

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**



**“DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE SUSCEPTIBILIDAD Y  
RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN POBLACIONES DEL  
MOSQUITO *Culex quinquefasciatus* Say DEL ESTADO DE YUCATÁN,  
MÉXICO”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**WILBERT ANTONIO CHI CHIM**

**DIRECTORES TESIS:**

**Dr. Miguel Ángel Reyes López**

**Dra. María del Consuelo Gómez García**

**Reynosa, Tamps.**

**Agosto 2018**

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**



**“DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE SUSCEPTIBILIDAD Y  
RESISTENCIA A INSECTICIDAS EN POBLACIONES DEL  
MOSQUITO *Culex quinquefasciatus* Say DEL ESTADO DE YUCATÁN,  
MÉXICO”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**WILBERT ANTONIO CHI CHIM**

**DIRECTORES TESIS:**

**Dr. Miguel Ángel Reyes López**

**Dra. María del Consuelo Gómez García**

**Reynosa, Tamps.**

**Agosto 2018**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. el día 06 del mes de Julio del año 2018, el que suscribe Wilbert Antonio Chi Chim alumno del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro B140991, adscrito al Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Reyes López, Dra. María del Consuelo Gómez García y cede los derechos del trabajo titulado "Determinación del estado de susceptibilidad y resistencia a insecticidas en poblaciones del mosquito *Culex quinquefasciatus* (say) del estado de Yucatán, México.", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones Blvd. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Wilbert Antonio Chi Chim



## **AGRADECIMIENTOS**

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión de este trabajo. En primer lugar, quiero agradecer al Centro de biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, que me dio la oportunidad y me abrió las puertas para obtener este logro.

Le agradezco de manera muy especial al Dr. Miguel Ángel Reyes López por confiar en mí y darme la oportunidad. También le agradezco a la Dra. Guadalupe Reyes Solís, por su apoyo durante la realización del presente trabajo.

Mi sincero agradecimiento a la Dra. Consuelo Gómez García por su orientación y aportaciones para concluir este trabajo.

Agradezco a los miembros del comité, al Dr. Narváez, al Dr. Virgilio y al Dr. Guo por sus sugerencias que contribuyeron a mejorar la calidad del trabajo.

También quiero agradecer los apoyos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) y al programa Institucional de formación de investigadores del Instituto Politécnico Nacional (BEIFI-IPN).

A mis amigos al Dr. Carlos Baak y al biólogo Julio Chan, Biol. Rosa Carmina Centina Trejo compañeros que me apoyaron y le dedicaron tiempo para desarrollar este trabajo.

## **DEDICATORIA**

A Dios

Por acompañarme todo los días.

A mis padres que siempre se preocuparon que no me faltara nada, gracias por todo el apoyo para poder obtener este logro.

A mis hermanos por brindarme su apoyo en todo los aspectos, y aconsejándome siempre, a Yudith Herrera que en el momento mas difícil estuvo presente apoyándome.

## ÍNDICE

	Pag.
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iii
<b>DEDICATORIA</b>	iv
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	vii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	viii
<b>ABREVIATURAS</b>	x
<b>RESUMEN</b>	xii
<b>ABSTRACT</b>	xiii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. ANTECEDENTES</b>	3
2.1 <i>Culex quinquefasciatus</i> , biología y comportamiento	3
2.2 Resistencia a insecticidas	4
2.3 Mecanismos de resistencia a insecticidas	5
2.4 Evolución de la resistencia a insecticidas en los mosquitos <i>culex</i> e impacto en el control	6
2.5 Factores que influyen en la evolución de la resistencia	7
2.6 Insecticidas y sus sitios activos	8
2.7 Modo de acción de los insecticidas	8
2.7.1 Insecticidas organofosforados	8
2.7.2 Insecticidas carbamatos	9
2.7.3 Insecticidas piretroides	9
2.8 Importancia de la resistencia a insecticidas	10
2.8.1 Resistencia debido a la insensibilidad del sitio blanco alterado	11
2.8.1.1 Insensibilidad del canal de sodio	11
2.8.1.1.1 Estructura y función del canal de sodio	12
2.8.1.1.2 Resistencia “ <i>knockdown</i> ” en mosquitos	14
2.8.1.1.3 Insensibilidad de la AChE	15
2.8.1.1.4 Insensibilidad del receptor del ácido gamma aminobutirico (GABA)	16
2.8.2 Resistencia debido a la desintoxicación metabólica de insecticidas	17
2.8.3 Otros mecanismos de resistencia a insecticidas	18
2.8.3.1 Resistencia conductual o de comportamiento	18
2.8.3.2 Penetración reducida	19
2.8.3.3 Excreción acelerada	19
2.8.4 Detección de la resistencia	20
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	22
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	23
<b>V. OBJETIVOS</b>	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos	24
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	25
6.1 Área de estudio	25

6.2 Sitios de colecta de estados inmaduros	25
6.3 Obtención del material biológico	26
6.4 Determinación de frecuencia de la mutación L1014F en canal de sodio	27
6.4.1 Extracción y purificación del DNA genómico	27
6.4.2 PCR	28
6.4.3 Análisis de datos	30
6.5 Mecanismos enzimáticos alterados	30
6.5.1 Pruebas bioquímicas para AChE	30
<b>VII. RESULTADOS</b>	32
7.1 Criaderos muestreados en áreas rurales y urbanas	32
7.2 Parámetros evaluados en diferentes criaderos	33
7.3 Frecuencias de la mutación L1014F asociada con la resistencia a insecticidas en poblaciones de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	35
7.4 Frecuencia y distribución del alelo 1014F en época de secas y de lluvias	36
7.5 Determinación de los mecanismos de resistencia por medio de pruebas bioquímicas	40
7.6 Comparación de frecuencias genéticas asociadas a resistencia a insecticidas en <i>Cx. quinquefasciatus</i>	43
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	49
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	59
<b>X. RECOMENDACIONES</b>	60
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b>	61
<b>XII. APÉNDICE</b>	83

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.	
CUADRO 1	Secuencia de los iniciadores utilizados en las pruebas moleculares	28
CUADRO 2	Número de estados inmaduros recolectados durante la temporada de lluvias en áreas rurales y urbanas.	32
CUADRO 3	Número de estados inmaduros recolectados durante la temporada de secas en áreas rurales y urbanas.	33
CUADRO 4	Modelo de regresión estimado (Máxima verosimilitud)	34
CUADRO 5	Genotipos presentes en poblaciones del mosquito <i>Cx. quinquefasciatus</i> durante la temporada de lluvias en 2015.	38
CUADRO 6	Genotipos presentes en poblaciones del mosquito <i>Cx. quinquefasciatus</i> durante la temporada de lluvias en 2016.	40
CUADRO 7	Porcentaje de individuos susceptibles (SS), heterocigotos (RS) y resistentes (RR) en poblaciones de <i>Cx. quinquefasciatus</i> después de ser expuestos a propoxur al 0.1%.	43
CUADRO 8	Encuestas relacionadas al uso de insecticidas.	44
Apéndice A	Zonas urbanas y rurales seleccionadas para el estudio	84
Apéndice B	Insecticidas y herbicidas utilizados en zonas urbanas y rurales.	85

## LISTA DE FIGURAS

		Pag.
Figura 1	Distribución global del complejo <i>Cx. pipiens</i> donde se ubica <i>Cx. quinquefasciatus</i> .	4
Figura 2	Representación gráfica de las mutaciones localizadas en el canal de sodio.	13
Figura 3	Principales pasos de toxicidad de los insecticidas piretroides y los mecanismos de resistencia asociados en los mosquitos. SNC: sistema nervioso central. La molécula piretroide representada es deltametrina.	20
Figura 4	Sitio de colecta de estados inmaduros de <i>Cx. quinquefasciatus</i> en áreas urbanas y rurales en el estado de Yucatán.	27
Figura 5	Representación grafica en el desarrollo de los estados inmaduros de <i>Cx. quinquefasciatus</i> con el volumen de agua (L).	35
Figura 6	Identificación de la mutación L1014F. M, marcador de tamaño molecular, carril 1(Cx3), 2(Cx4), carril 3(Cx3) ,4(Cx4), carril 5(Cx3), 6(Cx4), muestras amplificadas con primers susceptibles (TA) y resistentes (TT) en poblaciones de <i>Culex quinquefasciatus</i> .	36
Figura 7	Distribución de los alelos L1014 / L1014, L1014 / F1014 y F1014 / F1014 en poblaciones de <i>Cx. quinquefasciatus</i> durante la época de secas. Los diagramas circulares representan el porcentaje de alelos presentes en cada sitio.	37
Figura 8	Distribución de los alelos L1014 / L1014, L1014 / F1014 y F1014 / F1014 en poblaciones de <i>Cx. quinquefasciatus</i> durante la época de lluvias. Los diagramas circulares representan el porcentaje de alelos presentes en cada sitio	39
Figura 9	Actividad remanente de AChE en <i>Cx. quinquefasciatus</i> colectado en el área urbana. Las barras de error (IC 95%) representan las medianas de la actividad remanente.	41
Figura 10	Actividad remanente de AChE en <i>Cx. quinquefasciatus</i> colectado en el área rural. Las barras de error (IC 95%) representan las medianas de la actividad remanente.	42
Figura 11	Microplaca donde se observa una reacción de la acetilcolinesterasa (AChE), <b>A</b> ) muestras colectadas de Caucel, <b>B</b> ) muestras colectados de la comisaria de Xkalakdzonot.	45
Figura 12	Genotipos presentes en poblaciones del mosquito <i>Cx. quinquefasciatus</i> , <b>A</b> ) durante la temporada de secas, <b>B</b> ) durante la temporada de lluvias.	48

Figura 13 Porcentajes de actividad remanente en poblaciones del mosquito *Cx. quinquefasciatus* en zonas urbanas y rurales de Yucatán. 49

## ABREVIATURAS

<b>VON</b>	Virus del Oeste del Nilo
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>kdr</b>	Knock down resistance
<b>DDT</b>	Dicloro difenil tricloroetano
<b>P450</b>	Sistema citocromo P450
<b>GSTs</b>	Glutation transferasa
<b>CCEs</b>	Carboxil colinesterasa
<b>OF</b>	Organofosforado
<b>OCs</b>	Organoclorados
<b>GABA</b>	Ácido gamma amino butírico
<b>AchE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>VGSC</b>	Canal de sodio dependiente de voltage
<b>Na<sup>+</sup></b>	Iones de sodio
<b>Ace-1</b>	Acetilcolinesterasa sub unidad 1
<b>Ace-2</b>	Acetilcolinesterasa sub unidad 2
<b>Cl</b>	Cloro
<b>A</b>	Alanina
<b>G</b>	Glicina
<b>M</b>	Molar
<b>Tris</b>	Trizma/ ácido clorhídrico
<b>HCl</b>	
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamina tetra acético
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>KAc</b>	Cloruro de potasio

<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>TE</b>	Tris/ácido clorhídrico /ácido etilen-diamino-tetraacetico
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>dATP</b>	Desoxiadenosina trifosfato
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosina trifosfato
<b>dCTP</b>	Desoxicitocina trifosfato
<b>dTTP</b>	Desoxitimidina trifosfato
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>VdTTP</b>	VoltiosDesoxitimidina trifosfato
<b>DTNBMgCl<sub>2</sub></b>	Ácido 5,5-ditiobis 2-hidrobenzoicoCloruro de magnesio
<b>grH<sub>2</sub>O</b>	gramosAgua
<b>ACTHV</b>	Acetilcolina IodadaVoltios
<b>XDTNB</b>	Veces la concentraciónÁcido 5,5-ditiobis 2-hidrobenzoico
<b>AchEigr</b>	Acetilcolinesterasa insensiblegramos
<b>glACTH</b>	Grados de libertadAcetilcolina Iodada
<b>SSX</b>	SusceptibleVeces la concentración
<b>RSAchEi</b>	HeterocigotoAcetilcolinesterasa insensible
<b>RRgl</b>	ResistenteGrados de libertad
<b>SS</b>	Susceptible
<b>RS</b>	Heterocigoto
<b>RR</b>	Resistente

## RESUMEN

Los mosquitos *Culex quinquefasciatus* Say se distribuyen ampliamente y transmiten muchas infecciones arbovirales. Es una de las especies más importantes y abundantes en el entorno urbano y, constituye un problema grave para la salud pública en la actualidad. Esta especie probablemente está bajo presión debido al uso intensivo de insecticidas, generando resistencia a estos productos, principalmente piretroides durante la etapa adulta, debido a una mutación en el canal voltaje-sodio, el cual es el objetivo principal de los insecticidas piretroides y DDT en diversas especies de artrópodos y durante su etapa larval esta asociado con la resistencia a organofosforados debido a la insensibilidad de la acetilcolinesterasa. En este estudio, se recolectaron huevos, larvas y pupas de *Cx. quinquefasciatus* Say en diferentes criaderos en áreas urbanas y rurales en el estado de Yucatán, se extrajo el DNA genómicos en mosquitos adultos en cada localidad por el método de sales. La identificación molecular de la mutación L1014F se determinó por PCR para cada localidad y la insensibilidad de la acetilcolinesterasa se analizó mediante pruebas bioquímicas. Se identificaron homocigotos susceptibles (L1014 / L1014) con el 12% (114/950), individuos heterocigotos (F1014 / L1014) con 34% (323/950) y homocigotos mutados (F1014 / F1014) con el 54% (513/950) durante las temporadas de secas y de lluvias. En el área urbana, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de actividad remanente en las muestras analizadas y recolectadas por localidad ( $X^2 = 50.65$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0.000$ ). Mientras que en el área rural también se observó una diferencia estadísticamente significativa en la actividad remanente en cada uno de estos sitios, ( $X^2 = 19.72$ ,  $df = 4$ ,  $P = 0.001$ ). Los resultados demuestran un aumento en la actividad de los diferentes mecanismos de insensibilidad asociados a la resistencia a insecticidas en *Cx. quinquefasciatus* Say, estos hallazgos pueden ayudar a garantizar un uso más eficaz de los recursos disponibles para el control de mosquitos vectores y poder detectar qué factores están causando el desarrollo de la resistencia a los insecticidas y, por lo tanto, es importante continuar con su monitoreo para la detección temprana y ejercer un control mediante la selección de insecticidas adecuados.

## ABSTRACT

The mosquitoes *Culex quinquefasciatus* are widely distributed and important in the transmission of many human diseases. It is one species most important and abundant in the urban environment and constitutes a serious problem for public health today. This species probably has been under pressure selection due to the intensive use of insecticides, generating insecticide resistance. A mutation in the voltage-sodium channel gene is a primary target of pyrethroid and DDT insecticides in various arthropod species, and insensitivity of acetylcholinesterase. In this work, eggs, larvae and pupae of *Cx. quinquefasciatus* in different breeding sites in urban and rural areas in the state of Yucatan, were extracted. Genomic DNA in adult mosquitoes in each locality was extracted by salt method. Molecular identification of L1014F mutation was determined by PCR for each locality and the insensitivity of acetylcholinesterase was analyzed by biochemical tests. Susceptible homozygotes were identified (L1014 / L1014) in 12% (114/950), heterozygous individuals (F1014 / L1014) in 34% (323/950) and mutated homozygotes (F1014 / F1014) in 54% (513/950) during the dry and rainy seasons. In the urban area, a statistically significant difference was observed between the percentages of remaining activity in the samples analyzed and collected by locality ( $X^2 = 50.65$ ,  $d.f. = 4$ ,  $P = 0.000$ ). While in the rural area there is also significant statistical difference observed in the remaining activity in each of these sites, ( $X^2 = 19.72$ ,  $d.f. = 4$ ,  $P = 0.001$ ). The results show an increase in the activity of the different insensitivity mechanisms associated with resistance to insecticides in *Cx. quinquefasciatus*, these findings can help ensure a more effective use of available resources for the control of mosquito vectors, and can detect which factors are causing the development of resistance to insecticides and, therefore, it is important to continue monitoring for early detection and exercising control by selecting suitable insecticides.

## I. INTRODUCCIÓN

*Culex quinquefasciatus* es un miembro del complejo *Culex pipiens*, es un mosquito de importancia médica y veterinaria con una distribución mundial (Atkinson *et al.*, 1995). En Estados Unidos, es el principal vector de *Wuchereria bancrofti* que causa la filariasis linfática en humanos (Farid *et al.*, 2001; White, 1989; Janousek TE, 1989) y, transmite el virus Zika (Duschinka *et al.* 2017). Considerado también como vector del Virus del Oeste del Nilo (VON), virus de la fiebre del Valle del Rift, el virus de la encefalitis de San Luis y el virus Sindbis en condiciones de laboratorio (Turell., 2012). En México, el VON fue detectado en *Cx. quinquefasciatus* en Nuevo León (Elizondo-Quiroga *et al.*, 2005). La biodiversidad de los mosquitos es muy evidente, con muchos géneros que tienen distribución mundial como el complejo *Culex* (Farajollahi *et al.*, 2011), y algunos géneros como *Aedes* y *Anopheles* con distribución limitada o endémica (Rueda, 2008). La actividad humana es responsable de la creación de un ambiente génico de los mosquitos la cual puede ser natural o artificial, (Vanek *et al.* 2006). Pudiendo prosperar en una variedad de hábitats con agua dulce, agua salobre o cualquier agua (clara, turbia o contaminada) excepto en hábitats marinos con alta concentración de sal con 10 y 12 ppt (Rueda, 2008). La selección de criaderos para la puesta de huevos puede estar asociada con factores presentes en el agua, como la materia orgánica, los compuestos químicos y la presencia de inmaduros (larvas y pupas) (Barbosa, 2010).

La estrategia actual para el control de vectores de enfermedades se basa principalmente en la aplicación de insecticidas. Sin embargo, el uso intensivo y a largo plazo de insecticidas en salud pública y en la agricultura, ha llevado al desarrollo de la resistencia a los mismos (Rivero *et al.*, 2010; Hemingway and Ranson, 2000). *Cx. quinquefasciatus* es indirectamente “presionado” ante el uso intensivo y extensivo de insecticidas en las campañas de control dirigidos al vector del dengue *Aede aegypti*, lo que implica un incremento notable de sus poblaciones, presumiblemente debido a la aparición de la resistencia (WHO, 2013), el incremento exponencial de este fenómeno es enfatizado

por la OMS, debido a las implicaciones económicas y sociales que ello provoca. En México, se encuentra que la mutación L1014F-*kdr* en poblaciones naturales de mosquitos, está asociada con una resistencia al derribo (*knockdown*), muy alta en insecticidas piretroides (Saavedra Rodríguez *et al.*, 2007). La mutación se presenta en el canal de sodio dependiente de voltaje, el sitio destino del DDT y los insecticidas piretroides (Martínez-Torres *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2017). Esta mutación genera una sustitución de un codón de leucina (1014) en el segmento hidrófobo S6 del dominio II, reduciendo la afinidad del sitio destino para los insecticidas (O'Reilly *et al.*, 2006).

Sin embargo, falta información sobre la diversidad, los factores que contribuyen a un desarrollo exitoso y el papel de los alelos *kdr* en la resistencia a los piretroides en *Cx. quinquefasciatus*. Poco se sabe sobre la importancia de la frecuencia de la mutación L1014F asociada con la resistencia a los insecticidas piretroides en *Cx. quinquefasciatus* en el sureste de México, por lo que consideramos necesario realizar estudios para determinar la frecuencia actual de la mutación L1014F en poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* en diferentes áreas del estado de Yucatán, México.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 *Culex quinquefasciatus*, biología y comportamiento.

Los mosquitos pueden causar al ser humano más enfermedades que cualquier otro organismo. Más de un millón de personas alrededor del mundo muere cada año por alguna enfermedad relacionada con estos insectos. El mosquito *Cx. quinquefasciatus* (Say, 1823) es una de las mayores plagas de las zonas urbanas. Es una especie antropofílico y uno de los vectores adaptados a las diversas condiciones y modalidades del hábitat humano. Esta especie es importante por ser agente de varios patógenos del hombre, a los animales y a algunos agentes productores de zoonosis. *Cx. quinquefasciatus* Say se encuentra ampliamente distribuida, tanto latitudinal y altitudinalmente, en zonas tropicales y subtropicales del planeta (Marquetti *et al.*, 2000).

En muchas zonas es el mosquito más abundante por lo que se estima que puede jugar un papel importante en la transmisión de diferentes enfermedades. Esta especie (Fig. 1), se distribuye principalmente en América y África tropical, Medio Oriente, sur de Asia, Nueva Guinea, Australia y el sur de Estados Unidos (Brewer *et al.*, 1987; Almirón *et al.*, 1995). *Cx. quinquefasciatus* es un díptero tropicopolita que se desarrolla en colecciones de agua estancada o de baja corriente y abundante materia orgánica o inorgánica incluidos elementos pesados, en muchos casos estos criaderos son productos de deficiencia sanitarias durante procesos de urbanización no controladas (Ribeiro *et al.* 2004).

*Cx. quinquefasciatus* posee una vagilidad intermedia; tiene un ciclo de vida holometábolo presentando una metamorfosis completa en su ciclo evolutivo, pasando desde la fase de huevo, larva, pupa y adulto. Sus fases inmaduras se desarrollan en depósitos de agua, ocupando diversos tipos de criaderos, con abundante contenido de materia orgánica, detritos en proceso de fermentación, preferentemente sombreados, lénticos o semilóticos cercanos al ambiente domiciliario principalmente antropogénicos (Brewer *et al.*, 1987). Las hembras de *Cx. quinquefasciatus* depositan sus huevos en forma grupal formando una especie de balsa que flota de aproximadamente 150 a 200 huevos, las cuales no presentan

movilidad y están sujetos a las variaciones del medio ambiente y pueden presentar adaptaciones diferentes. La hembra deposita los huevos en agua estancada, preferiblemente en horas nocturnas, al principio son blanquecinos, pero al cabo de 1-2 horas se tornan oscuros debido a la oxidación del exocóron (Marquardt, 2000).

El complejo *Culex* en el que se incluye *Cx. quinquefasciatus* ganó relevancia epidemiológica en los últimos años, debido a que es considerado un importante transmisor del Virus del Oeste del Nilo (Dohm *et al*, 2002)

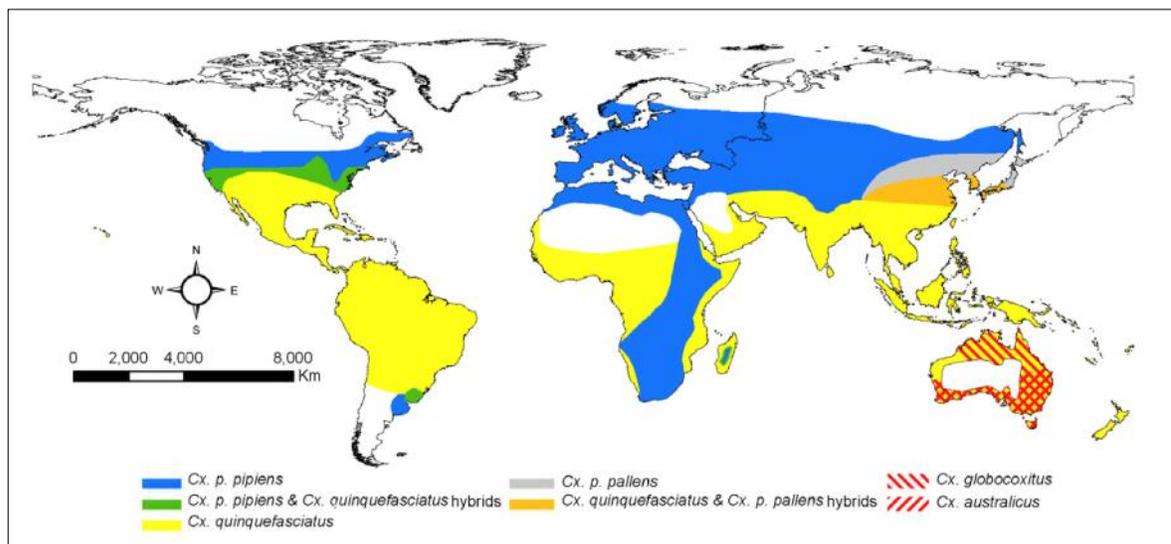


Figura 1: Distribución global del complejo *Cx. pipiens*, donde se ubica *Cx. quinquefasciatus*. Tomado de Farajollahi *et al.*, 2011.

## 2.2 Resistencia a insecticidas

*Cx. quinquefasciatus* es una “importante molestia” en las zonas urbanas en muchas partes del mundo (Lee *et al.*, 1997), también es considerado como un objetivo en los programas de control de mosquitos, ya que es capaz de transmitir una gran cantidad de patógenos que infectan a los seres humanos y otros animales (Hardstone *et al.*, 2007; Gordon and Ottea, 2012). El desarrollo de resistencia a los pesticidas por artrópodos es una preocupación principal para el manejo de plagas y control de enfermedades, sin embargo en estudios recientes se ha demostrado que a un se desconocen la resistencia a insecticidas a gran escala, sin una comprensión más clara entre los insecticidas utilizados y el nivel de

susceptibilidad de las poblaciones de mosquitos. La resistencia a insecticidas en *Cx. quinquefasciatus* también podría estar relacionado con el aumento en el uso de las actividades agrícolas, que juegan un papel en el desarrollo de la resistencia fisiológica a este compuesto. Sin embargo varias cepas de *Cx. quinquefasciatus* aun todavía son susceptibles a algunos grupos de insecticidas, lo que sugiere que estos compuestos pueden todavía ser eficaz en el control de *Cx. quinquefasciatus* en algunos países (Sparks 2018; Whalan *et al.*, 2008; Mota-Sanchez *et al.*, 2002).

La resistencia a insecticidas o la resistencia fisiológica se define como la capacidad de una población de insectos de tolerar dosis de un insecticida que serían letales para la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie y es el resultado de la presión de selección positiva ejercida por el insecticida sobre genes, inicialmente en baja frecuencia (WHO, 2009). Los genes de resistencia pueden luego dispersarse en la población local de insectos e incluso en el mundo. Los patrones de distribución de estas variantes genéticas en poblaciones naturales son el efecto en conjunto de varias fuerzas evolutivas y factores demográficos como la selección, mutación y el ciclo de vida. (Gazave *et al.*, 2001). En la actualidad los piretroides siguen estando entre los principales grupos de insecticidas que se utilizan intensivamente por los agricultores en el control de plagas, así como también en salud pública como la principal estrategia de control de mosquitos (Corbel *et al.*, 2007).

### 2.3 Mecanismo de resistencia a insecticidas

La resistencia a grupos de insecticidas es reportado en varios países, entendiendo el nivel y mecanismo de resistencia, generalmente la resistencia a insecticidas en mosquitos es causado por tres principales mecanismos como a) la sensibilidad reducida en el sitio blanco, b) penetración reducida debido a la alteración de la cutícula y c) el incremento de la actividad de los niveles de enzimas detoxificantes (resistencia metabólica) (Hemingway J *et al.*, 2004). Paralelamente, la resistencia a insecticida involucradas en el metabolismo de detoxificación, provoca la biotransformación de la molécula del insecticida por enzimas considerado como una llave de los mecanismos de resistencia en insectos a los insecticidas químicos (Hemingway J *et al.*, 2004). Este mecanismo puede ser el resultado de dos distintos eventos genéticos como una mutación de la secuencia de la proteína de la enzima que lleva

un mejor metabolismo del insecticida y/o una mutación en una región reguladora no codificante que conduce a la producción de más de una enzima capaz de metabolizar el insecticida. Tres numerosas familias de enzimas, los citocromos P450 (monooxigenasas), glutatión S-transferasas (GSTs) y carboxil/ colinesterasas (CCEs), están implicados en el metabolismo de los insecticidas (Feyereisen R, 2005).

## 2.4 Evolución de la resistencia a insecticidas en los mosquitos *Culex* e impacto en el control.

Muchas especies de insectos desarrollaron resistencia a insecticidas y la principal arma para contrarrestar la resistencia consiste en utilizar compuestos con estructuras química alternativa. La resistencia no evoluciona a la misma velocidad en todos los organismos que se someten a presión de selección, solamente se desarrolla de manera rápida en algunas especies, más lentas en otras y en algunas mas no se desarrollan. La evolución de la resistencia probablemente es causado por el impacto de los compuestos químicos que se acumulan en cuerpos de agua (Stegeman, 1994). De hecho, los insecticidas a menudo se introducen deliberadamente en el hábitat de los mosquitos en la lucha contra las muchas enfermedades que transmiten como por ejemplo: la malaria, el dengue, la fiebre amarilla y la filariasis (Lounibos, 2002). Sin embargo, la exposición a insecticidas es una fuerza selectiva potente, que presenta un riesgo de generar resistencia que pondría en peligro la eficacia de los programas de control (Linna *et al*, 2015). El esfuerzo de investigación, para comprender el desarrollo de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos, es intenso. La resistencia a los piretroides, en particular y la consiguiente resistencia cruzada a otros insecticidas, son cuestiones críticas (Butler, 2011; Zaim, 2002) y da lugar al resurgimiento de enfermedades transmitidas por insectos en muchas partes del mundo. Se identifica una mayor resistencia de los mosquitos a los insecticidas en más de 60 países, afectando a todas las principales especies de vectores y todas las clases de insecticidas (WHO, 2013).

Muchos estudios detallados son llevados a cabo sobre la importancia de la resistencia a los mosquitos, resistencia al modificar el objetivo de los insecticidas, la resistencia metabólica y la adaptación conductual (Gatton *et al.*, 2013; Rusell *et al.*, 2013). Los estudios experimentales que investigan dicha evolución de la resistencia no son fáciles de diseñar, porque los cambios en el comportamiento que ocurren en el campo no son

necesariamente observables o cuantificables en los laboratorios. Lockwood *et al.*, (1984) describió varios tipos de resistencia conductual en insectos (Haubruge *et al.*, 1998), algunos están asociados con la movilidad del insecto (Lockwood *et al.*, 1984) y, otros están asociados con su inmovilidad, que facilita la evasión a los insecticidas, permitiendo que los insectos eviten el contacto con el producto tóxico o limitan la duración de este contacto. Los cambios en el comportamiento constituyen un serio obstáculo para la implementación de programas de control de vectores efectivos y sostenibles.

## 2.5 Factores que influyen en la evolución de la resistencia.

Estudios señalan el posible papel de otros factores que influyen en la selección de mecanismos de resistencia hacia los insecticidas, entre ellos, el uso de insecticidas para la protección personal y para controlar las plagas de los cultivos en la agricultura que a menudo sugiere como presiones selectivas adicionales que favorecen la resistencia hacia los insecticidas (Theresia *et al.*, 2013). La presencia de los contaminantes antropogénicos también está asociados con una mayor tolerancia a los insecticidas de los mosquitos como en las zonas urbanas, agrícolas e industriales, causando un gran impacto y afectando los mecanismos de resistencia hacia los mosquitos (David *et al.*, 2010).

Los factores que actúan en el desarrollo temporal de la resistencia a los insecticidas, son algunos cambios fisiológicos como mutaciones en las proteínas que son blanco de los insecticidas, generando insensibilidad por cambio de estas moléculas (Hemingway and Ranson, 2000). El uso de insecticidas mostró que la agricultura contribuye en la selección de resistencia en los mosquitos, amenazando la eficacia de los programas de control de vectores (Chouaibou *et al.*, 2008; Diabate *et al.*, 2002; Yadouleton *et al.*, 2009, 2011). De hecho, la mayoría de los insecticidas utilizados en la agricultura son de las mismas clases químicas y tienen los mismos objetivos y modos de acción que los utilizados para el control de vectores (Khambay y Jewess, 2010). En la actualidad, los piretroides se utilizan ampliamente para proteger cultivos contra insectos plaga (Khambay y Jewess, 2010), no obstante se ha demostrado el mecanismo de desarrollo de resistencia a éstos por parte de los mosquitos. Además de pesticidas e insecticidas, los productos químicos comúnmente utilizados en la agricultura también incluyen fertilizantes, herbicidas, fungicidas y diversos adyuvantes que aumentan su eficacia al desarrollo de la resistencia. Aunque estos

compuestos generalmente no son tóxicos para los insectos, se demostró que su presencia en los sitios de reproducción afecta la tolerancia a los insecticidas a través de la modulación de su sistema de desintoxicación (Li *et al.*, 2009).

## 2.6 Insecticidas y sus sitios activos.

La resistencia de los mosquitos a los insecticidas químicos amenaza los programas de control de vectores en todo el mundo, a partir de lo cual, surge la necesidad de descubrir nuevos sitios blancos y compuestos específicos para el desarrollo de insecticidas. Existen grandes grupos de insecticidas utilizados en la actualidad para el control de mosquitos vectores. Estos son: organofosforados (OF), organoclorados (OCs), carbamatos, piretroides, reguladores del crecimiento e insecticidas microbianos y Spinosad (Sebastien *et al.*, 2014; Callaghan *et al.*, 1993). Los cuatro primeros actúan por afectación de la transmisión de los impulsos nerviosos, mientras que los otros dos interfieren en el desarrollo y permeabilidad de la membrana plasmática de las células nerviosas de los insectos. La mayoría de los mecanismos de resistencia a insecticidas pueden clasificarse en dos grupos principales, las modificaciones de las moléculas blanco provocando insensibilidad en el sitio destino (es decir, la insensibilidad del canal de sodio, la acetilcolinesterasa y el receptor GABA) o el aumento de la desintoxicación metabólica (alteraciones en los niveles o actividades de las proteínas de desintoxicación). Además, muchos insecticidas también provocan cambios fisiológicos y de comportamiento, cambiando sus hábitos y no contacta con el depósito del insecticida (Cole *et al.*, 1993).

## 2.7 Modo de acción de los insecticidas

Los insecticidas son capaces de matar insectos penetrando en sus cuerpos a través del contacto directo (entrada dérmica), entrada oral y/o respiratoria (Kim *et al.*, 2017). La mayoría de los insecticidas químicos en uso hoy en día son neurotóxicos y actúan envenenando el sistema nervioso del organismo objetivo (Casida, 2009).

### 2.7.1 Insecticidas organofosforados

Organofosforados es el nombre general para derivados orgánicos de fósforo, son los insecticidas más comúnmente utilizados en el mundo porque su estructura química inestable conduce a una rápida hidrólisis y poca acumulación a largo plazo en el medio ambiente

(Juan, 2002). La toxicidad aguda por organofosforado se inicia con una inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), esta enzima se clasifica como una B esterasa cuyo papel principal es la hidrólisis de la acetilcolina (ACh), que es un neurotransmisor importante en el sistema nervioso periférico y central. Esta inhibición interrumpe la capacidad de la enzima para unirse a su sustrato normal con la posterior acumulación de ACh en las terminaciones nerviosas (Jokanovic, 2001 and Remington, 2010). En consecuencia, se produce una sobre estimulación seguida de desensibilización de los receptores ACh muscarínicos y nicotínicos. La inhibición de AChE se produce después de la fosforilación del grupo hidroxilo en la serina en el sitio activo de la enzima, dependiendo del grado de inhibición de la AChE, la estimulación colinérgica puede conducir a la hiperactividad de los tejidos excitables, causando fasciculación, convulsiones, parálisis muscular severa, hipersecreción de las glándulas secretoras, insuficiencia respiratoria, coma y muerte (Milatovic *et al.*, 2016; Jokanovic, 2010).

### **2.7.2 Insecticidas carbamatos**

La inhibición de AChE por un insecticida carbamato, se produce por un mecanismo prácticamente idéntico al descrito anteriormente para un éster de organofósforo (Fukuto, 1990). Al igual que con los organofosforados, los signos y síntomas se basan en una estimulación colinérgica excesiva. A diferencia de la intoxicación por organofosforados, las intoxicaciones por carbamatos tienden a ser de menor duración porque la inhibición de la AChE del tejido nervioso es reversible y los carbamatos se metabolizan más rápidamente (Fishel, 2011).

### **2.7.3. Insecticidas piretroides**

Debido a su toxicidad relativamente baja para los mamíferos en contraste con los insecticidas organofosforados, los piretroides sintéticos se encuentran entre los pesticidas más frecuentemente utilizados y representan más de un tercio de los insecticidas actualmente comercializados en el mundo (Lei *et al.*, 2017). El primer pesticida piretroide, la aletrina, se identificó en 1949. Su estructura y las de otros piretroides con la estructura de éster carboxílico de ciclopropano básico se llamaron piretroides de tipo I. La actividad insecticida de los piretroides sintéticos se mejoró aún más mediante la adición de un grupo ciano en el átomo de carbono bencílico para dar piretroides  $\alpha$ -ciano (tipo II), tales como

cifenotrina y cipermetrina (Bradberry *et al.*, 2005). Los principales efectos tóxicos de los piretroides son en los canales de sodio y cloruro. Como resultado, las células excitables (nerviosas y musculares) son los objetivos principales de la toxicidad de los piretroides, que se manifiesta como una función desordenada en lugar de un daño estructural (Bradberry *et al.*, 2005). Lo anterior, reduce la velocidad de la activación de canales de sodio activados por voltaje (VGSC), lo que conduce a una disminución en el pico de corriente de  $\text{Na}^+$ , ralentizando la inactivación y desactivación de los VGSC, conduciendo a un tiempo abierto y prolongado de estos canales. Los piretroides tipo II prolongan el tiempo de apertura del canal más que los piretroides tipo I. Si el tiempo de apertura del canal es mayor, más  $\text{Na}^+$  ingresa a la célula y conduce a la hiperexcitabilidad con piretroides tipo I, despolarización de la membrana y bloqueo de conducción con piretroides tipo II. Aunque no todos los VGSC son alterados por los piretroides, la modificación de un pequeño porcentaje de VGSC puede aumentar sustancialmente la corriente de  $\text{Na}^+$  (Shafer *et al.*, 2005; Wakeling *et al.*, 2012).

## 2.8 Importancia de la resistencia a insecticidas

El control de los mosquitos vectores fue durante mucho tiempo una parte fundamental de la estrategia mundial para manejar las enfermedades asociadas a los mosquitos (OMS, 2000) y, los insecticidas son el componente más importante en este esfuerzo. En la actualidad, los piretroides y los carbamatos son los insecticidas más ampliamente utilizados como aspersores de interiores de vivienda en todo el mundo, debido a su eficacia y seguridad. Este tipo de insecticida, es el único producto químico utilizado para el tratamiento de mosquiteros y cortinas con insecticidas (MTI), para la prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores. (WHO 2007; WHO 2009). Sin embargo, las enfermedades transmitidas por mosquitos están en aumento, en gran parte debido a la creciente resistencia de los mosquitos a los insecticidas (Hemingway 2002; Kelvin 2011). La investigación sobre la resistencia a los insecticidas en los mosquitos proliferó desde la década de 1950, cuando se publicó el primer informe sobre la resistencia de los mosquitos a los insecticidas a base de hidrocarburos clorados (Gjullen, 1952). Investigadores de todo el mundo intentan dilucidar los mecanismos que rigen el desarrollo de la resistencia a los insecticidas, un primer paso vital hacia la creación de nuevas

estrategias más eficaces para prevenir la resistencia, controlar los mosquitos resistentes y, en última instancia, reducir la prevalencia de enfermedades transmitidas por mosquitos (Hemingway *et al.*, 2002).

### **2.8.1 Resistencia debido a la insensibilidad del sitio blanco alterado**

La insensibilidad de los mosquitos a los insecticidas, debido a una modificación estructural o mutación (mutación puntual) de genes que codifican para proteínas blanco que interactúan con los insecticidas (Casida, 2013). Los insecticidas, como DDT y los piretroides se dirigen a los canales de sodio. Después de unirse a estos canales de sodio, provocan que el sistema nervioso del insecto se descargue repetidamente y sus membranas nerviosas se despolaricen (Narahashi 1988), lo que provoca la muerte. La AChE es una enzima clave en el sistema nervioso, que hidroliza los neurotransmisores de la acetilcolina y los impulsos nerviosos terminales y, es el objetivo de los insecticidas del grupo de los organofosforados. Los insecticidas de ciclodieno y fipronil se dirigen a los receptores de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Cole *et al.*, 1993; Cole *et al.*, 1995; ffrench-Constant *et al.*, 2000).

#### **2.8.1.1 Insensibilidad del canal de sodio**

Los canales de sodio de insectos son reconocidos ampliamente en virtud de la gran cantidad de evidencia fisiológica, como el objetivo principal para el DDT y los piretroides sintéticos, que son derivados estructurales de las piretrinas naturales, alterando sus propiedades de compuerta y manteniéndolos abiertos durante un tiempo inusualmente largo (Narahashi T., 1988). La frecuencia de mutaciones en el canal de sodio de los mosquitos *Culex* se ha correlacionado con los niveles de resistencia a los insecticidas piretroides (Xu *et al.*, 2006a), la insensibilidad del canal de sodio, es el resultado de las modificaciones en la estructura del canal provocado por mutaciones puntuales o sustituciones de un solo nucleótido, reduciendo la afinidad de los insecticidas con las moléculas blanco (Rinkevich *et al.*, 2013; Soderlund, 2005). Esto también, quizás indirectamente, altera las propiedades de compuerta del canal de sodio (Oliveira EE *et al.*, 2013; Rinkevich *et al.*, 2013), disminuyendo los efectos tóxicos de los insecticidas y dando como resultado la resistencia a los insecticidas. Uno de los mecanismos de resistencia más importantes en mosquitos, es la insensibilidad reducida del canal de sodio dependiente de

voltaje a los insecticidas, que también se conoce como resistencia al derribo (*kdr*). Los insectos que exhiben *kdr* tienen una sensibilidad reducida del sitio blanco (canal de sodio) a los piretroides y al DDT, que resulta de una o más mutaciones puntuales en sus proteínas del canal de sodio (Enayati *et al.*, 2003, Knipple *et al.*, 1991, Li *et al.*, 2012). El importante papel que desempeñan los canales de sodio en la resistencia a los insecticidas llevó a muchos investigadores a estudiar la biología del canal de sodio de insectos.

#### **2.8.1.1.1 Estructura y función del canal de sodio**

Los canales de sodio controlados por voltaje son proteínas integrales transmembrana responsables de la fase de aumento rápido de los potenciales de acción y, son críticos para la señalización eléctrica en la mayoría de las células excitables (Dong, 2007). En respuesta a la despolarización de la membrana, los canales de sodio se abren (activan) y permiten que los iones de sodio fluyan hacia la célula, despolarizando así el potencial de la membrana. Unos pocos milisegundos después de la activación del canal, el poro del canal está ocluido, un proceso conocido como inactivación rápida, que es parcialmente responsable de la fase de caída del potencial de acción (Yu and Catterall, 2003). Los canales de sodio son "puertas" especiales dentro de la membrana que separa las células nerviosas (neuronas) del ambiente circundante (el fluido extracelular). Estos canales se abren o cierran dependiendo de los estímulos eléctricos o químicos. Cuando se abren, dejan pasar los iones de sodio cargados. Los iones de sodio fluyen entre las neuronas y el fluido extracelular para establecer el estado del potencial de carga eléctrica cuando la neurona está en reposo (el potencial de reposo) y para liberar ese potencial cuando la neurona envía un impulso nervioso (el potencial de acción) (Dong, 2007) Fig.2.

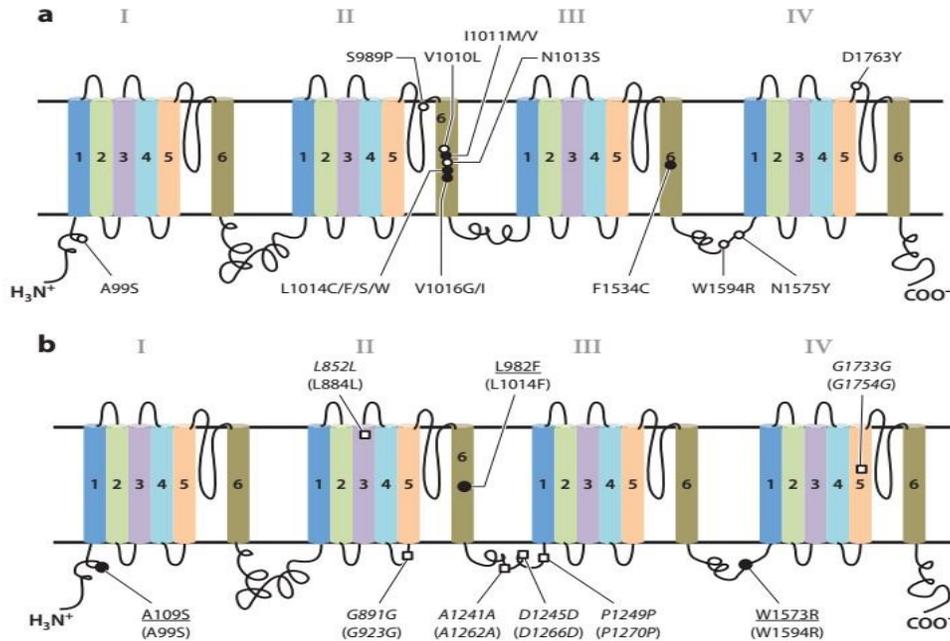


Figura 2. Representación gráfica de las mutaciones localizadas en el canal de sodio asociadas a la resistencia a insecticidas piretroides en mosquitos. Tomado de Dong, 2007. (a) La proteína del canal de sodio contiene cuatro repeticiones homólogas (I-IV), cada una con seis dominios transmembranal. (b) Mutaciones sinónimas (etiquetas en cursiva) y no sinónimas (etiquetas subrayadas) identificadas en un canal de sodio completo de una cepa resistente de *Cx. quinquefasciatus*.

Los canales de sodio están compuestos por una subunidad  $\alpha$  formadora de poros y una o más subunidades  $\beta$ . Se encuentran subunidades  $\alpha$  de canales de sodio múltiples en mamíferos (Catterall, 2014; Goldin, 2002). Las subunidades  $\alpha$  de los canales de sodio tienen cuatro dominios homólogos (I-IV), cada dominio posee seis segmentos transmembrana. En cada dominio, los segmentos 1-4 (S1-S4) constituyen el módulo de detección de voltaje, mientras que S5, S6 y un bucle de reentrada de membrana que conecta los segmentos S5 y S6 (llamado región P) forman el módulo de poro. Las subunidades  $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 4) son pequeñas proteínas transmembrana que poseen un dominio de inmunoglobulina extracelular, un único segmento transmembrana y un dominio C terminal corto intracelular (Brackenbury and Isom, 2011; Catterall, 2000). La co expresión de las subunidades  $\beta$  modula la expresión del

canal de sodio y las propiedades de compuerta (Brackenbury and Isom, 2011; Catterall, 2000).

Sin embargo, estos canales de sodio de cuatro dominios no están identificados en procariotas. Un estudio (Ren *et al.*, 2001) reportó sobre un canal de sodio bacteriano en la bacteria de la sal *Bacillus halodurans*. Este canal de sodio dependiente de voltaje de dominio único tiene una secuencia y características farmacológicas similares a las del canal de calcio. Tres características clave de los canales de sodio son la activación dependiente de voltaje, la inactivación rápida y la conducción selectiva de iones. El poro externo del canal de sodio está formado por los bucles de reentrada entre los segmentos transmembrana S5 y S6 de cada dominio. Se cree que dos aminoácidos importantes en posiciones análogas en los cuatro dominios forman los anillos externo e interno cargados negativamente que sirven como un sitio receptor para bloqueadores de poros y el filtro de selectividad. Las mutaciones de estos residuos tienen efectos significativos sobre la unión de neurotoxinas, como la tetrodotoxina y la saxitoxina (Noda *et al.*, 2000).

#### **2.8.1.1.2 Resistencia “knockdown” en mosquitos**

Para el control de los mosquitos, se usan insecticidas químicos, a lo cual las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* desarrollaron resistencia a estos compuestos después de la exposición repetida a ellos (Rodríguez *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2003). Tanto los piretroides como el DDT, actúan sobre el sistema nervioso de los insectos y las sustituciones de un solo nucleótido en el canal de sodio son asociados a la resistencia a los insecticidas (Narahashi 1996). Se observó en varias especies de insectos, incluidos los mosquitos *Anopheles gambiae* Giles (Martinez-Torres *et al.*, 1998), *An. stephensi* Liston (Enayati *et al.*, 2003), *Cx. quinquefasciatus* Diga (Martinez-Torres *et al.*, 1999) y *Ae. aegypti* (Bregues *et al.*, 2003). Este mecanismo de resistencia se identificó por primera vez en la mosca doméstica *Musca domestica* (Milani, 1954), alterando las funciones normales del canal de sodio, originando una apertura prolongada de la misma causando más transmisiones de impulsos nerviosos, lo que lleva a la parálisis y la muerte del insecto (Soderlund y Bloomquist 1989, Narahashi 1992). El cambio de un solo nucleótido (TTA a TTT) en el segmento transmembranal hidrofóbico S6 del dominio II (dominio IIS6) en el canal de sodio dependiente de voltaje, contribuye en la sustitución de leucina por

fenilalanina (L1014F) reduciendo la afinidad del sitio blanco por insecticidas (O'Reilly *et al.*, 2006). El *kdr* es un mecanismo bien caracterizado de resistencia al piretroide y DDT, en *Culex*, solo se informó de algunos casos de esta mutación en diferentes partes del mundo (Chandre *et al.*, 1998, Martine-Torres *et al.*, 1999, McAbee *et al.*, 2004, Xu *et al.*, 2005; Wondji *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009). Se identificó a más de 20 mutaciones en el canal de sodio dependiente de voltaje en insectos que están involucrados en la reducción de la sensibilidad del canal a insecticidas o neurotoxinas (Park y Taylor 1997, Liu y Pridgeon, 2002, Pridgeon *et al.*, 2002; Soderlund y Knipple, 2003). Además, la mutación *kdr* en los mosquitos atrajo gran atención, debido a la importancia del piretroide en el control del mosquito en todo el mundo. La literatura actual sugiere que las mutaciones puntuales en los genes de los canales de sodio dependientes del voltaje de los insectos son la causa principal de la resistencia al derribo de los piretroides.

#### **2.8.1.1.3 Insensibilidad de la AChE**

Las enzimas AChE1 y AChE2, codificadas por los genes *ace-1* y *ace-2*, respectivamente, se han identificado en diferentes especies de mosquitos, entre ellas *Cx. quinquefasciatus* pero solo AChE1 está implicado en la resistencia de los mosquitos a los insecticidas OF y carbamatos (Alout *et al.*, 2008 Weill *et al.*, 2002, Weill *et al.*, 2003). Aunque se informó de varias mutaciones relacionadas con el desarrollo de la resistencia a insecticidas en otras especies de insectos, dos mutaciones del sitio activo de AChE1 en mosquitos resultan en insensibilidad o sensibilidad reducida en respuesta a insecticidas OF y carbamatos. La AChE termina los impulsos nerviosos al hidrolizar el neurotransmisor ACh. AChE en el sistema nervioso de insectos, es el objetivo principal de los insecticidas organofosforados y carbamato, que inhiben la actividad de AChE mediante la fosforilación o carbamilación del residuo de serina en el sitio activo de la enzima (Weill *et al.*, 2003). El uso extensivo de insecticidas organofosforados y carbamatos resultó en el desarrollo de altos niveles de resistencia entre los insectos (Kwon *et al.*, 2010, Chandre *et al.*, 1997). Varios estudios encontraron evidencia de que una mutación puntual en el gen *ace1* está asociada con la resistencia a pesticidas OF y carbamatos. Esta mutación puntual cambia la estructura de la AChE haciéndolo insensible a los mosquitos ante estos insecticidas. La sustitución G119S está reportada en varias especies de mosquitos, incluyendo *An. gambiae*,

*An. albimanus*, *Cx. vishnui*, *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* (Alout *et al.*, 2008, Liu *et al.*, 2005, Weill *et al.*, 2003). Un estudio funcional de *ace1* en el sistema de células de baculovirus-insecto reveló que la resistencia a OF en *Cx. tritaeniorhynchus* resultó de la sustitución de F455W en *ace-1* (Nabeshima *et al.*, 2004). Se informó la sustitución de F455W en *Myzus persicae* resistente a carbamato (Nabeshima *et al.*, 2004), araña roja *Tetranychus urticae* resistente a OF (Anazawa *et al.*, 2003.) y *Bemisia tabaci* de biotipo B resistente a OF (Alon *et al.*, 2008), lo que sugiere la importancia de esta mutación en insectos resistentes en general.

#### **2.8.1.1.4. Insensibilidad del receptor del ácido gamma amino butírico (GABA)**

El ácido gamma aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en los sistemas nerviosos de vertebrados e invertebrados (French-Constant *et al.*, 1993). Los receptores GABA están localizados en los canales de los iones Cl<sup>-</sup> de la membrana nerviosa los cuales controlan el flujo de estos iones a través de la misma y es el neurotransmisor inhibitorio principal en insectos y mamíferos y sirve como el agonista para abrir el canal de cloro transmembrana pentamérico (Cole *et al.*, 1993, Cole *et al.*, 1995). La unión de GABA a su receptor activa el canal selectivo de ion cloruro (Hemingway *et al.*, 2004). El receptor GABA es el sitio blanco de los insecticidas de ciclodieno y fenilpirazoles (French-Constant *et al.*, 2000).

El receptor GABA consta de cinco subunidades, cada una de las cuales contiene un ciclo Cys extracelular y cuatro dominios transmembrana (M1-M4). El dominio transmembrana M2 constituye la porción principal del canal iónico (Bloomquist, 2003). Una mutación puntual que resulta en una sustitución de Alanina 296 por Serina / Glisina (A296S / G) es clave en el receptor GABA para la resistencia a la dieldrina en muchos insectos (Djouaka *et al.*, 2008, French-Constant *et al.*, 1993, Wondji *et al.*, 2011). La sustitución A296G se observó en *An. gambiae* (Du *et al.*, 2005), mientras que la sustitución A296S está asociada con la resistencia a la dieldrina en *An. arabiensis*, *An. stephensi*, *An. funestus* y *Ae. aegypti* (Du *et al.*, 2005, French-Constant *et al.*, 2000, Wondji *et al.*, 2011). Se informó un menor nivel de resistencia al fipronil en varias especies de mosquitos; estos incluyen *Cx. quinquefasciatus* y *An. stephensi* (Davari *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2005). Sin embargo, no están implicadas mutaciones específicas en las secuencias

codificantes de los receptores GABA en el desarrollo de resistencia al fipronil, lo que sugiere que diferentes mecanismos o mutaciones pueden estar implicados en la resistencia a diferentes insecticidas con el mismo modo de acción.

### **2.8.2. Resistencia debido a la desintoxicación metabólica de insecticidas**

Los mecanismos metabólicos contribuyen a una disminución en la dosis efectiva disponible en el sitio blanco. A pesar del pequeño número de familias de genes hasta ahora implicadas en la resistencia metabólica, una gran cantidad de mecanismos moleculares desencadenan cambios en la función de la enzima de desintoxicación, la expresión o ambos (Li *et al.*, 2007). La resistencia mediada por las enzimas de desintoxicación se asocia principalmente con la sobre regulación, la variante alélica o la amplificación génica, aunque algunos de estos mecanismos no se observan en las tres familias de genes de desintoxicación (Bass y Field, 2011). La desintoxicación de insecticidas en los mosquitos involucra a tres familias principales de genes de desintoxicación metabólica: citocromo P450 (P450), esterasas y glutatión S-transferasas (GST) (Vontas *et al.*, 2005). Se observó una sobreexpresión de P450 en los mosquitos *An. gambiae* resistentes a la permetrina (Vulule *et al.*, 1999) y *An. albimanus* (Brogdon *et al.*, 1999). CYP6Z1, un gen P450 específico de un adulto, se identificó en *An. gambiae* asociado con la resistencia piretroide (Nikou *et al.*, 2003). Los P450 son una de las familias de genes más grandes en todos los organismos vivos y cumplen un grupo muy diverso de funciones fisiológicas y bioquímicas, son críticos para la desintoxicación y activación de xenobióticos y compuestos endógenos (Feyereisen, 2005). Se documentó aproximadamente un nivel elevado de 2.5 veces de CYP6F1 en *Cx. quinquefasciatus* que están asociados con la resistencia a insecticidas (Kasai *et al.*, 2000). Se encontró una sobreexpresión de los miembros de la familia CYP4 de *Cx. pallens* asociada con la resistencia a deltametrina (Shen *et al.*, 2003). Este gen se encuentra dentro de los límites de un locus de rasgo cuantitativo en el brazo cromosómico 3R asociado con la resistencia a la permetrina en esta especie (Ranson *et al.*, 2004).

Las GST son proteínas diméricas solubles que están involucradas en el metabolismo, desintoxicación y excreción de una gran cantidad de compuestos endógenos y exógenos (Ketterman *et al.*, 2011, Ranson, 2005, Ranson *et al.*, 2001). Una característica importante de los insectos P450 y GST es su aumento en la regulación transcripcional, que

da como resultado un aumento en los niveles de producción de proteínas y actividades enzimáticas. Esto, a su vez, mejora la desintoxicación metabólica de los insecticidas y las toxinas de las plantas en los insectos y conduce al desarrollo de resistencia a los insecticidas (Feyereisen, 2005, Scott, 1999) y tolerancia a las toxinas de las plantas (Berenbaum, 1991, Li, 2007, Schuler, 1996, Schuler, 2011). También se conoce que la amplificación/duplicación de genes que codifican P450, está implicada en el desarrollo de la resistencia a los insecticidas (Itokawa *et al.*, 2010, Riveron *et al.*, 2013, Wondji *et al.*, 2009).

Las esterasas, son un grupo de enzimas heterogéneas, están presentes en la mayoría de los organismos. Su sobreproducción se estudió extensamente, ya que la amplificación y/o sobreexpresión ocasional de genes de esterasas aumenta la producción de proteínas de desintoxicación (Pasteur, 1996, Raymond *et al.*, 1998, Vaughan, 1995). Como sucede con otras especies de insectos, la investigación sobre las enzimas de desintoxicación metabólica involucradas en el desarrollo de resistencia a insecticidas en mosquitos progresó desde los estudios sinérgicos iniciales hasta la caracterización compleja, desde el análisis de secuencia de gen único a genoma completo, desde la expresión de un solo gen a las interacciones de múltiples genes, y del análisis transcripcional tradicional (Liu *et al.*, 2007) a la caracterización funcional de proteínas (Chiu *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2014, Riveron *et al.*, 2013). Los cambios cuantitativos de esterasas (esterasas elevadas), que dan como resultado una producción de proteínas abundantes en insectos resistentes, se documentó en *Cx. pipens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tritaeniorhynchus* (Hemingway y Karunaratne, 1998), *An. gambiae* (Vulule *et al.*, 1999), *An. albimanus* (Brogdon y Barber, 1990) y *Ae. aegypti* (Mourya *et al.*, 1993) asociados con la resistencia a los insecticidas. Los cambios cualitativos de las esterasas, que dan como resultado el aumento de las actividades de las esterasas, también se identificó en *An. culicifacies*, *An. stephensi* y *An. arabiensis* (Herath *et al.*, 1987).

### **2.8.3. Otros mecanismos de resistencia a insecticidas**

#### **2.8.3.1 Resistencia conductual o de comportamiento**

Algunos insectos de importancia agrícolas y médicos, incluidos los mosquitos, demostraron lo que se denomina "resistencia al comportamiento" ya que es una respuesta

innata e involuntaria a un estímulo externo en lugar de un cambio permanente en el comportamiento basado en la genética, ya que estos cambios es debido a la presión selectiva del insecticida (Theeraphap *et al.*, 2013). La resistencia conductual se define como el desarrollo de comportamientos que reducen la exposición de un insecto a una toxina o que permiten que un insecto sobreviva en un ambiente que es dañino y/o fatal para la mayoría de otros insectos (Zalucki, 2017). Este mecanismo se puede dividir en dos grupos, dependiente del estímulo (requiere estimulación sensorial) e independiente del estímulo (ausencia de estimulación sensorial). Se identificó la resistencia conductual al fenvalerato y la permetrina en la mosca del cuerno (Lockwood *et al.*, 1985). La resistencia conductual a los piretroides también se documentó en la cucaracha alemana (Ross, 1992). El comportamiento de los mosquitos resistentes se encontró induciendo el cambio en los tiempos de mordedura evitando y reduciendo los contactos con el insecticida (Mbogo *et al.*, 1996; Mathenge *et al.*, 2001).

#### **2.8.3.2 Penetración reducida**

Para llegar a su sitio objetivo, los insecticidas deben pasar a través de la cutícula del insecto. Como resultado, otros factores pueden estar directa o indirectamente involucrados en la expresión del fenotipo de resistencia (Wood *et al.*, 2010). Una posibilidad es el engrosamiento cuticular. Las cutículas más gruesas conducen a tasas más bajas de absorción de insecticidas, lo que probablemente mejore la eficiencia de la desintoxicación metabólica. La penetración más lenta de insecticidas a través de la cutícula (aunque no necesariamente el resultado del engrosamiento de la cutícula) se asoció con la resistencia a los insecticidas en el algodoncillo *Helicoverpa armigera* (Ahmad *et al.*, 2006, Gunning *et al.*, 1995).

#### **2.8.3.3 Excreción acelerada**

Para alcanzar su objetivo, un insecticida primero debe penetrar en la cutícula del insecto (Fig. 3). La resistencia a la penetración ocurre cuando los insectos tienen alteraciones físico-químicas a la estructura de su cutícula que resulta en una absorción más lenta de los químicos o en una cantidad reducida del insecticida que pasa a través de estas barreras físicas. Este mecanismo protege a los insectos de una amplia gama de insecticidas, una penetración retrasada y más lenta puede proporcionar más tiempo para la desintoxicación del insecticida por las enzimas (Scott, 1990; Strycharz *et al.*, 2013; Kasai

*et al.*, 2014). Recientemente, surgió evidencia indirecta de la importancia de este mecanismo en el áfido verde del melocotón, en el que se encontró que varias proteínas cuticulares se expresaban diferencialmente en poblaciones resistentes a los neonicotinoides (Puinean *et al.*, 2010). Además, la resistencia a los insecticidas piretroides está asociada con la estructura y la composición de la cutícula en los mosquitos debido a que la penetración del insecticida, esta en dependencia de las características físicas de la molécula tóxica y de las propiedades del tegumento interno del insecto (Fang *et al.*, 2015; Wood *et al.*, 2010).

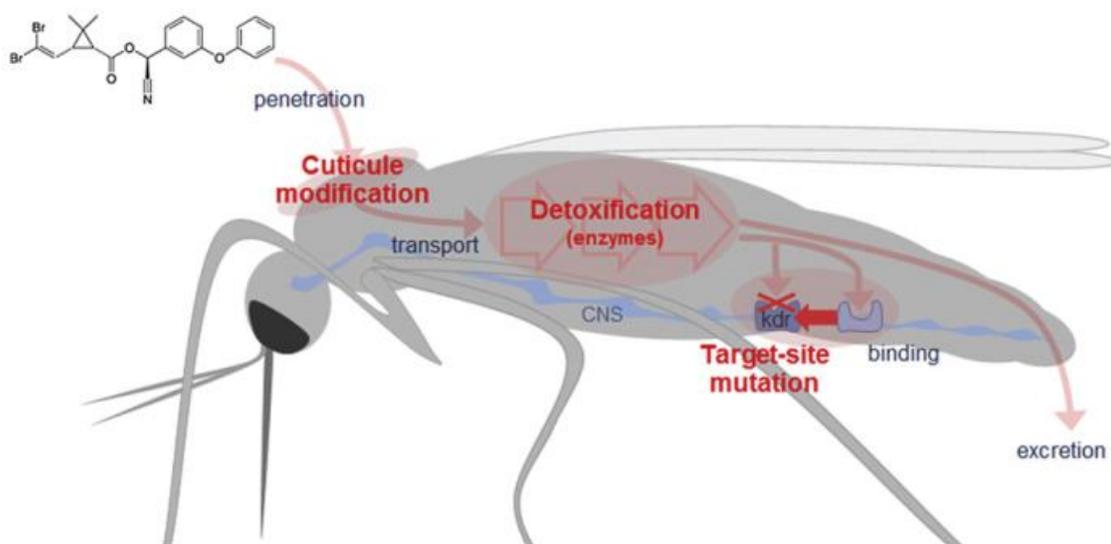


Figura 3. Principales pasos de toxicidad de los insecticidas piretroides y los mecanismos de resistencia asociados en los mosquitos. SNC: sistema nervioso central. La molécula piretroide representada es deltametrina. Tomado de (Nkya *et al.*, 2013)

#### 2.8.4 Detección de la resistencia

Detectar los niveles de resistencia es una herramienta esencial para permitir la decisión que se tomará cuando sea conveniente cambiar el producto y la clase de insecticida a favor de otro antes de que el control de insectos falle y el riesgo de la transmisión de la enfermedad aumente. La resistencia a los pesticidas surge cuando los insectos sobreviven a las dosis de insecticida, que pueden ser resultado de una tolerancia a una aplicación inadecuada. Cualquier supervivencia a las concentraciones de insecticidas usadas en el control de vector operacional puede volverse problemática si el mecanismo subyacente tiene una base hereditaria, que es comúnmente el caso de los mecanismos de resistencia

bioquímicos y fisiológicos. (Hemingway *et al.*, 2004) La selección causa una proporción progresivamente más alta de individuos en la población para sobrevivir a la exposición de los insecticidas. En consecuencia, un aumento en la prevalencia de resistencia debería actuar como una señal de advertencia de la futura pérdida de eficacia insecticida, que lo ideal sería ser un estímulo para promover una acción correctiva. (Toe, 2014).

Los bioensayos también se pueden usar para cuantificar el nivel de resistencia al insecticida ya sea por el registro de la mortalidad de mosquitos en una serie de concentraciones de insecticidas o periodos de exposición. Ambos métodos puede dar una buena caracterización de la resistencia de una población de vectores. (Hemingway and Karunaratne., 1998; Brogdon, W.G. 1984)

Los métodos bioquímicos y moleculares pueden detectar mecanismos específicos de resistencia y detectar genes de resistencia, cuando estos aun estén en bajas frecuencias (Brogdon, 1984). Las pruebas bioquímicas están disponibles para la evaluación de las esterasas inespecíficas, oxidasas de función mixta, glutatión S-transferasas y acetilcolinesterasas inhibidas, las cuales pueden ser detectadas en un mismo individuo. Actualmente se dispone de estudios comparativos de la estructura y función de los genomas totales (Ranson *et al.*, 2000b) las cuales permitirán descubrir nuevas moléculas blanco para el desarrollo de nuevas clases de insecticidas, así como las investigaciones sobre la genómica funcional lo cual permitirá determinar cambios moleculares precisos que resulten en fenotipos de resistencia (Hemingway *et al.*, 2002).

### III. JUSTIFICACIÓN

El mosquito *Culex quinquefasciatus* es un miembro del complejo *Culex pipiens*, considerado como vector principal de *Wuchereria bancrofti* y de múltiples enfermedades arbovirales, que representan una amenaza en la salud animal y humana, presentando una amplia distribución geográfica. Además, las picaduras de estos mosquitos pueden causar alergias graves al hombre provocándole lesiones cutáneas pruriginosas. Las altas densidades de *Cx. quinquefasciatus* así como de otros mosquitos, está basado en la ecología de éstos, así como en la aplicación de insecticidas que son dirigidos a los estados inmaduros y los adultos.

Aunque esta medida puede ser efectiva por un tiempo, el uso frecuente de insecticidas químicos (principalmente piretroides y OF) contribuye a seleccionar varios mecanismos de resistencia en poblaciones específicas de mosquitos. En el estado de Yucatán, *Cx. quinquefasciatus* es abundante durante todo el año, pero con mayores picos en la temporada de lluvia, además se alimenta tanto del humano como de animales. Aunado a esto, fue detectado que estos mosquitos están infectados con el VON en México.

A pesar de su importancia como vector potencial de arbovirus en nuestro país, se sabe poco sobre la distribución y la presencia de subpoblaciones, así como de resistencia a insecticidas en esta especie. La fuerte dependencia de los insecticidas piretroides y organofosforado para controlar las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* en el estado, ha llevado a la presencia de mutaciones en estos insectos, lo que confiere resistencia al derribo. Por esta razón, es importante realizar estudios de susceptibilidad y resistencia a insecticidas por área rural y urbana de *Cx. quinquefasciatus* en el estado de Yucatán. Esto ayudará a planear y reforzar las medidas de control de mosquitos que se llevan a cabo en Yucatán.

## **IV. HIPÓTESIS**

La aplicación continua de insecticidas en las campañas de control de vectores, permite al *Cx. quinquefasciatus* desarrollar mecanismos de resistencia, lo cual determinaría el tipo y grado de resistencia en las poblaciones seleccionadas en el estado de Yucatán.

## V. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Determinar el estado de susceptibilidad o resistencia, así como los factores que contribuyen al desarrollo de un hábitat como criadero de éxito en las poblaciones de *Culex quinquefasciatus* en el estado de Yucatán.

### 5.2. Objetivos específicos

1. Determinar los hábitats larvales con mayor productividad pupal de *Cx. quinquefasciatus*.
2. Determinar la frecuencias de mutaciones que confieren resistencia a piretroides en poblaciones de mosquitos *Cx. quinquefasciatus* Say 1823.
3. Determinar los mecanismos enzimáticos involucrados en la resistencia a insecticidas de las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* Say 1823 mediante estudios bioquímicos.
4. Comparar frecuencias genéticas de las mutaciones encontradas en los mosquitos *Cx. quinquefasciatus* Say 1823 entre poblaciones.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Área de estudio

Este estudio se realizó en el estado de Yucatán ubicado en la península de Yucatán, región sureste del país, limitado al norte con el Golfo de México, al sureste con el estado de Quintana Roo y al suroeste con el estado de Campeche. La superficie del estado es de 43 379 km<sup>2</sup> ubicándolo en el lugar número 20 de los estados de México por superficie, representando aproximadamente, el 2.21% de la superficie del país. También cuenta con 340km de costa, lo que lo representa el 3.1% del total nacional, con un clima cálido y subhúmedo durante todo el año, presentando dos temporadas climáticas bien marcadas. La temporada de lluvia abarca los meses de mayo a octubre, en el cual la temperatura media mensual es de 27.54°C, la temperatura máxima promedio es alrededor de 36°C y con precipitación media de 1,000 mm. Mientras que la temporada de secas comprende los meses de noviembre a abril donde la temperatura media mensual es de 25. 14°C y con precipitación media de 300 mm. (<http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/yuc/territorio/clima.aspx?tema=m&e=31>).

### 6.2 Sitios de colecta de estados inmaduros

En este estudio se seleccionaron 10 sitios que corresponde a 5 zonas urbanas y 5 zonas rurales seleccionando las colonias como Juan Pablo II, ubicada al oeste dentro de la ciudad de Mérida, Vergel III ubicada al este de la ciudad y la colonia del centro. Así como las ciudades de Umán, ubicada al noroeste del estado de Yucatán en México, a una distancia de 18 kilómetros al suroeste de Mérida, y Kanasín ubicada al este, es uno de los municipios conurbados de la región metropolitana que se integra junto con la ciudad de Mérida. El municipio de Hunucmá ubicado en la costa del Golfo de México, en la región noroeste de

la península de Yucatán, y Motul que se encuentra al norte de Yucatán, México. El comisario de Caucel, ubicado al sureste de México, el municipio de Chocholá se encuentra al oeste del estado aproximadamente a 21 kilómetros al suroeste de la ciudad de Mérida y la localidad XKalakdzonot se encuentra en el municipio de Chancóm ubicado en el centro sur del estado (Fig. 4). Los sitios fueron seleccionados basados en los reportes y casos de dengue obtenidos en estudios realizados con *Ae. aegypti* (García-Rejón *et al.*, 2008, 2011b; Baak-Baak *et al.*, 2014a; Cigarroa-Toledo *et al.*, 2016), incluyendo zonas urbanas y rurales como se muestra en el apéndice A.

### 6.3 Obtención del material biológico

Las colectas fueron realizadas durante el año, entre Junio de 2015 y enero de 2016, se colectaron estados inmaduros (huevo, larva y pupa) de mosquitos del genero *Culex* en una ocasión en cada área de estudio en zonas urbanas y en zonas rurales, durante la temporada de secas y de lluvias. La colecta se realizó de acuerdo con las técnicas estándar de inmersión en criaderos de vidrio, plástico, aluminio, hule y cemento ubicados al aire libre con la ayuda de pipetas de plástico y mallas (100 µm). Los criaderos fueron etiquetados según el índice de turbidez o colorímetro del agua (transparente, semioscura y oscura) para poder determinar el desarrollo exitoso de *Cx. quinquefasciatus*. Los estados inmaduros colectados fueron almacenados y marcados en botellas de plástico y transportados al laboratorio Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" de la Universidad Autónoma de Yucatán, México, fueron colocados en charolas de plástico de 25 x 30 cm de ancho y alimentados con concentrado canino molido en proporciones de 0.05g por cada litro de agua con una capacidad de 70 larvas por charola para mantener las colonias estables y bien alimentadas con una temperatura entre 25 y 26°C. Al emerger los adultos se colocaron en jaulas entomológicas y alimentadas con sangre de ratón, complementando su alimentación con azúcar y agua impregnados en una torunda. Las condiciones imperantes en el insectario fueron de 12:12 horas (luz: oscuridad), 28°C de temperatura y 70-80% de humedad relativa. Posteriormente fueron contabilizados e identificados de acuerdo con las claves estándar (Carpenter y LaCasse, 1955; Schick 1970; Clark-Gil y Darsie, 1983; Ibáñez-Bernal y Martínez-Campos, 1994). ; Darsie y Ward, 2005).

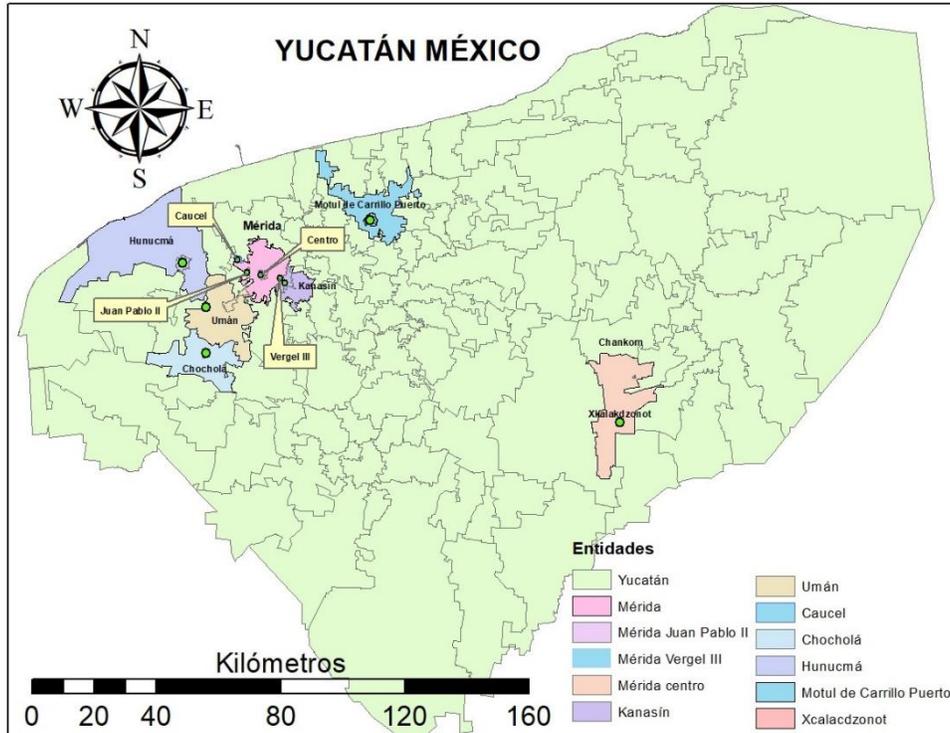


Figura 4. Sitios de colecta de estados inmaduros de *Cx. quinquefasciatus*, en áreas urbanas y rurales en el estado de Yucatán.

## 6.4 Determinación de frecuencia de la mutación L1014F en el gen del canal de sodio.

### 6.4.1 Extracción y purificación del DNA genómico

Para la extracción del DNA genómico de *Cx. quinquefasciatus*, fueron seleccionados 50 mosquitos hembras de aproximadamente dos días de haber emergido al estado adulto según los criterios de la OMS (1998). De acuerdo a la técnica de extracción de sales modificado por Black & DuTeau (2007). Fueron colocados cada mosquito de forma individual en tubos eppendorf y fueron macerados, el tejido triturado fue centrifugado a 3500 rpm durante 10 min. a 4°C, después del centrifugado, el sobrenadante fue colectado y resguardado a -70°C. el tejido triturado fue utilizado añadiéndole 50 µL de buffer de maceración (0.1 M NaCl, 0.2 M sacarosa, 0.1 M Tris HCl (pH 9.1-9.2), 0.05 M EDTA, 0.5% SDS), centrifugado durante 5 s, e incubado a 65°C en un baño seco por 30 min. Aun tibios los tubos se les añadieron 7 µL de 8 M de KCL (cloruro de potasio), fue incubado en hielo de 30 a 45 min. Fue centrifugado a máxima velocidad por 15 min a temperatura

ambiente. Los supernadantes obtenidos fueron transferidos a tubos eppendorf de 1.5 mL de manera individual, añadiéndole 100  $\mu$ L de etanol al 100%, mezclando e incubando a temperatura ambiente por 5 min posteriormente se centrifugo a 15 min y de manera cuidadosa fue removido el etanol y lavando nuevamente el precipitado con 100  $\mu$ L de etanol al 75%, se mezcló y centrifugo por 5 min y el etanol fue removido. El último paso fue lavar el precipitado nuevamente con etanol al 100%, se centrifugo y este fue removido. Se colocaron en el Speed Vac hasta que el DNA se apreció libre de etanol. El DNA fue re suspendido en un volumen de 100  $\mu$ L de buffer TE (Tris-EDTA pH 8.0) y almacenado a 4°C. las muestras extraídas fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

#### 6.4.2 PCR.

La mutación L1014F se determinó por PCR punto final de acuerdo con Martinez-Torres *et al.* (1999) y Ponce *et al.* (2015). Dónde se usaron para cada reacción 12.5 $\mu$ L de GoTaq® Green Master Mix, 2X (Promega; contiene: DNA polimerasa GoTaq®, buffer de reacción (pH 8.5), dATP 400  $\mu$ M, dGTP 400  $\mu$ M, dCTP 400  $\mu$ M, dTTP 400  $\mu$ M y MgCl<sub>2</sub> 3 mM), 1 $\mu$ L de cada uno de los iniciadores Cx1 y Cx2, 1 $\mu$ L de cebador Cx3 o Cx4, 2.5  $\mu$ l de agua destilada y 2 $\mu$ l de muestra de DNA.

CUADRO 1. Secuencia de los iniciadores utilizados en este estudio.

Iniciadores	Secuencia	Sentido
Cx1 (1014)	5'GTGGAACTTCACCGACTTC3'	5'-3'
Cx2 (1014)	5' GCAAGGCTAAGAAAAGGTTAAG 3'	5'-3'
Cx3 (Leu1014)	5' CCACCGTAGTGATAGGAAATTTA 3'	5'-3'
Cx4 (Phe1014)	5' CCACCGTAGTGATAGGAAATTTT 3'	5'-3'

Las muestras de DNA extraídas, fueron amplificadas en un volumen final de reacción de 20  $\mu$ L. Cada reacción contenía 12.5  $\mu$ L de GoTaq® Green Master Mix, 2  $\mu$ L de muestra de DNA, 1  $\mu$ L de cada cebador específico, 2.5  $\mu$ L de agua destilada (H<sub>2</sub>O) para ajustar a un volumen final de 20  $\mu$ L.

Dos reacciones de PCR fueron realizados, la primera reacción con 1  $\mu$ g de DNA genómico, fue amplificado un fragmento del gen del canal de sodio de aproximadamente 500 pares de bases, utilizando utilizando el cebador Cx1 y Cx2 (CUADRO 1). Las condiciones de temperatura utilizados en la primera reacción fueron: desnaturalización inicial de 95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos descritos de la siguiente manera: desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridación 55°C por 30 s, extensión 72°C por 1 min, extensión final después del último ciclo 72°C por 10 min. la segunda reacción de PCR, se realizó dos reacciones en paralelo para la misma muestra en la primera reacción, utilizando un par de iniciadores específicos Cx3 (TTA), Cx4 (TTT) amplificando con las siguientes condiciones de temperatura: desnaturalización inicial de 95°C por 1 min., seguido de 38 ciclos, con una desnaturalización de 94°C por 30 s, hibridación 58°C por 30 s, extensión 72°C por 1 min. y una extensión final después del último ciclo 72°C por 10 min. los resultados de la amplificación de las muestras de DNA se observaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Promega Corp., Madison, WI) teñidos con bromuro de etidio. La corrida se realizó a 80 V durante 1 h y posteriormente fue visualizado en un fotodocumentador ((Doc™ XR+ Gel) (Chang *et al.*, 2008).

La posición 1014 del gen tipo “para” del canal de sodio localizado en las membranas nerviosas de *Cx. quinquefasciatus*, su triplete está formado por TTA que codifica para el aminoácido leucina y esta mutación esta ubicada en el dominio II del segmento 6 del gen del canal de sodio sustituyendo A por T formando el triplete TTT que codifica para el aminoácido fenilalanina, relacionado con la resistencia a insecticidas. La frecuencia de esta mutacion está relacionada con la resistencia a insecticidas piretroides en *Cx. quinquefasciatus* (Martinez-Torres *et al.*, 1998).

### 6.4.3 Análisis de Datos

Los datos fueron analizados utilizando el software IBM SPSS Statistics versión 22 para Windows (IBM Corporation, Armonk, NY), y los resultados se consideraron significativos cuando  $P < 0,05$ . Se realizó un cuadro de contingencia y el análisis de correspondencia para analizar desde el punto de vista gráfico las relaciones de frecuencia de la mutación L1014F por área. Las frecuencias de los alelos para mutación L1014F se calcularon utilizando la siguiente ecuación (García *et al.*, 2009). Las frecuencias de genotipo se calcularon dividiendo el número de individuos con un genotipo dado por el número total de mosquitos analizados de la siguiente manera: (i) frecuencia de genotipo homocigótica de tipo silvestre L1014/L1014, (ii) frecuencia de genotipo homocigótico mutante, F1014 / F1014, y (iii) frecuencia del genotipo heterocigoto, L1014 / F1014.

## 6.5 Mecanismos enzimáticos alterados

### 6.5.1 Pruebas bioquímicas para AChE

Se realizaron pruebas bioquímicas para medir la insensibilidad de la AChE para detectar la presencia del mecanismo alterado del sitio objetivo que confiere resistencia a OF y carbamatos, basados en las técnicas utilizadas por el CDC de Atlanta, GA, USA.

Fueron utilizados ácido 5,5-ditiobis 2- nitrobenzoico (DTNB): 0.12gr en 3mL en regulador de fosfato de sodio 100 mM, PH 7.0, acetilcolina iodada (ACTH): 0.0174 g en 6 mL de agua esteril, propoxur: 0.0209gr en 1 mL de acetona, Triton 100X: 5 mL en 50 mL de buffer de fosfato de sodio 1M pH 7.8. Se homogenizaron las muestras de cabeza-tórax de cada mosquito hembra en forma individual en 300  $\mu$ L en agua estéril, utilizando un pistilo y homogenizador de tejidos eléctricos (Fisher Brand). Se prepararon además dos placas de fondo plano (F96 MaxiSorp Nunc-Immuno Plate (60/cs) Thermo scientific, una para determinación de la actividad AChE normal y la otra para la actividad AChE inhibida con propoxur. En ambas placas se adicionaron 25  $\mu$ L del homogenizado en duplicado, también se colocaron 25  $\mu$ L de agua estéril en los pocillos blancos (G10-G12), posteriormente utilizando una pipeta multicanal se adicionaron en las placas 145  $\mu$ L de la solución tritón-100X al 1%. 10  $\mu$ L de la solución DTNB (ácido 5-5' ditiobis 2 nitrobenzoico) con pH 7.0, 25  $\mu$ L de solución de acetilcolina iodada (ACTH). En la placa donde se midió la actividad AChE inhibida, se adicionaron las mismas cantidades de

soluciones que la placa anterior, con la diferencia que en esta placa se adicionaron 25  $\mu$ L de la solución ACTH más 6  $\mu$ L de solución de stock de propoxur.

Después de preparado estas dos placas, fueron incubadas a temperatura ambiente por 60 minutos y se leyó la absorbancia en un espectrofotometro con un filtro de 405nm. Para determinar si la AChE está actuando como mecanismo de resistencia, es decir, con modificaciones en su sitio activo (AChEI) se empleó la siguiente formula:

$$\frac{\text{Actividad de la AChEI x100\%}}{\text{Actividad de la AChE normal}} = \text{\% de la actividad AChE en presencia del inhibidor}$$

Los valores de la actividad de AChE, en presencia del inhibidor, menores del 30% corresponden a individuos susceptibles, es decir sin la presencia del mecanismo de AChEI modificada, 30-70% corresponden a individuos heterocigotos, mayores al 70% se consideran como individuos resistentes. Los promedios de las densidades ópticas fueron calculadas, y para el análisis estadístico de los datos se aplicaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza, cuando fue necesario, los datos fueron transformados para que éstos tuvieran una distribución normal.

La comparación de mecanismos de resistencia en las poblaciones, fue realizada por un análisis de correlación entre el nivel de resistencia y los factores ecológicos asociados a la resistencia.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Criaderos muestreados en áreas rurales y urbanas

Durante el periodo de estudio se muestrearon un total de 508 contenedores artificiales considerados como posibles hábitat de inmaduros de *Cx. quinquefasciatus* Say en 5 áreas rurales y 5 áreas urbanas en dos estaciones del año. Se colectaron aproximadamente 55,000 estados inmaduros, en la época de lluvias fueron colectados 37,109 inmaduros (CUADRO 2) y 17,727 durante la época de secas (CUADRO 3), además en ambos casos, se consideró el tipo de material del criadero

CUADRO 2. Número de estados inmaduros recolectados durante la temporada de lluvias en áreas rurales y urbanas

<b>Lluvias</b>			
<b>Material de criadero</b>	<b>Zona rural</b>	<b>Zona Urbana</b>	<b>Total</b>
Vidrio	1458	37	1495
Cemento	887	1740	2627
Plástico	10451	554	11005
Aluminio	23	0	23
Hule	0	0	0
Agua clara	642	246	888
Agua semi oscura	178	1544	1722
Agua oscura	3658	541	4199
< 0.6L	2219	622	2841
> 0.6 L	10600	1709	12309
<b>Total</b>			<b>37109</b>

CUADRO 3. Número de estados inmaduros recolectados durante la temporada de secas en áreas rurales y urbanas

<b>Secas</b>			
<b>Material de criadero</b>	<b>Zona rural</b>	<b>Zona urbana</b>	<b>Total</b>
Vidrio	68	58	126
Cemento	2513	1856	4369
Plástico	536	487	1023
Aluminio	130	13	143
Hule	60	0	60
Agua clara	13	215	228
Agua semi oscura	2741	1518	4259
Agua oscura	685	681	1366
< 0.6L	183	106	289
> 0.6 L	3556	2308	5864
<b>Total</b>			<b>17727</b>

## 7.2 Parámetros evaluados en diferentes criaderos

Con el modelo de regresión de Poisson fueron relacionados los recuentos de las variables cuantitativas y cualitativas, demostrando que los valores de  $P$  reportados para la categorización de las variables fueron  $< 0.05$ , lo que indica que ninguna de las variables (volumen de agua, tipo de criadero, material de la criadero y grado de turbidez del agua dentro del criadero) podría excluirse del modelo sin una pérdida de información estadísticamente significativa. Las estimaciones obtenidas con el método de máxima verisimilitud, mostraron evidencia de un número mayor de estados inmaduros durante la

época de lluvias en comparación con la época de secas, en la zona urbana se detectaron evidencia estadística que el recuento de estados inmaduros de *Cx. quinquefasciatus* Say en los criaderos muestreados fueron menores (CUADRO 4), comparado a los números obtenidos en áreas rurales. Los materiales que componen el criadero, tomando como base categórica el criadero de vidrio, al realizar la comparación se observó que los criaderos de cemento y plástico registraron un número mayor de inmaduros dentro de los criaderos, comparado con los criaderos de hule y aluminio que mostraron números menores de inmaduros.

CUADRO 4. Modelo de regresión estimado (máxima verosimilitud)

<i>Parámetro</i>	<i>Estimación</i>	<i>Error estándar</i>
CONSTANTE	2.7670851	0.0398551
Volumen de agua	0.103748	0.0005003
Temporada	6.32338	0.407993
Urbano	-0.6098437	0.0157548
M1	-0.8025604	0.0717918
M2	0.7140382	0.0273539
M3	-0.5272904	0.1202320
M4	0.5173264	0.0260962
C1	2.0506647	0.0307248
C2	1.3089461	0.0321793

M1=Aluminio, M2=Cemento, M3=Hule, M4=Plastico, C1=Color de agua, C2= Oscura.

Por otro lado, con los análisis estadísticos de las características físicas del agua, se observó que los estados inmaduros de *Cx. quinquefasciatus* Say se reproducen en grandes cantidades en aguas contaminadas y estancadas con alto contenido de materia orgánica, mostrando una relación directa entre el volumen y el color del agua siendo un factor determinante en el desarrollo de estados inmaduros (Fig. 5). En la temporada de lluvias, en

las zonas rurales se pudo observar que el desarrollo exitoso de *Cx. quinquefasciatus* fue mayor en comparación con la temporada de secas.

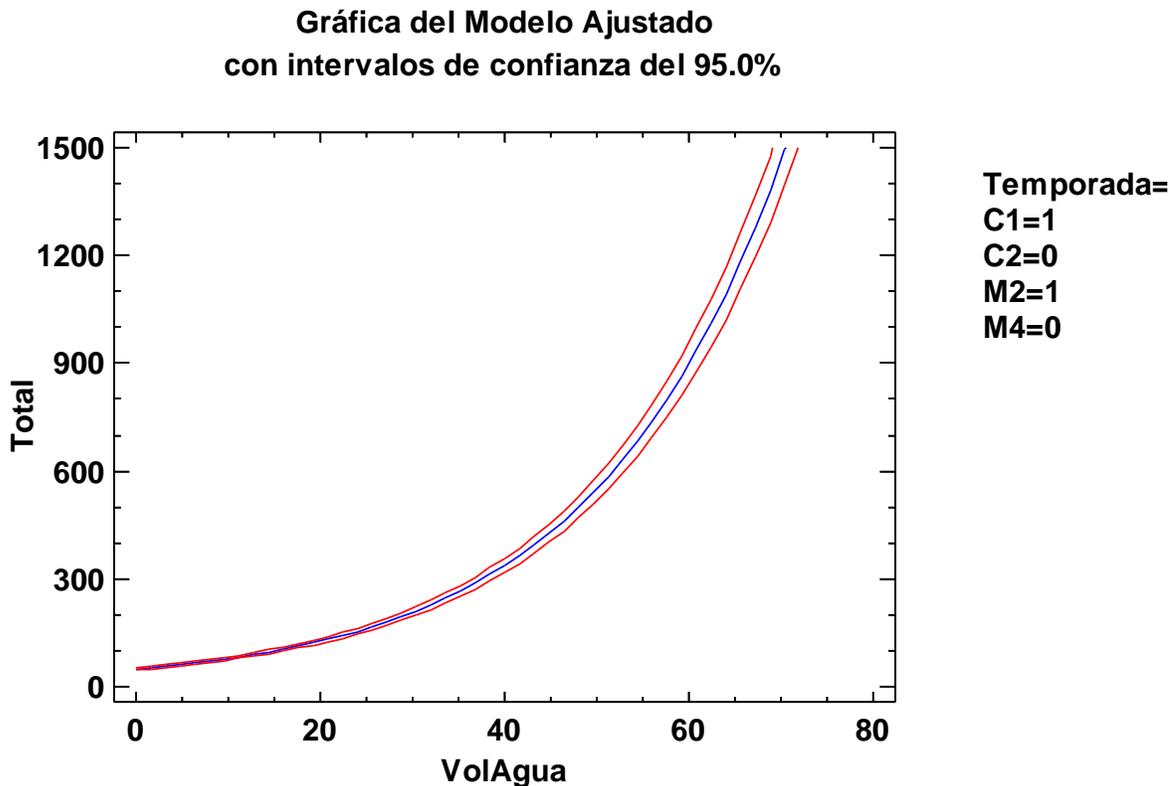


Figura 5. Representación gráfica en el desarrollo de estados inmaduros de *Cx. quinquefasciatus* con el volumen de agua (L).

### 7.3 Frecuencia de la mutación L1014F asociada con la resistencia a insecticidas en poblaciones de *Cx. quinquefasciatus*

Los mosquitos susceptibles tienen el codón TTA en la posición 1014 que codifica para el aminoácido leucina (Leu1014) presente en el gen del canal de sodio de las membranas nerviosas, que es el sitio blanco de los insecticidas piretroides y organoclorados. Sin embargo, la mutación de este alelo origina un cambio de TTA a TTT, este último codificando para el aminoácido fenilalanina en el mismo residuo 1014 (Phe1014). Fueron amplificadas un total de 950 muestras de DNA genómico de *Cx. quinquefasciatus*, observadas en geles de agarosa y se detectó el genotipo susceptible

amplificando un fragmento de 500 pb, así como el genotipo mutado y asociado a resistencia a insecticidas piretroides amplificando un fragmento de 400 pb. (Fig. 6). Los mosquitos *Cx. quinquefasciatus* utilizados en el estudio fueron colectados durante la temporada de secas y de lluvias, en la temporada de secas no se encontraron muestras de *Cx. quinquefasciatus* en el municipio de Motul, interesantemente la mutación fue encontrada en todas las poblaciones analizadas, en donde las frecuencias de la mutación en individuos homocigotos susceptibles (L1014/L1014) fue 12% (114/950), heterocigotos (F1014 / L1014) 34% (323/950) y homocigotos mutado (F1014 / F1014) 54% (513/950). El análisis de los individuos por temporada mostró que el 14% (63/450) fueron homocigotos susceptible, el 31,33% (141/450) como heterocigotos y el 54,67% (246/450) como homocigótico mutado. En la época de lluvias, fueron analizados un total de 500 hembras de *Cx. quinquefasciatus*, el 10.2% (51/500) identificadas como homocigoto susceptible, 36.4% (182/500) como heterocigotos y 53.4% (267/500) como homocigoto mutado.

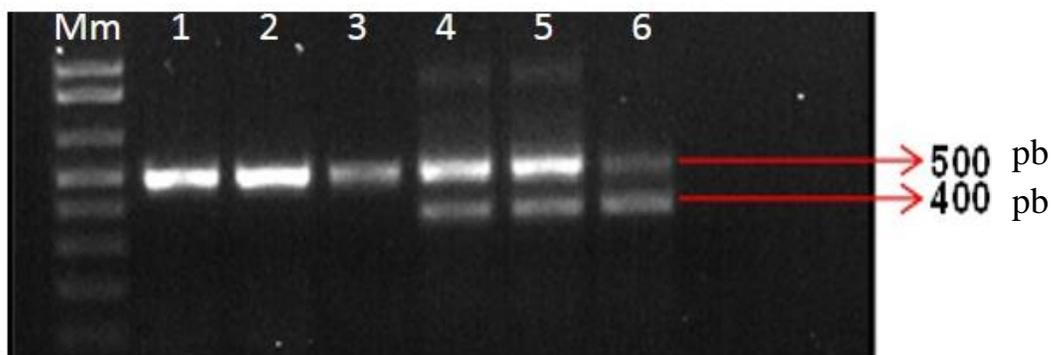


Figura 6. Identificación de la mutación L1014F. M, marcador de tamaño molecular, carril 1(Cx3), 2(Cx4), carril 3(Cx3) ,4(Cx4), carril 5(Cx3), 6(Cx4), muestras amplificadas con primers susceptibles (TA) y resistentes (TT) en poblaciones de *Cx. quinquefasciatus*.

#### 7.4 Frecuencia y distribución del alelo 1014F en la época de secas y lluvias.

En la temporada de secas, la presencia y frecuencia del homocigoto mutado fueron similares entre las zonas urbanas y rurales con un 58.4% y 50% respectivamente (Fig. 7), mientras que el área urbana de Juan pablo II, Uman y Kanasin la presencia de y frecuencia

de la mutacion fue mayor variando entre un 71% y 98%. En las áreas rurales, la frecuencia de la mutacion fue del 96% en Xkalakdzont, 62% en Caucel y 64% en Chochola (CUADRO 5)

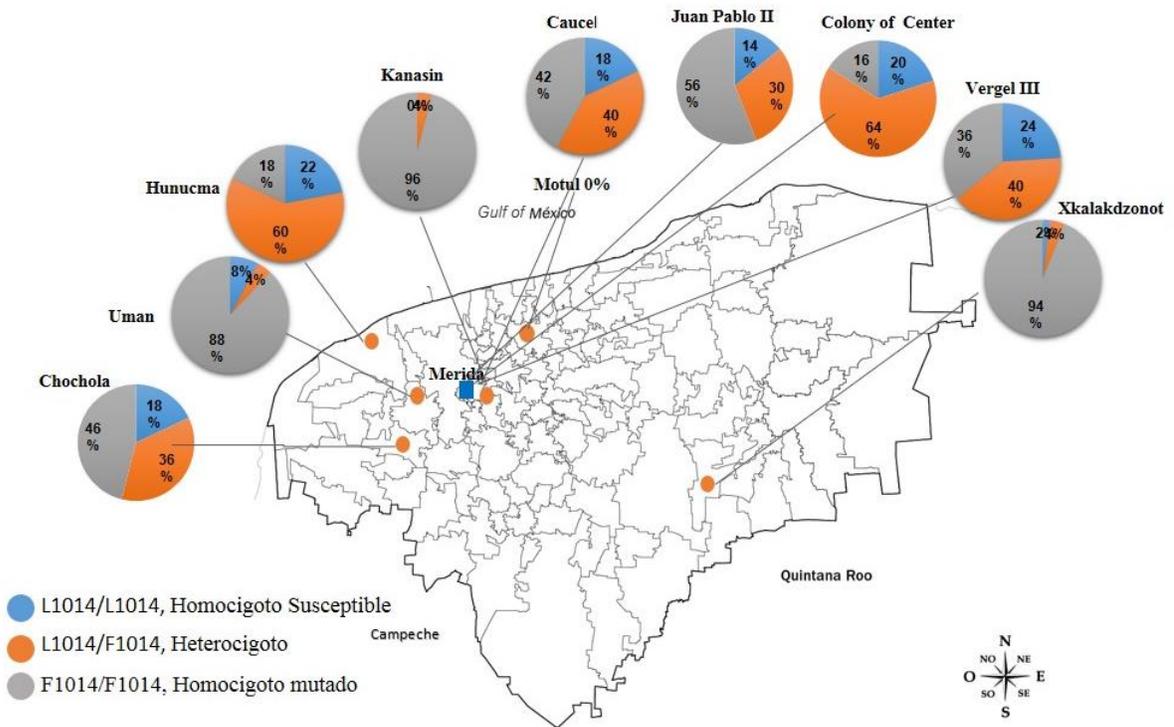


Figura 7. Distribución de los alelos L1014/L1014, L1014/F1014 y F1014/F1014 en poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* durante la época de secas. Los diagramas circulares representan el porcentaje de alelos presentes en cada sitio.

CUADRO 5. Genotipos presentes en poblaciones del mosquito *Cx. quinquefasciatus* durante la temporada seca en 2015.

Zona	Colonia/ Municipio	Año	N. de mosquitos	AA	TA	TT	Frecuencia alélica	
							R	S
	Col. Juan Pablo II	2015	50	7	15	28	0.71	0.29
Urbana	Col. Vergel III	2015	50	12	20	18	0.56	0.44
	Col. Centro	2015	50	10	32	8	0.48	0.52
	Kanasin	2016	50	0	2	48	0.98	0.02
	Uman	2016	50	4	2	44	0.90	0.10
	Hunucma	2015	50	11	30	9	0.48	0.52
	Motul	2015	50	-	-	-	-	-
Rural	Caucel	2015	50	9	20	21	0.62	0.38
	Chochola	2015	50	9	18	23	0.64	0.36
	Xkalaktzonot	2016	50	1	2	47	0.96	0.04

Col., colonia; AA, homocigoto Susceptible; TA, heterocigoto; TT, homocigoto mutado.

Durante la temporada de lluvias, en las áreas urbanas como Juan Pablo II, y Kanasin, mantuvieron frecuencias elevadas de la mutacion L1014F (Fig. 8), el alelo mutante fue más frecuente en las poblaciones colectadas en la colonia del centro. Una frecuencia disminuida de la mutación en la zona rural se observó en el municipio de Umán, más sin embargo la frecuencia fue elevada en el resto de las áreas rurales estudiadas que van del 63% al 87%. (CUADRO 6).

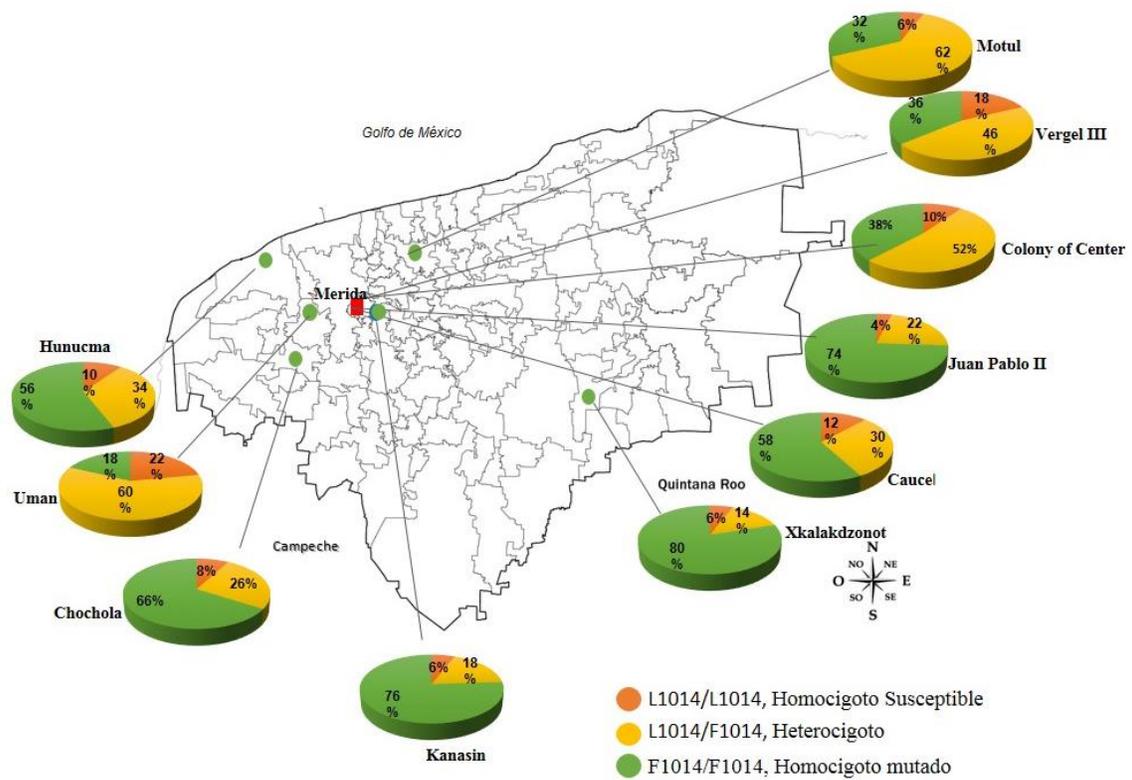


Figura 8. Distribución de los alelos L1014 / L1014, L1014 / F1014 y F1014 / F1014 en poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* durante la época de lluvias. Los diagramas circulares representan el porcentaje de alelos presentes en cada sitio.

CUADRO 6. Genotipos presentes en poblaciones del mosquito *Cx. quinquefasciatus* durante la temporada de lluvias en 2016.

Zona	Colonia/Municipio	Año	N. de mosquitos	AA	TA	TT	Frecuencia alélica	
							R	S
Urbana	Col. Juan Pablo II	2016	50	2	11	37	0.85	0.15
	Col. Vergel III	2016	50	9	23	18	0.59	0.41
	Col. Center	2016	50	5	26	19	0.64	0.36
	Kanasin	2016	50	3	9	38	0.85	0.15
	Uman	2016	50	11	30	9	0.48	0.52
	Hunucma	2016	50	5	17	28	0.73	0.27
	Motul	2016	50	3	31	16	0.63	0.37
Rural	Caucel	2016	50	6	15	29	0.73	0.27
	Chochola	2016	50	4	13	33	0.79	0.21
	Xkalaktzonot	2016	50	3	7	40	0.87	0.13

Col: colonia; AA, homocigoto Susceptible; TA, heterocigoto; TT, homocigoto mutado.

### 7.5 Determinación de los mecanismos de resistencia por medio de pruebas bioquímicas

Se realizaron modificaciones en la técnica para las pruebas bioquímicas para la detección de los mecanismos involucrados en la resistencia a insecticidas, para ello se analizaron 450 mosquitos *Cx. quinquefasciatus* Say por duplicado, colectados en 5 zonas urbanas y 5 zonas rurales, las cuales fueron sometidos a pruebas de AChE y AChEI en placas de micro titulación de Elisa y se observó un incremento de la actividad de la AChE (Fig. 9) en cada uno de los sitios. Los resultados obtenidos muestran la actividad específica

de AChE en el área urbana, se observó que existe diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de actividad remanente en *Cx. quinquefasciatus* colectados por localidad ( $X^2 = 50.65$ ,  $g.l. = 4$ ,  $P = 0.000$ ). La mayor actividad remanente en esta especie fue reflejada en la colonia del Centro, Vergel III y Uman.

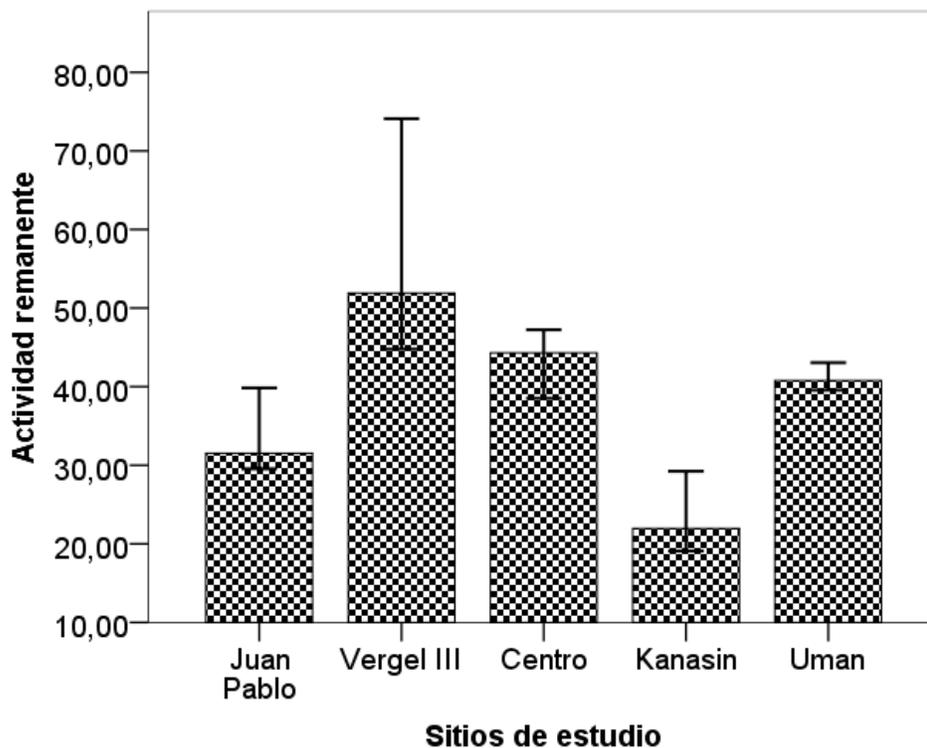


Figura 9. Actividad remanente de AChE en *Cx. quinquefasciatus* colectado en el área urbana. Las barras de error (IC 95%) representan las medianas de la actividad remanente.

Por otro lado, en el área rural fue observada una diferencia estadística significativa entre los porcentajes de actividad remanente en *Cx. quinquefasciatus* colectado por localidad ( $X^2 = 19.72$ ,  $g.l. = 4$ ,  $P = 0.001$ ). Fue estimado mayor actividad remanente en mosquitos colectados en Motul, Hunucma y Xkalakdzonot (Fig. 10).

Con las absorbancias obtenidas de las placas para cada muestra se compararon los promedios de las longitudes de onda y los porcentajes obtenidos de la actividad remanente fueron calculados (datos transformados a la raíz cuadrada del arcoseno) el análisis reveló que la media de todas las actividades enzimáticas probadas en poblaciones de *Cx.*

*quinquefasciatus* colectados en diez sitios de Yucatán, fueron significativamente diferentes en todos los sitios de estudio.

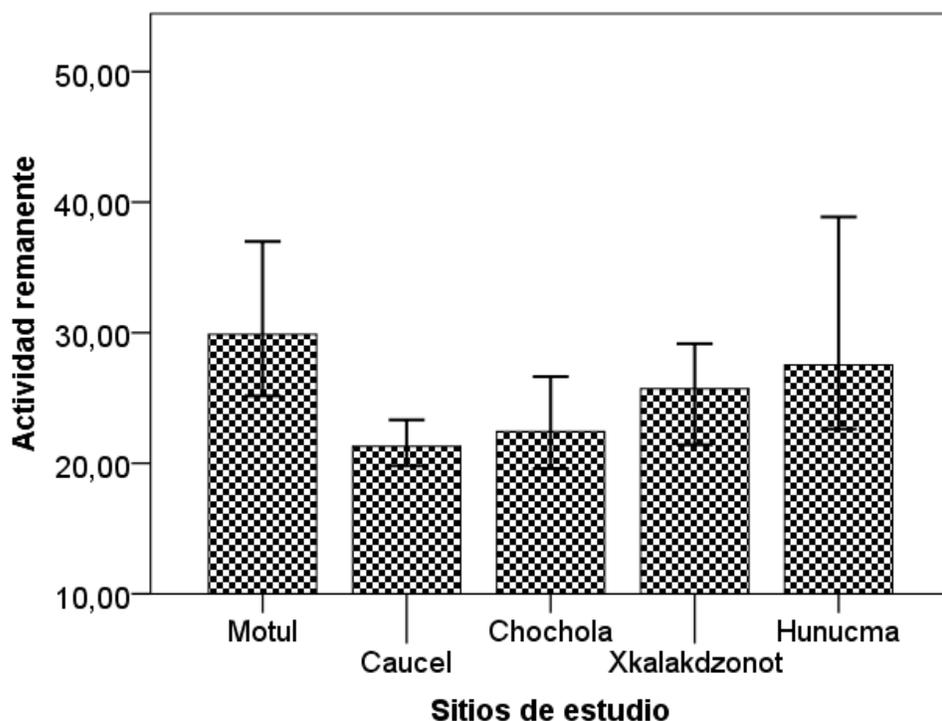


Figura 10. Actividad remanente de AChE en *Cx. quinquefasciatus* colectado en el área rural. Las barras de error (IC 95%) representan las medianas de la actividad remanente.

Con el análisis de las placas para AChEI, los resultados se interpretaron como un porcentaje de actividad remanente en la fracción inhibida por propoxur en comparación con la actividad de control (no inhibida) (Fig. 11A y 11B). Los mosquitos individuales con más del 70% de actividad remanente son indicados como homocigoto resistentes (RR) y con 30-70% de actividad remanente son considerados como heterocigotos (RS) (CUADRO 7). Debido a la absorción de luz del propoxur en la microplaca, los homogenizados muestran mayor actividad de AChE en la fracción inhibida por propoxur, que es una actividad normal en cepas resistentes como se observó en la zona urbana y rural.

CUADRO 7. Porcentaje de individuos susceptibles (SS), heterocigotos (RS) y resistentes (RR) en poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* después de ser expuestos al propoxur al 0.1%.

<b>Localities</b>	<b>&lt;30%</b>	<b>30-70%</b>	<b>&gt;70%</b>
Col. Juan Pablo II	18 (42.85%)	23 (54.76%)	1 (2.38%)
Col. Vergel III	7 (16.66%)	19 (54.23%)	16 (38.09)
Col. Centro	8 (19.04%)	31 (73.80%)	3 (7.14%)
Uman	1 (2.38%)	40 (95.23%)	1 (2.38%)
Kanasin	27 (64.28%)	14 (33.33%)	1 (2.38%)
Hunucma	25 (59.52%)	6 (14.28%)	10 (23.08)
Motul	21 (50%)	20 (47.61%)	1 (2.38%)
Caucel	35 (83.33%)	7 (16.66%)	0
Chochola	30 (71.42%)	12 (28.57%)	0
Xkalakdzonot	29 (69.04%)	11 (26.19%)	2 (4.76%)

### 7.6 Comparación de frecuencias genéticas asociadas a resistencia a insecticidas en *Cx. quinquefasciatus*

La relación que probablemente existe entre los mecanismos de resistencia en los sitios de estudio fue analizado realizando una encuesta basado en el uso y consumo de productos químicos utilizados contra plagas de insectos y mosquitos vectores. Un total de 200 encuestas fueron aplicadas, recopilando información de 20 personas por sitio. Los datos obtenidos de cada una de las encuestas fueron revisados, calculando el porcentaje de productos utilizados, realizando un análisis de chi cuadrada, revelando que fueron estadísticamente significativos (CUADRO 8).

CUADRO 8. Encuesta relacionada al uso de los insecticidas

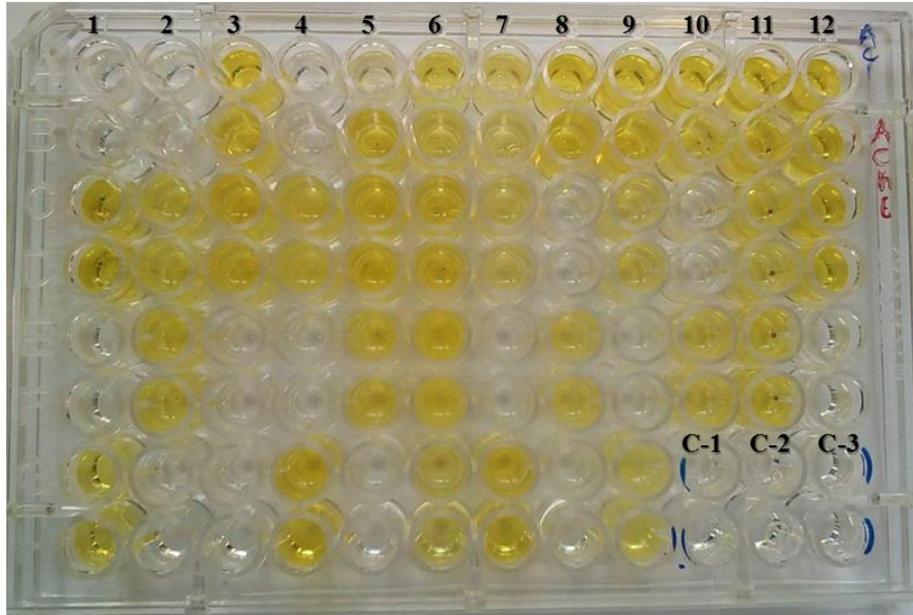
	Urbana		Rural		Valor estadístico	Valor -P
	Si	No	Si	No		
*¿Hay mosquitos en su casa?	91	9	100	0	7,446	0,006
**¿Utiliza algún repelente comercial?	83	17	57	43	16,095	0.000
**¿Utiliza insecticida en spray para reducir los mosquitos?	90	10	66	34	16,783	0.000
**¿Utiliza herbicida para reducir malezas?	58	42	39	61	7,227	0,007
**¿Usa o usó temefos para reducir las larvas de mosquitos?	28	72	43	57	17,207	0.000
Total	350	150	305	195		

\*test exact of Fisher

\*\* test of chi cuadrada

Las preguntas más importantes en las encuestas se analizaron sobre la consistencia de cada una de las respuestas. De acuerdo con los resultados obtenidos sobre la presencia de mosquitos dentro de las casas, 91 de las personas encuestadas mostraron un mayor predominio hacia una respuesta positiva y solo 9 personas dijeron que no había mosquitos en sus hogares en el área urbana, mientras que en el área rural 100 personas dijeron que si hay mosquitos dentro de sus casas. En la segunda pregunta sobre el uso de repelentes comerciales, en el área urbana 83 personas de los encuestados utilizaron productos como “off”, “byte byte”, dos lados, repelente ecológico, clavo de olor con vinagre de sidra de manzana, clavo de olor con limón, clavo con aceite mennen y crema de alcohol, crema de citronela, fuera de la familia, así como también pulseras impregnadas y solo 57 personas de las 100 encuestadas en el área rural tuvieron acceso a estos productos. Con respecto a los insecticidas en aerosol utilizados en áreas rurales y urbanas, 90 de las personas encuestadas en el área urbana usaron insecticidas en forma de aerosol, 66 personas en el área rural emplearon este tipo de productos para el combate de mosquitos vectores.

**A**



**B**



Figura 11. Microplaca donde se observa una reacción de la acetilcolinesterasa (AChE), **A**) muestras colectadas de Caucel, **B**) muestras colectadas de la comisaria de Xkalakdzonot.

58 de las personas en el área urbana reportaron haber usado productos químicos como herbicidas para el control de malezas y 39 de los 100 encuestados en áreas rurales aplicaron este tipo de producto. En referencia al conocimiento sobre el uso de temefos

(organofosforados) para reducir el número de larvas de mosquitos, 28 personas respondieron al uso de este producto en el área urbana y 43 en el área rural, vale la pena mencionar que el uso continuo de estos compuestos, probablemente estaría causando algún cambio en los mecanismos asociados a la resistencia a los grupos de insecticidas comúnmente utilizados para el combate de mosquitos vectores. Cinco zonas rurales y cuatro de las zonas urbanas hacen uso frecuente de insecticidas y herbicidas para el control de malezas e insectos plaga, sin embargo municipios como Motul, Chocholá y Xkalakdzonot, son los sitios principales de uso intensivo de insecticidas debido a la producción de áreas de cultivos. Las frecuencias encontradas en la zona rural y urbana, como se informan aquí, combinados con los insecticidas y los herbicidas probablemente condujeron inevitablemente las mutaciones y actividades enzimáticas elevadas, asociados a resistencia a insecticidas organofosforados y piretroides (Apéndice B).

La frecuencia comparativa encontrada en las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus*, muestra la presencia de diferentes genotipos para el locus kdr y la AChE modificada en la misma población de mosquitos resistentes, susceptibles incluyendo individuos que fueron heterocigotos. La mayoría de los individuos presentan alelos de resistencia para insecticidas piretroides y sitios alterados para AChE que es el blanco para insecticidas OF (Fig. 12A y 12B). Los valores más altos en la aparición de genotipos resistentes para kdr, se presentaron en la colonia de Juan Pablo II con un 56% y 74% de alelos resistentes para kdr, 2% de genotipos resistentes para AchE, con 54% de individuos heterocigotos. Uman con 88% de genotipos resistentes para kdr, 7% para AChE y un 73% de heterocigocidad, Kanasin con un 96% y 76% de genotipos resistentes para kdr, 2% de genotipos resistentes para AChE y 33% de heterocigotos. La comisaria de Xkalaktdonot con un 92% y 80% de genotipos resistentes para kdr y 4% para AchE con 26% de individuos heterocigotos (Fig. 13). Sin embargo los mecanismos de resistencia de AChE y la mutación L1014F-kdr, resultaron estar presentes en todos los sitios estudiados con altos a muy bajas frecuencias.

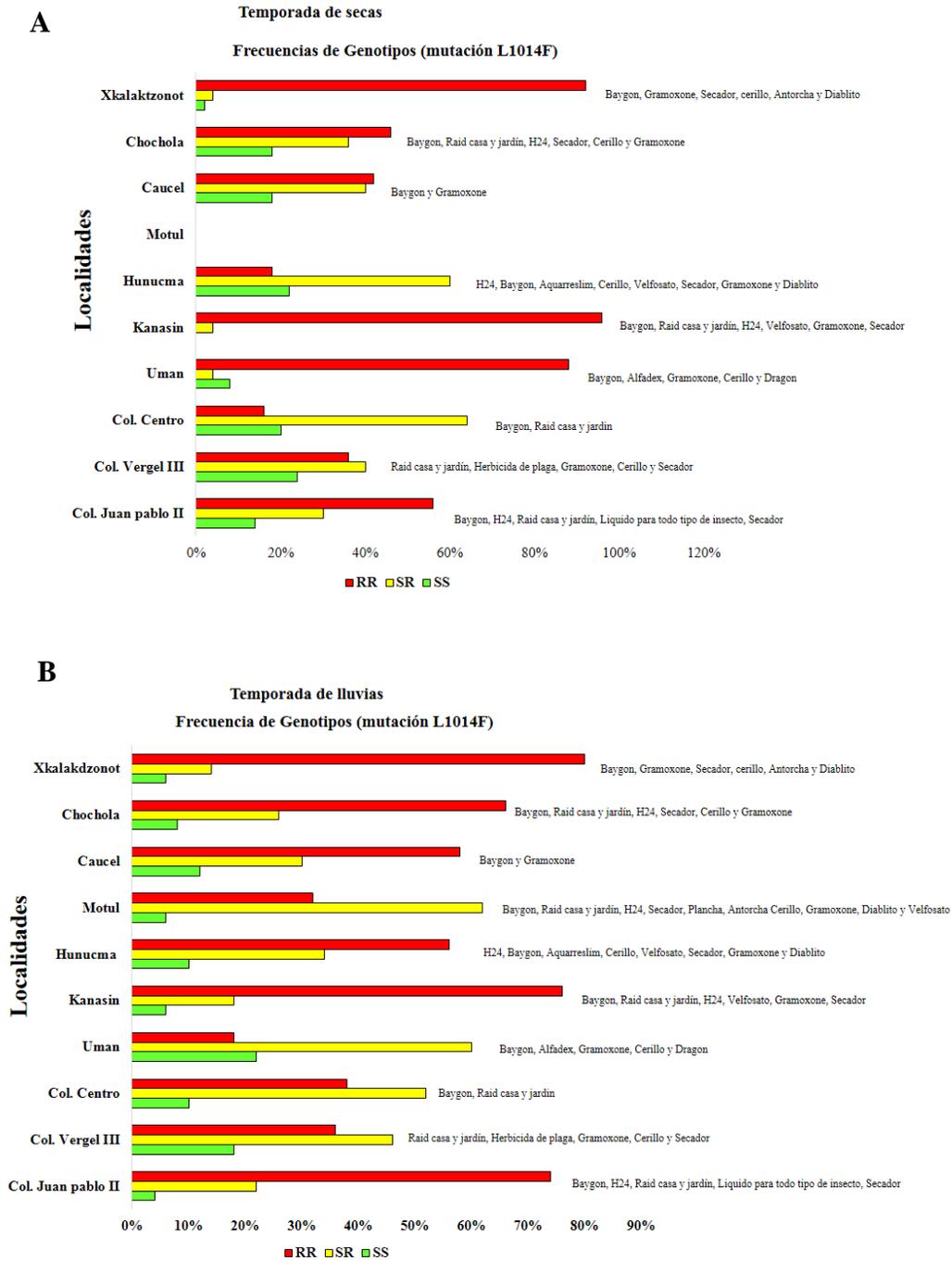


Figura 12. Porcentaje de genotipos presentes en poblaciones del mosquito *Cx. quinquefasciatus*, RR: resistentes, RS: heterocigotos, SS: susceptibles), A) durante la temporada de secas, B) durante la temporada de lluvias.

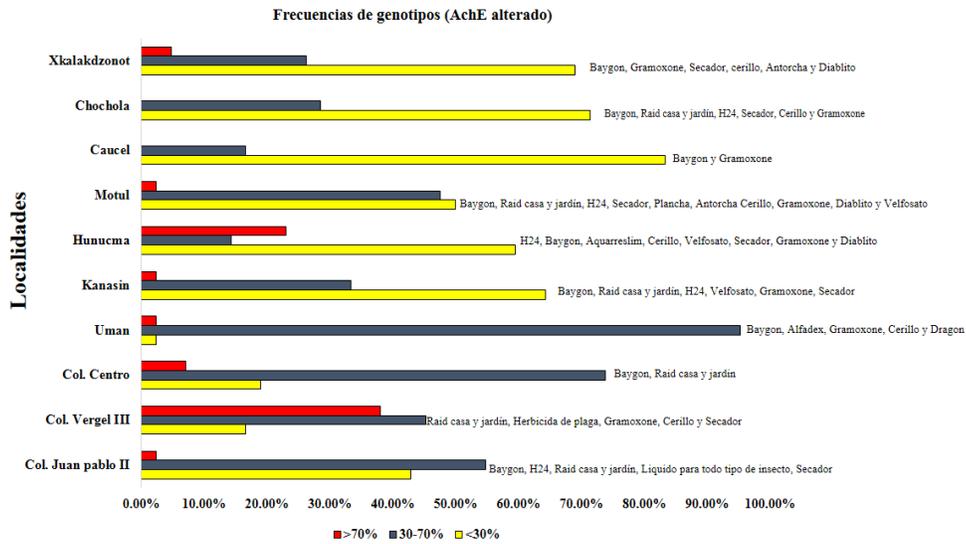


Figura 13. Porcentajes de actividad remanente en poblaciones del mosquito *Cx. quinquefasciatus* en zonas urbanas y rurales de Yucatán, (RR: resistentes, RS: heterocigotos, SS: susceptibles).

## VIII. DISCUSION

La diferencias observadas en la distribución de las especies de *Cx. quinquefasciatus* en los sitios de muestreo puede haber explicado el estado de resistencia a insecticidas entre las diferentes áreas urbanas y rurales. Aunque el nivel de contaminación de los criaderos no se cuantificó en las áreas de estudio, se observó que en las zonas rurales como Hunucma, Chochola, Xkalakdzont, Cautel y urbanas como Vergel III, Juan Pablo II, Kanasin, Col. Centro y Umán, se colectaron una alta proporción de larvas y pupas, mostrando que las condiciones encontrados en estos sitios son adecuados para su presencia. Cabe mencionar que los sitios establecidos en este estudio son considerados como áreas de alto riesgo de enfermedades transmitidos por vectores (García-Rejon *et al.*, 2008), Por lo tanto, no es sorprendente que la especie *Cx. quinquefasciatus* encontradas en estas áreas fueran más abundantes junto con *Ae. aegypti*. Hasta ahora, se ha prestado poca atención a numerosos criaderos contaminados y diseminados en las zonas urbanas y rurales. Sin embargo, se ha demostrado que los contaminantes urbanos aumentan la tolerancia de los mosquitos a los insecticidas (Poupardin *et al.*, 2008; Riaz *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos durante el muestreo en la temporada de lluvia y secas en diferentes sitios en el estado de Yucatán, México, mostraron que diversos criaderos con mayor volumen de agua y mayor cantidad de materia orgánica son los criaderos específicos y más importante para el desarrollo y éxito de *Cx. quinquefasciatus*, que a su vez se ve influenciado por las actividades humanas. Estos estudios demostraron, que los criaderos productivos cambian de acuerdo a las zonas de colecta, este tipo de reproducción permanente es común en otros lugares de México y en otras especies, como en los estudios del sitio de reproducción del vector de dengue *Ae. aegypti* (Quintero *et al.*, 2014). Los resultados son similares con los reportados en Baja California Sur, México (Tovar-Zamora *et al.*, 2015). Previamente fue reportado que, en casas de la ciudad de Mérida, Yucatán, los criaderos más comunes para *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti*, fueron los recipientes desechables (latas, bolsas de sabrita, bolsas de galletas, unicel) (Winch *et al.*, 1992; García-

Rejón *et al.*, 2011a), así como las grandes alcantarillas ubicados a un costado de las carreteras, ya que se mantienen con agua y larvas durante todo el año (Arana-Guardia *et al.*, 2014).

Sin embargo, los resultados de los análisis estadísticos de regresión de Poisson, realizados con los datos obtenidos en las áreas rurales y urbanas del Estado de Yucatán, México, se demostró que *Cx. quinquefasciatus* prefiere los criaderos de cemento (Shabad and Shivani, 2017), vidrio y plástico donde fueron colectados mayor cantidad de estados inmaduros en el área rural en comparación con el área urbana. Probablemente el pH de 7.6 y superior en los criaderos es ideal para la proliferación de *Cx. quinquefasciatus* (Andreas *et al.*, 2011). Estudios realizados en el distrito de Nagpur de Maharashtra y sus alrededores informa que *Cx. quinquefasciatus* prefiere reproducirse en pH entre 7.5 y 8; en cuerpos de agua no perturbados altamente contaminados que indican que esta especie posee tendencia alcalina.

En el estado de Yucatán, las condiciones ambientales son un factor importante, determinando los sitios más productivos en las poblaciones de mosquitos del genero *Culex* (Araújo *et al.*, 2006). Las épocas del año impactan en la cantidad de mosquitos colectados según estudios realizados en el estado de Yucatán, en *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* en entornos urbanos y rurales, así como en los tipos de contenedores o estructuras para su reproducción (Baak Baak *et al.*, 2017), desagües pluviales como fuentes productivas para el desarrollo de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* en toda la ciudad de Mérida durante los meses secos y lluviosos, coincidiendo con el numero de inmaduros colectados en nuestro estudio (Arana-Guardia *et al.*, 2014). Por lo tanto, probablemente el número significativamente mayor de inmaduros durante la temporada de lluvia se debió al aumento en el número de posibles sitios de reproducción y en la temporada de secas, se identificó que los criaderos productivos son aquellos abastecidos de agua por acción humana. Ambos entornos proporcionaron posibles sitios de reproducción (Veronica *et al.*, 2014), desde contenedores naturales y de origen humano, por lo que la competencia interespecífica puede contribuir a la determinación de los niveles de población (Juliano, 2009). El almacenamiento de agua en contenedores utilizado por los humanos, fueron identificados como los hábitats principales de larvas de *Cx. quinquefasciatus*, presentándose de manera

más abundante en aguas oscuras y semi oscuras con altas cantidades de materia orgánica mostrando su naturaleza antropológica (Rajesh *et al.*, 2013), así como la capacidad de dejar cuerpos de agua con gran cantidad de materia orgánica y de trasladarse a otros contenedores utilizándolos como sitios de reproducción preferidos. (David *et al.*, 2016).

En las áreas rurales, fue mayor el número de inmaduros colectados en diferentes sitios de reproducción durante la temporada de lluvias, concordando con los estudios de Mullen (2009) indicando a *Cx. quinquefasciatus* como una especie urbana, también fue observado por Hardine *et al.*, (2007) y K. Rajesh *et al.*, (2013), que en áreas urbanas, los sitios típicos de reproducción son aguas estancadas y contaminadas y en áreas rurales son principalmente letrinas. Sin embargo, los sitios de reproducción como neumáticos, plástico y contenedores de metal son una señal de posibles cambios en el comportamiento de *Cx. quinquefasciatus* en la ovoposición. La selección del hábitat de los mosquitos para la oviposición se demostró en respuesta a la idoneidad física y química para el desarrollo larval (Trimble R.M., 1979), esto puede explicar la preferencia por recipientes de metal, plástico y cemento. El bajo número de inmaduros en algunas áreas puede estar asociado con el tamaño de la reproducción y la disponibilidad limitada de recursos (Blaustein, 1993; Heart, 1994b). La preferencia del mosquito *Cx. quinquefasciatus* a diferentes tipos de criaderos podría atribuirse a las condiciones rurales extremas en las comunidades que se muestrearon y el acceso limitado del servicio de agua, así como al uso que se le puede dar a cualquier contenedor como jarrones, fuentes de agua para animales y desafortunadamente, estos contenedores sirven como criaderos de mosquitos, donde la naturaleza “omnipresente” de *Cx. quinquefasciatus* se destaca por su alto porcentaje de ocurrencia en todas las categorías como el sitio y tipo de cría. Trabajos realizados previamente (Ferreira y Neto, 2007) corroboraron los hallazgos del presente estudio, argumentando que factores como las características culturales y socioeconómicas de las comunidades influyen en la densidad del mosquito y que el conocimiento de dichos factores es indispensable para el diseño de un plan de control y de esta manera reducir el número de enfermedades que pudieran ser causados por *Cx. quinquefasciatus*.

Por otro lado, en referencia a los resultados de resitencia y susceptibilidad, las altas frecuencias de la mutación L1014F encontradas en las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus*

en diez sitios importantes en el estado de Yucatán, México, indican la presencia del mecanismo de resistencia al knock-down (*kdr*), que es el responsable de la resistencia a los insecticidas piretroides y DDT. Los resultados obtenidos con la técnica molecular de PCR, mostraron que la mutación provoca una sustitución de leucina a fenilalanina en la posición 1014 en el dominio dos del segmento seis del gen que codifica para el canal de sodio presente en el sistema nervioso de los mosquitos, lo cual podría estar relacionada con la resistencia a insecticidas piretroides. Probablemente las altas tasas de la mutación 11014F se deba a la presión de selección hacia las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* que son afectados de manera indirecta (Vazquez *et al.*, 2017, Ponce *et al.*, 2016, Flores, *et al.*, 2013), cuando las estrategias de control son aplicados para el combate del vector del dengue *Ae. aegypti*, un vector que desarrolló resistencia a los insecticidas piretroides debido a la frecuencia de mutaciones (Ile1016) (García-Rejón *et al.*, 2018, Flores *et al.*, 2006). Se demostró que la resistencia a los insecticidas no solo es causada por mutaciones en el gen del canal de sodio, sino también por mecanismos enzimáticos implicados en su desarrollo (Deming *et al.*, 2016, Brengues *et al.*, 2003, Rodríguez *et al.*, 2005).

Sin embargo, estudios basados en la resistencia en poblaciones de *Ae. aegypti* en la ciudad de Mérida, Yucatán, presentaron diferentes variaciones en las frecuencias de mutación asociadas con la resistencia a grupos de insecticidas como clorpirifos (Deming *et al.*, 2016) y organofosforados (Flores *et al.*, 2006, Aponte *et al.*, 2013), en lugares cercanos a la ciudad de Mérida (Flores *et al.*, 2012). En Yucatán, México, la frecuencia de la mutación L1014F en poblaciones de *Cx. quinquefasciatus*, relacionada con la resistencia a insecticidas es similar a los estudios realizados por Ponce *et al.*, (2016) en el noreste de México, donde se determinó la presencia de la mutación en 16 poblaciones de *Cx. quinquefasciatus*; sin embargo, la presencia de esta mutación también fue reportada en *Anopheles spp*, tres *Culex spp*, *Cx. pipiens* (Bkhache *et al.*, 2016, Dong *et al.*, 2014, Scott *et al.*, 2014, Qiang *et al.*, 2011) en sitios urbanos y rurales en Marruecos, modificando la estructura del canal de sodio (Singh *et al.*, 2015, Bhache *et al.*, al. 2016, Niang *et al.*, al. 2016).

La distribución del alelo mutante 1014F en los diez sitios muestreados en el estado de Yucatán, México durante la estación seca fue alta en áreas como Kanasin con un 100%, Uman con 90% y Juan Pablo II con 70%, mientras que solo en el área rural en el municipio

de Xkalakdzonot, la frecuencia del alelo mutado fue alta con 96%. Se observó un aumento en la frecuencia de la mutación en la colonia Juan Pablo II, la colonia de Centro, Uman y Kanasin durante la estación lluviosa y seca. Estos hallazgos probablemente se deben al uso de productos de consumo personal, como los insecticidas domésticos, como lo mencionan Loroño-Pino *et al.*, (2014) así como el uso frecuente de piretroides para el control de *Ae. aegypti* alrededor de las casas, generando una presión de selección en las áreas urbanas mencionadas por Saavedra-Rodriguez *et al.*, (2015). Esto provoca el aumento de las mutaciones relacionados con la resistencia a los insecticidas, un evento que podría explicar las altas frecuencias encontradas en algunas áreas urbanas. Por otro lado, las áreas rurales como Motul y Xkalakdzonot, mostraron valores significativos de mutaciones 1014F en poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* recolectadas en estos sitios. Vale la pena mencionar que el municipio de Xkalakdzonot fue el área rural que presentó la mayor frecuencia de alelos mutantes 1014F en ambas estaciones del año (lluvioso y seco). Esto muestra una diferencia estadísticamente significativa con respecto a otros sitios en el área rural. La alta frecuencia de la mutación L1014F probablemente se deba a varios factores, como el flujo de genes en un rango de 180 km, la migración que probablemente sean las únicas fuerzas evolutivas implicadas en la aparición de un nuevo alelo de resistencia en una población determinada. (Sarkar *et al.*, 2009, Gorrochotegui, 2002), así como la exposición de estos vectores a los insecticidas utilizados en la agricultura (Molly, 2016). En muchas comunidades rurales, las personas trabajan en campos de cultivo con diversos tipos de insecticidas, herbicidas y fungicidas disponibles en el mercado y los aplican para el control de plagas. Durante los trabajos en el control de insectos, muchos de los equipos utilizados se lavan en criaderos de mosquitos ejerciendo una gran presión de selección sobre las larvas de mosquitos, causando la aparición de resistencia a los insecticidas en *Cx. quinquefasciatus* Say (Corvel *et al.*, 2007). Esto aumenta la probabilidad de inducir resistencia a los insecticidas (Molly, 2016, Nkya *et al.*, 2013), posiblemente explica las diferencias observadas en cada sitio.

La aplicación de técnicas bioquímicas para determinar los cambios que ocurren en los mecanismos de resistencia a insecticidas en las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* en las áreas rurales y urbanas, es de gran importancia para el conocimiento del uso adecuado de los insecticidas y otros compuestos químicos como los herbicidas que son usados de

manera continua en la región, de esta manera poder evitar la aparición temprana de individuos resistentes. Aunado a esto, se realizaron encuestas basadas en la resistencia a insecticidas, en áreas que presentan altas tasas de enfermedades transmitidas por vectores, cuando comienza la temporada de lluvias, donde las personas aún realizan trabajos en la agricultura, tomando diferentes medios para combatir mosquitos y otras plagas de insectos domésticos (Loroño Pino *et al.*, 2014). En un ambiente endémico de dengue. El uso extensivo de estos productos químicos probablemente se relaciona en gran medida con la infestación de mosquitos dentro de las casas, que no solo pican a los humanos sino que también son molestos, especialmente *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* (Garcia-Rejon *et al.*, 2008, Loroño-Pino *et al.*, 2013).

Sin embargo, se reportó que el uso frecuente e indiscriminado de estos compuestos químicos resultó en altos niveles de resistencia a los insecticidas en varias especies de mosquitos (Suman *et al.*, 2010; Tantely *et al.*, 2010; Alout *et al.*, 2007) causando cambios en las actividades enzimáticas, actividades metabólicas y mutaciones en el sitio blanco (Osta *et al.*, 2012), debido a que los insecticidas utilizados en la agricultura presentan estructuras químicas similares, con los mismos objetivos y modos de acción, que a su vez son utilizados para el control de vectores (Khambay y Jewess, 2010). Trabajos reportados adicionales (Overgaard, 2006) en el norte de Tailandia, informan sobre posibles áreas de desarrollo de resistencia a insecticidas en mosquitos, debido al uso de compuestos químicos en la agricultura. A pesar del control de las plagas agrícolas que se aplican en las áreas rurales y de las plagas domésticas en las áreas urbanas, es probable que afecten el desarrollo de resistencia en los vectores de enfermedades (Diabate *et al.*, 2002).

A pesar del control de las plagas agrícolas que se aplican en las áreas rurales y de las plagas domésticas en las áreas urbanas, es probable que afecten el desarrollo de resistencia en los vectores de enfermedades (Diabate *et al.*, 2002). En áreas urbanas, el depósito de los herbicidas, insecticidas en forma de aerosoles, letrinas, drenajes abiertos y charcos contaminados pueden ser utilizados por *Cx. quinquefasciatus* como sitios de reproducción, donde pueden desarrollarse con éxito en (Jones *et al.*, 2012). Durante el trabajo en el control de insectos plagas, ya sea en el campo o en áreas urbanas, muchos de los equipos utilizados se lavan en criaderos de mosquitos ejerciendo una gran presión de

selección sobre las larvas de mosquitos, causando la aparición de resistencia a los insecticidas en *Cx. quinquefasciatus* (Corvel *et al.*, 2007). Es probable, que nuestro estudio muestre datos relevantes en el sureste de México, donde las condiciones socioeconómicas en áreas urbanas y rurales son incomparables (Loroño-Pino *et al.*, 2014). Los insecticidas químicos en forma de aerosoles en la mayoría de los sitios se usan para matar cucarachas, hormigas, moscas y mosquitos con aplicaciones diarias o quincenales, debido a que los mosquitos infestan las casas durante todo el año (García-Rejon *et al.*, 2008, Loroño-Pino *et al.*, 2013).

Así, el uso y la aplicación de los productos químicos de una manera irracional, también podría explicar la resistencia de *Cx. quinquefasciatus* a los insecticidas piretroides (Czeher *et al.*, 2008), esta hipótesis fue confirmada con encuestas realizadas por Corvel *et al.*, (2007) en poblaciones *Cx. quinquefasciatus* en Benin, dependiendo en gran medida del uso de insecticidas que tienen el canal de sodio como sitio objetivo, que se ven afectados por las prácticas agrícolas y el uso insecticidas dentro de las casas (Theresia *et al.*, 2013) mejorando la capacidad de desintoxicación e influenciado por el uso de pesticidas en la agricultura, así como la cantidad de compuestos xenobióticos antropogénicos o naturales encontrados en los criaderos (Theresia *et al.*, 2013). Estudios realizados por (Poupardin *et al.*, 2008, 2012; Riaz *et al.*, 2009) demostraron la existencia de interacciones entre xenobióticos como metales pesados (cobre), hidrocarburos aromáticos policíclicos (fluorenathene, benzopyrene) o herbicidas (glifosato y atrazina) y la expresión de genes de mosquitos que codifican enzimas de desintoxicación. La mayoría de los insecticidas son moléculas lipofílicas, es probable que confieran resistencia cruzada a múltiples insecticidas, debido a la presencia de contaminantes o residuos de plaguicidas como los utilizados en el trabajo agrícola (David *et al.*, 2010), lo que provoca la selección de resistencia en mosquitos, que afecta los programas de control de vectores (Chouaibou *et al.*, 2008; Diabate *et al.*, 2002; Yadouleton *et al.*, 2009, 2011).

Desde hace ya varios años atrás, las prácticas agrícolas favorecen la resistencia metabólica (Motowo *et al.*, 2010) provocando cambios estructurales en vectores de insectos, modificando las enzimas de desintoxicación (Braga *et al.*, 2007), que implican cambios en la acetilcolinesterasa (AChE) en el metabolismo o secuestro de insecticidas

(Karunartne, 2000). La actividad insensible de la acetilcolinesterasa se encontró en diez sitios de Yucatán, elevadas actividades fueron determinadas en tres áreas urbanas y tres áreas rurales, respecto a los otros sitios, también se encontró una gran cantidad de individuos heterocigotos (CUADRO 3). Es importante tener en cuenta que la aparición de estos sitios alterados en las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* resistentes al propoxur, están relacionadas con el uso frecuente de insecticidas en forma de aerosoles, herbicidas y otros compuestos químicos utilizados en el campo (CUADRO 2), similar a los estudios realizados por Feng *et al.*, (2006) con alta actividades de la acetilcolinesterasa insensible en poblaciones de *Cx. pipiens* recolectadas en el sur de China. La importancia del estudio sobre la acetilcolinesterasa y acetilcolinesterasa insensible como mecanismo de resistencia mediante pruebas enzimáticas, pueden ser de gran utilidad y tener implicaciones generalizadas para las futuras metodologías, para conocer los factores que contribuyen al desarrollo de los mecanismos de resistencia a insecticidas.

Los ensayos bioquímicos y moleculares competitivos ayudaron a detectar mecanismos de resistencia específicos en insectos individuales y las cuales fueron usadas para estimar la frecuencia de genes de resistencia en poblaciones de *Cx. quinquefasciatus*. Estas poblaciones colectadas en zonas urbanas y rurales, mostraron evidencia sobre mecanismos de resistencia alterados para insecticidas piretroides y organofosforados. El propoxur fue usado en este ensayo para inhibir la actividad de la AChE sensible (es decir, susceptible) y permitió la detección de la enzima alterada cuando está presente (Mariah and Janet, 2012). En mosquitos resistentes, el insecticida no puede inhibir AChE. El número de alelos de AChE insensible es mayor a medida que el color amarillo se oscurece; sin embargo, puede ser difícil determinar puntos de corte exactos a simple vista.

Sin embargo, con las pruebas para la mutación L1014F y AchE insensible, se observaron notables diferencias entre las localidades de las zonas urbanas y rurales. Se demostró que existe variación entre los porcentajes de los genotipos para los alelos resistentes en el gen del canal de sodio en dos temporadas distintas, las frecuencias más elevadas durante las dos temporadas fueron en la colonia de Juan Pablo II con 0.71 y 0.85 de frecuencia alélica, Kanasín con 0.98 y 0.85, Umán con 0.90 y 0.48. En la zona rural, Hunucamá con 0.48 y 0.73, Caucel con 0.62 y 0.73, Chocholá con 0.64 y 0.79,

Xkalakdzonot con 0.96 y 0.87 de frecuencia de alelos resistentes, lo que significa que en estos lugares existen probabilidades de que la población de *Cx. quinquefasciatus* sean resistentes a insecticidas piretroides. Lo cual demuestra que probablemente se sometió a presión de selección de manera indirecta (Ponce *et al.*, 2016; Ndiath *et al.*, 2012) en el ambiente rural y urbano. Las localidades con porcentajes de genotipos resistentes al propoxur fueron la colonia de Vergel III con 38.09% de 42 individuos analizados en la zona urbana, en la zona rural fueron los municipios de Hunucmá con 23.08% de individuos resistentes a propoxur, sin embargo la cantidad de individuos heterocigotos fue entre el 14% y el 75% de la población.

Los insecticidas se han usado ampliamente en la agricultura desde la década de los 1980 (Akogbéto *et al.*, 2005), incluidos insecticidas organofosforados y piretroides pertenecientes a las dos clases principales recomendadas para el control de vectores en salud pública, también son utilizados indiscriminadamente para controlar plagas en cultivos, las cuales durante los tratamientos, los residuos de los insecticidas en los campos son lavados en los criaderos de mosquitos, ejerciendo una gran presión de selección (Yadouléton *et al.*, 2015).

Los datos presentados aquí, derivados de muestras recolectadas, muestran probablemente los mecanismos de resistencia alterados por la aplicación de organofosforados que son utilizados ampliamente para el control de plagas tanto agrícolas como paisajísticas debido a su toxicidad relativamente baja y baja persistencia en el sistema de mamíferos, en comparación con los plaguicidas organoclorados (Kazemi *et al.*, 2012). Aunque existe evidencia sobre la resistencia a piretroides como a temefos (organofosforado) que son utilizados para controlar larvas y adultos de *Ae. aegypti* (Viana *et al.*, 2017). Sin embargo la alteración de los mecanismos enzimáticos y la insensibilidad del sitio objetivo probablemente ocurra debido al uso generalizado de la permetrina, la cual confiere resistencia cruzada con organofosforados (Aponte *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2005) que se utilizan recientemente en los programas de control en México. En sitios rurales y urbanas como Hunucmá, Kanasín, Umán, Chocholá y Xkalakdzonot, se esperaba encontrar una baja frecuencia de la mutación L1014F y sitios alterados de AchE, debido a que son considerados como áreas de baja transmisión de enfermedades transmitidas por vector, por

lo tanto la aplicación de insecticidas es incomparable con las colonias de Juan Pablo II y Vergel III (Saavedra-Rodríguez *et al*, 2015), demostraron el flujo de genes resistentes a los insecticidas en Yucatán, y concluyeron que en las áreas donde el insecticida ya no se aplican, las frecuencias de los alelos resistentes disminuyó.

Asimismo, estudios de genética de poblaciones demostraron que las poblaciones de mosquitos en Yucatán experimentan un flujo libre de genes dentro de los 180 km (Gorrochotegui *et al*, 2002), Esto sugiere que las diferencias observadas en el genotipos resistentes están siendo impulsadas por presiones de escala fina, como la exposición focal a insecticidas, como se hipotetizó en un estudio de genética de poblaciones reciente de Saavedra et al. (Saavedra-Rodríguez *et al*, 2015). Probablemente, lo anteriormente descrito, se deba al uso doméstico de insecticidas para mantener la presión de los piretroides, aún cuando los programas de control de vectores hayan cambiado de grupo químico. Existen estudios que demostraron que 3 años después de que el programa de control de vectores suspendió el uso de deltametrina, la resistencia a deltametrina y una alta frecuencia de alelos *kdr*, persisten en las poblaciones de mosquitos.

## IX. CONCLUSIONES

1. En este estudio, se determinó el estado de resistencia a insecticidas de las especies de *Culex quinquefasciatus*, mostrando un patrón similar de alelos resistentes para insecticidas piretroides y organofosforados en zonas urbanas y rurales.
2. Se observó que factores ambientales como la ecología, los criaderos con material de cemento, plástico con mayor volumen de agua oscura con alto grado de materia orgánica, contribuyen en el desarrollo exitoso de las poblaciones de *Culex quinquefasciatus* en zonas urbanas y rurales.
3. La frecuencia de la mutación L1014F en el gen *kdr* fue significativo, mostrando una asociación directa entre los alelos resistentes con los sitios de colecta durante la temporada de lluvias y de secas en las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus*.
4. En las zonas rurales y urbanas, los mecanismos de acción enzimática asociados a la resistencia a insecticidas, fue caracterizado el mecanismo de la AchE alterado, que contribuye a la resistencia a los insecticidas organofosforados y carbamatos en poblaciones de *Cx. quinquefasciatus*.
5. Las frecuencias de genotipos resistentes detectados entre las localidades de las zonas urbanas y rurales, están asociados a la resistencia a insecticidas piretroides y organofosforado, que son los grupos de insecticidas más utilizados durante las campañas de control de vectores.
6. Los compuestos químicos utilizados en la agricultura probablemente estén influyendo en el desarrollo de la resistencia a los insecticidas en las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus*.
7. Estos resultados serán fundamentales para diseñar estrategias y poder preservar la efectividad de los insecticidas, así como actualizar el estado de resistencia en las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus*.

## **X. RECOMENDACIONES**

1. Realizar un análisis molecular de otras mutaciones que probablemente se encuentran presentes en otros segmentos del gen de canal de sodio.
2. realizar pruebas bioquímicas para enzimas estererasas, glutatión S-transferasas, receptores gaba, involucrados en la resistencia a insecticidas, para crear métodos más específicos de detección temprana de la resistencia.
3. Establecer estrategias de control integrado en las zonas rurales, con el fin de preservar la efectividad de los productos aprobados por la OMS, así como actualizar el estado de la resistencia en las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus*.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad M, Denholm I, Bromilow RH. 2006. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Manag Sci.* 62:805-810.
- Akogbéto M, Djouaka R, Noukpo H. Use of agricultural insecticides in Benin. *Bull Soc Pathol Exot.* 2005; 98:400–5.
- Almirón W. R., Humeres S. G. & Gardenal S. N. 1995. Distribution and hybridization between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 90: 469-73.
- Andreas AK, Ben AM, Botchey AM. 2011. Aqueous neem extract versus neem powder on *Culex quinquefasciatus*: implications for control in anthropogenic habitat. *J. Ins. Sci.* 11:1-9.
- Alout H, Djogbenou L, Berticat C, Chandre F, Weill M. 2008. Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetylcholinesterase 1 biochemical properties. *Comp. Biochem. Physiol. B* 150:271–77
- Alout H, Berthomieu A, Hadjivassilis A, Weill M. 2007. A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. *Insect biochemistry and molecular biology* 37: 41–47
- Alon M, Alon F, Nauen R, Morin S. 2008. Organophosphates' resistance in the B-biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an *ace1*-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38:940–49.
- Anazawa Y, Tomita T, Aiki Y, Kozaki T, Kono Y. 2003. Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33:509–14-
- Andrias O. O'Reilly, Bhupinder P. S. Khambay, Martin S. Williamson, Linda M. Field, B. A. Wallace and T. G. Emyr Davies. 2006. Model-ling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium chan-nel. *Biochemistry Journal.* 396, 255–263.

- Aponte HA, Penilla RP, Dzul-Manzanilla F, CheMendoza A, López AD, Solis F, *et al.* 2013. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. *Pestic Biochem Physiol.* 107:226-234.
- Arana-Guardia R, CM Baak-Baak, MA Loroño-Pino, C Machain-Williams, BJ Beaty, L Eisen, JE García-Rejón. 2014. Stormwater drains and catch basins as sources for production of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Acta tropica.* 134: 33-42
- Araujo FMDC, Nogueira RMR, De Araujo JMG, Ramalho ILC, *et al.* Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceara, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101:925–928
- Atkinson CT, Words RL, Dusek RJ, Siles LS, Iko WM. Wildlife disease and conservation in Hawaii: Pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected Iwi (*Vestiaria coccinea*). *Parasitology.* 1995;111:559-569
- Baak-Baak, C. M., R. Arana-Guardia, N. Cigarroa-Toledo, M. A. Loroño-Pino, G. Reyes-Solis, C. Machain-Williams, B. J. Beaty, L. Eisen, and J. E. Garcia-Rejon. 2014a. Vacant lots: productive sites for *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) in Merida City, Mexico. *Journal of medical entomology* 51: 475-483.
- Baak-Baak C. M., D. A. Moo-Llanes, N. Cigarroa-Toledo, F. I. Puerto, C. Machain-Williams, G. Reyes-Solis, Y. J. Nakazawa, A. Ulloa-Garcia, and J. E. Garcia-Rejon. 2017. Ecological Niche Model for Predicting Distribution of Disease-Vector Mosquitoes in Yucatan State, Mexico. *J. Med. Entomol.* 54: 854–861.
- Barbosa RMR, Regis L, Vasconcelos RL, Leal WS. 2010. *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) egg laying in traps loaded with *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis* and baited with skatole. *J Med Entomol.* 47:345-348.
- Bass, C., and L. M. Field. 2011. *Gene amplification and insecticide resistance. Pest Management Science* 67: 886-890.
- Berenbaum MR. 1991. Coumarins. In *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*, ed. GA Rosenthal, MR Berenbaum, pp. 221–49. New York: Academic.
- Butler D. 2011. Mosquitoes score in chemical war. *Nature* 475:19.
- Bkhache M., FZ. Tmimi, O. Charafeddine, C. Faraj, AB. Failloux, M. Sarih. 2016. First report of L1014F-*kdr* mutation in *Culex pipiens* complex from Morocco. *Parasit Vectors.* 9:644.
- Black IV., W.C. and N. M. DuTeau. 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. *Mol. Biol. Insect Dis. Vectors.* 361-373.
- Blaustein I., Kotler B.P. 1993. Oviposition habitat selection by the mosquito, *Culiseta longiareolata*: Effects of conspecifics, food and green tadpoles. *Ecol. Entomol.* 18:104-108.

- Bloomquist JR. 2003. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Insect Biochem. Physiol.* 54:145–56.
- Braga IA, Valle D. 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde* 2007; 16(4):279–293.
- Brackenbury WJ, Isom LL. 2011. Na Channel  $\beta$  Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Front Pharmacol.* 2:53.
- Bradberry SM, Cage SA, Proudfoot AT, Vale JA. 2005. Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol Rev* 24: 93-106.
- Bregues C, Hawkes NJ, 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 Vet Entomol.* 2003;17:87–94
- Brewer, M., Bufa L., Almirón W. (1987). *Culex pipiens quinquefasciatus* y *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) en Córdoba, Argentina. *Rev. Per. Entomol*; 29:69-72.
- Brogdon, W.G., McAllister, J.C., Corwin, A.M., Cordon-Rosales, C., 1999. Independent selection of multiple mechanisms for pyrethroid resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *J. Econ. Entomol.* 92, 298-302.
- Brogdon, W.G., Barber, A.M., 1990. Fenitrothion–deltamethrin cross-resistance conferred by esterases in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 3, 130-139.
- Brogdon, W.G. 1984. Mosquito protein microassay.1. Protein determinations small portions single-mosquito homogenates. *Comparative Biochemistry and physiology. B, Comparative Biochemistry.* 79: 457-9.
- Callaghan A., Hemingway, C. A. Malcolm 1993. The selection and genetic analysis of esterase electromorphs in an organophosphate-resistant strain of *Culex pipiens* from Italy.
- Casida JE, Durkin KA. 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58:99–117.
- Casida JE. 2009. Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide actions. *Chem Res Toxicol* 22: 609-619.
- Carpenter SJ, WJ La Casse. 1965. Mosquitoes of North America (North of Mexico), University of California Press, Berkeley, CA.
- Catterall WA. 2000. from ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltagegated sodium channels. *Neuron.* 26:13–25.

- Catterall WA. Sodium channels, inherited epilepsy, and antiepileptic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014; 54:317–338.
- Cigarroa-Toledo N, BJ Blitvich, RC Cetina-Trejo, LG Talavera-Aguilar, CM BaakBaak, OM Torres-Chable, MN Hamid, I Friedberg, P Gonzalez-Martinez, G Alonzo-Salomon, EP Rosado-Paredes, N Rivero-Cardenas, GC. Reyes-Solis, JA Farfán-Ale, JE García-Rejón, C Machain Williams. 2016. Chikungunya Virus in Febrile Humans and *Aedes aegypti* Mosquitoes, Yucatan, Mexico. *Emerging Infectious Diseases.* 22: 1804-1807.
- Cole LM, Nicholson RT, Casida JE. 1993. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pestic. Biochem. Physiol.* 46:47–54.
- Cole LM, Roush TT, Casida JE. 1995. *Drosophila* GABA-gated chloride channel: modified (3H)EBOB binding site associated with Ala → Ser or Gly mutants of *Rdl* subunit. *Life Sci.* 56:757–65.
- Corbel V, N'Guessan R, Brengues C, Chandre F, Djogbenou L, Martin T, et al. 2007. Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop*;101:207–16
- Chang MC, HJ Teng, CF Chen, YC Chen, CR Jeng. 2008. The resting sites and bloodmeal sources of *Anopheles minimus* in Taiwan. *Malaria Journal* 7: 105.
- Chandre F, Darriet F, Darder M, et al. 1998. Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from West Africa. *Medical and Veterinary Entomology.* 12, 359–366.
- Chandre F, Darriet F, Doannio JMC, Riviere F, Pasteur N, et al.1997. Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in West Africa. *Journal of medical entomology* 34: 664–671
- Chen M, Du Y, Nomura Y, Zhu G, Zhorov BS, Dong K.2017. Mutations of two acidic residues at the cytoplasmic end of segment IIIS6 of an insect sodium channel have distinct effects on pyrethroid resistance. *Insect Biochem Mol Biol.* Mar;82:1-10
- Chiu TL, Wen Z, Rupasinghe SG, Schuler MA. 2008. Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:8855–60.
- Chouaibou, M., Etang, J., Brevault, T., Nwane, P., Hinzoumbe, C.K., Mimpfoundi, R., Simard, F. 2008. Dynamics of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon. *Trop. Med. Int. Health* 13: 476-486.

- Clark-Gil S, Darsie Jr RF. 1983. The mosquitoes of Guatemala. Their identification, distribution and bionomics, with keys to adult females and larvae. *Mosquito Systematics* 15: 151–284.
- Czeher C, Labbo R, Arzika I, Duchemin JB. 2008. Evidence of increasing Leu-Phe knockdown resistance mutation in *Anopheles gambiae* from Niger following a nationwide long-lasting insecticide-treated nets implementation. *Malar J.*;7:189.
- Darsie Jr RF, Ward RA. 2005. Identification and Geographical Distribution of the Mosquitoes of North America, North of Mexico. University of Florida Press, Gainesville, Florida.
- David Adebote A., J. Sonnie Oniye, S Iliya Ndams and K. Mary Nache. 2016. The breeding of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in peridomestic containers and implication in Yellow Fever Transmission in Villages Around Zaira, Northern Nigeria. *Journal of Entology* 3: 180-188.
- David, J.P., Coissac, E., Melodelima, C., Poupardin, R., Riaz, M.A., Chandor-Proust, A., Reynaud, S. 2010. Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics* .11: 216.
- Davari B, Vatandoost H, Oshaghi MA, Ladonni H, Enayati AA, et al. 2007. Selection of *Anopheles stephensi* with DDT and dieldrin and cross resistance spectrum to pyrethroids and fipronil. *Pestic. Biochem. Physiol.* 89:97–103
- Deming R., P. Manrique-Saide, A. Medina Barreiro, E. U. Koyoc Cardena, A., Chemo-Mendoza, B. Jones, K. Liebman, L. Vizcaino, G. Vazquez-Prokopec and A. Lenhart. 2016. Spatial variation of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* presents unique vector control challenges. *Parasit. Vectors.* 9:67.
- Diabate, A.; Baldet, T.; Chandre, F.; Akogbeto, M.; Guiguemde, T. R.; Darriet, F.; Brengues, C.; Guillet, P.; Hemingway, J.; Small, G. J.; and Hougaard, J. M. 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s. l. in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67: 617-622.
- Dong, K., Y. Du, F. Rinkevich, Y. Nomura, P. Xu P, L. Wang, K. Silver and B. S. Zhorov. 2014 Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 50:1–17.
- Dohm DJ, Sardelis MMR, Turell MJ. 2002. Experimental vertical transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 39:640-44.

- Duschinka RD Guedes, Marcelo HS Paiva, Mariana MA Donato, Priscilla P Barbosa, Larissa Krokovsky, Sura W Dos S Rocha, Karina LA Saraiva<sup>1</sup>, Mônica M Crespo, Tatiana MT Rezende, Gabriel L Wallau, Rosangela MR Barbosa, Cláudia MF Oliveira, María AV Melo-Santos, Lindomar Pena, Marli T Cordeiro, Rafael F De O Franca, André LS De Oliveira, Christina A Peixoto, Walter S Leal And Constanca FJ Ayres. 2017. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg. Microbes Infec.* 6:8.
- Du W, Awolola TS, Howell P, Koekemoer LL, Brooke BD, et al. 2005. Independent mutations in the *Rdl* locus confer dieldrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Insect Mol. Biol.* 14:179–83
- Djouaka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, Akogbeto MC, Ranson H, et al. 2008. Expression of the cytochrome P450s, *CYP6P3* and *CYP6M2* are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics* 9:538.
- Enayati AA, Vatandoost H, Ladonni H, Townson H, Hemingway J. 2003. Molecular evidence for a kdr-like pyrethroid resistance mechanism in the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Med. Vet. Entomol.* 17:138–44.
- Elizondo-Quiroga, D., C. T. Davis, I. Fernandez-Salas, R. Escobar-Lopez, D. Velasco Olmos, L. C. Soto Gastalum, M. Aviles Acosta, A. Elizondo-Quiroga, J. I. Gonzalez-Rojas, J. F. Contreras Cordero, H. Guzman, A. Travassos da Rosa, B. J. Blitvich, A. D. Barrett, B. J. Beaty, and R. B. Tesh. 2005. West Nile Virus isolation in human and mosquitoes, Mexico. *Emerg. infect. Dis.* 11: 1449-1452.
- Fang F, Wang W, Zhang D, Lv Y, Zhou D, Ma L, et al. 2015. The cuticle proteins: a putative role for deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. *Parasitol. Res.* 114: 4421-4429.
- Farid H. A., Hammad R. E., Hassan M. M., Morsy Z. S., Kamal I. H., Weil G. J., et al. 2001. Detection of *Wuchereria bancrofti* in mosquitoes by the polymerase chain reaction: a potentially useful tool for large-scale control programmes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95: 29-32.
- Farajollahi Ary , Dina M. Fonseca , Laura D. Kramer, A. Marm Kilpatrick. 2011. Bird biting’’ mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution.* 11:1577-1585.
- Feyereisen R. 2005. Insect cytochrome P450. In *Comprehensive Molecular Insect Science*, ed. LI Gilbert, K Iatrou, SS Gill, 4:1–77. Amsterdam, Neth.: Elsevier BV.

- Ferreira AC, Neto FC. 2007. Infestação de área urbana por *Aedes aegypti* e relação com níveis socioeconômicos. *Rev Saude Publica*. P. 41:6.
- Feng Cui, Michel Raymond, Arnaud Berthomieu, Haoues Alout, Myle` ne Weill and Chuan-Ling Giao. 2006. Recent Emergence of Insensitive Acetylcholinesterase in Chinese Populations of the Mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 43: 878-883.
- Fishel FM. 2011. Pesticide Toxicity Profile: Chlorinated Hydrocarbon Pesticides. 1-3.
- Fukuto TR.1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect* 87: 245-254.
- Ffrench-Constant RH, Anthony N, Aronstein K, Rocheleau T, Stilwell G. 2000. Cyclodiene insecticide resistance: from molecular to population genetics. *Annu. Rev. Entomol.* 45:449–66
- Ffrench-Constant, R. H., Rochelaeau, T. A., Steichen, J.C., Chalmers, A. E., 1993. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363, 449-451.
- Flores A.E., G. Ponce, B.G. Silva, S.M. Gutierrez, C. Bobadilla, B. Lopez, R. Mercado and W.C. Black. 2013. Wide spread cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Veracruz State Mexico. *J. Econ. Entomol.*, 106: 959–969.
- Flores AE., G. Ponce, M.A Loroño, J.E García, C. Machain, G. C. Reyes, S. Lozano, E. Lars, B. J Beaty, W.C. Black. 2012. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* in Mexico: im- plications for dengue control (abstract). *DMID Intern. Res. in Infect. Dis. Meet.* Bethesda, MD.49
- Flores, A.E., J.S. Grajales, , I.F. Salas, , G.P. Garcia, M.H. Becerra, S. Lozano, , W.G. Brogdon, W.C. Black and, B. Beaty. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22:672–677.
- Flores AE, Albeldaño-Vázquez W, Salas IF, Badii MH, Becerra HL, Garcia GP, *et al.* 2005. Elevated  $\alpha$ -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. *Pestic Biochem Physiol.* 82:66-78.
- Gatton ML, Chitnis N, Churcher T et al.2013. The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa. *Evolution.* 67: 1218–1230.
- García-Rejón JE, JA Farfán-Ale, A Ulloa, LF Flores-Flores, E Rosado-Paredes, CM Baak-Baak, MA Loroño-Pino, I Fernández-Salas, BJ Beaty. 2008. Gonotrophic cycle

- estimate for *Culex quinquefasciatus* in Merida, Yucatan, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 24: 344-348.
- García-Rejón JE, MA Loroño-Pino, JA Farfán-Ale, LF Flores-Flores, MP López-Uribe, R. Nájera-Vázquez, G Nuñez-Ayala, BJ Beaty, L Eisen. 2011b. Mosquito infestation and dengue virus infection in *Aedes aegypti* females in schools in Merida, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 84: 489-49.
- Garcia, G. P., A. E. Flores, I. Fernandez-Salas, K. Saavedra-Rodriguez, G. Reyes-Solis, S. Lozano-Fuentes, J. Guillermo Bond, M. Casas-Martinez, J. M. Ramsey, J. Garcia-Rejon, M. Dominguez-Galera, H. Ranson, J. Hemingway, L. Eisen, and I. W. Black. 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 3: e531.
- Garcia-Rejon Julian E., Julio A Chan-Orilla, Nohemi Cigarroa-Toledo, Wilberth A Chi Chim, Oswaldo M Torres-Chable, Guadalupe A CruzEscalona, Carlos Machain-Williams, Jorge Mendez-Galvan, Julio C TzucDzul and Carlos M Baak-Baak. 2018. Laboratory evaluation of the Ile1, 016 mutation-effect on several life-history parameters of *Aedes aegypti*. *IJMR*; 5: 112-120
- García-Rejón JE, Loroño-Pino MA, Farfán-Ale JA, Flores-Flores L, Rosado-Paredes ED, RiveroCardenas N, Nájera-Vázquez R, Gomez-Carro S, Lira-Zumbardo V, Gonzalez-Martinez P, Lozano-Fuentes S, Elizondo-Quiroga E, Beaty BJ, Eisen L. 2008. Dengue virus-infected *Aedes aegypti* in the home environment. *Am J Trop Med Hyg*. 79:940–950.
- Gazave, E.; Chevillon, C.; Lenormand, T.; Marquine, M.; Raymond, M. 2001. Dissecting the cost of insecticide resistance genes during the overwintering period of the mosquito *Culex pipiens*. *Heredity* 87: 441-448.
- Goldin AL. 2002. Evolution of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *J Exp Biol*. 205:575–584.
- Gordon, J.R., Ottea, J., 2012. Association of esterases with insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Econ. Entomol*. 105:971–978.
- Gorrochotegui-Escalante N, Gomez-Machorro C, Lozano-Fuentes S, Fernandez-Salas L, De Lourdes Munoz M, Farfan-Ale JA, et al. 2002. Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. *Am J Trop Med Hyg*. 66:213–22.
- Gunning RV, Devonshire AL, Moores GD. 1995. Metabolism of esfenvalerate by pyrethroid susceptible and resistant Australian *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic Biochem Physiol*. 51:205-213.
- Gjullen CM, Peters RF. 1952. Recent studies of mosquito resistance to insecticides in California. *Mosq. News* 12:1–7

- Haubruge E, Amichot M. 1998. Les mecanismes responsables de la resistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnol Agron Soc Environ*; 2: 161–174.
- Hardstone, M.C., Leichter, C., Harrington, L.C., Kasai, S., Tomita, T., Scott, J.G., 2007. Cytochrome P450 monooxygenase-mediated permethrin resistance confers limited and larval specific cross resistance in the Southern house mosquitoes, *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 89: 175–184.
- Hardine J.S., Brown C., Jones F., Taylor R. 2007. Distribution and habitats of mosquito larvae in the Kingdom of Tonga. *Australian J. Entomol.* 46:332-338
- Hemingway J, Hawfes NJ, McCarroll L, Ranson H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 653–665.
- Hemingway, J. 2004. Taking aim at mosquitoes. *Nature* 430: 936.
- Hemingway J, Field L, Vontas J. 2002. An overview of insecticide resistance. *Science.* 298:96–97
- Hemingway, J.; Coleman, M.; Paton, M.; Mccarroll, M.; Vaughan, A.; Desilva, D. 2000. Aldehyde oxidase is coamplified with the words most common *Culex* mosquito insecticide resistance associated esterases. *Insect Molecular Biology.* 9:93-99.
- Hemingway J, Ranson H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol.* 45: 371-391.
- Hemingway, J., Karunaratne, S.H.P.P., 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med. Vet. Entomol.* 12: 1-12.
- Heard S.B. 1994b. Imperfect oviposition decision by the pitcher plant mosquito *Wyeomyia smithii*. *Evolutionary Ecology* 8:493-502.
- Herath, P.R.J., Hemingway, J., Weerasinghe, I.S. and Jayawardena, K.G.I., 1987. The detection and characterisation of malathion resistance in field populations of *Anopheles culicifacies* B in Sri Lanka. *Pestic. Biochem. Physiol.* 29, 157-162
- Ibáñez-Bernal S, Martínez-Campos C. 1994. Clave para la identificación de larvas de mosquitos comunes en las áreas urbanas y suburbanas de la República Mexicana (Díptera: Culicidae). *Folia Entomológica Mexicana.* 92: 43–73.
- Itokawa K, Komagata O, Kasai S, Okamura Y, Masada M, et al. 2010. Genomic structures of *Cyp9m10* in pyrethroid resistant and susceptible strains of *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40:631–40.

- Janousek TE, Lowrie RC 1989. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* (Haitian strain) following infestation with *Wuchereria bancrofti*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 83:679-680.
- Jokanović M, Kosanović M. 2010. Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. *Environ Toxicol Pharmacol* 29: 195-201
- Jokanovic M. 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166: 139-160.
- Jones C, Machin C, Majambere K, Ali S, Khatib A, Mcha O, et al. 2012. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* from Zanzibar: implications for vector control programmes. *Parasit Vectors.* 5:78.
- Juan A. Bisset. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Rev. Cubana Med Trop.* 54:202-219.
- Juliano S.A. 2009. *Annual Review of Entomology* .54:37-56.
- Kasai S, Komagata O, Itokawa K, Shono T, Ng LC, Kobayashi M, et al. 2014. Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism. *PLOS Neglect. Trop. D.* 8: e2948.
- Kasai, S., Weerasinghe, I.S., Shono, T., Yamakawa, M., 2000. Molecular cloning, nucleotide sequence and gene expression of a cytochrome P450 (CYP6F1) from the pyrethroid-resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30:163-171.
- Karunaratne S.h.p.p. and J. Hemingway. 2000. Insecticide resistance spectra and resistance mechanisms in populations of Japanese encephalitis vector mosquitoes, *Culex tritaeniorhynchus* and *Cx. gelidus*, in Sri Lanka. *Medical and Veterinary Entomology:* 14: 430–436.
- Kazemi, M., Tahmasbi, A. M., Valizadeh, R., Nazerian, A. A., Soni, A., & Moheghi, M. M. 2012. Importance and toxicological effects of organophosphorus pesticides: A comprehensive review. *Journal of Agricultural Science and Review.* 1: 43–57.
- Ke Dong. 2007. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci.* 7:17–30
- Ketterman AJ, Saisawang C, Wongsantichon J. 2011. Insect glutathione transferases. *Drug Metab. Rev.* 43:253–65.
- Kelvin AA. 2011. Outbreak of Chikungunya in the Republic of Congo and the global picture. *J. Infect. Dev. Ctries.* 5:441–44.

- Kim KH, Kabir E, Jahan SA. 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ* 575: 525-535.
- Khambay, B.P.S., Jewess, P.J. 2010. Pyrethroids. In: Gilbert, L.I., Gill, S.S. (Eds.), *Insect Control: Biological and Synthetic Agents*. Elsevier Academic Press, pp. 1e29.
- Knipple DC, Doyle KE, Marsella-Herrick PA, Soderlund DM. 1991. Tight genetic linkage between the *kdr* insecticide resistance trait and a voltage-sensitive sodium channel gene in the house fly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2483–87.
- Kwon DH, Im JS, Ahn JJ, Lee JH, Marshall Clark J, et al. 2010. Acetylcholinesterase point mutations putatively associated with monocrotophos resistance in the two-spotted spider mite. *Pesticide biochemistry and physiology*. 96: 36–42
- Lee, C.Y., Loke, K.M., Yap, H.H., Chong, A.S.C., 1997. Baseline susceptibility to malathion and permethrin in field-collected *Culex quinquefasciatus* Say from Penang, Malaysia. *Trop. Biomed.* 14:87–91.
- Lei W, Wang DD, Dou TY, Hou J, Feng L, et al. 2017. Assessment of the inhibitory effects of pyrethroids against human carboxylesterases. *Toxicol Appl Pharmacol* 321: 48-56
- Liu, N., Xu, Q., Li, T., He, L., Zhang, L., 2009. Permethrin resistance and target site insensitivity in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Alabama. *J. Med. Entomol.* 46: 1424–1429.
- Liu N, Liu H, Zhu F, Zhang L. 2007. Differential expression of genes in pyrethroid resistant and susceptible mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *Gene* 394:61–68.
- Liu H, Xu Q, Zhang L, Liu N. 2005. Chlorpyrifos resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J. Med. Entomol.* 42:815–20
- Liu H, Cupp EW, Micher KM, Guo A, Liu N. 2004. Insecticide resistance and cross-resistance in Alabama and Florida strains of *Culex quinquefasciatus*. *J. Med. Entomol.* 41:408–13
- Liu N & Pridgeon JW. 2002. Metabolic detoxification and the *kdr* mutation in pyrethroid resistant house fly, *Musca domestica* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 73: 157–163
- Linna Shi, Hongxia Hu, Kai Ma, Dan Zhou, Jing Yu, Daibin Zhong, Fujin Fang , Xuelian Chang , Shengli Hu , Feifei Zou , Weijie Wang , Yan Sun , Bo Shen , Donghui Zhang , Lei Ma , Guofa Zhou , Guiyun Yan , Changliang Zhu. 2015. Development of Resistance to Pyrethroid in *Culex pipiens pallens* Population under Different Insecticide Selection Pressures. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 9:8.

- Lin YH, Teng HJ, Ho CM, Pai HH, Wu SC, Hsu EL. 2003. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* during dengue epidemics in Taiwan. *Formosan Entomol.* 23:263–74
- Li T, Zhang L, Reid WR, Xu Q, Dong K, Liu N. 2012. Multiple mutations and mutation combinations in the sodium channel of permethrin resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *Sci. Rep.* 2:781
- Li T, Liu L, Zhang L, Liu N. 2014. Role of G-protein-coupled receptor-related genes in insecticide resistance of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Sci. Rep.* 4:6474
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR. 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.* 52:231–53
- Lockwood, J.A., Byford, R.L., Story, R.N., Sparks, T.C., Quisenberry, S.S., 1985. Behavioral resistance to the pyrethroids in the horn fly, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Environ. Entomol.* 14: 873-880.
- Lockwood JA, Spark TC, Story RN.1984. Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the role of physiology and behavior. *Bull Entomol Soc Am*; 30: 41–51.
- Lorono-Pino, M.A., Y. N. Chan Dzul, R. Zapata-Gil, C. Carrillo-Solis, A. Uitz-Mena, J.E. Garcia-Rejon, T. J. Keefe, B.J.Beaty, and L. Eisen. 2014. Household use insecticide consumer products in a dengue-endemic área in Mexico. *Trop. Med. In. Health*:10: 1267-1275.
- Loroño-Pino MA, JE García-Rejón, C Machain-Williams, S Gomez-Carro, G NunezAyala, R Nájera-Vázquez, A Losoya, L Aguilar, K Saavedra-Rodriguez, S Lozano-Fuentes, MK Beaty, WC IV Black, TJ Keefe, L Eisen, BJ Beaty. 2013. Towards a Casa Segura: a consumer product study of the effect of insecticidetreated curtains on *Aedes aegypti* and dengue virus infections in the home. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 89: 385-397.
- Lounibos LP. 2002. Invasions by insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol.* 47:233-266.
- Marquetti MC, Valdés V, Aguilera L.2000. Tipificación de hábitats de *Aedes albopictus* en Cuba y su asociación con otras especies de culícidos, 1995-1998. *Rev Cub Med Trop.* 52:170-4.
- Marquardt W.C., Demaree R.S., Grieve R.G. 2000. Parasitology and vector biology. Academic Press.697.

- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, et al. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol.* 7:179–84.
- Martinez-Torres D, Chevillon C, Brun-Barale A, Berge JB, Pasteur N, Pauron D. 1999. Voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. *Pest Sci.*55:1012–20.
- Mariah L. Scott and Janet C. Mcallister. 2012. Comparison of biochemical and molecular tests for detecting insecticide resistance due to insensitive acetylcholinesterase in *Culex quinquefasciatus*. *J Am Mosq Control Assoc*; 28: 323–326.
- Matowo, J., Kulkarni, M.A., Mosha, F.W., Oxborough, R.M., Kitau, J.A., Tenu, F., Rowland, M. 2010. Biochemical basis of permethrin resistance in *Anopheles arabiensis* from Lower Moshi, north-eastern Tanzania. *Malar. J.* 9:193
- Mathenge, E.M., Gimnig, J.E., Kolczak, M., Ombok, M., Irungu, L.W. and Hawley, W.A., 2001. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behaviour, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Kenya. *J. Med. Entomol.* 38: 531-536.
- Michael J. Turell. 2012. Members of the *Culex pipiens* Complex as Vectors of Viruses. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 28 :123-126.
- Milatovic D, Gupta RC, Aschner M. 2006. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. *Sci World J.* 6: 295-310.
- Milani R. 1954. Comportamento mendeliano della resistenza alla azione abbatante del DDT: correlazione tran abbattimento e mortalia in *Musca domestica* L. *Rivista Parasitologia* 15: 513–542.
- Mourya, D.T., Hemingway, J. and Leake, C.J., 1993. Changes in enzyme titres with age in four geographical strains of *Aedes aegypti* and their association with insecticide resistance. *Med. Vet. Ent.* 7: 11-16.
- Molly C. Reid and F. E. McKenzie. 2016. The contribution of agricultural insecticide use to increasing insecticide resistance in African malaria vectors. *Malar. J.* 15:107.
- Mota-Sanchez, D., P. S. Bills, and M. E. Whalon. 2002. Arthropod resistance to pesticides: Status and overview. *Pesticides in Agriculture and the Environment*: 241-272. Mullen G.R. and Durden L.A. (Eds) 2009. *Medical and Veterinary Entomology*. 2nd Edition. 637pp. Elsevier Academic Press.

- McAbee RD, Kang KD, Stanich MA, *et al.* 2004. Pyrethroid tolerance in *Culex pipiens pipiens* var *molestus* from Marin County, California. *Pest Management Science* 60:59–368.
- Mbogo, C.N.M., Baya, N.M., Ofulla, A.V.O., Githure, J.I. and Snow, R.W., 1996. The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. *Med. Vet. Entomol.* 10, 251-259.
- Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, Hidoh O, *et al.* 2004. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313:794–801
- Narahashi T. 1996. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Parmacol Toxicol:* 78:1–14
- Narahashi T. 1992. Nerve membrane Na<sup>+</sup> channels as targets of insecticides. *Trends in Pharmacological Science* 13, 236–241.
- Narahashi T. 1988. Molecular and cellular approaches to neurotoxicology: past, present and future. In *Neurotox '88: Molecular Basis of Drug and Pesticide Action*, ed. GG Lunt. 563–82. New York: Elsevier.
- Niang el HA., L. Konaté, M. Diallo, O. Faye, I. Dia. 2016. Patterns of insecticide resistance and knock down resistance (*kdr*) in malaria vectors *An. arabiensis*, *An. coluzzii* and *An. gambiae* from sympatric areas in Senegal. *Parasit. Vectors.* 5:9:71.
- Nikou, D., Ranson, H., Hemingway, J., 2003. An adult-specific CYP6 P450 gene is over expressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene* 318: 91-102.
- Noda T, *et al.* (2000) Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. *J Cell Biol* 148 :465-80
- Ndiath, M.O., Sougoufara, S., Gaye, A., Mazenot, C., Konate, L., Faye, O., Sokhna, Ch. and Trape, J.F. (2012) Resistance to DDT and pyrethroids and increased *kdr* mutation frequency in *An. gambiae* after the implementation of permethrin-treated nets in Senegal. *PLoS ONE*, 7, e31943
- Nkya T., R. F. Poupardin, I. Laporte, F. Akhouayri, F. Mosha, S. Magesa, *et al.* 2013. Impact of agriculture on the selection of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a multigenerational study in controlled conditions. *Parasit. Vectors.* 7:480.

- Oliveira EE, Du Y, Nomura Y, Dong K. 2013. A residue in the transmembrane segment 6 of domain I in insect and mammalian sodium channels regulate differential sensitivities to pyrethroid insecticides. *Neurotoxicology* 38:42-50
- O'Reilly AO, Khambay BP, Williamson MS, Field LM, Wallace BA & Davies TGE. 2006. Modelling insecticide binding sites in the voltage gated sodium channel. *Biochemistry Journal* 396: 255–263.
- Osta MA, Rizk ZJ, Labbe' P, Weill M, Knio K. 2012. Insecticide resistance to organophosphates in *Culex pipiens* complex from Lebanon. *Parasites & vectors* 5: 1–6
- Overgaard, H. J. 2006. Malaria mosquito resistance to agricultural insecticides: Risk area mapping in Thailand. Colombo, Sri Lanka: International Water Management Institute.103: 68.
- Pasteur N, Raymond M. 1996. Insecticide resistance genes in mosquitoes: their mutations, migration, and selection in field populations. *J. Hered.* 87:444–49.
- Park Y & Taylor MFJ. 1997. A novel mutation L1029H in sodium channel gene *hscp* associated with pyrethroid resistance for *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 9–13.
- Poupardin, R., Riaz, M.A., Jones, C.M., Chandor-Proust, A., Reynaud, S., David, J.P.2012. Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics. *Aquat. Toxicol.* 114: 115, 49-57.
- Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J., David, J.P. 2008. Crossinduction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38:540-551.
- Ponce G., I. P. Sanchez, S. M. García, J. M. Torrado, S. Lozano-Fuentes, B. Lopez-Monroy and Adriana E. Flores. 2016. First report of L1014F *kdr* mutation in *Culex quinquefasciatus* in Mexico. *Insect Sci.*23:829-834.
- Puinean AM, Foster SP, Oliphant L, Denholm I, Field LM, Millar NS et al. 2010. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *PLOS Genet* 6:e1000999.
- Pridgeon JW, Appel AG, Moar WJ & Liu N. 2002. Variability of resistance mechanisms in three strains of pyrethroid resistant German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 73:149–156.

- Qiang Xu., L. Tian, L. Zhang, and N. Liu. 2011. Sodium channel genes and their differential genotypes at the L-to-F *kdr* locus in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem. Biophys Res Commun.*4: 645–649.
- Quintero J, Brochero H, Manrique-Saide P, Barrera-Pérez M, Basso C, Romero S. 2014. Ecological, biological and social dimensions of dengue vector breeding in five urban settings of Latin America: a multi-country study. *BMC Infect Dis.* 38:1-13.
- Rajesh K., D. Dhanasekaran, B. K. Tyagi. 2013. Survey of container breeding mosquito larvae (Dengue vector) in Tiruchirappalli district, Tamil Nadu, India. *Journal of Entomology and Zoology Studies.* 6: 88-9.
- Ranson H, Hemingway J. 2005. Mosquito glutathione transferases. *Method Enzymol.* 401:226–41.
- Ranson, H., Paton, M.G., Jensen, B., McCarroll, L., Hemingway, J., Collins, F.H., 2004. Genetic mapping of genes conferring permethrin resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 13: 379-386.
- Ranson H, Rossiter L, Orтели F, Jensen B, Wang X, et al. 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* 359:295–304.
- Ranson, H; Jensen, B. Wang, X.; Prapanthadara, L.; Hemingway, J.; Collins, F.H. 2000b. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology.* 9: 499-507.
- Raymond M, Chevillon C, Guillemaud T, Lenormand T, Pasteur N. 1998. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 353:1707–11.
- Ren D, Navarro B, Xu H, Yue L, Shi Q, Clapham DE.2001. A prokaryotic voltage-gated sodium channel. *Science.* 294.
- Remington SE. 2010. Cellular response to DNA damage after exposure to organophosphates in vitro. BSc (Hons) Medical Biochemistry (Birmingham University). MSc Toxicology (Birmingham University).
- Ribeiro, P. B.; Costa, P. R.; Loeck, A. E.; Vianna, E. E. S.; Silveira, JR. P. 2004. Exigencias térmicas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) en Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Serie Zoologia, Porto Alegre.* 2: 177-180.
- Riveron JM, Irving H, Ndula M, Barnes KG, Ibrahim SS, et al. 2013. Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:252–57.

- Rivero A, Vezilier J, Weill M, Read AF, Gandon S. 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? *PLoS pathogens*. 6: e1001000.
- Rinkevich F.D, Du Y, Dong K. 2013. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pestic. Biochem. Physiol.* 106: 93-100.
- Riaz, M.A., Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., David, J.P. 2009. Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. *Aquat. Toxicol.* 93: 61-69.
- Rodriguez MM., J.A. Bisset, Y. De Armas, F. Ramos. 2005. Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.* 4:437– 445.
- Rodríguez MM, Bisset J, de Fernandez DM, Lauza' n L, Soca A. 2001. Detection of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba and Venezuela. *J Med Entomol.* 38:623–8.
- Ross, M.H., 1992. Difference in the response of German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*) field strains to vapors of pyrethroid formulations. *J. Econ. Entomol.* 85: 123-129.
- Rueda, L.M. 2008. Global diversity of mosquitoes (Insecta:Diptera:Culicidae) in freshwater. *Hydrobiology.* 595:477-487.
- Russell TL, Beebe NW, Cooper RD, Lobo NF, Burkot TR. 2013. Successful malaria elimination strategies require interventions that target changing vector behaviours. *Malar J.* 12: 56–61.
- Saavedra-Rodriguez K, Beaty M, Lozano-Fuentes S, Denham S, Garcia-Rejon J, Reyes-Solis G, *et al.* 2015. Local evolution of pyrethroid resistance offsets gene flow among *Aedes aegypti* collections in Yucatan State, Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 92:201-209
- Saavedra-Rodriguez, K., L. Urdaneta-Marquez, S. Rajatileka, M. Moulton, A. E. Flores, I. Fernandez-Salas, J. Bisset, M. Rodriguez, P. J. McCall, M. J. Donnelly, H. Ranson, J. Hemingway, and W. C. t. Black. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect molecular biology* 16: 785-798
- Sarkar M., A. Borkotoki, I. Baruah, I.K. Bhattacharyya, R.B. Srivastava. 2009. Molecular analysis of knock down resistance (*kdr*) mutation and distribution of *kdr* genotypes in

- a wild population of *Culex quinquefasciatus* from India. *Trop. Med. Int. Health.* 9: 1097-1104.
- Sebastien Marcombea, Ary Farajollahi, Sean P. Healy, Gary G. Clark, Dina M. Fonseca. 2014. Insecticide Resistance Status of United States Populations of *Aedes albopictus* and Mechanisms Involved. *PLoS ONE* 9:7.
- Singh OP., C.L. Dykes, G. Sharma, M.K. Das. 2015. L1014F-kdr Mutation in Indian *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae) Arising from Two Alternative Transversions in the Voltage-Gated Sodium Channel and a Single PIRA-PCR for Their Detection. *J. Med. Entomol.* 52:24-7.
- Soderlund DM. 2005. Sodium channels. In *comprehensive Molecular Insect Science*, ed. LI Gilbert, Iatrou, SS Gil, 5:1-24. Amsterdam, Neth.: Elsevier BV.
- Soderlund DM & Knipple DC. 2003. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* .33, 563–577.
- Soderlund DM & Bloomquist JR. 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Entomology* 34, 77–96.
- Suman DS, Tikar SN, Parashar BD, Prakash S. 2010. Development of insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* mosquito from different locations in India. *Journal of Pesticide Science* 35: 27–32.
- Scott, J.G., Yoshimizu M. H., M. and S. Kasai. 2014. Pyrethroid resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *Pest. Biochem. Physiol.*120:68-76.
- Scott JG. 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29:757–77.
- Scott JG. 1990. Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies and pitfalls. In: Roush RT, Tabashnik BE (eds), *Pesticide resistance in arthropods*, Chapman and Hall, New York & London. 39-57.
- Schuler MA. 2011. P450s in plant-insect interactions. *Biochem. Biophys. Acta* 1814:36–45.
- Schuler MA. 1996. The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant Physiol.* 112:1411–19.
- Schick RX. 1970. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XX. The Terrens group of *Aedes* (Finlaya). *Contributions of the American Entomological Institute* 5: 1–96.

- Shabad Preet and Shivani Gupta. 2017. Genetic diversity studies on *Culex quinquefasciatus* from diverse larval habitats using RAPD-PCR marker. *International Journal of Mosquito Research*. 4(2): 93-98.
- Shafer TJ, Meyer DA, Crofton KM .2005. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ Health Perspect*. 113: 123-136.
- Shen, B., Dong, H.-Q., Tian, H.-S., Ma, L., Li, X.-L., Wu, G.-L., Zhu, C.-L., 2003. Cytochrome p450 genes expressed in the deltamethrin-susceptible and –resistant strains of *Culex pipiens pallens*. *Pestic. Biochem. Physiol*. 75:19-26.
- Sparks, T. C. 2013. Insecticide discovery: an evaluation and analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107: 8-17.
- Stegeman JJ, Hahn ME. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In *Aquatic toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives* Edited by: Malins DC, Ostrander GK. Boca Raton: Lewis Publisher, CRC Press: 87-206.
- Strycharz JP, Lao A, Li H, Qiu X, Lee SH, Sun W, et al. 2013. Resistance in the highly DDT-resistant 91-R strain of *Drosophila melanogaster* involves decreased penetration, increased metabolism, and direct excretion. *Pestic. Biochem. Physiol*. 107: 207-217.
- Tantely ML, Tortosa P, Alout H, Berticat C, Berthomieu A, et al. 2010. Insecticide resistance in *Cx. quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Re´union Island. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40: 317– 324.
- Toe´ KH, Jones CM, N’Fale S et al. 2014. Increased pyrethroid resistance in malaria vectors and decreased bed net effectiveness, Burkina Faso. *Emerg Infect Dis*. 20:1691–6
- Tovar-Zamora I, A Ramos-Rodríguez, JFM Galván, R Servín-Villegas. 2015. Entomological Indicators to Assess Larval *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) Control in Baja California Sur, México. *Southwestern Entomologist*. 40: 81-96.
- Theeraphap Chareonviriyaphap, Michael J Bangs, Wannapa Suwonkerd, Monthathip Kongmee, Vincent Corbel and Ratchadawan Ngoen-Klan. 2013. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. *Parasites & Vectors*.6:280.

- Theresia E. Nkya, Idir Akhouayri, Wiliam Kisinza, Jean-Philippe David. 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43: 407-416.
- Trimble R.M. 1979. Laboratory observations on oviposition by the predaceous tree hole mosquito, *Toxorhynchites rutilus septentrionalis*. *Canadian J. Zool.* 57:1104-1108.
- Vanek MJ, Shoo B, Mtasiwa D, Kiama M, Lindsay SW, Fillinger U, Kannady K, Tanner M, FKG. 2006. Community based surveillance of malaria vector larval habitats a baseline study in urban Dares Salaam, Tanzania. *Biomedical Central Public Health.* 6:15.
- Vaughan A, Hemingway J. 1995. Mosquito carboxylesterase Est $\alpha$ 21 (A2): Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J. Biol. Chem.* 270:17044–49.
- Vazquez-Prokopec GM., A. Medina-Barreiro, A. Che-Mendoza, F. Dzul-Manzanilla, F. Correa-Morales, G. Guillermo-May. et al. 2017. Deltamethrin resistance in *Aedes aegypti* results in treatment failure in Merida, Mexico. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11:6.
- Veronica I. Itina, M. Aline E. Noutcha and Samuel N. Okiwelu. 2014. Breeding sites of culicidae in Akwa Ibom state, Nigeria. *European Journal of Experimental Biology.* 4:768-773.
- Viana-Medeiros P.F., D.F. Bellinato, A.J. Martins and D. Valle. 2017. Insecticide resistance, associated mechanisms and fitness aspects in two Brazilian *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*) populations. *Medical and Veterinary Entomology.* 31:340–350.
- Vontas J, Blass C, Koutsos JAC, David P, Kafatos FC, et al. 2005. Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. *Insect Mol. Biol.* 14: 509-21.
- Vulule, J. M., R. F. Beach, F. K. Atieli, J. C. McAllister, W. G. Brogdon, J. M. Roberts, R. W. Mwangi, and W. A. Hawley. 1999. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. *Medical and Veterinary Entomology* 13: 239-244.
- Wakeling EN, Neal AP, Atchison WD (2012) Pyrethroids and Their Effects on Ion Channels. *Pesticides- Advances in Chemical and Botanical Pesticides.*
- Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, et al. 2003. Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423:136–37

- Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, et al. 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the *ace* gene in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 269:2007–16
- Winch PJ, G Barrientos-Sánchez, E Puigserver-Castro, L Manzano-Cabrera, LS Lloyd, JF Méndez-Galván. 1992. Variation in *Aedes aegypti* larval indices over a one year period in a neighborhood of Merida, Yucatan, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association.* 8: 193-195
- Wood OR, Hanrahan S, Coetzee M, Koekemoer LL, Brooke BD. 2010. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasit. Vectors* 3: 67.
- Wondji CS, Dabire RK, Tukur Z, Irving H, Djouaka R, et al. 2011. Identification and distribution of a GABA receptor mutation conferring dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41:484–9
- Wondji CS, Irving H, Morgan J, Lobo NF, Collins FH, et al. 2009. Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome Res.* 19:452–59.
- Wondji CS, De Silva WAPP, Hemingway J, Hilary R & Karunaratne SHPP. 2008. Characterization of knockdown resistance in DDT and pyrethroid resistant *Culex quinquefasciatus* population from Sri Lanka. *Tropical Medicine and International Health* 13, 548–555.
- World Health Organ. (WHO). 2013. Malaria: Core vector control methods. WHO, Geneva. [http://www.who.int/malaria/areas/vector\\_control/core\\_methods/en/](http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/core_methods/en/).
- World Health Organ (WHO). 2013. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. WHO, Geneva. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80139/1/9789241505154\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80139/1/9789241505154_eng.pdf).
- World Health Organ. (WHO). 2009. *WHO recommended long-lasting insecticidal mosquito nets*. WHO, Geneva.
- World Health Organ. (WHO). 2007. Long-lasting insecticidal nets for malaria prevention—a manual for malaria programme managers. Trial Ed., WHO, Geneva. [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/insecticidal\\_nets\\_malaria/en/](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/insecticidal_nets_malaria/en/)
- World Health Organization, 2000. WHO Expert Committee on Malaria 20th Report. WHO Tech. Rep. Ser. 892, 71.
- Whalon, M. E., D. Mota-Sanchez, and R. M. Hollingworth. 2008. Analysis of Global Pesticide Resistance in Arthropods. *Global Pesticide Resistance in Arthropods*: 5-31.

- White, GB. WHO.1989. Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors. Geneva. Lymphatic filariasis. 23-25.
- Xu, Q., H. Wang, L. Zhang, and N. Liu. 2006a. Kdr allelic variation in pyrethroid resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* (S.). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345: 774-780.
- Xu Q, Liu H, Zhang L & Liu N. 2005. Resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, and possible mechanisms for resistance. *Pest Management Science* 61: 1096–1102.
- Yadouléton Agnes, Kefilath Badirou, Ramziath Agbanrin, Hanna Jöst, Roseline Attolou, Ramasamy Srinivasan, Gil Padonou and Martin Akogbéto. 2015. Insecticide resistance status in *Culex quinquefasciatus* in Benin. *Yadouléton et al. Parasites & Vectors*, 8:17.
- Yadouleton, A., Martin, T., Padonou, G., Chandre, F., Asidi, A., Djogbenou, L., Dabire, R., Aikpon, R., Boko, M., Glitho, I., Akogbeto, M. 2011. Cotton pest management practices and the selection of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* population in northern Benin. *Parasit. Vectors* 4:60.
- Yadouleton, A.W., Asidi, A., Djouaka, R.F., Braima, J., Agossou, C.D., Akogbeto, M.C. 2009. Development of vegetable farming: a cause of the emergence of insecticide resistance in populations of *Anopheles gambiae* in urban areas of Benin. *Malar. J.* 8:103.
- Yu, F.H., Catterall, W.A., 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology* 4, 207.
- Zaim M, Guillet P. 2002. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitol.* 18: 161-63.
- Zalucki M.P., M.J. Furlong. 2017. Behavior as a mechanism of insecticide resistance: evaluation of the evidence. *Current Opinion in Insect Science.* 21:19-25.
- Zhou L, Lawrence GG, Vineis JH, McAllister JC, Wirtz RA & Brogdon WG. 2009. Detection of broadly distributed sodium channel alleles characteristic of insect pyrethroid resistance in west nile virus vector *Culex pipiens* complex mosquitoes in the United States. *Journal of Medical Entomology* 46: 321–327.

## XII. APÉNDICE

Apéndice A. Zonas urbanas y rurales seleccionados para el estudio.

Sitios	Coordenadas GPS	
Col. Juan Pablo II	21° 57'59''N	89° 40' 47''O
Col. Vergel III	20°57'93''N	89° 34'58'' O
Col. Centro	20° 57'48''N	89° 38'22''O
Kanasín	20° 56'00'' N	89° 34'00'' O
Umán	20° 53'00'' N	89° 45'00'' O
Mun. motul	21° 05'42'' N	89° 16'59'' O
Caucel	21° 00'53'' N	89° 42'25'' O
Mun. Chocholá	20° 45'03'' N	89° 49'47'' O
Mun. Hunucmá	21° 10'00'' N	90° 02'00'' O
Mun. Xkalakdzonot	26° 26' 21''N	88° 34'10'' O

Apéndice B. Insecticidas y herbicidas utilizados en zonas urbanas y rurales

Zona	Productos usados para el control de vectores	Otros químicos usados en el área
<b>Urbana</b>	<p><b>Baygon</b> (piretroides: ciflutrina, transflutrina, praletrina, Carbamato propoxur y organofosforado clorpirifos).</p> <p><b>Alfadex</b> (Cipermetrina) se usa para bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, aves y perros indicado para el control de ectoparásitos</p> <p><b>Raid casa y jardín</b> (praletrina y fenotrina)</p> <p><b>H24</b> ( tetrametrina, cifenotrina, disolvente emulsificante, perfume antioxidante, antiespumante propelente y butóxido de peperonilo, N-octil bicicloheptano</p> <p><b>Insecticide of biological origin</b></p>	<p><b>Gramoxone</b> (dicloruro de paraquat) herbicida de contacto no selectivo, familia bipyridylum.</p> <p><b>Cerillo.</b> ( paraquat dicloruro+ diuron) herbicida no selectivo.</p> <p><b>Dragon</b> (picloram, sal trisopropandamida)</p> <p><b>Secador</b> ( Dicloruro de paraquat, poderoso herbicida de contacto no selectivo).</p> <p><b>Velfosato</b> (glifosato: sal isopropilamina de N-(fosfonometil)-glicina con contenido de N- fosfonometil).</p>
<b>Rural</b>	<p><b>Baygon</b> (piretroides: ciflutrina, transflutrina, praletrina, Carbamato propoxur y organofosforado clorpirifos).</p> <p><b>Raid casa y jardín</b> (praletrina y fenotrina)</p> <p><b>H24</b> ( tetrametrina, cifenotrina, disolvente emulsificante, perfume antioxidante, antiespumante propelente y butóxido de peperonilo, N-octil bicicloheptano</p> <p><b>Rayoback</b> (piretroide permetrina, insecticida de contacto)</p> <p><b>Aquarreslin</b> (permetrina, esbiol y esbioaletrina</p> <p><b>OKo insecticida</b></p>	<p><b>Plancha</b></p> <p><b>Antorcha</b> (Dicloruro de paraquat, actua por contacto,no es selectivo y controla maleza de hoja ancha y su uso es restringido.</p> <p><b>Secador</b> (Dicloruro de paraquat, poderoso herbicida de contacto no selectivo).</p> <p><b>Gramoxon</b> dicloruro de paraquat) herbicida de contacto no selectivo, familia bipyridylum</p> <p><b>Cerillo</b> ( paraquat dicloruro+ diuron) herbicida no selectivo.</p> <p><b>Diablito</b> (Herbicida de solución acuosa, moderadamente toxico, herbicida hormonal de post-emergencia 2,4-D sal dimetilamina</p> <p><b>Velfosato</b> (glifosato: sal isopropilamina de N-(fosfonometil)-glicina con contenido de N- fosfonometil).</p>