmisión del patógeno (Nelson, 1986, Fernández, 2009).

2.1.3 Autoecología de *Ae. aegypti*

Este mosquito se localiza entre la franja geográfica del paralelo 35° Latitud Norte y 35° Latitud Sur, es considerada una especie de ambientes tropicales y subtropicales (Harwood y James, 1988) y se ha observado en altitudes superiores a los 2000 msnm (Nelson, 1986; Ibáñez y Gómez-Dantés, 1995; Com. Pers. Dr. J. F. Méndez, Dic. 2011).

Por tener la capacidad de colonizar distintos tipos de contenedores naturales de agua para su supervivencia y reproducción, *Ae. aegypti* es considerada una especie sinantrópica al encontrarse en distintos objetos y sitios como conchas de moluscos, cáscaras de frutos, huecos de árboles, y recipientes de uso doméstico como: jarrones, latas, floreros, pilas, tanques, cubetas, juguetes, corcholatas, canales de techo, además de otros (Fernández, 1999), aunque tienen una marcada preferencia por recipientes de color oscuro y de boca ancha ubicados sobre el suelo y con poca exposición al sol, como las llantas de vehículos que son eliminadas y/o almacenadas, las cuales son un reservorio ideal

para estos mosquitos (Carrada *et al.*, 1984; Thiri3n, 2002; Morrison *et al.*, 2004; Fern3ndez, 2009). Por lo anterior, el manejo de estos recipientes ha contribuido en gran medida a favorecer la dispersi3n de *Ae. aegypti* a otras localidades, en donde el viento juega un papel importante, aunque al encontrar lo necesario en el ambiente dom3stico, no requieren desplazarse grandes distancias lo que representa un desaf3o para los programas de control y vigilancia epidemiol3gica del presente siglo (OMS, 1997; Rojas y Schmeda, 1992; Schmeda y Arias 1992; Fern3ndez, 2009).

Se ha demostrado que la abundancia de esta especie est3 relacionada con diferentes factores ambientales como temperatura, precipitaci3n y humedad relativa (Duncombe *et al.*, 2013; Dhimal *et al.*, 2015), y por estar asociada con el humano, tambi3n depende de la disponibilidad de recipientes con agua as3 como de las condiciones de la vivienda (Espinoza, 2001). Con respecto a la temperatura, se ha estimado que los l3mites de supervivencia van de 10 a 35 3C, con un valor 3ptimo promedio de 25 3C a 30 3C (Brady *et al.*, 2013), el ciclo completo requiere de 7.2 ± 0.2 d3as a 35 3C y, 39.7 ± 2.3 d3as a 15 3C, con una m3xima supervivencia de adultos (88-93%) entre 20 3C y 30 3C (Tun-Lin *et al.*, 2000) y con una mortalidad total arriba de 40 3C, especialmente las formas inmaduras (Christophers, 1960; Carrington *et al.*, 2013). Al respecto algunos autores mencionan que la temperatura influye en la reducci3n de los ciclos gonotr3ficos y aceleran la eclosi3n de los huevos de acuerdo con su valor, las densidades m3s altas ocurren en valores por arriba de 17.5 3C (Scott *et al.*, 1993; Gubler y Trent 1994; Barrera *et al.*, 2011), asimismo a temperaturas entre 13 3C y 15 3C *Ae. aegypti* mantiene la actividad de oviposici3n (Miceli *et al.*, 2006). Azil *et al.* (2010), sugieren que la temperatura m3nima y temperatura promedio es el factor m3s importante que se asocia con la abundancia del vector en el corto y largo plazo, mientras que la humedad relativa tiene un efecto significativo en el an3lisis de la abundancia en corto plazo y tambi3n influye seg3n Lagrotta *et al.* (2008), en la fertilidad y en la tasa de eclosi3n de los huevos, con un incremento cercano al 80% (Alto y Juliano, 2001).

Debido a que el agua es indispensable para el desarrollo de los primeros estadios, *Ae. aegypti* puede aprovechar cualquier sitio en donde se almacene este líquido, lo que le ha permitido establecerse aún en ambientes áridos (Dibo *et al.*, 2008). En este sentido la precipitación pluvial es muy importante ya que al almacenarse en diferentes contenedores se ofertan diversos nichos para esta actividad (Kolivras, 2010). Por otra parte Sota y Mogi (1992), señalan que las lluvias estimulan la eclosión de los huevos, diversos autores han reportado una correlación positiva entre la precipitación y la abundancia del vector que a su vez influye sobre la casuística del dengue (Moore *et al.*, 1978; Stein *et al.*, 2005, Rubio-Palis *et al.*, 2011), lo que muestra que la precipitación es un factor importante para la presencia del insecto y el riesgo epidemiológico de la enfermedad. Se señala también que la incidencia del dengue se correlaciona con alguna variable ambiental como temperatura, humedad relativa y precipitación, ésta última referida como un agente de cambio climático importante que afecta el patrón de distribución temporal y geográfica de la incidencia de casos de dengue (Kolivras, 2010), mientras que la temperatura parece jugar un papel crítico en la intensidad del brote (Arcari *et al.*, 2007).

2.2 Análisis de los métodos para estimar la densidad y abundancia del mosquito *Ae. aegypti* y su control

Desde un enfoque de manejo integrado para combatir el crecimiento poblacional de una especie plaga, es necesario conocer la dinámica poblacional y los parámetros ambientales que la determinan, en las áreas afectadas, a lo largo de un ciclo anual o en periodos más largos para en su caso predecir con mayor certeza, las abundancias relativas que pudieran presentarse, de esta forma se pueden aplicar medidas de manejo preventivas y así reducir los posibles casos de dengue (Sheppard, 1969; Gould, 1970; Richards *et al.*, 2012).

En este sentido se han dedicado importantes esfuerzos a nivel mundial para conocer la ecología de distintas especies de mosquitos entre ellos *Ae. aegypti* y

áreas de riesgo para la transmisión del virus DENV (Chan *et al.*, 1971; Fernández e Iannacone, 2005; Lenhart *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2006). Por lo anterior, la vigilancia entomológica constituye una herramienta fundamental, que permite estimar la intensidad en la que deben aplicarse las medidas de control vectorial hacia el mosquito y la enfermedad (Ibañez y Gómez, 1995; Ooi *et al.*, 2006; Eiras y Carvallo, 2009). Para dichas evaluaciones se han utilizado índices de infestación basados en diferentes estadios del ciclo de vida de estos insectos. Sin embargo, a pesar de que sólo la hembra adulta del mosquito *Ae. aegypti* es la que está directamente involucrada en la transmisión del dengue, la dificultad práctica de estimar la densidad poblacional de adultos de esta especie, radica principalmente en su observación y recolección en campo, por lo que dentro de la vigilancia entomológica se consideran también las formas inmaduras, para lo cual se utilizan larvi-trampas y/u ovi-trampas las cuales son sensibles aún en casos de baja infestación de los mosquitos, aunque su uso es cuestionado debido a que los huevos o las larvas presentes en ellas pueden pertenecer a distintas hembras y no reflejan con certeza la abundancia poblacional (Ibañez y Gómez, 1995).

No obstante varios autores consideran las ovitrampas como uno de los métodos más prácticos, eficientes y económicos para el monitoreo poblacional de este vector (Facchinelli *et al.*, 2007). Se utilizan desde 1965 para determinar la distribución, la fluctuación estacional y como una estrategia para definir presencia-ausencia. Asimismo, es especialmente útil para evaluar la eficacia de la aplicación de insecticidas y para la detección temprana de posibles re-infestaciones (Ibañez y Gómez 1995). De acuerdo con lo anterior, Castro (1998) utilizó dos índices entomológicos basados en la colecta por ovitrampas: índice de positividad de ovitrampas (IOP) que se refiere al porcentaje de trampas positivas a la presencia de huevos del total colocadas, e índice de densidad de huevos (IDH), el cual proporciona el número de huevos colectados en las ovitrampas entre el total de ovitrampas positivas. La ventaja de este método es que permite obtener dos indicadores de frecuencia de ocurrencia, al ser los huevos fácilmente identificables, es rápido y requiere una mínima capacitación para su identificación.

Otra técnica de muestreo utilizado para estimar la densidad y la abundancia de *Ae. aegypti*, es utilizando trampas pegajosas o con atrayentes, estas favorecen la captura y cuenta directa del número real de hembras que visitan la trampa, de esta manera la especie puede ser identificada fácilmente en sitios donde existen otras especies de mosquitos (Ritchie *et al.*, 2003). Sin embargo por su costo es poco usado en países con escasos recursos económicos (Ibañez y Gómez, 1995).

Por esta razón, en las regiones con problemas de dengue, el monitoreo de *Ae. aegypti*, se basa principalmente en las formas juveniles (huevo, larva y pupa), que por su condición de vida acuática pueden ser ubicados fácilmente en los cuerpos de agua de los alrededores e interior de las viviendas, por el personal técnico disponible (Ibañez y Gómez, 1995).

Muchos programas de control del dengue en el mundo usan los índices larvarios como indicadores de las densidades poblaciones de *Ae. aegypti*, para dirigir y focalizar espacial y temporalmente las acciones de control del vector (Tun-Lin *et al.*, 1996; Focks, 2003; WHO 2009). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2009), existen al menos cinco índices entomológicos de uso generalizado para la estimación de abundancia de *Ae. aegypti*, con base en la presencia de larvas y de pupas, en donde la unidad básica de muestreo son las viviendas, entre ellos los tres más usados son: el índice de casas positivas (ICP) que nos estima el porcentaje de casas infestadas de larvas en el universo del muestreo, el índice de recipiente (IR), que proporciona el porcentaje de los contenedores con presencia de larvas o pupas y el índice de Breteau (IB) que estima el número de recipientes positivos a larvas en 100 casas estudiadas. Dichos índices son complementarios entre si y se obtienen con el mismo esfuerzo operativo (Tun-Lin *et al.*, 1996; Espinoza *et al.*, 2001, Focks, 2003; Abdalmagid y Alhusein, 2008). Sin embargo, estos índices frecuentemente son difíciles de correlacionar y por ello poco confiables para evaluar el riesgo de transmisión del dengue (Ibañez y Gómez, 1995; Sánchez *et al.*, 2006). Por consiguiente el desarrollo de nuevas metodologías para coleccionar particularmente hembras de *Ae.*

aegypti y la definición de nuevos indicadores más efectivos para la vigilancia, seguimiento y evaluación entomológica son una prioridad de investigación de la Organización Mundial de la Salud y una valiosa contribución en la prevención de esta enfermedad (Tun-Lin *et al.*, 1996; Scott y Morrison, 2003; Williams *et al.*, 2007), con tales índices se podrían evaluar las fluctuaciones temporales de las poblaciones larvarias y adultas, lo que sería de mucha utilidad para la implementación de un cronograma de aplicación de agentes de control biológico y químico (Berti *et al.*, 1993; Berti y Zimmerman, 1998; Berti *et al.*, 2010).

2.3 Estrategias de manejo de *Ae. aegypti*

Existen diversos estudios taxonómicos realizados con *Ae. aegypti* (Carpenter y LaCasse, 1955; Vargas, 1956; Bohart y Washino, 1978; Ibáñez y Martínez, 1994; Zapata-Peniche *et al.*, 2007), biológicos (Bates, 1970; Nelson, 1986), etológicos (Gadelha, 1985; Kettle, 1993), ecológicos (Barrera *et al.*, 1981; Herrera, 1999; Mazine *et al.*, 1996; Stein *et al.*, 2005), con énfasis en la dinámica poblacional en larvas y adultos (Micieli *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2006; Azil *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2010), toxicológicos usando diversos insecticidas (Georghiou *et al.*, 1983; Brown 1986; WHO, 1992; Hemingway y Ranson, 2002; Flores *et al.*, 2006; Aponte *et al.*, 2013), de variabilidad genética de este mosquito (Leiva y Cáceres, 2004; Nene *et al.*, 2007), análisis genómico de genes involucrados en la detoxificación proteómica e interacción huésped-patógeno, como una estrategia de combate (Rodríguez-Cruz, 2002; Strode *et al.*, 2007).

Estos estudios se han utilizado para establecer programas de manejo de forma integral, lo que constituyen hoy en día una de las alternativas más útiles para evitar la propagación del dengue, además del desarrollo de vacunas potencialmente eficaces contra los serotipos víricos Den-1 a Den-5 (López *et al.*, 2008; Normile, 2013), que ya han sido probadas en niños y con potencial para ser aplicadas a la comunidad (Villar *et al.*, 2015).

Por lo anterior el control de *Ae. aegypti*, se basa en los programas de manejo integrado de vectores (MIV), establecidos por las instituciones de salud a nivel mundial, en colaboración con la comunidad local y otros sectores públicos y privados, lo que incluye el control químico y biológico de este insecto, así como estrategias que tienen como objetivo combatir y controlar altas densidades poblacionales de este mosquito, a través de la movilización social, gestión ambiental, vigilancia epidemiológica de la enfermedad, vigilancia entomológica del vector, mejorar la eficacia de las acciones y reducir el costo de éstas (Brown, 1986; Lacey y Lacey, 1990; Focks, 2003; Stephenson, 2005; Kyle y Harris, 2008; WHO, 2009; Bobadilla, 2010; NOM-032-SSA2-2010; Tapia-Conyer *et al.*, 2012).

2.3.1 Combate químico de *Ae. aegypti*

Entre las estrategias más utilizadas a nivel mundial para el control de vectores se encuentra el control químico y los insecticidas de mayor uso pertenecen a seis grupos toxicológicos: organofosforados, organoclorados, carbamatos, piretroides, reguladores de crecimiento e insecticidas microbianos (Hemingway y Ranson, 2000). Entre los piretroides están permetrina, resmetrina, y fenotrina, con organofosforados, Temefos y clorpirifós, propoxur y carbosulfán como carbamatos (Curtis, 1989; Gubler, 1989; OMS, 1997; Fernández, 2009), entre los reguladores de crecimiento de insectos llamados IGR (por sus siglas en inglés), los más utilizados son el metopreno (hormona análoga estructural) y el piriproxifen, los cuales presentan un estrecho parecido con las hormonas juveniles, al actuar sobre la muda que aunque permite el crecimiento de la larva, impide la formación de la crisálida (Sawby *et al.*, 1992; Ritchie *et al.*, 1997). Como insecticidas microbianos se tienen a *Bacillus thuringiensis israelensis* y *Bacillus sphaericus*, aunque su uso no ha sido muy eficaz debido a los elevados costos de adquisición particularmente por los países en vías de desarrollo (Cabezas, 2005; Ayesa y Scott, 2006).

2.3.2 Uso de atrayentes como una alternativa de manejo para *Ae. aegypti*

Se han realizado varios estudios encaminados al uso de sustancias atrayentes para coleccionar y estimar abundancias poblacionales relativas de diferentes especies de mosquitos, aprovechando su capacidad para detectar a sus hospederos a través del olor (Torres y Rodríguez, 2003). Esta cualidad está definida por el ambiente y el estado fisiológico de los mosquitos, con base en señales químicas que emanan de los posibles sitios para la reproducción, oviposición y alimentación de las hembras (Takken, 1991; Cork y Park, 1996). Dichas señales se han utilizado ampliamente en contenedores para atrapar de forma selectiva distintas especies de mosquitos, lo que permite evaluar de forma más objetiva sus densidades poblacionales en áreas afectadas (Davis y Sokolove, 1975).

Para atraer a las hembras preparadas para ovipositar se han usado infusiones de hierbas y hongos (Reiter y Nathan, 2001; Santana *et al.*, 2006), y extractos de huevos de *Ae. aegypti* (Allan y Kline, 1998; Ganesan *et al.*, 2006). En Virginia y en Nuevo México se utilizaron infusiones con estiércol de vaca y conejo, así como hierba y paja de trigo, resultando más atractivas las infusiones de hierbas y paja de trigo, que los excrementos de vaca y conejo para las especies *Culex pipiens* y *C. restuans* (Diptera: Culicidae) (Jackson, 2004). Santos *et al.* (2010) en Brasil, utilizaron extractos de hojas de marañón (*Anacardium occidentale*), cáscaras de papa (*Solanum tuberosum*) y pasto de Guinea (*Panicum máximum*), encontraron que *Ae. aegypti*, depositó un mayor número de huevos en las ovitrampas con dichos atrayentes que en el testigo. En Cuba, Díaz *et al.* (2012) evaluaron la actividad larvicida de los extractos etanólicos y fracciones activas de diferentes órganos vegetales, del árbol cabo de hacha (*Trichilia hirta*) y cojón de fraile (*Tabernaemontana cymosa*), según los resultados, se consideró como promisorio el extracto de semillas de *T. cymosa* para la obtención de metabolitos secundarios con actividad larvicida.

En México, Manrique-Saide *et al.* (2004), en Mérida, Yucatán, utilizando ovitrampas cebadas con infusiones de pasto Bermuda (*Cynodon dactylon*), a diferentes concentraciones (10, 25, 50 y 100%) y diferente temporalidad (3, 7, 12, 18 y 25 días), ellos no encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de las infusiones, y la utilización de agua en las ovitrampas. Sin embargo, observaron que la oviposición aumentó o disminuyó de acuerdo con la concentración o la edad de la infusión.

En lo que respecta a la utilización de atrayentes alimenticios se han utilizado ácidos grasos como el ácido láctico que se encuentra en la piel humana, el cual mezclado con dióxido de carbono muestra mayor efectividad (Acree *et al.*, 1968; Smith *et al.*, 1970; Eiras y Jepson, 1991; Geier *et al.*, 1996; Geier *et al.*, 1999a), al ser un componente importante de la respiración humana (Gillies y Wilkes, 1968; Gillies, 1980; Geier *et al.*, 1996; Takken y Knols, 1999; Smallegange *et al.*, 2005). También se ha usado amonio mezclado con ácido L-láctico dando buenos resultados (Geier *et al.*, 1999b), sin embargo, cuando se combina con ácidos carboxílicos, parecen ser más atrayentes para hembras *Ae. aegypti* (Geier *et al.*, 1996; Bosch *et al.*, 2000; Smallegange *et al.*, 2005).

Algunos autores han referido como un atrayente al alcohol 1-octen-3-ol, el cual es comúnmente liberado por los vertebrados, este combinado con dióxido de carbono (CO₂) ha dado resultados favorables, debido a que existe una neurona receptora contenida dentro los palpos maxilares de mosquitos adultos, que responde selectivamente a este compuesto (Takken y Kline, 1989; Kline *et al.*, 1990; 1991a, 1991b; Takken *et al.*, 1997; Takken y Knols, 1999; Grant y Dickens, 2011).

2.3.3 Combate biológico de *Ae. aegypti*

Los métodos biológicos de control del mosquito consisten básicamente en el uso de agentes entomopatógenos que son organismos que infectan al insecto y se reproducen en él hasta causarle la muerte. Los entomopatógenos se clasifican

en cinco grandes grupos: bacterias, hongos, nemátodos, protozoarios y virus. Entre los virus que afectan a *Ae. aegypti* se encuentra el de la poliedrosis citoplásmica, los densovirus y los virus iridiscentes de invertebrados. Sin embargo en la actualidad no existen formulaciones comerciales para la utilización en campo de ninguno de estos virus (Vázquez *et al.*, 2008). Respecto a las bacterias que más se emplean para el control de los mosquitos son *Bacillus thuringiensis* serovariedad israelensis (nombre común: Bti) y *Bacillus sphaericus*, que reducen las poblaciones de mosquitos (WHO, 1982; Fernández, 2009).

También se han usado algunos enemigos naturales (depredadores) de *Ae. aegypti*, entre ellos destacan algunas especies de invertebrados como *Toxorhynchites* (un género de mosquitos), algunos peces larvívoros entre los más usados bajo condiciones de laboratorio se encuentra, *Gambusia* y *Poecilia reticulata*, ranas y patos que se alimentan de los estadios inmaduros del mosquito, sin embargo, aún no se usan en programas de control por su complejo manejo en las casas habitación (WHO, 1982; Costero *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000; Duque *et al.*, 2003; Kay y Nam, 2005).

2.3.4 Manejo cultural para la disminución poblacional de *Ae. aegypti*

Es una práctica que integra diferentes métodos de control poblacional del vector en donde participa la comunidad afectada, es fundamental al incluir estrategias capaces de modificar prácticas y comportamientos humanos, que propician la proliferación y el mantenimiento de criaderos potenciales de *Ae. aegypti*, ya que hasta el momento ha sido imposible acabar con los criaderos (Basso, 2010). Entre las prácticas culturales están el mantenimiento de patio limpio y cuidado del agua almacenada, (Tapia-Conyer *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a que el hábitat de este mosquito es principalmente intra y peridomicilio y a que la higiene depende del estilo de vida de cada familia, por seguridad, se siguen utilizando insecticidas para mantener bajo control las poblaciones de este

mosquito, como el larvicida Temefos al 1 y 5% y la permetrina para los adultos junto con el sinergista butóxido de piperonilo.

2.4 Mecanismos de resistencia en *Ae. aegypti* hacia el combate químico

Considerando que *Ae. aegypti* tiene una distribución cosmopolita en donde representa un riesgo para la salud, se han establecido programas de control en diversos países, entre ellos el uso intensivo de insecticidas (larvicidas y adulticidas) que se aplican de forma indiscriminada no solo hacia los mosquitos, sino también a otros insectos asociados con casas habitación como cucarachas, hormigas, termitas, ciempiés y escorpiones, mediante el uso de aerosoles, lo que en consecuencia ha generado resistencia en estos artrópodos a los insecticidas (Harris *et al.*, 2010).

El término resistencia a insecticidas, se refiere a la capacidad adquirida por una población de insectos para tolerar dosis de un tóxico que sería letal para la mayoría de los individuos de una población (OMS, 1957). La resistencia marca un cambio genético en respuesta a la selección por tóxicos, es decir es una característica heredable, cuya frecuencia se incrementa en la población como un resultado directo a los efectos selectivos de un insecticida (Georghiou, 1965).

El primer dato formal sobre fenómenos de resistencia en insectos fue proporcionado por Melander (1914), al no encontrar resultados positivos del sulfuro de calcio para el combate del insecto *Aspidiotus perniciosus*. A partir de entonces se han reportado muchos casos similares, donde cualquier organismo puede generar resistencia a infinidad de plaguicidas bajo condiciones adecuadas (Georghiou, 1971). De acuerdo con varios autores, la resistencia a los insecticidas deriva de factores multidimensionales que dependen de la bioquímica, fisiología, genética y ecología de las plagas lo cual varía con cada especie, población y localidad (Denholm *et al.*, 2002; Hemingway y Ranson 2000; Rodríguez *et al.*, 2007).

Miller (1988) diversificó los mecanismos de resistencia en cuatro categorías:

a) Resistencia por comportamiento: es aquella que se origina por cambios en la etología de los insectos, que se traduce en una disminución de contacto con el insecticida para aumentar la probabilidad de supervivencia en un entorno tratado con éste.

b) Resistencia a la penetración o mecanismo físico de resistencia: se debe a cambios ocurridos en la cutícula de los insectos que reducen la tasa de penetración y confiere resistencia a un número de insecticidas. La penetración reducida otorga por lo general sólo un bajo nivel de resistencia, pero en combinación con otros mecanismos, puede resultar potencialmente en un aumento importante en la misma.

c) Resistencia por alteraciones en el sitio de acción del insecticida: se atribuye a un mecanismo en el cual los sitios blanco se alteran y se disminuye la acción con el tóxico, ya sea porque hay disminución en la sensibilidad de éstos o por su modificación (Hemingway y Ranson 2000).

d) Resistencia metabólica: Involucra principalmente tres familias enzimáticas: oxidasas de función mixta, esterasas y transferasas (Brogdon *et al.*, 1989; OMS, 1997), que al ser detoxificantes contribuyen a disminuir la dosis efectiva de un insecticida y evitan que llegue a su sitio de acción (Georghiou, 1965; Brogdon y McAllister, 1998; Bisset, 2001; Ranson *et al.*, 2002; Flores *et al.*, 2005).

Algunos otros autores han señalado un mecanismo adicional definido como resistencia múltiple o resistencia cruzada: involucra el mismo mecanismo de resistencia para dos clases de insecticidas no relacionados, es decir la resistencia no solo afecta negativamente al compuesto sobre la que se genera, sino que puede conferir resistencia cruzada a otros plaguicidas parecidos (**Figura 1**). Esto es debido a que productos de insecticidas de un mismo grupo químico pueden afectar a un punto de acción común y compartir un mismo modo de acción, (IRAC,

2007). Este tipo de resistencia se presenta principalmente entre piretroides y DDT en diferentes especies de insectos incluido *Ae aegypti* (Brogdon y McAllister, 1998; Najera y Zaim, 2002; Fonseca y Quiñones, 2005). Nauen (2007), considera entre los mecanismos más importantes, la alteración en el sitio blanco y la resistencia metabólica (Figura 2).

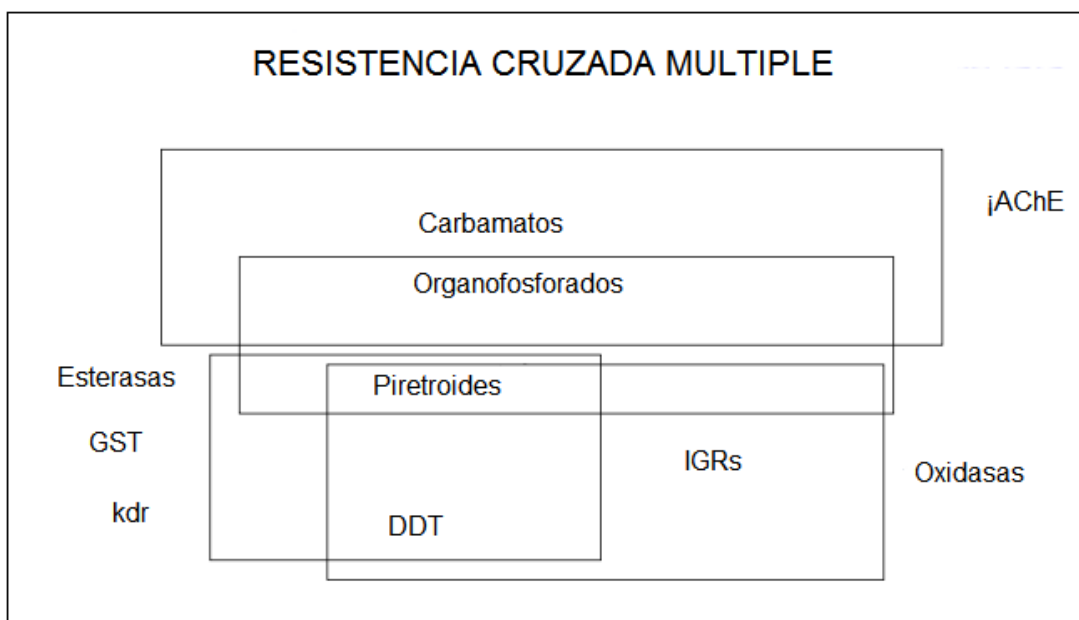



Figura 1. Resistencia cruzada entre diferentes grupos toxicológicos de uso más frecuente (Brogdon y McAlliester, 1998).



	Mecanismos bioquímicos de resistencia				
	Metabólica			Sitio blanco	
	Esterasas	Monoxigenasas	Glutat S-Transferasas	kd	ACHE
Piretroides	○	●		●	
DDT		○	●	●	
Carbamatos	○				●
Organofosforados	●	○			●

Figura 2. Principales mecanismos bioquímicos que confieren resistencia a las clases importantes de los insecticidas en los mosquitos (Nauen, 2007).

2.4.1 Mecanismos de resistencia de mayor importancia en *Ae. aegypti*

a) Resistencia por alteración en el sitio blanco

Existen tres principales sitios blanco de los insecticidas: 1) la acetilcolinesterasa (AChE), que es el blanco para los organofosforados y carbamatos (Gepner *et al.*, 1978; Hemingway y Ranson, 2000), 2) los canales de Na^+ de la membrana de las células nerviosas, sitio blanco para algunos organoclorados y piretroides y 3) los receptores GABA sitio activo para los ciclodienos, cuyas alteraciones producidas por mutaciones en el ADN que generan la resistencia a insecticidas a continuación se describen:

I. Acetilcolinesterasa insensible (AChEi): Normalmente los insecticidas organofosforados y carbamatos forman un compuesto fosforilado o carbamilado al momento de unirse a la enzima, que impide la función normal de la AChE. La acetilcolina juega un papel importante en las funciones nerviosas como principal neurotransmisor excitatorio, la AChE normalmente se encarga de catalizar la hidrólisis de la acetilcolina e intervenir en la sinapsis colinérgica en el sistema

nervioso de los insectos (Toutant, 1989) deteniendo un impulso entre dos células nerviosas y deteniendo así una acción reflectora muscular. Esta función la sigue desarrollando la AChEi, en anofelinos se ha reportado que gracias a un cambio de un aminoácido por otro en la enzima, ésta logra escapar de la fosforilación o carbamilación de los insecticidas. Sin embargo en aedinos no se ha encontrado aún alguna mutación relacionada con esta insensibilidad.

II. Alteraciones en el Canal de Sodio: se relaciona con la resistencia a DDT y piretroides. Normalmente los insecticidas se unen al poro del canal de sodio, lo que prolonga el mecanismo de inactivación dependiente del voltaje provocando la muerte del mosquito. Estudios electrofisiológicos en *Ae. aegypti* han demostrado que estos fenómenos resultan de la modificación en la cinética de apertura de estos canales (Hemingway *et al.*, 1989). La reducción de la sensibilidad del canal de sodio dependiente del voltaje con la unión de los insecticidas es la causa de la generación de fenotipos resistentes, que provoca una resistencia a la parálisis (resistencia knockdown o *kdr*), evento presente en varias especies de insectos (Maymó, 2008). Se han reportado varias mutaciones relacionadas al *kdr* en diversas especies de insectos, pero en *Aedes aegypti* están estrechamente relacionadas dos de ellas: la V1016I y la F1534C (Aponte *et al.*, 2013).

III. Receptores GABA: están localizados en los canales de los iones Cl de la membrana nerviosa, los cuales controlan su flujo a través de ésta. Los ciclodienos, constituyen un subgrupo de los organoclorados que afectan la función del nervio por la unión con los receptores GABA. La resistencia a ciclodienos está asociada con el reemplazamiento de un simple aminoácido (alanina 302) y de una subunidad del gen de resistencia a dieldrin (Rdl), que codifica para el receptor GABA. En los insectos resistentes a ciclodienos, el residuo es reemplazado por serina o por glicina lo que evita la unión con el insecticida. (Rodríguez, 2008).

b) Resistencia metabólica en *Ae. aegypti*

En el interior del insecto, aquellos resistentes pueden biotransformar o destruir el tóxico más rápidamente que los insectos sensibles; éste es el

mecanismo más común. Tres son los principales sistemas enzimáticos implicados, y que todos los insectos poseen para biotransformar aquellos compuestos xenobióticos presentes en el ambiente de forma natural: las monooxigenasas citocromos P⁴⁵⁰, las esterasas y las glutatión-S-transferasas (GSTs). Los insectos emplean estos sistemas para transformar la molécula insecticida, de manera que las poblaciones resistentes pueden tener o más cantidad o formas más eficaces de estas enzimas. Puesto que estas familias de enzimas pueden contener múltiples isoformas, con una amplia especificidad de sustratos, la probabilidad de que al menos uno de los miembros de la familia pueda metabolizar a uno o más insecticidas es elevada (Hemingway y Ranson, 2000). Este tipo de resistencia puede, por tanto, ser específica para un compuesto determinado, o ser más general y afectar a un amplio rango de compuestos (IRAC, 2007). A continuación se describe cada uno de ellos:

I. Oxidasas de Función Mixta (OFM): son un amplio grupo de enzimas oxidativas con afinidad a sustratos específicos. Este sistema enzimático utiliza oxígeno molecular, en donde un átomo de oxígeno se incorpora al sustrato y el otro se une con un hidróxilo y forman una molécula de agua. Las enzimas citocromos P⁴⁵⁰, aisladas hasta la fecha que metabolizan fármacos y xenobióticos pertenecen a esta clase de monooxigenasas (Maymó, 2008) y son enzimas ampliamente distribuidas, desde bacterias a mamíferos. Su gran diversidad se debe a la existencia de múltiples isoenzimas, diferentes patrones de expresión y una amplia especificidad de sustrato, lo cual es particularmente relevante en el caso de las citocromos P⁴⁵⁰ en *Ae. aegypti* (Hemingway *et al.*, 2004). Se ha identificado resistencia mediada por citocromos P⁴⁵⁰, principalmente piretroides y carbamatos, y en menor medida a los organofosforados y al DDT (Hemingway *et al.*, 2004).

II. Esterasas: son enzimas que hidrolizan ésteres carboxílicos y fosfóricos presentes en insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides

(Hemingway y Karunaratne, 1998). Bioquímicamente, las esterasas actúan uniéndose rápidamente al insecticida pero liberando lentamente los metabolitos de este, es decir, secuestrando el insecticida antes que llegue a su sitio de acción. Lo anterior requiere altas cantidades de estas enzimas debido a la estequiometría de la reacción, desencadenando la sobreproducción enzimática y por ende el desarrollo de resistencia (Karunaratne *et al.*, 1993). Se han asociado como primer mecanismo de resistencia a organofosforados, carbamatos y en menor proporción a piretroides (Hemingway y Karunaratne, 1998).

III. Glutación-S-transferasas: Son enzimas que conjugan las moléculas insecticidas con sustratos endógenos (glutación, azúcares, aminoácidos) (Alzogaray 1998). Las glutación-S-transferasas (GSTs) están involucradas en el metabolismo, detoxificación y excreción de un extenso rango de xenobióticos incluyendo los insecticidas. Estas enzimas protegen a las células del estrés oxidativo y de los químicos tóxicos, catalizando la conjugación de los componentes electrofílicos con el grupo tiol de la glutación reducida (GSH), obteniendo productos más hidrosolubles y menos tóxicos, que son excretados por las células (Salinas y Wong, 1999). Las GSTs están involucradas con la resistencia al DDT (catalizando la dehidroclorinación del DDT a su metabolito menos tóxico DDE) (Clark y Shamaan, 1984), a organofosforados y recientemente a piretroides (Kostaropoulos *et al.*, 2001), a través de mecanismos de cambio en la especificidad del sustrato, niveles elevados de actividad y regulación génica, aunque los elementos reguladores que controlan la expresión de GSTs no se han identificado aún (Hemingway y Ranson, 2000).

2.5 Susceptibilidad y resistencia de *Ae. aegypti* a insecticidas

Antes de 1970 se emprendieron acciones por la Organización Panamericana de la Salud, para disminuir en varios países del continente americano a los distintos estadios del mosquito *Ae. aegypti*, y sus criaderos

mediante tratamientos con insecticidas (Gómez-Dantés y Willoquet, 2009). Durante los últimos 25 años en América Latina se han aplicado organofosforados en recipientes de agua doméstica para eliminar las formas larvales y para los adultos a través de fumigaciones dentro de las casas afectadas (Georghiou *et al.*, 1983). A partir de la década de los 90 hasta la actualidad se han utilizado distintos insecticidas como organoclorados (OCs), ciclodienos, organofosforados (OFs), carbamatos y piretroides de segunda generación, en años más recientes se han utilizado insecticidas microbianos y reguladores del crecimiento (Bisset, 2002), los cuales después de 25 años de uso, los mosquitos han desarrollado resistencia (Tabla I).

Tabla I. Estudios sobre resistencia a diversos insecticidas en *Ae aegypti* en el continente Americano.

Autor	Año	País	Insecticidas	Concentraciones	% Mortalidades
Fox y García.	1960	Puerto Rico	diazinon y malatión	10 X	
				0.8,	34% -F ₁ 3% F ₁₂ 72%-F ₁
Fox <i>et al.</i>	1973	Puerto Rico	malatión	1.6	14% F ₁₂ 100%-F ₁ 57% F ₁₂
				3.22 mg/l 0.6245	100 78.2
Mekuria <i>et al.</i>	1991	República Dominicana	malatión temefos fenition	0.0375 y 0.25	99.3
				0.025	
Sames	1996	Texas y México	malatión, clorpirifós, resmetrina y permetrina		>5x 4 x
					1.33 1
Mazzari y Georghiou	1995	Venezuela	temefos, malatión metil-pirifos y clorpirifós temefos		<5 X 7X
					46.9 X
Wirth y Georghiou	1999	Puerto Rico			
Bisset <i>et al.</i>	2007	Salvador	temefos clorpirifós deltametrina cipermetrina	1 %	FR ₅₀ = 24.16

2.5.1 Uso de insecticidas y susceptibilidad de *Ae. aegypti* en México

En México desde 1950 los programas operativos de control de vectores, han utilizado una serie de insecticidas para controlar a *Ae. aegypti*, inicialmente el DDT se usó ampliamente en el interior de las viviendas de 1950 a 1960, a pesar de su residualidad se continuó utilizando contando con registros que datan de 1998 (Flores *et al.*, 2006). Otro insecticida muy utilizado es el malatión para los adultos, fumigando este producto en las casas afectadas y las formas larvales se han combatido con Temefos, aplicándolo directamente en contenedores de agua de uso doméstico. Sin embargo, estas prácticas cambiaron en 2000 debido a la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002 (DOF, 2003), que indica utilizar permetrina para los adultos, situación que se ha mantenido vigente hasta 2009.

A pesar del uso intensivo de estos insecticidas incluidos los piretroides no se ha logrado erradicar el problema (Flores *et al.*, 2013), por lo que, varios investigadores han dedicado importantes esfuerzos en determinar los mecanismos de resistencia involucrados para la detoxificación de estos compuestos en México (Flores *et al.*, 2005; 2006, 2009) y el sitio objetivo de insensibilidad (kdr) (Saavedra *et al.*, 2007; 2008; Ponce *et al.*, 2009). Asimismo se han reportado resistencia a diversos insecticidas (Tabla III).

A raíz de ello, en 2011, se estableció una nueva política (NOM-032-SSA2-2010: DOF, 2011) que indica que antes de aplicar cualquier insecticida debe ser medida su eficacia en la especie que se pretende controlar, por tal razón ahora se utiliza el clorpirifós en los programas de manejo de nuestro país.

De acuerdo con la literatura consultada, en la península de Baja California solo se cuenta con un estudio realizado por Flores *et al.* (2005), quienes trabajaron con cuatro poblaciones de *Ae. aegypti*, provenientes de Tecate, Tijuana, Loreto y Ciudad Constitución, estas dos pertenecientes a Baja California Sur. Los autores encontraron diversidad en la respuesta hacia permetrina, lo que muestra el desarrollo de distintos mecanismos de resistencia de acuerdo con el origen de los

mosquitos, entre ellos se identificó α y β esterasas, oxidasas, glutatión-s-transferasa, y AChE.

Tabla II. Estudios de Susceptibilidad de *Ae. aegypti* a diversos insecticidas en México.

Autor	Año	Localidad	Insecticidas	Susceptibilidad
Bobadilla	2010	Veracruz	piretroides, <i>d</i> -fenotrina, permetrina, deltametrina, λ -cialotrina, bifentrina, cipermetrina, λ - cipermetrina y z-cipermetrina	>10x
Rosas	2011	Guerrero Jalisco San Luis Potosí	Temefos	10X
López et al.	2014	Veracruz	Clorpirifós	
Chino et al.	2014	Guerrero	λ -cialotrina malatión temefos clorpirifós permetrina y	<5x
Flores et al.	2005	Baja California	propoxur Permetrina	

3. JUSTIFICACIÓN

En Baja California Sur y en otras entidades mexicanas, se han incrementado considerablemente los casos de Dengue durante los últimos años, así también el número de defunciones debidas principalmente al tipo hemorrágico, a pesar de las medidas y recursos económicos implementados por las instancias gubernamentales responsables y, a la ausencia de vacunas efectivas para utilizarse en forma masiva. Para resolver esta problemática, en dicha entidad, actualmente se destinan seis millones de pesos para controlar este vector y 15 millones cuando se tienen brotes epidémicos, no obstante, de acuerdo con las bases de datos de la Secretaría de Salud, las poblaciones del mosquito continúan incrementándose. Una razón de ello es que dichas medidas suelen aplicarse durante algunos periodos del año, sin contar con un previo conocimiento sobre la dinámica poblacional de estos insectos y el nivel de susceptibilidad adquirido por la presión de selección ejercida por el uso de insecticidas, es decir si estas medidas se aplicaran cuando las poblaciones de *Ae. aegypti* se encuentran en los menores niveles, las estrategias serían más efectivas y menos costosas. Por tal razón se definieron varios objetivos orientados a conocer a través de indicadores entomológicos la fluctuación de esta especie y sus abundancias relativas a lo largo de tres años, así también, realizar bioensayos toxicológicos para conocer una posible resistencia a los compuestos más utilizados para su control en el área de estudio y los mecanismos de resistencia adquiridos para la detoxificación de éstos. Paralelamente, identificar sustancias atrayentes para las hembras de *Ae. aegypti*, durante la etapa de alimentación y reproducción, para en caso de éxito, ofertar su uso en las ovitrampas destinadas para su monitoreo y control, con lo que se aportaría conocimiento nuevo en relación con las estrategias de manejo hasta hora existentes.

4. HIPÓTESIS

Si la fluctuación estacional de las poblaciones de *Ae. aegypti* está relacionada con factores ambientales, alimenticios, reproductivos y de control, entonces se esperan cambios en el comportamiento de esta especie entre localidades ubicadas en zonas áridas, con ambientes diferentes.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los factores relacionados con la fluctuación poblacional, y niveles de susceptibilidad en *Ae. aegypti* a diferentes insecticidas utilizados así como el efecto atrayente de diferentes compuestos para su manejo en el sur de la Península de Baja California.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar la fluctuación espacio-temporal de *Ae. aegypti* de acuerdo con indicadores entomológicos de larvas y huevos, utilizados dentro de los programas operativos de control de este insecto.
- 2) Estimar el nivel de susceptibilidad en larvas de *Ae. aegypti* frente a temefos y, en adultos (F1) a permetrina, deltametrina, bifentrina, malatión, clorpirifós y propoxur con base en las CL50, CL99, TL50 y TL99 obtenidas.
- 3) Identificar los mecanismos de resistencia de naturaleza enzimática como acetilcolinesterasa, esterasas (α y β -naftil acetato y *p*NPA), glutatión-S-transferasas (GSTs) y monoxigenasas (citocromos P⁴⁵⁰), involucrados en la detoxificación de los insecticidas utilizados para el combate de *Ae. aegypti*, en B.C.S.
- 4) Determinar la frecuencia de las mutaciones V1016I y F1534C del gen del canal de sodio dependiente de voltaje, como posibles mecanismos de resistencia.
- 5) Evaluar cuatro sales sódicas como posibles atrayentes para hembras de *Ae. aegypti* en condiciones de laboratorio.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

El estado de Baja California Sur, se localiza al sur de la Península de Baja California entre los paralelos 22° 30' y 28° de latitud, y entre los meridianos 109° y 115° al Oeste de Greenwich. Ocupa el extremo suroeste del Desierto Sonorense en Norteamérica y limita al norte con el estado Baja California, al este con el Golfo de California o mar de Cortés, y al sur y oeste con el océano Pacífico. Cuenta con una longitud de 750 km, una anchura promedio de 100 km y aproximadamente 2, 200 km de litorales. Tiene una superficie de 73,677 km², que representan el 3.8% de la superficie total del país.

El área de estudio se integró por tres localidades ubicadas en el sur de la Península de Baja California: La Paz (LAP), localizada a 24°09' 0" N y 110°20'47" O, con una altitud de 47 msnm; San José del Cabo (SJC) a 23°03' 40" N y 109° 42' 29" O con una altitud de 47 msnm y Cabo San Lucas (CSL) a 22°53'41" N y 109° 55' 29" O con una altitud de 22 msnm. (Figura 3). Estas localidades cuentan con los servicios básicos de urbanización y representan zonas de turismo nacional e internacional de alto nivel en el estado (Tovar *et al.*, 2014).

El ambiente de esta región de acuerdo con la clasificación de Köppen (1948), modificado por García (1968), corresponde a un clima muy seco (BW), árido (h') con régimen de lluvias torrenciales en verano-otoño y muy ligeras en invierno (Latorre y Penilla, 1988; Salinas *et al.*, 1990). La temperatura media anual es de 23.7 °C y una oscilación diurna entre 7 °C y 14 °C, enero es el mes más frío con un valor promedio de 18 °C, 10 °C como mínima y de 28 °C como máxima. Los valores máximos se presentan en verano con 40 °C, que coincide con la presencia de huracanes y con el mayor nivel de precipitación, (CONAGUA, 2011).

La precipitación media anual es de 184 mm para el municipio de La Paz y de 262 mm para el municipio de Los Cabos (San José del Cabo y Cabo San Lucas). De agosto a noviembre se presentan fenómenos meteorológicos como

huracanes que afectan estas zonas presentando ocasionalmente lluvias torrenciales, no obstante el mes de septiembre se considera el más lluvioso para las tres localidades, mientras que de marzo a junio la precipitación es escasa (García, 1988; Gob. de B. C. S. 1998).

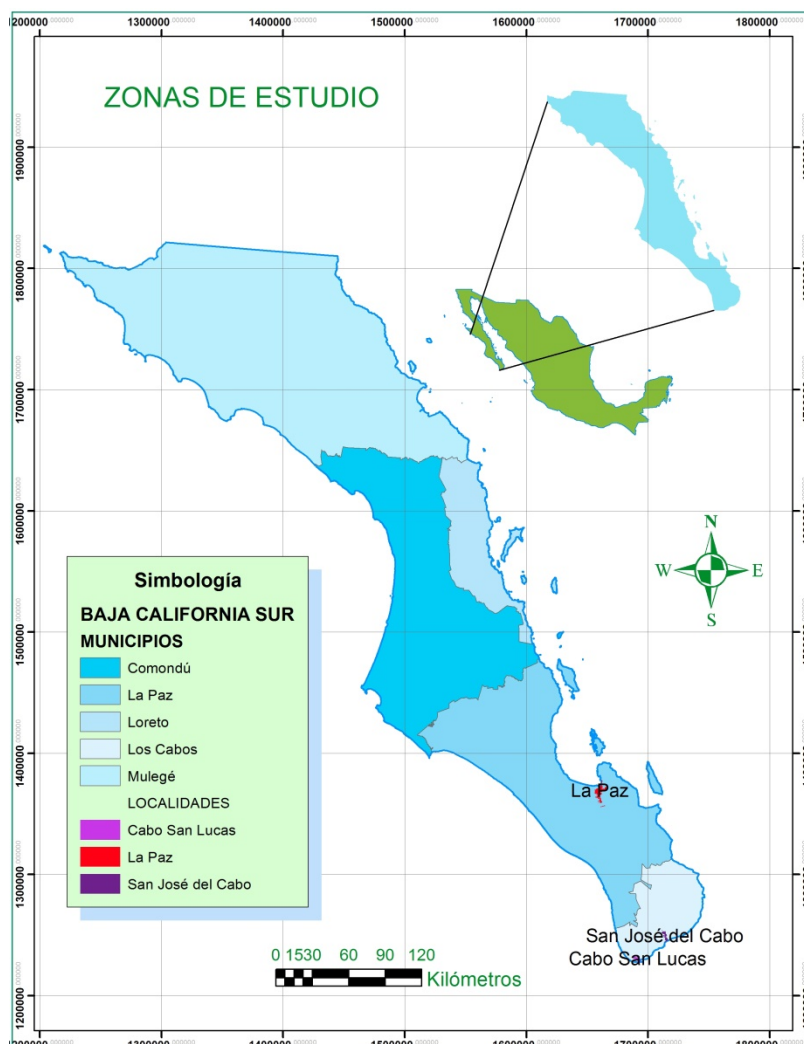


Figura 3. Localidades de estudio: La Paz, San José Cabo y Cabo San Lucas, ubicadas en el Sur de la Península de Baja California.

Por su condición desértica, la vegetación dominante en la península de Baja California es el matorral sarcocaulé de acuerdo con la Carta de Vegetación Oficial Mexicana (Anónimo, 1981). Este tipo de vegetación es una variante del matorral

xerófito, caracterizado por la dominancia de formas arbóreas, arbustivas y suculentas, propio de las zonas áridas de México (Rzedowski, 1978; León de la Luz *et al.*, 2000).

6.2 Fluctuación espacio temporal de *Ae. aegypti*

6.2.1 Estimación de la abundancia de *Ae. aegypti* utilizando indicadores entomológicos larvales (ICP, IRP e IB)

La fluctuación estacional de *Ae. aegypti*, se estudió mediante el uso de tres indicadores entomológicos obtenidos en larvas e indicadores basados en el número de huevos colectados, por personal operativo de la Secretaría de Salud (SSA) de Baja California Sur, con base en la metodología de la Organización Panamericana de la Salud (1994), y que son registrados en la plataforma del Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), de donde se obtuvieron dentro del periodo enero de 2011 a diciembre de 2013 para realizar el presente estudio.

Para los indicadores entomológicos larvales los datos evaluados fueron: número de casas revisadas, número de casas revisadas y positivas a la presencia de larvas de *Ae. aegypti*, número de recipientes revisados, número de recipientes revisados con agua y número de recipientes revisados con agua y con presencia de larvas de este insecto, para las tres localidades (La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas).

La información obtenida permitió calcular los siguientes índices larvarios:

Índice de casas positivas (ICP):

$$\text{ICP} = \frac{\text{No. de viviendas infestadas por } *Ae. aegypti* \times 100}{\text{No. de viviendas revisadas}} \quad (1)$$

Índice de recipientes positivos (IRP):

$$\text{IRP} = \frac{\text{No. de recipientes infestados por } Ae. aegypti \times 100}{\text{No. de recipientes revisados}} \quad (2)$$

Índice Breteau (IB):

$$\text{IB} = \frac{\text{No. de recipientes infestados por } Ae. aegypti \times 100}{\text{No. de viviendas revisadas}} \quad (3)$$

6.2.2 Estimación de la abundancia de *Ae. aegypti* utilizando indicadores entomológicos de ovitrampas (IOP e IDH)

En el caso de los huevos, éstos se obtuvieron de trampas que consisten de cilindros de plástico de color negro de 1 litro de capacidad, que fueron llenados con 500 mL de agua no clorada y libre de insecticida. Como sustrato en el interior de cada recipiente se colocó una tira de papel filtro de 12 cm de altura y 34 cm de longitud, para que las hembras depositaran sus huevos de acuerdo con el método sugerido por Fay y Perry (1965) (Figura 4). Las ovitrampas se se colocaron semanalmente en áreas aledañas a las viviendas con base en la Guía Metodológica para la Vigilancia Entomológica con Ovitrampas (CENAPRECE, 2010).

Las tiras de papel filtro una vez retiradas de las ovitrampas se revisaron y reemplazaron semanalmente. Las que presentaron huevos se transportaron a los Centros de Salud para una revisión minuciosa para su identificación, conteo y registro en la plataforma ya mencionada. Los datos se concentraron mensualmente para obtener el número de huevos totales por área, mes y año. De esta manera y de acuerdo con Nunes *et al.* (2011) y Da Rocha *et al.* (2015), se calcularon para cada localidad los siguientes índices entomológicos de infestación, para definir la dinámica poblacional de *Ae. aegypti*, para cada localidad:

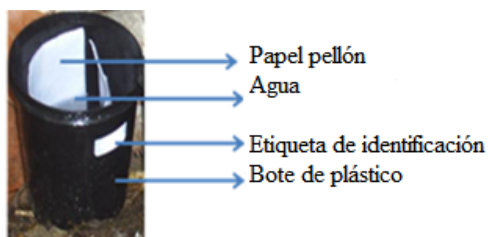


Figura 4. Ovitrapas utilizadas para evaluar la densidad de huevos de *Ae. aegypti* en el Sur de la Península de Baja California.

Índice de positividad de ovitrampas:

$$\text{IOP} = \frac{\text{No. de ovitrampas positivas} \times 100}{\text{No. de ovitrampas examinadas}} \quad (4)$$

Índice de densidad de huevos:

$$\text{IDH} = \frac{\text{No. de huevos colectados} \times 100}{\text{No. de ovitrampas positivas}} \quad (5)$$

Número promedio de huevos:

$$\text{MNH} = \frac{\text{No. de huevos.....}}{\text{No. de ovitrampas positivas}} \quad (6)$$

Paralelamente se utilizaron los valores promedio mensuales de las variables climáticas temperatura media, mínima y máxima, el valor mensual acumulado de precipitación y promedio mensual de humedad relativa, de las localidades de estudio obtenidos de las estaciones meteorológicas pertenecientes a la Comisión Nacional de Agua.

6.2.3 Análisis estadístico de la abundancia poblacional de *Ae. aegypti*

Los indicadores larvales (ICP, IRP e IB), al ser estimados en porcentaje, se transformaron utilizando la función arco seno (Zar, 2010), para determinar la existencia de diferencias significativas entre las evaluaciones previas y posteriores al control larvario, entre los tres índices de cada localidad. Para tal propósito se realizó un análisis de varianza de Kolmogorov-Smirnov al 95% de confianza, (Zar, 2010) y para determinar los agrupamientos de las medias se aplicó la prueba a posteriori de Student-Newman-Keuls (SNK, $\alpha= 0.05$).

En el caso de los indicadores de ovitrampas (IOP e IDH), se realizó una prueba de χ^2 de tendencia lineal con el índice de ovitrampas positivas (IOP), de acuerdo con la metodología propuesta por Da Rocha *et al.* (2015), asimismo, se estimó la posibilidad de ocurrencia de ovitrampas positivas mediante Odds Ratio (OR) de acuerdo con Bland y Altman (2000).

Para conocer la posible diferencia del número de huevos y las variables ambientales entre los tres años (análisis interanual), se realizaron análisis de variancia (ANOVA) no paramétricos y/o paramétricos, según el caso de normalidad y homocedasticidad, de los datos de los 12 meses (el promedio entre enero y diciembre), se aplicó la prueba de Tukey *post hoc* (significancia $\alpha= 0.05$) para la identificación de las diferencias entre los mismos y, se graficaron las tendencias de los valores promedio anuales con base en el número de huevos.

Se realizó un análisis intermensual mediante una prueba de ANOVA y una prueba de Tukey *post hoc* (significancia $\alpha= 0.05$, con los tres valores promedio mensuales del periodo de estudio, tanto para el número de huevos como para cada una de las variables ambientales. Ello con el propósito de identificar en un ciclo anual, periodos mensuales estadísticamente diferentes o semejantes y el posible impacto del clima sobre la abundancia de huevos.

Mediante una correlación de Spearman (significancia $\alpha= 0.05$), se estimó la relación entre la abundancia de huevos obtenidos por mes, con los valores mensuales promedio de temperatura (mínima y máxima) y HR. Para los valores de

precipitación pluvial se utilizaron los valores acumulados mensualmente a lo largo del año, por la escasa lluvia registrada en la localidad de estudio (Stein *et al.*, 2005; García *et al.*, 2011).

Para establecer una asociación entre el número de huevos de *Ae. aegypti* obtenidos por mes con la precipitación y humedad relativa, las correlaciones se realizaron con dos meses de desfase, debido a las características biológicas y ecológicas del área de trabajo.

Las posibles diferencias entre años (análisis interanual) y meses (análisis intermensual) con respecto a las diferentes variables consideradas, se determinaron mediante análisis de variancias paramétricas o no paramétricas según el caso de normalidad y homocedasticidad de los datos. Para la identificación de los casos distintos se usó una prueba de Tukey *post hoc* (significancia $\alpha = 0.05$) y para las variables ambientales que presentaron correlación con el número total de huevos se graficaron los promedios mensuales de los tres años en las distintas localidades.

6.3 Colecta de larvas de *Ae. aegypti* para los bioensayos de susceptibilidad, mecanismos de resistencia y detección de mutaciones de genes de resistencia

Se realizaron seis salidas de campo dos por localidad, durante el periodo febrero a octubre de 2013, para coleccionar larvas de *Ae. aegypti* en las viviendas buscando en los recipientes que contuvieran agua almacenada para uso doméstico principalmente y que se utilizan como criaderos. Las larvas obtenidas en campo fueron trasladadas al laboratorio de entomología agrícola del CIBNOR, en donde se identificaron con ayuda de un microscopio estereoscópico y de acuerdo a las claves taxonómicas de Darsie y Ward (2005). Las larvas de la especie *Ae. aegypti* se colocaron en recipientes de plástico de 1l, de capacidad que contuvieron agua libre de cloro e insecticida, fueron alimentadas con croquetas de ratón, molidas, coladas en un tamiz de 100 mm y, esterilizadas a 121

°C por 15 min, para evitar contaminaciones con microorganismos patógenos como hongos y bacterias y de esta forma reducir la mortalidad de las larvas. Una vez en el estadio de pupas, estas fueron separadas en machos y hembras y colocadas en recipientes de plástico redondos de 25 cm de diámetro y 1L de capacidad utilizando una pipeta de plástico desechable; estos recipientes fueron cubiertos con tela tul, para evitar se escapen los adultos una vez emergidos.

Con un tubo succionador fueron capturados hembras y machos y liberados en jaulas de madera de 40 × 40 cm con malla tul, a fin de asegurar una adecuada reproducción se colocaron aproximadamente 500 ejemplares en una relación de 1:1 y fueron mantenidas bajo condiciones de temperatura y humedad controlada (26 °C ± 2 °C, 70% HR, y fotoperiodo de 12 × 12 hrs. Se utilizó una jaula para cada población de mosquitos que correspondió a cada una de las localidades de estudio La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas para producir el material biológico necesario para los bioensayos de susceptibilidad a insecticidas. Los mosquitos adultos machos de 2-3 días de edad se alimentaron con algodones humedecidos en agua con 10% de azúcar, las hembras de la misma edad fueron alimentadas con sangre de conejo para obtener una siguiente generación (F₁), cada tercer día durante un mes a fin de garantizar la colecta de huevos de las tres localidades en ovitrampas colocadas dentro de las jaulas de madera. Los huevos obtenidos fueron trasladados al Laboratorio de Resistencia a Insecticidas del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP) ubicado en Tapachula Chiapas, en donde se realizaron los bioensayos de susceptibilidad a insecticidas.

Una vez en el insectario del CRISP, los huevos fueron liberados en charolas plásticas de 30 × 250 cm, de 250 mL con agua no clorada y libre de insecticida, posteriormente ya como larvas estadio 1, fueron distribuidas homogéneamente en diversas charolas de iguales características que la primera y alimentadas. Una vez que las larvas de la generación F₁ alcanzaron el estadio tardío III, fueron utilizadas para los bioensayos de susceptibilidad a Temefos, y para los bioensayos de susceptibilidad a permetrina, deltametrina, bifentrina, malatión, clorpirifós y propoxur así como para las pruebas bioquímicas para identificar mecanismos de

resistencia, las larvas se criaron hasta el estadio adulto, a fin de utilizar hembras de 1 día de emergidas sin alimentar, solo hidratadas con solución azucarada al 5%. Para determinar la frecuencia de las mutaciones V1016I y F1534C del gen del canal de sodio dependiente de voltaje, como posibles mecanismos de resistencia basados en el sitio blanco de los insecticidas a probar fue necesario realizar extracción de ADN en larvas.

6.4 Bioensayos de susceptibilidad a temefos en larvas

Se estableció la línea base para el insecticida Temefos mediante el análisis Probit (Finney, 1971), con la cepa susceptible New Orleans de *Ae. aegypti*, proporcionada por el CRISP, donde se obtuvieron los valores de la concentración letal media (CL₅₀) con valor de 0.008 ppm y concentración letal (CL₉₀) 0.024 ppm. Estos valores fueron considerados como referencia para comparar las poblaciones de campo (La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas), a las cuales se les realizaron ventanas biológicas para obtener la línea base utilizando el método estándar para pruebas de susceptibilidad recomendado por la WHO (2013). Se obtuvo exponiendo 25 larvas de *Ae. aegypti* de tercer estadio tardío y cuarto temprano a las concentraciones del insecticida Temefos, en vasos de plástico del No. 8 que contenían 249 mL de agua libre de insecticida y 1 mL de solución stock. Se realizaron 12 repeticiones para cada concentración, acompañadas cada una de un grupo control, con larvas seleccionadas al azar, del mismo lote donde se tomaron las larvas que fueron expuestas con el insecticidas y que fueron colocadas en vasos con las mismas características con 249 mL de agua y 1 mL de alcohol etílico en lugar de insecticida. A todos los vasos se les adicionó como alimento croquetas de ratón pulverizadas, a fin de evitar la mortalidad por esta variable. Todas las larvas fueron expuestas a las diferentes concentraciones durante 24 horas, al término de este periodo de exposición se contabilizaron las mortalidades correspondientes a cada disolución probada. Para establecer su línea base se realizó un análisis probit, y así obtener los valores correspondientes

a la CL₅₀ y CL₉₉ para cada población en estudio con los cuales se calculó el factor de resistencia (FR₅₀), de la siguiente manera:

$$FR_{50} = CL_{50} \text{ insecticida a evaluar} / CL_{50} \text{ de la cepa susceptible} \quad (6)$$

Con el valor calculado se estableció un criterio de interpretación de acuerdo a clasificación de la WHO (2013), aún vigente donde:

<5= Susceptibles

5-10= Susceptible intermedia

>10= Resistente.

6.5 Bioensayos de susceptibilidad a insecticidas en adultos de *Ae. aegypti*

Se utilizó la metodología propuesta por Brogdon y Chan (2012), la cual está basada principalmente en pruebas de dosis-mortalidad, utilizando botellas de vidrio tipo Wheaton de 250 mL. En nuestro estudio se determinó el tiempo de diagnóstico entendido el tiempo esperado para que el insecticida alcance el 100% de mortalidad. Se asume que existe resistencia en una población si una proporción significativa de ésta, sobrevive a la dosis diagnóstico en el tiempo diagnóstico. Los resultados fueron validados con la cepa New Orleans, proporcionada por el insectario del Centro Regional de Investigación en Salud Pública. Las dosis y tiempos de diagnósticos para *Ae. aegypti*, están dentro del rango establecido para los principales insecticidas usados a nivel mundial de acuerdo con la (WHO, 1998) (Tabla III).

En el caso de los insecticidas bifentrina y clorpirifós, al no contar con una dosis diagnóstico y tiempo letal ya establecido para *Ae. aegypti*, se procedió a obtener la línea base con la cepa susceptible New Orleans proporcionada por el

Tabla III. Insecticidas empleados para la determinación de susceptibilidad en larvas y adultos de *Ae. aegypti*.

Insecticida	Cantidad de insecticida µg/mL	Tiempo de exposición
Temefos+	1, 5, 10, 15, 25, 35, y 70	24 hr
Permetrina*	15	30 min
Deltametrina*	10	30 min
Bifentrina**	15	30 min
Malatión*	50	30 min
Clorpirifós**	60	30 min
Propoxur**	15	30 min

*Dosis diagnóstico registrada por Brogdan y Chan (2012) para la cepa susceptible New Orleans.

**Se calculó la línea base y se estableció una dosis diagnóstico y tiempo letal para para *Ae. aegypti* utilizando la cepa susceptible New Orleans.

insectario del CRISP. Una vez calculada la concentración discriminante y el tiempo de exposición para estos insecticidas, se evaluaron las poblaciones de campo de La Paz; San José del Cabo y Cabo San Lucas.

Preparación de las soluciones stock de insecticidas

Con los insecticidas grado técnico se prepararon diluciones, utilizando acetona como diluyente; siguiendo la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (7)$$

Donde:

C_1 = Concentración de la cual se van a realizar las diluciones

V_1 = Volumen inicial

C_2 = Concentración a obtener

V_2 = Volumen final

Las diferentes concentraciones de solución stock de todos los insecticidas fueron colocadas y resguardadas en botellas color ámbar de 25 mL, debidamente etiquetados y protegidas de la luz con papel aluminio y refrigerados a 4°C.

Las botellas Wheaton destinadas para el ensayo biológico fueron recubiertas en su interior con 1 mL de la concentración de la dosis diagnóstica del insecticida a evaluar, para cada insecticida se impregnaron cuatro botellas, de tal

manera que toda la superficie interna de cada una quedara perfectamente cubierta con la solución de insecticida y para los controles se colocó 1 mL de acetona en lugar de insecticida. Una vez que la fase líquida fue uniformemente distribuida y el insecticida se evaporó completamente, las botellas y las tapas fueron colocadas de forma invertida sobre papel absorbente durante 24 horas en un gabinete oscuro, posteriormente se procedió a realizar las exposiciones de los mosquitos a cada uno de los insecticidas a evaluar.

Exposición de hembras adultas de *Ae. aegypti* a insecticidas

Se utilizaron grupos de 15 mosquitos de hembras adultas en cada botella, y se realizaron 4 réplicas para exponer un total de 240 mosquitos a cada concentración discriminante y tiempo letal de cada insecticida a evaluar. Todos los bioensayos fueron validados con un grupo control de 240 mosquitos hembras adultas de *Ae. aegypti* de la cepa susceptible New Orleans.

Durante la exposición de las hembras a los insecticidas se contabilizaron y registraron los mosquitos derribados (sin movimiento posando en la base de la botella) a los tiempos de 0, 5, 10, 15, 20, y 30 minutos.

Se utilizó la fórmula de Abbott (1925) para corregir la mortalidad los controles que osciló entre 5 y 20%.

Como indicador de susceptibilidad para los bioensayos de botella se consideró la clasificación de referencia vigente de la WHO (2013).

- a) 98%–100% mortalidad en el tiempo de diagnóstico recomendado, indica susceptibilidad en la población.
- b) 80%–97% mortalidad en el tiempo de diagnóstico recomendado sugiere susceptibilidad intermedia
- c) <80% mortalidad en el tiempo de diagnóstico recomendado sugiere resistencia individual presente

6.5.1 Análisis estadísticos de la susceptibilidad de adultos de *Ae. aegypti* a diversos grupos de insecticidas

Para obtener los valores de las concentraciones letales (CL_{50}) y (CL_{99}) en el caso del insecticida Temefos en larvas, se utilizó el programa Probit-logaritmo con el software EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM Versión 1.5 de Raymond *et al.* (1985). En el caso de los adultos de cada población de campo expuestos a los distintos insecticidas se calcularon los (TL_{50}) y (TL_{99}) con el programa The Insecticide Resistance Monitoring Application (Irma QCal, exe), versión 0.1.

En el caso de los bioensayos con adultos se realizó un análisis de varianza de una vía para determinar diferencias entre las poblaciones de campo para cada insecticida.

6.6 Ensayos bioquímicos para determinar mecanismos de resistencia de *Ae. aegypti* a insecticidas

Se realizaron ensayos enzimáticos para comprobar la resistencia a los insecticidas probados, de acuerdo a la metodología propuesta por Hemingway *et al.* (1997). Cada ensayo enzimático y cada población de mosquito a evaluar se realizó por triplicado el procedimiento que consistió en los siguientes pasos:

1. Sobre una plancha de hielo se colocó una placa de fondo redondo de 96 pozos, en la cual se colocaron 47 hembras de mosquito individualmente de estadio tardío III de cada una de las poblaciones de campo.

2. Con una pipeta multicanal se adicionaron 50 μ L de agua tridestilada en cada pozo, y se maceró con un pistilo de plástico cada una de las larvas y posteriormente se agregó a cada pozo 150 μ L más de agua, para obtener un volumen final de 200 μ L de cada homogenizado que se usó para realizar los bioensayos enzimáticos.

3. Esta placa se centrifugó a 4 °C durante 30 minutos.
4. Todos los bioensayos fueron realizados por duplicado en placas de fondo plano de plástico de 96 pozos.
5. Se requirió un lector de placas modelo Termosystem, para determinar las absorbancias de las enzimas.

6.6.1 Ensayo bioquímico para evaluar acetilcolinesterasa (AChE)

Para evaluar acetilcolinesterasa (AChE) se colocaron 25 μ L del homogenizado por duplicado en cada pozo de cada placa se distribuyeron 145 μ L de buffer tritón al 1% ajustado a pH 7.8, posteriormente se agregaron 10 μ L de una mezcla de 0.008 gr de DNTB. A continuación se adicionaron 25 μ L de una mezcla de 0.2 gr de ASCHI (acetilcolinesterasa iodada) en 5.0 mL de H₂O, luego al 50% de la mezcla anterior, se añadieron 5 μ L de propoxur al 0.1 M. Inmediatamente después se agregaron 25 μ L ASCHI sin propoxur a las filas: A, C, E, G y a las filas: B, D, F, H y se adicionaron 25 μ L ASCHI con propoxur. Posteriormente la placa fue introducida en un lector de placas (Multiscan Spectrum) y se leyó a 450 nm por 5 min (cinética).

6.6.2 Ensayo bioquímico para evaluar enzimas α y β esterasas

Para determinar las esterasas generales (EST) se prepararon 120 μ L de α -naftil acetato 30 mM, diluidos en 12 mL de Na₂HPO₄ al 0.02 M, pH 7.2 y 120 de β -naftil acetato 30 mM, diluidos en 12 mL de Na₂HPO₄ al 0.02 M, pH 7.2. De las mezclas anteriores fueron colocados en dos placas 200 μ L de α -naftil acetato en las filas: A, C, E, G; y en las filas: B, D, F, H se añadieron 200 μ L de β -naftil acetato. Así mismo en cada pozo de cada una de las placas se adicionaron 20 μ L del homogeneizado. Posteriormente las placas se dejaron a temperatura ambiente

por 30 min, pasado este tiempo se agregaron 50 μL de una mezcla de 0.023 gr fast-blue + 2.25 mL H_2O + 5.25 mL de SDS al 5% y seguidamente las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min, pasado este tiempo se colocaron en el lector de placas para dar lectura a 570 nm en punto fijo.

6.6.3 Ensayo bioquímico para evaluar esterasas que usan paranitrofenilacetato (pNPA)

Se distribuyeron 10 μL del homogeneizado en cada uno de los pozos de las placas; luego se adicionarán 200 μL de una mezcla de 20 mL de buffer de Na_2HPO_4 a 50 mM, pH 7.4, a los cuales se les agregaron 100 μL de p-nitrofenil acetato al 0.2 M, y se dio lectura en el lector de placas a 405 nm por 2 min.

6.6.4 Ensayo bioquímico para evaluar glutatión-s-transferasas (GSTs)

Para la determinación de las enzimas se mezclaron 0.06 gr de glutatión reducido, en 20 mL de buffer Na_2HPO_4 al 0.1 M, pH 6.5 y por otra parte se mezclaron 0.013 gr CDNB (1-cloro- 2,4-dinitrobenzeno), en 1 mL de metanol, ambas mezclas se combinaron y se agregaron 200 μL de esta solución junto con 10 μL del homogeneizado en cada uno de los pozos de dos placas de plástico, inmediatamente se procedió a dar lectura en un lector de placas a 340 nm por 5 min (cinética).

6.6.5 Ensayo bioquímico para evaluar monooxigenasas citocromos P^{450}

En cada pozo de cada una de las placas se colocaron 20 μL del homogeneizado, se adicionaron en cada pozo 80 μL de K_2HPO_4 , pH 7.2 y 200 μL de una mezcla preparada de 0.01 g de tetrametilbencidina en 5 mL de metanol + 15 mL de acetato de sodio 0.25 M pH 5.0. Posteriormente se añadieron 25 μL de

H₂O₂ al 3%. Bajo esta condición las placas se mantuvieron durante una hora a temperatura ambiente y luego se leyeron a 650 nm en punto fijo.

6.6.6 Ensayo bioquímico para evaluar proteínas totales

Su determinación requirió de 10 µL del homogeneizado por cada pozo de cada placa, después se adicionaron 300 µL de reactivo Bio-Rad dilución 1:4 (7:28) en H₂O tridestilada, se dejó durante 5 min a temperatura ambiente y se leyó a 570 nm en punto fijo.

6.6.7 Análisis estadísticos de ensayos bioquímicos para determinar mecanismos de resistencia

Se realizó utilizando el software SPSS versión 20.0, previo análisis de normalidad y homocedasticidad con pruebas de Shapiro-Wilk y Levene ($\alpha= 0.05$, Zar, 2010). Así como análisis descriptivo de media, desviación estándar con un intervalo de confianza del 95%).

Se correlacionaron los resultados del valor de las absorbancias y el número de los mosquitos de campo (La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas) a fin de establecer el umbral de tolerancia o límite de resistencia, considerando los valores máximos de absorbancia, que para cada enzima se obtuvieron en la cepa susceptible. Con base en dichos valores se obtuvo la proporción de tolerancia en las poblaciones estudiadas de acuerdo con el mecanismo enzimático involucrado. Se realizó además un análisis de ANOVA ($\alpha= 0.05$) para determinar diferencias en la actividad enzimática entre las poblaciones estudiadas.

6.7 Determinación de las mutaciones V1016I y F1534C del gen del canal de sodio dependiente de voltaje, como posibles mecanismos de resistencia basados en el sitio blanco de los insecticidas en poblaciones de *Ae. aegypti* en B.C.S.

6.7.1 Extracción de ADN para *Ae. aegypti*

Se realizó en base al protocolo de extracción de ADN para muestras individuales de mosquitos modificado por Bender, Spierer y Hogness (1983). Se utilizaron 202 larvas de mosquito estadio tardío III, 82 mosquitos correspondieron a La Paz, 60 a San José del Cabo y 60 de Cabo San Lucas. Para la extracción de ADN se colocaron larvas vivas de manera individual en tubos eppendorf de 1.5 mL, que contenían 30 μ L de Solución Pat Romans. Se procedió a macerar durante 10 segundos usando pistilos unidos a un homogeneizador, una vez completado el macerado se continuó a enjuagar cuidadosamente el pistilo dentro del tubo con 30 μ L Pat Romans, se centrifugó durante 6 seg a 13,000 RPM, fin de conseguir que el tampón de extracción quedara al fondo del tubo, posteriormente se procedió a incubar los tubos en un baño seco a 65 °C durante 30 min.

Mientras que los tubos aún se encontraban calientes se añadieron 7 μ L de KAc 8 M a una concentración final de 1 M. Se continuó homogeneizando en bortex los tubos durante 10 seg y se incubaron posteriormente en hielo por 30 min. Después se centrifugo a una velocidad 13,000 RPM durante 15 min a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a tubos eppendorf de 1.5L usando una pipeta, y se adicionaron 100 μ L de EtOH al 100%, se colocaron los tubos durante 5 seg para mezclar y después se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. En seguida se centrifugó durante 15 min a 13,000 RPM retirándose con cuidado lo que restó de EtOH con una pipeta. Luego se agregaron 100 μ L de EtOH frío al 75% y se centrifugó durante 5 min, se retiró el etanol con una micropipeta y nuevamente se agregaron 100 μ L de EtOH frío, pero al 100% de

EtOH. Nuevamente se extrajo el EtOH con una micro pipeta y se colocaron los tubos en Speed Vac durante 10 min, transcurrido este tiempo los tubos se colocaron en el baño seco a 65 °C durante algunos minutos a modo de que los restos de EtOH se volatilizaran.

El ADN en forma de pellets, fue enviado al Laboratorio del Dr. William Black en la Universidad del Estado de Colorado, donde las muestras se resuspendieron en un volumen de 100 a 150 µL de Tris - EDTA (pH 8,0), para determinar las mutaciones V1016I y F1534C del gen del canal de sodio dependiente de voltaje, como posibles mecanismos de resistencia basados en el sitio blanco de los insecticidas.

6.7.2 Amplificación de los alelos Val1016 e Ile1016

Se realizó una sola reacción de PCR en tubo (Saavedra *et al.* 2007).

1. Primers, reactivos y equipos utilizados

- Termociclador Biocycler BIORAD®
- Placas blancas de 96 pocillos para PCR (Bio-Rad MLL9651).
- Tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Agua bi destilada (ddH₂O).
- Cloruro de Magnesio 1.5 mM
- dNTP's 25 nM,
- Primers "alelo específicos" re-suspendidos en TE pH 8.0 para una

concentración final de 500 pmol/µL

Val1016

(5'-[GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCACAAATTGTTTCCCACCCGCACCG]3)

y Ile1016 (5'-[GCGGGCACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA]-3') y un primer anti

sentido Ile1016r 5'-TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC y Taq polimerasa 5U/µL.

2. Se preparó un Máster mix con buffer 10x, agua destilada

ultrapurificada, cloruro de magnesio 1.5 mM, dNTP's 25nM.

3. En cada tubo de PCR se mezclaron por pipeteo 1,5 μ L de ADN y 23,5 μ L del master mix y se colocaron en un termociclador programado a 4 ciclos: 1er ciclo: 95 $^{\circ}$ C x 5 min, 2do ciclo: 95 $^{\circ}$ C x 1min, 60 $^{\circ}$ C x 1min, 72 $^{\circ}$ C x 1.15 min x 29, 3er Ciclo: 72 $^{\circ}$ C x 10min, 4 $^{\circ}$ C x 4 $^{\circ}$ C 24 horas. Tres controles fueron incluidos cada vez que se realizó la PCR: un control homocigoto susceptible (Val1016/Val1016 cepa New Orleans), un homocigoto resistente cepa IMUS (I1016/I1016 población resistente de Isla Mujeres, México) donada por la Dra. Karla Saavedra Rodríguez de Colorado State University y un control negativo que correspondió a agua destilada ultra purificada.

Los productos de PCR, un marcador de peso molecular de 12 bandas (de 25bp a 500 pb HyperLadderTMV, Bioline) y el control negativo se revisaron en geles de agarosa al 3% con bromuro de etidio. La electroforesis se corrió por 20 minutos a 100 V y se visualizó el gel para lo genotipificación según Saavedra *et al.* (2007) mediante fragmentación de productos de PCR de alelos específicos del sistema V1016I. La frecuencia de cada mutación (p), fue calculada como la suma de dos veces el número de homocigotos resistentes y el número de heterocigotos de todo dividido entre $2n$, donde n es el tamaño de la muestra. El intervalo de confianza 95% alrededor de p , fue calculado con el intervalo Wald el cual se basa en la distribución asintótica del estimador de la proporción muestral $\hat{p} = x/n$, donde x representa el número de éxitos en n ensayos, y está definido por:

$$\hat{p} \pm z_{\alpha/2} \sqrt{\hat{p}(1 - \hat{p})/n} \quad (8)$$

Donde $z_{\alpha/2}$ es el cuantil $(1-\alpha/2)$ de la distribución normal estándar (Agresti y Coull, 1998).

6.7.3 Amplificación de los alelos Cis1534

Para identificar la mutación 1534C, se siguió el protocolo de Yanola *et al.* (2011), la cual se basa en ensayos de genotipaje TaqMan SNP y una PCR Alelo-Específica (AS-PCR) y se validaron mediante comparación con la secuenciación

del ADN de cepas de laboratorio homocigotos susceptibles y homocigotos resistentes, sus progenies recíprocamente cruzadas, y mosquitos *Ae. aegypti* de la generación F₁, y de tal manera determinar el fenotipo resistente de las poblaciones de La Paz, Cabo San Lucas y San José del Cabo.

6.7.4 Reacción de PCR

Los reactivos se descongelaron a temperatura ambiente pero se mantuvieron en una cama de hielo. Se calculó el número de reacciones requeridas.

En un tubo eppendorf de 1.5 mL, se procedió a preparar la mezcla master mix de acuerdo con la Tabla IV.

Se mezcló con la micropipeta y se adicionó 19,6 µL de master mix, en cada pozo de la placa de PCR, se adicionó de 0.5 a 1 µL de templado de ADN y se procedió a cubrir la placa con tiras de papel parafilm. Posteriormente se centrifugó la placa durante 2 minutos para asegurar la reacción de la mezcla ubicada en el fondo del pozo. Las condiciones del termociclador y de la curva de fusión se observan en la Tabla V.

Tabla IV. Cantidades de reactivos para preparar la mezcla maestra para la reacción de PCR.

Reactivos	1 rx	10 rx	64rx	96rx
ddH ₂ O	9.53	95.30	610.00	915.0
iQSYBER mix	10.00	100.00	640.00	960.0
Primer	0.06	0.66	4.23	6.4
Cys1534+ Primer	0.20	2.00	13.00	19.3
Phe1534+ Primer P1534-	0.20	2.00	13.00	19.3
Volumen Total (µL)				

*Primers a 50 pmol/ul.

Secuencia Cys 1534+ GCGGGCAGGGCGGGCGGGGGCGGGCCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATGTG

PHE1534+ GCGGGCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATATT

1534- TCTGCTCGTTGAAGTTGTGAT

Tabla V. Condiciones del termociclador.

Temperatura en °C	Tiempo en sec
95	10 x 2
57	10
72	30
95	10
Curva de fusión 65 ° C a 95 °C Incremento 0.55 °C	5
Lectura de placa	

6.7.5 Lectura de resultados

Se procedió a observar los diferentes picos en la curva de fusión, 80 °C correspondió a nuestro producto amplificado con el primer corto, que es específico para el alelo T (códigos de TTC para la fenilalanina o alelo susceptible) y 85 °C correspondió al producto amplificado con el primer largo, el cual es específico para el alelo G (códigos TGC para cisteína o alelo resistente). Cuando ambos picos estuvieron presentes TG (80 °C y 85°C), se consideró como heterocigoto.

6.7.6 Análisis de los datos

Una forma común para interpretar los resultados es mediante el cálculo de la frecuencia del alelo para cada población de mosquitos. En una hoja de cálculo Excel, se agregó la información de cada mosquito analizado de la población La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas. Asimismo se incluyó el genotipo de cada mosquito TT, GG o TG y se contabilizó el número de individuos con cada genotipo: TT, GG o TG.

La frecuencia total del alelo fue calculada por la siguiente fórmula:

$$p^2+2pq+q^2=1 \quad (9)$$

Dónde:

P= No. homocigotos GG

Q= No. homocigotos TT

Pq= No. heterocigotos TG

Para calcular la frecuencia del alelo Cys1534:

$$\text{Frecuencia del alelo GG} = \frac{1 * (\# \text{ heterocigotos TG}) + 2 * (\# \text{ homocigotos GG})}{2 * (\# \text{ total de mosquitos analizados})} \quad (10)$$

Las frecuencias más cercanas a 1 tienen mayores frecuencias del alelo resistente. Se realizó una prueba exacta de Fisher ($\alpha = 0.05$), utilizando la línea GrapPad Software (<http://www.graphpad.com>). El alelo de frecuencia para la mutación V1016 fue calculada para la fórmula de Hardy Weinberg a través del programa de Hardy-Weinberg Calculadora (<http://www.changbiosci.com>).

6.8 Bioensayos para evaluar cuatro sales sódicas como posibles atrayentes para hembras de *Ae. aegypti* en condiciones de laboratorio

El estudio se realizó en el laboratorio de etología química del Centro Regional de investigación en Salud Pública (CRISP), en la ciudad de Tapachula, Chiapas, México, durante diciembre 2013 y junio 2014. Se realizaron dos bioensayos el primero consistió en estudios de electroantenografía (EAG) y el segundo en estudios conductuales, para ello se utilizaron mosquitos hembra de *Ae. aegypti*, cepa susceptible New Orleans, de entre 10-12 horas de emergidas sin alimentar criadas en el insectario a 28 ± 2 °C, con una humedad relativa de $75 \pm 5\%$, y un fotoperiodo de 12:12 (L:O).

6.8.1 Sales sódicas utilizadas para los bioensayos con *Ae. aegypti*

Se utilizaron cuatro sales sódicas (Tabla VI). Se realizaron mezclas a las siguientes concentraciones: 50 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm y 500 ppm, para cada sal sódica con agua (H₂O) y alcohol (OH) marca Sigma-Aldrich a 96% de pureza. Para determinar si existió respuesta antenal a los diferentes olores, se

utilizó como control negativo aire y como control positivo octenol (1-octen-3-ol) con 98% de pureza marca Sigma-Aldrich, el cual ha probado ser un compuesto atractivo para *Ae. aegypti* (Takken y Kline, 1989; Kline *et al.*, 1990; Takken *et al.*, 1997; Takken y Knols, 1999; Grant y Dickens, 2011).

6.8.2 Estudios electrofisiológicos

Para determinar la respuesta olfativa a las diferentes sales sódicas y

Tabla VI. Compuestos evaluados como atrayentes de alimentación en *Ae. aegypti*

Sales sódicas	Composición química	Marca	Concentración (%)
Citrato de sodio	$C_6H_2NaO_7$	Sigma	99.5
Fumarato de sodio	$C_4H_7Na_2O_4$	Sigma	90
Propionato de sodio	$C_3H_5NaO_2$	Sigma	98
Succinato de sodio	$C_4H_7Na_2O_4$	Fluka	98

concentraciones, se utilizó el sistema de electroantenografía (EAG) utilizado en entomología para realizar bioensayos experimentales para la detección de compuestos volátiles percibidos por el aparato olfativo antenal de los insectos, de acuerdo con el método de Schneider (1957) y modificado por Qiu (2004), basado en la lectura de las fluctuaciones del voltaje registrado por la tensión entre la punta y la base de una antena del mosquito, durante la estimulación con kaeromonas, asumiendo que tal variación es causada por la despolarización eléctrica de muchas neuronas olfativas en la antena. Para lo anterior se usaron cinco antenas de cinco mosquitos hembra, con ayuda de una pinza se amputó una antena a cada hembra, la amputación fue desde la base de la antena y se procedió a colocarla en el sistema (EAG) donde se encuentran dos electrodos que componen el circuito eléctrico del mismo, el primero es llamado electrodo de registro donde se coloca la base de la antena y el segundo nombrado electrodo de tierra en el que se ubica el último segmento de la antena; ambos electrodos están cubiertos

con un capilar relleno de solución Ringer (7.0 g de NaCl, 0.3 g de KCl, 0.20 g de NaHCO₃ y 1 mL de H₂O) (Qiu, 2004). Las señales generadas por la antena se analizaron, usando un programa de computadora desarrollado por Syntech® (Syntech NL 1200, Hylversum Holanda).

Para la estimulación se expuso la antena a una corriente de aire limpio con flujo continuo de 1 mL/min, conducido por medio de una manguera nombrada tygon, hacia uno de los extremos de un tubo de metal (15 x 1 cm de diámetro).

Se impregnaron 20 µL de la muestra de cada una de las mezclas y concentraciones de olor a probar (Tabla VI), en pedazos de papel filtro Whatman (No. 2) de 2cm², los cuales se colocaron dentro de una pipeta Pasteur cada uno de ellos de acuerdo a la metodología de Meijerink *et al.* (2000). La pipeta Pasteur fue conectada a la manguera tygon que proporcionaba el flujo de aire y por arrastre de la corriente de aire producido por el (EAG), se condujo el aroma contenido en el papel filtro hacia la antena del mosquito (estímulo). Para cada tratamiento se realizaron diez "puff" (repeticiones), el tiempo de duración del estímulo fue de 1 seg, los estímulos se realizaron con una diferencia de 25 segundos entre cada uno de ellos. La actividad del estímulo se interpretó en el (EAG), al observar sobre la pantalla una súbita deflexión de la línea base hacia abajo, en el instante de realizar el "puff" (Meijerink *et al.*, 2000). Se utilizaron en total cinco antenas de mosquito hembra, en cada una de las antenas se realizaron 10 repeticiones por concentración de cada mezcla de H₂O y OH, un total de 60 estímulos para cada antena, considerando las cuatro sales sódicas y los dos controles fueron contabilizados y evaluados.

6.8.3 Estudios conductuales

Una vez evaluados las sales sódicas en el sistema (EAG), se determinó la concentración que dio mayor respuesta antenal y posteriormente se utilizó el sistema desarrollado por Grieco *et al.* (2007), denominado High Throughput Screening System Showing (HITSS), que consta de módulos de ensayo para la

investigación rápida de los compuestos químicos, este sistema permite evaluar dos respuestas de comportamiento; irritación de contacto y repelencia espacial, así como la toxicidad de insecticidas en mosquitos adultos y realizar réplicas múltiples con varios tratamientos en periodos cortos de tiempo, tiene un área superficial donde se aplica el tratamiento lo que reduce al mínimo la cantidad de producto químico a probar y puede descontaminarse fácilmente y proporciona resultados constantes dentro de los tratamientos (Figura 5). En este estudio este sistema se utilizó para determinar si la mayor respuesta de la señal antenal que se obtuvo en el sistema de electroantenografía corresponde a la atracción o repelencia espacial de *Ae. aegypti* a los volátiles de las sales sódicas, asimismo se utilizó como sinergista el ácido láctico y el octenol los cuales han sido referidos como atrayentes de alimentación para esta especie (Geier *et al.*, 1996).

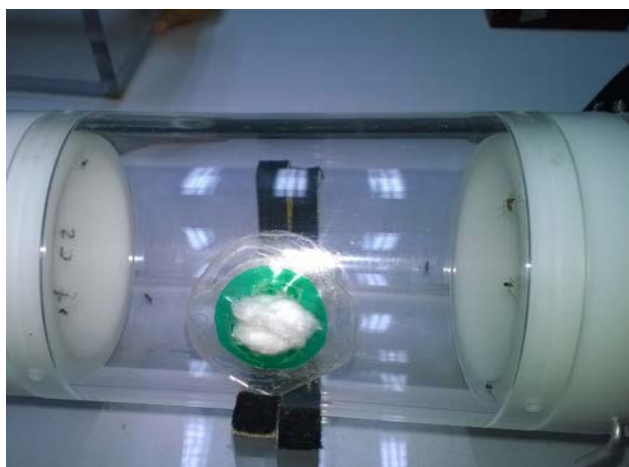


Figura 5. Sistema High Throughput Screening System Showing (HITSS) (Grieco *et al.*, 2007).

Para este bioensayo se utilizaron un total de 720 hembras, las cuales se expusieron en grupos de 15 insectos, se realizaron seis repeticiones por cada mezcla y concentración a evaluar para las cuatro sales sódicas.

6.8.4 Análisis estadístico de bioensayos con atrayentes orgánicos en laboratorio para captura de adultos de *Ae. aegypti*

Para determinar las diferentes respuestas de *Ae. aegypti* a los tratamientos (sales sódicas, mezclas y diluciones) tanto en el caso de la respuesta de la señal antenal y la respuesta conductual obtenida con el sistema HITSS, se usó un análisis de ANOVA y para identificar los agrupamientos se aplicó una prueba de Tukey *Post hoc* (significancia $\alpha= 0.05$). Previo análisis de normalidad y homocedasticidad con pruebas de Shapiro-Wilk y Levene ($\alpha= 0.05$, Zar, 2010) respectivamente, adicionalmente se realizó la prueba U de Mann-Whitney, para distinguir entre dos tratamientos, la preferencia de las hembras.

7. RESULTADOS

7.1 Fluctuación espacio temporal de *Ae. aegypti*

7.1.1 Abundancia de *Ae. aegypti* evaluada con indicadores entomológicos larvales. (ICP, IRP e IB)

Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$), entre los valores de los índices entomológicos (ICP, IRP e IB) previos y posteriores a las actividades de control larvario. Los mayores valores de los índices se registraron en LAP, con un ICP que varió entre 18-78%, un IRP de 8-35% y un IB de 50-380%. Con respecto a SJC y CSL, se obtuvieron valores similares en ambos casos, con un ICP de 2-40%, un IRP de 1-18% y un IB de 5-150% (Figura 6a, c y e). Los índices larvales posteriores a la intervención, disminuyeron de forma significativa en una proporción menor al 10% (Figura 6b, d y f).

Con respecto a la variación estacional de los índices por localidad, se encontró que estos presentan un comportamiento distinto a lo largo del año. En LAP, los valores más abundantes de ICP previos a las intervenciones de control larvario, se presentaron en los meses de enero, abril, julio y octubre (52-61% respectivamente), los valores mínimos se obtuvieron en junio y agosto (29-34%). El ICP posterior a las intervenciones, se redujo considerablemente (1-3%) y presentó diferencias significativas ($F = 430.03$, $p < 0.05$) con el ICP previo. En el caso de SJC, al comparar la variación mensual del ICP previo, el mayor valor se encontró en octubre (34.7%), los valores mínimos se obtuvieron entre enero y marzo (1-15%). El ICP posterior, se redujo significativamente del 3-5% ($F = 219.78$, $p < 0.05$).

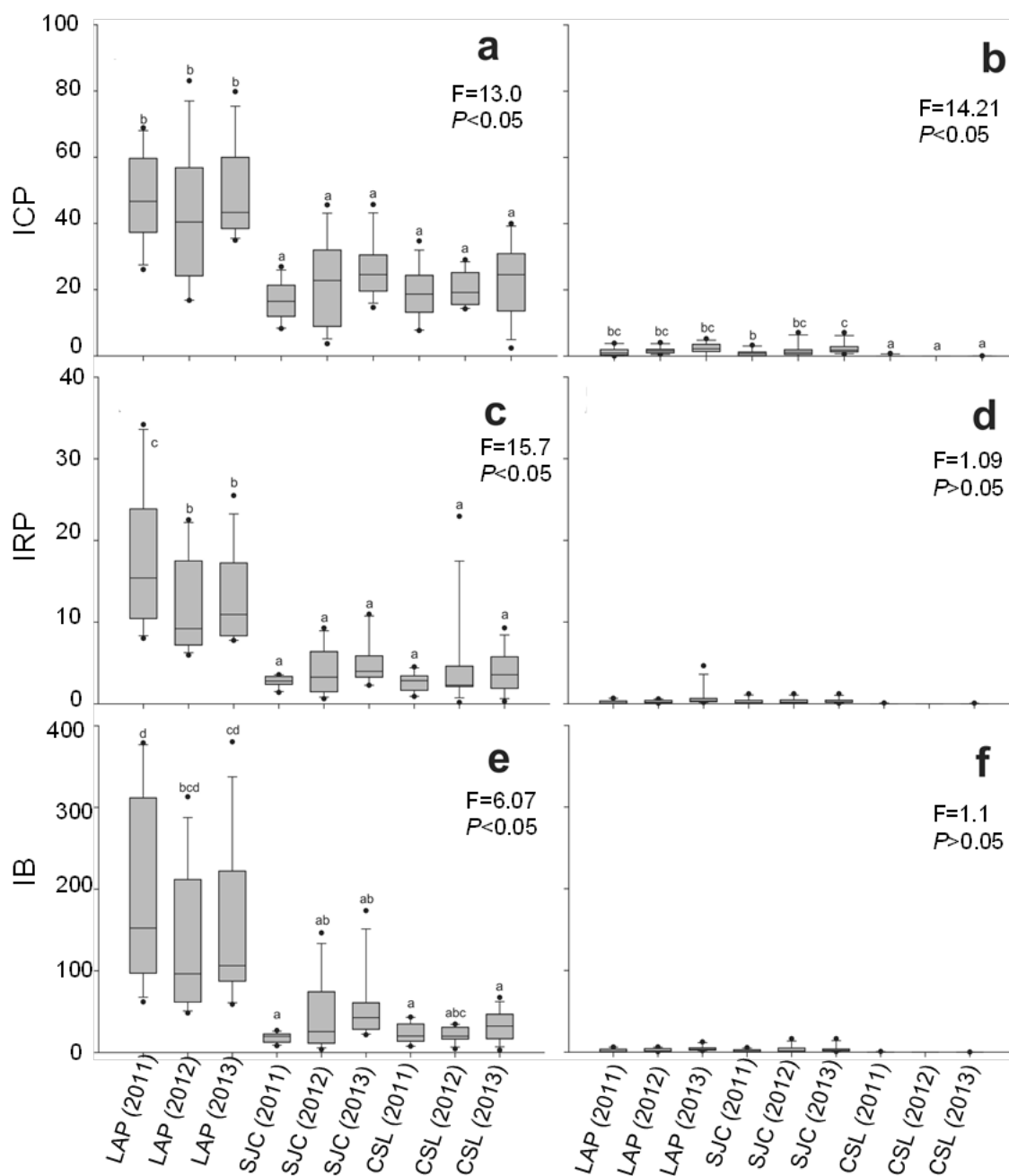


Figura 6. Valores anuales de los tres indicadores entomológicos (ICP, IRP e IB) previos a la intervención de control larvario de *Ae. aegypti* (a, c y e) y posterior a la intervención (b, d y f) en tres localidades (La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas, B.C.S.) durante el período de estudio 2011-2013.

En CSL los valores de ICP más elevados se registraron de septiembre a noviembre (27-31%), y el ICP posterior a las intervenciones fue menor al 1%, con diferencias significativas ($F= 560.09, p<0.05$) (Figura 7).

El IRP de LAP previo a las intervenciones presentó los máximos valores de abril a noviembre (17-21%). El IRP posterior fue significativamente menor al 1% ($F= 12.41, p<0.05$). En SJC, el IRP previo tuvo su máximo valor en octubre (7.5%), los mínimos en marzo y mayo (2-2.25%). El IRP posterior, se redujo significativamente a 1.2% ($F= 71.23, p<0.05$). En CSL los valores más elevados del IRP se registraron de septiembre a noviembre (5-12%) y los mínimos de enero y abril (1.6 y 2.2%). Los IRP posteriores fueron significativamente menores a 0.1% ($F= 34.05, p<0.05$) (Figura 8).

Con referencia al IB previo a las intervenciones, en LAP se obtuvieron los máximos valores en enero, abril, octubre y noviembre (213-238%). El IB posterior a éstas fue significativamente menor al 5% ($F= 22.7, p<0.05$). En SJC, el IB previo tuvo sus máximos valores de agosto a diciembre (40.6 a 111%), los mínimos se presentaron en marzo y abril (15.4-19.1%). El IB posterior, se redujo significativamente menor a 5% ($F= 32.5, p<0.05$). En CSL los valores más elevados del IB previo se presentaron de septiembre a noviembre (33-52%) y los mínimos en marzo y abril (13.7-17%). Los IB posteriores fueron significativamente menores a 0.1% ($F= 6.0, p<0.05$) (Figura 9).

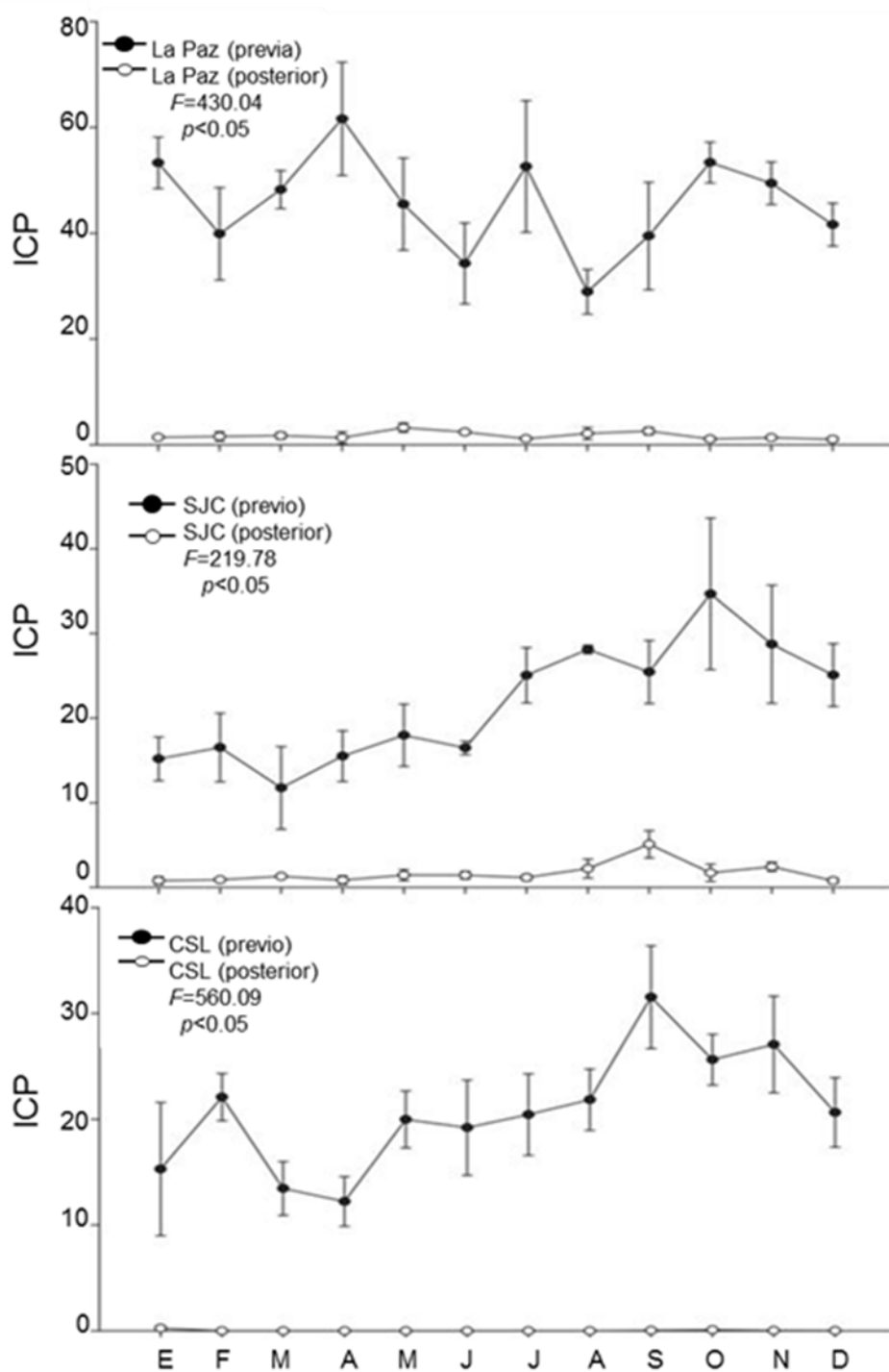


Figura 7. Valores mensuales para el Índice de casas positivas a la frecuencia de larva de *Ae. aegypti* en las tres localidades del estudio (La Paz, San José del Cabo, Cabo San Lucas, B.C.S.) en el período 2011-2013.

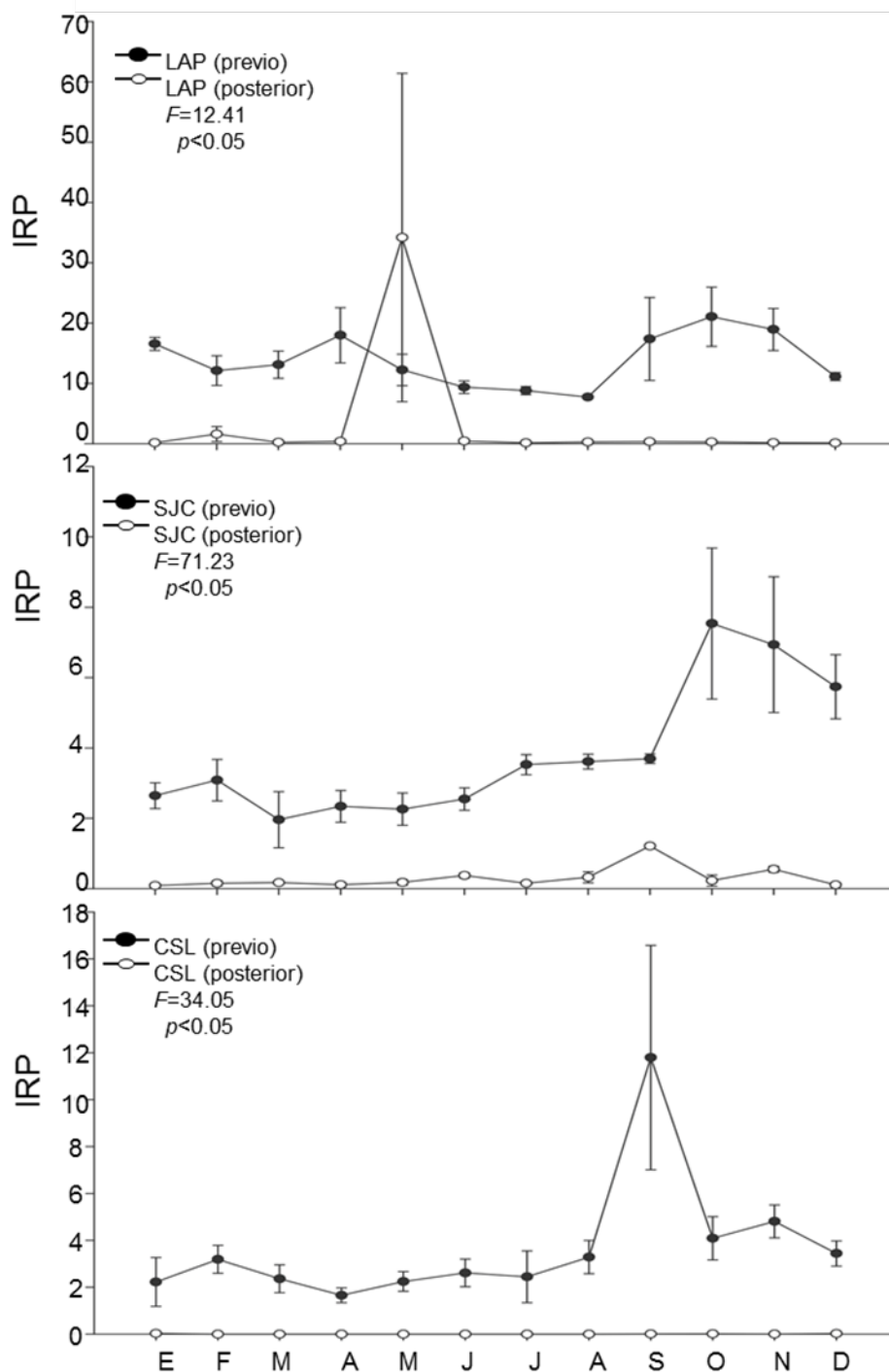


Figura 8. Valores mensuales para el Índice de recipientes positivos (IRP) a la frecuencia de larvas de *Ae. aegypti* en las tres localidades del estudio (La Paz, San José del Cabo, Cabo San Lucas, B.C.S.) en el período 2011-2013.

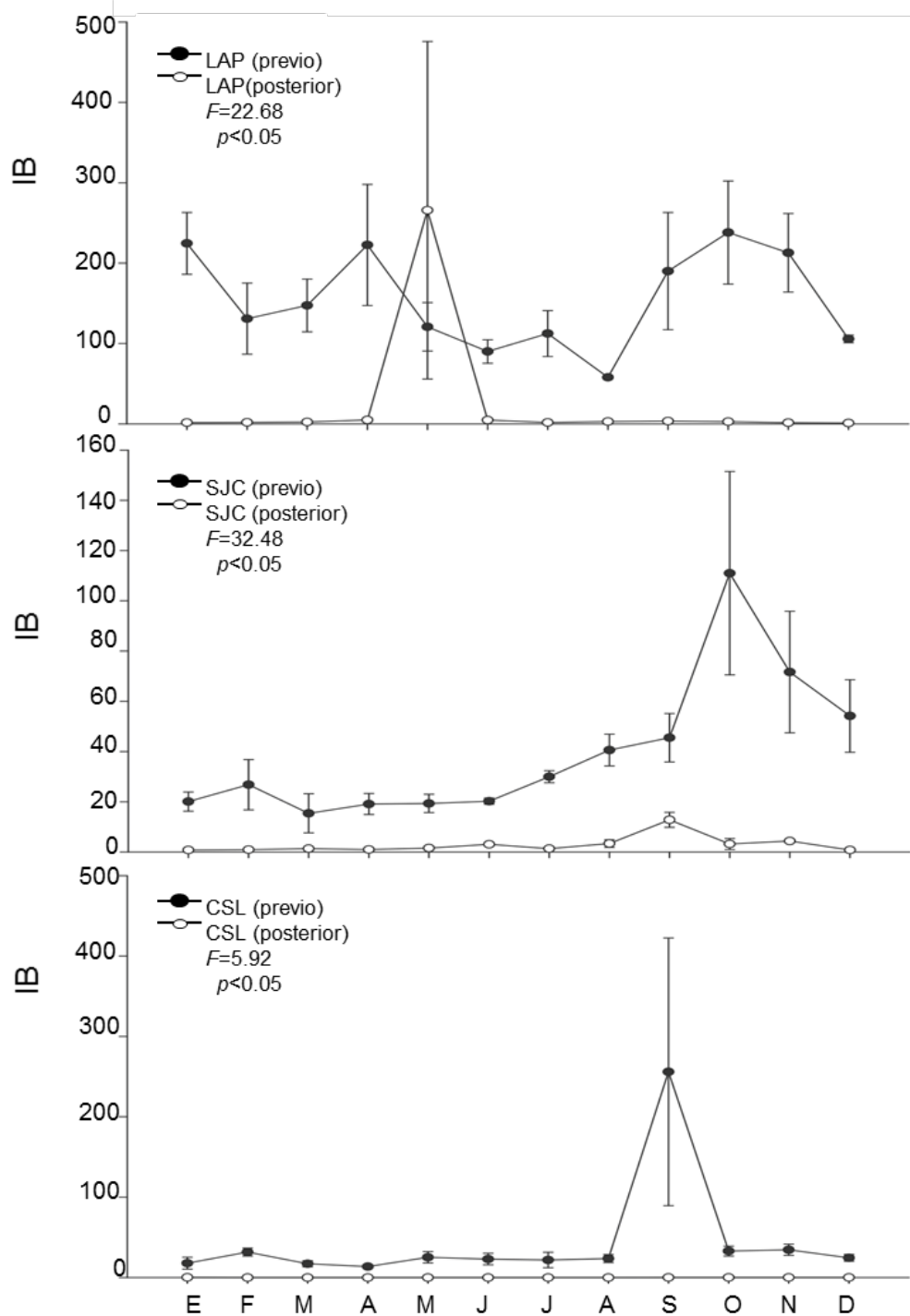


Figura 9. Valores mensuales para el Índice de Breteau (IB) a la frecuencia de larvas de *Ae. aegypti* en las tres localidades del estudio (La Paz, San José del Cabo, Cabo San Lucas, B.C.S.) en el período 2011-2013.

7.1.2 Abundancia de *Ae. aegypti* utilizando indicadores entomológicos de ovitrampas (IOP e IDH)

Durante el periodo de enero 2011 a diciembre 2013, se colocaron un total de 186, 590 ovitrampas con las que se colectaron 3, 129,203 huevos de *Aedes* de los cuales 2, 477,935 (79%) se obtuvieron en La Paz LAP y 651, 268 (21%) en Los Cabos (SJC y CSL). Los índices entomológicos: número promedio de huevos (NMH), índice de ovitrampas positivas (IOP) e índice de huevos (IDH), mostraron diferencias significativas ($p < 0.005$) entre ambas localidades al registrar un mayor nivel en LAP que en LC. Al analizar tales diferencias con ORs se obtuvieron valores para LAP y LC de 1.8 y 1 ($p < 0.05$) respectivamente, lo que indica que en LAP existe un 64% de probabilidad de que las ovitrampas colocadas presenten huevos en comparación con el 50% obtenido en LC (Tabla VII).

Tabla VII. Indicadores Entomológicos de *Ae. aegypti*: número promedio de huevos (NMH), índice de ovitrampas positivas (IOP) e índice de huevos (IDH) y número de huevos colectados en ovitrampas en dos regiones de Baja California Sur, México

Localidad	Número de huevos	Ovitrampas revisadas	Ovitrampas positivas	IOP (%)	IDH	MNE	IOP: de OR para tendencia lineal
LAP	2477935	105820	39512	37.34	62.71	1058.20	1.8
LC	651268	80770	19920	24.66	32.69	807.70	1

χ^2 de tendencia lineal.

IOP, índice de ovitrampas positivas; IDH, índice de huevos; MNH; media del número de huevos.

7.1.3 Análisis interanual e intermensual de la abundancia de huevos de *Ae. aegypti*

Los análisis de varianza de los promedios anuales de huevos para los tres años de estudio en LAP, no mostraron diferencias significativas ($\chi^2= 2.482$, $p= 0.0990$), aunque destaca 2013 por presentar las mayores abundancias registradas. En LC en cambio sí hubo diferencias significativas ($F= 5.76$, $p\leq 0.011$), al encontrar una mayor abundancia en 2013 que 2011 y 2012 (Figura 10).

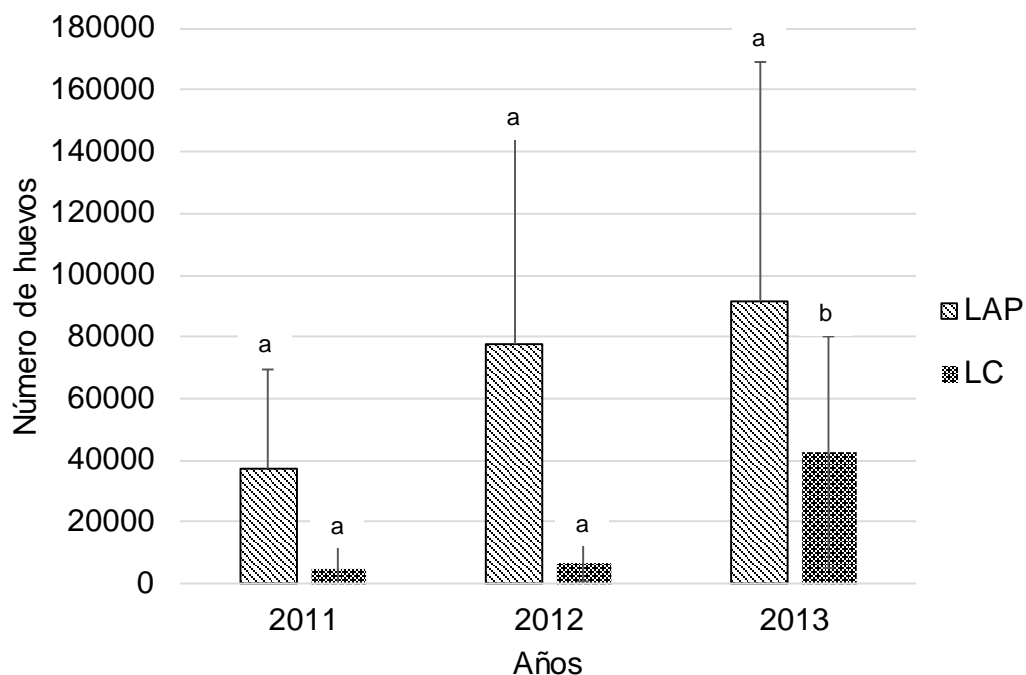


Figura 10. Número de huevos de *Ae. aegypti* por año en La Paz (LAP) y Los Cabos (LC) para el periodo enero 2011 – diciembre 2013.

Con respecto al análisis intermensual, el número de huevos fue superior a 50,000 en LAP de mayo a diciembre, con el máximo nivel en octubre equivalente a 164,083 (Figura 11a). Por el contrario en LC los meses con mayor abundancia de huevos fue de julio a diciembre, con un mayor nivel en septiembre equivalente a

46735 huevos (Figura 11b). Por lo anterior, el resultado del análisis de varianza de los promedios mensuales de huevos obtenidos en LAP, presentaron diferencias significativas ($F= 121.8494$, $p= 0.0001$), no así para LC ($F= 0.5984$, $p= 0.7924$).

En LC no existió diferencia entre meses $p>05$, sin embargo, las mayores abundancias fueron septiembre, octubre y noviembre (46734.7 ± 64309.3 ; 43425.3 ± 51501.7 ; 28768.7 ± 32664) (Figura 11b).

7.1.4 Análisis interanual e intermensual de las variables ambientales

La Tabla VIII muestra los resultados de los análisis de variancia interanual realizados con las variables ambientales. En LAP hubo diferencias significativas ($p \leq 0.0057$) en referencia a la temperatura promedio anual, ya que en 2011 fue menor (24.88 ± 7.01 °C) que en 2012 y 2013 (25.66 ± 4.90 y 25.21 ± 4.81 °C), la temperatura máxima fue significativamente diferente ($\chi^2= 9.1124$, $p= 0.0105$), al obtener un valor promedio de 31.87 ± 5.80 °C en 2013, que a su vez fue menor que los obtenidos en 2011 y 2012 (37.58 ± 4.20 y 37.91 ± 4.18 °C). Asimismo, al comparar la humedad relativa de cada año, el 2013 presentó menor valor (58.66 ± 6.11) que 2011 (63.58 ± 5.88) y 2012 (64.55 ± 5.066) ($p= 0.0375$).

En LC la temperatura mínima del 2013 (16.67 ± 3.52 °C), presentó diferencias significativas ($\chi^2= 6.4141$, $p= 0.0405$), con las obtenidas en 2011 (12.72 ± 5.46 °C) y 2012 (11.58 ± 4.3 °C). Con la temperatura máxima hubo también diferencias significativas ($\chi^2= 12.2044$, $p= 0.0022$) al presentarse 37.41 ± 3.02 °C, como promedio en el 2012, 32.25 ± 7.3 °C en el 2011 y 31.17 ± 3.02 °C en 2013. Con la precipitación pluvial, no se encontraron diferencias significativas entre ambas localidades y años de estudio (Figura 12e y f).

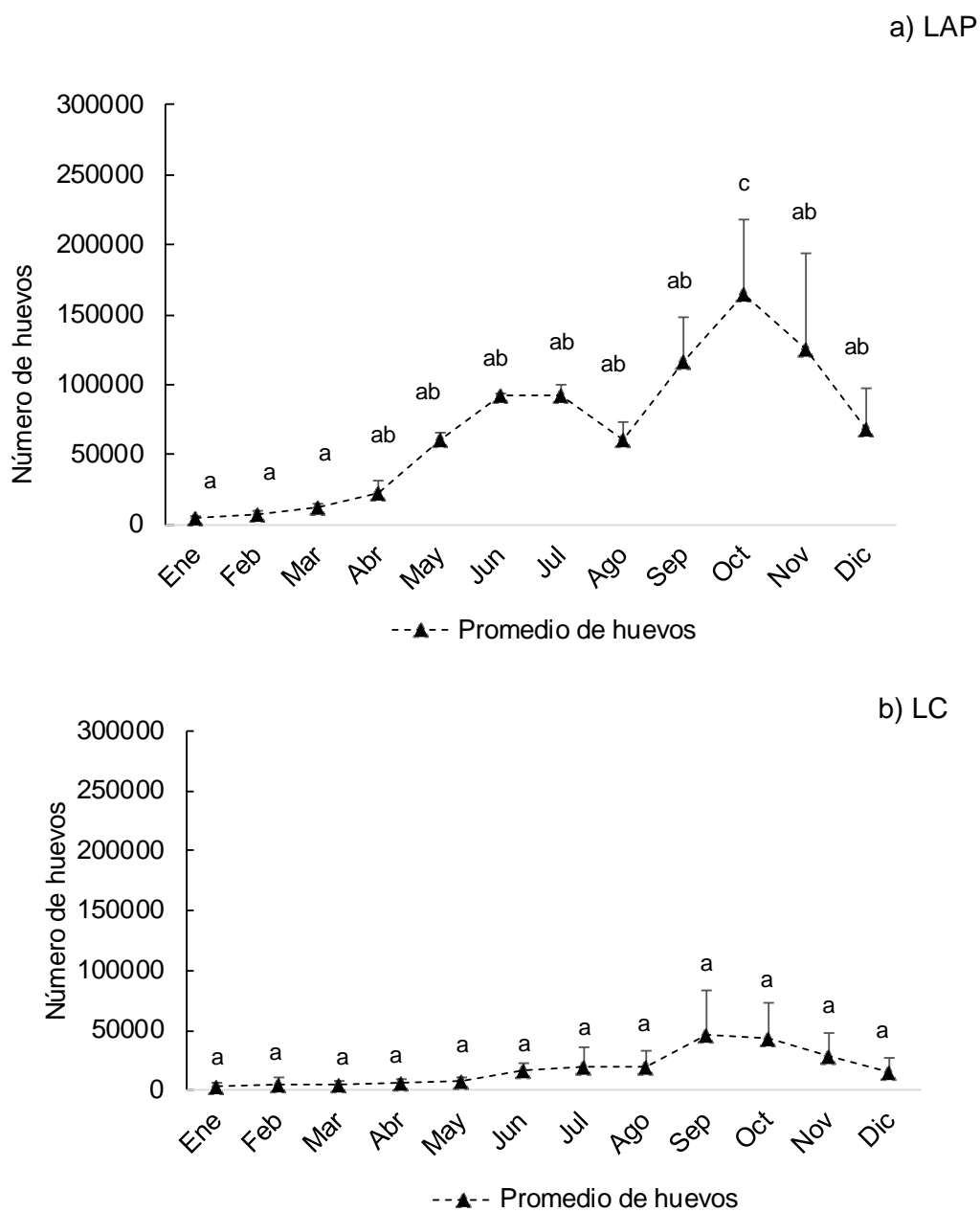


Figura 11. Número de huevos de *Ae. aegypti* por mes en: a) La Paz (LAP) y b) Los Cabos (LC) para el periodo de estudio enero 2011-diciembre 2013.

Tabla VIII. Resultados del análisis de varianza realizado a las variables ambientales entre años en La Paz (LAP) y Los Cabos (LC) para el periodo de estudio enero 2011- diciembre 2013.

Variables Ambientales	La Paz						Los Cabos					
	F	Significancia	Año	Subgrupo ¹	Año	Subgrupo ²	F	Significancia	Año	Subgrupo ¹	Año	Subgrupo ²
Temp. Promedio	6.06	0.0057 **	2011	24.088 ± 7.01	2012	25.66 ± 4.90	χ^2	Prob>> χ^2	-	-	-	-
			2013	25.21 ± 4.81	1.68	0.4303 ++	-	-	-	-		
Temp. Mínima	2.26	0.12052**	-	-	-	-	χ^2	Prob>> χ^2	2013	16.67 ± 3.52	2011	12.72 ± 5.46
			2013	31.87 ± 5.80	2011	37.58 ± 4.20	6.41	0.0405 ++	2012	11.58 ± 4.3		
Temp. Máxima	9.11	0.0105 ++	-	-	-	-	χ^2	Prob>> χ^2	2012	37.41 ± 3.02	2011	32.25 ± 7.3
			2012	37.91 ± 4.18	12.20	0.0022 ++	2013	31.17 ± 3.02				
Precipitación.	1.80	0.1988 *	-	-	-	-	F Ratio	Prob>>F	-	-	-	-
			2013	58.66 ± 6.11	1.41	0.2693 *						
Humedad Relativa	3.63	0.0375 **	2011	63.58 ± 5.88	2012	64.55 ± 5.06	χ^2	Prob>> χ^2	-	-	-	-
			2012	64.55 ± 5.06	1.22	0.5428 ++						

* Prueba de igualdad de medias Anova de Welch

** Prueba de Anova de T-Student.

++Prueba de Kruskal-Wallis.

El análisis de varianza intermensual realizado permite distinguir una época fría compuesta por los meses de enero a abril y una cálida de junio a noviembre. Entre estos periodos se obtuvieron diferencias significativas particularmente con la temperatura mínima (Figura 12a y b) y máxima (Figura 12c y d), así como con la humedad relativa (Figura 12 e y f). Con respecto a la precipitación el análisis no pudo realizarse por la ausencia de lluvias en la mayoría de los meses, restringiéndose este evento solamente de julio a noviembre.

7.1.5 Análisis de correlación entre el número total de huevos *Ae. aegypti* y las variables ambientales

La Tabla IX muestra las correlaciones entre el número de huevos y las variables ambientales. La mayor correlación (superior o igual al 0.6%), se encontró entre el número de huevos y la temperatura mínima en ambas áreas (Rho= 0.607 y 0.714, LAP y LC respectivamente, $p \leq 0.01$). Con respecto a la precipitación en LAP se encontró una asociación a un mes de retraso (Rho= 0.508, $p = 0.01$), y para la humedad relativa no se encontró una correlación en ambas áreas.

Tabla IX. Valores del coeficiente de correlación calculado entre el número de huevos de *Ae. aegypti* y parámetros ambientales para La Paz (LAP) y Los Cabos (LC).

Variable ambiental /indicador	Huevos				%IOP				%IDH			
	LAP		LC		LC		LAP		LC			
	Rho	p>	Rho	p>	Rho	p>	Rho	p>	Rho	p>		
Temperatura promedio	0.59 **	.000	0.395 *	0.017	0.398 *	0.160	0.521 **	0.001	0.55 **	0.001	0.367 *	0.028
Temperatura mínima	0.607 **	.000	0.714 **	.000	0.2	0.242	0.552**	0.000	0.392 *	0.018	0.666`**	0.000
Temperatura maxima	0.325	.053	-0.026	0.882	0.562 **	0.000	0.316	0.060	0.635 **	0.000	-0.044	0.800
Precipitación	0.371 *	.026	0.397 *	0.017	0.342 *	0.327	0.401*	0.150	0.293	0.082	0.391 *	0.180
Precipitación a 1 mes de retraso	0.508 **	0.002										
Humedad relativa	0.055	0.749	0.188	0.271	0.303	0.072	0.391*	0.180	0.204	0.232	0.225	0.186
Humedad relativa a 1 mes de retraso	0.33	0.053										

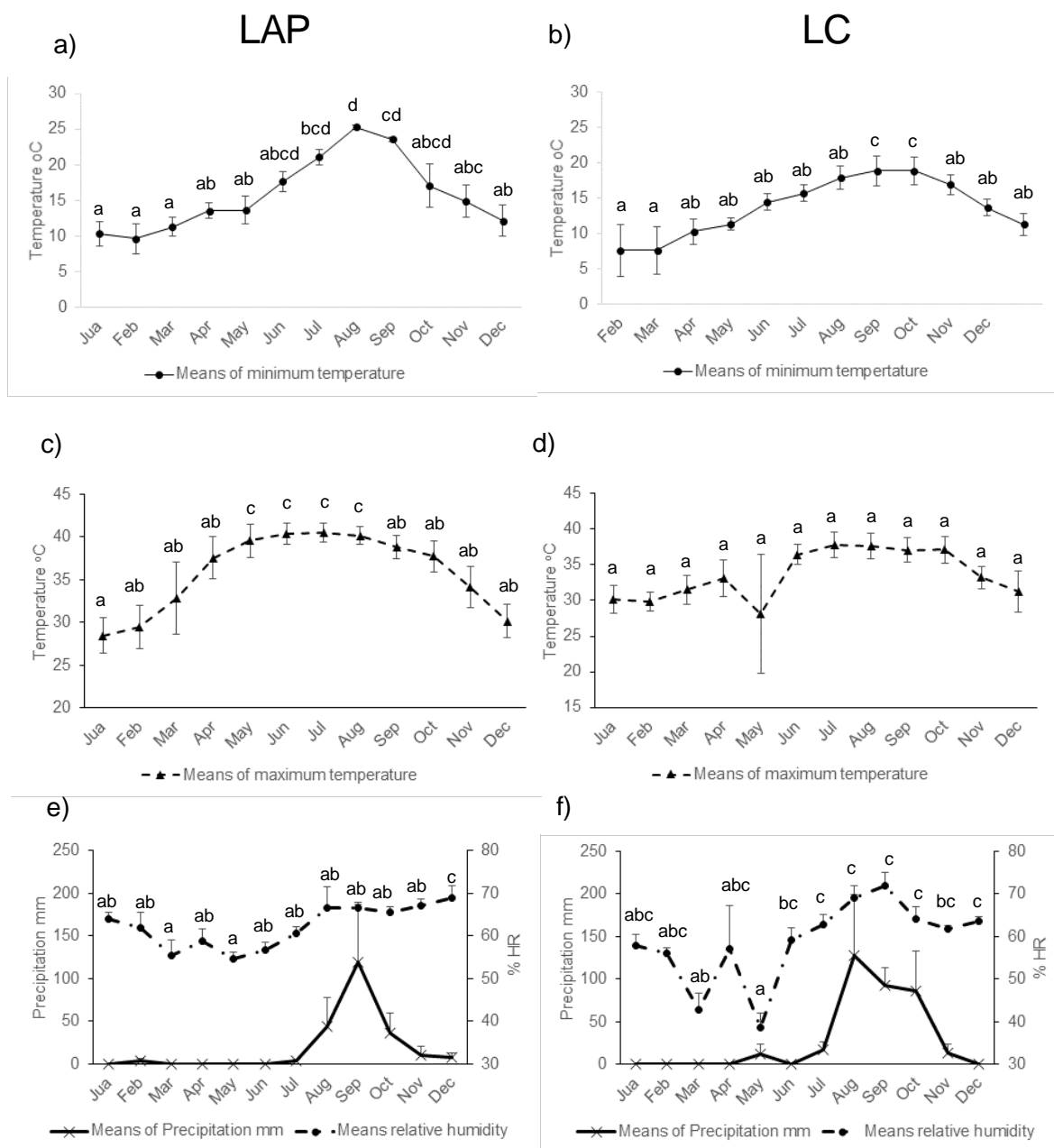


Figura 12. Promedio de valores de variables ambientales en dos áreas: a) promedio de temperatura mínima en La Paz, b) promedio de temperatura mínima en Los Cabos, c) promedio de temperatura máxima en La Paz, d) promedio de temperatura máxima en Los Cabos, e) promedio de precipitación y valores de humedad relativa en La Paz, f) promedio de precipitación y valores de humedad relativa en Los Cabos, durante el periodo de estudio de enero 2011 a diciembre 2013.

7.1.6. Patrones intermensuales del número total de huevos de *Ae. aegypti* y las variables ambientales

Cabe resaltar que de septiembre a noviembre se obtuvo el mayor número de huevos, en ambas localidades, en el caso de LAP fueron $135, 260 \pm 83,394$ (Figura 11a), que coincide con un promedio de temperatura mínima de 18.50 ± 5.3 °C (Figura 11a), temperatura máxima de 36.88 ± 3.54 °C (Figura 12c), precipitación de 55.44 ± 81.56 mm y HR de $66.44\% \pm 2.01\%$ (Figura 12e). En LC se registraron 39643 ± 45082 huevos durante dicho periodo (Figura 11b), con un promedio de temperatura mínima de $16,43 \pm 3.24$ °C (Figura 12b), temperatura máxima de 35.81 ± 3.20 °C (Figura 12d), precipitación de $64,09 \pm 58.88$ mm y HR de $65.90\% \pm 5.98\%$ (Figura 12f).

7.2 Susceptibilidad en larvas de *Ae. aegypti* expuestas a temefos

La Tabla X muestra los intervalos de confianza para las CL_{50} y CL_{99} de los resultados obtenidos de la línea base para el insecticida Temefos en las diferentes poblaciones de *Ae. aegypti*, la concentración letal CL_{50} alcanzada a las 24 horas de exposición para la cepa susceptible New Orleans de esta especie fue de 0.008 mg/l ($\chi^2= 0.118$, $p \leq 9.488$, para la población de La Paz, de 0.026 mg/l ($\chi^2= 5.46$, $p= 0.65$), en San José del Cabo de 0.20 mg/l ($\chi^2= 1.067$, $p \leq 0.899$), y en Cabo San Lucas de 0.66 mg/mL ($\chi^2= 0.164$, $p= 0.983$) (Figura 13).

Tabla X. Concentración Letal media (CL₅₀) calculada para el insecticida temefos en las poblaciones de campo y susceptible de *Ae. aegypti*.

Probabilidad PROBIT	New New Orleans		La Paz		San José del Cabo		Cabo San Lucas	
	Concentración mg/l	Intervalo	Concentración mg/l	Intervalo	Concentración mg/l	Intervalo	Concentración mg/l	Intervalo
0.01	0.001	0.001 ± 0	0.008	0.004 ± 0.012	0.003	0.002 ± 0.004	0.006	0.003 ± 0.01
0.05	0.002	0.002 ± 0	0.011	0.006 ± 0.16	0.005	0.004 ± 0.007	0.012	0.007 ± 0.019
0.15	0.004	0.003 ± 0	0.015	0.009 ± 0.21	0.008	0.007 ± 0.01	0.023	0.014 ± 0.032
0.5	.008	0.008 ± 0.01	0.026	0.018 ± 0.32	0.02	0.018 ± 0.023	0.066	0.051 ± 0.079
0.85	.020	0.019 ± 0.02	0.043	0.036 ± 0.49	0.049	0.046 ± 0.054	0.189	0.167 ± 0.216
0.9	0.024	0.022 ± 0.03	0.049	0.042 ± 0.55	0.061	0.056 ± 0.068	0.243	0.213 ± 0.283
0.95	.033	0.003 ± 0.04	0.059	0.053 ± 0.065	0.083	0.074 ± 0.096	0.352	0.301 ± 0.43
0.99	.058	0.05 ± 0.07	0.083	0.075 ± 0.096	0.148	0.124 ± 0.187	0.706	0.557 ± 0.977

Intervalo de confianza al 95% del límite inferior y superior.

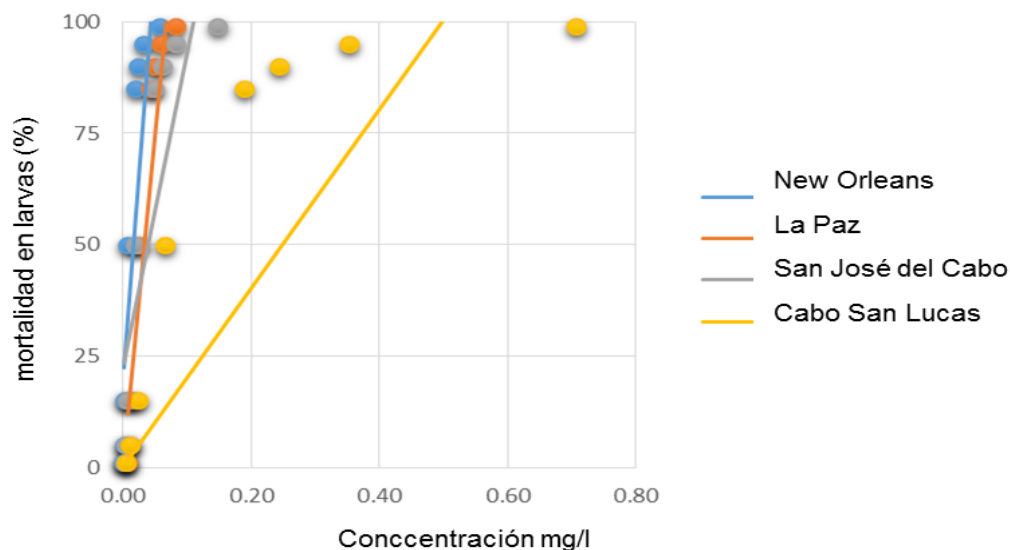


Figura 13. Línea base calculada para las poblaciones de *Ae. aegypti* de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas para el insecticida temefos, en B.C.S., México.

El factor de resistencia calculado para cada una de las poblaciones de campo de *Ae. aegypti* con respecto a la cepa susceptible New Orleans, se muestra en la Tabla XI, como puede apreciarse solamente la población colectada en Cabo San Lucas, fue la que mostró resistencia al Temefos de acuerdo con la OMS.

Tabla XI. Susceptibilidad a Temefos en las poblaciones de *Ae. aegypti* de las localidades: La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas de B.C.S., México.

Población de <i>Ae. aegypti</i>	CL ₅₀	FR ₅₀	Susceptibilidad (WHO 2013)
La Paz	0.026	3.25	Susceptible
San José del Cabo	0.020	2.5	Susceptible
Cabo San Lucas	0.066	8.25	Resistencia moderada
New Orleans	0.008	1	

Factor de resistencia calculado de acuerdo al criterio de la WHO (2013).

7.3 Susceptibilidad de adultos de *Ae. aegypti* a insecticidas

7.3.1 Susceptibilidad a piretroides permetina, deltametrina y, bifentrina.

Los resultados obtenidos para todos los insecticidas probados se muestran en la Tabla XII.

Tabla XII. Resultados de las pruebas de susceptibilidad de acuerdo a la WHO (2013) de *Ae. aegypti* colectados en tres localidades: La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.

Insecticida	Población	DD µg/mL	N	TL ₅₀ (min)	Intervalo de Confianza	TL ₉₉ (min)	Intervalo de Confianza	% de mortalidad	FR ₅₀	Susceptibilidad
Permetrina	San José	15	240	9.6003	7.41 - 11.93	58.21	55.20 - 61.45	100.00	1.02	*
	San Lucas		240	11.13	8.79 - 13.61	89.67	86.39 - 93.20	69.00	1.18	***
	La Paz		240	10.552	8.27 - 12.98	71.22	68.06 - 74.60	98.33	1.12	*
	New Orleans		240	9.4291	7.23 - 11.71	20.65	18.10 - 23.33	100.00		*
Deltametrina	San José	15	240	11.1454	8.80 - 13.62	77.06	73.84 - 81.01	100.00	1.06	*
	San Lucas		240	21.6469	18.63 - 24.78	101.69	98 - 105.63	95.41	2.06	**
	La Paz		240	10.966	8.63 - 13.42	51.19	48.16 - 54.42	100.00	1.05	*
	New Orleans		240	10.4833	8.18 - 12.88	28.27	25.53 - 31.18	100.00		*
Bifentrina	San José	15	240	26.495	23.27 - 29.82	76.60	72.92 - 80.49	72.20	2.46	***
	San Lucas		240	25.769	22.56 - 29.06	55.59	51.96 - 59.43	65.41	2.40	***
	La Paz		240	11.712	9.31 - 14.24	61.32	58.17 - 64.67	100.00	1.09	*
	New Orleans		240	10.749	8.44 - 13.19	50.22	47.21 - 53.43	100.00		*
Malation	San José	50	240	47.462	43.62 - 52.34	71.62	67.59 - 75.71	94.50	1.70	**
	San Lucas		240	47.44	43.60 - 51.32	76.08	72.03 - 80.20	100.00	1.69	*
	La Paz		240	44.662	40.88 - 48.48	85.92	81.84 - 90.07	100.00	1.60	*
	New Orleans		240	27.996	24.69 - 31.36	55.96	52.34 - 59.67	100.00		*
Clorpirifos	San José	60	240	46.905	43.07 - 50.77	81.05	76.97 - 85.19	99.00	2.36	*
	San Lucas		200	38	34.38 - 41.66	77.70	73.75 - 81.71	95.50	1.91	**
	La Paz		200	32.343	28.88 - 35.84	59.40	55.66 - 63.14	100.00	1.63	*
	New Orleans		240	19.886	16.93 - 22.91	59.32	55.85 - 62.87	100.00		*
Propoxur	San José	15	240	12.1619	9.74 - 14.74	119.22	115.78 - 122.96	100.00	1.40	*
	San Lucas		240	15.902	13.18 - 18.71	35.30	32.21 - 38.51	100.00	1.82	*
	La Paz		240	11.595	9.21 - 14.12	82.70	79.43 - 86.21	100.00	1.33	*
	New Orleans		240	8.7145	6.60 - 10.93	23.49	20.93 - 26.21	100.00		*

Criterio de susceptibilidad establecido por la OMS (1994), aún vigente.

* Población susceptible

** Susceptibilidad intermedia

*** Resistencia individual presente

DD: Dosis discriminante calculada para la cepa susceptible New Orleans.

N: Número de mosquitos expuestos.

Para permetrina la población de *Ae. aegypti* perteneciente a Cabo San Lucas, alcanzó una mortalidad de 69% a la concentración discriminante y, un TL_{50} de 11.13 minutos en comparación con el TL_{50} de la cepa susceptible New Orleans que fue de 9.4 minutos. Las poblaciones de La Paz y San José del Cabo alcanzaron el 100% de mortalidad a la dosis discriminante, sin embargo se observaron indicios de susceptibilidad individual (Figura 14).

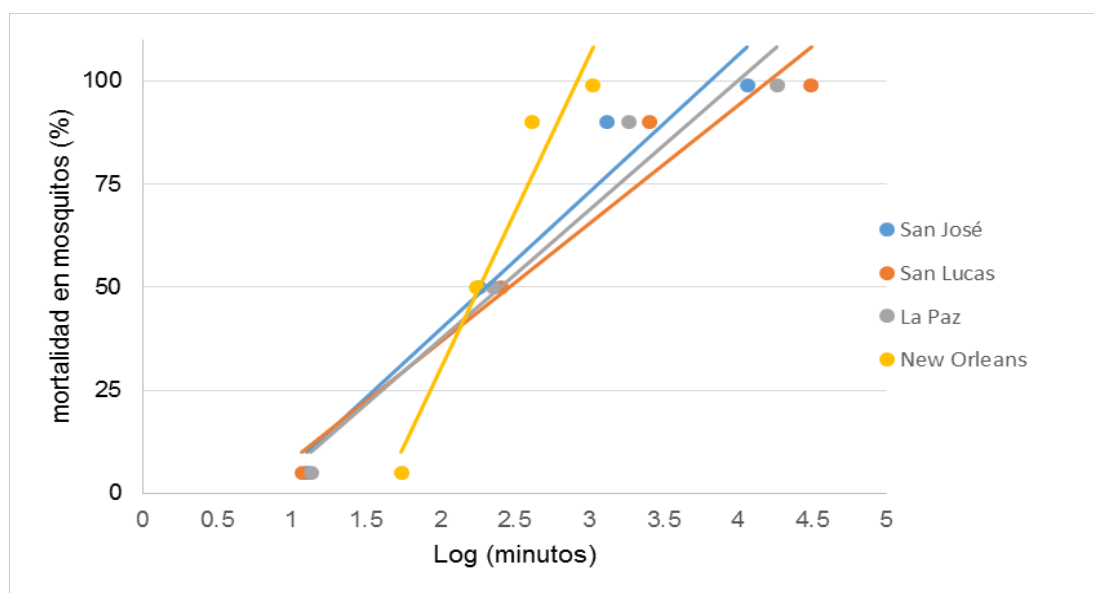


Figura 14. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad, en adultos de *Ae. aegypti* expuestos a botellas tratadas con el insecticida piretroide permetrina y, dosis discriminante de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Con deltametrina la población de *Ae. aegypti* de Cabo San Lucas registró un 95.41% de mortalidad (susceptibilidad intermedia), en comparación con las poblaciones susceptible, de La Paz y San José del Cabo en las cuales se alcanzó el 100 % (Figura 15).

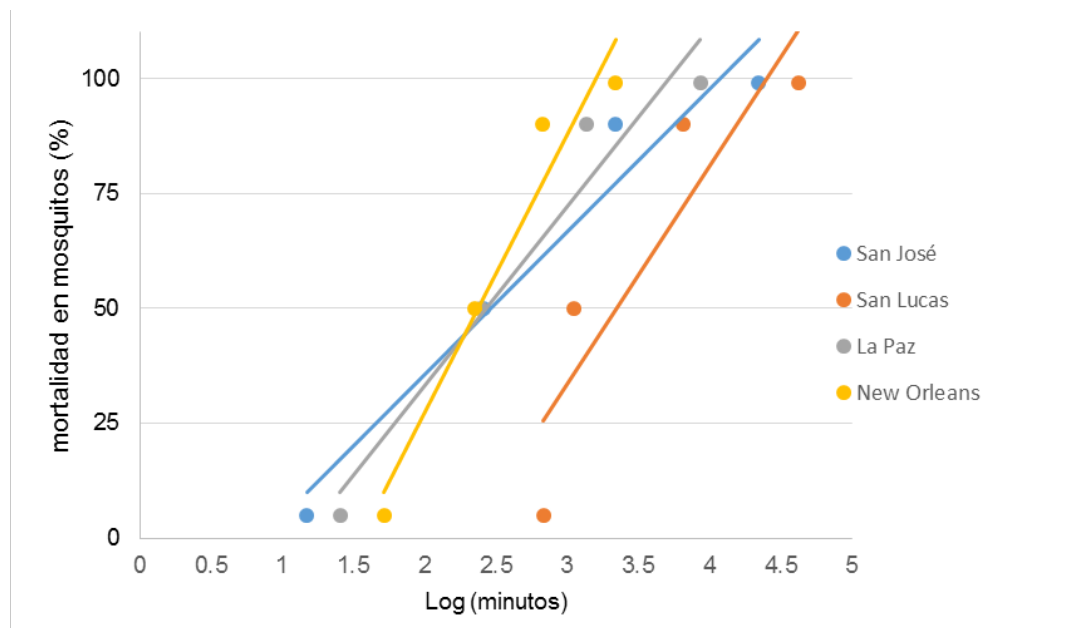


Figura 15. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad, en adultos de *Ae. aegypti* expuestos a botellas tratadas con el insecticida piretroide deltametrina y, dosis discriminante de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

7.3.1.1 Línea base de bifentrina para *Ae. aegypti* y la susceptibilidad de las poblaciones de campo

La concentración discriminante obtenida para bifentrina con la línea base de la cepa susceptible New Orleans fue de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con un tiempo letal TL_{99} de 30 minutos (Tabla XIII y Figura 16). Una vez obtenida la concentración letal se realizaron los bioensayos para las poblaciones de campo, los resultados mostraron que las poblaciones de *Ae. aegypti* de las localidades de Cabo San Lucas y San José del Cabo alcanzaron un 65.41% y un 72.20% de mortalidad respectivamente, en comparación con el 100% de mortalidad de La Paz (Figura 17).

Tabla XIII. Línea base calculada para el insecticida bifentrina en *Ae. aegypti*, cepa susceptible New Orleans.

Concentración 1 μmL	CL	Valor de la pendiente Log (Y)	Y(TL= min)
5 μmL	0.5	34.26	30.75
	0.9	40.80	59.19
	1.0	43.07	121.66
10 μmL	0.5	32.22	25.08
	0.9	37.92	44.35
	1.0	39.86	53.84
15 μmL	0.5	28.20	16.78
	0.9	32.25	25.17
	1.0	41.24	61.81
20 μmL	0.5	26.51	14.18
	0.9	30.69	21.53
	1.0	35.37	34.39
25 μmL	0.5	26.31	13.89
	0.9	29.84	19.77
	1.0	32.18	24.97
	0.5	26.61	14.32
	0.9	30.07	20.22
	1.0	32.32	25.33

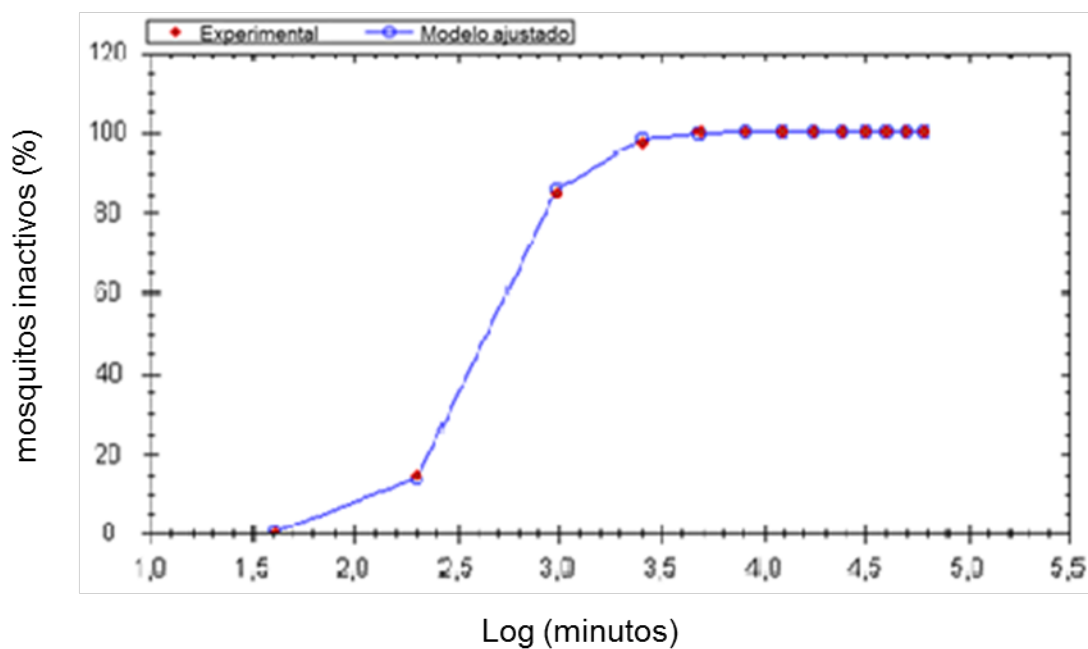


Figura 16. Susceptibilidad de *Ae. aegypti* de la cepa New Orleans a 15 mg bifentrina/mL en botellas de CDC.

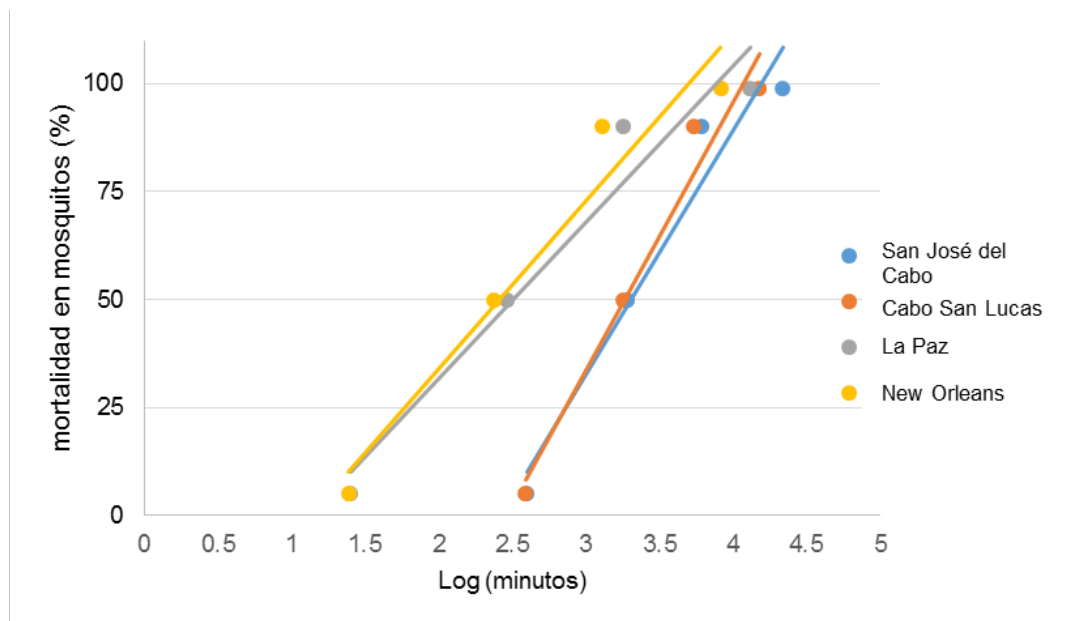


Figura 17. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad en adultos de *Ae. aegypti* expuestos a botellas tratadas con el insecticida piretroide bifentrina y, dosis discriminante de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

7.3.2 Susceptibilidad de *Ae. aegypti* a organofosforados malatión y clorpirifós

Los análisis realizados con el insecticida malatión mostraron que la población de *Ae. aegypti* perteneciente a San José del Cabo, presentó una mortalidad de 94.50%, lo que muestra una susceptibilidad intermedia a este producto, las poblaciones de Cabo San Lucas y La Paz alcanzaron el 100% de mortalidad a la dosis discriminante para la cepa susceptible New Orleans. (Figura 18).

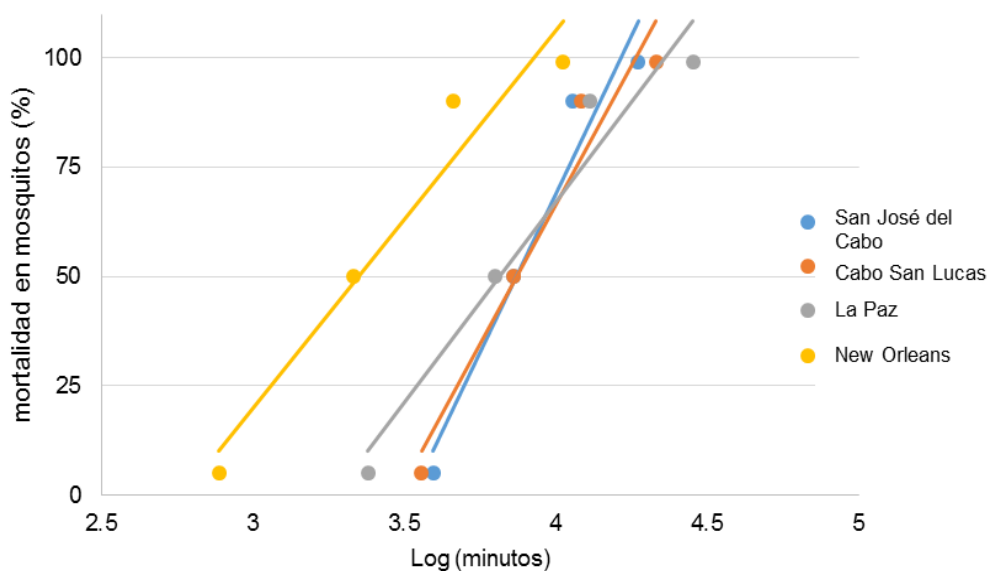


Figura 18. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad, en adultos de *Ae. aegypti* expuestos a botellas tratadas con el insecticida organofosforado malatión y, dosis discriminante de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

7.3.2.1 Línea base para clorpirifós y susceptibilidad de las poblaciones de campo

La dosis discriminante para la cepa susceptible New Orleans fue de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 60 minutos (Tabla XIV y Figura 19). A esta concentración la población de Cabo San Lucas mostró una susceptibilidad intermedia con el 95% de mortalidad, las poblaciones de San José del Cabo y la Paz, registraron el 99 y 100% de mortalidad respectivamente, por lo que de acuerdo a la clasificación de la OMS son consideradas susceptibles (Figura 20).

Tabla XIV. Línea base calculada para el insecticida clorpirifós en *Ae. aegypti*, cepa susceptible New Orleans.

Concentración 15 µ/mL	CL	Valor de la pendiente Log (Y)	Y(TL= min)
15 µ/mL	0.5	3.98	53.56
	0.9	4.37	78.98
	0.99	4.79	120.65
25 µ/mL	0.5	3.71	40.76
	0.9	3.94	51.28
	0.99	4.19	65.88
35 µ/mL	0.5	3.45	31.39
	0.9	3.81	44.85
	0.99	4.19	66.21
40 µ/mL	0.5	3.58	35.78
	0.9	3.96	52.57
	0.99	4.38	80.01
50 µ/mL	0.5	3.48	32.54
	0.9	3.83	46.18
	0.99	4.21	67.65
60 µ/mL	0.5	3.43	30.75
	0.9	3.73	41.61
	0.99	4.06	57.88

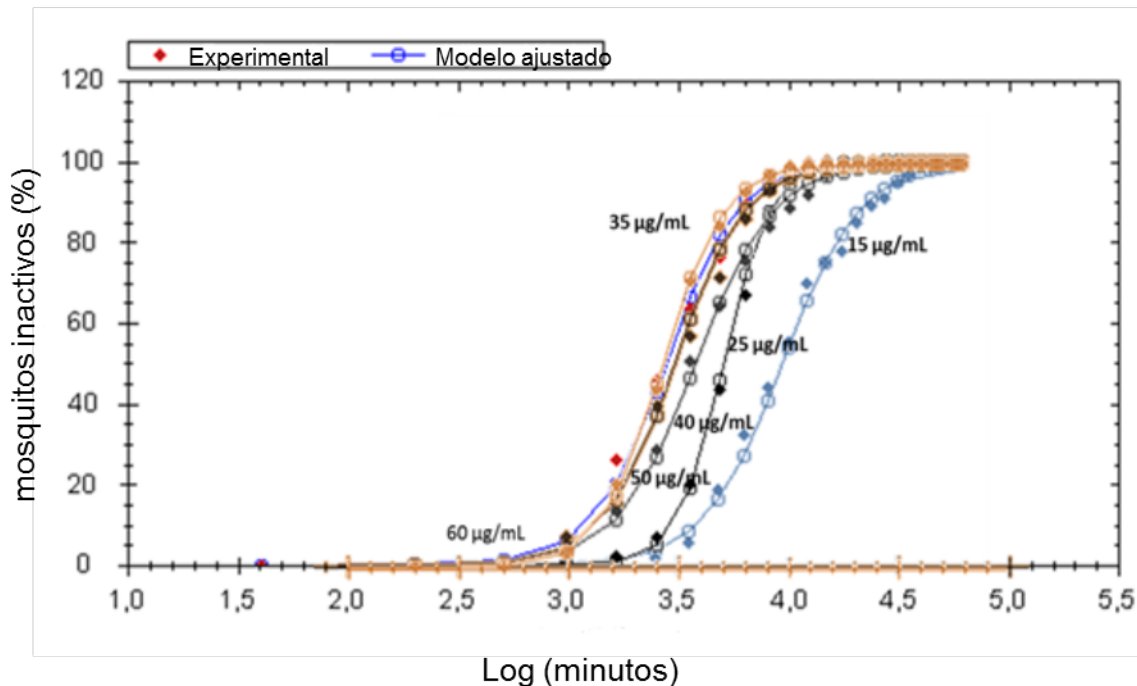


Figura 19. Curvas de regresión logística para la línea base de clorpirifós para *Ae. aegypti* de la cepa susceptible New Orleans.

7.3.1 Susceptibilidad de *Ae. aegypti* al carbamato propoxur.

Los resultados muestran que las tres poblaciones provenientes de La Paz San José del Cabo y Cabo San Lucas, son susceptibles a este insecticida al alcanzar el 100% de mortalidad con la dosis discriminante (Figura 21).

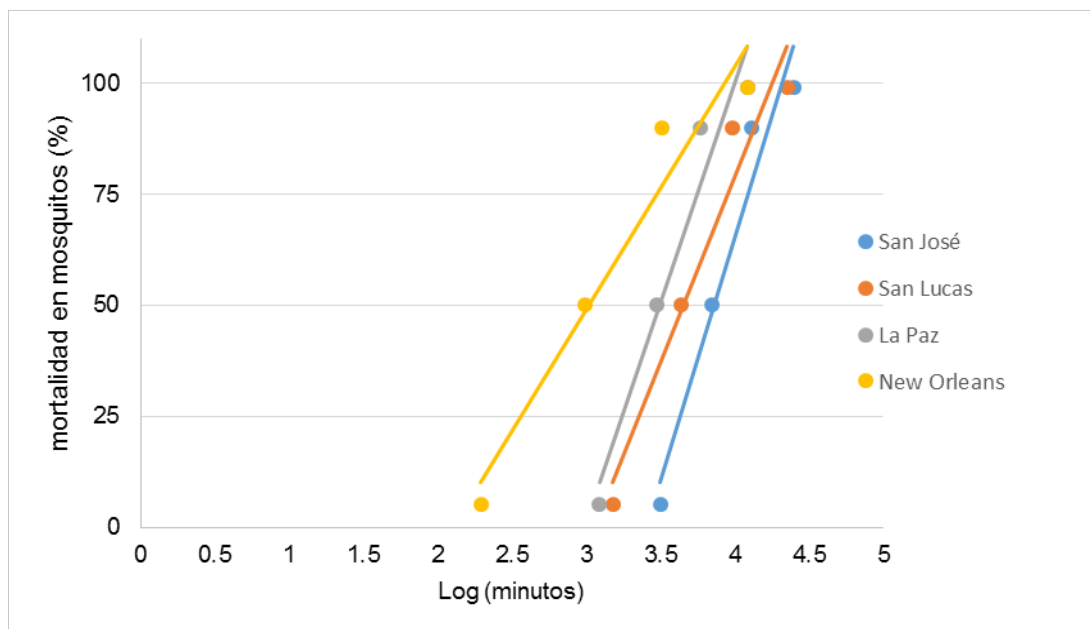


Figura 20. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad, en adultos de *Ae. aegypti* expuestos a botellas tratadas con el insecticida organofosforado clorpirifós y, dosis discriminante de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

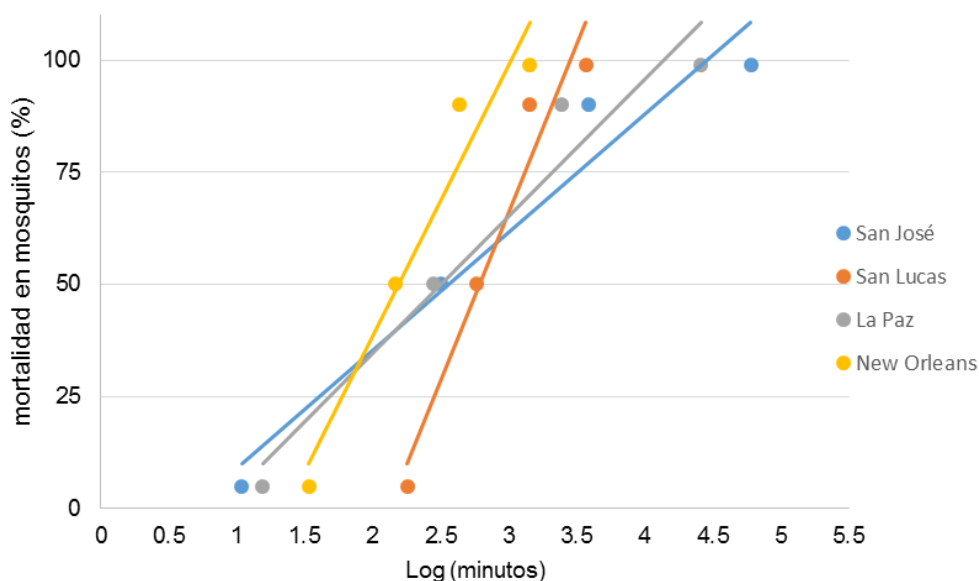


Figura 21. Tendencia de los datos tiempo-mortalidad, en adultos de *Ae. aegypti* expuestos en botellas tratadas con el insecticida propoxur y, dosis discriminante de 60 µg/mL.

7.4 Identificación de mecanismos de resistencia de *Ae. aegypti* a insecticidas

En la Tabla XV se muestran los promedios de la actividad de las enzimas evaluadas en las poblaciones de campo y la cepa de *Ae. aegypti* susceptible. Como puede apreciarse la AChE y las alfa y beta esterasas de las poblaciones de mosquitos colectadas en San Lucas y San José del Cabo, mostraron concentraciones significativamente más altas con respecto a la cepa susceptible, así también las concentraciones de las pNPA esterasas y GSTs de las poblaciones de mosquitos colectados en las tres localidades, fueron significativamente más altas que las de la cepa susceptible. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de citocromos P⁴⁵⁰ entre las poblaciones de campo y la cepa susceptible de laboratorio.

Tabla XV. Media \pm desviación estándar de las pruebas bioquímicas de *Ae. aegypti* colectados en las localidades de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas, B.C.S., México.

Localidad	AChE	α	β	PnPA	GSTs	Citocromo ⁴⁵⁰
	% de Inibición por el propoxur	μ moles del producto formado/min/mg proteína Naftil acetato			μ moles de CDNB conjugado/min/mg proteína	μ moles de P ⁴⁵⁰ /mg de proteína
New Orleans	41.06 \pm 26.20	0.0002 \pm 0.0001	0.0002 \pm 0.0001	0.44 \pm 0.40	0.70 \pm 0.337	0.0004 \pm 0.0007
La Paz	51.24 \pm 29.20	0.0002 \pm 0.0001	0.0002 \pm 0.0001	0.77 * \pm 0.35	3.15 * \pm 1.72	0.0003 \pm 0.0005
San José del Cabo	53.66 \pm 33.80	0.0004 * \pm 0.002	0.0004 * \pm 0.002	0.70 * \pm 0.28	2.40 * \pm 1.32	0.0004 \pm 0.0004
Cabo San Lucas	57.26 \pm 30.37	0.0004 * \pm 0.0001	0.0004 * \pm 0.0001	1.10 * \pm 0.85	3.15 * \pm 1.74	0.0003 \pm 0.0000

* Indica que la media difiere de la cepa susceptible New Orleans con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ % Tukey post hoc.

7.4.1 Acetil colinesterasa (AChE)

Los datos de actividad de la AChE inhibida por el propoxur en las poblaciones de *Ae. aegypti* de campo, mostraron diferencias significativas entre sí con respecto a la cepa susceptible New Orleans ($F=4.496$, $p<0.004$) (Tabla XV y Figura 22). Asimismo, la población de San José del Cabo y Cabo San Lucas presentó mayores valores de porcentaje de inhibición al propoxur que la población de La Paz y la cepa susceptible (Figura 23). Sin embargo se registró un mayor número de individuos que salen de la campana de Gauss con porcentajes de inhibición menores y mayores de la media registrada en la cepa susceptible.

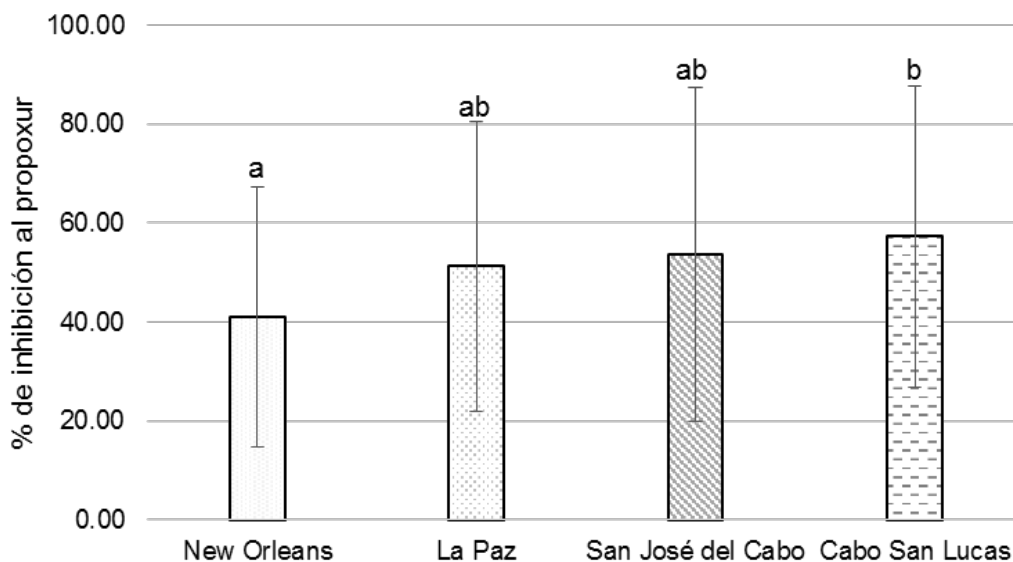


Figura 22. ANOVAS de los porcentajes de inhibición de la AChE por el insecticida propoxur en poblaciones de *Ae. aegypti* de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México. Tukey *Post hoc* ($\alpha= 0.05$).

7.4.2 α y β esterasas

En todas las poblaciones de campo se observó actividad de esterasas significativamente mayores que la cepa susceptible New Orleans, con los substratos α -naftil acetato ($F= 166.56$, $p<0.000$); así como en el caso del substrato β -naftil acetato ($F= 82.873$, $p<0.000$) (Tabla XV y Figura 24).

Las poblaciones de San José del Cabo y Cabo San Lucas presentaron concentraciones de α y β esterasas mayores a la cepa susceptible y a la población de La Paz (Figuras 25 y 26).

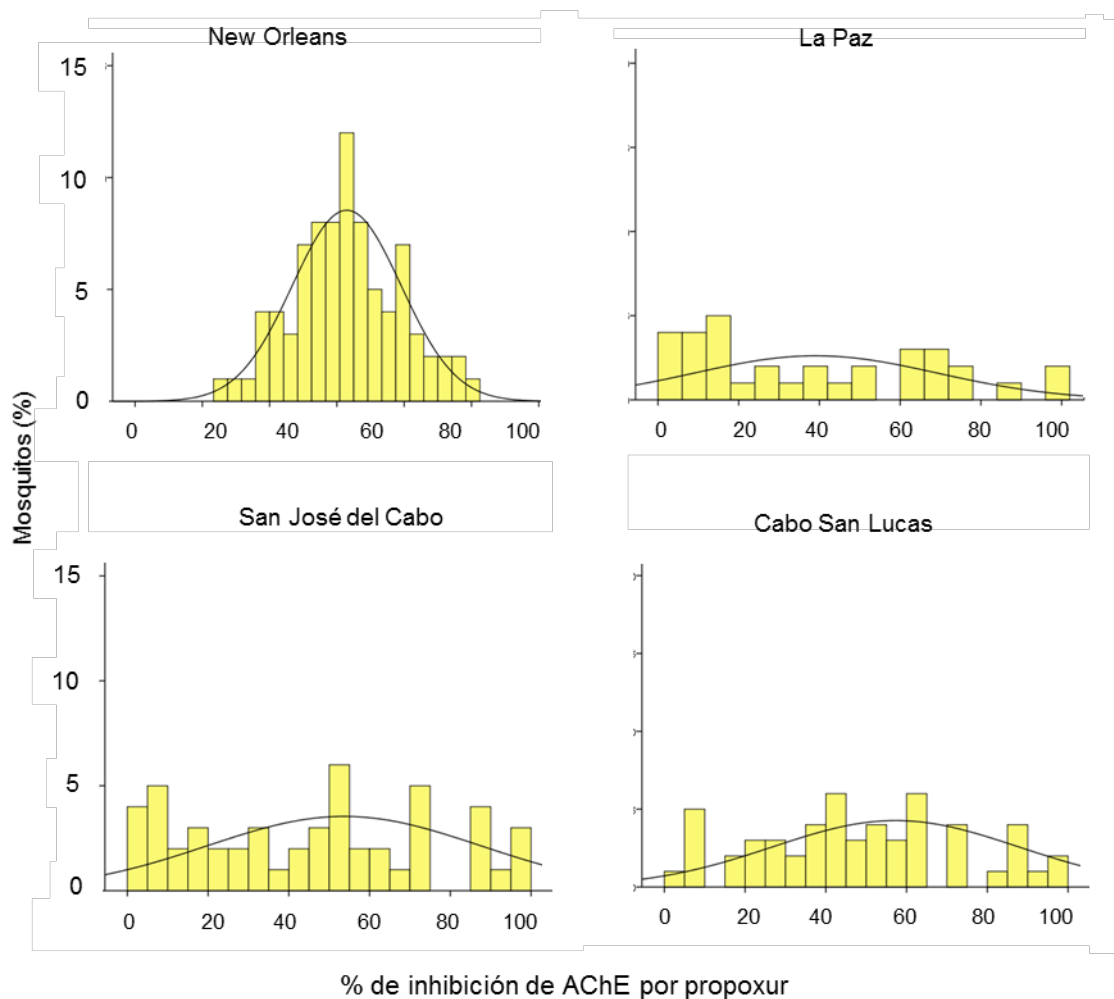


Figura 23. Porcentajes de inhibición de la AChE por el insecticida propoxur en poblaciones de *Ae. aegypti* de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.

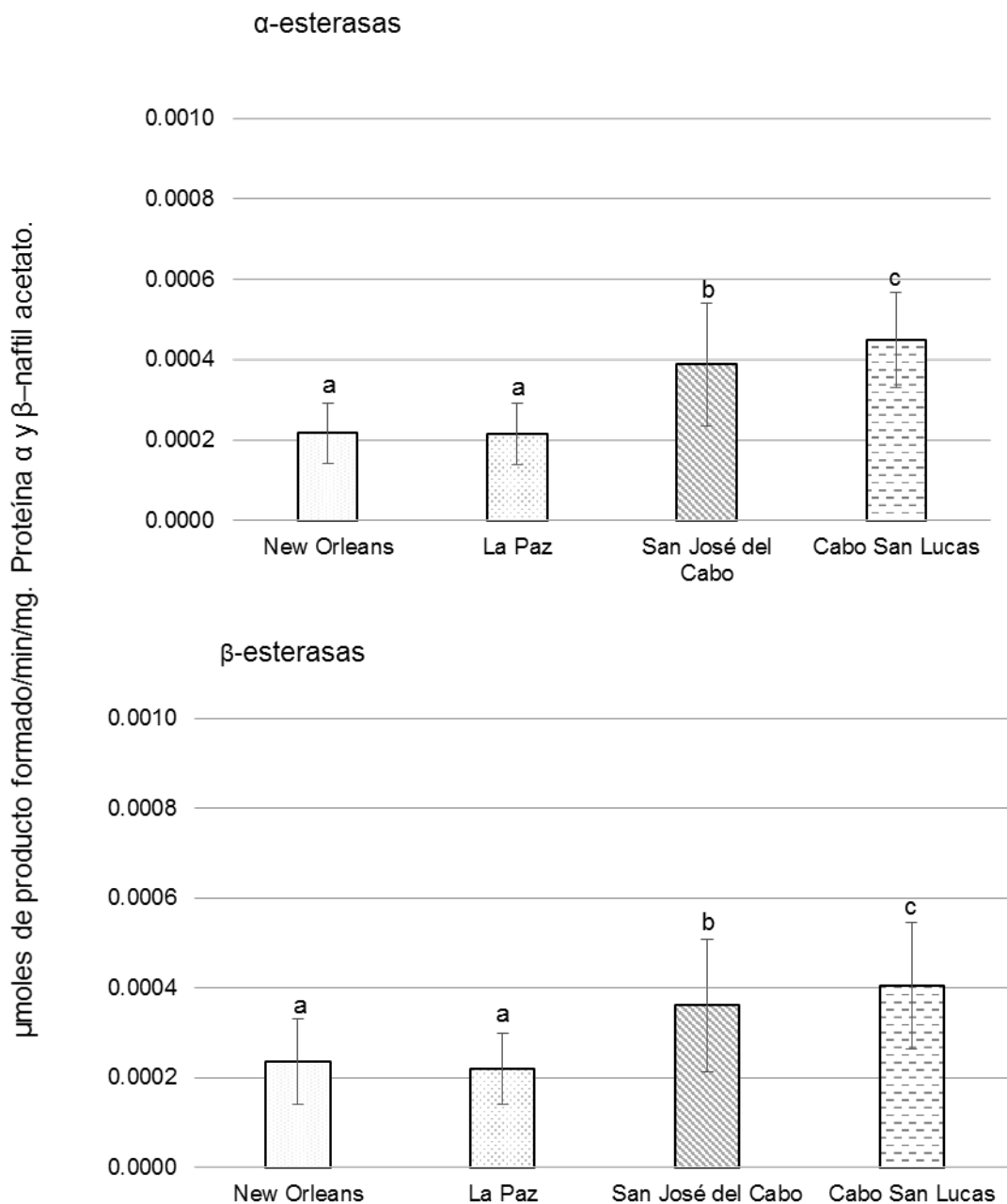


Figura 24. ANOVAS de la actividad de esterasas que utilizan α y β -naftil acetato en poblaciones de *Ae. aegypti* de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México. Tukey *Post hoc* ($\alpha= 0.05$).

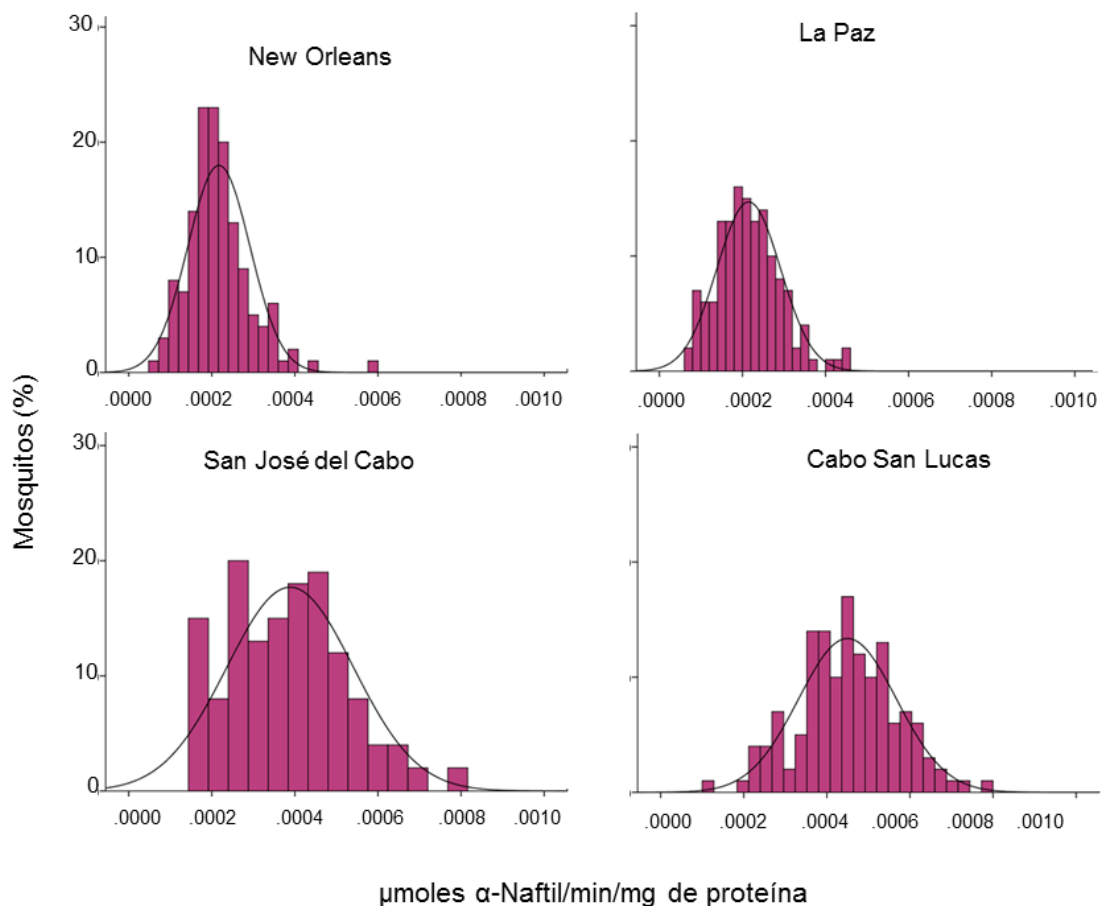


Figura 25. Actividad de estererasas que utilizan α -naftil acetato en poblaciones de *Ae. aegypti* de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.

7.4.3 p -NPA estererasas

Los resultados muestran diferencias significativas ($F= 37.727$, $p<0.000$), entre los niveles de la actividad de estererasas de la cepa susceptible y las poblaciones de campo (Figura 27). El mayor nivel lo alcanzó la población de Cabo San Lucas (1.10 ± 0.85 μ moles) (Tabla XV y Figura 28).

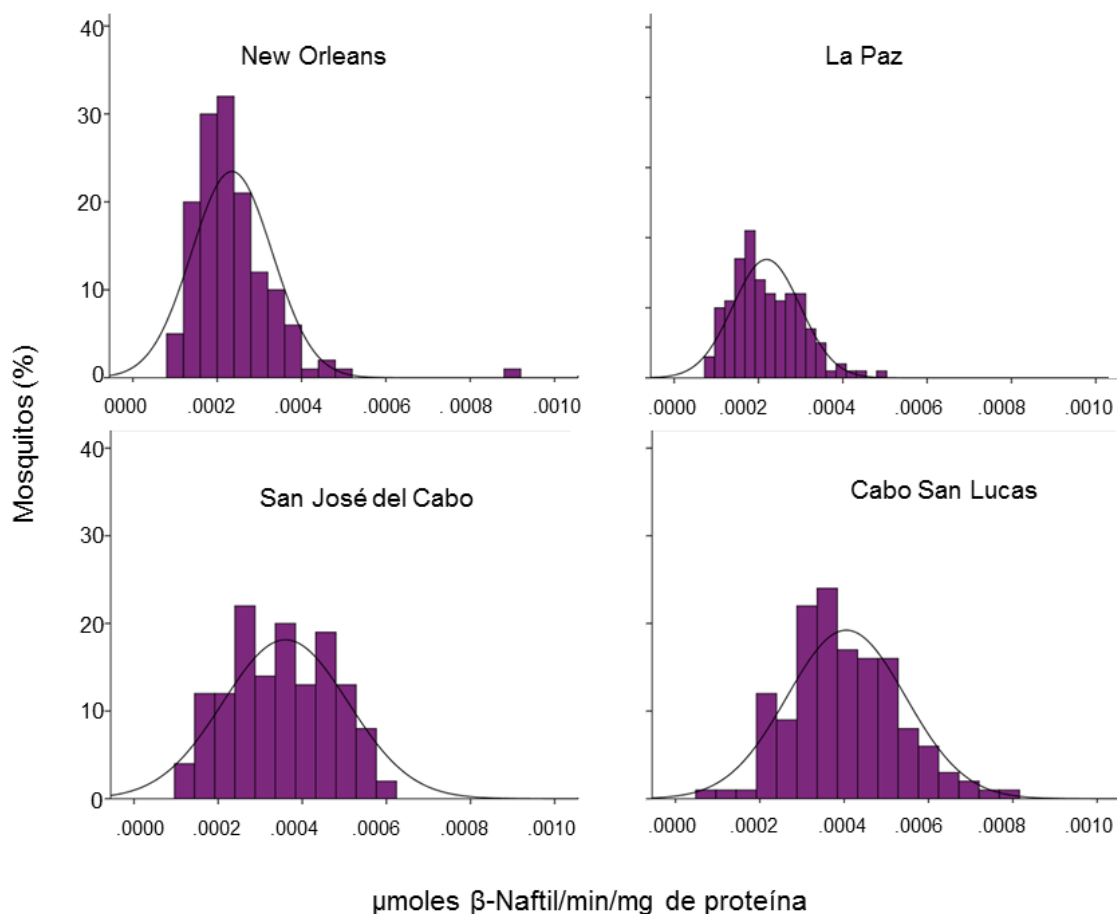


Figura 26. Actividad de esterases que utilizan β -naftil acetato en poblaciones de *Ae. aegypti* de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.

7.4.1 Monoxigenasas Citocromo P⁴⁵⁰

Los niveles de la enzima monooxigenasa P⁴⁵⁰ en los mosquitos de las poblaciones de campo, no mostraron diferencias significativas respecto a la cepa susceptible New Orleans ($F= 2.116$, $p= 0.097$) (Tabla XV y Figuras 29 y 30).

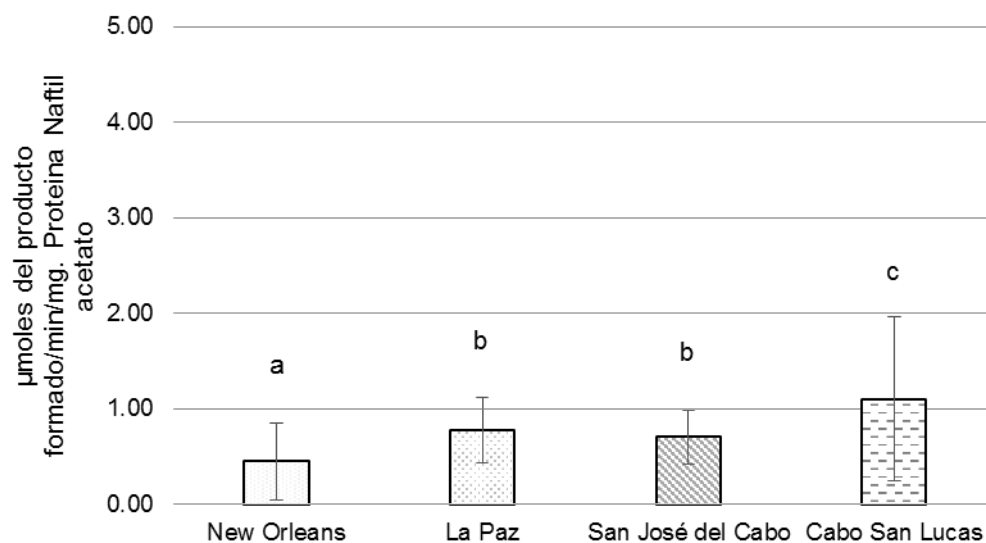


Figura 27. ANOVAS de la actividad de la enzima *p*-NPA evaluada en poblaciones de *Ae. aegypti* de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México. Tukey *Post hoc* ($\alpha=0.05$).

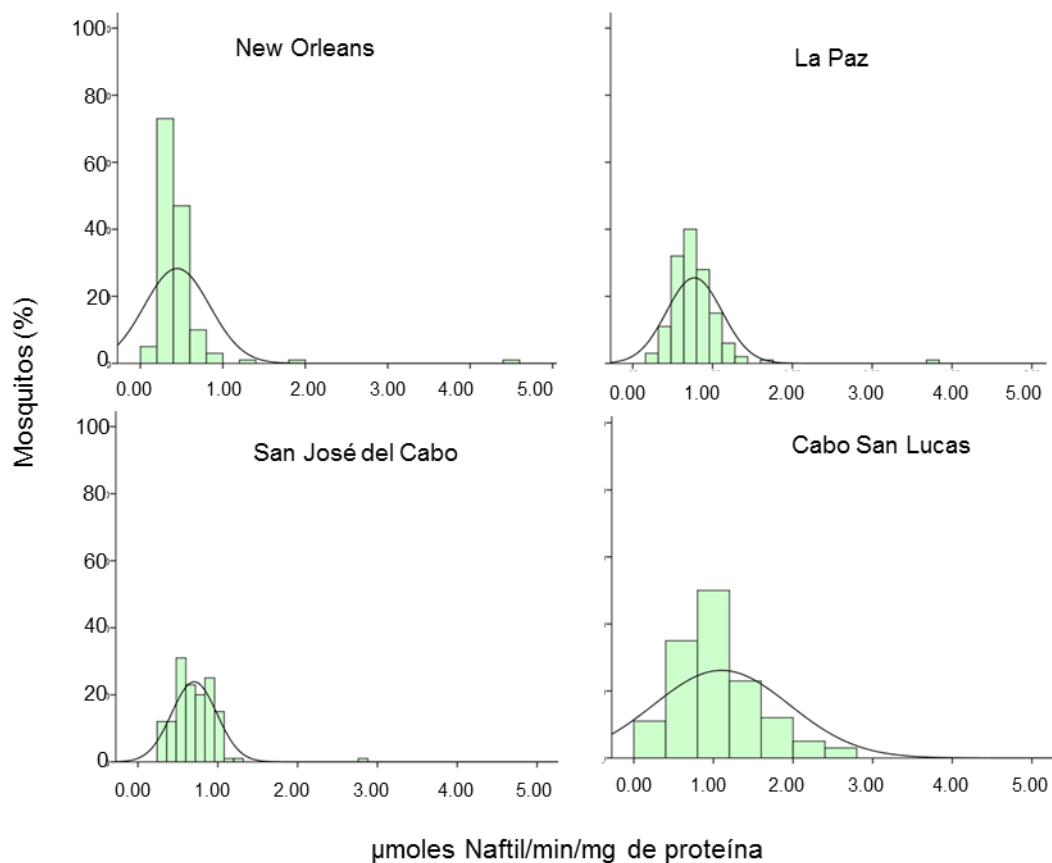


Figura 28. Actividad de *pNPA* en poblaciones de *Ae. aegypti* cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.

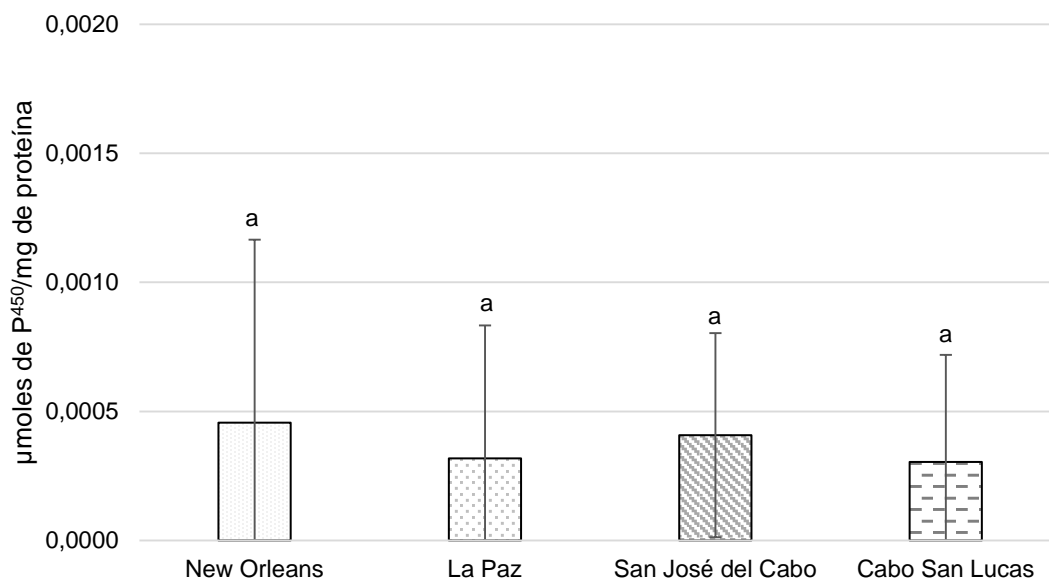


Figura 29. ANOVAS del contenido de las enzimas monoxigenasas citocromos P⁴⁵⁰ evaluada en poblaciones de *Ae. aegypti* de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México. Tukey *Post hoc* ($\alpha=0.05$).

7.4.2 Glutación-S-transferasas (GSTs)

Los niveles de la enzima glutación-S-transferasas en los mosquitos de la cepa susceptible New Orleans, fueron significativamente menores que aquellos de las poblaciones de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas, con una diferencia significativa ($F= 89.172$, $p<0.000$) (Figura 31). Sin embargo, las poblaciones de mosquitos de La Paz y Cabo San Lucas, mostraron un mayor nivel de la enzima que la población de San José del Cabo (Tabla XV y Figura 32).

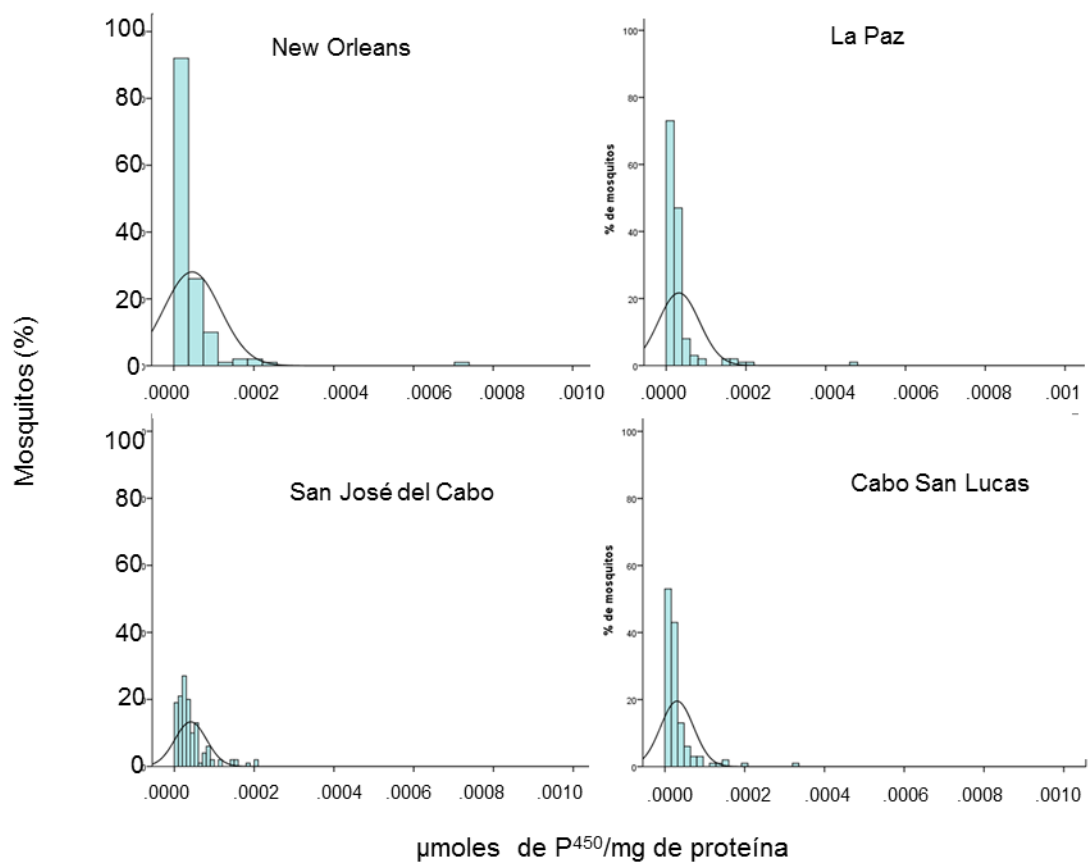


Figura 30. Contenido de Citocromos P⁴⁵⁰ en poblaciones de *Ae. aegypti* cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.

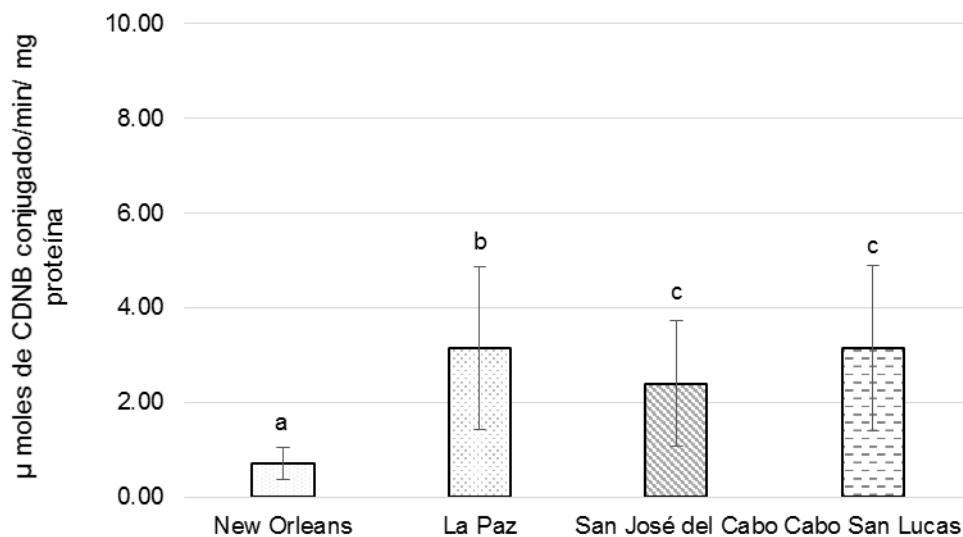


Figura 31. ANOVAS de la actividad de la enzima glutatión-S-transferasas (GSTs) evaluada en poblaciones de *Ae. aegypti* de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México. Tukey *Post hoc* ($\alpha= 0.05$).

7.1 Frecuencia de las mutaciones V1016I y F1534C en *Ae. aegypti* en B.C.S.

La mutación V1016I se encontró en las tres poblaciones analizadas con una mayor frecuencia del genotipo homocigoto resistente (A/A) I1016 en Cabo San Lucas. En la población de La Paz y San José del Cabo el genotipo predominante fue heterocigoto (G/A) (Tabla XVI).

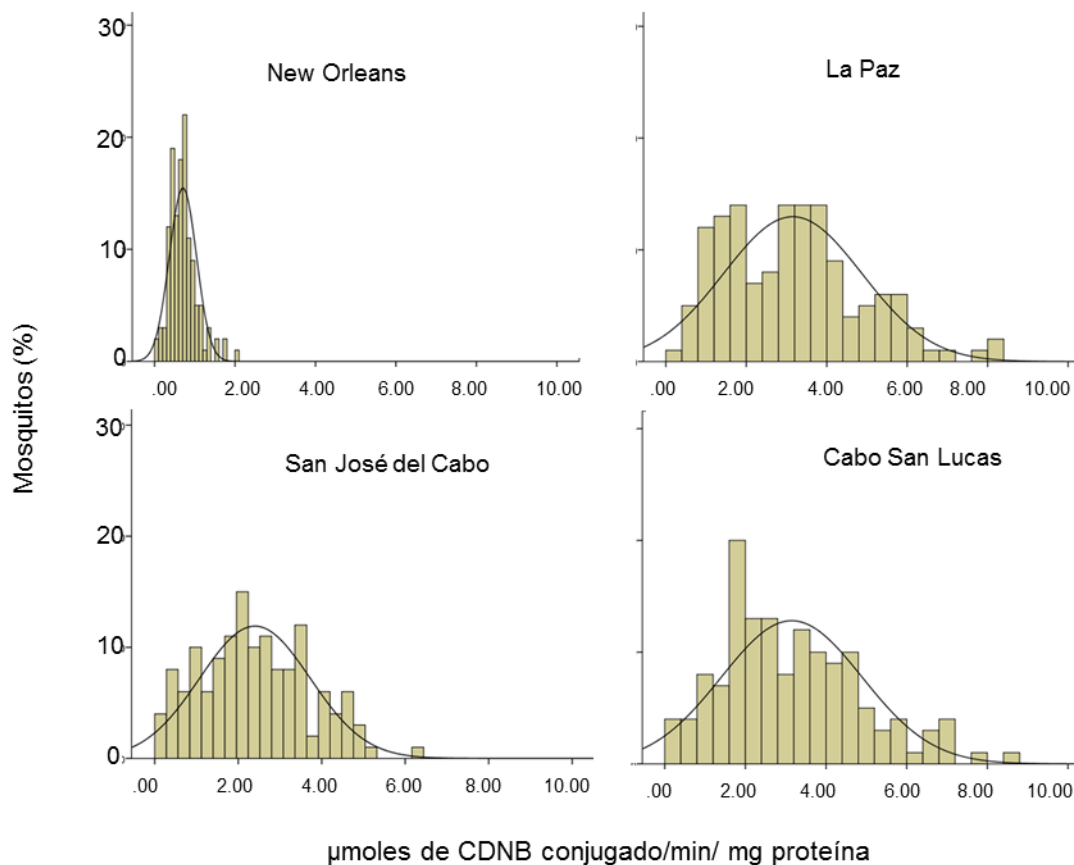


Figura 32. Actividad de las GSTs en poblaciones de *Ae. aegypti* de la cepa susceptible New Orleans y poblaciones de campo de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.

La mutación C1534 se presentó en las tres poblaciones estudiadas con mayor frecuencia del genotipo homocigoto resistente en Cabo San Lucas (0.945), seguido de San José del Cabo con 0.95% y en último lugar La Paz con 0.81% (Tabla XVI).

Tabla XVI. Frecuencia del alelo V1016I y C1534 en poblaciones de *Ae. aegypti* de las localidades de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas en B.C.S., México.

Localidad	Mosquitos	G/G V1016	G/A V1016I	A/A I1016	Frecuencia alelica I1016	G/G Ph1534	G=A Ph1534C	A/A C1534	Frecuencia alelica C1534
Cabo San Lucas	60	6	19	35	0.7	0	7	53	0.94
San José del Cabo	60	6	37	17	0.6	0	5	55	0.96
La Paz	82	8	50	24	0.6	4	23	55	0.81
Total	202	20	106	76		4	35	35	

G/G: mosquitos homocigotos susceptibles

G/A: mosquitos heterocigotos

A/A: mosquitos homocigotos resistentes

7.2 Respuesta de *Ae. aegypti* a cuatro sales sódicas como atrayentes para adultos en condiciones de laboratorio

7.2.1 Estudios electrofisiológicos

La amplitud de la respuesta electrofisiológica registrada con las antenas de *Ae. aegypti* en milivolts (mV), mostró diferencias significativas ($F= 18.55$, $p \leq 0.0001$) con los tratamientos de citrato, fumarato, succinato, propionato y octenol disueltos con agua y alcohol, que cuando fueron expuestas solo con aire, asimismo, estos compuestos fueron más reactivos cuando se disolvieron en alcohol que cuando se utilizó agua como disolvente. En el primer caso se obtuvo una respuesta promedio de 6.81 ± 6.55 mV, en cambio con agua fue de 6.60 ± 6.18 mV, con octenol de 5.79 ± 0.82 mV y con aire de 0.16 ± 0.02 mV (Figura 33). Cuando estos compuestos se utilizaron en una concentración de 250 ppm se obtuvo la mayor respuesta con un promedio de 14.00 ± 5.77 mV y la menor a 50 ppm con un promedio de 0.47 ± 0.39 mV y, además con diferencias significativas ($F= 204.81$, $p= 0.0001$) entre las cinco concentraciones utilizadas de acuerdo con el ANOVA realizado (Figura 34).

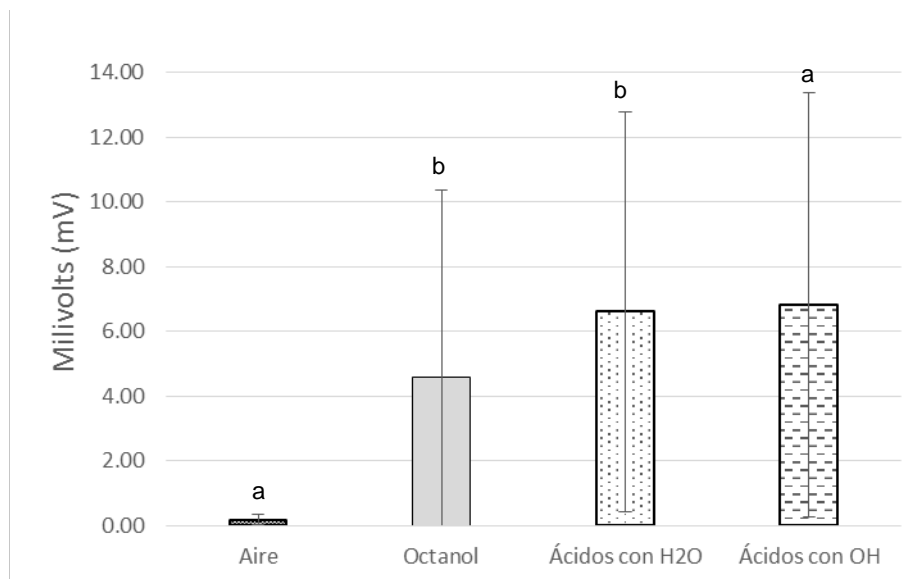


Figura 33. Respuesta electrofisiológica de *Ae. aegypti* a aire, 1-octen-3-ol y sales sódicas (citrato, fumarato, succinato, propionato) utilizando agua (H₂O) y alcohol (OH) como solventes.

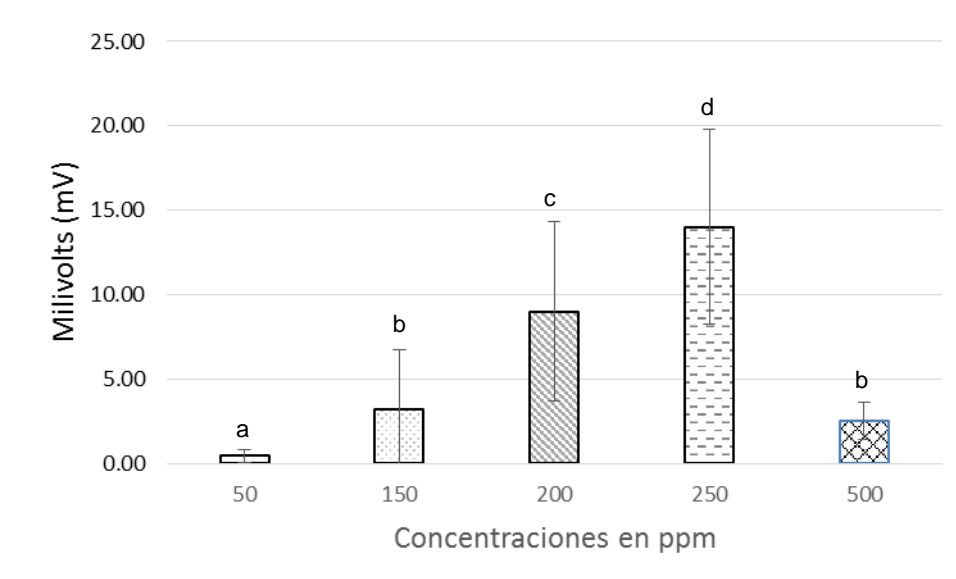


Figura 34. Respuesta electrofisiológica de *Ae. aegypti* a las concentraciones utilizadas con las sales sódicas (citrato, fumarato, succinato y propionato), el control positivo fue 1-octen-3-ol y como negativo aire. Tukey *Post hoc* ($\alpha = 0.05$).

De todos los compuestos utilizados en el bioensayo destaca el propionato de sodio al generar la mayor respuesta electrofisiológica en los distintos

tratamientos realizados, particularmente cuando se mezcló con agua a una concentración de 250 ppm (21.75 ± 2.80 mV), en cambio con alcohol (50 ppm) dicha respuesta fue la menor (0.19 ± 0.08 mV) y con diferencias significativas ($F=84.271$, $p \leq 0.000$), (Figura 35).

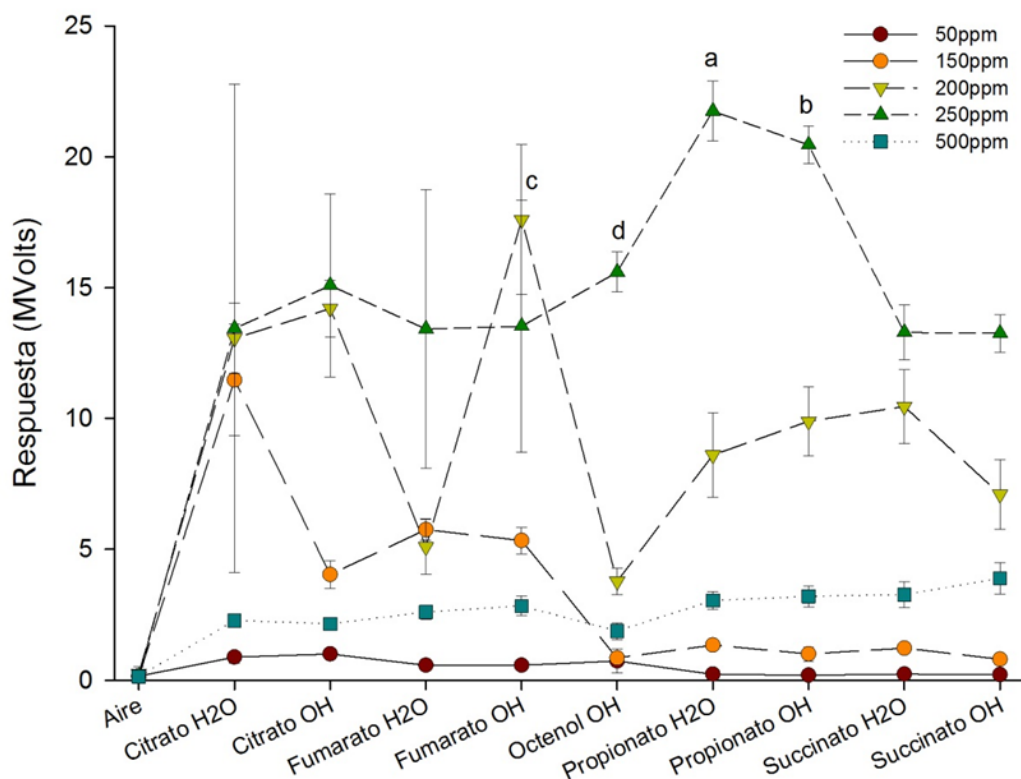


Figura 35. Amplitud de la señal en minivolt observada en antenas de *Ae. aegypti* a diferentes concentraciones de sales sódicas y solventes así como sus controles.

7.2.2 Estudios conductuales

De acuerdo con los resultados anteriores al comparar los distintos compuestos ya mencionados, se decidió utilizar 250 ppm como concentración para todas las sales sódicas y, como controles el ácido láctico y el 1-octen-3-ol, para determinar el nivel de atracción. Para evaluar la respuesta conductual se

aplicó la prueba U de Mann-Whitney, con la cual se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos probados. Dicha respuesta se presenta en la Tabla XVII, en donde el propionato fue el único que atrajo el mayor número de insectos, con un rango promedio de 9.5 mosquitos en comparación con el 1-octen-3-ol que atrajo a 3.5 individuos ($p \leq 0.003$), un compuesto que dio siempre una mayor respuesta que el citrato, fumarato y succinato de sodio. Al comparar el ácido láctico con el propionato no se obtuvieron diferencias significativas $p \leq 0.05$, sin embargo, al mezclar propionato, fumarato, succinato más 1-octen-3-ol, dichas diferencias si fueron significativas ($p \leq 0.012$) con un promedio de 9.88 mosquitos y 3.92 solamente con el ácido láctico (Tabla XVII).

Tabla XVII. Resultados obtenidos en los estudios conductuales de la respuesta de *Ae. aegypti* a sales sódicas utilizando el sistema HITSS, mediante la prueba U-de Mann-Whitney.

Compuestos probados	Mosquitos con respuesta	Valor de Z	Valor de p
1-octen-3-ol.	3.5	-2.929	0.003
Propionato de sodio con H ₂ O	9.5		
1-octen-3-ol.	7.92	-1.401	0.161
Citrato de sodio con H ₂ O	5.08		
1-octen-3-ol.	5.33	-1.149	0.25
Succinato de sodio con H ₂ O	7.67		
1-octen-3-ol.	5	-1.526	0.127
Fumarato de sodio con H ₂ O	8		
1-octen-3-ol.	3.75	-2.719	0.007
Propionato+ ácido láctico	9.25		
1-octen-3-ol.	5.08	-1.37	0.168
Propionato+1-octen-3-ol.	7.92		
1-octen-3-ol.	3.92	-2.513	0.012
Propionato+ fumarato+ succinato	9.08		
Ácido láctico	5	-1.475	0.14
Propionato de sodio con H ₂ O	8		
Ácido láctico	3.92	-2.513	0.012
Propionato+ fumarato+ succinato+1-octen-3-ol.	9.08		

Significancia asintótica bilateral

8. DISCUSIÓN

8.1 Fluctuación espacio-temporal de *Ae. aegypti*

8.1.1 Abundancia de *Ae. aegypti* utilizando indicadores entomológicos larvales (ICP, IRP e IB)

Los resultados obtenidos con los indicadores entomológicos mostraron que las medidas aplicadas por la SSA, las cuales incluyen aplicación de insecticidas, limpieza y eliminación de recipientes para el control de *Ae. aegypti*, reducen de forma considerable la abundancia de larvas de este insecto en las tres localidades estudiadas, lo que coincide con estudios similares realizados en otros países y regiones de México también afectadas (Espinoza, 2001; Sánchez *et al.*, 2006; Villegas-Trejo *et al.*, 2011; Manrique *et al.*, 2013).

La distribución de los valores de cada índice por localidad permite distinguir claramente dos agrupamientos, el primero corresponde a La Paz (LAP) y el segundo a Los Cabos (LC), constituido por las localidades de San José del Cabo y Cabo San Lucas, lo cual puede atribuirse a que se encuentran en ambientes relativamente distintos, tal observación ha sido referida por González–Abraham *et al.*, (2010), quienes clasifican a LAP dentro de la Eco-región de la Costa Central del Golfo de California, por su mayor grado de aridez y, a SJC y CSL dentro de Eco-región de Matorral Tropical del Cabo por su ambiente menos árido, a pesar de su condición ambiental más árida se encontró una mayor abundancia de larvas en La Paz que en Los Cabos.

Al comparar cada uno de los índices larvarios considerados, resulta evidente que el ICP permite inferir cuando es conveniente aplicar las medidas de control, ya que aporta una estimación de la distribución del mosquito en la unidad de muestreo y, nos da una idea del porcentaje de casas positivas a este insecto, así como las posibles zonas de riesgo. Sin embargo, al no proporcionar el número exacto de larvas, las acciones implementadas pueden ser sesgadas y con ello

poco eficientes, como lo indica Focks (2003), en su revisión del tema. Con referencia al IRP, que estima la proporción de los recipientes con presencia de larvas y muestra de forma relativa la tipología y preferencia de los mosquitos para su reproducción, al igual que el ICP, no puede ser utilizado como un indicador poblacional que sería lo más conveniente, ya que solo mide una proporción y no el total de larvas, lo cual es mencionado por Espinoza *et al.* (2001) y Morrison *et al.* (2004). El IB por su parte, sin ser un indicador exacto, nos proporciona la relación existente entre los recipientes positivos y las casas muestreadas, por lo que nos puede ofertar una abundancia relativa de las larvas presentes en los recipientes con mayor precisión, situación indicada por Zhen y Kay (1993), aunque existen evidencias de que la abundancia de criaderos no implica necesariamente que haya abundancia de larvas en la misma proporción (Morrison *et al.*, 2004; Barrera *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006).

Aunque cada índice no proporciona datos exactos de los niveles poblacionales de las larvas, a lo largo del ciclo anual y existe controversia entre los expertos que los han utilizado (Pontes *et al.*, 2000; Espinoza *et al.*, 2001, Marin *et al.*, 2009). Existen trabajos que mencionan que pueden ser empleados de forma complementaria (Focks y Chadee 1997), lo cual ya ha sido aseverado por Sulaiman *et al.* (1996), al aplicar los tres indicadores para estimar la abundancia de *Ae. aegypti* en varias localidades de Malasia, que al correlacionarlos no encontraron diferencias significativas entre ellos. Por su parte, Fernández *et al.* (2005) están de acuerdo en un uso complementario de los tres índices, no obstante, mencionan que deben considerarse con reserva al encontrar diferencias significativas entre los mismos.

Un aspecto necesario para determinar la abundancia de este mosquito, es identificar la diversidad de recipientes disponibles en las casas, dato proporcionado por el IRP, que en el caso de CSL y SJC, fue mayor, debido posiblemente a la escases de servicios públicos y a los hábitos de los residentes, en comparación con los existentes en LAP, capital de B.C.S. Al respecto cabe señalar que en B.C.S., a pesar de las condiciones de aridez que imperan en la

región *Ae. aegypti* está presente durante todo el año, lo que se atribuye a la práctica cultural de almacenar agua en diversos contenedores por la ausencia de lluvias, lo que oferta al mismo tiempo posibilidades para la reproducción de este insecto de forma exitosa (Abdalmagid y Alhusein, 2008) y ocasionando que los indicadores larvarios sean cercanos o superiores al 10%, lo que es considerado como un riesgo epidemiológico elevado de acuerdo con la escala de la WHO (2009). De acuerdo a lo anterior, Troyo *et al.* (2008) reportaron que contenedores como tambos, baldes y tinas, pueden albergar elevadas poblaciones de larvas en función del volumen de agua que pueden almacenar, lo que oferta una mayor persistencia de positividad durante todo el año, lo cual coincide con otros estudios (Yebakima, 1996; Favier *et al.*, 2006; Burkot *et al.*, 2007).

8.1.2 Abundancia de *Ae. aegypti* utilizando indicadores entomológicos de ovitrampas (IOP e IDH) y su fluctuación poblacional

Los resultados del número de huevos obtenido, los indicadores entomológicos aplicados, así como los valores de Odd roots calculados, aumenta la evidencia de que el factor social interactúa con el clima e influye en la dinámica del vector, aún en regiones con variabilidad climática estacional. Diversos estudios han demostrado que las variaciones poblacionales de *Ae. aegypti* se explican en parte a las condiciones del clima, así como a las prácticas de almacenamiento de agua de las comunidades, ya que estos son factores necesarios para entender las variaciones entre dos localidades de una región, no obstante el clima predominante sea similar entre ellas (Bar Zeev, 2009; Rodríguez-Cruz, 2002).

Respecto al número de huevos registrados y los indicadores entomológicos analizados (IOP, IDH y MNH), se observó que LAP a pesar de que cuenta con un servicio de abastecimiento de agua más eficiente y de mayor cobertura que en LC, la población que habita el área urbana y especialmente la sub-urbana, tienden a mantener agua en una mayor diversidad de recipientes a diferencia de LC en donde las hembras disponen de una menor diversidad de sitios para depositar sus

huevos (Tovar-Zamora *et al.*, 2015). Este escenario ha sido ya planteado en varios documentos publicados, los autores confirman que las condiciones de urbanización y los estilos de vida son determinantes para el éxito reproductivo de este mosquito, siempre y cuando las condiciones climáticas sean las adecuadas, en particular la temperatura (Loh y Song 2001; Mohammed y Chadee, 2011; Chen y Hsieh 2012; Carrington *et al.*, 2013), aunque otros autores mencionan que además es igualmente importante la precipitación y la humedad ambiental de las regiones tropicales (Loh y Song 2001; Azil *et al.*, 2010; Da Rocha *et al.*, 2015) y templadas (Vezzani *et al.*, 2004; Troyo *et al.*, 2008). Con referencia a la temperatura, en el presente caso hubo una mayor correlación entre el número de huevos y la temperatura mínima en LAP y en LC, situación que coincide con otros estudios realizados (Abdalmagid y Alhusein 2008; Carrington *et al.*, 2013). De acuerdo con (Chen y Hsieh, 2012), la tasa de oviposición se da en el intervalo de 15 °C a 30 °C, sin embargo, puede haber grandes variaciones en temperaturas mayores a 30 °C. En el presente caso, el promedio mensual de temperatura mínima en LAP fue de 16 ± 6 °C y en LC 13 ± 3 °C), valores que se encuentran dentro de dicho intervalo, lo que podría explicar la correlación obtenida entre esta variable y la abundancia de huevos registrada en LAP, lo que se confirmó con el análisis de riesgo epidemiológico realizado mediante Odd roots, con base en los indicadores entomológicos utilizados. De esta manera se distingue a LAP como la localidad más vulnerable dentro del área de estudio.

Sowilem *et al.* (2013), señalan que más del 70% de los huevos ovipositados por una hembra pueden eclosionar y de estos arriba del 60% pueden alcanzar el estadio de pupa. Por lo que con base en el número total de huevos obtenidos a lo largo del ciclo anual en LAP y LC, *Ae. aegypti* representa un riesgo permanente para la generación de brotes epidemiológicos, por lo que es fundamental considerar estrategias eficientes para el manejo de esta especie. En la literatura disponible se reconoce que las fluctuaciones de los mosquitos pueden variar de una región a otra de acuerdo con sus límites térmicos (Wallner, 1987). Se ha observado que en condiciones de laboratorio a 16 °C requieren de más tiempo

para su desarrollo larval que a 37 °C, sin embargo, arriba de este valor, hay una disminución en la supervivencia de las formas inmaduras. En el caso de las hembras cuando son sometidas por arriba de 35 °C disminuyen la ovipostura y su ciclo gonadotrófico (Tun-Lin *et al.*, 2000). En este sentido, LAP y LC presentan durante el periodo de septiembre a noviembre temperaturas que fluctúan entre 16 y 36 °C, una condición propicia para la reproducción de esta especie, sin embargo, aun cuando estas condiciones no se presentan en el resto del año, gracias a la plasticidad ecológica y genética que ha desarrollado *Ae. aegypti* (Waldock *et al.*, 2013), es posible encontrarlo en todos los meses del año, por lo que las estrategias de manejo deben establecerse para cada localidad afectada de acuerdo con su dinámica poblacional (Azil *et al.*, 2010; Chen y Hsieh 2012).

Por lo que se refiere a la humedad relativa (HR), se sabe que este parámetro es determinante para la distribución y abundancia de los mosquitos, el mejor desempeño se da con valores entre 70 y 75% y con temperaturas entre 28 °C a 32 °C (Pedrosa *et al.*, 2010). En LAP y LC la HR más elevada (>70%) se dio entre septiembre y noviembre lo que coincide con las mayores abundancias de huevos, por el contrario las menores abundancias se dieron entre marzo y mayo con un valor promedio HR <62%. Algunos autores (Eiras y Carvallio 2009; Pedrosa *et al.*, 2010), consideran que bajo este ambiente los huevos y adultos pueden sufrir deshidratación, sin embargo, en el presente caso aún bajo esta condición *Ae. aegypti* continúa ovipositando a lo largo del año estableciendo un riesgo para la entidad.

Si bien la precipitación en el área de estudio es escasa, a través del análisis de Spearman no se obtuvo correlación entre esta variable y el número de huevos durante los meses de verano, con desfase de un mes. Lo que pudiera deberse a la disponibilidad de recipientes con agua a lo largo del año, establecidos por los habitantes de LAP y LC. No obstante ante la disponibilidad de agua almacenada, la precipitación pudiera considerarse no importante para la reproducción de *Ae. aegypti* de acuerdo con (Chen y Hsieh, 2012). Algunos estudios han reportado que el agua de lluvia es un estimulador de la eclosión del

huevo (Sota y Mogi 1992; Yotopranoto *et al.*, 2010). Ello podría estar sucediendo en LC, en donde huevos de oviposuras anteriores a las precipitaciones, que quedaron en la etapa de diapausa se ven estimulados por el agua de lluvia durante la época estacional de huracanes, que a su vez aumenta la disponibilidad y criaderos favoreciendo la abundancia de este mosquito. Octubre, el mes que presentó el mayor número de huevos en LAP, se explica por la asociación a un mes de retraso entre la precipitación y el número de huevos, lo que aumenta la disponibilidad de diversos recipientes que se encuentran en los patios de las viviendas y que almacenan agua de lluvia, convirtiéndose en criaderos potenciales de mosquitos, aunado a los ya existentes y disponibles durante todo el año. Para la zona de LC el mes de mayor precipitación y humedad relativa fue el mes septiembre para los 3 años de estudio, lo cual posiblemente influyó de manera directa en la dispersión de las hembras para colocar huevos en diversos recipientes, entre los cuales se encuentran los que almacenaron agua de lluvia, aumentando el éxito reproductivo de las mismas, lo que demuestra que no solo la precipitación es una condición que determine el aumento de huevos y en consecuencia la fluctuación de esta especie de manera directa, lo anterior ya señalado en otras regiones del mundo (Chen y Hsieh, 2012).

8.2 Susceptibilidad de *Ae. aegypti* a insecticidas

8.3 Temefos en larvas

En Baja California Sur, solamente se ha utilizado este larvicida durante los últimos 15 años. Los niveles de susceptibilidad a este producto muestran que de las tres poblaciones de estudio, Cabo San Lucas fue la que presentó el menor nivel de susceptibilidad requiriéndose 8.25 veces más producto que la cepa susceptible utilizada, en el caso de La Paz y San José del Cabo, 3.25 y 2.5 veces más respectivamente. Dicha situación es similar a valores obtenidos por otros investigadores en varios estados mexicanos en donde se tiene la presencia del

vector. No obstante en algunas ciudades se han obtenido valores de FR_{50} menores a los obtenidos en Cabo San Lucas como ejemplo se tiene Guerrero (Castro, *et al.*, 2014), Jalisco y San Luis Potosí (Rosas, 2011). Ello podría deberse a que en Cabo San Lucas se aplica temefos y permetrina dos insecticidas reportados con resistencia cruzada (Flores *et al.*, 2005) que al aplicarse de forma frecuente para evitar brotes epidémicos que afecten la actividad turística de esta ciudad se han alcanzado los niveles de susceptibilidad mencionados. En otros países se han obtenido resultados similares como Tailandia Jirakanjanakit *et al.* (2007), India (Singh *et al.*, 2014), Cuba (Bisset *et al.*, 2001), Venezuela (Álvarez *et al.*, 2006) y Brasil (Braga *et al.*, 2004), en donde también la susceptibilidad se ha reducido por su frecuente uso referido por Rawlins (1998). Algunos estudios demuestran que es posible revertir la resistencia de *Ae. aegypti* a temefos (Duque-Luna *et al.*, 2004), al suspender las aplicaciones (Prieto *et al.*, 2002). Con base en lo anterior y en los resultados obtenidos se sugiere utilizar otros compuestos de forma alternada como reguladores de crecimiento (piriproxifeno) (Terán *et al.*, 2014) y otras alternativas disponibles en el mercado.

8.4 Susceptibilidad a piretroides (permetrina, deltametrina y bifentrina)

Con los insecticidas piretroides: permetrina, bifentrina y deltametrina la población de Cabo San Lucas fue la que registró con permetrina y bifentrina la menor susceptibilidad no así con deltametrina, con la que se obtuvo 95 % de mortalidad. En San José del Cabo se observó una susceptibilidad ligeramente superior a la de Cabo San Lucas, con una menor susceptibilidad a bifentrina de los tres piretroides, en cambio en La Paz, se encontró el mayor nivel de susceptibilidad, lo que coincide con una menor frecuencia de aplicaciones ya que en este sitio no se cuenta con el apoyo de otros sectores para combatir a *Ae. aegypti* como en Cabo San Lucas.

Existen varios trabajos que consideran a *Ae. aegypti* como resistente a permetrina con base en los factores de resistencia obtenidos en poblaciones de

Guerrero (Aponte *et al.*, 2013), Veracruz (Bobadilla, 2010), Jalisco, San Luis Potosí (Rosas, 2011), Coahuila (Arce, 2004), Sonora y Tamaulipas (Flores *et al.*, 2009).

Esta situación coincide con lo referido por Flores *et al.* (2005), en un estudio previo realizado en la Península de Baja California quienes confirman lo anterior a pesar de haber trabajado con poblaciones de otras localidades (Loreto y Constitución. Otros autores de distintos países como Tailandia (Sirisopa *et al.*, 2014), Taiwan (Thongwat y Bunchon, 2015) y Venezuela (Álvarez *et al.*, 2008), refieren también resistencia de *Ae. aegypti* a permetrina, y responsabilizan este hecho al uso frecuente de este insecticida en conjunto con temefos. Rodríguez *et al.* (2002) refieren en sus estudios resistencia cruzada entre el DDT y algunos piretroides debida a los mecanismo del “Knockdown” y resistencia metabólica.

Bifentrina es considerada por algunos autores como un insecticida que puede usarse en lugar de permetrina (Flores *et al.*, 2013), particularmente en los casos en donde la susceptibilidad del mosquito es menor como en Veracruz (Bobadilla, 2010). Sin embargo, en el caso de Cabo San Lucas ya no se tiene esta alternativa debido a su uso frecuente y a la presión de selección ejercida como lo referido en Taiwan (Sirisopa *et al.*, 2014) y Pakistan (Jahan y Saquid, 2012), por lo que se sugiere que dentro de las estrategias de manejo de *Ae. aegypti* se integren otras alternativas de control.

Al presentar los mosquitos de Cabo San Lucas una susceptibilidad intermedia a deltametrina con 95.41% de mortalidad, cifra similar a la obtenida en Veracruz (Rosas, 2011), y en localidades obtenidas en otros países como Cuba (Bisset *et al.*, 2003), Perú (Chávez *et al.*, 2005), Colombia (Santacoloma *et al.*, 2010), Costa Rica (Bisset *et al.*, 2013) y Panamá (Cáceres *et al.*, 2013), al obtener estos valores deltametrina oferta una posibilidad de uso exitosa sin embargo en Guerrero, México las mortalidades obtenidas fueron menores al 50 % (Aponte *et al.*, 2013), por lo que debe ser utilizado de forma cuidadosa para evitar el incremento de la resistencia como se ha referido en Taiwan (Sirisopa *et al.*, 2014), Tailandia (Thongwat y Bunchu, 2015) y Nicaragua (Rodríguez *et al.*, 2008).

8.5 Susceptibilidad a malatión y clorpirifós

En México son escasos los estudios realizados con malatión, sin embargo, nuestros resultados muestran que los niveles de susceptibilidad encontrados en San José del Cabo presentan un menor valor que la respuesta obtenida en mosquitos de Torreón (Arce, 2012), Puerto Vallarta, Jalisco y Ciudad Valles, San Luis Potosí (Rosas, 2011), y mayor susceptibilidad que las obtenidas en varias ciudades de Guerrero como Chilpancingo (Rosas, 2011), Tierra Caliente, Costa Chica y Acapulco (Chino *et al.*, 2014). Así también de Tamaulipas (Reyes, 2007), y los poblados de Loreto y Constitución de B.C.S. (Flores *et al.*, 2015). Por otro lado, si bien las mortalidades obtenidas en el presente estudio con malatión fueron del 95 al 100% en las tres localidades, es importante considerar que el uso de este insecticida es de riesgo por su residualidad por lo que se sugiere que se evite su aplicación para el control de *Ae. aegypti* como ocurre en Panamá (Cáceres *et al.*, 2013) y Venezuela (Pérez y Molina, 2009), en donde la susceptibilidad de este insecto es aún elevada por no utilizarse.

En México existe poco conocimiento sobre la susceptibilidad a clorpirifós. Chino *et al.* (2014) realizaron un estudio de susceptibilidad en tres localidades de Guerrero: Tierra Caliente, Costa Chica y Acapulco, y refieren un factor de resistencia <10 , en el presente trabajo se obtuvieron factores de resistencia <5 en las tres poblaciones estudiadas, lo que puede deberse a que este producto, a pesar de ser permitido su uso para el control del mosquito, se ha aplicado de manera discrecional por su rápida degradación a elevadas temperaturas, una condición ambiental presente durante varios meses en B.C.S. Sin embargo podría utilizarse durante el invierno que es cuando las poblaciones del insecto son reducidas.

8.6 Susceptibilidad a propoxur

A pesar de ser el propoxur un insecticida perteneciente al grupo toxicológico de los carbamato que se caracterizan por su residualidad, se utiliza en varios países afectados por *Ae. aegypti*, en Colombia (Santacoloma *et al.*, 2010), Venezuela (Pérez y Molina 2009) y República Dominicana (Solís, 2000) en donde se obtuvieron elevados niveles de resistencia hacia este insecticida. En México solo se tiene referencia del trabajo realizado por Chino *et al.* (2014), en tres localidades de Guerrero quienes encontraron niveles de resistencia moderada, a diferencia de los valores obtenidos en el presente trabajo que indican susceptibilidad con una mortalidad del 100%.

8.7 Actividad enzimática

8.7.1 Acetilcolinesterasa

Diversos estudios realizados con *Ae. aegypti* han demostrado que la AChE alterada es el mecanismo de resistencia común para organofosforados (OP) y carbamatos (CARB) (Hemingway y Georghiou, 1983). En las tres poblaciones de *Ae. aegypti* estudiadas, se obtuvieron individuos fuera del rango de susceptibilidad obtenido por la cepa susceptible New Orleans (41.06 ± 26.20), indicando que estos insecticidas tienen menor rango de inhibición de la AChE en esos individuos que por consiguiente los hace resistentes. Flores *et al.* (2009) reportó actividad de iAChE en Coahuila, pero no en Sonora y Tamaulipas y refieren que este mecanismo no está asociado con la resistencia a los piretroides, sino más bien, con la resistencia a los insecticidas organofosforados y carbamatos. Flores *et al.*, 2005 reportaron actividad enzimática de acetilcolinesterasa en poblaciones de Ciudad Constitución y Loreto en B.C.S, donde los mayores niveles de actividad se presentaron en Loreto, con una media de 0.22 nm, siendo significativamente diferente del grupo conformado por las poblaciones de New Orleans, Ciudad

Constitución y Tijuana con medias de 0.023 nm, 0.047 nm y 0.050 nm, respectivamente. La población que obtuvo la menor media y fue significativamente diferente del resto de las poblaciones fue Tecate, con una media de -0.038 nm.

8.7.2 Esterasas α , β y ρ -NPA

Nuestras pruebas bioquímicas mostraron que la actividad de α y β esterasas fueron significativamente mayores en San José del Cabo y Cabo San Lucas, con respecto a la cepa de referencia, mientras que en las tres localidades, se observaron altos valores de actividad de esterasas con el sustrato ρ -NPA, en comparación con la cepa susceptible New Orleans. Sin embargo en las tres localidades los niveles de citocromo P⁴⁵⁰ no fueron estadísticamente diferentes a la cepa susceptible. Nuestros resultados confirman que el mecanismo de resistencia basado en esterasas presente en las tres poblaciones de estudio podría ser responsables de la resistencia a temefos y a permetrina, pero es necesario realizar pruebas de metabolismo para confirmarlo. Al respecto estudios realizados en Cuba en una cepa de laboratorio, mostraron que las enzimas esterasas y GSTs fueron responsables de la resistencia a los piretroides (Rodríguez *et al.*, 2007). En Brasil la alta actividad esterasa con sustrato ρ -NPA en algunas poblaciones se interpretó como una evidencia indirecta de la función de esterasas en la resistencia a los piretroides (Martins *et al.*, 2009). Algunos otros estudios han señalado que el incremento en la actividad de las esterasas se ha asociado con la resistencia del mosquito *A. aegypti* al temefos en Venezuela (WHO; 1981), Trinidad y Tobago (Vaughan *et al.*, 1998), Cuba (Rodríguez *et al.*, 2002, 2007), Perú (Bisset *et al.*, 2007), Tailandia (Saelim 2005) y Brasil (Boyer y David, 2006). Al respecto Molina *et al.* (2013) reportó que las enzimas esterasas, principalmente las que usan el sustrato ρ -NPA, son las primeras que aparecen confiriendo resistencia a organofosforados y piretroides.

En México se ha reportado en algunos estados que las oxidasas de función mixta (α y β esterasas y ρ -NPA), son uno de los principales mecanismos de

resistencia a temefos y permetrina en poblaciones de mosquitos del estado de Sonora (Flores *et al.*, 2009). En Quintana Roo Flores *et al.* (2006) reportó que los valores medios de absorbancia de α -esterasas en hembras de *Ae. aegypti* oscilaron entre 0.371nm y 0.963nm, mientras que los machos mostraron absorbancias medias entre 0.471 nm y 0.754 nm y los valores medios de absorbancia para β -esterasas se encontraron entre 0.601 nm y 1.190 nm en las poblaciones de hembras, mientras que los machos oscilaron entre 0.808 nm y 1.198 nm. En Mérida Yucatán González (2013) reportó valores de absorbancias para α -esterasas entre 0.776 nm a 1.071 nm y para β -esterasas los valores estuvieron entre 0.712 nm y 1.113 nm. Los cuales son mayores del obtenido en las poblaciones de La Paz, San José del Cabo y Cabo San Lucas.

8.7.3 Glutación -S - transferarsas

Este sistema enzimático generalmente está involucrado en la resistencia a insecticidas organofosforados y proveen la forma más importante de resistencia metabólica al organoclorado DDT en insectos (Ortelli *et al.*, 2003). En nuestras poblaciones de estudio se observaron diferencias significativas con la cepa susceptible, lo que sugiere que la resistencia basada en el metabolismo en las poblaciones de *Ae. aegypti* en B.C.S., puede estar mediado también por enzimas GSTs varios estudios en Latinoamérica han demostrado que las GSTs en conjunto con las α y β beta esterasas desempeñan un papel importante en la resistencia a los organofosforados y piretroides (Brogdon y McAllister, 1998). Estudios sobre *Ae. aegypti* de Cuba y Brasil han señalado una alta resistencia metabólica asociada con α y β esterasas y con GSTs (Martins *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011).

En México Flores *et al.* (2006), reportaron para localidades de Quintana Roo, México que los valores promedio de absorbancia de GSTs en hembras estuvieron entre 0.003 nm y 0.120 nm, mientras que en los machos fueron menores 0.003 nm y 0.109 nm. En Mérida, Yucatán se reportaron valores

promedio de absorbancia de GSTs entre 0.025 nm y 0.155 nm (González, 2013), valores menores que en nuestras poblaciones.

De acuerdo con nuestros resultados las GSTs pueden estar involucradas en la detoxificación de permetrina en los mosquitos de las tres poblaciones, similar a lo reportado en Nuevo León, donde se asociaron los elevados niveles de las GSTs con la detoxificación a permetrina en *Culex quinquefasciatus* (Reyes, 2007).

8.7.4 Citocromo p^{450}

Las monooxigenasas pueden contribuir a la resistencia de los organofosforados y están implicadas como el factor principal en muchos casos de resistencia metabólica a carbamatos y piretroides (Urmila *et al.*, 2001). En el caso de nuestras poblaciones en estudio no encontramos niveles elevados en comparación con la cepa susceptible New Orleans, y se obtuvo una susceptibilidad a propoxur con una mortalidad del 100% y a deltametrina solo en Cabo San Lucas fue de 95%. Lo que coincide con lo reportado en Cuba donde se encontraron niveles superiores de citocromo P^{450} en la cepa susceptible al aplicar deltametrina y propoxur (French *et al.*, 2015). En Quintana Roo, México se registraron concentraciones para hembras fueron de 0.080 y 1.170 y para machos de 0.075 y 0.120 (Flores *et al.* (2006). Reflejando que las de nuestro estudio fueron menores.

8.7.5 Frecuencia de las mutaciones V1016I Y F1534C

En las tres poblaciones estudiadas de B.C.S., se detectaron dos mutaciones no sinónimas en el canal de sodio, ambas con una frecuencia general del alelo de resistencia que en el caso de V1016I fue $\geq 0.70\%$, estudios previos han señalado que esta mutación está altamente relacionada con la resistencia a piretroides específicamente a permetrina en *Ae. aegypti* (Saaverdra *et al.*, 2007) y aumenta la posibilidad de que el 100% de los homocigotos lle1,016 sobrevivan a

exposiciones de permetrina en dosis de 5 μg a 10 μg por botella (Ponce *et al.*, 2009). Estudios han reportado en Venezuela una frecuencia de 0.293, mientras que en Santiago de Cuba, se observó un incremento significativo en la frecuencia de I1016 desde 0.033 en la generación F_1 hasta 0.567 en la F_{12} y 0.883 después de una selección adicional con deltametrina (Saavedra *et al.*, 2007).

En el caso de la mutación F1534C la frecuencia cuantificada en nuestras poblaciones de estudio fue \geq 0.81%, esta mutación en particular se ha encontrado con frecuencia en las Islas Caimán (Harries *et al.*, 2010), y en el sudeste de Asia en Tailandia (Yanola *et al.*, 2011) en las poblaciones de *Ae. albopictus* de Singapur (Marcombe *et al.*, 2014). Un estudio con mosquitos de Vietnam ha correlacionado esta mutación con la resistencia a piretroides tipo I pero no a los de tipo II (Harris *et al.*, 2010; Hu *et al.* 2011), y se ha reportado en *Ae. aegypti* en resistencia para permetrina y DDT (Yanola *et al.*, 2011). Contrariamente a estos informes, Álvarez *et al.* (2015) demostró la participación de esta mutación en la resistencia a la deltametrina en cinco poblaciones de mosquitos de Venezuela, y señalan que las frecuencias de la mutación F1534C son más altas (0,35 y 1,0%) que las frecuencias I1016 (0,01 y 0,375) además mencionan que con deltametrina se selecciona más rápidamente la mutación F1534C que I1016. Al respecto Kushwah *et al.* (2015) observaron que F1534C kdr confirió una mayor protección contra el DDT, en segunda instancia contra deltametrina pero no mostró una protección significativa contra la permetrina.

Sin embargo el efecto fenotípico de tener tanto alelos F1534C y V1016I aún no se conoce, pero las altas frecuencias de estos alelos en el Caribe sugiere una ventaja selectiva (Chang *et al.*, 2009). De modo que poblaciones de *Ae. aegypti* que presentan estas dos mutaciones tienen una mayor resistencia a los piretroides, por lo que es de gran importancia conocer las frecuencias alélicas ya que se ha observado que en poblaciones susceptibles con altas frecuencias de Val1,016 / Cys1,534 están en alto riesgo para la evolución de kdr, mientras que las poblaciones susceptibles sin mutación son menos propensos a desarrollar altos niveles de kdr, al menos durante un período de 10 años (Vera *et al.*, 2015).

Estudios en México han referido un aumento significativo en la mutación del gen Ile1016 en canales de sodio dependientes de voltaje de *Ae. aegypti* de 1996 a 2009, en varios estados, entre ellos Nuevo León en el norte, Veracruz (0.51%) en la costa atlántica central, Yucatán (0.145%), en Chetumal Quintana Roo (varió de 38,3% -88,3%) y en Guerrero (0.8) (Ponce *et al.*, 2009, Aponte *et al.*, 2013), similar a lo obtenido en la población de Cabo San Lucas, las diferencias encontradas en la frecuencia del gen Ile1016 en nuestras poblaciones de estudio pueden reflejar diferencias en la presión de selección y/o en la frecuencia inicial de Ile1,016. Al respecto, Ponce *et al.* (2009) mencionan que un aumento rápido de la frecuencia de mutación puede ser consecuencia de una selección direccional en un alelo recesivo. Un estudio realizado por el mismo autor señaló un análisis de regresión lineal realizado con la frecuencia de homocigotos Ile1016, y predijo con exactitud la tasa de caída para los mosquitos expuestos a permetrina en un bioensayo (R^2)=0.98.

Los resultados de este estudio indican que las poblaciones de *Ae. aegypti* contienen los genes de resistencia, y de acuerdo a la información disponible en la región se señala que en estas localidades se ha combatido este insecto principalmente con organofosforados, particularmente temefos y en el caso de piretroides con permetrina principalmente, por lo anterior es incuestionable el hecho de que los niveles de tolerancia de *Ae. aegypti* a estos productos esté relacionado con la frecuencia de aplicación de los mismos, lo que evidencia que se ha ejercido una presión de selección alta y prolongada, y que puede estar ocasionando una resistencia cruzada entre organofosforados y piretroides, ya que participan los mismos mecanismos de resistencia (gen kdr, citocromos P⁴⁵⁰, enzimas esterasas y glutatión-S-transferasas) (Hemingway *et al.*, 1989; Bisset *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2007).

Por tanto se recomienda el constante monitoreo de las mutaciones puntuales *Ae. aegypti*, para la apoyar la toma de decisiones en la aplicación de insecticidas, esto debido a que la resistencia puede cambiar con el paso del tiempo y de una localidad a otra, por lo tanto las decisiones para la aplicación de

cualquier insecticida debe estar basado en estudios, los cuales puedan detectar el mecanismo de resistencia involucrado en las poblaciones de mosquitos de las localidades de alto riesgo de incidencia de dengue. Así mismo es importante mencionar que desafortunadamente, los programas de control del dengue que han cambiado clases de insecticidas en respuesta a la resistencia, no siempre han sido testigo de una disminución de la resistencia al insecticida original.

8.8 Sales sódicas como atrayentes de hembras de *Ae. aegyptii*

Uno de los aspectos más importantes del ciclo de vida de los insectos que se alimentan de sangre es el localizar su alimento y dependiendo del tipo de asociación y acercamiento que presenten con el hospedero, es la especialización en el sistema sensorial (Lehane, 2005). Como muchos otros insectos que se alimentan de sangre, los mosquitos han desarrollado un sistema olfatorio, el cual es una estrategia de supervivencia que les permite encontrar al hospedero, encontrar al consorte y/o seleccionar los sitios de ovoposición (Carey y Carlson, 2011). Por esta razón, el estudio de la regulación y estimulación de los sistemas olfativos es de gran relevancia al generar información de utilidad que permita diseñar estrategias de manejo de los mosquitos que no dañen el ambiente, mediante el estudio y caracterización de atrayentes químicos para *Ae. aegyptii* que son: (1) fáciles de obtener en la industria, (2) que son moléculas pequeñas y volátiles y (3) su precio en el mercado es bajo. Tales como las sales sódicas derivadas de ácidos orgánicos como el citrato, fumarato, propionato y succinato. Se pretende no solo contribuir a la identificación de atrayentes potenciales para el manejo de esta especie, si no también que se pueda identificar algún compuesto que pueda ser utilizado de manera practica en los programas de control poblacional de esta especie.

Los resultados mostraron que de todas las sales sódicas derivadas de ácidos orgánicos (AOs) de cadena corta probados, propionato de sodio, independientemente del disolvente usado, pareciera ser el que da mayor

respuesta a las antenas en *Ae. aegypti*. Sin embargo, el nivel de la estimulación fue dependiente de la concentración del este ácido, la mayor estimulación fue obtenida en el rango de 200 a 250 ppm. En previos estudios (datos no mostrados) se probó que al utilizar propionato de sodio y citrato de sodio se incrementó el número de hembras en trampas de ovoposición. Estos resultados apoyan lo encontrado por otros autores que refieren a los ácidos orgánicos de cadena corta (incluyendo algunos ácidos grasos) como buenos atrayentes para *Ae. aegypti* y que las hembras de esta especie responden de manera diferencial a estos, dependiendo del tipo de sal sódica y su concentración, por lo que el rol de los AOs en el proceso de atracción es más complejo de lo que se pensaba previamente. Klowden (1994) reportó que la búsqueda de hospedero y por ende el proceso de atracción es modulada por el ciclo circadiano, el desarrollo de los organismos, la nutrición y el estado de madurez sexual. Lo que es evidente, es que el propionato de sodio es un buen candidato como atrayente, no solo para las hembras emergentes sino también para la ovoposición en conjunto con el ácido acético y butírico (Perry y Fray, 1967).

En el caso de *Ae. aegypti* el sistema olfatorio es relevante para asegurar la supervivencia de los mosquitos. Estudios recientes en bioinformática a partir de muestras de *Ae. aegypti*, han demostrado que esta especie tiene hasta 131 receptores olfativos potenciales (Bohbot *et al.*, 2007). Sin embargo, dicho sistema olfativo cambia a través del desarrollo del mosquito, por ejemplo, aquellas hembras que han ingerido una buena cantidad de sangre no tienen la misma capacidad para responder al estímulo olfativo. Por otro lado, mientras los huevos se desarrollan existe una señal humoral que reduce la sensibilidad de los receptores. De la misma manera las hembras que se encuentran en estado de diapausa presentan una baja atracción hacia el hospedero, mientras que aquellas que salen de diapausa inician el proceso de búsqueda del hospedero y en consecuencia su sensibilidad a percibir químicamente a este. Asimismo, la sensibilidad del mosco hacia el atrayente no está influida únicamente por el estado de desarrollo de este, sino también por las características químicas del atrayente.

Por ejemplo, se sabe que *Ae. aegypti* presenta una respuesta olfativa a ácidos carboxílicos, ácido láctico, amonio, acetona, butanona, ácidos grasos, 6-metil-5-hepten-2-ona y varios compuestos fenólicos, entre otros (Bosch *et al.*, 2000). Muchos de estos compuestos son secretados por la piel, aunque el mayor compuesto secretado es el dióxido de carbono (Davis y Bowen, 1994; Lehane, 2005), según Bernier *et al.* (2000) en la piel y el aliento de humanos se han identificado 346 compuestos volátiles, de los cuales más de 100 corresponden al aliento, Ellin *et al.* (1974) refiere de 135 a 3000 compuestos derivados de la excreción humana.

Uno de estos compuestos es el ácido L-(+) láctico el que se encuentra tanto en piel como en el aliento, este ácido juega un rol muy importante en los mosquitos *Ae. aegypti* para localizar a sus hospederos, actúa sinérgicamente con el dióxido de carbono (CO₂) (Zwiebel y Takken, 2004). Los mosquitos lo detectan a través de dos clases de neuronas presentes en las sensilas de las antenas, tanto de las hembras como de los machos, una clase de neuronas es excitada por el ácido láctico, mientras la otra es inhibida por el mismo ácido carboxílico (Davis y Bowen, 1994). Otras neuronas receptoras olfativas (específicas) se han descrito para el dióxido de carbono (las cuales residen en las sensilas ubicadas en los palpos maxilares) y actúan sinérgicamente con los receptores involucrados con el ácido láctico en la atracción de los mosquitos hacia sus hospederos (Acree *et al.*, 1968; Geier *et al.*, 1996).

La presencia de ácidos carboxílicos en la piel es un rasgo único en los humanos en comparación con otros mamíferos y aves. Los ácidos carboxílicos alifáticos tienen la capacidad de incrementar el aterrizaje de hembras de *Ae. aegypti* en las ovitrampas. Se sabe que en esta especie, el ácido acético por sí mismo tiene una gran capacidad de atraer las hembras a la ovoposición. Perry y Fay (1967) reportaron que los factores que presentan la influencia más importante en la selección de los sitios de ovoposición incluyen la textura, el color y el olor, ellos observaron que el ácido acético, propionico y butírico influye la respuesta de ovoposición en las hembras de *Ae. aegypti*. En otros estudios, al usar otros ácidos

carboxílicos se ha observado que influyen para la oviposición de *Anopheles gambiae* cuando se encuentra en contacto con ácidos como el 2 - oxopenatnoico (Healey y Copland, 2000) y, con la combinación de amonio, ácido láctico y otros AOs (Smallegange *et al.*, 2005). Además de la atracción por el huésped, la mayoría de los mosquitos requieren una fuente de azúcar, la cual es obtenida en su interacción con el néctar de algunas plantas, por lo que también pueden presentar cierta atracción hacia ellas (Woodbridge y Hancock, 1994; Pitts *et al.*, 2014). Estos resultados son evidencia de la relevancia y la complejidad que existe en la quimio-detección de alimento y sitios de reproducción para esta especie, que presenta respuestas muy diferentes ante compuestos puros y/o mezclados, debidas a las características propias de la especie. Por lo que se proponen estudios futuros que incluyan no únicamente el uso de algunos ácidos orgánicos puros, sino también utilizarlos en forma de mezclas por la posible sinergia que pudiera darse entre ellos y otros compuestos (ej. ácido láctico, dióxido de carbono, amonio y ácidos grasos).

Por lo que los resultados obtenidos sugieren que los ácidos orgánicos de cadena corta, tienen un gran potencial para su uso como atrayentes en estudios de monitoreo y manejo de este vector para reducir o evitar la transmisión del dengue.

9. CONCLUSIONES

Los índices entomológicos obtenidos por la SSA, permitieron estimar la abundancia poblacional a lo largo de 3 años en B.C.S.

El análisis de dichos índices muestran una fluctuación estacional de *Ae aegypti* similar en las tres localidades de estudio al presentar los mayores niveles poblacionales de junio a diciembre y los menores de enero a marzo, no obstante, el haber obtenido un mayor número de huevos en la Paz que en las dos localidades de Los Cabos, permite distinguir dos áreas ambiental (temperatura mínima) y culturalmente distintas (turismo y servicios públicos).

De las tres localidades de estudio la Ciudad de La Paz se distingue por presentar un mayor número de habitantes, lo que oferta al mosquito disponibilidad de sangre humana y recipientes para su reproducción, a pesar de tener mayor grado de aridez que las localidades de Los Cabos (San José del Cabo y Cabo San Lucas).

Con respecto al control químico utilizado en Baja California Sur, *Ae. aegypti* en sus estados inmaduros mostraron mayor residencia a temefos en la región de Los Cabos que en La Paz debido a que en Los Cabos se ha ejercido una mayor presión de selección a estos producto por su actividad turística. En el caso de los adultos coincide esta situación mostrando mayor resistencia a permetrina y bifentrina y de forma particular a malatión en San José del Cabo.

Dentro de los mecanismos de resistencia involucrados en la detoxificación de los insecticidas utilizados destaca la presencia de α , β y p NPA esterasas en conjunto con las GSTs. Asimismo, se manifestó la mutación V1016I y F1534C asociadas con resistencia a permetrina y bifentrina.

De los cuatro compuestos probados destaca el propionato de sodio, por haber mostrado la mayor atracción en los estudios de antenografía y de conducta de las hembras adultas de *Ae. aegypti*.

Con base en los resultados del presente trabajo es necesario además de las medidas aplicadas por la Secretaria de Salud, diseñar una trampa por ahora inexistente, que incluya además del propionato de sodio, ácido láctico, CO₂, amonio, entre otros elementos que incrementen la atracción del insecto hacia estos dispositivos para disminuir el riesgo de infección por dengue, chikungunya y ahora virus Zika.

9.1 Perspectivas.

De acuerdo con la información generada en este trabajo, ahora se tiene más claridad sobre el comportamiento de *Ae. aegypti* a lo largo de tres años, lo que podría ser usado por los programas de manejo establecidos por las instancias gubernamentales responsables, con base en los resultados obtenidos, se sugiere que las medidas de combate químico hacia estos insectos se apliquen cuando las poblaciones se encuentran en los menores niveles, esto además de ser más efectivo, permite destinar menos dinero para las campañas de erradicación que cuando el problema es más intenso. El estudio toxicológico permite definir con mayor precisión cuales insecticidas son más recomendables para usarse y las dosis más efectivas, con ello, se reduce la posibilidad de incrementar los mecanismos de resistencia ya establecidos en este insecto, o el desarrollo de nuevos mecanismos con base en la presión de selección generada por el excesivo combate químico. Por otro lado al encontrar una sustancia como el ácido propiónico como un atrayentes de *Ae. aegypti* oferta la posibilidad de usarse en trampas, ya sea para estimar la población de este insecto o como una estrategia de control que la población puede aplicar en sus casas, debido a su naturaleza y a que es más amigable con el ambiente. No obstante, es necesario continuar con

estos estudios para contribuir de forma más precisa en la problemática del dengue y su vector.

10. LITERATURA CITADA

- Abbot, W. S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18:265-267.
- Abdalmagid, M.S., S.H. Alhusein. 2008. Entomological Investigation of *Aedes aegypti* in Kassala and Elgadarief States, Sudan. *SJPH.* 3(2): 77–80.
- Acree, F. Jr., R.B. Turner, H.K. Gouck, M. Beroza, N. Smith. 1968. L-lactic acid: a mosquito attractant isolated from humans. *Science.* 161:1346-1347.
- Agresti, A., B. Coull. 1998. Approximate is better than 'exact' for interval estimation of binomial proportions. *Am. Stat.* 52(2):119–126.
- Alarcón, E., M. Segura, G. Rúa-Urbe, G. Parra-Henao. 2014. Evaluación de ovitrampas para vigilancia y control de *Aedes aegypti* en dos centros urbanos del Urabá antioqueño. *Biomédica. Revista del Instituto Nacional de Salud.* 34:409-24.
- Allan, S., D. Kline. 1995. Evaluation of organic infusions and synthetic compounds mediating oviposition in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Chem Ecol.* 21: 847-298.
- Alto, B., S. Juliano. 2001. Precipitation and Temperature Effects on Populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): Implications for Range Expansion. *J. Med. Entomol.* 38(5):646–656.
- Álvarez, L., A. Briceno, M. Oviedo. 2006. Resistencia al Temephos en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), del occidente de Venezuela. *Rev. Colomb. Entomol.* 32: 172-175.
- Álvarez, L., C. Castillo, M. Oviedo, F. Briceño. 2008. Diferencias en la susceptibilidad a la deltametrina en poblaciones de *Aedes aegypti* de Trujillo, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental.* 48(2):169-175.
- Álvarez, L., G. Ponce, K. Saavedra, B. López, A. Flores. 2015. Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. *Pest Manag Sci.* (6):863-869.

- Alzogaray, R., M. Picollo, E. Zerba, 1998. Independent and joint action of cis-and trans-permethrin in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Archives of Insect Biochem Physiol.* 37(3), 225-230.
- Arcari, P., N. Tapper, S. Pfueller. 2007. Regional variability in relationships between climate and dengue. Singapore. *Jour Trop Geo.* 28(3):251-272.
- Arce, D. 2004. Líneas de respuesta a adulticidas (Tiempo-Mortalidad), del mosquito *Aedes aegypti* (L.) en una población de Torreón, Coahuila. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Agronomía y Parasitología. Torreón Coahuila. 44p.
- Ayesa, P., L. Harrington, J. Scott. 2006. Evaluation of Novel Insecticides for Control of Dengue Vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 43(1):55-60.
- Azil, A., S. Long, S. Ritchie, C. Williams. 2010. The development of predictive tools for pre-emptive dengue vector control: a study of *Aedes aegypti* abundance and meteorological variables in North Queensland, Australia. *Trop Med Int Health.* 15(10):1190–1197.
- Barrera, R., C. Machado, L. Bulla. 1981. La persistencia de criaderos, sucesión y regulación poblacional en tres Culicidae urbanos (*Culex fatigans* Wied., *C. corniger* Theo., y *Aedes aegypti* (L.)). *Acta Cient Venez.* 32: 386–393.
- Barrera, R., M. Amador, A.J. MacKay. 2011. Population Dynamics of *Aedes aegypti* and Dengue as Influenced by Weather and Human Behavior in San Juan, Puerto Rico. *PLOS Negl Trop Dis.* 5(12): e1378. doi:10.1371/journal.pntd.0001378
- Barrera, R., M. Amador, G.G. Clark. 2006. Use of the pupal survey technique for measuring *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) productivity in Puerto Rico. *AJTMH.* 74: 290–302.
- Basso., C. 2010. Abordaje ecosistémico para prevenir y controlar al vector del dengue en Uruguay. Editorial Universidad de la República. Primera Edición. Uruguay, Montevideo. 284p.

- Bates, M. 1970. The natural history of mosquitoes. Peter Smith, Gloucester, MA. 378 pp.
- Bender, W.; Spierer, P. Hogness, D. 1983. Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the ace and rosy loci and the bi thorax complex in *Drosophila melanogaster*. J. Mol. Biol. 168: 17-34.
- Bernier, U., D. Kline, D. Barnard, C. Schreck, R. Yost. 2000. Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry. 2. Identification of volatile compounds that are candidate attractants for yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). Anal Chem. 72:747–756.
- Berti, J., J. González, E. Navarro, E. Zoppi, L. Gordon. 2010. Estacionalidad de la densidad larval del mosquito *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae) y otros insectos asociados a su hábitat en Sucre, Venezuela. Rev. Biol. Trop. 58(2): 777-787.
- Berti, J., R. Zimmerman, J. Amarista. 1993. Spatial and temporal distribution of Anopheline larvae in two malarious areas in Sucre State, Venezuela. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 88(3): 353-362.
- Berti, J., R. Zimmerman. 1998. Métodos para el control integrado de los vectores de la malaria en Venezuela. BMSA. 38(2):123-136.
- Bisset, J. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Revista Cubana de Medicina Tropical. 54(3):202-219.
- Bisset, J., M. Marquetti, R. Portillo, M. Rodríguez, S. Suárez, M. Leyva. 2006. Factores ecológicos asociados con la presencia de larvas de *Aedes aegypti* en zonas de alta infestación del municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Revista Panamericana de Salud Pública. 19(6):379-384.
- Bisset, J., M. Rodríguez, D. Fernández, O. Pérez. 2004. Estado de la resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en larvas del Municipio Playa, colectadas durante la etapa intensiva contra el *Aedes aegypti* en Ciudad de la Habana, 2001–2002. Rev Cub Med Trop. 56:61–66.

- Bisset, J., M. Rodríguez, D. Fernández. 2007. Resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de dos provincias del Perú. *Rev Cub Med Trop.* 58:210–216.
- Bisset, J., M. Rodríguez, D. Molina, C. Díaz, A. Soca. 2001. Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. *Rev Cubana Med Trop.* 53(1):37-43.
- Bisset, J., M. Rodríguez, L. 2003. Cáceres. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en 2 cepas de *Aedes aegypti* de Panamá. *Rev Cubana Med Trop.* 53(3):191-195.
- Bisset, J., R. Marín, M. Rodríguez, D. Severson, Y. Ricardo, L. French, M. Díaz, O. Pérez. 2013. Insecticide resistance in two *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strains from Costa Rica. *J Med Entomol.* 50(2):352-61.
- Bland, J., D. Altman. 2000. The odds ratio. *British Medical Journal.* 320-1468.
- Bobadilla, M. 2010. Perfil de resistencia y mutación Kdr Asociada a insecticidas piretroides en *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae) de Veracruz México. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. 142p.
- Bohart, R., R. Washino. 1978. Mosquitoes of California, 3rd ed. University of California Press. Division of Agricultural Sciences, Berkeley, CA. 126–134.
- Bohbot, J., J. Pitts, H. Kwon, M. Rutzler, H. Robertson, L. Zwiebel. 2007. Molecular characterization of *Aedes aegypti* odorant receptor gene family. *Insect Molecular Biology.* 16(5):25-537.
- Bosch, O., M. Geier, J. Boeckh. 2000. Contribution of fatty acids to olfactory host finding of female *Aedes aegypti*. *Chem Senses* 25:323-330.
- Boyer S, J. David, D. Rey, G. Lemperiere, P. Ravanel. 2005. Response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae to three xenobiotic exposures: larval tolerance and detoxifying enzyme activities. *Environ Toxicol Chem.* 25:470–476.
- Brady, O., M. Johansson, C. Guerra, S. Bhatt, N. Golding, D. Pigott, D. Smith, T. Scott, P. Gething, S. Hay. 2013. Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes*

- albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field settings. Parasit Vectors. 6:351
- Braga, I., J. Pereira, S. Silva, D. Valle. 2004. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99(2):199-203.
- Brogdon, W., A. Chan. Instrucciones para la Evaluación de la Resistencia a Insecticida en Vectores mediante del Ensayo Biológico de Botella CDC. National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 28p.
- Brogdon, W., J. McAllister. 1998. Insecticide resistance and vector control. Emerg Infect Dis. 4(4):605–613.
- Brogdon, W., R. Beach, J. Stewart, L. Castanaza. 1989. Análisis por ensayo de microplaca de la distribución de la resistencia de *Anopheles albimanus* a organofosforados y carbamatos en Guatemala. PAHO Bull. 106(2): 139-152.
- Brown, A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes; a pragmatic review. J. Am Mosq Control Assoc. 2 (2): 123-140.
- Burkot, T., T. Handzel, M. Schmaedick, J. Tufa, J. Roberts, P. Graves. 2007. Productivity of natural and artificial containers for *Aedes polynesiensis* and *Aedes aegypti* in four American Samoan villages. Med. Vet. Entomol. 21: 22–29.
- Cabezas, C. 2005. Dengue en el Perú: aportes para su diagnóstico y control. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica: 22(3):212-228.
- Cáceres, L., J. Rovira, A. García, R. Torres, M. De la Cruz. 2013. Determinación de la sensibilidad a insecticidas organofosforados, carbamato y piretroides en poblaciones de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) de Panamá. Biomédica. Revista del Instituto Nacional de Salud. 33(1):70-81.
- Carey, A., J. Carlson. 2011. Insect olfaction from model systems to disease control. PNAS. 108(32):12987-12995.

- Carpenter, S., W. LaCasse. 1955. Mosquitoes of North America (north of México). University of California. Press, Berkeley, Los Angeles, CA. 360p
- Carrada, T., I. Vázquez. 1984. La ecología del dengue y el *Aedes aegypti*. Investigación preliminar. Tercera parte. Salud Pública México. 26(3):297-311.
- Carrington, L., M. Armijos, L. Lambrechts, C. Barker, T. Scott. 2013. Effects of Fluctuating Daily Temperatures at Critical Thermal Extremes on on *Aedes aegypti* life-history traits. PLOS, one. 8(3):e58824.
- Castro G., 1998. Medidas dos niveles de infestación urbana para *Aedes aegypti* (*Stegomyia*) y *Aedes albopictus* en programa de vigilancia entomológica. IESUS. 7(3)49:57.
- Castro, E. 2014. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) a Insecticidas en Guerrero, México. Southwest. Entomol. 39(3):601-612.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. Surveillance and Control of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the United States. <http://www.cdc.gov/chikungunya/resources/vector-control.html>. Fecha de consulta 14 de Marzo de 2014.
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). 2010. Guía Metodológica para las acciones de control larvario. México, D.F. 32p.
- Chakraborty, S., S. Singha, G. Chandra. 2010. Mosquito larvicidal effect of orthophosphoric acid and lactic acid individually or their combined form on *Aedes aegypti*. Asian Pac J Trop Med. 3(12):954-956.
- Chan, K., B. Ho, Y. Chan. 1971. *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) in Singapore City. Larval Habitats. Bull World Health Organ. 44(5): 629-633.
- Chávez, J., J. Vargas, F. Vargas. 2005. Resistencia a deltametrina en dos poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del Perú. Rev Perú Biol.12:161-4.

- Chen, S., M. Hsieh 2012. Modeling the transmission dynamics of dengue fever: Implications of temperature effects. *Science of the Total Environment*, 431:385–391.
- Chino, A., H. Sanchez, L. Ortega, E. Castro. 2014. Insecticide Susceptibility of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) in Guerrero, Mexico. *Southwest. Entomol.* 39(3):601-612.
- Chiparelli, H., F. Schelotto. 2002. Dengue una enfermedad emergente muy cerca de nuestro país. *Revista de infectología. Departamento de bacteriología y virología, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.* <http://www.higiene.edu.uy>. Fecha de consulta 13 de enero de 2011.
- Christophers, S. 1960. *Aedes aegypti* (L.), the yellow fever mosquito: its life history. bionomics and structure. Cambridge University Press, ed., London. 721p.
- Clark, A., N. Shamaan. 1984. Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the housefly is a glutathione S-transferase. *Pest Biochem Physiol.* 22: 249-261.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2011. Estadísticas del agua en México. Editorial. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 130p.
- Cork, A., K. Park. 1996. Identification of electrophysiologically-active compounds for the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, in human sweat extracts. *Med. Vet. Entomol.* 10(3):269–276.
- Costero, A., J. Edman, G. Clark, T. Scott. 1998. Life table study of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Puerto Rico fed only human blood plus sugar. *J. Med Entomol.* 35:809-813.
- Cruz, C., C. Sebrango, M. Cristo, C. Pina, M. Marquetti, Sánchez L. 2010. Comportamiento estacional y temporal de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Sancti Spíritus, 1999-2007. *Rev Cubana Med Trop.* 62(1):5-10.
- Curtis, C., J. Lines, P. Carnevale, V. Robert, C. Boudin, J. Halna, L. Pazart, P. Gazin, A. Richard, J. Mouchet, J. Charlwood, P. Graves, M. Hossain, T. Kurihara, K. Ichimori, Z. Li, B. Lu, G. Majori, G. Sabatinelli, M. Coluzzi, K. Njunwa, T. Wilkes, R. Snow, S. Lindsay. 1990. Impregnated bed nets and

- curtains against malaria mosquitoes. In: Curtis CF, ed. *Appropriate technology in vector control*. Boca Raton, Florida: CRC Press.p5–46.
- Da Rocha, T., J. Marques, M. Dos Santos, A. Dos Santos, A. Camargos, V. Neves, S. Nunes, C. Di Lorenzo, A. Gutterres, L. Lara, C. Magalhaes, E. Kroon, L. Barcelos, B. Paiva, J. Siqueira. 2015. Dengue outbreaks in Divinópolis, south-eastern Brazil and the geographic and climatic distribution of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in 2011-2012. *Trop Med Int Health*. 20(1):77–88.
- Darsie, R. Jr., R. Ward. 2005. Identification and geographical distribution of the mosquito of North America, north of Mexico. Gainesville, FL: University Press of Florida. *Mosq. Syst. Suppl.* 1:313p.
- Davis, E., M. Bowen. 1994. Sensory physiological basis for attraction in mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* 10:316-325.
- Davis, E., P. Sokolove. 1975: Temperature responses of antennal receptors of the mosquito, *Aedes aegypti*. *J. comp. Physiol.* 96: 223-236.
- Denholm, I., D. Williamson. 2002. Insecticide resistance on the move. *Science*. 297:2222-2223.
- Dhimal, M., I. Gautam, H. Datt Joshi, R. O'Hara, B. Ahrens, U. Kuch. 2015. Risk Factors for the Presence of Chikungunya and Dengue Vectors (*Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*), Their Altitudinal Distribution and Climatic Determinants of Their Abundance in Central Nepal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9(3):e0003545.
- Díaz, F., S. Morelos, M. Carrascal, Y. Pájaro, H. Gómez. 2012. Actividad larvívica de extractos etanólicos de *Tabernaemontana cymosa* y *Trichilia hirta* sobre larvas de estadio III y IV de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev Cubana Plant Med.* 17(3): 256-267.
- Dibo, M., A. Chierotti, M. Ferrari, A. Mendonça, F. Neto. 2008. Study of the relationship between *Aedes aegypti* egg and adult densities, dengue fever and climate in Mirassol, state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103:554–560.

- Duncombe, J., A. Clements, J. Davis, W. Hu, P. Weinstein, S. Ritchie. 2013. Spatiotemporal patterns of *Aedes aegypti* populations in Cairns, Australia: assessing drivers of dengue transmission. *Trop Med Int Health*. 18:839–849.
- Duque, J., L. Muñoz, S. Navarro. 2003. Modelo de simulación para el control del mosquito *Aedes aegypti*, transmisor del dengue y la fiebre amarilla, por el crustáceo *Mesocyclops* spp. *Rev. Salud Pública*. 6:1-11.
- Duque-Luna, J., M. Ferrer- Martins, A. Feliz, E. Fumio, A. Navarro-Silva. 2004. Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cipermetrhin insecticides, Brazil. *Revista Saúde Pública*. 38 (6): 842-843.
- Eiras, A., P. Jepson. 1991. Host location by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): a wind tunnel study of chemical cues. *Bull. Entomol. Res*. 81: 151–160.
- Eiras, Á., R. Carvallio. 2009. Preliminary evaluation of the “Dengue-MI” technology for *Aedes aegypti* monitoring and control. *Cad. Saúde Pública. Cadernos de Saúde Pública*. 25(1):45–58.
- Eldridge, B. 2005. Mosquitoes, the Culicidae. In *Biology of Disease Vectors* (2nd ed). Ed. Marquardt, W., B. Kondratieff, G. Moore, J. Freier, H. Hagedorn, W. eds. *Biology of disease vectors*. 2nd ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press. pp. 95–111.
- Ellin, R., R. Forrand, F. Oberst, C. Crouse, N. Billerps, W. Koon, N. Musselman, F. Sidell. 1974. An apparatus for the detection and quantitation of volatile human effluents. *J. Chromatogr*. 100: 137-152.
- Espinoza, F., M. Hernández, M. Coll, R. 2001. Factores que modifican los índices larvarios de *Aedes aegypti* en Colima, México. *Rev Panam Salud Pública*; 10(1): 6-12.
- Facchinelli, L., L. Valerio, M. Pombi, P. Reiter, C. Constantini, A. Della Torre. 2007. Development of a novel sticky trap for container-breeding mosquitoes and evaluation of its sampling properties to monitor urban populations of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol*. 21(2): 183-195.
- Favier, C., N. Degallier, P. Ribeiro, M. Laurentino, M. Cavalcanti, M. Britto. 2006. Effects of climate and different management strategies on *Aedes aegypti*

- breeding sites: a longitudinal survey in Brasília (DF, Brazil). *TMIH*. 11:1104–1118.
- Fay, R.W., A.S. Perry. 1965. Laboratory studies of ovipositional preferences of *Aedes aegypti*. *Mosq News*. 26:531-535.
- Fernández, F., J. Lanaconne, 2005. Variaciones de tres índices larvarios de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) y su relación con los casos de dengue en Yurimaguas, Perú, 2000 - 2002. *Parasitología Latinoamericana*.; 60:3–16.
- Fernández, I. 2009. Biología y control de *Aedes aegypti*. Manual de operaciones. Editorial Universidad Autónoma de Nuevo León. Primera Edición. Monterrey, Nuevo León. 133p.
- Fernández, W., O. Iannacone., P. Rodríguez 2005. Comportamiento poblacional de larvas de *Aedes aegypti* para estimar los casos de dengue en Yurimaguas, Perú. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública*. 22(3)175-182.
- Flores, A., G. Ponce, B. Silva, S. Gutiérrez, C. Bobadilla, B. López, R. Mercado, W. Black. 2013. Wide spread cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Veracruz state Mexico. *Journal of economic entomology*. 106 (2):959-969.
- Flores, A., G. Reyes, I. Fernández-Salas, F. Sanchez, G. García. 2009. Resistance to Permethrin in *Aedes aegypti* (L.) in Northern Mexico, Southwest. *Entomol*. 34(2):167-177.
- Flores, A., J. Grajales, I. Fernández-Salas, G. Garica, M. Becerra. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. *J Am Mosq Cont Assoc*. 22(4): 672–677.
- Flores, A., W. Albedaña, M. Badii, I. Fernández-Salas, M. Loaiza, G. Ponce. S. Lozano, W. Brogdon, W. Black. 2005. Elevated δ -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, México. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 82: 66-78.

- Focks, D. 2003. A review of entomological sampling methods y indicators for dengue vectors. Editorial Organization World of Health. Primera Edición. Geneva Switzerland. 38p.
- Focks, D., D. Chadee. 1997. Pupal survey: an epidemiologically significant surveillance method for *Aedes aegypti*: an example using data from Trinidad. Am. J Trop. Med. Hyg. 56:159–167.
- Fonseca, I., M. Quiñones. 2005. Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en salud pública. Revista Colombiana de Entomología 31 (2): 107-15.
- Fox, I, A. Boike, I. Garcia.1960. Notes on rock hole breeding and resistance of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 9:425–429.
- Fox, I. 1973. Malathion resistance in *Aedes aegypti* from pressure on adults. Mosquito News. 33:161-164.
- Gadelha, D. 1985. Biología e comportamento do *Aedes aegypti*. Rev. Bras. Mal. Trop. 37:29-36.
- Ganesan, K., M. Mendki, M. Suryanarayana, R. Prakash, C. Malhotra. 2006. Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ovipositional responses to newly identified semiochemicals from conspecific eggs. Aust J Entomol. 45(1):75–80.
- García, C., L. García, L. Espinosa, C. Ley. 2011. Abundancia y distribución de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) y dispersión del dengue en Guasave Sinaloa, México. Rev. Biol. Trop. 59(4):1609-1619.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koeppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). 3a ed. Instituto de Geología. U.N.A.M. México, D.F. 246p.
- García, E., P. Mosiño. 1968. Los climas de Baja California. 29-54p. In: Comité Nacional Mexicano para el Decenio Hidrológico Internacional. Memoria 1966-1967. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Geier, M, O. Bosch, J. Boeckh. 1999. Influence of odour plume structure on upwind flight of mosquitoes towards hosts. J Exp Biol. 202:1639-1648.

- Geier, M., H. Sass, J. Boeckh. 1996. A search for components in human body odour that attract females of *Aedes aegypti*. In: Bock GR, Cardew G, (ed.) Olfaction in mosquitoes-host interactions. Ciba Foundation Symposium 2000. Chichester.132-148.
- Geier, M., O. Bosch, J. Boeckh. 1999. Ammonia as an attractive component of host odour for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Chem. Senses. 24:647–653.
- Georghiou, G. 1965. Genetic studies on insecticide resistance. Adv. Pest Control Res. 6:171.
- Georghiou, G. 1971. Resistance of Insects and Mites to Insecticide and Acaricides and the Future of Pesticide Chemicals. In: Swift, J. E. (ed.) Agricultural Chemicals Harmony or Discord for Food People and Environment. Univ. California Div. Agr. Sci. 151p.
- Georghiou, G., J. Baker, Z. Ai-khatib, R. Mellon, C. Murray, H. Tran, M. Vazquez, F. Pelsue, J. Hazelrigy. 1983. Insecticide resistance in mosquitoes: research on new chemicals and techniques for management. In “Mosquito Control Research Annual Report. Editorial Univ. Of California, Riverside. 86–91p.
- Gillies, M. 1980. The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera: Culicidae): a review. Bull Entomol Res. 70:525–532.
- Gillies, M., T. Wilkes. 1968. A comparison of the range of attraction of animal baits and of carbon dioxide for some West African mosquitoes. Bull. Entomol. Res. 59:441–456.
- Gómez-Dantés, H., J. Willoquet. 2009. Dengue in the Americas: challenges for prevention and control. Cad Saude Pública. 25(1):S19-31.
- Gómez-Dantés, H., M. Rodríguez. 1994. Paludismo y Dengue: de la erradicación a las zonas de riesgo. Cuadernos de Salud. Secretaría de Salud, México: 55-85.
- González, G. 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. 132p.
- González-Abraham, C., P. Garcillán, E. Ezqurra. 2010. Ecoregiones de la Península de Baja California: una síntesis. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 82:69–82.
- Gould, D., G. Mount, J. Scanlon, H. Ford, M. Sullivan. 1970. Ecology and control of Dengue vectors on an island in the Gulf of Thailand. *J. Med. Entomol.* 7:499-508.
- Grant, A., J. Dickens. 2011. Functional Characterization of the Octenol Receptor Neuron on the Maxillary Palps of the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *PLOS ONE* 6(6): e21785. doi:10.1371/journal.pone.0021785.
- Gubler, D. 1989. Dengue. In Monath, T.P. (ed.), *The Arbo viruses: Epidemiology and Ecology*, Vol. II. CRC Press, Boca Raton, F.L. 223–260p.
- Gubler, D., D. Trent. 1994. Emergence of epidemic Dengue and Dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infectious Agents and Disease.* 2: 383-393.
- Harbach, R., I. Kitching. 1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Syst. Entomol.* 23: 327–370.
- Harries, A., S. Rajatileka, H. Ranson. 2010. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83(2): 277–284.
- Harwood, R., M. James. 1988. *Entomología médica y veterinaria*. Primera Edición. Editorial Limusa, S.A. México. 615p.
- Hemingway J., R. Boddington, J. Harris. 1989. Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. *Bull Entomol. Res.* 79: 123-130.
- Hemingway, J., G. Georghiou. 1983. Studies on the acetylcholinesterase of *Anopheles albimrtnus* resistant and susceptible to organophosphate and carbamate insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 19:167-171.
- Hemingway, J., H. Ranson. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Ann Rev Entomol* 45:371–391.
- Hemingway, J., L. Field, J. Vontas. 2002. An overview of insecticide resistance.

- Hemingway, J., N. Hawkes, L. McCarroll, H. Ranson. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.* 34:653-65.
- Hemingway, J., S. Karunaratne. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol.* 12(1):1-12.
- Herrera, F. 1999. Ecología de *Aedes aegypti*. Dugandia. Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad del Atlántico: 2(1):5-8
- Holick, J., A. Kyle, W. Ferraro, R. Delaney, M. Iwasezko. 2002. Discovery of *Aedes albopictus* infected with West Nile virus in southeastern Pennsylvania. *J Am. Mosq. Cont. Assoc.* 18: 131.
- Ibáñez-Bernal, S., B. Briseño, J. Mutebi, E. Argot, G. Rodríguez, C. Martínez-Campos, C. Tapia-Conyer, A. Flisser. 1997. First Record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak in Reynosa, México. *Med. Vet. Entomol.* 11:305-309.
- Ibáñez-Bernal, S., C. Martínez-Campos. 1994. Claves para la identificación de larvas de mosquitos comunes en las áreas urbanas y suburbanas de la República Mexicana (Diptera: Culicidae). *Folia Entomológica Mexicana.* 92:43-73.
- Ibáñez-Bernal, S., H. Gómez-Dantés. 1995. Los vectores del dengue en México: Una revisión crítica. *Salud Pú. Méx.* 37:53-63.
- Jackson, B. 2004. Oviposition Preferences for Infusion-Baited Traps and Seasonal Abundance of *Culex* Mosquitoes in Southwestern Virginia. Thesis Masters of Science. Virginia Polytechnic Institute and State University. 76p.
- Jahan, N., A. Sadiq. 2012. Evaluation of resistance against Bifenthrin in Dengue vector (*Ae. aegypti*) from Lahore, Pakistan. 58(2):13-19.
- Jirakanjanakit, N., P. Rongnoparut, S. Saengtharatip, T. Chareonviriyaphap, S. Duchon, C. Bellec, S. Yoksan. 2007. Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005. *J Econ Entomol.* 100(2):545-50.

- Kay, B., V. Nam. 2005. New strategy against *Aedes aegypti* in the Vietnam, *Lancet*. 365:613–617.
- Kettle, D. S. 1984. *Medical and Veterinary Entomology*. Croom Helm, London and Sydney. 658p.
- Kettle, D. S. 1993. *Medical and Veterinary Entomology*. Cab International. UK: 125-131, 451-471.
- Kline, D., W. Takken, J. Wood, D. Carlson. 1990. Field studies on the potential of butanone, carbon dioxide, honey extract, 1-octen-3-ol, L-lactic acid and phenols as attractants for mosquitoes. *Med. Vet. Entomology*. 4:383–391.
- Kline, D. L., J. Wood, J. Cornell. 1991. Interactive effects of 1-octen-3-ol and carbon dioxide on mosquito (Diptera: Culicidae) surveillance and control. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 28:254-258.
- Klowden, M. J. 1994. Endogenous regulation of the attraction of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 10(2):326-332.
- Kolivras K. N. 2010. Changes in dengue risk potential in Hawaii, USA, due to climate variability and change. *Climate Res* 42:1–11.
- Köppen, W. 1948. *Climatología*. Ed. Fondo de Cultura Económica, México. 478p.
- Kostaropoulos, I. A. Papadopoulos, A. METAXAKIS, E. Boukpuvala, E. Papadopouloi-Mourkidou. 2001. Glutathione S-transferase in the defense against pyrethroid insecticides. *Insect Molecular Biology* 31:313-319.
- Kushwah, R., L. Cherry, L. Dykes, K. Neera, A. Tridibes, P. Om. 2015. Pyrethroid-resistance and presence of two knockdown resistance (kdr) mutations, F1534C and a novel mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti* *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9(1): e3332
- Kyle, J., E. Harris. 2008. Global spread and persistence of dengue. *Annu Rev Microbiol.* 62:71-92.
- Lacey, L., C. Lacey. 1990. The Medical Importance of Riceland Mosquitoes and their Control Using Alternatives to Chemical Insecticides. *J. Am. Mosquitoes Control Assosiation supplement*. 2:93.

- Latorre, C., L. Penilla. 1988. Influencia de los ciclones en la precipitación de Baja California Sur. *Atmósfera*. 1:99–11.
- Lehane, M. J. 2005. *The Biology of Blood-Sucking in Insects*. Second Edition. Cambridge University Press: 337p.
- Leitmeyer, K., D. Vaughn, D. Watts, R. Salas, I. Villalobos, D. Chacon, C. Ramos, R. Rico-Hesse. 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*. 73(6):4738-47.
- Leiva, N., O. Cáceres. 2004. Variabilidad genética de *Aedes aegypti* en algunas áreas del Perú usando Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP). *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 21(3):157-66.
- Lenhart, A, N. Orelus, R. Maskill, N. Alexander, T. Streit, P. McCall. 2008. Insecticide-treated bednets to control dengue vectors: preliminary evidence from a controlled trial in Haiti. *Trop Med Int Health*. 3(1):56–67.
- León De La Luz, J.L., J. Navarro-Pérez, A. Breceda. 2000. A transitional xerophytic tropical plant community of the Cape Region, Baja California. *J. Veg. Sci*. 555–564.
- Loh, B., R.J. Song. 2001. Modeling Dengue Cluster Size as a Function of. *Dengue Bulletin*. 25:74–78.
- López, B., G. Ponce, J. González, S. Gutiérrez, O. Villanueva, G. González, C. Bobadilla, I. Rodríguez, W. Black, A. Flores. 2014. Susceptibility to chlorpyrifos in pyrethroid-resistant populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico. *Vector Control pest management, resistance repellents*. 51(3):644-649.
- López, C., L. Lazo, L. Gil, L. Hermida, G. Guillén, G. Guzmán, S. Vázquez, L. Bernardo, A. Zulueta, J. Martín, I. Valdés, J. Sánchez, A. Blanco, Y. Romero, I. Menéndez, M. de la Rosa, G. Márquez, R. Silva, V. Falcón, M. Selman. 2008. New evidence on the virus capsid as a vaccine candidate against the Dengue 2 virus without the induction of the neutralizing antibodies. *Biotecnología Aplicada*. 25:54-55.

- Manorenjitha, M. 2006. The Ecology and Biology of *Aedes aegypti* (L.) And *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) and the Resistance Status of *Aedes albopictus* (Field Strain) Against Organophosphates in Penang, Malaysia. Master's thesis, University Sains Malaysia. 124p.
- Manrique-Saide, P., A. Che-Mendoza, E. Rebollar-Telléz, P. Coleman, C. Davies. 2004. Field evaluation of traditional vs. baited ovitraps, single and paired, with different concentrations and ages of Bermuda grass for the surveillance of *Ae. aegypti*. UADY-FMVZ-Departamento de Zoología. London School of Hygiene & Tropical Medicine. [diapositivas de PowerPoint]. Recuperado de: <http://www.cidfa2004.sld.cu/conferencia/ver.php?id=103>. Fecha de consulta 7 de enero de 2012.
- Manrique-Saide, P., C. Davies, P. Coleman, A. Che-Mendoza, F. Dzul-Manzanilla, M. Barrera-Pérez, P. Burciaga-Zu. 2013. The Risk of *Aedes aegypti* breeding and premises condition in south México. JAMCA. 29: 337–345.
- Marcombe, S., A. Farajollahi, S. Healy, G. Clark, D, Fonseca. 2014. Insecticide resistance status of United States populations of *Aedes albopictus* and mechanisms involved. PLoS One. 9(7):e101992.
- Martínez, F.C. 1987. Los Mosquitos de México (Diptera: Culicidae). Taxonomía, Distribución Geográfica y su importancia en Salud Pública. Tesis UNAM Facultad de Ciencias. 198p.
- Maymó, A.C. 2008. Estudio de los mecanismos de resisyencia frente a insecticidas en dos insectos plaga: *Battella germanica* (L.) y *Frankliniella Occidentalis* (pergande). Tesis de Doctorado. Universidad de Valencia. España.
- Mazine, C., M. Macoris, M. Macoris-Andrighetti, S. Yasumaro, M. Silva, M. Nelson, P. Winc. 1996. Disposable containers as larval habitats for *Aedes aegypti* in a city with regular refuse collection: a study in Marilia, Sao Paulo State, Brazil. Acta Tropica. 62:1-13.
- Mazzarri, M., G. Georghiou. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field

- populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. J Am Mosq Control Assoc. 11(3):315-22.
- Meijerink, J., M. Braks, A. Brack, A. Adam, T. Dekker, M. Posthumus, T. Van Beek, J. Van Loon. 2000. Identification of olfactory stimulants for *Anopheles gambiae* from human sweat samples. J. Chem. Ecol. 26, 1367-1382.
- Melander, A. 1914. Can insect become resistant to spray? J. Econ. Entomol. 7:167.
- Micieli, M., J. García, G. Martí. 2006. Dinámica poblacional de los estadios inmaduros del vector del dengue *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): un estudio longitudinal (1996-2000). Rev. Biol. Trop. 54: 979-983.
- Mohammed, A., D. Chadee. 2011. Effects of different temperature regimens on the development of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) mosquitoes. Acta Trop. 119(1):38–43.
- Molina, D., D. Bastidas, L. Figueroa. 2013. Malathion vs. *Aedes aegypti* (Linnaeus, Diptera: Culicidae) from different regions of Venezuela. B Malarial Salud Amb. LIII(1):46-55
- Moore, C., B. Cline, E. Ruiz-Tiben, D. Lee, H. Romney-Joseph, E. Rivera-Correa. 1978. *Aedes aegypti* in Puerto Rico. Environmental determinants of larval abundance and relation to dengue virus transmission. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27:1225-1231.
- Morrison, A., H. Astete, C. Chapilliquen, G. Ramirez-Prada, A. Diaz, T.W. Scott. 2004. Evaluation of a sampling methodology for rapid assessment of *Aedes aegypti* infestation levels in Iquitos, Perú. J. Med. Entomol. 41: 502–510.
- Morrison, A.C., E. Zielinski-Gutierrez, T.W. Scott, R. Rosenberg. 2008. Defining Challenges and Proposing Solutions for Control of the Virus Vector *Aedes aegypti*. PLOS Med 5(3):e68. doi:10.1371/journal.pmed.0050068
- Nauen, R. 2007. Perspective Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. Pest Management Science.63:628-633.
- Nelson, M. J. 1986. *Ae. aegypti*: Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud. Washington, DC. 50p.

- Nene, V., J. Wortman, D. Lawson, B. Haas, C. Kodira, Z. Tu, B. Loftus, Z. Xi, K. Megy, M. Grabherr, Q. Ren, E. Zdobnov, N. Lobo, K. Campbell, S. Brown, M. Bonaldo, J. Zhu, S. Sinkins, D. Hogenkamp, P. Amedeo, P. Arensburger, P. Atkinson, S. Bidwell, J. Biedler, E. Birney, R. Bruggner, J. Costas, M. Coy, J. Crabtree, M. Crawford, B. Debruyn, D. Decaprio, K. Eiglmeier, E. Eisenstadt, H. El-Dorry, W. Gelbart, S. Gomes, M. Hammond, L. Hannick, J. Hogan, M. Holmes, D. Jaffe, J. Johnston, R. Kennedy, H. Koo, S. Kravitz, E. Kriventseva, D. Kulp, K. Labutti, E. Lee, S. Li, D. Lovin, C. Mao, E. Mauceli, C. Menck, J. Miller, P. Montgomery, A. Mori, A. Nascimento, H. Naveira, C. Nusbaum, S. O'leary, J. Orvis, M. Pertea, H. Quesneville, K. Reidenbach, Y. Rogers, C. Roth, J. Schneider, M. Schatz, M. Shumway, M. Stanke, E. Stinson, J. Tubio, J. Vanzee, S. Verjovski, D. Werner, O. White, S. Wyder, Q. Zeng, Q. Zhao, Y. Zhao, C. Hill, A. Raikhel, M. Soares, D. Knudson, N. Lee, J. Galagan, S. Salzberg, I. Paulsen, G. Dimopoulos, F. Collins, B. Birren, C. Fraser-Liggett, D. Severson. 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 316: 1718–1723.
- Nkya, T. E., I. Akhouayri, B. Poupardin, R. Batengana, F. Mosha, S. Magesa, W. Kisinza, J. David. 2014. Insecticide resistance mechanisms associated with different environments in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a case study in Tanzania. *Malar J.* 2014 Jan 25; 13:28. doi: 10.1186/1475-2875-13-28.
- Norma Oficial Mexicana.NOM-032-SSA2-2010. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. Diario Oficial de la Federación. 29 de abril de 2010.
- Normile, D. 2013. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science.* 342: 415.
- Ooi, E., K. Goh, D. Gubler. 2006. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. *Emerg. Infect. Dis.*12:887–93.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 1957. Informe Anual de actividades de la OMS. Editorial .Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza.182p.

- Organización Mundial de la Salud (OMS). 1997. Informe sobre la salud en el mundo. Editorial .Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza.199p
- Pedrosa, E., E. Mendonça, J. Cavalcanti, C. Ribeiro. 2010. Impact of small variations in temperature and humidity on the reproductive activity and survival of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). Revista Brasileira de Entomología. 54(3):488-493.
- Pérez, P., D. Molina. 2009. Resistencia focal a insecticidas organosintéticos en *Aedes aegypti* (Linneaus, 1762) (Diptera: Culicidae) de diferentes municipios del estado Aragua, Venezuela. Bol. Mal. Salud Amb. Vol. XLIX(1):143-150.
- Perry, A., R. Fay. 1967. Correlation of chemical constitution and physical properties of fatty acid esters with oviposition response of *Aedes aegypti*. Mosq News. 27:175-183
- Pitts, R. J., R. Mozuraitis, A. Gauvina-Bialecki, G. Lemperiere. 2014. The roles of kairomones, synomones and pheromones in the chemically-mediated behaviour of male mosquitoes. Acta Trop.132: S26-S34.
- Ponce, G., A. Flores, I. Fernández, K. Saavedra, G. Reyes, S. Lozano, J. Bond, M. Casas, J. Ramsey, J. García, M. Domínguez, H. Ranson, J. Hemingway, L. Eisen, W. Black. 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México. PLoS Negl. Trop. Dis. 3:531–560.
- Pontes, R., J. Freeman, W. Oliveira-Lima, J.C. Hodgson, A. Spielman. 2000. Vector densities that potentiate dengue outbreaks in a Brazilian city. Am. J. Trop. Med. Hyg. 62:378–383.
- Pratt, H., G. Chester. 1993. Mosquitoes of Public Health Importance and Their Control. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Self-study Course 3013-G: Vector-Borne Disease Control. 85p.
- Qiu, Y., R. Smallegange, S. Hoppe, J. Van, E. Bakker, W. Takken. 2004. Behavioural and electrophysiological responses of the malaria mosquito

- Anopheles gambiae* Giles *snesu stricto* (Diptera: Culicidae) to human skin emanations. *Med. Vet. Entomol.* 18:429-438.
- Rawlins, S., R. Martinez, S. Wiltshire, G. Legall, G. 1998. A comparison of surveillance systems for the dengue vector *Aedes aegypti* in Port of Spain, Trinidad. *J Am Mosq Control Assoc.* 14:131-6.
- Rawlins, S., R. Ragoonansingh. 1990. Comparative organophosphorous insecticide susceptibility in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and *Toxorhynchites moctezuma*. *J Am Mosq Control Assoc.* 6:315-17.
- Reinert, J., R. Harbach, I. Kitching. 2004. Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zoological Journal of the Linnean Society.* 142:289–368.
- Reiter, P., M. Nathan. 2001. Guías para la Evaluación de la Eficacia del Rociado Espacial de Insecticidas para el control del vector del Dengue. Organización Mundial de la Salud. 25p.
- Richards, S., S. Anderson, B. Alto. 2012. Vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) for dengue virus in the Florida Keys. *J. Med. Entomol.* 49: 942–946.
- Ritchie, S., S. Long, A. Hart, C. Webb, R. Russell. 2003. An adulticidal sticky ovitraps for sampling container-breeding mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* 19: 235 – 242.
- Ritchie, S. A., M., Asnicar, B.H., Kay. 1997. Acute and sublethal effects of (S)-methoprene on some Australian mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* 13(2):153-5.
- Rodríguez, M. 2008. Tesis de doctorado “Estudio de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kauri”. 128 pp.
- Rodríguez, M., J. Bisset, D. Fernández. 2007. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from some Latin American countries. *J Am Mosq Control Assoc.* 24:420–9.

- Rodríguez, M., J. Bisset, M. Ruiz, A. Soca. 2002. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J Med Entomol.* 39:882–8. 22.
- Rodríguez-Cruz, R. 2002. Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Rev Cubana Med Trop.* 54(3):189–201.
- Rojas, A., G. Schmeda. 1992. Feeding Deterrence and Insecticidal Effects of Plants Extracts on *Lutzomyia longipalpis*. *Phytoth Rese.* 6:64-7.
- Rosas, V. 2011. Susceptibilidad de cuatro poblaciones de *Ae. aegypti* (L) (Diptera: Culicidae) a insecticidas en Jalisco, san Luis Potosí y Guerrero. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. 50p.
- Roth, A., A. Mercier, A. Lepers, D. Hoy, S. Duituturaga, E. Benyon, L. Guillaumot, Y. Souarès. 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):20929. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20929>
- Rubio-Palis, Y., L.M. Pérez-Ybarra, M. Infante-Ruíz, G. Comach, L. Urdaneta-Márquez. 2011. Influencia de las variables climáticas en la casuística de dengue y la abundancia de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Maracay, Venezuela. *Bol Mal Salud Amb.* 51(2): 145-158.
- Saavedra, K. L. Urdaneta, S. Rajatileka, M. Moulton, A. Flores, I. Fernandez, J. Bisset, M. Rodriguez, P. McCall, M. Donnelly, H. Ranson, J. Hemingway, W. 2007. Mutations in the voltage gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology.* 16:785–798.
- Saavedra, K., C. Strobe, A. Flores, I. Fernandez, H. Ranson, J. Hemingway, W. Black. 2008. QTL mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics.* 180:1137–1152.
- Saelim, V., W. Brogdon, J. Rojanapremsuk, S. Suvannadaba, W. Pandii, J. Jones, R. Sithiprasasna. 2005. Bottle and biochemical assays on temephos

- resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 36: 417–25.
- Salinas, A., M. Wong. 1999. Glutathione S-transferases a review. Curr. Med. Chem. 6: 279–309.
- Salinas, C., A. Leyva, D. Lluch, E. Díaz. 1990. Distribución geográfica y variabilidad climática de los regímenes pluviométricos en Baja California Sur, México. Atmósfera. 3: 217–237.
- Sames, W., J. Bueno, J. Hayes, J. Olson. 1996. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Lower Rio Grande Valley of Texas and Mexico. J Am Mosq Control Assoc. 12(3):487-90.
- Sanabria, L., E., Segovia, N., González, P., Alcaraz, N., Vera. 2009. Actividad Larvicida de extractos vegetales acuosos en larvas de *Ae. aegypti* (primeros ensayos). Memorias del Instituto de Investigaciones Ciencias de la Salud. 5(1):26-31.
- Sánchez, L., V. Vanlerberghe, L. Alfonso, C. Marquetti, M. Guzman, J. Bisset, S. Vander. 2006. *Aedes aegypti* larval indices and risk for dengue epidemics. Emerg Infect Dis. 12(5):800-806.
- Santacoloma, L., B. Chaves, H. Brochero. 2010. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. Rev Panam Salud Pública. 27(1):66–73.
- Santana, A., R. Roque, A. Eiras. 2006. Characteristics of grass infusions as oviposition attractants to *Aedes* (*Stegomyia*) (Diptera: Culicidae) J Med Entomology. 43:214-220.
- Santos, E., J. Correia, L. Muñiz, M. Meiado, C. Albuquerque. 2010. Oviposition Activity of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) in Response to Different Organic Infusions. Neotropical Entomology. 39(2):299-302.
- Sawby, R., M. Klowden, R. Sjogren. 1992. Sublethal effects of larval methoprene exposure on adult mosquito longevity. Journal of the American Mosquito Control Association. 8(3):290-2.

- Schmeda, G., A. Arias. 1992. A screening method for natural products on triatominae bugs. *Phytother. Res.* 6: 68-73.
- Science. 298(5591): 96-97.
- Scott, T., A. Morrison. 2003. *Aedes aegypti* density and the risk of dengue virus transmission. In Takken, W., T., Scott, Eds. Ecological aspects for application of genetically modified mosquitoes. Frontis, Dondrech, the Netherlands.187-206.
- Scott, T., G. Clarck, L. Lorenz, P. Amerasinghe, P. Reiter, J. Edman. 1993. Detection of multiple feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. *Journal Medical Entomology.* 30: 94-99.
- Sheppard P., W. Macdonald, R. Tonn. 1969. A new method of measuring the relative prevalence of *Aedes aegypti*. *Bull World Health Organ.* 40(3):467–468.
- Sirisopa, P., T. Kanutcharee, CH.Theeraphap, J. Waraporn. 2014. Resistance to Synthetic Pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Kasetsart J. Nat. Sci.* 48: 577–586.
- Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue (SINAVE/DGE/SALUD). 2011. Disponible en http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/panodengue/historicos_denge.html. Fecha de consulta 7 de enero de 2012.
- Smallegange, R., Y. Qiu, J. Van Loon, W. Takken. 2005. Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). *Chem. Senses* 30:145–152.
- Smith, C.N., N., Smith, H.K., Gouck, D.E., Weidhaas, I.H., Gilbert, M.S., Mayer, B.J., Smittle, A., Hofbauer. 1970. L-Lactic acid as a factor in the attraction of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to human hosts. *Annals of the Entomological Society of America.* 63:760–770.

- Sota, T., M. Mogi. 1992. Interspecific variation in desiccation survival time of *Aedes* (*Stegomyia*) mosquito eggs is correlated with habitat and egg size. *Oecologia*. 90(3):353–358.
- Stein, M., G., W. Oria, J. Almiron, J., Willener. 2005. Fluctuación estacional de *Aedes aegypti* en Chaco, Argentina. *Rev. Saúde Pública*. 39(4):559-564
- Stephenson, Jr. 2005. Understanding dengue patogénesis: implications for vaccine desing. *Bill World Health Organ*. 83(4):308-14.
- Strode, C., C. Wondjia, J. David, N. Hawkesa, N. Lumjuanc, D. Nelsond, D. Dranee, K. Parakrama, J. Hemingway, C. Black, H. Ransona. 2007. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Molec Biol*. 38(1):113–123.
- Sulaiman, S., Z. Pawanchee, Z. Arifin, A. Wahab. 1996. Relationship between Breteau and House indices and cases of dengue/dengue hemorrhagic fever in Kuala Lumpur, Malaysia. *J. Am. Mosq. Control. Assoc*. 12:494-96.
- Takken, W. 1991. The role of olfaction in host-seeking of mosquitoes: a review. *Insect Science and its Application*. 12:287–295.
- Takken, W. 1996. Synthesis and future challenges: the response of mosquitoes to host odours. *Olfaction in mosquito host interactions*. Wiley. Chichester, United Kingdom. 302–320.
- Takken, W., B. Knols. 1999. Odor-mediated behavior of afrotropical malaria mosquitoes. *Annual Review of Entomology*. 44:131–157.
- Takken, W., D. Kline. 1989. Carbon dioxide and 1-octen-3-ol as mosquito attractant. *Journal American Mosquitoes Control Assoc*. 5:311-316.
- Takken, W., T. Dekker, Y. Wijnholds. 1997. Odor-mediated flight behavior of *Anopheles gambiae* Giles sensu stricto and *An. stephensi* Liston in response to CO₂, acetone, and 1-octen-3-ol (Diptera: Culicidae). *J. Insect Behav*. 10:395–407.
- Tapia-Conyer, R., J., Méndez -Galván, P., Burciaga-Zúñiga. 2012. Community participation in the prevention and control of dengue: the patio limpio strategy in Mexico. *Paediatr Int Child Health*. 32(1):10-13.

- Terán, M. C., M. Rodríguez, Y. Ricardo, J. Bisset. 2014. Evaluación de Temefos y pyriproxifeno en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Guayaquil, Ecuador. *Med. Trop.* 66:1.
- Thirión, J. I. 2002. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) como transmisor del dengue en México. Tesis UNAM Facultad de Ciencias: 134p.
- Thongwat, D., N. Bunchu. 2015. Susceptibility to temephos, permethrin and deltamethrin of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Muang district, Phitsanulok Province, Thailand. *Asian Pac J Trop Med.* 8(1):14-8
- Toma, T., I. Miyagi, T. Okazawa, J. Kobayashi, S. Saita, A. Tuzuki, H. Keomanila, A. S., Nambanya, M., Phompida, M., Takakura. 2000. Entomological surveys of malaria in khammouane province, Lao PDR, in 1999 and 2000. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 33: 532-546.
- Torres, T., R. Caballero, J. Barraza, J. Romero. 2006. Cultural Conceptions about Dengue in Nayarit, Mexico. *Dengue Bull.* 30: 223-33.
- Toutant, J. 1989. Acetylcholinesterase: catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Prog Neurobiol.* 32:423-446.
- Tovar, I., A. Ramos., R. Servin. 2015. Entomological Indicators to Assess Larval *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) Control in Baja California Sur, México. *Southwest. Entomol.* 40(1):81–96.
- Troyo, A., O. Calderón-Arguedas, D.O. Fuller, M.E. Solano, K.L. Arheart, D.D. Chadee, J.C. Beier. 2008. Seasonal profiles of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larval habitats in an urban area of Costa Rica with a history of mosquito control. *J. Vector Ecol.* 33:76–88.
- Tun-Lin, W., B. Kay, A. Barnes, S. Forsyth. 1996. Critical examination of *Aedes aegypti* indices: correlations with abundance. *Am J Trop Med Hyg.* 54:543–547.
- Tun-Lin, W., T. Burkot, B. Kay, 2000. Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in North Queensland, Australia. *Med Vet Entomol.* 14(1):31–37.

- Vargas, L., A. Martínez-Palacios. 1956. Anofelinos mexicanos, taxonomía y distribución. México, D.F Comisión Nacional para la Erradicación del Paludismo, Secretaría de Salubridad y Asistencia. 181p.
- Vaughan, A., D. Chadee, R. Ffrench. 1998. Biochemical monitoring of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. *Med Vet Entomol.* 12(3):318-21.
- Vezzani, D., S. Velázquez, N. Schweigmann. 2004. Seasonal Pattern of Abundance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Buenos Aires City, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 351–356.
- Villar, L., G. Dayan, J. Arredondo-García, D. Rivera, R. Cunha, C. Deseda, H. Reynales, M. Costa, J. Morales-Ramírez, G. Carrasquilla, L. Rey, R. Dietze, K. Luz, E. Rivas, M. Miranda, M. Cortés, B. Zambrano, E. Langevin, M. Boaz, N. Tornieporth, M. Saville, F. Noriega. 2015. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. *N Engl J Med.* 372(2):113-123.
- Villegas-Trejo, A., A. Che-Mendoza, M. González-Fernández, G. Guillermo-May, H. González-Bejarano, F. Dzul-Manzanilla, P. Manriqueaide. 2011. Control enfocado de *Aedes aegypti* en localidades de alto riesgo de transmisión de dengue en Morelos, México. *Salud Pública Méx.* 53:141–151.
- Wang, CH., N. T Chang, H. Wu, C. HO. 2000. Integrated control of the dengue vector *Aedes aegypti* in Liu- Chiu village, Ping - Tung, country, Taiwan, J. AM. Mosq. Control Assoc. 16(2):93-99.
- Williams, C. R., S. A., Ritchie, S. A., Long, N., Dennison, R. C., Russell. 2007. Impact of a bifenthrin-treated lethal ovitraps on *Aedes aegypti* oviposition and mortality in north Queensland, Australia. *J Med Entomol.* 44: 256-262.
- Wirth, M. C., G. Georghiou. 1999. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. *J. Amer. Mosq. Control. Assoc.* 15:315-320.

- Woodbridge, A., R. Hancock. 1994. Nectar-related olfactory and visual attractants for mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 10 (2):288-296.
- World Health Organization. 1981. Instructions for determining the Susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC/81.807. Geneva Switzerland.
- World Health Organization. 1982 Manual on environmental management for mosquito control, Geneva Geneva Switzerland.
- World Health Organization. 1998. Discriminating Concentrations of Insecticides for Adult Mosquitoes. WHO/CDC/CPC/MAL/98.12. WHO, Geneva Switzerland.
- World Health Organization. 2009. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Genève Switzerland : World Health Organization.
- World Health Organization. 2012. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. World Health Organization Switzerland, 35 pp.
- World Health Organization. 2013. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. Genève, Switzerland. 40p.
- Yanola, I., P. Somboon, C. Walton, W. Nachaiwieng, P. Somwang, L. Prapanthadara. 2011. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Trop Med Int Health*. 16(4):501–509
- Yotopranoto, S., K. Mulyatno, H. Arwati. 2010. The Fluctuation of *Aedes aegypti* in Endemic Area of Dengue Hemorrhagic Fever in Surabaya City, Indonesia. *IJTID*. (2):60–64.
- Zapata-Peniche, A., P. Manrique-Saide, E. Rebollar-Téllez, A. Che-Mendoza, F. Manzanilla-Dzul. 2007. Identificación de larvas de mosquito (Diptera: Culicidae) de Mérida, Yucatán, México y sus principales criaderos. *Rev Biomed*. 18(1):3–17.

- Zar, H. 2010. Biostatistical analysis. 5^a edition. Pearson Education international, 960p.
- Zhen, T., B. Kay. 1993. Comparison of sampling efficacy of sweeping and dipping for *Aedes aegypti* larvae in tires. JAMCA. 9:316–320.
- Zwiebel, L., W.Takken. 2004. Olfactory regulation of mosquito-host interactions. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 34(7):645-652.

11. ANEXOS

Tovar, I., A. Ramos., R. Servin. 2015. Entomological Indicators to Assess Larval *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) Control in Baja California Sur, México. Southwest. Entomol. 40(1):81–96.

Tovar, I., J. Caraveo, R. Penilla, V. Serrano, J. Mendez-Galvan, A. Maeda-Martinez, I. Guerrero, R. Servin. 2016. Seasonal variation of Dengue vector abundance in the Southern Portion of the Baja California Peninsula, Mexico submitted in Medical and Veterinary Entomology 20 de Ene 2016.