



República de Cuba

Ministerio de Salud Pública

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"

Departamento de Control de Vectores



**Determinación de la Resistencia a Insecticidas y sus Mecanismos en Poblaciones de
Aedes aegypti (Díptera: Culicidae) en Algunos Países América Central**

Tesis presentada para optar al grado científico de Doctor en Ciencias de la Salud con
especialización en Entomología Médica y Control de Vectores.

Autor: Lorenzo Cáceres Carrera M.Sc.

Tutores:

Prof. Juan A. Bisset Lazcano PhD

Prof. Nereyda Cantelar de Francisco MD, PhD

Asesora:

Lic. Magdalena M. Rodríguez, PhD

2013

I

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento póstumo especial al Dr. Gustavo Kouri, quien como Director General del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” nos apoyó y brindó todo el apoyo y colaboración para la culminación de este trabajo doctoral.

A nuestros tutores Prof. Juan A. Bisset Lazcano PhD. y la Prof. Nereyda Cantelar de Francisco PhD. agradecemos el apoyo, colaboración, estímulo constante y la muy acertada guía brindada en el desarrollo y aportes en la culminación del presente trabajo doctoral.

Mi especial agradecimiento también a la Prof. María Magdalena Rodríguez PhD., por brindarme siempre su apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

A todo el personal profesional y técnico del Departamento de Control de Vectores, por el apoyo brindado en el laboratorio y en el mantenimiento de las colonias de *Aedes aegypti*; al igual que todo el personal del Instituto Medicina Tropical “Pedro Kouri”, que de una forma u otra me brindaron su colaboración y apoyo.

Deseo agradecer a los compañeros que me brindaron su apoyo del Departamento de Entomología del Instituto Conmemorativo Gorgas, en especial a José Rovira y Arsenio García, por las enseñanzas brindadas desde mi ingreso a la Sección de Entomología Médica del Ministerio de Salud.

A los doctores Jorge Motta y Néstor Sosa, quienes en su momento como directores del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio de la Salud, nos brindaron el apoyo para el logro de este objetivo.

II

DEDICATORIA

Con mis sentimientos sinceros de amor y respeto dedico este trabajo a mi hija Andrea Gabriela Cáceres Edghill, a mis hijos Lorenzo Gabriel Cáceres Edghill y Alexander Gabriel Cáceres Edghill, y a mi esposa Deborah Ann Edghill Edwards. Igualmente, dedico póstumamente este trabajo a Félix Cáceres Orocú por su gran dedicación, cariño y esfuerzo hacia mi persona.

III

ABREVIATURAS

- Ach:** Acetilcolina
- AchE:** Acetilcolinesterasa
- AchEr:** Acetilcolinesterasa resistente o modificada
- CL₅₀:** Concentración letal media (causa el 50% de mortalidad)
- CL₉₀:** Concentración letal que causa el 90% de mortalidad
- DDT:** Triclorodifenil - tricloroetano
- DDE:** Diclorodifenil - dicloroetano
- DLN:** Dieldrina
- DEF:** S, S, S trybutyl phosphorotrithioate
- DH:** Dengue hemorrágico
- DO:** Densidad óptica
- EST:** Esterasas
- FAO:** Organización para la Alimentación y la Agricultura
- FR:** Factor de resistencia
- FS:** Factor de sinergismo
- GABA:** Receptores ácido gamma amino butírico
- GST:** Glutathion transferasa
- Kdr:** *Knock down resistance*
- MO:** Citocromo P-450 monoxigenasa
- OC:** Organoclorados
- OF:** Organofosforados
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- OPS:** Organización Panamericana de la Salud
- PB:** Piperonil butóxido
- ULV:** Ultra bajo volumen

IV

ÍNDICE

<i>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN</i>	1
1.1 Introducción general	1
1.2 Hipótesis	8
1.3. <i>Objetivos general</i>	8
1.3.1 Objetivos específicos	8
1.4 <i>Importancia práctica</i>	9
1.5 Novedad científica	9
<i>CAPITULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</i>	11
2.1 Resistencia a los insecticidas en insectos	11
2.2 La resistencia y su impacto en el control de mosquitos vectores	12
2.3 Desarrollo de la resistencia en poblaciones de <i>Aedes aegypti</i>	15
2.4 Factores relacionados con la aparición de la resistencia en poblaciones de insectos	20
2.5 El fenómeno de la resistencia cruzada y múltiple	21
2.6 Clasificación de los insecticidas y sus modos de acción	23
2.7 Caracterización de los mecanismos de resistencia	24
2.8 Alteración o insensibilidad en el sitio de acción	25
2.8.1 Acetilcolinesterasa alterada (AchEr)	25
2.8.2 Receptores GABA (ácido amino butírico)	27
2.8.3 Alteración de los canales de sodio (Na⁺)	28
2.9 Resistencia metabólica	29
2.9.1 Esterasas inespecíficas	29
2.9.2 Glutación-S-Transferasa	31

2.9.3 Citocromo P-450 Monoxigenasas (MO).....	31
2.10 Mecanismos genéticos de la resistencia.....	32
2.11 Detección de los mecanismos de la resistencia.	33
CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1 Cepas de <i>Ae. aegypti</i> utilizadas en el estudio	37
3.2 Cría y mantenimiento de las colonias de <i>Ae. aegypti</i>	38
3.3 Bioensayos.....	38
3.3.1 Agentes químicos.....	38
3.3.2 Bioensayos de larvas	40
3.3.3 Bioensayos de adultos	41
3.4 Métodos de detección de los mecanismos de resistencia	42
3.4.1 Esterasas inespecíficas.....	42
3.4.2. Glutación-s-transferasa (GST).....	43
3.4.3 Acetilcolinesterasa modificada (AChEr)	44
3.5 Cálculo de la frecuencia de individuos resistentes.....	45
3.6. Determinación de los mecanismos de esteratas y citocromo P-450 monoxigenasas “in vivo” mediante la utilización agentes de sinergistas.....	46
3.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida para la caracterización de esteratas. ..	47
3.8 Análisis Estadístico:.....	49
CAPITULO 4. RESULTADOS	51
4.1 Bioensayos de susceptibilidad y/o resistencia en larvas de <i>Aedes aegypti</i>	51
4.2 Bioensayos de susceptibilidad y/o resistencia en mosquitos adultos	54
4.3 Determinación de los mecanismos de resistencia a través de pruebas bioquímicas.	56
4.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida para esteratas en cepas de <i>Aedes aegypti</i> .57	

4.5	<i>Determinación de los mecanismos de resistencia utilizando agentes sinérgicos</i>	58
	
	<i>CAPITULO 5. DISCUSIÓN</i>	62
	5.1 Bioensayos de susceptibilidad y/o resistencia	62
	5.2 Determinación de los mecanismos de resistencia utilizando agentes sinérgicos y su frecuencia	71
	5.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida para la visualización de las esterasas en cepas de <i>Ae. aegypti</i>	73
	<i>CAPITULO 6. CONCLUSIONES</i>	80
	<i>CAPITULO 7. RECOMENDACIONES</i>	82
	<i>CAPITULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	84

V RESUMEN

Aedes aegypti Linnaeus, es el principal vector en la transmisión de la fiebre amarilla y dengue en las Américas. El control del vector es hasta la fecha la única opción para prevenir o reducir la transmisión de esta enfermedad, pero la resistencia a los insecticidas ha dificultado el control de esta especie. El objetivo de este trabajo fue determinar el nivel de susceptibilidad a insecticidas organofosforados (OF), piretroides y al organoclorado (OC) DDT (Triclorodifenil-tricloroetano) en *Ae. aegypti*, así como los mecanismos de resistencia de acción metabólica, basados en el incremento de la actividad de las enzimas esterasas (EST), citocromo P-450 monoxigenasa (MO) y glutatión transferasa (GST). Se utilizaron cepas de *Ae. aegypti* colectadas de países de América Central: PANAMÁ, COSTA RICA y NICARAGUA y la cepa de referencia susceptible ROCKEFELLER. El nivel de susceptibilidad a insecticidas, tanto en larvas como en adultos, se determinó utilizando las metodologías recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se evaluaron en larvas los insecticidas OF (temefós, malatión, fentiión, pirimifós metil, fenitrotión y clorpirifós) y los piretroides (deltametrina, lambdacialotrina, cipermetrina y ciflutrina). En el estado adulto se evaluó el OF clorpirifós y los piretroides que fueron evaluados en larvas. La detección de los mecanismos de resistencia se realizó mediante técnicas bioquímicas y agentes sinérgistas, inhibidores específicos de las enzimas EST y MO. De los OF evaluados en larvas, se observó mayor resistencia a temefós, seguido de pirimifós metil y clorpirifós y completa susceptibilidad a malatión, fentiión y fenitrotión.

Las larvas resultaron susceptibles a deltametrina y lambdacialotrina en las tres cepas evaluadas y solamente COSTA RICA mostró resistencia moderada a cipermetrina.

A ciflutrina se observó resistencia moderada en PANAMA y COSTA RICA y NICARAGUA resultó susceptible. En el estado adulto se observó resistencia a DDT en todas las cepas evaluadas. Se observó susceptibilidad a lambdacialotrina en PANAMA y NICARAGUA, a cipermetrina en COSTA RICA y NICARAGUA, a deltametrina en PANAMÁ, a ciflutrina en COSTA RICA y al resto de los piretroides, las cepas resultaron en verificación. Para el OF clorpirifos resultó susceptible NICARAGUA y en verificación PANAMA y COSTA RICA. A través de estudios con agentes sinérgicos y ensayos bioquímicos en larvas se demostró que los mecanismos de acción metabólica de EST y MO jugaron un papel importante en la resistencia detectada a insecticidas OF. En el zimograma para EST se observó la presencia de la banda de EST-A4, fuertemente teñida en las cepas evaluadas, que no se observó en la cepa ROCKEFELLER. Monitorear los cambios de las enzimas de acción metabólica EST y MO nos permite detectar la resistencia tempranamente y evitar el desarrollo de la misma, a través de la creación de estrategias de uso de insecticidas con mecanismos de resistencia diferentes.

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción general

Las enfermedades virales transmitidas por artrópodos han re-emergido como uno de los mayores problemas de importancia en salud pública en muchos países de la región tropical. Por ejemplo, la incidencia del dengue se ha incrementado durante los últimos 20 años, incluyendo la forma severa que es causante de muchas muertes. El dengue es una amenaza para más de 2.5 billones de personas que viven en riesgo de padecer esta enfermedad (WHO, 1996; Beaty, 2000 y TDR/OPS, 2009).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), plantea que más de 100 países han sido afectados por esta enfermedad. Se ha estimado que ocurren más de 50 millones de casos por año, 500 mil hospitalizados y 20 mil defunciones, siendo los niños el 95% de los casos notificados (WHO, 2006). En la actualidad, el dengue constituye un problema cada vez más grave para los países de la Región de las Américas que se han visto afectados por numerosas epidemias o pandemias. El control de la enfermedad es costoso y las epidemias ocasionan un impacto negativo en el desarrollo socioeconómico de los países (San Martín *et al.*, 2010).

Un Informe de la Organización Panamericana de la Salud, indicó, que desde la década de los 90, en la región de las Américas, existían condiciones epidemiológicas y sociales similares a las que favorecieron el agravamiento del dengue en Asia durante el decenio de los años cincuenta. Es decir, se encontraban altas densidades del vector junto con la circulación de varios serotipos del virus dengue y el hacinamiento de poblaciones marginadas en los cinturones de pobreza de las grandes ciudades. Además se plantea que la situación en la región estaba siguiendo una evolución similar a la que se inició en Asia en ese decenio, debido a las escasas medidas de control (OPS, 1997).

En Panamá, desde la re-infestación del mosquito *Ae. aegypti* en 1985 y la circulación autóctona de la enfermedad, con el inicio de la epidemia en 1993 hasta el año 2011, se han registrado un total de 43 398 casos de dengue, 106 correspondieron a dengue severo y 32 defunciones (MINSA, Panamá 2012). Esta situación se correspondió con la circulación de los cuatro serotipos, índices elevados de infestación de *Ae. aegypti*, aplicaciones frecuentes de insecticidas y el posible desarrollo de resistencia a los insecticidas aplicados en la lucha antivectorial en las poblaciones de *Ae. aegypti*.

En Costa Rica, desde la aparición del dengue en 1993 a 2011 se han registrado un total de 221 943 casos de dengue y 12 muertes, representado la enfermedad un problema de salud pública de gran magnitud. Se estima que el 95,7% de la población está en riesgo de contraer la enfermedad, especialmente la que reside en las zonas con transmisión de dengue y altos índices de infestación del mosquito *Ae. aegypti* (OPS, 2012).

Nicaragua notificó el primer brote de dengue importante en 1985, afectando la mayoría de las regiones del país, desde 1995 a 2011 se han registrado un total de 110 270 casos diagnosticados de dengue y 95 muertes (OPS, 2007, 2012).

Hasta el presente, el control del vector ha sido la única opción para prevenir o reducir la transmisión del dengue en el mundo. La reducción de los criaderos y los programas de saneamiento ambiental con la activa participación de grupos comunitarios organizados son importantes componentes dentro de las estrategias sostenibles de control de *Ae. aegypti*, sin embargo todavía no es suficiente para el control de las poblaciones de este vector. Los insecticidas han desempeñado un papel esencial en la disminución y erradicación de enfermedades (Zaim y Guillet, 2002).

En los últimos 25 a 30 años en América Latina se han utilizado insecticidas OF en recipientes de agua doméstica y para tratamiento residual intradomiciliario o rociado espacial para reducir las densidades de *Ae. aegypti* (Georghiou *et al.*, 1987; Gratz, 1991 y Ocampo *et al.*, 2011). El uso de insecticidas representa la medida de intervención práctica más utilizada para reducir las poblaciones de mosquitos, vectores transmisores de enfermedades. Con el advenimiento del DDT y otros insecticidas sintéticos en la década del 40 se originó un modelo único de lucha antivectorial. El uso intensivo e indiscriminado de estos agentes químicos provocó la aparición rápida del desarrollo de la resistencia a los insecticidas que antes eliminaban a las poblaciones de insectos.

El surgimiento de la resistencia a los diferentes grupos de agentes químicos en poblaciones de insectos plaga y de importancia médica, es uno de los efectos indeseables o el problema técnico más grave en todas las regiones del mundo.

Los insecticidas piretroides continúan siendo las herramientas de control químico más exitosas para el control de insectos vectores de enfermedades (Rajatileka *et al.*, 2011).

A partir de la década de los 90 hasta la fecha se han utilizado en la mayoría de los países de América Latina, los insecticidas piretroides para el control de poblaciones de mosquitos.

Ae. aegypti ha desarrollado resistencia a una amplia variedad de insecticidas (Bisset *et al.*, 2009), lo que constituye el principal problema operacional que afecta su control. Se ha incrementado en el tiempo el número de especies, vectores de enfermedades, resistentes a insecticidas, así como el desarrollo de resistencia cruzada y múltiple, lo que incrementa el costo en las operaciones de control químico (Fonseca-González *et al.*, 2011).

Entre los mecanismos de resistencia más importantes en insectos se encuentran la resistencia metabólica y el sitio insensible o sitio blanco alterado. La forma más importante de resistencia metabólica incluye la citocromo P-450 monoxigenasas (MO), glutatión transferasa (GST) y las esterasas (EST). Estos mecanismos, cuya amplificación genética es generalmente inducida en los organismos durante la exposición a los insecticidas, pueden generar resistencia a la mayoría de los insecticidas disponibles (Hemingway *et al.*, 2004).

Las esterasas se han identificado a menudo en insectos como mecanismos de resistencia a insecticidas organofosforados (OF) y carbamatos y en menos casos a piretroides (Hemingway y Ranson, 2000, Rodríguez *et al.*, 2005; 2007). El posible papel de las enzimas esterasas en la detoxificación de insecticidas en *Ae. aegypti* fue notificado primeramente por Chen y Sudderuddin (1978), quienes encontraron que las larvas que fueron más tolerantes a compuestos OF mostraron una alta actividad de esterasas.

Posteriormente, Field *et al.*, en 1984 encontraron una asociación entre los niveles de resistencia (10x) y el incremento de la actividad esterasas en cepas de *Ae. aegypti* provenientes de Puerto Rico, luego de someterlas a una selección con malatión.

Otros autores han asociado la actividad de esterasas como mecanismo fundamental de resistencia a temefos en *Ae. aegypti* (Mazarri y Georghiou, 1995, Vaughan *et al.*, 1998, Paeporn *et al.*, 2003; Saelim *et al.*, 2005, Rodriguez *et al.*, 2007a, Bisset *et al.*, 2011, Rodríguez *et al.*, 2012).

La dehidrocloración del DDT (Triclorodifenil-tricloroetano) a DDE (Diclorodifenil-dicloroetano), es un importante mecanismo de resistencia a DDT y esta reacción es catalizada por la enzima glutatión-s-transferasa (GST), lo cual fue notificado por primera vez en *Musca domestica* (Clark y Sharman, 1984). La sobre-expresión de una GST, ha sido implicada como enzima responsable del metabolismo del DDT en, *Anopheles gambiae* (Ranson *et al.*, 2001, Ding *et al.*, 2003; Ortellì *et al.*, 2003).

La GST no ha sido implicada en el metabolismo de piretroides, pero sí en la detoxificación de los productos de oxidación de los lípidos, provocado por la acción de los piretroides, como se demostró en la especie *Nilaparvata lugens*, plaga del arroz (Vontas *et al.*, 2001; 2002). También esta enzima puede actuar como mecanismo de resistencia a través del secuestro de insecticidas piretroides en algunos insectos (Kostaropoulos *et al.*, 2001).

En *Ae. aegypti* de Tailandia se identificó la sobreexpresión de un gen de la enzima GST en una cepa resistente a DDT y permetrina. Ellos confirmaron por estudios metabólicos que la enzima GST era responsable de la resistencia a DDT (Lumjuan *et al.*, 2005).

Jean-Philippe *et al.*, (2005), demostraron a través de la técnica de microarreglos que en la especie *An.gambiae* las enzimas de acción metabólica GST y MO se sobre expresaron en una cepa resistente a piretroides. Otro tipo de mecanismo de resistencia, que se basa en el sitio blanco alterado, incluye a la acetilcolinesterasa (sitio blanco para los OF y carbamatos) y el tipo de resistencia al *knock-down* (gen Kdr). Este último, basado en la insensibilidad en los canales de sodio a la unión de los piretroides debido a mutaciones puntuales que ocurren en un gen denominado "para" de la membrana nerviosa del insecto y ha sido bien caracterizado en *An.gambiae* (Martínez-Torres, 1998) y en *M. domestica* (Williamson *et al.*, 1996).

La resistencia mediada por la acetilcolinesterasa ocurre mediante cambios cualitativos en el sitio activo de la enzima o a su alrededor debido a mutaciones genéticas, lo que genera una habilidad reducida para unir a los OF y carbamatos.

Estas mutaciones genéticas, asociadas con la resistencia a insecticidas están bien caracterizadas en *Drosophila melanogaster* (Mutero *et al.*, 1994) y en *An. gambiae* (Weill y *et al.*, 2004a); pero no han sido identificadas aún mutaciones del gen de esta enzima, asociadas con la resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti*.

La práctica de utilizar un insecticida hasta que aparezca resistencia es un factor que ha limitado la disponibilidad de estos químicos para el control de vectores. Se han realizado estrategias de manejo de resistencia a través del empleo de insecticidas en forma rotacional, alternándolos o en mosaico (Curtis, 1985; Curtis *et al.*, 1993). Los modelos matemáticos se han ideado para poder estimar la mejor forma de utilizar estas estrategias (Tabashnik, 1989).

Sin embargo, estos modelos son difíciles de evaluar en condiciones de campo debido a lo difícil de estimar los cambios en la frecuencia de los genes de resistencia en poblaciones grandes de insectos (Hemingway *et al.*, 1997 y Marcombe *et al.*, 2011).

La incorporación de técnicas bioquímicas y moleculares apropiadas para detectar cambios en la frecuencia de genes para la resistencia a insecticidas hace más factible establecer estrategias de manejo de resistencia a insecticidas. Se han modificado técnicas bioquímicas en placas de microtitulación para medir la actividad de enzimas específicas que metabolizan insecticidas en poblaciones de insectos, las cuales permiten monitorear fenotipos resistentes que pueden ser detectados, aún a baja frecuencia (Brogdon y Dickinson, 1983; Hemingway *et al.*, 1990; Díaz *et al.*, 2004).

La implementación de medidas para la detección oportuna de la resistencia es importante en los programas de control de vectores, debido a que facilita la selección del insecticida más apropiado o la inclusión de otros métodos complementarios. Algunos programas de control de vectores desarrollan actividades para detectar y monitorear el desarrollo de la resistencia. Entre los más importantes está el programa de la OMS, el cual recomienda metodologías adecuadas para detectar y documentar casos de resistencia en insectos de importancia médica con énfasis en mosquitos y otros vectores como los triatominos (WHO, 1976; 1980; 1992; 1998).

Como el dengue y su manifestación más severa, dengue hemorrágico (DH) representan un problema para la salud pública en países de América Central, como Panamá, Costa Rica y Nicaragua, el control de su principal vector *Ae. aegypti* continúa siendo la única medida para evitar o prevenir la transmisión de esta enfermedad, se hace necesario realizar investigaciones sobre la presencia de resistencia a insecticidas y de los mecanismos involucrados.

Estos resultados son importantes para el desarrollo de estrategias adecuadas que pueden ser utilizadas para facilitar el uso correcto de insecticidas y un control efectivo del vector con los insecticidas actualmente disponibles para su uso en los programas de salud pública.

1.2 Hipótesis

El uso intensivo de insecticidas OF y piretroides, para el control de la transmisión del dengue, ha propiciado la aparición de resistencia y sus mecanismos en poblaciones de *Ae. aegypti* de Panamá, Costa Rica y Nicaragua.

1.3. Objetivos general

Lograr un mejor conocimiento de la resistencia a insecticidas y sus mecanismos en poblaciones de *Ae. aegypti* de Panamá, Costa Rica y Nicaragua, con vistas a obtener información que contribuya en la elaboración de estrategias de uso adecuado de insecticidas para un control sostenibles de este vector.

1.3.1 Objetivos específicos

1. Determinar la resistencia a insecticidas OF, piretroides y al organoclorado DDT en poblaciones de larvas y adultos de *Ae. aegypti* de Panamá, Costa Rica y Nicaragua, mediante el uso de bioensayos recomendados por la OMS.
2. Determinar los mecanismos de resistencia de acción metabólica de EST y MO a través del uso de agentes sinérgicos en poblaciones de *Ae. aegypti* de Panamá, Costa Rica y Nicaragua.
3. Determinar los mecanismos de resistencia, basados en la actividad de las enzimas GST, EST y AchE en poblaciones de *Ae. aegypti* de Panamá, Costa Rica y Nicaragua.

4. Identificar las esterasas asociadas con la resistencia a insecticidas, detectada en poblaciones de *Ae. aegypti* de Panamá, Costa Rica y Nicaragua.

1.4 Importancia práctica

El estudio sobre el comportamiento de la resistencia a insecticidas y sus mecanismos en poblaciones de *A. aegypti* de la subregión centroamericana aporta información que contribuye en la elaboración y fortalecimiento de las estrategias sobre el uso de los insecticidas en los programas de control de vectores de Panamá, Costa Rica y Nicaragua, lo que generaría un mayor impacto en las intervenciones de prevención y control de la transmisión del dengue.

1.5 Novedad científica

Se aporta significativa evidencia científica sobre el comportamiento de la resistencia y por primera vez sobre los mecanismos bioquímicos de resistencia involucrados en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Panamá, Costa Rica y Nicaragua. Los resultados brindan novedosa información técnica a los programas de control de vectores, evitando de esta manera modificaciones en el uso de insecticidas, cambios en las estrategias utilizadas de control y reducir los costos en la lucha antivectorial para combatir al mosquito transmisor del dengue en los países bajo estudio.

CAPITULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CAPITULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resistencia a los insecticidas en insectos.

La Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), define la resistencia como una respuesta disminuida de la población de una especie de animales o plantas a un plaguicida o agente de control como resultado de su aplicación (FAO, 1967). En otros términos, se indica que la resistencia es una peculiaridad adquirida que llega a caracterizar a una población de insectos y su descendencia después del tratamiento continuo con un insecticida (Brown y Pal, 1971).

El Comité de Expertos de la OMS en Lucha Antivectorial declaró *"Por fin se está reconociendo que la resistencia es quizás el mayor obstáculo con que se tropieza en la lucha contra las enfermedades transmitidas por vectores y es la causa principal que en muchos países no se logre la erradicación de muchas enfermedades"* (OMS, 1980). Por su parte Georghiou y Lagunes-Tejada (1991), expresaron que la habilidad de los insectos en desarrollar resistencia a los insecticidas ha sido el mayor obstáculo técnico para el control de los insectos plaga.

La OMS, define la resistencia como una característica heredada que otorga una mayor tolerancia a un plaguicida o grupo de plaguicidas, de tal modo que los individuos resistentes sobreviven a una concentración de compuestos que generalmente sería mortal para la especie. Actualmente, la resistencia se explica sobre la base de factores multidimensionales dependientes de la ecología, fisiología, bioquímica y genética de los vectores, teniendo en cuenta que todo esto varía con la especie, las poblaciones y la localización geográfica (WHO, 1992). Por otra parte, se expresa que la resistencia a los insecticidas, es el resultado del incremento de la frecuencia de su aplicación, el aumento de las dosis y cambios en el ambiente entre otros aspectos de importancia (Mullin y Scott, 1992).

También, se reconoce que el uso intensivo e indiscriminado de insecticidas de uso agrícola y salud pública ha contribuido al desarrollo de la resistencia cruzada y múltiple, dificultando el control a través de los químicos (Chavasse y Yap, 1997).

2.2 La resistencia y su impacto en el control de mosquitos vectores.

La notable intensificación de la lucha contra los vectores de la malaria en todo el mundo y la pretendida campaña de erradicación en las Américas han hecho resaltar el peligro que significa para el éxito de estas, la resistencia de los anofelinos a los insecticidas usados contra ellos (OMS, 1957). El aumento notable de la resistencia desde la introducción de los insecticidas sintéticos contra los principales vectores del paludismo, ha sido el principal problema técnico en la erradicación de esta enfermedad en las distintas regiones del mundo (Busvine, 1963).

Entre los problemas técnicos que impiden el avance de los programas antimaláricos en las Américas, está la resistencia de los vectores a los insecticidas. Cuatro de las diez especies de anofelinos consideradas de importancia en las Américas han presentado resistencia al menos a un insecticida (Palacios, 1975). El análisis de los patrones de resurgimiento de la malaria en la India, reveló que los brotes de malaria eran originados debido al problema de la resistencia de los vectores a los insecticidas (Sharma y Mehrotra, 1986).

Hasta 1984 había 1 797 casos de resistencia en artrópodos y para 1992, la resistencia a al menos un insecticida, se había registrado para 504 especies (Georghiou, 1986; Brown, 1986; Georghiou y Lagunes-Tejada, 1991 y Breaud, 1993). En las poblaciones de mosquitos vectores, se ha comprobado que un gran número de especies de mosquitos son resistentes a la acción de los insecticidas, entre estas el *Ae. aegypti* que juega un papel importante en la transmisión de enfermedades vírales como el dengue y fiebre amarilla que causan un gran impacto en la salud pública (OMS, 1989; Lehane, 1991; Gubler, 1992 y Rajatileka *et al.*, 2011)

Las enfermedades de transmisión vectorial son una creciente causa de muerte y sufrimiento en todo el mundo. Los esfuerzos para controlar estas enfermedades han sido focalizados en el uso de plaguicidas, pero la resistencia de los artrópodos a los plaguicidas es ahora un gran problema técnico (Robert y Andre, 1994; McAbee *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004a).

Un alto nivel de resistencia al DDT y bajos niveles de resistencia a insecticidas OF, carbamatos y piretroides han sido detectados en *Anopheles albimanus* en México (Hemingway *et al.*, 1997).

El desarrollo de la resistencia a insecticidas piretroides en mosquitos *Anopheles* es potencial debido a los tratamientos continuos de rociados a viviendas y a la impregnación de mosquiteros con insecticidas de este tipo (Hodjati y Curtis, 1999). Estudios de resistencia con *Culex quinquefasciatus* de Venezuela; revelaron resistencia a malatión, clorpirifos, pirimifosmetil, fentión, cipermetrina, deltametrina, permetrina, lambdacialotrina y DDT (Bisset *et al.*, 1999).

Anopheles culicifacies y *Anopheles subpictus*, registró resistencia a DDT. La resistencia a malatión ha sido registrada en los mayores vectores de malaria como *An. culicifacies*, *Anopheles stephensi*, *An. albimanus*, *An. arabiensis* y *Anopheles sacharovi*. Por su parte, *An. subpictus* ha mostrado resistencia a clorpirifos. En Sri Lanka el *An. culicifacies* especie B ha sido registrada como resistente al fenitrotión. La resistencia a piretroides ha sido observada en *Cx. quinquefasciatus*, *An. albimanus*, *An. stephensi*, *An. gambiae* y *Ae. aegypti* entre otros. Específicamente *An. culicifacies* y *An. subpictus*, registra resistencia a permetrina. A insecticidas carbamatos, la resistencia ha sido detectada en *An. sacharovi* y *An. albimanus* (Karunaratne, 1999; Hemingway y Ranson, 2000 y Coleman *et al.*, 2006). El uso generalizado y continuo del malatión en el control de *Ae. aegypti* en América Latina ha generado el desarrollo de la resistencia a este químico en *Cx. quinquefasciatus* y en *Ae. aegypti* no.

Estudios con *Ae. aegypti* de Cuba, Venezuela, Costa Rica y Jamaica demostraron susceptibilidad a malatión, a pesar de su uso histórico en los programas de control de *Ae. aegypti* en estos países (Rodríguez *et al.*, 2000).

La resistencia a organoclorados, OF, carbamatos y piretroides ha sido investigada en *Cx. quinquefasciatus* en Tailandia. *Ae. aegypti* resultó resistente a permetrina y tolerante a deltametrina, pero fue 100% susceptible al fenitrotión (Sunaiyana *et al.*, 2006). En China, las siete principales especies de mosquitos vectores: *Cx. pipiens*, *Culex tritaeniorhynchus*, *Anopheles sinensis*, *Anopheles minimus*, *Anopheles arthropophagus*, *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* han desarrollado resistencia a todos los tipos anteriores de insecticida excepto a los carbamatos. El grado de resistencia varía entre las especies de mosquitos, el tipo de insecticida y la región geográfica (Cui *et al.*, 2006).

2.3 Desarrollo de la resistencia en poblaciones de *Aedes aegypti*.

La incidencia y prevalencia del dengue está aumentando en todas las zonas endémicas tropicales y subtropicales, la enfermedad se produce en más de 100 países y territorios de Asia-Pacífico, América, Oriente Medio y África, y los casos siguen aumentando en todo el mundo.

En Las Américas se registra un aumento dramático de los casos en las últimas siete décadas (San Martín *et al.*, 2010).

La reducción de las poblaciones de *Ae. aegypti*, en la actualidad es la única opción viable disponible para controlar la transmisión del dengue. Las estrategias de control incluyen la reducción de criaderos, saneamiento ambiental, control biológico y químico (Pimsamarn *et al.*, 2009).

En las Américas, la presión selectiva ejercida contra poblaciones de *Ae. aegypti* a través de las aplicaciones de forma intensiva, extensiva e indiscriminada desde la introducción de los insecticidas sintéticos en los programas sanitarios han generado el desarrollo de la resistencia a uno o más insecticidas en esta especie de mosquito, convirtiéndose en el principal problema técnico que afecta las estrategias en los programas de control de vectores (Bisset *et al.*, 2009; Marcombe *et al.*, 2009). En estudios con *Ae. aegypti* de Santo Domingo en República Dominicana, las poblaciones resultaron resistentes a DDT, malatión, propoxur, permetrina y deltametrina (Mekuria *et al.*, 1991).

La susceptibilidad de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* se evaluó en respuesta a un potencial brote de dengue en Texas durante 1995. Los resultados indicaron que ambas especies eran todavía susceptibles a malatión, clorpirifos, resmetrina y permetrina (Sames *et al.*, 1996).

Bioensayos realizados con 102 cepas de *Ae. aegypti* de 16 países, incluido Suriname y la cadena de Islas del Caribe, donde se ha utilizado temefos como larvicida y malatión como adulticida, desde hace 15 a 30 años, reveló una amplia variación de la susceptibilidad del larvicida en las poblaciones de mosquitos dentro de cada país y entre los diferentes países (Rawlins y Hi, 1995; Rawlins y Ragoonansingh, 1990 y Rawlins, 1998). En Cuba, debido a un brote de dengue en la provincia de Santiago de Cuba, una cepa de *Ae. aegypti* mostró bajos niveles de resistencia a fentión, malatión y deltametrina, niveles moderados de resistencia a temefos, pirimifosmetil y cipermetrina y altos niveles de resistencia a clorpirifos (Rodríguez *et al.*, 1999).

Estudios con *Ae. aegypti* de Cuba, Venezuela, Costa Rica y Jamaica demostraron susceptibilidad a malatión a pesar de su uso histórico en estos países, sin embargo, se detectó un alto nivel de resistencia a este insecticida en *Cx. quinquefasciatus* en Venezuela, Colombia, Brasil y Cuba (Rodríguez *et al.*, 2000).

En estudios con cuatro cepas de *Ae. aegypti*, una de Cuba y tres de Venezuela, con insecticidas OF (temefos, malatión, fentión, pirimifosmetil y clorpirifos), los piretroides (deltametrina, lambdacialotrina y cipermetrina), las cepas venezolanas resultaron con bajos niveles de resistencia a fentión y malatión y moderada a alta resistencia a temefos, pirimifosmetil y clorpirifos, sin embargo todas las cepas fueron sensibles a piretroides, excepto la cepa cubana, que tuvo niveles moderados de resistencia a cipermetrina (Rodríguez *et al.*, 2001). En estudios similares realizados en una cepa de *Ae. aegypti* de Cuba y cuatro de Venezuela se determinó la resistencia a los insecticidas temefos, clorpirifos y pirimifosmetil. La cepa venezolana APURE fue resistente a temefos, TACHIRA, ARAGUA y MIRANDA fueron resistentes a clorpirifos. Todas las cepas venezolanas mostraron resistencia a pirimifosmetil. La cepa cubana de Santiago de Cuba reveló resistencia a temefos, pirimifosmetil y clorpirifos (Bisset *et al.*, 2001). En un estudio más amplio, que incluyó varias cepas de países de América Latina, todas mostraron resistencia a temefos y susceptibilidad a los OF malatión, fentión y fenitrotión en larvas y a todos los piretroides, sin embargo en el estado adulto se mostró algún grado de resistencia a estos últimos (Rodríguez *et al.*, 2007). Patrones de susceptibilidad a los insecticidas temefos, malatión y permetrina fueron determinados en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* de cinco sitios de Tailandia, en todos los sitios se observó resistencia a permetrina y susceptibilidad a malatión.

La resistencia de *Ae. aegypti* a temefos se detectó en todas las cepas, excepto las de Nakhon Ratchasima. Las larvas de *Ae. albopictus* tenían bajos niveles de resistencia a los tres insecticidas, excepto Mae Sot y Phatthalung, que fueron resistentes a la permetrina (Ponlawat *et al.*, 2005). Las especies *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, fueron sometidos a una presión selectiva con los insecticidas malatión, permetrina y temefos. El *Cx. quinquefasciatus* desarrolló mayor resistencia a malatión y permetrina comparado con *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Hamdan *et al.*, 2005). En bioensayos con temefos en larvas de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* de Malasia, se observó resistencia en ambas especies. Sólo dos cepas de *Ae. aegypti* de Banjar fueron sensibles a este organofosforado (Chen *et al.*, 2005). Los resultados de pruebas con deltametrina, permetrina y fenitrotión con *Ae. aegypti* de Tailandia, indicaron resistencia a permetrina y tolerancia a deltametrina y 100% de susceptibilidad a fenitrotión (Sunaiyana *et al.*, 2006). *Ae. aegypti* de Catamarca, Córdoba y Posadas (Argentina) y de Yacuiba (Bolivia) ha mostrado la capacidad de desarrollar resistencia a diferentes insecticidas, incluido el temefos, el larvicida más ampliamente usado. La cepa Posadas mostró susceptibilidad a la concentración diagnóstica (0,012 mg/litros), mientras que la mortalidad en Catamarca fue de 87%. En las muestras colectadas en Yacuiba y Córdoba, se registró resistencia al temefos (Biber *et al.*, 2006). Sobre el comportamiento de la susceptibilidad de *Ae. aegypti* de Panamá, se han publicado pocos trabajos. Uno de estos trabajos, fue el realizado en 1975, para determinar la eficacia del malatión grado técnico 95% aplicado con equipo ULV LECO modelo HD montada en vehículo liviano contra *Ae. aegypti*, los resultaron registraron un 100% de mortalidad (Echevers *et al.*, 1975).

Además se tienen los estudios realizados en dos cepas de *Ae. aegypti* (RIO ABAJO y VICTORIANO LORENZO) de Panamá, donde se observó resistencia a pirimifosmetil en larvas de ambas cepas, sin embargo, fueron susceptibles al resto de los insecticidas OF temefos, malatión, fenitrotión, fentión y clorpirifos y a los piretroides deltametrina, lambdacialotrina, cipermetrina y ciflutrina. En los ensayos con mosquitos adultos con papeles impregnados con insecticidas piretroides, las dos poblaciones fueron totalmente susceptibles a deltametrina, lambdacialotrina, cipermetrina y betaciflutrina (Bisset *et al.*, 2003).

Igualmente, existen pocos registros sobre el comportamiento de la susceptibilidad de *Ae. aegypti* en Nicaragua y Costa Rica. En este último se demostró susceptibilidad de *Ae. aegypti* a lambdacialotrina en aplicaciones de ultra bajo volumen (ULV) [Perich *et al.*, 2003], así como al malatión (Rodríguez *et al.*, 2000). En trabajos realizados con cepas de *Ae. aegypti* de Panamá, Nicaragua y Costa Rica, registró un comportamiento variables de la resistencia a los insecticidas OF temefos, malatión, fentión, pirimifosmetil, fenitrotión y clorpirifos; como también a los insecticidas piretroides deltametrina, lambdacialotrina, betacipermetrina y ciflutrina (Rodríguez *et al.*, 2007; Bisset *et al.*, 2012).

El registro del incremento de la resistencia a diferentes tipos de insecticidas en *Ae. aegypti* en la región de las Américas, refleja un problema mundial del aumento de la resistencia a los insecticidas, mientras que el número de productos químicos para uso en salud pública es reducido continuamente (Dusfour *et al.*, 2011).

Estudios más recientes en las Américas notificaron en *Ae. aegypti* resistencia variada a distintos tipos de insecticidas, en Brasil (Lima *et al.*, 2011), Colombia (Valderrama *et al.*, 2008; Santacoloma *et al.*, 2010; Ocampo *et al.*, 2011; Fonseca-González *et al.*, 2011), Cuba (Rodríguez *et al.*, 2010), Venezuela (Pérez y Molina, 2009), Trinidad y Tobago (Polson *et al.*, 2011), Martinique (Marcombe *et al.*, 2012), El Salvador (Bisset *et al.*, 2009) y Costa Rica (Bisset *et al.*, 2013).

2.4 Factores relacionados con la aparición de la resistencia en poblaciones de insectos.

La resistencia puede variar mucho en cuanto a su origen, intensidad e importancia en la lucha contra vectores de enfermedades, es un fenómeno dinámico que aparece en lapsos de tiempo muy variables. Es conocido que la resistencia se ha manifestado lentamente en algunas especies y más rápidamente en otras. Aún en la misma especie, bajo ciertas condiciones, la resistencia se desarrolla rápidamente, mientras que bajo otras situaciones la resistencia evoluciona lentamente o no se manifiesta. Esto ocurre en especies diferentes y en las mismas especies sometidas a distintas intensidades de aplicación de insecticidas (Georghiou, 1973). Actualmente se reconocen tres tipos de factores que influyen en la evolución de la resistencia: genéticos, biológicos y operacionales. Los genéticos, están referidos a la frecuencia, número y dominancia de alelos relacionados con la resistencia, entre otros aspectos de importancia. Los biológicos, están constituidos por los factores bióticos, relacionados principalmente con el potencial de reproducción y comportamiento poblacional de los insectos. Los operacionales, se refieren a los agentes químicos y su aplicación (Georghiou, 1980a y Georghiou, 1980b).

Los factores genéticos y biológicos son intrínsecos de la especie y por lo tanto, no pueden ser cambiados. Sin embargo, el conocimiento de su contribución es importante, ya que sirve para evaluar la propensión a la resistencia en una población de insectos. Los factores operacionales pueden ser controlables a través de un programa de manejo de plaguicidas (Georghiou y Taylor, 1986). Se ha considerado que la manifestación de la susceptibilidad a insecticidas, así como los fenómenos de resistencia están asociados a factores genéticos y ambientales. Igualmente, la variación en los niveles de susceptibilidad, se asoció con los valores enzimáticos, la variabilidad genética y la presión selectiva ejercida por los insecticidas (Shelton *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Santacoloma *et al.*, 2010).

2.5 El fenómeno de la resistencia cruzada y múltiple.

En términos actuales hay que hablar de resistencia cruzada para definir el mecanismo por el cual un gen simple confiere resistencia a un número de agentes químicos del mismo grupo, tal es el caso de las fosfotriesterasas que brindan resistencia a varios OF o diferentes grupos, como el gen *kdr* que confiere resistencia al DDT y a piretroides. En tanto que la resistencia múltiple, es cuando un mecanismo evoluciona en respuesta a la selección de diferentes aplicaciones de insecticidas (OMS, 1957 y Mallet, 1989).

Un claro ejemplo de resistencia cruzada en mosquitos, es la participación de la carboxilesterasa como principal mecanismo de resistencia a OF, pero también son un mecanismo secundario de resistencia a carbamatos y en menor grado a piretroides (Hemingway y Karunaratne, 1998).

Por otra parte, la resistencia múltiple se ha registrado en *An. albimanus*, *An. stephensi*, *An. culicifacies*, *Anopheles pseudopunctipennis* y *An. sacharovi* con organoclorados, OF, carbamatos y piretroides. La aparición de este tipo de resistencia en algunas poblaciones de *An. albimanus* en América Central está relacionada con la aplicación de plaguicidas de uso agrícola que origina un amplio espectro de resistencia. En *Ae. aegypti*, *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* se ha registrado resistencia a uno o más compuestos de insecticidas (Georghiou *et al.*, 1973 y OMS, 1992).

En trabajos con *Ae. aegypti* de Santiago de Cuba, con un alto nivel de resistencia a temefos, se detectó poca o ninguna resistencia cruzada a malatión y fenitrotión; observándose una alta resistencia cruzada a deltametrina (337,5x) y a fentiión (12,74x). La resistencia cruzada a deltametrina debido a la presión selectiva con temefos podría limitar el uso de ambos insecticidas para el control de *Ae. aegypti*. Se observó también resistencia cruzada a lambdacialotrina, cipermetrina y ciflutrina (Rodriguez *et al.*, 2002).

Trabajos realizados en Colombia, demostraron que la resistencia cruzada del tipo fisiológico entre DDT y lambdacialotrina, en las poblaciones de *Ae. aegypti* evaluadas, estuvo asociada con el incremento de las esterasas no específicas. El comportamiento diferencial en los niveles de susceptibilidad y los valores enzimáticos entre poblaciones se asoció con la variabilidad genética y presión de selección química a nivel local (Santacoloma *et al.*, 2010).

2.6 Clasificación de los insecticidas y sus modos de acción.

Según su naturaleza química y origen, los insecticidas se pueden clasificar dentro de cuatro grupos: organoclorados, OF, carbamatos y piretroides.

Organoclorados: Los organoclorados son insecticidas que contienen carbono, hidrógeno, y cloro. Hay tres categorías principales de hidrocarburos clorados: 1) El DDT y los análogos de DDT como metoxicloro y pertano; 2) los isómeros de hexacloruro de benceno, como alfa, beta y gamma o lindano y 3) los compuestos del ciclodieno como aldrina, endrina, dieldrina, clordano, endosulfán y heptacloro (Ferrer *et al.*, 1993).

OF y Carbamatos: Se denominan compuestos OF a aquellas sustancias orgánicas derivadas de la estructura química del fósforo. Químicamente los compuestos OF son básicamente ésteres del ácido fosfórico y sus homólogos, fosfórico, tiofosfórico y ditiófosfórico. Estos compuestos deben su carácter de plaguicidas principalmente al enlace fósforo-éster (Kotronarou *et al.*, 1992). El grupo de los carbamatos corresponden en su mayor parte a derivados del ácido N-metil-carbámico. La biotransformación se realiza a través de tres mecanismos básicos: hidrólisis, oxidación y conjugación (Henao y Corey, 1986).

El modo de acción de los OF es similar a los carbamatos, ellos inhiben las hidrolasas del éster de carboxilo, en particular la acetilcolinesterasa (AChE). La AChE es una enzima que degrada la acetilcolina (ACh) en colina y ácido acético. Los OF inactivan la AChE al fosforilarse el grupo hidroxilo de serina ubicado en el sitio activo de la AChE.

Cuando la AChE es inactivada, la ACh se acumula en todo el sistema nervioso, dando lugar a sobre estimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos (Ware y Whitacre, 2004 y Salgado, 1997).

Insecticidas Piretroides: Las características químicas de los piretroides y su modo de acción son clasificadas como de Tipo 1 y Tipo 2, dependiendo del alcohol substitutivo. Los tipo 1, no presentan el grupo α -ciano en la parte alcohólica de su estructura y actúan principalmente, sobre el sistema nervioso periférico. El Tipo 2, en su composición alcohólica cuentan con el grupo α -ciano y preferentemente actúan sobre el sistema nervioso central (Miller, 1988).

Los piretroides actúan sobre la membrana nerviosa, ocasionando interferencias que provocan cambios conformacionales de las proteínas en la interfase lípido-proteína. Estas alteraciones originan un retardo en el cierre de los canales de Na^+ después de ocurrido el impulso nervioso (Zerva, 1988).

2.7 Caracterización de los mecanismos de resistencia.

El desarrollo de la resistencia puede ocurrir mediante mecanismos fisiológicos, bioquímicos y modificaciones de conductas de una población o especie (Georghiou, 1978). En los insectos han evolucionado tres mecanismos principales para superar las sustancias tóxicas; 1) la resistencia bioquímica; 2) la resistencia fisiológica; y 3) la resistencia por comportamiento.

En esta interacción se seleccionan individuos que por distintos mecanismos bioquímicos y fisiológicos son capaces de tolerar mayores dosis del compuesto (Georghiou, 1972 y Brattsten *et al.*, 1986). En algunos casos, más de un mecanismo puede estar presente en una población, situación conocida como resistencia múltiple (Scott, 1990).

Miller (1988) hace referencia que la resistencia puede ser clasificada en cuatro categorías:

- a. Resistencia por comportamiento:** el insecto no entra en contacto con el insecticida.
- b. Resistencia a la penetración:** donde la composición del exoesqueleto llega a ser modificada inhibiendo la penetración del insecticida.
- c. Sitio insensible:** el sitio químico de acción para el insecticida se modifica reduciendo la sensibilidad a la forma activa del insecticida.
- d. Resistencia metabólica:** la vía metabólica del insecto llega a ser modificada detoxificando el insecticida o negando el metabolismo del compuesto aplicado en su forma tóxica. La forma más importante de resistencia metabólica incluye oxidasas de función mixta, la glutatión-s-transferasas y las esterasas.

2.8 Alteración o insensibilidad en el sitio de acción.

2.8.1 Acetilcolinesterasa alterada (AChE).

La acetilcolinesterasa (AChE; EC 3.1.1.7) es una enzima clave del sistema colinérgico porque regula el nivel de la acetilcolina en las terminaciones de los impulsos nerviosos mediante la catalización de la hidrólisis de la acetilcolina. Los insecticidas OF y carbamatos se han desarrollado como inhibidores de esta enzima. Estos insecticidas tienen propiedades similares a la acetilcolina pero son hemisubstratos porque fosforilan o carbamilan la serina de sitio activo que conduce a la inhibición irreversible de la enzima.

Esta inhibición conduce a una acumulación de la acetilcolina en las hendiduras sinápticas, lo que causa que los receptores de acetilcolina estén permanentemente abiertos, teniendo como resultado la muerte del insecto (Aldridge, 1950 y Reiner, 1971). Smitsaert describió el primer caso de AchE con sensibilidad reducida a los plaguicidas (Smitsaert, 1964). Desde entonces, la resistencia por modificación de la AchE se ha descrito en muchas especies de insectos (Fournier, 1994 y Guedes *et al.*, 1997).

El uso extensivo e intensivo de insecticidas OF o carbamatos para el control de plagas de insectos ha conducido a la sobreproducción de enzimas asociadas con la resistencia en los insectos. Se han identificado algunas mutaciones responsables de la resistencia a insecticidas. La presencia de una enzima mutada tiene varias consecuencias en la genética de la resistencia y el mantenimiento de los alelos resistentes en las poblaciones naturales (Fournier y Mutero, 1994).

Además de la modificación cualitativa de la enzima, la sobreproducción de AchE origina la resistencia a los insecticidas, como se demostró primeramente de forma experimental en *Drosophila* al aumentar la dosis enzimática y en segundo término al encontrar una correlación positiva entre la cantidad de AchE y la resistencia en poblaciones naturales (Fournier *et al.*, 1992; Charpentier y Fournier, 2001). La evolución de la resistencia a insecticidas en los insectos tiende a ser rápida porque la selección es intensa, las poblaciones son grandes y el tiempo de generación es corto. Con la amenaza de la resistencia a los insecticidas es absolutamente necesario investigar las bases moleculares de la distribución de mutaciones de AChE en poblaciones naturales en las diferentes partes del mundo (Menozzi, 2004).

Se han realizado diversos estudios de evaluación de la AChE alterada en *Ae. aegypti*, relacionando su actividad a la resistencia a insecticidas OF y carbamatos. Los niveles elevados de AchE, demuestran que la resistencia bioquímica puede desempeñar un papel importante en la manifestación de la resistencia a los insecticidas en poblaciones de *Ae. aegypti* (Rodríguez *et al.*, 2001; Pethuan *et al.*, 2007; Polson *et al.*, 2011). Por tanto la vigilancia de la resistencia a los insecticidas debe ser permanente, para su detección antes de que se extienda a toda la población, por lo que permite una intervención temprana (Fonseca-González *et al.*, 2011).

2.8.2 Receptores GABA (ácido amino butírico).

El receptor del ácido gamma aminobutírico (GABA) es el sitio o canal de entrada propuesto en insectos para varios tipos de insecticidas (Hosie *et al.*, 1997). Los receptores GABA están localizados en los canales de los iones de cloro en la membrana nerviosa, los cuales controlan el flujo iones a través de la misma (Chalmers *et al.*, 1987). Está demostrado que en *Ae. aegypti* y *Drosophila melanogaster* la resistencia a los insecticidas ciclodienos está asociada con cambios en los receptores GABA y canales de iones cloruro (ffrench-Constant *et al.*, 1994; Bloomquist, 1996). Una mutación asociada con este tipo de mecanismo fue primeramente identificada en *Drosophila*, desde entonces se ha logrado mostrar que este fenómeno ocurre en una amplia gama de insectos resistentes a dieldrina, incluido *Ae. aegypti* (Thompson *et al.*, 1993).

Durante el Programa Global de Erradicación de la Malaria entre los años 1950 a 1960, se diagnosticó resistencia a dieldrina, que involucraba un mecanismo específico de resistencia (GABA) registrado en poblaciones de *An. gambiae* s.l. en África al igual que en América (Chandre *et al.*, 1999; Hemingway y Ranson, 2000). El receptor del ácido gamma aminobutírico, confiere resistencia en los mosquitos a los insecticidas ciclodienos que incluye la aldrina, clordano, dieldrina, heptacloro, la endrina y endosulfán (Wondji *et al.*, 2011; Asih *et al.*, 2012)

2.8.3 Alteración de los canales de sodio (Na⁺).

El canal de sodio sensible a voltaje se considera en general el sitio primario de acción de DDT y los piretroides. Se han realizado numerosos estudios en los que se demuestra la insensibilidad nerviosa a estos compuestos (Williamson *et al.*, 1993). La insensibilidad del canal de sodio dependiente de voltaje a los insecticidas, fue registrado por primera vez en *Musca domestica* (Farnham y Sawicki, 1976). El efecto del DDT y los piretroides causa la persistente activación de los canales de sodio al retrasar la activación del mecanismo normal de voltaje-dependiente (Soderlund y Knipple, 2003). Este proceso conlleva a un rápido efecto conocido como “knockdown” que ocasiona en el insecto parálisis y muerte. “Knockdown” es el nombre genérico que se aplica a los insectos que pierden la actividad motora coordinada, luego de que se exponen a los insecticidas (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2007). Sin embargo, el intenso uso de los piretroides y el DDT ha provocado el desarrollo del fenotipo “Knock – down resistance (Kdr)” en muchas especies de insectos (Soderlund y Knipple, 2003; Liu *et al.*, 2000) incluyendo *Aedes* y *Anopheles*.

Los piretroides son comúnmente utilizados como adulticidas contra mosquitos y la evolución de la resistencia a estos compuestos es una gran amenaza para la salud pública. En estudios realizados en México se detectó una alta frecuencia de una mutación asociada a canales de sodio en *Ae. aegypti*, resistente a permetrina, probablemente debido a la presión de selección de los insecticidas piretroides (Siller *et al.*, 2011).

2.9 Resistencia metabólica.

En el metabolismo de los insecticidas se involucran principalmente tres familias de enzimas: carboxilesterasas, GST y MO. La actividad elevada de una o más de estas enzimas a menudo se encuentra en poblaciones de insectos resistentes, pero en contraste con la resistencia dada por alteraciones en el sitio blanco, no se conocen totalmente los mecanismos moleculares de esta resistencia metabólica (Berticat *et al.*, 2000). Estudios realizados en Martinica con *Ae. aegypti*, sugieren que el alto nivel de resistencia a los insecticidas es consecuencia de los mecanismos de resistencia metabólica. Los niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos tienen implicaciones importantes para el control del vector, por lo que es necesario desarrollar nuevas herramientas y estrategias para mantener un control efectivo de las poblaciones de mosquitos *Aedes* en todo el mundo (Marcombe *et al.*, 2009).

2.9.1 Esterasas inespecíficas.

Las esterases A, B y C son codificadas por distintos loci denominados EST-1, EST-2 y EST-3 (O'Brien, 1960). Las esterases no sólo hidrolizan ésteres carboxílicos, piretroides sintéticos y naturales, sino que también lo hacen sobre los ésteres fosfatos y carbamatos, donde participan como importantes agentes defensivos.

Las esterasas han sido clasificadas en cuatro clases: arilesterasas, acetilesterasas, carboxilesterasas y acetilcolinesterasas (Heymann, 1980). El incremento de estas enzimas puede producir resistencia mediante la hidrólisis o el secuestro del insecticida (Motoyama *et al.*, 1984). En mosquitos *Culex* a través de estudios previos, se han clasificado a las esterasas de acuerdo a su preferencia por hidrolizar los ésteres sintéticos ó naftil acetato y por su movilidad electroforética (Georghiou y Pasteur, 1978; Raymond *et al.*, 1987). Se han informado tres fenotipos de esterasas en el complejo *Cx. pipiens*: A1 en el sur de Francia e Italia (Pasteur N. *et al.*, 1981a), B1 en poblaciones de California, Cuba, América Central y Asia (Georghiou y Pasteur, 1978; Bisset *et al.*, 1990), mientras que las EST A2 y B2 han sido encontradas en poblaciones de varios países (Villani *et al.*, 1983; Raymond *et al.*, 1987). El incremento de la actividad de EST se ha asociado a los niveles de resistencia en cepas de *Ae. aegypti* de Puerto Rico, seleccionadas con malatión (Field *et al.*, 1984) y en mosquitos del complejo *Cx. pipiens* (Vaughan *et al.*, 1998). Otros estudios, igualmente han asociado la actividad de EST como mecanismo principal de resistencia a temefos en *Ae. aegypti* de Venezuela (Mazarri y Georghiou, 1995); Cuba (Rodríguez *et al.*, 2002, Bisset *et al.*, 2011), Panamá (Bisset *et al.*, 2003), Perú (Bisset *et al.*, 2007), El Salvador (Bisset *et al.*, 2009) y Costa Rica (Bisset *et al.*, 2013).

Aunque las EST están asociadas principalmente con la resistencia a OF y carbamatos (Hemingway y Karunaratne, 1998) altos niveles de estas enzimas también han estado involucrados con la resistencia a piretroides, como los encontrados en *An.gambiae* (Vulule *et al.*, 1999), *Ae. aegypti* (Flores *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2010) y *Culex quinquefasciatus* (Bisset *et al.*, 2000; Hamdan *et al.*, 2005).

2.9.2 Glutación-S-Transferasa

El papel de las GST, se ha asociado como uno de los mecanismos de resistencia a los insecticidas OF y carbamatos (Lalah *et al.*, 1995). En estudios bioquímicos realizados con *Ae. aegypti* la resistencia a DDT se relacionó con el incremento de las GST (Mourya *et al.*, 1994; Ranson y Hemingway, 2004, Lumjuam *et al.*, 2011). La GST pueden metabolizar los insecticidas al facilitar su deshidrocloración reductiva o mediante las reacciones de conjugaciones con glutatión reducido, para producir metabolitos solubles en agua que se excretan más fácilmente (Enayati *et al.*, 2005). Estudios más recientes con una muestra de *Ae. aegypti* de Santiago de Cuba, indicaron que la resistencia observada a la deltametrina podría estar asociada con la esterasa o GST como mecanismos de resistencia (Rodriguez *et al.*, 2005). Los resultados de este estudio, apoyan que esta clase de enzima es importante al conferir la resistencia a los insecticidas (Ding *et al.*, 2005). Los resultados de un estudio *An.gambiae* apoyan que esta clase de enzima es importante al conferir la resistencia a los insecticidas (Ding *et al.*, 2005).

2.9.3 Citocromo P-450 Monoxigenasas (MO).

El papel de las MO en la resistencia a piretroides se observó en larvas de *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* y *An. stephensi* (Kumar *et al.*, 1991; Chareonviriyaphap *et al.*, 2004). Estudios bioquímicos con *Ae. aegypti* de Colombia; integradas por poblaciones locales genéticamente diferenciadas con distintos niveles de resistencia a los insecticidas, indicaron que la resistencia estaba asociada con la variación de los niveles de MO (Ocampo y Wesson, 2004).

En trabajos realizados con el agente sinérgico butóxido de piperonilo (PB) con poblaciones de *Ae. aegypti* de Venezuela, se demostró que las enzimas del grupo MO actúan como mecanismo de resistencia frente al malatión en las dos cepas de este país. Por otra parte, estudios con *Ae. aegypti* de Guinea Francesa, demostraron una mayor actividad de la MO como mecanismo de resistencia a la deltametrina (Dusfour *et al.*, 2011).

2.10 Mecanismos genéticos de la resistencia.

El fenómeno de la resistencia surge como resultado de la interacción insecto/insecticida, originando focos o poblaciones resistentes. Como esta capacidad llega a estar determinada genéticamente, es heredable a nuevas generaciones, que siguen sobreviviendo al tratamiento con insecticida mientras se disminuye la proporción de individuos susceptibles en la población. De esta manera el insecticida actúa como una fuerza selectiva poderosa que concentra individuos resistentes en la población (Cochran, 1989).

La resistencia evoluciona mediante la selección de genes que confieren la tolerancia a los insecticidas. Varios genes de resistencia se han identificado y clonado en *Drosophila* (Morton, 1993). La recombinación entre los alelos resistentes preexistentes en las poblaciones naturales es un mecanismo que los insectos utilizan para adaptarse rápidamente a nuevas presiones selectivas (Mutero *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 2004).

En mosquitos con sobreproducción de EST A2 y B2, el nivel de amplificación de la esterasa A es igual al de la esterasa B lo que indica que los genes son co-amplificados. Esto sugirió que la sobreproducción de las EST A puede lograrse a lo largo de dos diferentes mecanismos: la amplificación de genes y un mecanismo regulatorio (Rooker *et al.*, 1996).

Los genes de resistencia pueden dispersarse en la población local e incluso a nivel mundial. Los patrones de distribución de estas variantes genéticas en poblaciones naturales son el efecto conjunto de varias fuerzas evolutivas y factores demográficos como selección, mutación y ciclo de vida (Gayave *et al.*, 2001).

La resistencia por AchE modificada se ha descrito en muchas especies de insectos y la secuenciación de sus genes ha permitido describir varios puntos de mutaciones. Cada mutación proporciona un patrón específico de resistencia, puede conferir resistencia a un insecticida pero puede aumentar la sensibilidad a otro. La mayoría de las mutaciones alteran la hidrólisis del sustrato al reducir la tasa de desacetilación enzimática y disminuir la estabilidad de la enzima.

Las mutaciones a menudo se encuentran en combinación con la misma proteína. Esto tiene varias consecuencias: aumenta el nivel de la resistencia, incrementa el espectro de la resistencia y puede restaurar la eficiencia catalítica de la enzima (Fournier, 2005). Las mutaciones que confieren resistencia a los insecticidas están bien documentadas. Sin embargo, hasta el presente, no se ha podido determinar si estas mutaciones surgieron antes o después de la introducción de los insecticidas (ffrench-Constant, 2007).

2.11 Detección de los mecanismos de la resistencia.

Los conocimientos adquiridos a través de estudios genéticos y bioquímicos permiten establecer dos conceptos importantes al momento de estudiar y comprender el fenómeno de la resistencia en poblaciones de insectos.

El primero de ellos es el de la resistencia cruzada la cual ocurre cuando la selección para un compuesto produce simultáneamente resistencia a uno o más compuestos a los que el insecto no ha sido expuesto.

Otros de los mecanismos conocidos, es la resistencia múltiple la cual se manifiesta cuando existe simultáneamente una población de insectos, con diferentes mecanismos bioquímicos, cada uno de los cuales la protege contra diferentes tipos de tóxicos (Oppernoorth, 1985). Los mecanismos de resistencia a insecticidas, han sido muy bien caracterizados mediante bioensayos de susceptibilidad, estudios genéticos, bioquímicos y electrofisiológicos. La aplicación de técnicas bioquímicas y biología molecular como *Detox chip*, (Strode *et al.*, 2007) y *Suppression Subtractive Hybridization cDNA* (SSH) (Zhao *et al.*, 2010) para el estudio de la resistencia a los insecticidas ha revolucionado el entendimiento de las bases genéticas de la resistencia.

En el caso de mecanismos metabólicos, los mismos logran evidenciarse con el uso de sinergistas, ya que estos potencian la acción de los insecticidas inhibiendo la actividad de algunas enzimas, siendo el sinergista S,S,S,- tributilfosforotritioato (DEF) inhibidor de las enzimas EST, el ácido etacrínico inhibidor de las GST, mientras que el sinergista PB es un inhibidor de las enzimas del grupo de las multifunción oxidasas (Pérez y Molina, 2009).

La identificación de los mecanismos de resistencia a insecticidas es de suma importancia para el control de insectos vectores. Este conocimiento sustenta las estrategias de control de insectos, proporcionando las formas de detectar y manejar la resistencia. Los estudios de resistencia a insecticidas dependen en gran medida de detallados análisis bioquímicos y genéticos.

Aunque han habido muchos éxitos, también hay muchos ejemplos que la resistencia aún es un desafío. Como paso previo a un control racional de insectos vectores y plagas, es necesario el conocimiento de la biología del insecto, dentro de los contextos ambientales y ecológicos en que se encuentran, los modos de acción y el metabolismo de los insecticidas (Perry *et al.*, 2011).

CAPITULO

3.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

CAPITULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas de *Ae. aegypti* utilizadas en el estudio

- a) **PANAMÁ (PAN)**, población natural colectada en la localidad de 24 de Diciembre (9⁰05'57.32" N y 79⁰21'38.89" O con 44 msnm) en el Municipio de Panamá.
- b) **COSTA RICA (CR)**, población natural colectada en el Barrio de Escalante (9⁰56'07.75" N y 84003'44.75" O, con 1 196 msnm) en el Municipio de San José, Costa Rica.
- c) **NICARAGUA (NI)**, población natural colectada en el Barrio de Altos de Santo Domingo (12⁰09'05.19" N y 86⁰16'03.81" con 59 msnm) centro de la Ciudad de Managua, Nicaragua.
- d) **ROCKEFELLER (ROC)**, cepa de laboratorio susceptible a insecticidas, de origen caribeño, colonizada a principios de los años 30, suministrada por el laboratorio del CDC de San Juan, Puerto Rico.

3.2. Cría y mantenimiento de las colonias de *Ae. aegypti*.

Las cepas de *Ae. aegypti* se mantuvieron en el insectario del Departamento de Control de Vectores del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" a una temperatura de 25 °C \pm 2 °C y 75% \pm 2% de humedad relativa. Las larvas se criaron en bandejas plásticas a las que se les añadió aproximadamente 2.5 litros de agua y 0.7g de harina de pescado o levadura como alimento. Al pasar a pupas, las mismas se colocaron en un vaso de precipitado con agua dentro de una doble jaula (30x30x30 cm) hasta que emergieron a los adultos, los que se alimentó con solución azucarada al 10%. Para la alimentación de las hembras en las jaulas se pusieron curieles enjaulados, condicionando de esta forma alimentación y el mantenimiento de la colonia (puesta de huevos).

Se colocó un vaso de precipitado con agua dentro de la jaula y se puso en su borde interior una tira de papel pegada para garantizar la recolecta de los huevos. Estos últimos se pusieron a eclosionar pasados tres días de su recolecta.

3.3. Bioensayos

3.3.1 Agentes químicos

a. Piretroides:

- **Deltametrina:** (s)- α -cyano-3-phenoxybenzyl cis-(1R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethyl cyclopropane carboxylate, (96.8 %), suministrado por Roussel Uclaf, France.
- **Ciflutrina:** (RS;SR)-alpha-Cyano-4-fluoro-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR) -3-(2,2-dichlorovinyl) -2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate, suministrada por Bayer S.A. Central América, Costa Rica.

- **Cipermetrina:**(90,5%): α -cyano-3phenoxy-4-fluorobenzyl-2,2-dimethyl-3(2,2-dichlorovinyl) cyclopropanecarboxylate, (90,5%), suministrada por Chemotécnica S.A, Argentina.
- **Lambdacialotrina:**[α -ciano-3-fenoxibenzil-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoropropenil) 2,2-dimetilciclopropanocarboxilato], (97,8 %), suministrada por Syngenta S.A, Suecia.

b. Organofosforados:

- **Fenitrotión:** o, o-dimetil 0-(4-nitro-m-tolyl) fosforotioato; 97% de pureza, suministrado por Sumitomo Chemical Company.
- **Malatión:** Dietil mercaptosuccinato, éster con o,o-dimetil fosforoditioato; 97% de pureza, suministrado por American Cyanamid Co., Princeton, New Jersey.
- **Fentión:** o, o dimetil o-(4-metiltio-m-tolyl) fosforotioato; 99.1% de pureza, suministrado por Mobay, Kansas City, Kansas.
- **Clorpirifos:** o, o-dietil o-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato; 94% de pureza, suministrado por Dow Chemical Co., Midlan, Michigan.
- **Temefos:** o, o dimetil fosforotioato o,o-diéster con 4,4' tiodifenol; 93.3% de pureza, suministrado por American Cyanamid Co., Princeton, New Jersey.
- **Pirimifosmetil:** o [2-(dietilamino)-6-metil-4-pirimidinil] o,o-dimetil fosforotioato; 99.8 % de pureza, suministrado por ZENECA Salud Pública.

c. Organoclorado:

- **DDT:** 1,1,1-Tricloro-2,2-bis (p-clorofenil) etano; 99.0 % de pureza, suministrado por Ralph N. Emanuel Ltd.

3.3.2 Bioensayos de larvas

Con la generación F₁ de cada una de las cepas de *Ae. aegypti* se realizaron bioensayos de susceptibilidad con larvas de *Ae. aegypti* de tercer estadio tardío o cuarto estadio temprano, siguiendo la metodología estandarizada por la OMS (OMS, 1981a), para determinar las concentraciones letales del 50 y 90% de la población (CL₅₀ - CL₉₀) frente a los insecticidas. Se emplearon cinco réplicas de cada concentración del insecticida, registrándose entre 2 y 98 % de mortalidad.

Un total de 25 larvas de *Ae. aegypti* fueron colocadas en envases que contenían 99 ml de agua y 1 ml de solución de insecticida a la concentración deseada en acetona.

Todas las soluciones de insecticidas se ajustaron a un volumen final de 1 ml con acetona, el control fue tratado con 1 ml de acetona solamente. La lectura de la mortalidad se realizó a las 24 horas, los resultados fueron analizados sobre la base de criterios de resistencia a insecticidas según la OMS. Los resultados se analizaron mediante el programa Probit-logaritmo de Raymond (Raymond *et al.*, 1985). Para evaluar la resistencia en las cepas bajo estudio se calcularon los factores de resistencia (FR₅₀), por comparación de las CL₅₀ de las cepas de campo con la cepa de referencia, mediante la siguiente fórmula: $FR_{50} = CL_{50} \text{ cepa de campo} / CL_{50} \text{ cepa susceptible}$ (Rockefeller). Cuando la mortalidad en los controles osciló entre el 5 y el 20 % se utilizó la ecuación de Abbott para corregir la mortalidad de los mosquitos expuestos a insecticidas (Abbott, 1925).

Para el diagnóstico de la resistencia se utilizó siguiente criterio:

$FR_{50} \leq 5$ Susceptible

FR_{50} entre 5 y 10 Resistencia moderada

$FR_{50} > 10$ Resistente

3.3.3 Bioensayos de adultos

El nivel de resistencia a los insecticidas se determinó mediante las pruebas de susceptibilidad para mosquitos adultos, siguiendo las normas para mosquitos adultos de la OMS, (OMS, 1981b), con muestras de hembras adultas de la primera generación (F_1) de las cepas de *Ae. aegypti* bajo estudio.

Las cepas de *Ae. aegypti*, fueron criadas y mantenidas en condiciones de laboratorio con una temperatura promedio mínima de 28.5 °C (DE: 0.5703) y máxima de 30.0 °C (DE: 0.0912), humedad relativa de 70.5 % (DE: 0.3939) y con fotoperíodo de 12:12 (día/noche) para posteriormente realizar los bioensayos de susceptibilidad.

En los bioensayos se utilizaron lotes de 25 hembras de 2 a 4 días de emergidas previamente alimentadas con sangre de *Cavia porcellus* (cobayo). Los bioensayos se hicieron una hora después de alimentados los mosquitos. Cada prueba con los insecticidas evaluados contó con cuatro réplicas y sus controles respectivos. Los mosquitos fueron expuestos a papeles impregnados con los insecticidas a la dosis diagnóstica y tiempo sugeridos por la OMS o por los fabricantes de los insecticidas, DDT (4% /0.5 h), lambdacialotrina (0.1%/1h), cipermetrina (0.1%/1h), deltametrina (0.1%/1h), ciflutrina (0.1%/1h) y clorpirifos (1%/1h).

Después del período de exposición a los insecticidas, los mosquitos fueron trasladados a las cámaras de recuperación y se colocaron almohadillas de algodón humedecidas en solución de glucosa al 10% como alimento durante el período de recuperación. El porcentaje de mortalidad se registró a las 24 horas en los mosquitos expuestos a papeles impregnados con insecticidas. Se incluyó un grupo control, que consistió en papeles impregnados con aceite de silicona en el caso de los insecticidas piretroides y DDT y aceite de oliva en el caso de los insecticidas organofosforados y carbamatos. La temperatura promedio registrada durante los bioensayos fue de 27 ± 2 °C y 70% de humedad relativa.

Los resultados fueron analizados sobre la base de los criterios de resistencia a insecticidas de la OMS: susceptible (98- 100 % de mortalidad), verificación de la resistencia (entre 80 y 97 % de mortalidad) y alta resistencia cuando la mortalidad es menor del 80% (WHO, 1992).

3.4 Métodos de detección de los mecanismos de resistencia

3.4.1 Esterasas inespecíficas

Reactivos:

- **Tampón fosfato:** Tampon 0,01M, pH 7,5. Se preparó la forma ácida (NaH_2PO_4) y básica (Na_2HPO_4) a una molaridad de 0,01M. Se añadió la forma básica a la ácida hasta ajustar el pH a pH 7,5.
- **Sustrato (β naftil acetato):** sustrato β -naftilacetato 70mM, se preparó disolviendo 0,6517g en 50 ml de acetona. A partir de esta solución madre, se preparó una dilución de 1:100 con tampón fosfato, en el momento del ensayo.

- **Duodecil sulfato de sodio (SDS):** Se preparó una solución al 5 %, disolviendo 5g en 100 ml de agua destilada.
- **Fast Blue BB Salt (O-dianisidine tetrazotized):** 30mg de Fast Blue fueron disueltos en 3 ml de agua destilada y 7 ml de SDS 5 %.

Preparación de las muestras de larvas

Se colocó una larva cuarto estadio temprano en cada pocillo de una placa de microtitulación. Se homogenizaron en 50 µl de tampón fosfato con el empleo de un homogenizador de placa sobre un a bolsa de hielo. Se completó el volumen de cada pocillo a 200 µl con tampón fosfato.

Descripción de la técnica: De cada pocillo se tomaron 20 µL y se traspasaron a una nueva placa. Se adicionaron 200 µL del sustrato β-naftilacetato. Se dejó transcurrir la reacción durante 10 minutos y posteriormente se adicionó 40 µL de Fast Blue.

La densidad óptica (DO) se leyó a 570 nm con el empleo de un lector de ELISA (Labsystems iEMS Reader MF).

3.4.2. Glutación-s-transferasa (GST)

Reactivos:

- **Glutación reducido (GSH) 20 mM:** 0,13g en 20 ml de tampón fosfato
- **1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 50 mM:** 0,01g en 1 ml de metanol.

Mezcla de sustratos: Se preparó en una proporción de 1CDNB: 20 GSH. Para una placa de 96 pocillos se preparó una mezcla de 1 ml de CDBN en 20 ml de GSH.

Descripción de la técnica: Se adicionó 20 µl de cada homogenado de larva a una placa de microtitulación y se le adicionó 200 µl de la mezcla [250 µl de 3,4 CDNB (50 mM) + 5ml de glutatión reducido (20mM)]. Se dejó transcurrir la reacción por 3 min y se leyó la DO a 340 nm.

3.4.3 Acetilcolinesterasa modificada (AchEr)

Reactivos:

- **Ácido 5,5-dithiobis 2- nitrobenzoico (DTNB) (0,07 M):** 0,0396g en 10 ml de tampón fosfato pH 7,5.
- **Acetilcolina Iodada (ASChI) (0.06M):** 0,0578g de ASChI en 20 ml de agua destilada.
- **Propoxur (0.025 M):** 0,292g de propoxur en 10 ml de acetona.
- **Triton X-100 (1%):** en tampón fosfato 0,01M, pH 7,5.

Descripción de la técnica: La preparación de las muestras fue similar a la descrita anteriormente, (Acapite 3.4) con la diferencia de que las muestras se homogenizaron en 50 µl de tampón fosfato, conteniendo tritón X-100 al 1%. Se utilizaron 20 µl del homogenato. Se prepararon dos placas además, una para la determinación de la actividad AchE normal y otra para la actividad AchE modificada. Inhibida con propoxur. En ambas placas se adicionaron 20 µl de DTNB y 20 µl de ASChI. En la placa donde se midió la actividad AchE modificada se adicionaron además 10 µl de propoxur 0.025 M. La reacción se dejó transcurrir durante 30 minutos y se leyó la DO a 405 nm.

Para determinar si la AchE estaba actuando como mecanismo de resistencia, es decir, con modificaciones en su sitio activo (AchEr), se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad de la AchEr} = \frac{\text{Actividad de la Ache normal}}{\text{Actividad AchE en presencia del inhibidor}} \times 100$$

Los valores de actividad de AchE, en presencia del inhibidor, menores de 70 % correspondieron a individuos susceptibles, es decir sin la presencia del mecanismo de AchEr modificada.

3.5 Cálculo de la frecuencia de individuos resistentes

Para calcular la frecuencia de individuos resistentes en una población, basados en los mecanismos de esterasas, acetilcolinesterasa alterada o glutatión transferasa se utilizó la ecuación de Hardy-Weinberg, asumiendo que la población estaba en equilibrio genético. Una frecuencia de 1, significa que el 100 % de la población posee el fenotipo resistente (RS+RR).

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \quad \text{donde: } p = \text{SS}, pq = \text{RS}, q = \text{RR} \text{ y } T = \text{Total de mosquitos evaluados}$$

$$\frac{(SS)^2 + 2(RS + (RR)^2)}{T} = 1$$

SS: Mosquitos homocigóticos susceptibles
 RS: Mosquitos heterocigóticos resistentes
 RR: Mosquitos homocigóticos resistentes

T

$$\text{Frecuencia de mosquitos resistentes } (RS + RR) = 1 - \sqrt{\frac{SS}{T}}$$

Esterasas: SS= Valores de D.O \leq 1.22

GST: SS= Valores de AE \leq 0.6694 μ mol/ min

AchE: SS= Valores de AEr \leq 70 %

3.6. Determinación de los mecanismos de esterasas y citocromo P-450 monoxigenasas “in vivo” mediante la utilización agentes de sinérgistas.

Agentes Sinérgistas:

DEF: S,S,S-tributilfosforotioato; 99% de pureza, suministrado por Mobay, Kansas City, Kansas.

PB: (a-[2-butoxi-etoxi] etoxi-4,5-metilenodioxo-2-propiltolueno); 96,8% de pureza, suministrado por McLaughlin Gormley King Co, Minneapolis, Minnesota.

Método: Se determinó la acción de los agentes sinérgistas DEF inhibidor de EST y PB inhibidor de MO, exponiendo durante 4 horas larvas de cuarto estadio a las dosis subletales 0.008 mg/l de DEF y 5 mg/l de PB. Posteriormente se les aplicó diferentes dosis de insecticidas y se determinó la mortalidad transcurridas 24 horas de exposición. Se calcularon las concentraciones letales 50 (CL₅₀) y 90 (CL₉₀) a través del programa Probit-logaritmo de Raymond, (1985). Se calculó el factor de sinérgismo (FS) con la siguiente fórmula:

$$FS = CL_{50} \text{ del insecticida sólo} / CL_{50} \text{ del insecticida + sinérgistas}$$

Se consideró que existió sinérgismo para valores de FS > 5.

3.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida para la caracterización de esterasas.

Reactivos:

- **Solución A:** Acrilamida 30 %: 90g de acrilamida, 2,4g de bis acrilamida, Mezclar ambas soluciones con 300 ml de agua destilada.
- **Solución B:** 25 g. de sacarosa, 250 ml de tampón del gel.
- **Solución C:** 0,1 g. de persulfato de amonio en 25 ml de agua destilada.
- **-Tampón del gel Tris-Borato-EDTA, pH 8.6:** 12,11g. de tris, 0,93g. de EDTA, 2.47g de ácido bórico. Mezclarlos con 250 ml de agua destilada.
- **Tampón- de corrida pH=8,0:** Pesar 60,55 g. de Tris, 3,98g de EDTA, 21,21g de ácido bórico. Mezclarlos en cinco litros de agua destilada y ajustar el pH a 8,0 con ácido bórico saturado.
- **Tampón 0,1 M fosfato pH= 7,5:** Pesar 29,995g de NaH_2PO_4 (forma ácida) en 2500 ml de agua destilada, 35,49 g. de Na_2HPO_4 (forma básica) en 2500 ml de agua destilada. A la forma ácida le añado la forma básica hasta ajustar el pH a 7,5.
- **Preparación de xilene cianol 1%:** Pesar 0,05 g. de xilene cianol en 5 ml de agua destilada. Pesar 1,5 g. de sacarosa en 10 ml de agua destilada. Tomar 200 μl de xilene cianol y disolverlos en 10 ml de sacarosa.
- **Preparación del gel (10 %):** 6,66 ml de Solución A, 4,32 ml de agua destilada, 5 ml de Solución B, 5 ml de Solución C, 20 μl de TEMED (N, N, N, N, tetrametyl etilendiamino).

Soluciones para la tinción del gel:

- **Sustratos:** α y β naftil acetato 70 mM en acetona =0,6517g de cada uno de ellos en 100 ml de acetona.
- **Colorante:** Fast Blue B Sal (O-dianisidine tetrazotized): 30 mg de Fast Blue fueron disueltos en 3 ml de agua destilada y 7 ml de SDS 5 %.

Descripción de la técnica: Para realizar la electroforesis se determinó la actividad enzimática de las EST en cada larva y se seleccionaron las muestras con mayor actividad. Posteriormente, en tubos Eppendorf (1,5 ml), se adicionaron 10 μ L de muestra y 10 μ L del indicador Xilene cianol.

Se aplicaron 20 μ L de esta mezcla en el gel. La corrida se realizó a 150 V, durante 45 min. Para la tinción de las bandas de EST, cada gel se sumergió en una mezcla de 50 ml de tampón fosfato (0,1M) y 4 ml de cada uno de los sustratos inespecíficos de las EST (α - y β -naftil acetato). Después se añadió el colorante Fast Blue B salt, disuelto previamente en agua destilada y SDS.

Para fijar la coloración de las bandas los geles se sumergieron en una solución de ácido acético al 10 %. A cada una de las bandas se le determinó la movilidad relativa o factor de retención (R_f) calculándose la relación existente entre la distancia recorrida por la banda y el frente de corrida dado por el colorante xilen cianol.

$R_f = \text{distancia recorrida por la esterasa} / \text{distancia recorrida por el colorante}$

3.8 Análisis Estadístico:

- **Programa probit-logaritmo de Raymond, 1985.** Se utilizó para analizar si los datos se ajustaban a la recta de regresión Mortalidad vs Log. Dosis del insecticida. Con este programa se determinó el valor de concentración que causó el 50 y 90 % de mortalidad para cada insecticida y la pendiente de la recta de regresión, lo cual nos indicó el grado de homogeneidad de la población para la resistencia a insecticidas.

CAPITULO 4. RESULTADOS

CAPITULO 4. RESULTADOS

4.1 Bioensayos de susceptibilidad y/o resistencia en larvas de *Aedes aegypti*

Se evaluó la susceptibilidad y/o resistencia en larvas de *Ae. aegypti* a los insecticidas OF: temefos, malatión, fentión, pirimifosmetil, fenitrotión y clorpirifos en cepas de PANAMÁ, COSTA RICA y NICARAGUA (Tabla 1). Como se muestra en la tabla, la más alta resistencia a temefos, expresada por el valor de factor de resistencia ($FR_{50} > 10x$), se encontró en COSTA RICA (68.33x), seguido de PANAMÁ (23.33x); sin embargo en la cepa NICARAGUA la resistencia fue moderada a este insecticida (FR_{50} entre 5 x y 10x), con un valor de 9.16x. Todas las cepas resultaron susceptibles a malatión, fentión y fenitrotión ($FR < 5$). Con respecto al pirimifosmetil, se detectó alta resistencia en las cepas de PANAMÁ (12.30x) y COSTA RICA (10.76x), la cepa NICARAGUA resultó susceptible con un valor de 2.69x. Una resistencia elevada se observó a clorpirifos en la cepa COSTA RICA (15.94x), sin embargo, resultaron susceptibles a este insecticida las cepas de PANAMÁ (2.17x) y NICARAGUA (3.04x). En la tabla 2, se muestran los resultados de la evaluación de los piretroides: deltametrina, lambdacialotrina, cipermetrina y ciflutrina. Todas las cepas resultaron susceptibles a los piretroides, excepto valores moderados de resistencia que se observaron en COSTA RICA a cipermetrina (7.0x) y ciflutrina (5x) en PANAMÁ a ciflutrina (10.0x).

Tabla 1. Valor de concentración letal media (CL₅₀) y Factor de Resistencia (FR₅₀) para insecticidas OF en larvas de *Aedes aegypti* de tres países de América Central.

PAÍS	Temefos	Malatión	Fentión	Pirimifosmetil	Fenitrotión	Clorpirifos
PANAMÁ CL ₅₀	0.028 (0.02-0.03)	0.88 (0.83-0.93)	0.021 (0.01-0.02)	0.096 (0.08-0.1)	0.045 (0.04-0.05)	0.015 (0.01-0.02)
FR ₅₀	23.33	2.0	2.14	12.30	4.78	2.17
b (±DE)	5.2 (± 0.5)	8.3 (± 1.1)	3.6 (± 0.2)	3.6 (± 0.4)	6.2 (± 0.5)	3.0 (± 0.2)
COSTA RICA ^a CL ₅₀	0.082 (0.07-0.08)	0.61 (0.57-0.65)	0.024 (0.02-0.03)	0.084 (0.08-0.09)	0.042 (0.04-0.05)	0.11 (0.09-0.1)
^b FR ₅₀	68.33	1.38	2.44	10.76	4.46	15.94
^c b (±DE)	5.9 (±0.7)	(6.7±0.7)	5.9 (±0.7)	6.1 (±0.7)	6.3 (±0.05)	5.2 (±0.5)
NICARAGUA CL ₅₀	0.011 (0.009-0.01)	0.096 (0.09-0.1)	0.029 (0.02-0.03)	0.021 (0.01-0.02)	0.0077 (0.007-0.008)	0.021 (0.01-0.02)
FR ₅₀	9.16	0.22	2.96	2.69	0.82	3.04
b(±DS)	4.9	4.7 (±0.5)	4.7(±0.7)	5.5 (±0.5)	8.2	4.1 (±0.8)
ROCKEFELLER CL ₅₀	0.0012 (0.001-0.002)	0.44 (0.4-0.5)	0.0098 (0.009-0.01)	0.0078 (0.007-0.009)	0.0094 (0.009-0.010)	0.0069 (0.006-.007)
b(±DE)	6.2 (±0.7)	2.1 (±0.2)	6.0 (±1.2)	3.6 (±0.5)	7.7 (±1.1)	5.1 (±0.8)

Número de larvas evaluadas: 500 por insecticida a CL₅₀ en mg/litro, 95% límites de confianza están en paréntesis. b Factor de Resistencia (FR): CL₅₀ cepa a evaluar/ CL₅₀ Cepa ROCKEFELLER. c b es la pendiente de la recta Probit-log. Desviación Estándar (ó DE) está en paréntesis.

Tabla 2. Valor de concentración letal media (CL₅₀) y Factor de Resistencia (FR₅₀) para insecticidas piretroides en larvas de *Aedes aegypti* de tres países de América Central.

PAÍS	Deltametrina	Lambdacialotrina	Cipermetrina	Ciflutrina
PANAMÁ CL ₅₀	0.0002 (0.0002-0.0003)	0.0005 (0.0004-0.0005)	0.00001 (0.000009-0.00001)	0.01 (0.009-0.01)
FR ₅₀	2.5	0.5	0.01	10.0
b (±DE)	2.4 (±0.3)	2.5 (±0.1)	0.6(±0.1)	3.2 (±0.2)
COSTA RICA CL ₅₀	0.0002 (0.0002-0.0003)	0.004 (0.003-0.004)	0.007 (0.006-0.007)	0.005 (0.005-0.006)
FR ₅₀	2.5	4.0	7.0	5.0
b (±DE)	3.5 (±0.3)	2.8 (±0.3)	4.5 (±0.4)	3.6 (±0.4)
NICARAGUA CL ₅₀	0.00003 (0.00003-0.00004)	0.0003 (0.0003-0.00004)	0.0003 (0.0003-0.0004)	0.0005 (0.0005-0.0006)
FR ₅₀	0.4	0.3	0.3	0.5
b (±DE)	2.7(±0.3)	2.9(±0.4)	3.6(±0.3)	1.8(±0.2)
ROCKEFELLER CL ₅₀	0.00008 (0.00007-0.00008)	0.001 (0.0008-0.001)	0.001 (0.0008-0.001)	0.001 (0.001-0.002)
b (±DE)	2.9 (±0.3)	2.3 (±0.2)	1.5 (±0.2)	4.1 (±0.5)

Número de larvas evaluadas: 500 por insecticida, CL₅₀ en mg/litro 95% límites de confianza están en paréntesis, Factor de Resistencia (FR): L₅₀ cepa a evaluar/ CL₅₀ Cepa ROCKEFELLER, b es la pendiente de la recta Probit-log. Desviación Estándar (± DE) está en paréntesis.

4.2 Bioensayos de susceptibilidad y/o resistencia en mosquitos adultos

Organoclorado DDT: Como se observa en la tabla 3 todas las cepas resultaron resistentes al organoclorado DDT con el valor más bajo de porcentaje de mortalidad en la cepa de NICARAGUA (29.1 %) seguido por COSTA RICA (57.4 %) y PANAMÁ (63.3 %).

Piretroides: En cuanto a los mosquitos expuestos al insecticida piretroide lambdacialotrina, resultaron susceptibles las cepas de PANAMÁ (100 %) y NICARAGUA (100 %) y en verificación la cepa de COSTA RICA (83.5 %). Con respecto a cipermetrina resultaron ser susceptible las cepas de COSTA RICA y NICARAGUA con 100 % de mortalidad y en verificación PANAMÁ (95.6%). En el caso de la deltametrina, las cepas de COSTA RICA (97.3%) y NICARAGUA (94.6%) resultaron en verificación de la resistencia, sólo PANAMÁ resultó susceptible a este insecticida con valor de 99.2 % de mortalidad. A ciflutrina resultó susceptible COSTA RICA, con porcentaje de mortalidad de 99.7% y en verificación PANAMÁ (96.4 %) y NICARAGUA (95.9 %).

OF (Clorpirifos): Los resultados obtenidos después de la exposición de las poblaciones de *Ae. aegypti* al insecticida organofosforado clorpirifos, se demostró que la cepa de NICARAGUA, resultó con un valor de 100 % de mortalidad y en verificación PANAMÁ (96.2 %) y COSTA RICA (94.8 %).

Tabla 3. Nivel de susceptibilidad y/o resistencia al organoclorado DDT, a los insecticidas piretroides (lambdacialotrina, cipermetrina, deltametrina y ciflutrina) y al organofosforado clorpirifos en adultos de las cepas de *Aedes aegypti* de tres países de América Central.

INSECTICIDA	Cepas de <i>Aedes aegypti</i>			
	PANAMÁ	COSTA RICA	NICARAGUA	Estado de la Susceptibilidad
	% DE MORTALIDAD			
DDT (4% /0.5 h)^a	63.3	57.4	29.1	R/R/R
Lambdacialotrina (0.1%/1h)	100	83.5	100	S/V/S
Cipermetrina (0.1%/1h)	95.6	100	100	V/S/S
Deltametrina (0.1%/1h)	99.2	97.3	94.6	S/V/V
Ciflutrina (0.1%/1h)	96.4	99.7	95.9	V/S/V
Clorpirifos (1 %/1h)	96.2	94.8	100	V/V/S

^aLa dosis del insecticida en % y el tiempo de exposición están en paréntesis. Número de mosquitos adultos evaluados: 500 mosquitos por insecticida. **R**: resistente; **V**: verificación; **S**: susceptible.

4.3 Determinación de los mecanismos de resistencia a través de pruebas bioquímicas.

Como se muestra en la tabla 4, la frecuencia en que se encontró incrementada la actividad de las enzimas EST fue elevada (>40%), lo cual demostró que este mecanismo enzimático estuvo involucrado en la resistencia detectada a los insecticidas evaluados; sin embargo, los mecanismos de resistencia de la GST y AchEr se observaron a baja frecuencia, no resultando implicados en la resistencia a los insecticidas evaluados. Los valores más altos de frecuencia o actividad de EST se observaron en COSTA RICA (100%) y PANAMÁ (80%) y una baja frecuencia observada en NICARAGUA (31.0 %). Los valores de frecuencia de actividad de GSTs resultaron bajos (<40 %) en PANAMÁ (12.0 %), COSTA RICA (19.0 %) y NICARAGUA (14.0 %) respectivamente. La AchEr se encontró a muy baja frecuencia con valores de 1.4 para PANAMÁ y 0.53 en COSTA RICA y NICARAGUA.

Tabla 4. Frecuencia (%) en la que se encuentran con alta actividad las enzimas EST, GST y la enzima acetilcolinesterasa modificada (AchEr) en larvas de *Aedes aegypti*, procedentes de tres países de América Central.

Cepas de <i>Ae. aegypti</i>	MECANISMOS DE RESISTENCIA		
	Esteras	GST	AchEr
	Frecuencia (%)		
PANAMÁ	80.0	12.0	1.4
COSTA RICA	100	19.0	0.53
NICARAGUA	31.0	14.0	0.53
ROCKEFELLER	0.0	0.0	0.0

Número de larvas evaluadas = 352 larvas por cepa para cada mecanismo de resistencia.

4.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida para esterasas en cepas de *Aedes aegypti*.

La esterasa A4 fue identificada teniendo en cuenta la movilidad relativa o factor de retención (Rf). En las tres cepas evaluadas se observó que la banda de EST-A4 mostró mayor intensidad de tinción que la cepa ROCKEFELLER, sin embargo es de destacar que en las cepas de PANAMÁ y COSTA RICA se observó esta banda con mayor intensidad de tinción que en la cepa de NICARAGUA (Fig. 1).

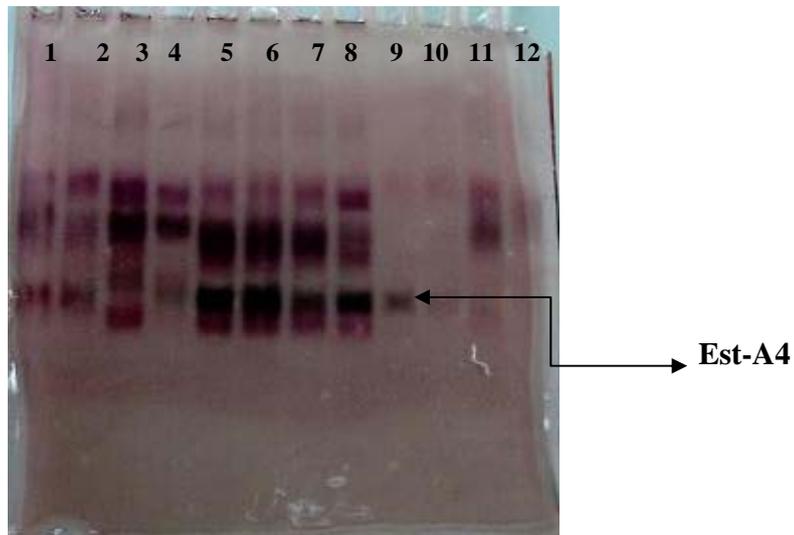


Figura 1. Patrón electroforético de esterasas observadas en tres cepas de *Ae. aegypti* de América Central. De izquierda a derecha: 1, 2 y 3 (NICARAGUA); 4,5 y 6 (COSTA RICA); 7, 8 y 9 (PANAMA) y 10, 11 y12 (ROCKEFELLER).

4.5 Determinación de los mecanismos de resistencia utilizando agentes sinérgicos

Se determinó “*in vivo*” los mecanismos de resistencia de EST a través de los sinérgicos DEF, inhibidor de EST y PB, inhibidor de las MO. Como se puede observar en la Tabla 4, el sinérgico DEF potenció la acción del insecticida organofosforado temefos en dos de las cepas evaluadas, lo cual se manifestó a través de los valores elevados del factor de sinérgico ($FS > 5$) observados, corroborándose el papel de las EST en la resistencia a temefos en estas cepas. El más alto valor de FS para temefos se observó en la cepa COSTA RICA (31.53), seguido de PANAMÁ (13.33). En la cepa NICARAGUA se observó que el valor de FS resultó menor de cinco (1.22), lo cual indicó que el mecanismo de EST no estuvo relacionado con la resistencia moderada a este insecticida.

El PB potenció la acción del temefos en las cepas de PANAMA, con un valor de FS = 8.8 por lo que las MO jugaron también un papel importante en la resistencia a temefos. La resistencia a pirimifosmetil estuvo dada por los mecanismos de EST y MO en la cepa PANAMÁ, mostrando el mismo valor (120) de FS para los dos sinergistas. El DEF potenció la acción del clorpirifos, lo cual demostró el papel de las EST en la resistencia a este insecticida, con un valor de FS = 15.8 en COSTA RICA. Las MO no resultaron ser un mecanismo de resistencia a clorpirifos con un valor de FS = 2.8 en la cepa de COSTA RICA (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de CL₅₀ y factor de sinergismo (FS) para insecticidas OF, utilizando los sinergistas DEF y PB, en larvas de *Aedes aegypti*, procedentes de tres países de América Central.

PAÍS	DEF			PB		
	Temefos	Pirimifosmetil	Clorpirifos	Temefos	Pirimifosmetil	Clorpirifos
PANAMÁ CL ₅₀	0.0021 (0.001-0.002)	0.00080 (0.007-0.0008)	-	0.0032 (0.003-0.004)	0.00008 (0.00007-0.0008)	-
FS	13.3	120.0	-	8.8	120.0	-
COSTA RICA	0.003 (0.02-0.03)	0.04 (0.03-0.04)	0.007 (0.006-0.007)	0.1 (0.09-0.1)	0.1 (0.09-0.1)	0.04 (0.03-0.04)
FS	31.5	2.0	15.8	0.7	0.7	2.8
NICARAGUA	0.0090 (0.008-0.009)	-	-	0.088 (0.01-0.02)	-	-
FS	1.2	-	-	0.81	-	-
ROCKEFELLE L ₅₀	0.01 (0.01-0.02)	0.01 (0.01-0.01)	0.004 (0.004-0.005)	0.02 (0.02-0.02)	0.03 (0.02-0.03)	0.02 (0.01-0.02)
FS	1.1	0.6	1.5	0.6	0.3	0.4

Número de larvas evaluadas: 1000 por insecticida, ^a CL₅₀ en mg/litro 95% LC están en paréntesis, ^bFactor de sinergismo (FS): CL₅₀ insecticida sin sinergistas/CL₅₀ insecticida + sinergistas.

CAPITULO 5. DISCUSIÓN

CAPITULO 5. DISCUSIÓN

5.1 Bioensayos de susceptibilidad y/o resistencia

Los insecticidas han jugado un importante papel en los programas de control de *Ae. aegypti* en los países de América, donde las epidemias de dengue, han sido básicamente controladas por el uso de insecticidas, tanto para el control de larvas, como de adultos. Dentro de los insecticidas OF más utilizados para el control de *Ae. aegypti* se encuentran el temefos, utilizado como larvicida en tratamiento focal, fentiión, fenitrotión y malatión, utilizados en tratamiento perifocal y en rociamiento intradomiciliario o espacial. Los OF pirimifosmetil y clorpirifos se han utilizado también, pero en menor medida en los programas de control de vectores.

Entre los insecticidas OF evaluados, al que se observó mayor resistencia fue a temefos, seguido de pirimifosmetil y clorpirifos. Sin embargo todas mostraron susceptibilidad a fentiión, fenitrotión y malatión. El insecticida organofosforado temefos ha sido el más utilizado para el control de los criaderos larvales de *Ae. aegypti* en América Latina, incluyendo los países de estudio. La resistencia observada por lo tanto responde a una presión selectiva sobre las poblaciones de este vector. Hay estudios previos que han demostrado la resistencia a temefos en países de América Latina (Rodriguez *et al.*, 2007).

En Ciudad de la Habana, Cuba, se demostró alta resistencia en los 15 municipios de la Ciudad, con un significativo incremento entre los años 2006 y 2008 (Bisset *et al.*, 2011). En otros países también se ha confirmado la tendencia al incremento de la resistencia a temefos, como en Brasil (Braga *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2006; Montella *et al.*, 2007; Beserra *et al.*, 2007 y Melo-Santos *et al.*, 2009), Tailandia (Jirakanjanakit *et al.*, 2007a), indicando la necesidad de aplicarse otros métodos de control alternativos para poder preservar la efectividad de este larvicida. Hay países como Brasil y Cuba que mantienen una vigilancia estrecha de la resistencia a insecticidas.

En 1999, la Fundación Nacional Brasileña para la Salud comenzó el primer Programa Nacional de Monitoreo de la resistencia a insecticidas, reportándose resistencia a temefos en varias municipalidades de Río de Janeiro y Espírito Santo (Lima *et al.*, 2003) y en 12 municipalidades de tres estados de Brasil (Braga *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2011).

En trabajos realizados con *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* de varias regiones de Malasia, los resultados indicaron que las poblaciones de *Aedes* desarrollaron resistencia a temefos (Chen *et al.*, 2005). En *Ae. aegypti* de Argentina también se han realizado investigaciones sobre la resistencia a temefos. Estudios realizados por Biber *et al.*, 2006, en cepas argentinas de CATAMARCA, CÓRDOBA y POSADAS y la cepa boliviana de YACUIBA, demostraron que la cepa POSADAS mostró susceptibilidad a la concentración diagnóstica (0,012 mg/litros), mientras que la mortalidad en CATAMARCA fue de 87%.

Estudios realizados en las provincias de Misiones y Formosa en Argentina con *Ae. aegypti*, mostraron una resistencia incipiente a temefos (Seccacini *et al.*, 2008).

En trabajos posteriores en poblaciones colectadas en YACUIBA y CÓRDOBA registraron resistencia a temefos (Biber *et al.*, 2006). En cepas colectadas en los años 2007-2008 en Argentina se detectó resistencia incipiente a temefos en siete cepas evaluadas (LLinás *et al.*, 2010).

A pesar de que temefos continúa siendo utilizado para el control larval de *Ae. aegypti* en América Latina y del Caribe, la evidencia de resistencia a este organofosforado y a otros, que han sido utilizado para el control de adultos (malatión, fentiión, fenitrotión y clorpirifos) se ha confirmado en trabajos previos, realizados en estos países. Rawlins y Ragoonansingh detectaron en 1990 resistencia a temefos en algunas poblaciones caribeñas de *Ae. aegypti*, así como a malatión, fentiión y clorpirifos, pero no se encontró resistencia a fenitrotión (Rawlins y Ragoonansingh, 1990). Rawlins y Wan en 1995 encontraron que de 34 cepas de *Ae. aegypti* evaluadas de 17 países caribeños, la mayoría mostraron resistencia a fentiión y temefos y moderados niveles de resistencia a malatión, fenitrotión y clorpirifos (Rawlins y Wan, 1995). Rawlins en 1998 evaluó 102 cepas de *Ae. aegypti* originarias de 16 países del Caribe y Suramérica con el larvicida temefos y el adulticida malatión, ellos encontraron que la resistencia a ambos insecticidas en este vector varió en las poblaciones, dentro de un país y de un país a otro, pero en general la resistencia a malatión en estado adulto no llegó al grado a la que mostraron las larvas a temefos y aumentó muy poco comparada con los grados de resistencia a estos insecticidas, determinada cuatro años antes (Rawlins, 1998).

En un estudio llevado a cabo en la India se demostró que tanto *Ae. aegypti* como *Aedes albopictus* mostraron completa susceptibilidad a los OF más utilizados por el Programa de Control de enfermedades transmitidas por vectores como fueron el temefos, fentión, malatión y fenitrotión, pero demostraron un variado grado de resistencia cruzada a clorpirifos, malatión y DDT (Sharma *et al.*, 2004).

Otros resultados revelaron que *Ae. aegypti* de diferentes localidades estudiadas de la India resultaron susceptibles a temefos, fentión y malatión, mientras que un bajo nivel de resistencia se observó a DDT en *Ae. aegypti* colectados en el campo (Tikar, 2008 y 2009). Sin embargo otros trabajos han demostrado que el *Ae. aegypti* es aún susceptible a fenitrotión en Brasil (Campos y Andrade, 2001; Lima *et al.*, 2003 y Sunaiyana *et al.*, 2006).

Debido a que la resistencia a temefos desarrollada por *Ae. aegypti* constituye una limitante en los programas de control de esta especie, la OMS ha brindado otras alternativas para el tratamiento focal en las aguas de consumo humano, como es *B. thuringiensis israelensis* (OMS, 2003), metopreno a dosis no superiores de 1 mg de ingrediente activo (ia) por litro (1 ppm) y el pyriproxifeno a dosis hasta 0.01 mg de ingrediente activo (ia) por litro (0.01 ppm) (OMS, 2006). Estas alternativas de control ya han sido evaluadas en otros países como Perú (Sihuincha. *et al.*, 2005), en Venezuela (Kroeger *et al.*, 2006) y en Cuba (Ricardo *et al.*, 2010).

En este trabajo las cepas estudiadas mostraron completa susceptibilidad a fenitrotión, fenitión y malatión. Similares resultados fueron registrados en poblaciones de *Ae. aegypti* de Cuba (Rodríguez *et al.*, 2007) y Brasil (Campos y Andrade 2001; Lima *et al.*, 2003; Sunaiyana *et al.*, 2006). Existen trabajos que demuestran que *Ae. aegypti* muestra aún susceptibilidad a este insecticida como ha sido en Texas, México (Sames *et al.*, 1996), La India (Sharma *et al.*, 2004), Tailandia (Ponlawat *et al.*, 2005) y Cuba (Rodríguez *et al.*, 2007).

A pesar de que malatión ha sido utilizado en la región del Caribe por más de 30 años, solo moderados niveles de resistencia (5-10x) han sido diagnosticados a este insecticida en poblaciones de *Ae. aegypti* (Rawlins *et al.*, 1995, 1998 y Rodríguez *et al.*, 2000; Ponlawat, 2007). Trabajos realizados en poblaciones de *Ae. aegypti* en Tailandia por Ponlawat *et al.*, 2005, detectaron que las poblaciones de mosquitos fueron completamente susceptibles a malatión. Es una especie que se ha demostrado, que bajo presión de selección en el laboratorio, no desarrolla resistencia (Rodríguez *et al.*, 2003).

Una intensa campaña para el control de *Ae. aegypti* comenzó en Cuba en 1981, malatión fue el principal insecticida utilizado como adulticida hasta 1986, en esta etapa *Ae. aegypti* fue exitosamente controlado por este insecticida, sin embargo este fue reemplazado por piretroides en 1986 porque otra especie de mosquito, *Cx. quinquefasciatus*, que ocupó los sitios de cría de *Ae. aegypti* en ambiente urbano (Bisset *et al.*, 1985), desarrolló resistencia a malatión. Posteriormente se comparó el nivel de resistencia a malatión en ambas especies de cepas de Latinoamérica y se demostró la presencia de alta resistencia en las cepas de *Cx. quinquefasciatus*, pero no en *Ae. aegypti* (Rodríguez *et al.*, 2000).

La alta resistencia a pirimifosmetil y clorpirifos observada en las cepas evaluadas no responde a su uso por los programas de control de *Ae. aegypti* ya que son insecticidas poco utilizados por Salud Pública. Pirimifosmetil se utiliza fundamentalmente para el control de plagas de granos almacenados y clorpirifos se utiliza para el control de plagas secundarias urbanas por los Controladores Profesionales de Plagas Urbanas (PCO). De aquí que *Ae. aegypti* en estos países, se expone a dosis sub-letales de estos insecticidas, factor que contribuye al incremento de la resistencia a insecticidas (Bisset *et al.*, 2005).

En trabajos realizados por Rodríguez *et al.*, 1999, en una cepa de *Ae. aegypti* de Santiago de Cuba, se registraron bajos niveles de resistencia a los OF fentión y malatión, sin embargo se observó niveles moderados de resistencia a los insecticidas temefos y pirimifosmetil, con altos niveles de resistencia a clorpirifos. En estudios posteriores se evaluó el nivel de resistencia a insecticidas OF, piretroides y un carbamato en dos cepas de *Ae. aegypti*, los resultados de los bioensayos en larvas mostraron una completa susceptibilidad a los insecticidas OF malatión, clorpirifos, pirimifosmetil y al carbamato propoxur. Sin embargo, se observó una elevada resistencia a temefos y fentión (Rodríguez *et al.*, 2004). No se registró resistencia a fenitrotión.

En la etapa adulta y en dosis recomendadas por la OMS, se observó resistencia a malatión, fenitrotión y propoxur, sin embargo, mejores resultados se obtuvieron con los piretroides, con porcentajes de mortalidad mayor al 90%. Por otra parte, en estudios posteriores con larvas y adultos con ocho cepas de *Ae. aegypti* (Venezuela, Perú, Costa Rica, Nicaragua, El Salvador, Panamá y Cuba).

Todas las cepas mostraron un comportamiento variable de la resistencia a seis insecticidas OF (temefos, malatión, fentiión, pirimifosmetil, fenitrotión y clorpirifos) y cuatro piretroides (deltametrina, lambdacialotrina, betacipermetrina y ciflutrina). La resistencia mostrada a los insecticidas en diferentes poblaciones de *Ae. aegypti* es un problema grave que enfrentan las operaciones de control, por lo que se recomiendan las estrategias de control integrado para ayudar a prevenir o retrasar la resistencia en larvas a temefos y en adultos la resistencia a los piretroides (Rodríguez *et al.*, 2007).

De los piretroides evaluados, en el estado adulto se observó moderada resistencia (verificación) a lambdacialotrina en Costa Rica, al resto de los piretroides se registró la mortalidad por encima de 94 % en todas las cepas. Es de destacar que a pesar del uso de piretroides en los programas de control de *Ae. aegypti*, estos continúan siendo efectivos para el control de poblaciones adultas, como es el caso de Panamá (Bisset *et al.*, 2003), El Salvador (Bisset *et al.*, 2009) y Cuba (Bisset *et al.*, 2011a). Perich *et al.*, 2003, observaron en Costa Rica, entre el 97% y el 100% de mortalidad de *Ae. aegypti* con el piretroide lambdacialotrina tanto en tratamientos con ULV en frío, como en tratamientos térmicos. Estudios previos desarrollados por Hemingway *et al.*, 1989, sobre el estado de la resistencia y/o susceptibilidad en poblaciones de *Ae. aegypti* a insecticidas piretroides, demostraron que *Ae. aegypti* desarrolló resistencia a los insecticidas piretroides en Puerto Rico (Mekuria *et al.*, 1991) y en Venezuela (Mazarri y Georghiou 1995).

Trabajos posteriores en Brasil demostraron la tendencia al incremento de la resistencia a cipermetrina en los años 2001 y 2003 (Cunha *et al.*, 2005). En cuanto al comportamiento de la resistencia y/o susceptibilidad de *Ae. aegypti* en la India y Asia, existen estudios que registran el estado de la resistencia y/o susceptibilidad en algunos países de estas regiones del mundo. Estudios realizados en la India por Mourya *et al.*, (1994), mostraron que las poblaciones de *Ae. aegypti* fueron resistentes al DDT y tenían alguna tolerancia a malatión en adultos y larvas. La resistencia cruzada mostrada con el DDT y la susceptibilidad observada en la cepa a malatión sugiere la existencia de una resistencia co-dominante (tipo metabólica). Posteriormente, en trabajos realizados también en Tailandia por Sunaiyana *et al.*, 2006 y Jirakanjanakit *et al.*, 2007a, con poblaciones de mosquitos *Ae. aegypti*, los resultados obtenidos indicaron que las poblaciones de *Ae. aegypti* fueron resistentes a permetrina y tolerantes a la deltametrina. Igualmente, en trabajos realizados por Jirakanjanakit *et al.*, 2007b, revelaron la resistencia de *Ae. aegypti* a los piretroides deltametrina y permetrina.

Ante la evidencia de los resultados obtenidos, se observa que la resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti* está muy extendida y sigue desarrollándose. Esto representa un serio problema para los programas destinados a la prevención y control del dengue en los países de la región. A la luz de esta problemática las medidas para controlar el *Ae. aegypti* están orientadas hacia el mejor uso de los insecticidas existentes, en particular mediante la combinación de aquellos que tienen diferentes modos de acción (Darriet *et al.*, 2010).

Otra alternativa ante la resistencia de *Ae. aegypti* a los insecticidas en uso, es la utilización de spinosad, un insecticida de origen natural. En estudios con *Ae. aegypti* resistente a insecticidas piretroides y OF, se realizó una evaluación operativa de la eficiencia de spinosad y pyriproxifeno solo y combinado. En la evaluación en condiciones simuladas la combinación de spinosad más pyriproxifeno se mantuvo activa contra larvas de *Ae. aegypti* durante ocho meses, en comparación con los tres meses usando spinosad solo y cinco meses usando solo pyriproxifeno. En condiciones de campo la actividad de esta combinación se mantuvo efectiva durante cuatro meses y medio (Bond *et al.*, 2004; Darriet y Corbel, 2006; Darriet *et al.*, 2010). El uso de pyriproxifeno, para el control larval de *Ae. aegypti* en tanques de almacenamiento de agua en Iquitos en Perú, a una dosis de ($CL_{50} = 0.012$ ppm) en el último estadio larval para evitar la emergencia del adulto, se obtuvo una alta mortalidad de larvas y pupas cinco meses después del tratamiento y con recambio de agua (Sihuincha M. *et al.*; 2005).

Por otra parte, considerando los resultados obtenidos con los insecticidas evaluados, se recomienda seguir utilizando los insecticidas piretroides y los organofosforados malatión, fentión y fenitrotión. Sin embargo, es necesaria la vigilancia periódica de la susceptibilidad de las poblaciones de *Ae. aegypti* de los municipios evaluados con el propósito de conservar, en las poblaciones, el carácter susceptible a estos insecticidas. Los insecticidas aplicados para el control de *Ae. aegypti* pueden seguir siendo utilizados en los municipios evaluados, pero depende de la susceptibilidad de los mosquitos en el área específica.

5.2 Determinación de los mecanismos de resistencia utilizando agentes sinérgicos y su frecuencia

El uso de los agentes sinérgicos DEF y PB demostraron que las EST y MO jugaron un papel importante en la resistencia detectada a los insecticidas OF temefos, pirimifosmetil y clorpirifos en las cepas de PANAMÁ y COSTA RICA. Berticat *et al.*, 2000, enunciaron que en el metabolismo de los insecticidas se involucran principalmente tres familias de enzimas: carboxilesterasas, GST y MO.

La actividad incrementada de EST ha sido previamente asociada con la resistencia a temefos en *Ae. aegypti* de Venezuela (Mazarri y Georghiou 1995), Trinidad (Vaugan *et al.*, 1998), Tailandia (Paeporn *et al.*, 2003, 2004 y Saelim *et al.*, 2005), Brasil (Marcoris *et al.*, 2003) y Cuba (Rodríguez *et al.*, 2007, Bisset *et al.*, 2011). Otros autores asociaron la resistencia a temefos con un incremento de EST, MO y GST (Rodríguez *et al.*, 2002; Braga *et al.*, 2005 y Boyer *et al.*, 2006).

Rodríguez *et al.*, 1999, en estudios realizados con *Ae. aegypti* de Santiago de Cuba, demostraron a través del uso del agente sinérgico, que las EST desempeñaron un papel importante en la resistencia a temefos y clorpirifos. En posteriores estudios realizados por Rodríguez *et al.*, 2004, con dos cepas de *Ae. aegypti*, se demostró que las MO y EST desempeñaron un papel importante en la resistencia a temefos y fenitión.

En el estado adulto se detectó alta resistencia a DDT y al piretroide lambdacialotrina se observó una cierta tolerancia, se asoció esta tolerancia posiblemente a la participación de mecanismos de acción metabólica relacionados con EST y MO, principalmente de EST.

Existen trabajos que han demostrado resistencia cruzada entre DDT y piretroides en *Ae. aegypti* debido al mecanismo de insensibilidad nerviosa asociado al gen Kdr (Chadwick *et al.*, 1977; McDonald y Wood 1979; Brengues *et al.*, 2003, Saavedra *et al.*, 2007). Hemingway *et al.*, 2004, indicaron que la desintoxicación de los piretroides por las MO ya sea sola o en combinación con las EST y GST, sugiere que las MO desempeñan un papel importante en la resistencia de las poblaciones de mosquitos a los insecticidas piretroides. Otros estudios por Kumar *et al.*, 2002, confirmaron el papel de estas enzimas como mecanismo primario en el desarrollo de la resistencia a deltametrina en larvas de *Ae. aegypti* a través de sucesivas selecciones en larvas con deltametrina más el agente sinergista PB. En *Aedes aegypti* de Cuba se demostró que la resistencia a piretroides estuvo determinada por los mecanismos de acción metabólica (Rodríguez *et al.*, 2007a).

Investigaciones realizadas por Berge *et al.*, 1998, relacionaron la resistencia a piretroides con mecanismos de acción metabólica, basados en cambios en la actividad de algunas enzimas como las MO en *D. melanogaster*, también estudios realizados por Vulule *et al.*, 1999 y Ding *et al.*, 2003 y 2005, indicaron que las enzimas EST y MO estaban asociadas con la resistencia a permetrina en *An.gambiae*.

En *An.gambiae* se demostró que la enzima GST fue la responsable del metabolismo del DDT (Ortelli *et al.*, 2003). Estudios posteriores demostraron que la GST y MO se sobre expresaron en la cepa de *An.gambiae* resistente a piretroides (Jean-Philippe *et al.*, 2005). En *Ae. aegypti* se encontró que la GST se sobre expresó en una cepa resistente a DDT y permetrina (Lumjuan *et al.*, 2005), sin embargo en estudios realizados, a través de ensayos bioquímicos, en esta especie en Tailandia no se encontró una asociación consistente entre la resistencia a piretroides y la actividad de GST (Pethuan *et al.*, 2007). Bisset *et al.*, 2007, en estudios con dos cepas de *Ae. aegypti* de Perú (TRUJILLO y TUMBES) utilizando los agentes sinergistas PB y DEF, demostraron que las enzimas EST y MO desempeñaron un papel importante en la resistencia observada a OF en larvas de la provincia TRUJILLO.

5.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida para la visualización de las esterasas en cepas de *Ae. aegypti*

En la electroforesis en gel de poliacrilamida se observó una banda fuertemente teñida, indicando la presencia de una elevada actividad de esterasa, observándose con mayor intensidad en las cepas que resultaron más resistentes a temefos (COSTA RICA y PANAMÁ, seguido por NICARAGUA y con muy baja tinción en la cepa susceptible ROCKEFELLER. Esta banda de EST de un Rf de 0,78 fue previamente clasificada en Cuba en una cepa de *A. aegypti* de Santiago de Cuba, colectada en 1997, como Est-A4 (Rodríguez *et al.*, 1999).

Esta esterasa específica se ha observado asociada a la resistencia a temefos, no solamente en cepas de *A. aegypti* de Cuba (Rodríguez *et al.*, 2002, 2004; Bisset *et al.*, 2004; 2011, sino de otros países de América Latina (Rodríguez *et al.*, 2007; Bisset *et al.*, 2007, 2009). Recientemente se caracterizó parcialmente la Est-A4 y resultó de un peso molecular de 58 kDa (Rodríguez *et al.*, 2012).

El uso extensivo de insecticidas OF y carbamatos para controlar las plagas de insectos ha conducido a la producción de enzimas asociadas con la resistencia. A través de estudios previos se ha logrado detectar y comprobar que entre los mecanismos de resistencias, las EST es un grupo heterogéneo de enzimas que juegan un papel importantes en el desarrollo de la resistencia (Hodgson y Motoyama, 1984). Este mecanismo se manifiesta a través de la relación existente entre los niveles elevados de EST presentes en poblaciones de mosquitos sometidos a una presión selectiva con insecticidas OF o carbamatos principalmente y en un menor grado con insecticidas piretroides, generando de esta forma poblaciones resistentes a estos insecticidas (Fournier y Mutero, 1994 y Berticat *et al.*, 2000).

Según Georghiou y Pasteur, 1978, la correlación entre la actividad de las EST y la resistencia a los compuestos OF está documentada en un gran número de insectos. Resultados de estudios previos realizados por Field *et al.*, 1984, clasificó como esterasa A6 la encontrada en adultos de *Ae. aegypti* procedentes de San Juan de Puerto Rico, con un valor de movilidad relativa de 1,00.

Mazarri, (1994), en una cepa de *Ae. aegypti* encontraron una banda de EST cuya movilidad relativa fue de 0.61, la cual se observó en el 91% de los individuos, esta fue clasificada como Est-A5 y no se observó incrementada en la cepa susceptible. Rodríguez *et al.*, 1999, en estudios realizados con *Ae. aegypti* de Santiago de Cuba, detectaron la presencia de una elevada actividad de EST asociada con la resistencia al temefos. A la banda oscura detectada se nombró como Est-A4 y tuvo una movilidad relativa de 0.78. La resistencia a los piretroides pudo estar asociada con un mecanismo del GST y no a EST. Liu *et al.*, 2000, en estudios con larvas de *Cx. pipiens* y *Ae. aegypti*, compararon la tolerancia a OF y carbamatos. Ambas poblaciones resultaron resistentes a los OF pero no a los carbamatos. Por electroforesis se observó que la resistencia a OF estaba ligada a una elevada actividad de EST.

Pasteur *et al.*, 1989 y Jayawardena *et al.*, 1994, expresaron que las poblaciones de mosquitos del complejo *Cx. pipiens*, que han estado sometidos a una presión selectiva con insecticidas OF han registrado en casi todo el mundo, mecanismos de resistencia asociados a niveles elevados de EST. La mayoría de estos mecanismos, involucran la co-evolución de dos EST, la EST-A2 y EST-B2 (Yebakima *et al.*, 1995). El incremento de estas enzimas puede producir resistencia mediante la hidrólisis o el secuestro del insecticida (Motoyama *et al.*, 1984). Según Rooker *et al.*, (1996), en estudios con mosquitos *Cx. pipiens*, la resistencia a los insecticidas OF a menudo es resultado del incremento de la detoxificación por dos tipos de EST, A y B, que están estrechamente relacionadas. La sobre expresión de EST B, hasta el presente han sido investigadas (B1, B2, B4, B5 y B6) relacionadas a una amplificación de genes.

En mosquitos con sobre expresión de EST A2 y B2, el nivel de amplificación de la esterasa A es igual al de la esterasa B que indica que los genes son co-amplificados. Esto indica que la sobreproducción de las EST A puede lograrse a lo largo de dos diferentes mecanismos: la amplificación de genes y un mecanismo regulatorio, la naturaleza. Severini *et al.*, 1997, en estudios con *Cx. pipiens* llegó a detectar mediante electroforesis con geles de almidón una sobre producción de EST no específicas A1-B1, A2-B2 y A4-B4 o A5-B5, originando resistencia múltiple a insecticidas OF. Siendo el primer registro de resistencia mediada por esterasa A5-B5 en Europa continental. Karunaratne (1999), en estudios de resistencia en poblaciones de *An. culicifacies* y *An. subpictus* de Sri Lanka con los insecticidas malatión, clorpirifos, propoxur y permetrina, reveló en la electroforesis una elevada actividad de esterasa, con alta afinidad a los insecticidas OF presente en cada una de las especie.

En estudios realizados por Bisset *et al.*, 2001, con cinco cepas de *Ae. aegypti*, una cepa cubana y cuatro cepas venezolanas, mediante electroforesis con geles de poliacrilamida, se observó una banda altamente teñida en todas las cepas con un valor de $R_f = 0,78$; que fue nombrada como Est-A4 y no fue vista en la cepa susceptible de referencia. Según Hawkes y Hemingway, 2002, la resistencia a los insecticidas OF en poblaciones de mosquitos de *Cx. quinquefasciatus* se debió principalmente a la amplificación y sobre expresión de EST no específicas. Según Souza-Polezzi y Bicudo, 2005, producto de la nomenclatura de estas EST se dificulta la comparación entre ellas.

Recientemente se asoció la aparición de nuevas bandas de EST asociadas con la resistencia a insecticidas en Brasil, comparando los tipos de bandas y su frecuencia entre los años 2000 y 2005. Considerando lo antes expresado, se puede decir, que la variabilidad del mecanismo enzimático observado en las poblaciones de *Ae. aegypti* bajo estudio, estuvo relacionado con la presión selectiva ejercida históricamente contra cada una de estas cepas de *Ae. aegypti* y la intensidad de la exposición debido al uso de insecticidas domésticos y aplicados por los programas de salud pública.

Estos resultados son importantes para el desarrollo de estrategias adecuadas que pueden ser utilizadas para facilitar el uso correcto de insecticidas y un control efectivo del vector con los insecticidas actualmente disponibles para su uso en los programas de salud pública. La evaluación de los insecticidas aplicados contra poblaciones de *Ae. aegypti*, se llevó a cabo como una respuesta a la gran necesidad que han expresado los programas de Control de vectores de la región centroamericana de conocer el estado de la susceptibilidad del vector en zonas con alto riesgo de transmisión de dengue. Los resultados obtenidos en este estudio, contribuirán al fortalecimiento de las medidas de intervención contra las poblaciones de *Ae. aegypti*, el uso adecuado de insecticidas y el manejo de la resistencia en estos países. Es necesario el seguimiento de la vigilancia periódica de la susceptibilidad de las poblaciones de *Ae. aegypti* de los municipios evaluados con el objetivo de facilitar la detección del momento oportuno para realizar cambios en los tipos de insecticidas para conservar en las poblaciones de mosquitos el carácter susceptible a estos insecticidas.

Se recomienda, considerando los resultados obtenidos, seguir utilizando los insecticidas aplicados por parte del programa de control de vectores para el control de *Ae. aegypti* en los municipios evaluados, su aplicación dependerá de la susceptibilidad de los mosquitos en el área específica. Igualmente, el desarrollo y la implementación de un programa de monitoreo de resistencia para la vigilancia periódica de la susceptibilidad y/o resistencia de las poblaciones de *Ae. aegypti* a los insecticidas empleados. El monitoreo de la susceptibilidad a los insecticidas debe ser determinada dependiendo de su mayor interés entomológico y riesgo epidemiológico de transmisión para cada una de las áreas, para así seleccionar el insecticida más adecuado contra las poblaciones de *Ae. aegypti*.

CAPITULO

6.

CONCLUSIONES

CAPITULO 6. CONCLUSIONES

1. La alta resistencia al larvicida temefos, detectada en las cepas evaluadas es una limitante en las operaciones de control de *Ae. aegypti*.
2. A pesar de que el uso de DDT ha sido discontinuado, todas las cepas mostraron resistencia a este organoclorado, sin embargo pocas cepas mostraron resistencia a piretroides y ninguna al organofosforado clorpirifos, adulticidas en uso en la actualidad.
3. Los mecanismos de acción metabólica de EST y MO jugaron un papel importante en la resistencia a insecticidas OF en las larvas de las cepas de *Ae. aegypti* evaluadas, no así las enzimas GST y AchEr.
4. Se asoció la EST A4, como principal mecanismo de resistencia a temefos en las tres cepas de *Ae. aegypti* evaluadas.

CAPITULO 7. RECOMENDACIONES

CAPITULO 7. RECOMENDACIONES

1. Establecer estrategias de control integrado de vectores con la utilización de otros productos, aprobados por la OMS, con el propósito de evitar el desarrollo de la resistencia a temefos.
2. Evaluar en condiciones de campo los insecticidas clorpirifos y cipermetrina, como candidatos potenciales para ser utilizados en los programas de control de vectores de los países de América Central.
3. Realizar una permanente vigilancia y monitoreo de la resistencia en *Ae. aegypti* a los insecticidas en uso y otros alternativos por parte de los programas de control de vectores.
4. Monitorear en poblaciones de *Ae. aegypti* la frecuencia de los mecanismos metabólicos de resistencia basados en la alta actividad de EST y MO como un indicador de la resistencia a los insecticidas OF.
5. Caracterizar molecularmente los genes relacionadas con las enzimas de acción metabólica en *Ae. aegypti* de los países estudiados.

CAPITULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPITULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abbott WS.** A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J Economic Entomol.* 1925; 18:265-7.
2. **Ahmad M, Arif MI, Ahmad Z.** Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to new chemistries in Pakistan. *Crop Protection.* 2003; 22:539-44
3. **Aldridge WN.** Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. *Biochem J.* 1950;46:451-60
4. **Alzogaray RA.** Aspectos moleculares de la resistencia a insecticidas. *Acta Bioq Clin Latinoam.* 1998; 32:387-95
5. **Asih PB, Syahrani L, Rozi IE, Pratama NR, Marantina SS, Arsyad DS, et al.** Existence of the *rdl* mutant alleles among the *Anopheles* malaria vector in Indonesia. *Malar J.* 2012; 25:11-57.
6. **Beach RF, Cordon-Rosales C, Brogdon WG.** Detoxifying esterase may limit the use of pyrethroids for malaria vector control in the Americas. *Parasitol Today.* 1989; 5:326-7.
7. **Beaty BJ.** Genetic manipulation of vectors: A potential novel approach for control of vector-borne diseases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:10295-7.

8. **Berge JB, Feyereisen R, Amichot M.** Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci.* 1998; 353:1701-5.
9. **Berticat C, Bouquien G, Raymond M, Chevillon C.** Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet Res.* 2002; 79:41-7.
10. **Beserra EB, Fernandes CR, de Queiroga Mde F, de Castro FP.** Resistance of *Aedes aegypti* (L.) (*Diptera: Culicidae*) populations to organophosphates temephos in the Paraíba State, Brazil. *Neotrop Entomol.* 2007; 36:303-7
11. **Biber PA, Duenas JR, Almeida FL, Gardenal CN, Almiron WR.** Laboratory evaluation of susceptibility of natural subpopulations of *Aedes aegypti* larvae to temephos. *J Am Mosq Control Assoc.* 2006; 22:408-11.
12. **Bisset JA, Navarro A, Marquetti MC.** La abundancia larval de mosquitos urbanos durante la campaña de erradicación de *Aedes aegypti* y del Dengue en Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 1985; 37:3-7.
13. **Bisset JA, Rodríguez MM, Díaz C, Ortiz E, Marquetti MC.** The mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* (*Diptera: Culicidae*) from Cuba. *Bull Entomol Res.* 1990; 80:245-50.
14. **Bisset JA, Rodríguez M, Díaz D, Soca A.** Evolución de la resistencia a insecticidas en *Culex quinquefasciatus* (*Diptera: Culicidae*) en un área de La Habana. *Rev Cubana Med Trop.* 2000; 52:180-5.

15. **Bisset JA, Rodríguez MM, Díaz C, Soca A.** Characterization of resistance to organophosphate insecticides, carbamates, and pyrethroids in *Culex quinquefasciatus* from the State of Miranda. *Rev Cubana Med Trop.* 1999; 51:89-94.
16. **Bisset JA, Rodríguez MM, Molina D, Díaz C, Soca LA.** High esterases as mechanism of resistance to organophosphate insecticides in *Aedes aegypti* strains. *Rev Cubana Med Trop.* 2001; 53:37-43.
17. **Bisset JA, Rodríguez MM, Caceres L.** Levels of resistance to insecticides and their mechanisms in 2 strains of *Aedes aegypti* from Panamá. *Rev Cubana Med Trop.* 2003; 55:191-5
18. **Bisset JA, Rodríguez MM, Fernández D, Pérez O.** 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 Cubana Med Trop.* 2004; 56:61-66.
19. **Bisset JA, Blanco S, Braga I, Coto H, Massuh H, Moncayo A, et al.** Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. Fundación Mundo Sano/Red Latinoamericana de Control de Vectores. Ciudad de Iguazú, Argentina. *Revista Mundo Sano.* 2005; 15 pag.
20. **Bisset JA, Rodríguez MM, Fernández D, Palomino M.** Resistencia a insecticidas y mecanismos de resistencia en *Aedes aegypti* (*Diptera: Culicidae*) de dos provincias del Perú. *Rev Cubana Med Trop.* 2007; 59:202-
21. **Bisset JA, Rodríguez MM, San Martín JL, Romero E, Montoya R.** Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.* 2009; 26:229-34.

22. **Bisset JA, Rodríguez MM, Ricardo Y, Perez O, Moya M, Montada D, et al.**
Efectividad de formulaciones de insecticidas para el control de *Aedes aegypti* de Ciudad de la Habana, Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2011; 63:166-70
23. **Bisset JA, Rodríguez MM, Ricardo Y, Ranson H, Perez O.** Temephos resistance and esterase activity in *Aedes aegypti* (*Diptera: Culicidae*) from Havana city increased dramatically between 2006 and 2008. *Med Vet Entomol.* 2011; 25:233–239.
24. **Bisset JA, Marín R, Rodríguez MM, Severson DW, Ricardo Y, French L, Díaz M, Pérez O.** Insecticide Resistance in Two *Aedes aegypti* (*Diptera: Culicidae*) Strains from Costa Rica *Journal of Medical Entomology.* 2013; 50(2):352-361.
25. **Bloomquist JR, Miller TA.** Sodium channel neurotoxin as probes of the knockdown resistance mechanism. *Neurotoxicology.* 1986; 7:217–24.
26. **Bloomquist JR.** Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol.* 1996; 41:163-90.
27. **Bond JG, Marina CF, Williams T.** The naturally derived insecticide spinosad is highly toxic to *Aedes* and *Anopheles* mosquito larvae. *Med Vet Entomol.* 2004; 18:50-6.
28. **Booth JE, Boyland E, Sim R.** An Ezyme from rat liver catalyzing conjugation with glutathione. *Biochem J.* 1961; 79:516–24.
29. **Bourguet D, Capela R, Raymond M.** An insensitive acetylcholinesterase in *Culex pipiens* (*Diptera: Culicidae*) from Portugal. *J Economic Entomol.* 1996; 89:1060-6.

30. **Boyer S, David JP, Rev D, Lemperiere G, Ravanel P.** Response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae to three xenobiotic exposures: larval tolerance and detoxifying activities. *Environ Toxicol Chem.* 2006; 25:470-6.
31. **Braga IA, Lima JB, Soares S, Valle D.** *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the state of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99:199-203.
32. **Braga IA, Mello CB, Montella IR, Lima JB, Martins Ade, Medeiros PF, et al.** Effectiveness of methoprene, and insect growth regulator, against temephos resistant *Aedes aegypti* populations from different Brazilian localities, under laboratory conditions. *J Med Entomol.* 2005; 42:830-7.
33. **Brattsten LB, Holyoke CW, Leeper JR, Raffa KF.** Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research. *Science.* 1986; 231:1255-60.
34. **Breud TP.** Insecticide resistance in Florida mosquitoes. *J Fl Mosq Control Assoc.* 1993; 4:14-21.
35. **Brengues C, Hawkes N, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, et al.** Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Veter Entomol.* 2003; 17:87-94.
36. **Brogdon WG, Dickinson CM.** A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in a high pressure liquid chromatography eluate fraction. *Anal Biochem.* 1983; 131:499-503.
37. **Brown AW.** Insecticide resistance in mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* 1986; 2:123-40.

38. **Busvine, JR.** The present status of insecticide resistance. *Bull World Helth Org.* 1963; 29:31-40.
39. **Callaghan A.** Genetic and biochemical studies of elevated esterases electromorph in *Culex pipiens*. 1989. PhD. Thesis. Dept. of Medical Parasitology. University of London.
40. **Campos J, Andrade CF.** Larval susceptibility to chemical insecticides of two *Aedes aegypti* populations. *Rev Saude Pub.* 2001; 35:232-6.
41. **Chadwick PR, Invest JF, Bowron MJ.** An example of cross-resistance to pyrethroids in DDT-resistant *Aedes aegypti*. *Pestic Sci.* 1977; 15:112-20.
42. **Chareonviriyaphap T, Aum-aung B, Ratanatham S.** Current insecticide resistance patterns in mosquito vectors in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1999a; 30:184-94.
43. **Chareonviriyaphap T, Prabaripai A, Bangs MJ.** Exit-repellency of deltamethrin on the malaria vectors, *Anopheles minimus*, *Anopheles dirus*, *Anopheles swadiwongporni*, and *Anopheles maculates*, in Thailand. *J Am Mosq Control Assoc.* 2004; 20:45-54.
44. **Charlmers AE, Miller TA, Olsen RW.** Deltamethrin: a neurophysiological study of the site of action. *Pestic Biochem Physiol.* 1987; 27:36-41.
45. **Charpentier A, Fournier D.** Acetylcholinesterase amount in *Drosophila melanogaster* in relation to insecticide resistance. *Pest Biochem Physiol.* 2001; 70:100-7.

46. **Chavasse DC, Yap HH.** Chemical methods for the control of vectors and pest of public health importance. Document WHO/CTD/WHOPES/97.2. World Health Organization. 1997; Geneva 128.
47. **Chen CD, Nazni WA, Lee HL, Sofian-Azirun M.** Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to temephos in four study sites in Kuala Lumpur City Center and Selangor State, Malaysia. Trop Biomed. 2005; 22:207-16.
48. **Chen CD, Nazni WA, Lee HL, Sofian-Azirun M.** Weekly variation on susceptibility status of Aedes mosquitoes against temephos in Selangor, Malaysia. Trop Biomed. 2005;22:195-206.
49. **Chen YP, Sudderuddin KI.** Toxicological studies of insecticides on *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (L.). J Trop Med Public Health. 1978; 9:378-83.
50. **Clark AG, Shamaan NA, Dauterman WC, Hayaoka T.** Characterization of multiple glutathione transferases from the housefly, *Musca domestica* (L). Pestic. Biochem. Physiol. 1984; 22:51-9
51. **Cochran DG.** Monitoring for insecticide resistance in field collected strains of the German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*). J Econ Entomol. 1989; 82:336-41.
52. **Coleman M, Sharp B, Seocharan I, Hemingway J.** Developing an evidence-based decision support system for rational insecticide choice in the control of African malaria vectors. J Med Entomol. 2006; 43:663-8.
53. **Cui F, Raymond M, Qiao CL.** Insecticide resistance in vector mosquitoes in China. Pest Manag Sci. 2006; 62:1013-22.

54. **Cunha da MP, Lima JBP, Brogdon WG, Moya GE, Valle D.** Monitoring of resistance of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (*Diptera: Culicidae*) populations collected between 2001 and 2003. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100:441-4.
55. **Curtis CF, Pasteur N.** Organophosphate resistance in vector populations of the complex *Culex pipiens* (L.) (*Diptera, Culicidae*). Bull Entomol Res. 1981; 71:153–61.
56. **Curtis CF.** Theoretical models of the use of insecticide mixtures for the management of resistance. Bull. Entomol. Res. 1985;75:259-65
57. **Curtis CF, Hill N, Kasin SH.** Are there effective resistance management strategies for vectors of human diseases? Biol J Linn Soc. 1993; 48:3-18.
58. **Darriet F and Corbel V.** Laboratory evaluation of pyriproxyfen and spinosad, alone and in combination, against *Aedes aegypti* larvae. J Med Entomol. 2006; 43:1190-4.
59. **Darriet F, Marcombe S, Etienne M, Yebakima A, Agnew P,** Field evaluation of pyriproxyfen and spinosad mixture for the control of insecticide resistant *Aedes aegypti* in Martinique (French West Indies). Parasit Vectors. 2010; 16:83-8.
60. **Díaz C, Calvo E, Rodríguez MM, Bisset JA, Fresneda M.** Determinación de la actividad de glutatión-S-transferasa en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Cuba y otros países de América Latina. Rev Cubana Med Trop. 2004; 56:111-6.

61. **Ding Y, Hawkes N, Meredith J, Eggleston P, Hemingway J, Ranson H.** Characterization of the promoters of Epsilon glutathione transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* and their response to oxidative stress. *Biochem J.* 2005; 1:879-88.
62. **Ding Y, Ortelli F, Rossiter LC, Hemingway J, Ranson H.** The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics.* 2003; 4:35-7.
63. **Dusfour I, Thalmensy V, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Girod R.** Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106:346-52.
64. **Echevers G, Lima M, Miranda FR, Calheiros LB.** Nevulización terrestre con malatión a volumen ultrarreducido (ULV) en Panamá. *Bull Pan Am Helalth Org.* 1975; 78:405-12.
65. **Enayati AA, Ranson H, Hemingway J.** Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol.* 2005; 14:3-8.
66. **FAO.** Report of the first session of the FAO Working Parry Experts on Resistance of Pest to Pesticides. FAO, Rome. 1967.
67. **Farnham AW, Sawicki RM.** Development of resistance to pyrethroids in insects resistant to other insecticides. *Pestic Sci.* 1976; 7:278-82.
68. **Ferrer DA, Martínez J, Marruecos L, Nogué S, Nolla J.** *Toxicología Clínica.* Springer-Verlag Ibérica, Barcelona. 1993; 233-53.

69. **Fersht A.** Measurement and Magnitude of enzymatic rate constants chapter, In: Enzyme Structure and mechanism. Copyright W. H. Freeman and company, New York. 1985.2nd edition: 121-4.
70. **French-Constant RH, Steichen JC, Shotkoski C.** Polymerase chain reaction diagnostic for cyclodiene insecticides resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. Med Vet Entomol. 1994; 8:99–100.
71. **French-Constant RH.** Which came first: insecticides or resistance? Trends Genet. 2007; 23:1-4
72. **Field WN, Hitchen JM, Rees AT.** Esterases activity in strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) tolerant and susceptible to the organophosphate insecticide malathion. J Med Entomol. 1984; 21:412-8.
73. **Finny D.** Probit analysis. Cambridge: University Press. 1971;pp 400
74. **Flores AE, Grajales JS, Salas IF, Garcia GP, Becerra MH, Lozano S, et al.** Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. J Am Mosq Control Assoc. 2006; 22:672-7.
75. **Flores AE, Grajales JS, Salas IF, Garcia GP, Becerra MH, Lozano S, et al.** Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. J Am Mosq Control Assoc. 2006; 22:672-7.
76. **Fonseca-González I, Quiñones ML, Lenhart A, Brogdon WG.** Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. Pest Manag Sci. 2011; 67:430-7.
77. **Fournier D, Mutero A.** Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. Comp Biochem Physiol 1994;108c:19-31.

78. **Fournier D, Bride JM, Hoffmann F, Karch F.** Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticide. *Biol Chem.* 1992; 267:14270-4.
79. **Gayave E, Chevillon C, Lenormand T, Marquine M, Raymond M.** Dissecting the cost of insecticide resistance genes during the overwintering period of the mosquito *Culex pippiens*. *Heredity.* 2001; 87:441-8.
80. **Georghiou GP.** The evolution of resistance to pesticides. *Ann Rev Ecol Syst.* 1972; 3:133-68
81. **Georghiou GP, Breeland SD, Arinatham V.** Seasonal escalation of organophosphorous and carbamate resistance in *Anopheles albimanus* by agricultural spray. *Wld. Hlth Org.* 1973; VBC/IRG/74.26
82. **Georghiou GP, Pasteur N.** Electrophoretic esterase patterns in insecticide resistant and susceptible mosquitoes. *J Econ Entomol.* 1978; 71:201-5.
83. **Georghiou GP.** Insecticide resistance and prospects for its management. *Residue Rev.* 1980a; 76:131-45.
84. **Georghiou GP.** Implication of the development of resistance to pesticides: basic principles and consideration of countermeasures. In: *Proceeding of seminar and workshop, Barbados. Pest and Pesticide management in the Caribbean.* 1980b; 116-29.
85. **Georghiou GP, Taylor CE.** Factors influencing the evolution of resistance. In: *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management, Committee on Strategies for the Management of Pesticide Resistant Pest Populations.* National Academy Press, Washington DC. 1986;157-69

86. **Georghiou GP.** The magnitude of the resistance problem. Pp.14-43. In: Pesticide resistance: strategies and tactics for management. National Academy Press, Washington DC. 1986.
87. **Georghiou GP, Wirth M, Tran H, Saume F, Knudsen AB.** Potential for organophosphate resistance in *Aedes aegypti* in the Caribbean area and neighbouring countries. J Med Entomol. 1987; 24:290-4.
88. **Georghiou GP, Lagunes-Tejada A.** The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. An index of cases reported through 1989. FAO, Rome.
89. **Georgiou GP and Lagunas-Tejada A.** The occurrence of resistance to pesticides in arthropods. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome 1991; pp 318.
90. **Gratz NG.** Emergency control of *Aedes aegypti* as a disease vector in urban areas. J Am Mosq Control Assoc. 1991; 7:353-65.
91. **Gubler D.** Dengue/ dengue hemorrhagic fever in the America: Prospects for the year 2000. En: Dengue, a worldwide problem, a common strategy. Halstead and Gómez, Mexico DF. 1992; pp 329.
92. **Guedes RNC, Kambhampati S, Dover BA, Zhu KY.** Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Rhyzopertha dominica* (Coleóptera: Bostrichidae) populations from the United States and Brazil. Bull Ent Res. 1997; 87:581-6.
93. **Hamdan H, Sofian-Azirun M, Nazni WA, Lee HL.** Insecticide resistance development in *Culex quinquefasciatus* (Say), *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) larvae against malathion, permethrin and temephos. Trop Biomed. 2005; 22:45-52.

94. **Hamdan H, Sofian-Azirun M, Nazni WA, Lee HL.** Insecticide resistance development in *Culex quinquefasciatus* (Say), *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) larvae against malathion, permethrin and temephos. Trop Biomed. 2005; 22:45-52.
95. **Hawkes NJ, Hemingway J.** Analysis of the promoters for the β -esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. Biochim Biophys Acta. 2002; 1574:51-62.
96. **Hemingway J, Karunaratne SHPP.** Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. Med Vet Entomol. 1998; 2:1-12.
97. **Hemingway J, Boddington RG, Harris J.** Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (*Diptera: Culicidae*) from Puerto Rico. Bull Entomol Res. 1989; 79:123-30.
98. **Hemingway J, Callaghan A, Amin AM.** Mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* from Saudi Arabia. Med Vet Entomol. 1990;4:275-82.
99. **Hemingway J, Penilla RP, Rodríguez AD, James BM, Edge W, Rogers H, et al.** Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. A large-scale field trial in southern Mexico. Pestic Sci. 1997; 51:375-82.
100. **Hemingway J.** Insecticide resistance in malaria vectors: a new approach to an old subject. J Parasitology. 1999; 41:315-8.
101. **Hemingway J, Ranson H.** Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annu Rev Entomol 2000; 45:371-91.

102. **Hemingway J, Hawkes NJ, Mc Carroll L, Ranson H.** The molecular basis of insecticide resistance in mosquitos. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004; 34:653-65.
103. **Henao S, Corey G.** Plaguicidas OF y carbámicos. Serie Vigilancia 2. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. 1986.
104. **Heymann E.** Carboxylesterases and amidases. In "Enzymatic Basis of Detoxication". *Biochem J.* 1980; 132:519-26.
105. **Hodgson E and Motoyama N.** Biochemical mechanisms of resistance to insecticides. *Ciba Found Symp.* 1984; 102:167-89.
106. **Hodjati M H and Curtis, C F.** Evaluation of the effect of mosquito age and prior exposure to insecticide on pyrethroid tolerance in *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Bull Ent Research.* 1999; 89:239-37.
107. **Hosie AM, Aronstein K, Sattelle DB, Ffrench-Constant RH.** Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends Neurosci.* 1997; 20:578–83.
108. **Huang F, Subramanyam B & TOEWS MD.** Susceptibility of laboratory and field strains of four stored-product insect species to spinosad. *J Econ Entomol.* 2004; 97:2154-9.
109. **Jayawardena KGI, Karunaratue SHP, Ketterman AJ. & Hemingway J.** Determination of the role of elevated B2 esterase in insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from studies on the purified enzyme. *Bull Entomol Res.* 1994; 84:39-44.

110. **Jean-Philippe D, Strode C, Vontas J, Nikou D, Vaughan A, Pignatelli PM, et al.** The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102:4080-4.
111. **Jirakanjanakit N, Rongnoparut P, Saentharatip S, Chareonvirivaphap T, Duchon S, Bellec C, et al.** Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005. J Econ Entomol. 2007; 100:545-50.
112. **Jirakanjanakit N, Saentharatip S, Rongnoparut P, Duchon S, Bellec C, Yoksan S.** Trend of temephos resistance in *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes in Thailand during 2003-2005. Environ Entomol. 2007; 36:506-11.
113. **Karunaratne SH.** Insecticide cross-resistance spectra and underlying resistance mechanisms of Sri Lankan anopheline vectors of malaria. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1999; 30:460-9.
114. **Kostaropoulos I, Papadopoulos AI, Metaxakis A, Boukouvala E, Papadopoulou-Mourkidou E.** Glutathione S-transferase in the defense against pyrethroids in insects. Insect Biochem Mol Biol. 2001; 31:313-9.
115. **Kroeger A, Lenhart A, Ochoa M, Villegas E, Levy M, Alexander N, et al.** Effective control of dengue vectors with curtains and water container covers treated with insecticide in Mexico and Venezuela: cluster randomoized trials. BMJ. 2006; 332:1247-52.

116. **Kumar S, Thomas A, Pillai MK.** Involvement of mono-oxygenases as a major mechanism of deltamethrin-resistance in larvae of three species of mosquitoes. *Indian J Exp Biol.* 1991; 29:379-84.
117. **Kumar S, Thomas A, Sahgal A, Verma A, Samuel T, Pillai MK.** Effect of the synergist, piperonyl butoxide, on the development of deltamethrin resistance in yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Arch Insect Biochem Physiol.* 2002; 50:1-8.
118. **Lalah JO, Chien CI, Motayama N and Dauterman WC.** Glutathione-S-Transferases: α -Naphthyl acetate activity and possible role in insecticide resistance. *J Econ Ent.* 1995; 88:768-70.
119. **Lehane MJ.** Biology and blood – sucking insect. Harper Collins Academic (eds). Hammersmith. London UK, 1991; 288 pages.
120. **Lima JB, Da-Cunha MO, Da Silva RC, Galardo AK, Soares Sda, Braga IA, et al.** Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. *Am. J. Trop Med Hyg.* 2003; 68:329-33.
121. **Lima EP, De Oliveira Filho AM, de Oliveira Lima JW, Ramos Júnior AN, de Góes Cavalcanti LP, Pontes RJ.** *Aedes aegypti* resistance to temephos of Ceará State. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39:259-63.
122. **Lima EP, Paiva MH, de Araújo AP, da Silva EV, da Silva UM, de Oliveira LN, et al.** Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasit Vectors.* 2011; 12:4-5.

123. **Liu H, Cupp EW, Micher KM, Guo A and Liu N.** Insecticide resistance and cross-resistance in Alabama and Florida strains of *Culex quinquefasciatus* (S.). J Med Entomol. 2004a; 41:408-13.
124. **Liu JE, Qiao CL, Chen LP, Sun ZQ.** Amplified esterases B1 and A2-B2 in field populations of *Culex pipiens* from China. J Am Mosq Control Assoc. 2000; 16:143-7.
125. **Llinás GA, Seccasini E, Gardenal CN, Licastro S.** Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105:113-6.
126. **Lumjuan N, McCarrol L, Prapanthadara L, Hemingway J, Ranson H.** Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol. 2005; 35:861-71.
127. **Lumjuan N, Rajatileka S, Changsom D, Wicheer J, Leelapat P, Prapanthadara, et al.** The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. Insect Biochem Mol Biol. 2011; 41:203-9.
128. **Mallet J.** The evolution of insecticide resistance: have the insects won? Trends in Ecology and Evolution 1989; 4:336-40.
129. **Marcombe S, Darriet F, Agnew P, Etienne M, Yp-Tcha MM, Yébakima A, Corbel V.** Field efficacy of new larvicide products for control of multi-resistant *Aedes aegypti* populations in Martinique (French West Indies). Am J Trop Med Hyg. 2011; 84:118-26.

130. **Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, et al.** Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics*. 2009; 26:10-494.
131. **Marcombe S, Mathieu RB, Pocquet N, Riaz MA, Poupardin R, Sélior S, et al.** Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PLoS One*. 2012; 7:309-89.
132. **Martínez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, et al.** Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (Kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae s.d.* *Insect Molec Biology*. 1998; 7:179-84.
133. **Mazarri MB.** Insecticide resistance in two field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Venezuela. Tesis de Masters. University of Riverside, California. 1994; 119 pages.
134. **Mazarri MB and Georghiou GP.** Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc*. 1995; 11:315-22.
135. **McAbee RD, Kang KD, Stanich MA, Christiansen JA, Wheelock CE, Inman, AD. et al.** Hammock, B.D. and Cornel, A. J. Pyrethroid tolerance in *Culex pipiens pipiens var molestus* from Marin County, California. *Pest Manag Sci*. 2004; 60:359-68.

136. **McDonald AE, Wood RJ.** Mechanisms of DDT resistance in larvae of the mosquito *Aedes aegypti* (L.). Pestic Sci. 1979; 10:375-82.
137. **Mekuria Y , Gwinn TA, Williams DC, Tidwell MA.** Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* from Santo Domingo, Dominican Republic. J Am Mosq Control Assoc. 1991; 7:69-72.
138. **Melo-Santos MA , Varjal-Melo JJ, Araújo AP, Gomes TC, Paiva MH, Regis LN, et al.** Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. Acta Trop. 2009; 113:180-9.
139. **Melo-Santos MA, Varjal-Melo JJ, Araújo AP, Gomes TC, Paiva MH, Regis LN.** Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. Acta Trop. 2010; 113:180-9.
140. **Menozzi P, Shi MA, Lougarre A, Tang ZH, Fournier D.** Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in *Drosophila melanogaster* populations. BMC Evol Biol. 2004; 5:4-4.
141. **Milani R.** Comportamento mendeliano della resistenza alla azione abbattente del DDT: correlazione tra abbattimento e mortalità in *Musca domestica*. Riv. Parasitol. 1954; 15:513-42.
142. **Miller TA.** Mechanisms of Resistance to Pyrethroid insecticides. Parasitology Today. 1988; 7:8-12.

143. [MINSA] **Ministerio de Salud de Panamá**. Departamento de Vigilancia epidemiológica. [Fecha de consulta: 10 de febrero de 2012]. Disponible en: <http://www.minsa.gob.pa>.
- 144.
145. **Montella IR, Martins AJ, Viana-Medeiros PF, Lima JB, Braga IA, Valle D**. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 77:467-77
146. **Morton RA**. Evolution of Drosophila insecticide resistance. *Genome*.1993;36:1-7.
147. **Motoyama N, Kao LR, Dauterman WC**. Dual role of esterases in insecticide resistance in green rice leaf hopper. *Pestic Biochem Physiol*. 1984; 21:139-47.
148. **Mourya DT, Gokhale MD, Mishra AC**. Biochemical basis of DDT-resistance in *Aedes aegypti* population from a dengue affected area in Shahjahanpur city. *Indian J Med Res*. 1994; 99:212-5.
149. **Mullin, Christopher A and Scout, Jeffrey G**. Molecular mechanisms of insecticide resistance. American Chemical Society: Washington, DC. 1992; 1-11 pages.
150. **Mutero A, Pralavorio M, Bride JM, Fournier D**. Resistance-associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:5922-6.
151. **N'Guessan R, Darriet F, Guillet P, Carnevale P, Traore-Lamizana M, Corbel V, et al**. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med Vet Entomol*. 2003; 17:19-25.

152. **O'Brien RD.** Toxic Phosphorus Ester, Academic Press, New York. 1960.
153. **Ocampo CB, Salazar-Terreros MJ, Mina NJ, McAllister J, Brogdon W.** Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Trop.* 2011; 118:37-44.
154. **Ocampo CB, Wesson DM.** Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue hyperendemic urban setting in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71:506-13.
155. **Oppernoorth FJ.** Biochemistry and genetics of insecticide resistance. En: *Comparative insect physiology, biochemistry and pharmacology.* Karbin GA, Soon JG, editors, Pergamon, Oxford 1985; 12:731-73.
156. **Organización Panamericana de la Salud.** Resurgimiento del dengue en las América. *Boletín.* 1997; 8:404-9.**Organización Panamericana de la Salud.** Salud En Las Américas. 2007; Volumen II–Países. **Organización Panamericana de la Salud.** Number of Reported Cases of Dengue and Figures for 2012 (to week noted by each country). [Fecha de consulta: 4 de marzo de 2012]. Disponible en: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=264&Itemid=363&lang=es.
157. **Ortelli F, Rossiter LC, Vontas J, Ranson H, Hemingway J.** Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J.* 2003; 373:957-63.

158. **Paeporn P, Komalamisra N, Deesin V, Rongsrivam Y, Eshita Y, Thongrunkiat S.** Temephos resistance in two forms of *Aedes aegypti* and its significance for the resistance mechanisms. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2003; 34:786-92.
159. **Paeporn P, Supaphathom K, Srisawat R, Komalamisra N, Deesin V, Yamphan P, et al.** Biochemical detection of pyrethroid resistance mechanism in *Aedes aegypti* in Ratchaburi province, Thailand Trop Biomed. 2004; 21:145-51.
160. **Palacios Fraire S.** Analysis of the principal problems impeding normal development of malaria eradication programs. Bull Pan Am Health Organ. 1975;9:283-94.
161. **Pasteur N, Sinrgre G, Gabinaud A.** Est-2 and Est-3 polymorphisms in *Culex pipiens* L. from Southern France in relation to organophosphate resistance. Biochem Genet. 1981;19:499-508.
162. **Pasteur N, Georghiou GP.** Improved filter paper test for detecting and Quantifying increased esterase activity in organophosphate-resistant mosquitoes (Diptera: Culicidae). J Econ Entomol. 1989; 82:347-53.
163. **Peiris HTR, Hemingway J.** Mechanism of insecticide resistance in a temephos selected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) strain from Sri Lanka. Bull Entomol Res. 1990; 80:453-7.
164. **Penilla RP, Rodriguez AD, Hemingway J, Torres JL, Arredondo-Jimenez JI, Rodriguez MH.** Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in Mexico. Med Vet Entomol. 1998; 12:217-33.

165. **Pérez Pinto EE, Molina DF.** Resistencia focal a insecticidas organosintéticos en *Aedes aegypti* (Linneaus, 1762) (Diptera: Culicidae) de diferentes municipios del estado Aragua, Venezuela. Bol Mal Salud Amb. 2009; 49:143-50.
166. **Perich MJ, Rocha NO, Castro AL, Alfaro AW, Platt KB, Solano T, et al.** Evaluation of the efficacy of lambda-cyhalothrin applied three spray application methods for emergency control of *Aedes aegypti* in Costa Rica. J Am Mosq Control Asso. 2003; 19:58-62.
167. **Perry T, Batterham P, Daborn PJ.** The biology of insecticidal activity and resistance. Insect Biochem Mol Biol. 2011; 41:411-22.
168. **Pethuan S, Jirakanjanakit N, Saengtharatip S, Chareonviriyaphap T, Kaewpa D, Rongnoparut P.** Biochemical studies of insecticide resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. Trop Biomed. 2007; 24:7-15.
169. **Pimsamarna S, Sorngengb W, Akksilpb S, Paepornc S and Limpawitthayakulb M.** Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti* to organophosphate and synthetic pyrethroid compounds in the north-east of Thailand. Dengue Bull 2009; 33:194-202.
170. **Polson KA, Brogdon WG, Rawlins SC, Chadee DD.** Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. Acta Trop. 2011; 117:31-8.
171. **Polson KA, Rawlins SC, Brogdon WG, Chadee DD.** Characterisation of DDT and Pyrethroid Resistance in Trinidad and Tobago populations of *Aedes aegypti*. Bull Entomol Res. 2011; 28:1-7.

172. **Ponlawat A, Scott JG and Harrington LC.** Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. *J Med Entomol.* 2005; 42:821-5.
173. **Rajatileka S, Burhani J, Ranson H.** Mosquito age and susceptibility to insecticides. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011; 105:247-53.
174. **Ranson H, Rossiter L, Ortelli F, Jensen B, Wang X, Roth CH, et al.** Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem Journal.* 2001; 359:295-304.
175. **Ranson H, Claudianos C, Ortelli F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, et al.** Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science.* 2002; 298:179-81.
176. **Ranson H, Hemingway J.** Mosquito glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 2004;401:226-41
177. **Rawlins SC, Hing Wan J.** Resistance in some Caribbean populations of *Aedes aegypti* to several insecticides. *J Am Mosq Control Assoc.* 1995; 11:59-65.
178. **Rawlins SC, Ragoonansingh R.** Comparative organophosphorous insecticide susceptibility in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and *Toxorhynchites moctezuma*. *J Am Mosq Control Assoc.* 1990; 6:315-17.
179. **Rawlins SC.** Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Rev Panam Salud Pública* 1998; 4:243-51.
180. **Raymond M.** Presentation d' un programme d'analyse log-probit pour micro-ordinateur. *Cah Orstom Ser Entomol Med Parasitol.* 1985; 22:117-21.

181. **Raymond M, Pasteur N, Georghiou GP, Mellon RB, Wirth MC, Hawley M.** Detoxification esterases new to California, USA, in organophosphate resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 1987; 24:24-7.
182. **Reiner E.** Recomendations of the IUBMB nomenclatura comité-comments concerning classification and nomenclatura of esterases hydrolyzing organophosphorus compounds. Chem Bio Interactions. 1993; 87:15-6.
183. **Reiner E.** Spontaneous reactivation of phosphorylated and carbamylated cholinesterases. Bull Entomol Res. 1971; 44:109-12.
184. **Ricardo Y, Rodriguez MM, Bisset JA, Pérez O, Sanchez L.** Eficacia del pyriproxifeno para el control de *Aedes (S) aegypti* (Diptera: Culicidae) en cepas con diferentes niveles de resistencia a temefos. Rev Cub Med Trop. 2010; 62:224-9.
185. **Roberts DR, Andre RG.** Insecticide resistance issues in vector-borne disease control. Am J Trop Med Hyg. 1994; 50:21-34.
186. **Rodriguez MM, Bisset JA, Mila LH, Calvo E, Diaz C, Alain Soca L.** Levels of insecticide resistance and its mechanisms in a strain of *Aedes aegypti* of Santiago de Cuba. Rev Cubana Med Trop. 1999; 51:83-8.
187. **Rodríguez MM.** Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. Rev Cubana Med Trop. 2000; 54:189-201.
188. **Rodríguez MM, Lazcano JA, de Fernandez DM, Soca A.** Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after its use in *Aedes aegypti* control programs. J Am Mosq Control Assoc. 2000; 16:324-30.

189. **Rodríguez MM, Bisset J, Fernandez DM, Lauzan L, Soca A.** Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. J Med Entomol. 2001; 38:623-8.
190. **Rodríguez MM, Bisset JA, de Fernandez DM, Lauzan L, Soca A.** Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. J Med Entomol. 2001; 38:623-8.
191. **Rodríguez MM, Bisset JA, Ruiz M, Soca A.** Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. J Med Entomol. 2002; 39:882-8.
192. **Rodríguez MM, Bisset JA, Diaz C, Soca LA.** Cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* from Cuba induced by the selection with organophosphate malathion. Rev Cubana Med Trop. 2003; 55:105-11.
193. **Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D, Pérez O.** Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. Rev Cubana Med Trop. 2004; 56:54-60.
194. **Rodríguez MM, Bisset JA, De Armas Y, Ramos F.** Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. J Am Mosq Control Assoc. 2005; 21:437-45.
195. **Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D.** Determinación in vivo del papel de las enzimas esterases y glutathion transferasa en la resistencia a piretroides en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Rev Cubana Med Trop. 2007a; 59:209-212.

196. **Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D.** Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from some latin-american countries. *J Am Mosq Control Assoc.* 2007; 23:420-9.
197. **Rodríguez M, Bisset J, Ricardo Y, Pérez O, Montada D, Figueredo D, et al.** Resistencia a insecticidas OF en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Santiago de Cuba, 1997-2009. *Rev Cubana Med Trop.* 2010; 62:217-23.
198. **Rodríguez MM, Bisset JA, Hernández H, Ricardo Y, French L, Pérez O, et al.** Caracterización parcial de la actividad de esterasas en una cepa de *Aedes aegypti* resistente a temefos. *Rev Cubana Med Trop.* 2012; 63.
199. **Rooker S, Guillemaud T, Berge J, Pasteur N, Raymond M.** Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity.* 1996; 77:555-61.
200. **Roush RT, Tabashnik BE.** Pesticide Resistance in Arthropods. Chapman & Hall, New York. 1990; pp 303.
201. **Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I.** A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 2007; 16:785-98.
202. **Saelim V, Brogdon WG, Rojanapremsuk J, Suvannadaba S, Pandii W, Jones JW, et al.** Bottle and biochemical assays on temephos resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. *Southeast Asian. J Trop Med Public Health* 2005; 36:417-25.
203. **Salgado VL.** The modes of action of spinosad and other insect control products. *Down to Earth* 1998; 52:35-43.

204. **Sames WJ, Bueno R Jr, Hayes J, Olson JK.** Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Lower Río Grande Valley of Texas and Mexico. *J Am Mosq Control Assoc.* 1996; 12:487-90.
205. **San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckenooghe A, Dayan GH, et al.** The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 82:128-35.
206. **Santacoloma L, Chaves B, Brochero E.** Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. *Rev Panam Salud Pública.* 2010; 27:66-73.
207. **Scott JG.** Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies and pitfalls. In: Roush, R.T., Tabashnik, B. (Eds.), *Pesticide Resistance in Arthropods.* Chapman and Hall, New York. 1990; 39–57.
208. **Seccacini E, Lucia A, Zerba E, Licastro S, Masuh H.** *Aedes aegypti* resistance to temephos in Argentina. *J Am Mosq Control Assoc.* 2008; 24:608-9.
209. **Selvi S, Edah MA, Nazni WA, Lee HL, Tyagi BK, Sofian-Azirun M, et al.** Insecticide susceptibility and resistance development in malathion selected *Aedes albopictus* (Skuse). *Trop Biomed.* 2010; 27:534-50.
210. **Severini C, Romi R, Marinucci M, Guillemaud T, Andraymond M.** Esterases A5-B5 in organophosphate-resistant *Culex pipiens* from Italy. *Med Vet Entomol.* 1997; 11:123-6.
211. **Sharma SN, Saxena VK, LaI S.** Study on susceptibility status in aquatic and adult stages of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* against insecticides at international airports of South India. *J Commun Dis.* 2004; 36:77-81.

212. **Sharma VP, Mehrotra KN.** Malaria resurgence in India: a critical study. Soc Sci Med. 1986;22:835-45.
213. **Shelton AM, Sances FV, Hawley J, Tang JD, Boune M, Jungers D, et al.** Assessment of insecticide resistance after the outbreak of *Diamondback moth* (*Lepidoptera: Plutellidae*) in California in 1997. Journal of Economic Entomology 2000; 93:931-6.
214. **Shi MA, Lougarre A, Alies C, Fremaux I, Tang ZH, Stojan J, et al.** Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. BMC Evol Biol. 2004; 6:4-5.
215. **Sihuincha M, Zamora-Perea E, Orellana-Rios W, Stancil JD, López-Sifuentes V, Vidal-Ore C, et al.** Potential use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (*Diptera: Culicidae*) in Iquitos, Perú. J Med Entomol. 2005; 42:620-30.
216. **Siller Q, Ponce G, Lozano S, Flores AE.** Update on the frequency of Ile1016 mutation in voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. J Am Mosq Control Assoc. 2011; 27:357-62.
217. **Smissaert HR.** Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. Science. 1964; 143:129-31.
218. **Soderlund DM, Bloomquist JR.** Molecular mechanism of insecticide resistance. In Pesticide resistance in arthropods. Roush, R. T. & Tabashnic, B. E. [eds]. Chapman & Hall. London. 1990; 237-60.
219. **Soderlund DM, Knipple DC.** The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect Biochem Mol Biol. 2003; 33:563-77.

220. **Souza-Polezzi RC, Bicudo HE.** Genetic variation along time in a Brazilian population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), detected by change in the esterase patterns. *Genetica*. 2005;125:43-53.
221. **Sparks TC, Lockwood JA, Byford RL, Graves JB, Leonard BR.** The role of behavior in insecticide resistance. *Pestic Sci*. 1989; 26:383-99.
222. **Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, et al.** Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2008; 38:113-23.
223. **Sunaiyana S, Pungasem P, Kasin S.** Detection of insecticides resistance status in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* to four major groups of insecticides. *Trop Biomed*. 2006; 23:97-101.
224. **Tabashnik BE.** Managing resistance with multiple-pesticide tactics: theory, evidence and recommendations. *J Econ Entomol*. 1989; 82:1263- 9.
225. **TDR/OPS.** Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control del dengue. WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1. 2009; p152.
226. **Thompson M, Shotkoski F, Ffrench-Constant RH.** Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *FEBS Lett*. 1993; 325:187-90.
227. **Tikar SN, Kumar A, Prasad GB, Prakash S.** Temephos-induced resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance studies to certain insecticides from India. *Parasitol Res*. 2009; 105:57-63.

228. **Tikar SN, Mendki MJ, Chandel K, Parashar BD, Prakash S.** Susceptibility of immature stages of *Aedes (Stegomyia) aegypti*; vector of dengue and chikungunya to insecticides from India. *Parasitol Res.* 2008; 102:907-13.
229. **Vaughan A, Chadee DD, ffrench-Constan, R.** Biochemical monitoring of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. *Med Vet Entomol.* 1998; 12:318-21.
230. **Vaughan A, Rodriguez MM, Hemingway J.** The independent gene amplification of electrophoretically indistinguishable B esterases from the insecticide-resistant mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem J.* 1995; 15:651-8.
231. **Villani F, White GB, Curtis CF, Miles SJ.** Inheritance and activity of some esterases associated with organophosphate resistance in mosquitoes of the complex of *Culex pipiens* L. (*Diptera: Culicidae*). *Bull Ent Res.* 1983; 73:153-70.
232. **Vontas JG, Small GJ and Hemingway J.** Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J.* 2001; 357:65-72.
233. **Vontas JG, Small GJ, Nikou DC, Ranson H, Hemingway J.** Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochem J.* 2002; 362:329-37.
234. **Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, McAllister JC, Brogdon WG, Roberts JM, et al.** Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin –impregnate nets. *Med Vet Entomol.* 1999; 13:239-44.

235. **Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, MCallister JC, Brogdon WG, Roberts JM, et al.** Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Med Vet Entomol.* 1999; 13:239-44.
236. **Ware GW, Whitacre DM.** *The Pesticide Book*, 6th Ed. 496 pp. Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio. 2004; (ISBN 1892829-11-8).
237. **Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M.** The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol.* 2004a; 13:1-7.
238. **Williamson MS, Denholm I, Bell CA, Devonshire AL.** Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). *Mol Gen Genet.* 1993; 240:17-22.
239. **Williamson MS, Martínez-Torres D, Hick CA, Devonshire AL.** Identification of mutations in the House fly para-type sodium channel gene associated with Knockdown resistance (Kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol Gen Genet.* 1996; 252: 51-60.
240. **Wondji CS, Dabire RK, Tukur Z, Irving H, Djouaka R, Morgan JC.** Identification and distribution of a GABA receptor mutation conferring dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *Insect Biochem Mol Biol.* 2011; 41:484-91.
241. **World Health Organization.** Seventh report Expert Committee on insecticides WHO Tech Report Ser 1957;125: 37.

242. **World Health Organization.** Resistance of vectors and reservoirs of disease to pesticides, fifth Report of the WHO Experts Committee in Vectors Biology and Control. WHO tech Rept Ser. 1976; pp 82.
243. **World Health Organization.** Resistencia de vectores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas. Org. Mund. Salud, Ser. Inf. Tecn. 1980; 655: p 125.
244. **World Health Organization.** Resistance of vectors and reservoirs of diseases to pesticides, twenty second. Report of the WHO Experts Committee on Insecticides. WHO Tech. Rept. Ser. 1980; pp 85.
245. **World Health Organization.** Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC/81.807, Geneva, 1981a; pp 1-6.
246. **World Health Organization.** Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides. Establishment of the baseline. WHO/VBC/81.805, Geneva, 1981b; pp 1-5
247. **World Health Organization.** Geographical distribution of arthropod-borne diseases y their principal vector. OMS/VBC/89.967, 1989.p.134.
248. **World Health Organization.** Fifteenth report. WHO Expert Committee on vector biology and control. WHO Tech Report Series. 1992; pp 124.
249. **World Health Organization.** Report fighting disease, fostering development. The World Health Organization, Geneva. 1996; pp143.

250. **World Health Organization.** Pesticides and Their application. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/2006.4. World Health Organization, Geneva. 2006; pp113
251. **World Health Organization.** Standard protocol for the establishment of discriminating dosages in adult malaria vectors in: Report the WHO informal consultation. Test-procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and resistance of insecticides on treated surfaces. WHO/CDC/CPC/MAL/98.12. 1998; pp 67.
252. **Xu Q, Wang H, Zhang L, Liu N.** Sodium channel gene expression associated with pyrethroid resistant house flies and German cockroaches. *Gene*. 2006; 379:62-7.
253. **Yasutomi K.** Studies on organophosphate-resistance and esterase activity in the mosquitoes of the *Culex pipiens* group. I *Jpn J Sanitary Zool*. 1970; 21:41-5.
254. **Yébakima A, Raymond M, Marquine M and Pasteur N.** Resistance to organophosphorous insecticides in *Culex pipiens quinquefasciatus* from Martinique. *J Med Entomol*. 1995; 32:77-82.
255. **Zaim M, Guillet P.** Strategy Development and Monitoring for Parasitic Diseases and Vector Control, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland. *Trends Parasitol*. 2002; 18:161-3.
256. **Zerva E.** Insecticidal activity of pyrethroids in insect of medical importance. *Parasitol Today*. 1988;4:53-7.

257. **Zhao JZ, Li YX, Collins HL, Gusukuma-Minuto L, Mau RFL, Thompson GD et al.** Monitoring and characterization of *Diamondback moth* (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. *J Economic Entomol* 2002;95:430-6.
258. **Zhao YY, Liu F, Yang G, You MS.** PsOr1, a potential target for RNA interference-based pest management. *Insect Mol Biol.* 2010; 20:97-104.