OBJETIVOS

3.1. General

Determinar susceptibilidad y mecanismos bioquímicos de resistencia a insecticidas en poblaciones de mosquitos *Aedes aegypti* (L.) de los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Coahuila, Sonora y Tamaulipas.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Establecer dosis diagnóstico para los insecticidas DDT, malatión, temefos, propoxur, bifentrina, cipermetrina, deltametrina, lamdacihalotrina en poblaciones del mosquito *Ae. aegypti.*

3.2.2. Determinar mecanismos bioquímicos de resistencia: esterasas (alfa y beta), oxidasas (MFO), glutatión s-transferasa (GST), acetilcolinesterasa (AChE), acetilcolinesterasa insensible (iAChE).

ANTECEDENTES

4.1. *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

Entre los artrópodos vectores de enfermedades, *Ae. aegypti* es uno de los más adaptados al ser humano y sus viviendas. Es un mosquito africano cuyo origen se ubica biogeográficamente en la Región Etiópica (África), donde se agrupa la mayor cantidad de especies del Subgénero Stegomyia (Tabachnick, 1991).

Se piensa que fue probablemente introducido del Viejo Mundo a bordo de barcos que cruzaban el Atlántico como parte del mercado de esclavos, diseminándose debido al intercambio entre naciones (Knudsen, 1983).

Ancestralmente, desde esas áreas, inició una dispersión efectuada por el hombre que lo ha llevado a constituirse en un mosquito cosmopolita. Su presencia es o fue detectada en la mayor parte de las áreas tropicales o subtropicales del planeta, comprendidas entre los 45° de latitud norte y los 35 de latitud sur, en las zonas isotermales intermedias a los 20°C (figura 1), altamente susceptible a temperaturas extremas y climas cálidos secos.

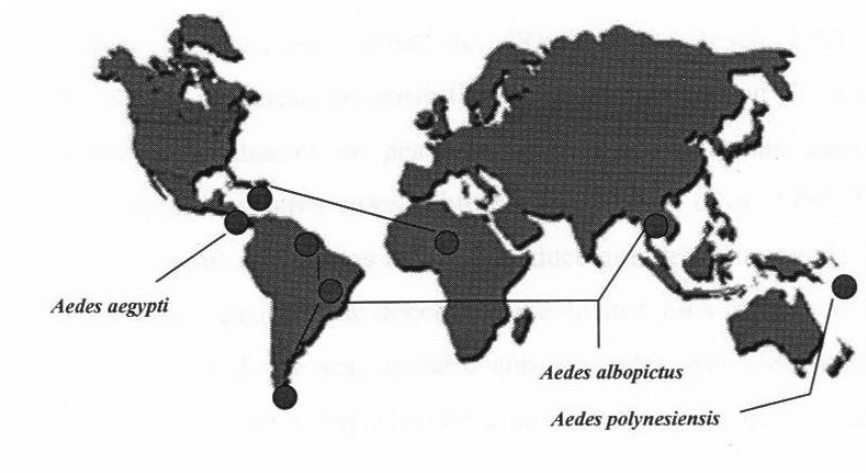


Figura 1. Distribución mundial de vectores del dengue.

Es un efectivo vector de diversas arbovirosis, pero su mayor importancia epidemiológica está ligada a su papel como transmisor de fiebre amarilla, chikungunya y, con mayor actualidad, de dengue (Womack, 1993).

Hasta la actualidad y desde 1980, se asiste a una constante dispersión y reinfestación de diversas áreas de las Américas con *Ae. aegypti*. Este hecho ha motivado más frecuentes e importantes epidemias de dengue en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú, Venezuela, México, toda Centroamérica, Antillas y Estados Unidos, entre otros países debido principalmente a que diversas situaciones ambientales y socio-demográficas van en aumento como la deforestación, cambio climático, migración campo-ciudad y proyectos de desarrollo interregional, facilitando su reinicio en un futuro mediato (Githeko *et al.* 2000).

Es un mosquito básicamente doméstico cuya densidad depende de la disponibilidad de criaderos dentro del hogar o en el peridomicilio. Los principales criaderos difieren de una zona a otra (Kudsen, 1983). Aunque pueden utilizar hábitats naturales como son las bromelias, huecos de árboles y axilas de hojas (Rodhain and Rosen, 1997). Los más comúnmente citados como hábitats larvales para este mosquito contenedores de agua (cisternas, barriles, cubetas, jarras ente otras) floreros (vasos, potes, etc.) que son usualmente productivos independientemente de los patrones de lluvia; aquellos objetos descartados o bien contenedores no manejables (latas de aluminio, botes, llantas, chatarra de carros, cubetas abandonadas, potes, cazuelas, ollas, contenedores de plástico, muebles, juguetes, auto partes, etc.) (Rodhain and Rosen, 1997; Focks, 2003). Incrementándose, sin embargo, las posibilidades de encontrarlo en sitios atípicos o bien no tradicionales como charcos en pisos de cemento, alcantarillas, desagües, cloacas, pozos, tanques sépticos, y otros sitios subterráneos (Russell *et al.* 1997; Morrison *et al.* 2004). En muchos casos estos sitios atípicos produce grandes números de adultos de este mosquito lo que hace ocasiona que deben hacerse ajustes a los medios de control debido a que no siempre es fácil que sean tratados con larvicidas. Son estos sitios los que nos indican que *Ae. aegypti* no siempre prefiere agua limpia para ovipositar (Focks *et al.* 1993).

Además de la mayor preferencia por los recipientes artificiales, existe diferencia en la afinidad por cierto tipo de contenedores, y no todos tienen la misma capacidad de

carga poblacional. Hay contendores que pueden servir para la crianza de un número pequeño de individuos en lapsos cortos, otros que soportan pocos individuos pero mantienen una productividad continua a lo largo del año; otros que soportan densidades poblacionales por lapsos cortos y otros más durante todo el año.

Es extremadamente difícil eliminar la totalidad de posibles criaderos alrededor y dentro de una vivienda y más aun de un poblado o una ciudad completa, de tal manera que lo más práctico sería eliminar a aquellos más productivos, aprovechando el tiempo y esfuerzo del personal disponible que frecuentemente es insuficiente, sin embargo no hay regla para su catalogación que tenga una aplicación universal, además que la situación se complica ya que las condiciones ambientales, la flora y fauna asociadas no son las mismas en las distintas regiones del país (Ibáñez-Bernal and Gómez-Dantés, 1995).

4.1.1. Clasificación sistemática.

Este mosquito pertenece a la clase: **Insecta**, subclase: **Pterigota**, infraclase: **Neoptera**, orden: **Díptera**, suborden: **Nematocera**, infraorden: **Culicomorfa**, familia: **Culicidae**, subfamilia: **Culicinae**, tribu: **Culicini**, género: ***Aedes*** Meigen, 1818, especie: ***aegypti*** (Linnaeus, 1762) (ITIS, 2005; NCBI, 2006) (figura 2).

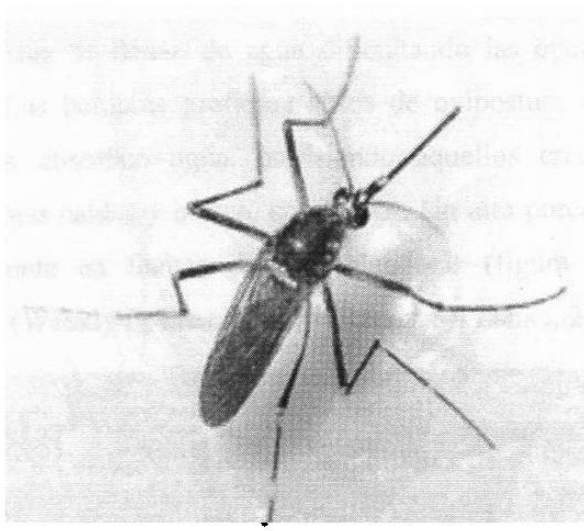


Figura 2. *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).

4.1.2. Ciclo de vida

Los mosquitos son homometábolos, es decir su ciclo de vida comprende cuatro etapas: **huevo, larva, pupa y adulto.**

4.1.2.1. Huevo

Los huevos son de aproximadamente 1 mm de largo y de color pálido, tornándose a un intenso color negro en corto tiempo. Son ovalados-oblongos, pero bajo el microscopio tienen la forma de un cigarro (figura 3a). Los huevos fertilizados son depositados en forma individual en las paredes de los contenedores que sirven como sitios de oviposición, los embriones se desarrollan de 2 a 5 días. Son capaces, los huevos, de aguantar períodos de desecación por semanas o meses, e incluso mucho más. Eventualmente cuando ocurren las inundaciones (una o varias veces) los huevos eclosionan y es la baja de oxigeno en el agua el estímulo para que esto suceda, éste comienza a reducirse debido a diversos factores como: la caída violenta de las gotas de lluvia y el movimiento que produce, o bien al paso de las horas, la presencia de microorganismos es también activada y éstos inician sus procesos de alimentación, respiración, etc. (Clements, 1992). La habilidad para soportar períodos prolongados de desecación les permite viajar en contenedores grandes distancias lo que provoca infestaciones cuando éstos se llenan de agua dificultando las operaciones de control (Focks *et al.* 1993a). Las hembras prefieren sitios de ovipostura de colores oscuros, rugosos y que puedan absorben agua, prefiriendo aquellos criaderos con materia orgánica, tierra seca, hojas caídas y hierba, entre otros. Un alto porcentaje de mosquitos es encontrado usualmente en llantas de vulcanizadoras (figura 3b) y floreros de cementerios (figura 3c) (Weekly Epidemiological Report Sri Lanka, 2002).

a. **b.** **c.**

Figura 3. a. Huevo de *Ae. aegypti;* b. llantas en vulcanizadora; c. floreros.

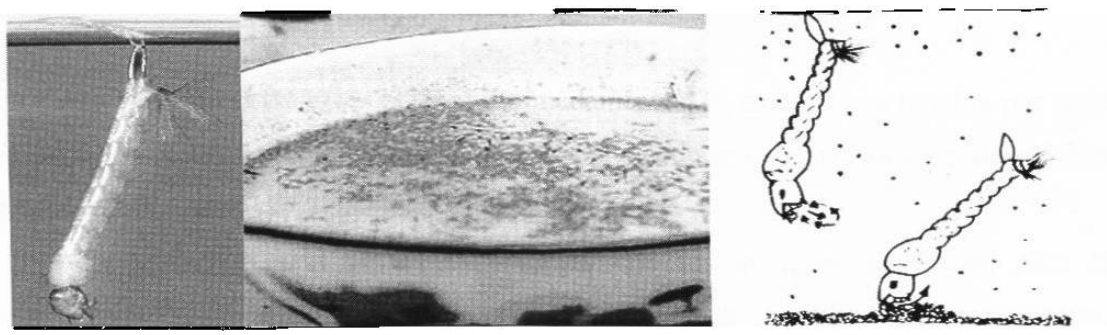
La cantidad de huevos que una hembra puede poner en una sola oviposición es afectado por diferentes factores como: tamaño de su cuerpo, magnitud del volumen de sangre ingerida, calidad proteica de la sangre que ingirió, edad, etc. En general se acepta un rango mínimo de 20 y un máximo de 120 huevos por ovipostura. El volumen de una comida de sangre promedio va de 1.5 a 6 microlitros. Una hembra mosquito viviendo en condiciones adversas de campo puede tener hasta 3 oviposiciones cada 3-5 días (Clements, 1992).

El desarrollo de larva a adulto depende en gran medida de la temperatura y de los recursos nutricionales existentes en el ambiente acuático larval (Focks *et al.* 1993b).

4.1.2.2. Larva

Las larvas de *Ae. aegypti* son fácilmente reconocibles ya que el sifón que poseen es el de menor tamaño de todos los culícidos (figura 4a). Éstas se mantienen de forma vertical con respecto a la superficie del agua, alimentándose con partículas de materia, protozoarios de vida libre y microalgas que se encuentran en el fondo de los contenedores así como en el intermedio de la columna de agua (figura 4c), usualmente los criaderos están localizados cerca de las casas, con agua relativamente limpia; éstos pueden ser cisternas y jarrones de cerámica (figura 4b) o cemento, inodoros que ya no son utilizados, así como contenedores de plástico, floreros, trampas para hormigas, es decir cualquier objeto que pueda contener 1 cm de agua, incluyendo tapas de refrescos desechables. Este período comprende 4 etapas evolutivas denominadas primero, segundo, tercero y cuarto; afectándoles los factores de temperatura, la habilidad de encontrar alimento y la densidad de individuos presentes en los receptáculos. El tiempo aproximado para pasar de una etapa a otra es de aproximadamente 48 horas. Las densidades poblacionales son reguladas primeramente por competencia intrínseca por el alimento (Southwood *et al.* 1972; McDonald, 1977; Focks *et al.* 1978; Gilpin and McClelland, 1979; Dye, 1984). La mortalidad larval puede ser alta bajo condiciones naturales, mientras que la mortalidad de las pupas, estadio en el cual no se alimenta, es típicamente baja. Cuando los recursos de alimento son limitados o las temperaturas son bajas, el desarrollo puede ser lento o detenerse hasta que las condiciones vuelvan a ser favorables de nuevo.

Dentro de un mismo criadero, las larvas varían en instar, numero, tamaño y en ocasiones hasta en origen maternal. La cantidad y calidad de los nutrientes es diferente entre cada criadero, esto afecta directamente en el tamaño de los individuos.



a. b. c.

Figura 4. a. Larva de *Ae. aegypti*; b. tazón de cerámica con larvas; c. larvas alimentándose a diferentes alturas de la columna de agua.

4.1.2.3. Pupa

La etapa pupal es la fase durante la cual tiene lugar la metamorfosis para convertirse finalmente en adulto, puede durar de 1 a 4 días dependiendo de la especie y la temperatura (figura 5a). La pupa flota cerca de la superficie tomando oxígeno a través de dos tubos denominados "trompetas" (figura 5b). Cuando el desarrollo se ha completado el adulto emerge lentamente y trabaja cuidadosamente su salida de exuvia pupal. Después de emerger flotará en la superficie del agua y se reclina mientras su cuerpo y alas endurecen. En esta etapa el individuo no se alimenta (Patrick, 1983).

La presencia de pupas tiene un significado importante en el estudio de los criaderos de este mosquito, ya que por un lado representa que los individuos fueron capaces de sobrevivir desde huevo hasta esta etapa, teniendo en cuenta que la mortalidad diaria estimada es de 5% aproximadamente; y que el criadero es de alta calidad nutricional y fisicoquímica (Fernández, 1999).

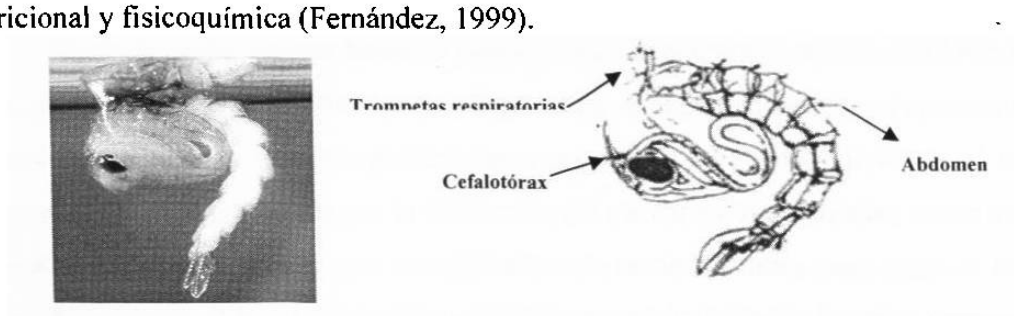


Figura 5. a. Pupa de *Ae. aegypti*; b. pupa de mosquito donde se señalan partes del cuerpo.

4.1.2.4. Adultos

Usualmente la emergencia del mosquito adulto de la cubierta pupal es durante el fotoperíodo, ya sea temprano en la mañana o crepuscular. El mosquito emerge en cuestión de minutos por el cefalotórax y se queda reposando parado sobre la película del agua (Clements, 1992).

La proporción de sexos es de aproximadamente 1:1, es decir una hembra por cada macho, pero puede haber variaciones de 0.6:0.4, siendo mayor la población de machos (Christophers, 1960).

La cercana asociación de *Ae. aegypti* con los humanos es central para la transmisión eficiente de cualquier arbovirosis. Altamente antropofílicas y antropofágicas; (>95%), las hembras (figura 6b) descansan y se aparean dentro de las casas donde frecuentemente se alimentan (múltiples veces durante un ciclo gonotrófico) preferentemente de humanos (Scott *et al.* 1993, 2000); los machos (figura 6c) se alimentan de néctares de plantas que se encuentran a su alrededor y frecuentemente están cercanos a las fuentes de alimentación de las hembras para realizar el apareamiento.

Los mosquitos de la especie *Ae. aegypti* son pequeños comparados con otros, usualmente miden de 3 a 4 milímetros. Son totalmente negros excepto por las manchas blancas en el cuerpo y las regiones de la cabeza, así como anillos blancos en las patas, las escamas de la región dorsal del tórax (mesonoto) dan la apariencia de una lira (figura 6a). Las hembras presentan antenas con pelos cortos y escasos, los palpos son de un tercio o menos de longitud que la proboscis; en cambio, en los machos las antenas son plumosas con pelos largos y abundantes y los palpos son del tamaño de la proboscis. Una vez que han emergido se alimentan por primera vez entre las 20 y 72 horas posteriores a este evento. La sobrevivencia de los mosquitos depende de su capacidad para alimentarse, reproducirse, protegerse y dispersarse. (CENAVE, 2006; Mortimer, 1995; Russell, 1996).

El macho debe esperar hasta 24 horas para que su aparato genital rote 180° y esté listo para poder ganchar a la hembra por la punta de su abdomen durante el apareamiento. Durante el cortejo, las hembras pueden hacer enjambres de pocos individuos, el macho reconoce este ruido producido por la frecuencia del movimiento de las alas, vuela hacia el enjambre y en el aire, gancha con sus genitales a la hembra, ambos caen luego al suelo y en cuestión de segundos, la insemina vaciando sus testículos para llenar la espermateca

(Christophers, 1960). La hembra queda fecundada de por vida y cada vez que oviposite los huevos saldrán fecundados antes de salir por el esperma del mismo padre. Después de inseminar a la hembra, el macho le coloca una sustancia conocida como matrona y producida por sus glándulas accesorias, la cual hará que la hembra no sea receptiva a otras cópulas posteriores (Beaty and Marquardt 1996).

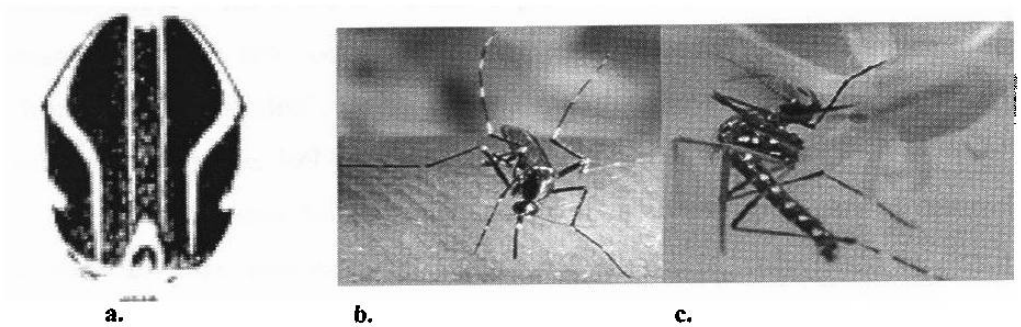


Figura 6. a. Escamas en forma de lira en el mesonoto de *Ae. aegypti*; b. hembra adulta de *Ae. aegypti*; c. macho adulto de *Ae. aegypti*

El intervalo entre la ingesta de sangre y la ovipostura es de tres días en condiciones óptimas de localización de huésped y temperatura, en el caso de las hembras de la especie *Ae. aegypti*, éstas se dispersan de manera muy limitada para buscar compañeros, alimento o sitios de oviposición, raramente más de 100 m (WHO, 1997; WHO, 1999; Edman *et al.* 1998: Harrington *et al.* 2001, 2005), sin embargo permanece toda su vida en su lugar de nacimiento siempre y cuando disponga de huéspedes, lugares de reposo y ovipostura.

La dispersión en busca de hospederos es desde el punto de vista epidemiológico muy importante ya que es por medio de este mecanismo que la hembra adquiere y disemina patógenos. El comportamiento de oviposición de las hembras están separadas en dos distintas categorías: preoviposición y oviposición. En la primera categoría es donde las hembras escogen el lugar donde depositaran los huevos, el cual escogerá por una combinación visual y de elementos químicos. Las hembras "testan" el agua, que deberá contener ciertos elementos derivados de la presencia de huevos y larvas y escogerán aquellos lugares donde sus huevos coexistan con otros. La presencia de larvas saludables está asociada con químicos que hacen atractivos estos lugares como sitios de

oviposición, sin embargo la presencia de larvas hambrientas o infectadas, son un claro indicio para la hembra que no son sitios ideales para la oviposición (Reeves, 2004). La viabilidad de los sitios de oviposición puede influir en el comportamiento de postura de los huevos y puede causar la retención de huevos (Corbet and Chadee, 1993; Chadee, 1997). Cuando los sitios de oviposición son raros, la retención de los huevos puede incrementarse y las hembras tienden a poner sus huevos en un solo lugar en contraste cuando los sitios son accesibles, las hembras exhiben un comportamiento denominado "brinco de oviposición", de tal manera que distribuye sus huevos en múltiples sitios (Corbet and Chadee, 1993; Chadee, 1997; Colton *et al.* 2003).

Las estaciones del año muy secas o frías no son aptas para el desarrollo de *Ae. aegypti*. En esas estaciones, el control natural ocurre, reduciendo la densidad de la población y bajo su influencia el ciclo de vida de los huevos (García-Silva *et al.* 2003). Sin embargo, este mosquito se encontrara en cualquier lugar que sus requerimientos ecológicos, sin importar las posibles barreras físicas (montañas, océanos, desiertos, etc.) o biológicas (comunidades vegetales y animales inalteradas que separen un asentamiento humano de otro).

La fecundidad de las hembras de esta especie puede depender del tamaño corporal, la temperatura ambiental, la viabilidad de la obtención de sangre y los sitios de oviposición (Focks *et al.* 1993).

Los sitios de descanso preferidos por los adultos de ésta especie son lugares oscuros y resguardados de las casas, especialmente roperos, baños y debajo de los muebles.

La vida promedio de las hembras esta estimado en 8 a 15 días y de 3 a 6 días los machos (Rodhain and Rosen, 1997).

4.2.2. Biorritmo de picadura

Este mosquito es primariamente un mosquito picador de día, usualmente tiene picos de actividad, uno a media mañana y otro en la tarde (Rodhain and Rosen, 1997), pero debido a los cambios de patrones en el comportamiento humano *Ae. aegypti* puede picar incluso de noche (Chadee and Martínez, 2000).

El rango de picadura determina la dinámica y epidemiología de los parásitos que están relacionados con vectores hematófagos para su transmisión. Muchos parásitos aparentemente incrementan el rango de picadura de sus vectores, generalmente impidiendo la habilidad de éste para obtener en una sola comida la sangre necesaria, por lo que se induce al vector a varias ingestaciones de sangre para llenarse a repleción aumentando con esto las probabilidades de ingestión y transmisión del patógeno (Macdonald, 1957).

4.2.3. Ciclo gonotrófico

Se denomina ciclo gonotrófico al período de tiempo que va desde que el mosquito se alimenta de sangre hasta que oviposita y se cierra en el punto que vuelva a tomar la siguiente alimentación sanguínea (WHO, 1975).

Los mosquitos hembra requieren de múltiples tomas de sangre en cada ciclo gonotrófico. Éstas prefieren sangre humana y muy raramente se alimenta solamente de azúcar; los cuerpos de estas hembras son de diferente medida y exhiben frecuencias variables de alimentación. Las hembras de menos tamaño con frecuencia necesitan de mayor número de ingestas de sangre. Este ajuste esta compensado por remanentes previtelogenicos en la etapa I-IIb de Christofer, por ahí ellos requieren subsecuentes alimentaciones de sangre para comenzar vitelogenicamente la etapa II y producir huevos maduros (Reyes-Villanueva, 2004).

4.2.4. Métodos para estimar la densidad de vectores y su importancia para el control

La dificultad práctica de estimar la densidad poblacional de los vectores del dengue con base en el estudio de los adultos, radica principalmente en su observación y recolección en campo y no necesariamente en los procedimientos de gabinete. Los métodos generales de estudio entomológico empleados son: vigilancia larvaria directa, larvitrampas, ovitrampas, captura de adultos mediante cebo humano, captura de adultos en sitios de reposo, bioensayos con insecticidas en larvas y adultos. La vigilancia larvaria directa es útil para conocer el estado de infestación, para monitorear los programas de control, para la vigilancia de áreas de riesgos de reinfestación, para verificar la posible erradicación, así como evaluar los métodos de control. Las larvitrampas y las ovitrampas

se emplean con fin de establecer el grado de infestación o densidad poblacional pero su efectividad es limitada ya que los huevos o larvas presentes en ellas pueden pertenecer a un número variable de hembras, ya que estas no necesariamente tienen la misma capacidad de producción de huevos; por otro lado su efectividad varia dependiendo del número y calidad de los cuerpos de agua existentes en el lugar que compiten con las trampas. El cebo humano llega a emplearse para verificar la posible erradicación y evaluar los métodos de control, mientras que la captura en sitios de reposo sólo es útil para evaluar las estrategias de control (Anónimo, 1992).

4.2. Enfermedades transmitidas por *Ae. aegypti*

4.2.1. Dengue y fiebre hemorrágica de dengue

El dengue y sus formas potencialmente fatales: el dengue hemorrágico y el síndrome de choque del dengue, es una infección viral transmitida por mosquitos que en años recientes ha resurgido como la más importante enfermedad transmitida por artrópodos convirtiéndose de esa manera en un grave problema de salud pública. Globalmente 2.5 billones de personas viven en las más de 100 naciones de África, América, el Mediterráneo, Sudeste asiático y el Pacífico (figura 7) con presencia amenazante de esta enfermedad debido a que ha tenido éxito tanto la dispersión geográfica del virus como la del vector (WHO, 2002).

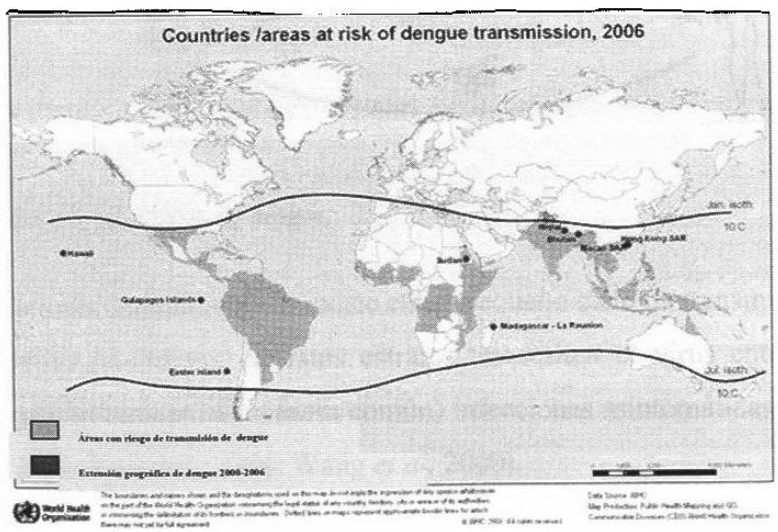


Figura 7. Distribución mundial del virus de dengue en 2006.

Es un arbovirus que se encuentra dentro de la familia Flaviviridae, misma que agrupa virus ARN de cadena simple en sentido positivo que se multiplican en células de vertebrados y de insectos vectores. Esta familia está representada por tres géneros: flavivirus (*flavus*, amarillo), pestivirus (*pestis*, peste, plaga) y virus hepatitis C (hepato, hígado; también conocidos como hepatacivirus) (Rice, 1996). El género Flavivirus reúne en su mayoría (55%) virus asociados a enfermedades humanas y algunos patógenos de animales domésticos o de interés económico. Además consta de más de 70 virus clasificados en 10 grupos (o especies), entre ellos: virus dengue, virus encefalitis japonesa, virus TBE (del inglés *Tick-Borne Encephalitis*), virus fiebre amarilla, virus Modoc, virus MBE (del inglés *Mosquito-Borne Encephalitis*), virus Ntaya, virus Río Bravo, virus Uganda S y virus Tyuleniy.

Esta enfermedad puede ser catalogada como metantroponótica, donde sólo quedan involucrados el hombre (como virtual huésped único) y el mosquito transmisor (figura 8).

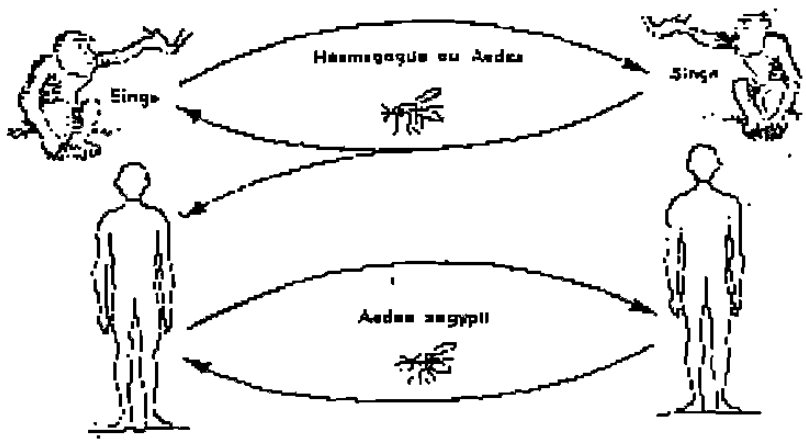


Figura 8. Ciclo de transmisión de dengue.

Esta enfermedad también existe en un pequeño ciclo de transmisión selvatica en la que mosquitos moradores de estos estratos transmiten el virus entre los primates no humanos, que presentan (de manera común) infecciones asintomáticas (Peiris *et al.* 1993; Rodhain, 1991; Rudnick, 1984; Wang *et al.* 2000).

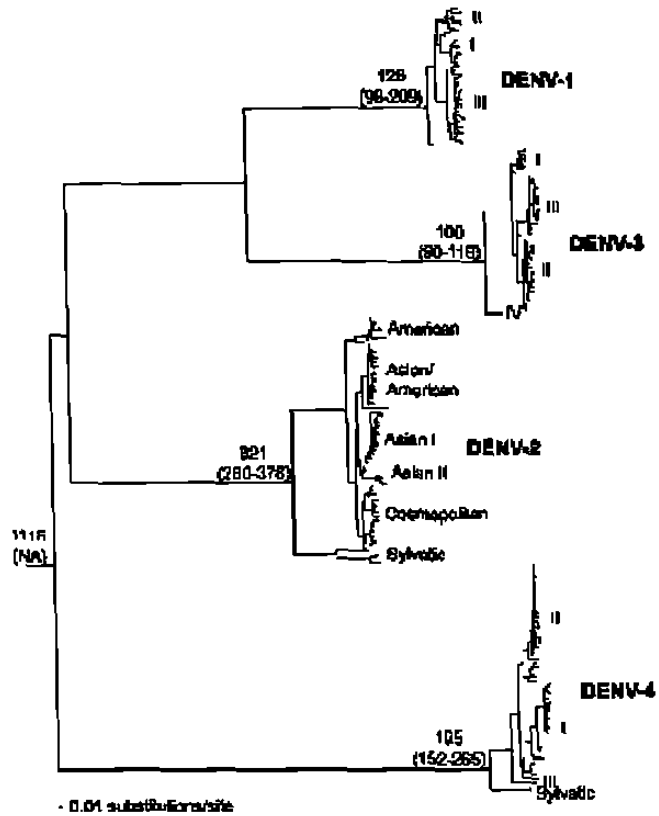


Figura 9. Historia filogenético del virus dengue. El subtipo se muestra cerca del grupo relevante y los estimados de edad de los más recientes antecesores comunes se muestran por las llaves (con intervalos en los paréntesis).

Tanto el dengue como sus formas fatales son causadas por uno de los cuatro, altamente relacionados, pero antigenicamente distintos, serotipos del virus denominados: DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4; además pueden presentar variantes genéticas (genéticas y topotipos) dentro de un mismo serotipo relacionadas con la virulencia y la procedencia geográfica de la cepa (*Monath and Heiz*, 1996; Rico-Hesse, 1990), que puede divergir en un ~30% a través de su poliproteína, por lo que se considera que hay dentro de los serotipos variaciones denominadas "subtipos" o "genotipos" (figura 9). Cada uno de los serotipos confiere inmunidad *homotípica permanente* y heterotípica por unas semanas (CENAVE 2005). Posee un genoma de aproximadamente 11 Kb que es traducido como una solo poliproteína y luego se divide en 10 componentes proteínicos.

4.2.1.1. Historia de la enfermedad del dengue

Las primeras epidemias de esta enfermedad reportadas fueron entre 1779 y 1780 en Asia, África y América del Norte, sin embargo en las Américas desde 1635 se sospechaba de brotes epidémicos en los archipiélagos de Martinica y Guadalupe. La simultaneidad con la cual ocurrieron los brotes en tres continentes indica que tanto el virus como el vector se han estado distribuyendo en los trópicos ampliamente por más de 200 años. En 1800 se reporta la primera epidemia americana en Perú con más de 50 000 casos; pero entre 1827 y 1828 ocurre la primera gran Pandemia en este continente que comienza en las Islas Vírgenes y se mueve al oeste a Cuba, Jamaica, Venezuela y ciudades portuarias de los Estados Unidos como lo son Nueva Orleáns y Pensacola, finalmente llega a México específicamente a Veracruz y desaparece en 1828. En el sudeste asiático después de la Segunda Guerra Mundial comienza otra pandemia que se esparce a todo el globo desde este punto, donde el tipo hemorrágico aparece por primera vez en los 50s, pero en 1975 comienzan a ser frecuentes los casos de hospitalización y la muerte entre niños en muchos países de esta región (CDC, 2005).

Las condiciones ambientales ejercen su influencia de diferente forma, al encontrar una relación inversa con la altitud y una relación directa con la temperatura media anual y la precipitación pluvial. Es una enfermedad propia de las zonas urbanas, aunque también llega a presentarse en las áreas rurales. Persiste en donde existe la carencia de agua potable, drenaje y recolección de basura, pero igualmente puede transmitirse en las zonas residenciales. El padecimiento posee cierta estacionalidad y la transmisión se incrementa después de la época de lluvias. El riesgo de transmisión de dengue está determinado por las características de la población, del agente y el medio; éste último es particularmente importante ya que es una enfermedad transmitida por vector. Entre las características del huésped resalta la susceptibilidad universal a la infección. Las mujeres parecen estar más expuestas a las picaduras de *Ae. aegypti* en el peridomicilio y suelen tener las mayores tasas de ataque. La infección aumenta con la edad y el grupo en edad productiva es el más afectado. La inmunidad en el individuo es permanente para cada serotipo y paradójicamente haber padecido infecciones previas aumenta considerablemente la probabilidad de desarrollar FDH. No existe hasta el momento vacuna o tratamiento

preventivo contra la enfermedad, así que el único camino para evitar epidemias es mantener bajas las poblaciones del vector (WHO, 1999).

4.2.1.2. Incidencia de dengue y fiebre hemorrágica de dengue a nivel mundial en los últimos años.

El rango de esta enfermedad se ha extendido rápidamente en los últimos años, hacia los países asiáticos incluyendo el subcontinente Indio, el Pacifico Sur, el Caribe, Sur y Central América, el noreste de Australia y África (figuras 10 y 11).

La epidemiología del dengue ha experimentado en los últimos 25 años fuertes brotes cíclicos luego de periodos de cierta moderación que se repiten de entre tres o cinco años cada uno. Los datos resultantes del ejercicio 2006, en combinación con las noticias sobre los actuales brotes y la presencia del fenómeno del Niño este año, son indicativos de que el 2007 será uno de esos años difíciles y complejos para responder a este desafío; y es esta misma tendencia los brotes cíclicos hace que sean cada vez más intensos, es por lo que es necesario que la respuesta sea eficaz, los esfuerzos y la coordinación de acciones vayan más allá del sector salud, ya que esta problemática rebasa en realidad las fronteras del sector salud y hace necesaria la participación activa de otros sectores y actores extra sectoriales y de la comunidad (OPS, 2007).

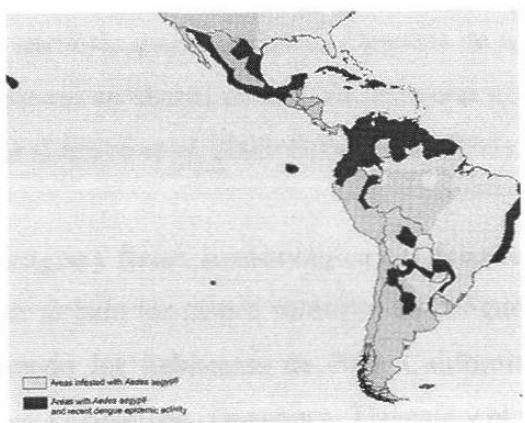


Figura 10. Distribución del virus de dengue en el Hemisferio Americano.

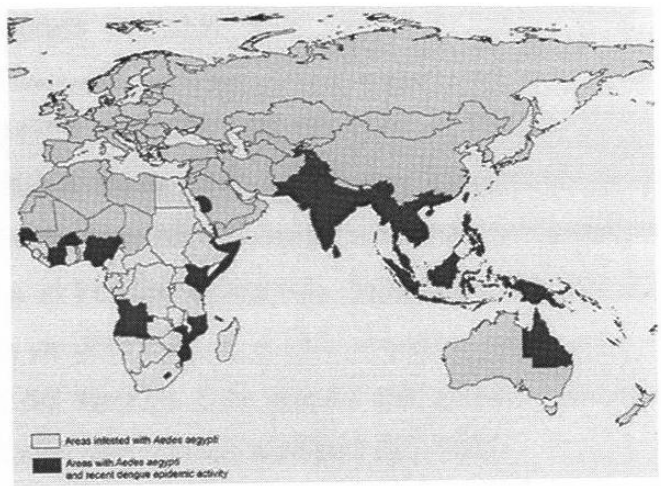


Figura 11. Distribución del virus dengue en África, Asia, Europa y Oceanía.

La epidemia de dengue en Paraguay que fue primero reportada a mediados de enero del 2007 todavía esta presente. Otras ciudades en el Sur y Centroamérica, como México y Nicaragua han reportado un incremento en los casos de dengue este año. En Perú, fuentes oficiales confirmaron la muerte de dos personas en los primeros meses del año así como reportaron 398 casos. Mientras que en Brasil datos preliminares muestran 53 146 casos registrados en contraste con 300 000 del año pasado. (msnbc, 2007a).

En la pasada década casos de dengue habían sido identificados en Texas cada 1 ó 5 años. Los casos más recientes en el 2005, incluyen un primer caso localizado de la dengue hemorrágico en territorio estadounidense. Después de una ausencia de 56 años, una limitada epidemia ocurrió en Hawai en el 2001, asociada con importantes casos que arribaron del Pacífico Sur (Lacayo *et al.* 2005; Effler *et al.* 2005).

4.2.1.3. Incidencia de dengue y fiebre hemorrágica del dengue en México

En México se han aislado los cuatro serotipos de dengue en varios estados de la Republica Mexicana, siendo los habitantes de Baja California, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Tlaxcala y el Distrito Federal, quienes tienen menor riesgo de contraer la enfermedad, en contraste con quienes habitan los estados de Sonora, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Veracruz, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo.

La Secretaria de Salud desde 1994 a la fecha realiza el seguimiento de los serotipos en el territorio mexicano, debido a que si bien el serotipo 1 no se había asociado a brotes desde 1994, en el año 2002 reaparece en Yucatán; en contraste el serotipo 2 se encontraba presente desde 1999 en Chiapas, apareciendo en el 2000 en Veracruz y Oaxaca, para nuevamente estar presente en Guerrero y Yucatán en el 2001, en el 2002 lo encontramos en el Pacífico Occidental, Tamaulipas, Hidalgo y Coahuila; el serotipo 3 casi desaparece en 1999, pero en el 2002 reaparece brotes asociados en diversos estados; la circulación del serotipo 4 se detecto por primera vez en Oaxaca en 1983 y su distribución es muy semejante al serotipo 1 (SS, 2002).

En relación al mortal dengue hemorrágico, este se ha incrementado dramáticamente en un 600 % desde el 2001 en nuestro país; los expertos predicen una oleada de casos debido en gran parte al cambio climático, la migración y la falla en los esfuerzos por erradicar el mosquito en el territorio (msnbc, 2007b).

4.2.1.4. Estatus de vacuna

Seis vacunas se encuentran en varios estados de desarrollo, pero la licencia para ser utiliza no es inminente para ninguna de ellas hasta el momento (Kroeger *et al.* 2004; Deen, 2004).

4.2.1.5. Mosquito tigre asiático *Aedes albopictus*

El vector secundario de dengue es el mosquito tigre asiático *Aedes albopictus*, el cual aparece en el Nuevo Mundo en 1985 (CDC, 1980). Fue implicado en la transmisión de virus de dengue en las Filipinas en 1926 (Siler *et al.* 1926) y luego en otras partes de Asia, donde se cría en contenedores artificiales y en huecos de árboles, en áreas urbanas, suburbanas, rurales y silvestres alejadas de asentamientos humanos (Monath, 1986). Transmisor horizontal y vertical (Gubler and Rosen, 1976; Rosen *et al.* 1983) y de una gran susceptibilidad como el vector tradicional *Ae. aegypti* para la infección oral con los 4 serotipos de dengue ya fueron demostrados experimentalmente en laboratorio (Rudnick and Chan, 1965). Sin embargo, el rol de este mosquito en la transmisión del dengue en las poblaciones americanas (la de Norteamérica y la de Brasil) no se ha relacionado en ningún brote de dengue o de alguna otra enfermedad. Estudios efectuados en EUA

indican que estas poblaciones utilizan primariamente contenedores artificiales, con preferencia a ocupar llantas usadas y floreros de cementerios. Un fenómeno interesante es el desplazamiento competitivo ejercido sobre otras especies en los contenedores ocupados por *Ae. aegypti*, lo que con el transcurso del tiempo podría implicar un cambio interesante en la epidemiología del dengue (O'Mera *et al.* 1993).

4.3.1. Fiebre amarilla

El virus de la fiebre amarilla es miembro del género *Flavivirus*, de la familia Flaviridae (Tomori 2004). Es un solo serotipo pero hay diferencias antigénicas entre las cepas americanas y africanas. Están presentes cuatro genotipos africanos (Oeste, Central este, Nuevo este, Angoleño) y un genotipo sudamericano circulando en diferentes regiones geográficas.

La etiología de la fiebre amarilla ha sido conocida desde 1901 y el conocimiento para controlar el vector fue acreditado con la construcción exitosa del canal de Panamá. La vacuna para esta enfermedad fue desarrollada en 1937, convirtiéndose en el primer arbovirus con contar con una vacuna eficaz. Sin embargo, la enfermedad se presenta en grandes regiones tropicales de África y Sudamérica. Se estima que hay 200 000 casos, incluyendo 30 000 muertes alrededor del mundo, de los cuales el 90% ocurre en África (figura 12). En América la mayoría de los casos son reportados en Perú, Bolivia y Brasil (Tomori, 2004).

El virus de la fiebre amarilla se mantiene en la naturaleza a través de un ciclo zoonótico entre primates no humanos y mosquitos de la floresta como *Haemagogus* spp. en las Américas y *Aedes* spp. en África. Los humanos están expuestos esporádicamente a ser infectados por los mosquitos cuando se entra al ciclo debido a sus ocupaciones o actividades recreacionales (Gubler, 2004; Tomori, 2004). El ciclo urbano es análogo al dengue, la transmisión ocurre en humano-mosquito-ciclo de transmisión humana. Se mantiene esta enfermedad a través de transmisión transovarial entre los mosquitos. En las Américas tanto los ciclos de la jungla como los urbanos son conocidos, sin embargo, epidemias no urbanas han sido reportadas desde 1948.

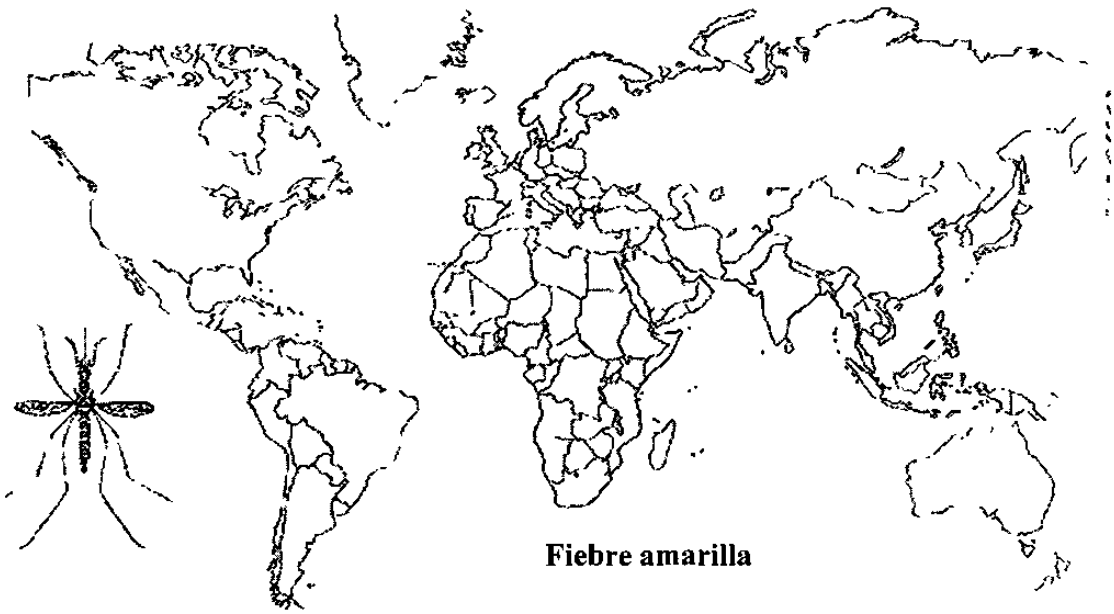


Figura 12. Distribución mundial del virus de la fiebre amarilla en 2005.

4.3.1.1. Estatus de vacuna

La vacuna actual es el virus vivo atenuado preparada en tejidos de embriones de pollo, la cual ha demostrado ser altamente eficaz.

4.3.2. Virus de Chinkungunya

El virus de Chinkungunya es un alfavirus que pertenece a la familia Togaviridae. Fue aislado por primera vez de la sangre de un paciente febril en Tanzania en 1953 y fue identificado repetidamente en el oeste, centro y sudeste de África, así como en sur y sureste de Asía. Tiene dos linajes: un linaje contiene todos aquellos aislados del oeste africano y el segundo contiene aquellas cepas del sureste y este de África, así como los que se presentan en Asia (Powers and Brault, en prensa).

El nombre del virus proviene del swahili, con una traducción de "aquello que se tuerce para arriba", se mantiene en un ciclo selvático que involucra a primates y mosquitos silvestres, similar a como se presenta la fiebre amarilla. En Asia, el virus se mantiene a través de picaduras de *Ae. aegypti* a los humanos.

Durante los primeros meses del año 2006 se presentaron epidemias en la India, las islas Mauricio y Seychelles, mientras que viajeros infectados viajan a ciudades europeas con la posibilidad de causar una epidemia (figura 13) (CDC, 2006).

4.3.2.1. Estatus de vacuna

Las pruebas desarrolladas por la armada de los Estados Unidos han sido completadas. El 98% de los vacunados desarrollaron cuerpos de neutralización y el 85% estuvieron protegidos hasta un año después de la inmunización (Edelman, 2000)

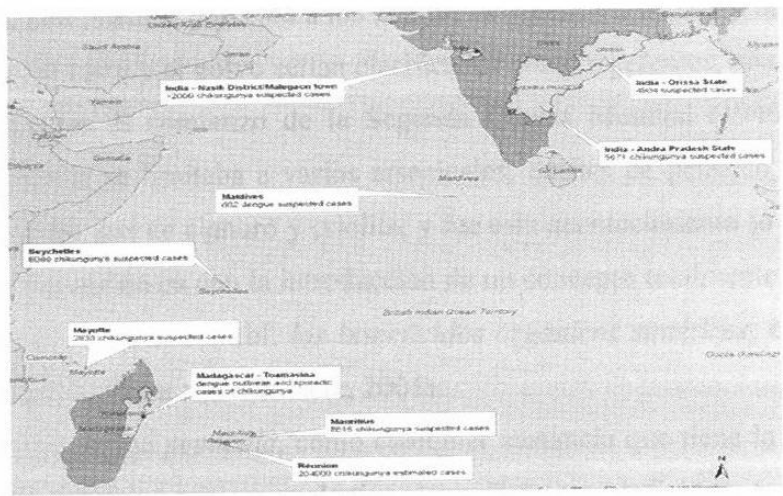


Figura 13. Distribución de casos del virus de Chikungunya en 2006.

4.4. Erradicación, un paradigma.

Históricamente, la erradicación ha sido un paradigma que ha prevalecido para vigilancia y control de *Ae. aegypti*, se consiguió erradicar al mosquito a comienzo de los 1900's en Cuba y Panamá, en los 50's y 60's se comenzó la eliminación en los demás países de Latinoamérica, sin embargo una gran variedad de razones, entre las que se incluyen cambios políticos y en las prioridades de salud, cambios demográficos humanos, incremento de viajes entre países, resistencia a insecticidas de los mosquitos, y la más razón más importante: la imposibilidad de sostener el financiamiento y los requerimientos de infraestructura para la erradicación, permitieron que en los años 70's se reinfestaran los sitios libres de estos mosquitos. En 1994 la Organización

Panamericana de Salud declaro la erradicación de *Ae. aegypti* como una meta imposible. La nueva meta para la prevención del dengue y los programas de control ha comenzado a ser: "la utilización costo-efectivo de recursos limitados para reducir las poblaciones del vector a niveles que no signifiquen un problema que amenace de manera significativa la salud de la población" (OPS, 1994).

5.1. Plaguicidas

Los primeros materiales utilizados para reducir las molestias causadas por los insectos fueron el barro y el polvo aplicados sobre la piel para repeler insectos que causaban irritación, una práctica parecida a los hábitos de elefantes, cerdos y búfalos. En estas circunstancias, el barro y el polvo serían clasificados como repelentes, una categoría de los insecticidas. Para el comienzo de la Segunda Guerra Mundial (1940) nuestra selección de insecticidas se limitaba a varios arsenicales, aceites de petróleo, nicotina. piretro, rotenona, azufre, gas de cianuro y criolita; y fue este acontecimiento lo que abrió la *era de los productos químicos* con la introducción de un concepto totalmente nuevo en los productos químicos para el control: *los insecticidas orgánicos sintéticos*, el primero de los cuales fue el DDT (Ware and Whitacre, 2004).

La EPA (1997) define *pesticida*, como cualquier sustancia que tiene la intención de prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga. Bajo esta definición se engloban numerosos productos, como por ejemplo, los fungicidas (para combatir hongos), herbicidas (malas hierbas), nematicidas (gusanos), molusquicidas (caracoles y babosas), acaricidas (ácaros), insecticidas (insectos) y rodenticidas (roedores), como los más conocidos.

Un *insecticida* consiste en un ingrediente activo y uno o varios aditivos que se usan para mejorar las características de dilución, la eficacia de la aplicación o su acción insecticida. El tipo de formulación en la cual se presenta un producto comercial tiene influencia sobre el método de aplicación, su persistencia en el campo y obviamente su toxicidad. Los insecticidas que se encuentran hoy en el mercado, se dividen en cuatro grupos químicos: *organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides.*

5.1.1. Organoclorados

Los organoclorados son insecticidas que contienen carbono (de ahí viene el nombre *órgano*), hidrógeno, y cloro. También se los conoce con otros nombres: *hidrocarburos clorados, orgánicos clorados, insecticidas clorados,* y *sintéticos clorados.*Ahora los organoclorados son principalmente de interés histórico ya que solo unos pocos sobreviven en el arsenal de hoy. Dentro de este grupo se incluía el DDT, el cual es probablemente el más conocido y notorio producto químico del siglo XX además que es el insecticida más útil jamás desarrollado hasta que en 1973 la Agencia para la Protección Ambiental de los EUA (EPA) le canceló en todos los usos y todos los países del Primer Mundo siguieron su ejemplo, sin embargo aun es usado con efectividad para el control de malaria en varios países del Tercer Mundo (Pesticide Action Network North America, 2004).

5.1.2. Organofosfatos

Este grupo incluye a todos los insecticidas que contienen fósforo. Todos son derivados de uno de los ácidos del fósforo y como clase general son los más tóxicos de todos los plaguicidas para los vertebrados. Debido a su similitud con la estructura química de los OPs con la de los "gases nerviosos" sus modos de acción también son similares. Tienen dos propiedades características: generalmente son más tóxicos a los vertebrados que otras clases de insecticidas y la mayoría de ellos son químicamente inestables o no persistentes. Esta última característica fue la que los trajo al uso agrícola como sustitutos de los organoclorados que son mucho más persistentes. En este grupo se encuentra el malatión, paratión metílico, fentión y clorpirifos (Dyro, 2006).

5.1.3. Carbamatos

Los insecticidas que pertenecen a este grupo son derivados del ácido carbámico, su modo de acción consiste en la inhibición de la vital enzima *colinesterasa* (AChE). El primer insecticida carbamato que tuvo éxito fue el *Carbarilo* (*Sevin®*) en 1956 del cual se ha vendido a nivel mundial más que todos los demás carbamatos juntos ya que su toxicidad oral y termal para mamíferos es muy baja y tiene un espectro de acción

excepcionalmente amplio para el control de insectos (International Programme on Chemical Safety, 1986).

5.1.4. Piretroides

Los insecticidas piretroides son un gran grupo, con diversas clases de estructuras de compuestos usados para el control de un vasto número de plagas de artrópodos de importancia médica y agrícola. Aun cuando solamente han sido desarrollados como tales desde hace una década representan el 25% de las ventas globales de todos los insecticidas. En comparación a otras clases de insecticidas, los piretroides pueden rápidamente inmovilizar a insectos, un fenómeno conocido como "*derribo*". No son tóxicos prácticamente para los mamíferos. Exhiben una habilidad muy interesante para matar a insectos a bajas dosis a temperaturas decrecientes un fenómeno conocido como *coeficiente negativo de temperatura* (Scout, 1988).

Estos insecticidas son análogos mas estables de los insecticidas naturales encontrados en los extractos de las flores de crisantemo (*Tanacetum* [*Chrysanthemum*] *cinerariaefolium*). La búsqueda para desarrollar piretroides sintéticos comenzó en los 40's para realzar su eficacia, facilidad de producción a gran escala y mejor estabilidad (Zalom *et al.* 2005).

Los piretroides han tenido una evolución que ha sido dividida convenientemente en cuatro generaciones:

- La **primera** generación contiene solo un piretroide, la aletrina (Pynamin®), la cual apareció en 1949 para salud publica y uso urbano, especialmente contra mosquitos y moscas domesticas. Su síntesis es muy compleja, involucra 22 reacciones químicas para llegar al producto final. Esta generación es de baja toxicidad para el ser humano y otros mamíferos ya que se descompone rápidamente, sin embargo es irritante para las mucosas sobretodo para los pacientes asmáticos. Esta considerado de esta manera porque es un químico muy similar a los componentes de los extractos naturales del piretrum.

- La **segunda** generación fue registrada en los 60's para el control de insectos urbanos. Resmetrina fue cerca de 20 veces mas efectiva que el piretrum para el control de moscas domesticas y tuvo mayor tiempo de residualidad, pero como la

aletrina fue fotolabil (es decir contiene moléculas que se descomponen rápidamente en la luz) y por lo tanto inadecuado para el uso al aire libre. Se incluyen también dentro de este grupo a la tetrametrina (Neo-Pynamin®) (1965), luego bioresmetrina (50 veces más efectiva que el piretro) (1967), luego Bioallethrin® (1969), y finalmente fonotrina (Sumithrin®) (1973).

- La **tercera** generación incluye fenvalerato (Pydrin® [descontinuado], Tribute®, y Bellmark®), y permetrina (Ambush®, Astro®, Dragnet®, Flee®, Pounce®, Prelude®, Talcord® y Torpedo®) que aparecieron en 1972-73. Estos se convirtieron en los primeros piretroides agrícolas debido a su excepcional actividad insecticida (0.1 Kg. ia/ha) y a su fotoestabilidad. Estos virtualmente no son afectados por la luz ultravioleta del sol, duran de 4-7 días como residuos eficaces sobre el follaje del cultivo.

- Los insecticidas piretroides pertenecientes a la **cuarta** y actual generación comenzaron a registrarse durante los últimos 20 años, su efectividad se encuentra en el rango de 0.01 a 0.05 Kg. ia/ha. Esta generación incluye bifentrina (Capture®, Talstar®), *lambda*-cihalotrina (Demand®, Karate®, Scimitar® y Warrior®), cipermetrina (Ammo®, Barricade®, Cymbush®, Cynoff® y Ripcord®), ciflutrina (Baythroid®, Countdown®, Cylense®, Laser® y Tempo®), deltametrina (Decis®) esfenvalerato (Asana®, Hallmark®), fenpropatrina (Danitol®), flucithrinato (Cybolt®, Payoff®), fluvalinato (Mavrik®, Spur ®, descontinuado), praletrina (Etoc®), *tau*-fluvalinato (Mavrik®) teflutrina (Evict®, Fireban®, Force® y Raze®), tralometrina (Scout X-TRA®, Tralex®), y *zeta*-cipermetrina (Mustang® and Fury®). Todos ellos son fotoestables, es decir, que en presencia de luz solar no sufren fotólisis (divisiones). Y como tienen una volatilidad mínima ofrecen una efectividad residual extendida, hasta de 10 días en condiciones óptimas. Adiciones recientes a la **cuarta** generación de piretroides son acrinatrina (Rufast®), imiprotrina (Pralle®), registrada en 1998, y *gamma*-cihalotrim (Pytech®), que está en desarrollo (Ware and Whitacre, 2004).

Los piretroides se han convertido en la alternativa de los granjeros para sustituir a los OP's debido en muchos casos a que superaran a estos en el rango de los insectos a los que eliminan, la sincronización del tratamiento y la actividad residual. Quizás el único

grupo de artrópodos para los cuales no son efectivos son los insectos del suelo y los ácaros, así como por sus precio que es menos caro.

En adición a su eficacia y costo, los piretroides presenten un bajo riesgo para los trabajadores y aplicadores, así como también la toxicidad para anfibios, mamíferos y aves es relativamente baja comparada con los OP's, sin embargo, muchos invertebrados acuáticos y peces son altamente susceptibles (Smith and Stratton, 1986).

Pero también con el incremento del uso de este grupo de insecticidas, se agudizara en el futuro varios problemas; los insectos benéficos y los ácaros son importantes componentes del Manejo Integrado de Plagas (MIP) ya que ellos pueden reducir la necesidad de aplicación de químicos si se encuentran a suficientes densidades. Los piretroides han mostrado que afectan seriamente a estos cuando se encuentran presentes en los campos, además generalmente no son compatibles con los programas de control biológico, aunado a esto, están asociados a el aumento del número de plagas secundarias (Bentley *et al.* 1987).

5.1.4.1. Resistencia a piretroides

Los piretroides como el DDT son neurotóxicos. Producen lesiones similares en el motor de las terminaciones nerviosas en una gran variedad de especies de insectos y pueden actuar en los nervios periféricos así como en sistema nervioso central (otras clases de insecticidas generalmente actúan en los axones periféricos). Los que actúan principalmente en los nervios periféricos son conocidos como Tipo I. Mientras que los que actúan principalmente en el sistema nervioso central (principalmente piretroides con el grupo α-ciano) son conocidos como Tipo II. Sin embargo, hay sus excepciones a estas categorías. A nivel de molécula, los piretroides pueden interactuar con los canales de sodio y potasio, GABA mediante los canales de cloro y con ATPs. Sin embargo, su interacción con los canales de sodio parecen relacionarse con todos sus efectos tóxicos en los insectos. Los efectos de los piretroides en los canales de sodio de los insectos no están claros, pero el incremento en la permeabilidad de sodio esta correlacionado con las lesiones presentes. Ahora sospechamos que el "derribo" confiere un cambio fundamental en los canales de sodio del sistema nervioso de los insectos con este rasgo. Desde que el

super-*kdr* fue identificado, se sospecha que este rasgo puede ser expresado en varias magnitudes (Millar, 1988).

5.1.5. Plaguicidas en México.

El uso de plaguicidas en México ha sido tema de discusión de las dependencias sanitarias durante los últimos 20 a 30 años. En aquel entonces la tarea de conservar registros era casi inexistente, pero durante los últimos 15 años se ha tomado conciencia de esta necesidad de monitoreo y control de plaguicidas. Hace casi 20 años, se creó la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) para coordinar esfuerzos intersecretariales, incluyendo estrategias del sector privado, y para facilitar el cumplimiento con las leyes de salud, salubridad y protección ambiental en México. Pese a los esfuerzos por parte de la CICOPLAFEST para controlar el uso de plaguicidas, no existe hasta el presente ningún reglamento que obligue a los aplicadores a conservar registros o reportar su uso de plaguicidas. Por ejemplo, de acuerdo con el Reglamento de Uso y Control de Herbicidas para México, el requisito más común que se les exige a los aplicadores es que usen productos químicos autorizados por la dependencia, pero en todo caso es requisito que se genere un registro de la aplicación. A pesar de ello, la mayoría de las dependencias guardan registros únicamente si opinan que pueden resultar útiles por razones económicas o administrativas.

Lo que se necesita con mayor urgencia en este momento es poder generar registros que documenten cada vez que se han aplicado plaguicidas en el territorio mexicano (Barud, 2006). La mayoría de las zona agrícolas carecen de un sistema de control para llevar la cuenta de las aplicaciones de plaguicidas. Esto es sumamente importante ya que en México se usa el 60% de los 22 plaguicidas como perjudiciales para la salud y el medio ambiente. De ellos el 42% se fabrican en el país. De 90 plaguicidas que han sido cancelados o restringido en los Estados Unidos, 30 se usan en México (INEGI, 1992).

Existen estudios que demuestran que son nocivos para la salud humana; buena parte de estas víctimas de los plaguicidas en el país son indígenas, trabajando ya sea lo mismo en Sonora que en Nayarit o Chiapas, así mismo son víctimas de los programas

agropecuarios, que en vez de diversidad alientan el monocultivo y el uso de paquetes tecnológicos que los hacen dependientes de los grandes consorcios productores de semillas, fertilizantes y otros productos químicos (Restrepo, 2007).

En México el uso del DDT fue sustituido por piretroides después de haberse usado por casi medio siglo, dentro del Sector de Salud Pública para el combate del mosquito *Ae. aegypti*, la Norma Oficial Mexicana **NOM-032-SSA2-2002**, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector, los criaderos se deben tratar con temefos, larvicida degradable de los más inocuos, aplicado en agua a la dosis de una parte por millón. Se cuenta con tres presentaciones: líquido al 50%, cápsulas al 5% y granos de arena al 1%. En el caso de las cápsulas al 5% se debe utilizar un gramo del producto por cada 50 litros; para temefos en granos de arena al 1% se aplica un gramo por cada 10 litros de agua. La presentación de temefos al 50% se destina para tratar carros-cisterna que suministran agua para uso doméstico durante las emergencias sanitarias-epidemiológicas, o en la dotación cotidiana de agua a los asentamientos humanos de riesgo con suministro irregular. La dosis es de 1 a 2 ml por cada 1,000 litros de agua. La aplicación de temefos se hace a recipientes positivos a larvas, evitando su aplicación de rutina en recipientes frecuentemente negativos. Se emplea como medida preventiva básica y se regirá por la periodicidad que indiquen los estudios entomológicos. Ante la presencia de situaciones emergentes como los desastres naturales y brotes, debe aplicarse simultáneamente con rociado espacial a VUR cumpliendo con: coberturas integrales, en periodos de ejecución cortos (menores a tres semanas) y con reducción de los índices de infestación a niveles óptimos.

Así mismo se recomienda la siembra de peces en piletas, toneles y otros recipientes para almacenar agua es una medida aceptada por la comunidad que logra el control de larvas de mosquitos. Otra medida es el empleo de tabletas de Bti (*Bacillus thuringensis*) 2300 UTI/mg a razón de 1 tableta por cada 50 litros de agua, con residualidad de 45 días, otra alternativa del mismo ingrediente activo, es la presentación WDG (gránulos dispersables en agua) con 3000 UTI/mg a razón de 1.2 g por cada 200 litros de agua lo que permitirá disminuir costos de tratamiento. Los mosquitos aedinos también se combaten mediante la aplicación de VUR.

Para el combate de los mosquitos adultos, se indica el uso de piretroides sintéticos como la permetrina, esbiol y butóxido de piperonilo a dosis de 10.9, 0.15 y 11.1 gramos de ingrediente activo por hectárea respectivamente, o como alternativa cyflutrin a dosis de 1 a 2 g/ha, así también bifentrina al 1.5% para aplicaciones U.L.V. en el control del paludismo para usar en exteriores a dosis de 150 ml de producto por hectárea, diluido en agua; y otros que por su elección demuestren resultados satisfactorios. El insecticida malatión en aplicación espacial queda temporalmente fuera de uso para el control de vectores, hasta contar con un larvicida que no pertenezca al grupo de los organofosforados.

Dado que el mosquito *Ae. aegypti* se caracteriza por ser eminentemente doméstico, se ha observado con un solo ciclo de nebulización de un día, con una aplicación temprana en la mañana y otra por la noche, es suficiente para eliminar a la mayoría de los mosquitos del área tratada. Este esquema reduce la infestación hasta por cuatro semanas cuando se garantiza la reducción simultánea de criaderos activos. Cuando la nebulización se usa como única medida, se aplica en ciclos de varios días consecutivos (el número de días lo determinará la productividad de los criaderos), con dos aplicaciones por día, una en la mañana y otra por la noche. En este caso se tendrá en cuenta que la reducción de densidades no se mantendrá por más de dos semanas.

Sin embargo, los estudios sugieren que una estrategia de manejo de insecticidas (mezclas, mosaicos, rotaciones) es necesaria para implementar y mantener a largo plazo la susceptibilidad los insecticidas que se están utilizando en estos momentos.

5.2. Resistencia a plaguicidas

5.2.1. Concepto de resistencia

Cuando se discute el termino **resistencia a plaguicidas**, generalmente se hace referencia a la habilidad humana para controlar una plaga, y no como la habilidad del organismo (insecto, planta, hongo, etc.) para defenderse a si mismo, cuando en la realidad la resistencia a los tóxicos es una forma de **autodefensa**. Ahora bien, la **exposición** a un plaguicida puede describirse como un **ambiente de estrés** y la **resistencia** como la **expresión de la respuesta natural del organismo al estrés**, ya que éstos van a

enfrentarse a lo largo de su vida tanto con estrés letal como no letal desarrollan efectivos mecanismos de defensa como respuesta a esta presión (Scout, 1995).

Antes de definir el concepto de resistencia, hay que comprender términos importantes como: **estrés** que podemos definir como **cualquier cambio en el ambiente que actúe para reducir el bienestar de un organismo**; puede ser de origen físico, biótico y/o tener su origen en componentes tóxico que actúan de manera crónica, por estaciones o bien ambas al mismo tiempo, afectando a nivel de comunidad, población o individual (Koehn and Bayne, 1989).

Resistencia puede ser definida como **el desarrollo de la habilidad de una cepa de una población de organismos para tolerar dosis de un toxico que podría ser letal para la mayoría de los individuos de una población de la misma especie** (Anónimo, 1957), ésta definición es sumamente imprecisa, porque infiere que ésta característica puede desarrollarse en un individuo expuesto o no a la presión de un tóxico, siendo estos dos momentos y eventos diferentes. **Resistencia** es la **expresión fenotípica de un rasgo heredable**, que puede expresarse en un pequeño grupo de individuos de una población **antes** de la **exposición a un tóxico**. El desarrollo de un cambio medible en la susceptibilidad de una población es debido a una selección específica de los individuos preadaptados por varias generaciones o bien por exposición a cantidades de tóxicos que pueden ser subletales para los preadaptados pero no para otros individuos de la población. **Resistencia** se refiere a un **decrecimiento en la susceptibilidad, que es heredable y no necesita ser inducida anteriormente para que pueda expresarse**, sin embargo exponer a un organismo a una condición de estrés, puede resultar en un incremento en la expresión de los genes resistentes que pueden o no ser heredables (Scout, 1995).

5.2.2. Resistencia cruzada y resistencia múltiple

Cientos de especies de insectos han adquirido de manera sucesiva resistencia a los grupos de plaguicidas presentes en el mercado. Pudiéndose presentar **resistencia cruzada** en donde un insecto exhibe un espectro de resistencia a **dos o más clases de plaguicidas** porque **estos productos tienen el mismo o muy similar modo de acción**. Podemos definirla como el mecanismo por el cual un simple gen confiere resistencia a varios químicos del mismo diferente grupo (Brogdon, 2003). Las fosfotriesterasas

muestran resistencia a varios organofosfatos y el gen *kdr* confiere resistencia a DDT y piretroides (Hemingway and Ranson, 2000). **Resistencia múltiple**, es cuando un organismo es resistente a dos o más clases de plaguicidas porque coexisten dos o más diferentes mecanismos de resistencia que contrarrestan las acciones de los productos incrementando esta (Brogdon, 2003; Hemingway and Ranson, 2000).

5.2.3. Mecanismos de resistencia

Los tipos más comunes de resistencia en insectos pueden ser agrupados en cuatro categorías:

1. ***Comportamiento:*** cuando el insecto modifica su comportamiento para evitar el contacto con el plaguicida.

2. ***Penetración:*** cuando la composición del exoesqueleto del insecto es modificado para inhibir la penetración del insecticida.

3. ***Sitio blanco insensible:*** cuando el sitio de acción para el insecticida comienza a ser modificado para reducir el impacto de la forma activa del insecticida. Este grupo se encuentra: *acetilcolinesterasa insensible, receptor GABA, canal de sodio y el receptor HJ.*

4. ***Metabólica:*** donde el metabolismo de los insectos comienza a modificarse para detoxificar el insecticida o bien no permite que el compuesto se convierta en su forma tóxica. Puede dividirse en tres principales sistemas de enzimas: *citocromo P450 monooxigenasas (P450s), esterasas no especificas y glutatión s-transferasas (GSTs).* Los componentes de cada sistema de enzimas puede mutar para alterar la detoxificación del plaguicida, sin embargo solamente tipos específicos de mutaciones parecen estar asociados con los mecanismos de resistencia (Tabla 1).

Tabla 1. Mutaciones genéticas asociadas con enzimas y receptores que pueden dar como resultado diferentes tipos de resistencia.

Tipos de resistencia	Mutaciones genéticas asociadas a:		
	Amplificación de genes	Alteración de expresión	Cambio estructural
Metabólica			
Oxidasas P450	ND	C	ND
Esterasas	C	ND	C
GSTs	ND	C	?
Insensibilidad en el sitio de acción			
Acetilcolinesterasa	ND	ND	C
Receptor GABA	ND	ND	C
Canal de sodio	ND	?	?
Receptor HJ	ND	?	?

ND: No detectado; **C:** Confirmado; **?:** Implicado pero no confirmado

Los dos tipos de mecanismos que pueden causar altos niveles de resistencia se refieren generalmente al tipo metabólico y el sitio blanco insensible (Oppenoorth, 1984; Scout, 1995).

5.2.3.1. Mecanismos de resistencia metabólicos

Son tres los grupos de enzimas considerados como la base importante en la resistencia para los grupos de insecticidas organofosfatos, organofosforados, carbamatos y piretroides.

El sitio blanco de los organofosforados (OPS y carbamatos es la acetilcolinesterasa en la sinapsis nerviosa y el sitio blanco para los organoclorados, como el DDT y los piretroides sintéticos son los canales de sodio (Miyazaki *et al.* 1996; Williamson *et al.* 1996).

5.2.3.2. Citocromo P450 monooxigenasas (P450)

Las P450 monooxigenasas son enzimas bien ubicadas, encontradas desde las bacterias hasta los mamíferos. Están envueltas en el metabolismo endógeno así como también en el metabolismo de xenobióticos. Por ejemplo, en los insectos estas actividades son esenciales para la síntesis y la degradación de hormonas de muda y hormonas juveniles así como también en el mecanismo de las feromonas. Las P450 son también

importantes para los mecanismos adaptativos de los insectos para sintetizar los químicos tóxicos emitidos por las plantas hospederas (Gould, 1984).

Catalizan una variedad de reacciones detoxificativas en los insectos, incluyendo la hidroxilación del DDT y la epoxidación de ciclodienos (Feyereisen *et al.* 1990).

La variedad de reacciones simultáneas por estas enzimas son muchas, por lo que varias enzimas P450 pueden estar presentes en un solo insecto y varios alelos de cada gen puede existir. No existe evidencia que sugiera que los genes P450 son amplificados o estructuralmente alterados para producir resistencia. Pero son numerosos los ejemplos de que su expresión puede ser alterada por diversas sustancias (Rose *et al.* 1991; Jeong *et al.* 1992; Waxman and Azaroff, 1992; Zinder *et al.* 1993).

Por definición, si la expresión de P450 es alterada para producir resistencia, tanto las cepas susceptibles como resistentes pueden tener cuantitativamente diferentes cantidades de estas enzimas. Están involucradas en el metabolismo de virtualmente todos los insecticidas (Wilkinson and Brattsten, 1972; Hodgson, 1985; Agosin, 1985).

A la fecha, se han asignado para seis CYP familias; cinco son específicas para insectos (CYP6, 9, 12, 18 y 28) y una CYP4 esta relacionada con secuencias de otros organismos (Feyereisen, 1999).

5.2.3.3. Esterasas no específicas

Los mecanismos de resistencia producidos por las esterasas han sido estudiados ampliamente en diferentes especies de mosquitos del genero *Culex* y el pulgón *Myzus persicae*. Resistencia de amplio espectro a OPs es conferida por incremento de esterasas que actúan ligándose rápidamente al insecticida y desdoblándolo lentamente (Kadous *et al.* 1983). La clasificación de esterasas se basa en su preferencia por α o β naftil acetato, su movilidad en gel de policrilamida y en la secuencia de nucleótido (Hemingway and Ranson, 2000)

Dos sitios comunes de esterasas, estα y estβ, se encuentran involucradas solas o en combinación en este tipo de resistencia en el genero *Culex* (Vaughan *et al.* 1997). En *Cx. quinquefasciatus* el fenotipo común de esterasas elevadas involucra dos enzimas: estα2[1] y estβ2[1] (Vaughan and Hemingway, 1995). Un pequeño número de especies del genero

Culex muestran elevadas estβ1 solas, elevadas estα1 solas o co-elevadas estα3 y estβ1 (De Silva *et al.* 1997; Hemingway and Karunaratne, 1998).

Algunas especies del genero *Anopheles* tienen un mecanismo de esterasas no elevadas, más sin embargo, estas confieren resistencia especifica a malatión a través del incremento en el rango de metabolismo (Hemingway 1983).

5.2.3.4. Glutatión s-transferasas

Las enzimas GSTs son multifuncionales y detoxifican un gran rango de xenobióticos. Estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del glutatión reducido (GSH, por sus siglas en ingles) en los centros electrofílicos de compuestos lipofílicos (Hemingway and Ranson, 2000). Múltiples formas de estas enzimas han sido reportadas en mosquitos, mosca domestica y *Drosophila* (Clark *et al.* 1984; Toung *et al.* 1990).

Existen por lo menos tres familias de GSTs en insectos y todas juegan un papel importante en la resistencia a insecticidas. En la especie *Ae. Aegypti* por lo menos dos GSTs se encontraron en altas concentraciones en mosquitos resistentes al DDT (Grant and Matsumura, 1989).

5.2.3.5. Insensibilidad en el sitio de acción

El segundo mecanismo de resistencia más importante es la insensibilidad en el sitio de acción, que se refiere a una alteración de la (s) moléculas (s) que directamente interactúan con el plaguicida para reducir la toxicidad. Tanto acetilcolinesterasa como el receptor ácido gamma-butírico (GABA) son conocidos como blancos de insecticidas y alelos resistentes de cada uno pudieran ser encontrados. El canal de sodio y el receptor de la hormona juvenil (HJ) son supuestos blancos de insecticidas. Su directa interacción con insecticidas no ha sido confirmada, pero está claramente evidenciado que juegan un rol clave en los procesos de intoxicación.

Acetilcolinesterasa (AChE) es el sitio blanco de organofosforados y carbamatos. Estos plaguicidas lazan a AChE y previenen que la enzima detenga la acción del neurotransmisor acetilcolina. Múltiples formas de AChE que confieren varios grados de resistencia pueden ser encontradas en una gran variedad de artrópodos. En cada caso examinado hasta ahora, la afinidad de ATC con el plaguicida ha sido reducida. Ningún

gen amplificado o expresión alteración de un gen que codifique a AChE ha sido detectado. En su lugar se han encontrado puntos de mutaciones que cambian la estructura de la enzima (Hemingway *et al.* 1986).

Recientemente se identificaron 5 puntos de mutación en *Drosophila melanogaster* que están asociados con sensibilidad reducida. Individualmente, las mutaciones dan solamente niveles bajos de resistencia, pero cuando varios de ellos se combinan, grandes niveles de resistencia son el resultado. La hipótesis es que la sensibilidad disminuida por ATC es el resultado de una combinación de varias mutaciones, cada una de las cuales provee una resistencia pequeña en lugar de la aparición de una sola mutación que proporcione una fuerte resistencia.

Los receptores GABA son el primer sitio blanco de los insecticidas ciclodienos. En vertebrados, este grupo de receptores untos forman un canal de iones cloruro. En los invertebrados esta inferido que poseen el mismo canal de iones. Muchos casos de aparición de resistencia a ciclodienos son debidos a una disminución de la sensibilidad del receptor GABA subtipo A, una parte integral del canal de iones cloruro. La disminución de la sensibilidad por receptores GABA es debido a un cambio estructural de una proteína. Ninguna amplificación o expresión alterada de genes del receptor GABA han sido detectadas. Solamente un punto de mutación causa que un aminoácido específico pueda ser sustituido dando como resultado altos niveles de resistencia para ciclodienos. Otros puntos de mutación han sido detectados pero estos no parecen ser la causa de resistencia o no están asociados consistentemente con este fenómeno (Hemingway *et al.* 1987).

Los canales de sodio juegan un rol integral en la transmisión de impulsos neurales. Los piretroides causan una interrupción en las transmisiones de los nervios por la interrupción de la función normal de los canales de sodio. La insensibilidad del sitio blanco para piretroides es una respuesta fenotípica comúnmente referida como "resistencia al derribo (*kdr*)", dando como resultado que los canales de sodio comiencen a ser menos sensibles a la intoxicación. Aunque está claro que los canales de sodio son adversamente afectados por los piretroides, hay desacuerdo sobre si el *kdr* es el resultado de una mutación en el canal de sodio o lo es de alguna otra molécula que es parte integral para la función de los canales. Un punto de mutación para el canal de sodio que pudo ser

estructuralmente alterado fue detectado en una cepa de insectos resistentes, pero hasta ahora esta mutación no ha mostrado ser causa de resistencia

Otros reportes indican que la mutación que causa *kdr* esta cercanamente ligada a (físicamente cerca o es parte de) el gene que codifica a un tipo de canal de sodio y esta liga ha sido interpretada como una fuerte evidencia de la(s) mutación (es) de que un gen del canal esta asociado con *kdr*. Por otra parte, una mutación de una proteína regular o del receptor pudo también dar como resultado *kdr*. Existe evidencia indirecta para sustentar ésta hipótesis alternativa. La tercera hipótesis que ha sido propuesta y que esta limitada a evidencia electrofisiológica indica que *kdr* es causado por cambio de dos genes cercanos ligados. Uno involucra un canal de sodio alterado y el otro puedo ser asociado con la fosforilación del calcio activado de una(s) proteína(s) involucrado con los neurotransmisores. Al mismo tiempo, puede ser que solamente esté indicado ya que no hay ningún evento de amplificación de gen asociado con *kdr*. Es más probable que la expresión de un gen que esta asociado con la función del canal de sodio ha sido alterado y/o una mutación estructural del canal de sodio resultó en *kdr* (Bisset, 2002).

Los análogos de las hormonas juveniles como el metopreno compiten con la hormona natural para el receptor de la HJ. La mayoría de la resistencia a los análogos de HJ son tanto metabólicos y/o una reducción en la penetración del insecticida a través de la cutícula. Los reportes de la insensibilidad del sitio blanco para análogos de HJ son en mutantes aislados de colonias de laboratorio de *Drosophila*. La transposición de los alelos de los genes de resistencia *Met* que han sido aislados de estas colonias por un TE pueden inducir resistencia, sin embargo, la transposición no es requerida para que la resistencia del gen sea expresada (Wilson, 1992).

Otros dos tipos de resistencia que deben ser descritos son la penetración reducida del plaguicida y la alteración del comportamiento para evitar el producto toxico. Esto presume que la estructura cuticular es de alguna manera alterada para reducir la cantidad de penetración del tóxico. El cambio en el comportamiento parecer ser estimulado por contacto o a través de receptores táctiles u olfatorios que entrar en contacto con el pesticida. Solos, ninguno de estos mecanismos causan grandes niveles de resistencia pero ellos pueden ser encontrados en combinación con otros tipos de resistencia y pueden

hacer una contribución significante para que la resistencia total exhibida por el insecto (Tabashnik 1989; Devonshire 1990).

5.3. Monitoreo, detección y manejo de resistencia

La resistencia es un fenómeno extenso y ya han sido detectadas muchas poblaciones resistentes de diversas plagas de importancia para el ser humano.

Donde el control ha fallado la historia nos revela que la aplicación de los plaguicidas usualmente indica que la exposición crónica a éstos ha resultado en altos niveles de resistencia que causan los fallos. Puede el desarrollo de poblaciones resistentes significar que la falla en el control es inevitable? Ciertamente la continua selección de los mismos mecanismos de resistencia una y otra vez pueden resultan en niveles de resistencia que sean tan grandes que resulte en un fallo total del control pero si la presión de selección (e.j.. un plaguicida) por cada mecanismo es removido antes del desarrollo de una resistencia suficientemente significante, entonces el fallo en el control puede evitarse (Georghiou, 1981; Georghiou and Lagunas, 1981; Georghiou, 1990).

Un paso importante para evitar este problema en el control de vectores es la detección de resistencia cuando se encuentra en su nivel más bajo, los objetivos de determinar el estatus de susceptibilidad de vectores son los siguientes:

a. Antes del comienzo de las operaciones de control, se debe obtener datos de la población a través del establecimiento de una línea base (es decir, es necesario tener el conocimiento de la susceptibilidad base, la cual se encontrará en una población que no ha sido expuesta previamente a plaguicidas, lo que servirá como punto de referencia) para establecer el programa y seleccionar el plaguicida a utilizar.

b. Detectar la presencia de la resistencia en un estado temprano para poder introducir un manejo de ésta en el momento justo. La detección en un estado avanzado de la evolución del organismo, es importante para elucidar la causa del fallo del sistema de control de la enfermedad; sin embargo, en ese caso, es muy probable que sea tarde para proponer alguna forma de manejo de la resistencia que no sea otra que reemplazar el insecticida.

c. Monitorear los niveles de resistencia sobre tiempo, en virtud de evaluar los efectos de las estrategias de control sobre ésta.

La WHO ha usado pruebas por muchos años para la detección y monitoreo de la resistencia en diversos vectores. La colecta y pruebas de los vectores deben ser estandarizados y racionalizados (e.j. para permitir ver el efecto de la edad en la resistencia), así como nuevos métodos deben ser desarrollados para probar los efectos de los plaguicidas que están saliendo al mercado así como detectar sus efectos en vectores, hospederos intermediarios y depredadores (WHO, 1970).

El más reciente desarrollo de técnicas de microensayos bioquímicos puede detectar mecanismos de resistencia en insectos individuales y estas facilidades para confirmar la resistencia en los pocos sobrevivientes de los bioensayos. La identificación de los mecanismos de resistencia ayuda a pronosticar el espectro de la resistencia cruzada y las facilidades de la selección de los plaguicidas alternativos.

5.3.1. Técnicas de detección y monitoreo de resistencia

5.3.1.1. Métodos estándares

Para que un método sea considerado como estándar, puede ser sencillo, replicable, eficaz, accesible y darnos un resultado rápido.

Las pruebas de susceptibilidad son para mosquitos, piojos, chinches de cama, moscas negras, moscas caseras, garrapatas, pulgas y roedores. Aun cuando estas pruebas han sido usadas extensivamente por muchos años con resultados satisfactores, todavía se tienen algunas dificultades con ellos, como por ejemplo:

1. La mayoría de los métodos fueron desarrollados para buscar resistencia en las generaciones anteriores de plaguicidas. Los nuevos productos con acción fumigante, knockdown y/o repelente pueden requerir diferentes enfoques.

2. Muchos métodos de exposición están en uso. Mientras, en muchas pruebas, los vectores son expuestos a superficies tratadas (mosquitos, moscas de la arena, cucarachas, chinches triatominas, chinches de cama, pulgas, etc.) otras están basadas en la aplicación tópica de cantidades conocidas de plaguicidas en el tórax del vector (moscas domesticas, moscas tsé-tsé, moscas de los establos y garrapatas).

3. Mosquitos pequeños como *Ae. aegypti* frecuentemente escapan por la malla de las tapas de los tubos de exposición de los kids de pruebas para mosquitos adultos.

4. La aplicación tópica de soluciones de insecticidas para garrapatas y moscas involucran el uso de equipo especial, esto también es necesario para anestesiar a las moscas que frecuentemente escapan durante el procedimiento.

5. En los tests que envuelven la exposición de mosquitos a papeletas impregnadas con insecticidas organoclorados, organofosforados y carbamatos, es asumido que el tiempo de exposición y el balance de la concentración siguen un camino semejante: tanto el producto como la mortalidad son constantes. Sin embargo, esto sólo puede ser verificado para pocos insecticidas y puede no ser totalmente cierto para algunos de los componentes probados (U.S. Army 1992).

5.3.1.2. Métodos tentativos

Estos incluyen pruebas para cucarachas y chinches reduviide, utilizando *Bacillus thuringensis*, fumigantes persistentes e irritantes.

Las pruebas para cucarachas son diferentes de otras por el numero de observaciones consecutivas de tiempos de knockdown hechos en los mismos insectos pero sin removerlos de la superficie tratada por un tiempo fijo de post-exposición. Como las relaciones entre los tiempos de knockdown y los tiempos letales no son constantes, la primera opción particularmente sensitiva a la temperatura y los efectos de penetración, estas pruebas pueden ser cambiadas para llevarlas dentro de la línea con otros insectos (tiempo fijo de exposición y 48 horas de observación post-exposición). Un largo tiempo de post-exposición es recomendado para cucarachas porque pueden recobrarse del knockdown después de la exposición entre 24-48 horas. En las pruebas utilizadas para chinches reduviide, las instrucciones nos sugieren utilizar los 7 instares. Estos son muy difíciles de colectar en gran numero en el campo, los instares tempranos son usualmente más numerosos y más fáciles de colectar. Cuando se desea conocer el resultado de una aplicación residual, se pueden utilizar hojas o partes de ellas, sueltas o unidas a plantas, las cuales son puestas en contacto con soluciones acuosas del plaguicida a utilizarse, diluidos en dosis requeridas. Otro tipo de bioensayo es mediante la inmersión del insecto o "dip-test" que se utiliza como un procedimiento rápido de detección de resistencia mediante la aplicación de una dosis discriminante (que es la concentración de insecticida que mata a los organismos en una lapso de una hora a temperaturas de entre 20 y 25°C

después de una inmersión de 10 s). Las pruebas tentativas para fumigantes persistentes deben ser satisfactorios y deben considerarse una de las pruebas estándares. Los métodos de detección de cambios ambientales son voluminosos e ineficientes. En vista de la creciente importancia de los piretroides, que actúan tanto como irritantes como repelentes, estas pruebas deben ser revisadas y/o desarrollar otras (U.S. Army 1992).

5.3.1.3. Otros métodos

Peces, caracoles y *Cyclops* spp., deberán ser probados tentativamente como si fueran larvas de mosquito; los biopesticidas deben ser considerados como larvicidas, pero la concentración del ingrediente activo es expresado en unidades tóxicas.

5.3.1.4. Bioensayos

Convencionalmente la detección de la resistencia está basada en pruebas de susceptibilidad a insecticidas que son experimentos de dosis-mortalidad (bioensayo). Existe una gran diversidad de tipos de bioensayo dependiendo del organismo al que va dirigido, el plaguicida a evaluar y el objetivo que se persigue.

Con éstos métodos se pueden detectar diferencias en susceptibilidad mediante la relación R/S (colonia resistente sobre colonia susceptible) de los valores de DL_{50}, llamada proporción de resistencia (PR), ésta permite comparar dos poblaciones de organismos con base en una dosis de un plaguicida (es decir, se encuentra a nivel de DL_{50}, DL_{90} u otra de interés) para saber cuantas veces es necesario aumentar la dosis para alcanzar la mortalidad deseada (50 o 90%) con respecto a la línea base. Permiten así mismo, detectar la homogeneidad genética de la población en su respuesta al tóxico, la cual se observa en los valores de la pendiente de la recta de regresión obtenida mediante el procedimiento de Probit, que nos señala que entre mayor es la pendiente la colonia es genéticamente más homogénea, es decir poseen los mismos genes de resistencia y están aproximadamente en iguales proporciones entre los individuos.

Los mecanismos que participan en el fenómeno de resistencia a plaguicidas en una población también pueden ser identificados indirectamente mediante estos ensayos debido a la utilización de sinergistas, ya que estos se unen a las enzimas que ocasionan resistencia permitiendo actuar libremente a los tóxicos, lo cual se verá reflejado en los

valores de susceptibilidad en insectos resistentes, casi tan bajo como los de la línea de base. A continuación se enlistan los más importantes dentro de este rubro (Brogdon 1989):

5.3.1.5. Dosis diagnóstico (concentración) para monitorear resistencia vectorial

La dosis diagnóstico (DD) es la forma más importante de monitoreo de resistencia en una población a través del tiempo. Esta determinada por la exposición de insectos susceptibles a una serie de concentraciones del insecticida a probar. La dosis letal para matar el 99.9% de la población testada (DL_{99}) deber ser determinada, la DD debe ser dos veces la DL_{99}. Por comparación, para definitivamente definir la resistencia deben determinarse la DL_{50} y la DL_{90} de la población testada y de una población susceptible.

Idealmente, la DD debe ser determinada antes de la exposición de la plaga blanco a insecticidas. Luego, a través de monitoreo regular, el desarrollo de la resistencia puede ser fácilmente detectable como un mayor porcentaje de la población del insecto plaga que sobrevive a la DD del insecticida. Sin embargo, probar una población de insectos plaga antes que sea expuesta a insecticidas raramente es hecho, por lo tanto, la DD de ciertos insecticidas debe ser determinada mediante el uso de una cepa de laboratorio susceptible.

Poblaciones sometidas son directamente comparadas con una población susceptible. En la mayoría de las poblaciones están presentes individuos tanto resistentes como susceptibles.

Para que éstas DD puedan considerarse para la determinación lo más pronto posible de resistencia en el campo deben ser definidas para cada situación local con el establecimiento de los valores de la línea base para las poblaciones locales susceptibles, de lo contrario se estaría cometiendo el error de sobreestimar o subestimar la resistencia en la población (Brogdon 1989).

5.3.1.5.1. Técnica de la WHO (1981)

La WHO ha coordinado el uso de sistemas de detección por 30 años, colectando resultados y proporcionando periódicamente de manera pública sus observaciones a través de comités expertos. La técnica de la WHO para mosquitos adultos, consiste en

exponerlos a papeletas impregnadas de una dosis conocida del plaguicida a probar en tubos de plástico.

El material biológico es colectado de sitios conocidos como por ejemplo en el caso de este mosquito en floreros de cementerios, tambos, piletas, etc. Se transporta a un insectario donde se establecerá una colonia para efectuar pruebas de dosis y resistencia. Los larvas son mantenidas en charolas de plástico, alimentadas con polvo de alimento para peces, cuando ya se encuentran en estado de pupa son trasladados a jaulas metálicas donde se mantienen hasta el momento de la prueba, son alimentados con agua y azúcar, si se quiere obtener huevos a las hembras se les proporcionará además sangre de ratón.

El procedimiento consiste en tomar de las jaulas 25 mosquitos adultos hembras de un día de edad, comprobar que son hembras todos los organismos, se utilizan dos tubos llamados de observación y de exposición. En el tubo de observación se colocan los mosquitos observándolos durante una hora para comprobar que no están dañados por manejo u otra circunstancia, se abre la compuerta que los separa y se deja pasar a los mosquitos al tubo de exposición que tiene la papeleta impregnada con el plaguicida a probar, durante una hora se expondrán los organismos. Al término de ese tiempo, se registra la mortalidad y son devueltos al tubo de observación. Se registrará nuevamente la mortalidad a las 24 horas. En caso de mortalidad en el control, ésta se ajusta mediante la fórmula de Abbot. Los mismos pasos se realizan en las poblaciones controles. Los bioensayos en larvas son semejantes, se utilizan larvas de 3er. estadio tardío o 4o. temprano. Se registra mortalidad a las 24 horas. En caso de mortalidad en el control, ésta se ajusta mediante la fórmula de Abbot.

La mortalidad de los mosquitos puede ser llevada acabo en papel logarítmico de probabilidad para la construcción de la línea de regresión de la dosis-mortalidad y/o para el tiempo-mortalidad cuando diferentes lotes de mosquitos son expuestos a alguna concentración de insecticida, pero para diferentes períodos de tiempo o cortos intervalos dependiendo de la concentración estándar del insecticida utilizado.

Si la mortalidad en el grupo de controles más del 5% pero menos del 20% se realiza como ya se mencionó una corrección de la mortalidad aplicando la fórmula de Abbot (figura 14).

$$\% \text{ Mortalidad corregida} = \frac{\% \text{ Mortalidad en prueba} - \% \text{ Mortalidad en control}}{100 - \% \text{ Mortalidad en control}} \times 100$$

Figura 14. Fórmula de Abbot.

Cuando la mortalidad en los controles es arriba del 20% las pruebas son descartadas. Calcular un promedio de la mortalidad obtenida para las concentraciones por triplicado. Al construir la **línea de regresión**, si ésta muestra una orientación hacia la **derecha pero permanece paralela a la línea base**, esto nos indica un **incremento en la tolerancia** solamente. Si **la línea de regresión tiene tendencia a formar una meseta en la parte superior**, esto indica **resistencia** (WHO 1981a, 1981b, 1981c, 1981d, 1986).

5.3.1.5.2. Bioensayo CDC (1998)

Se desarrollaron dos métodos de bioensayos, uno para trabajar con mosquitos adultos mientras que el otro es para larvas. El propósito de ambos bioensayos es detectar resistencia a insecticidas en insectos individuales por cambios medibles en el tiempo que requiere un insecticida en encontrar el blanco y ejercer su efecto tóxico, pero en presencia de mecanismos de resistencia el intervalo de tiempo se incrementa.

Es importante obtener estos datos de manera reciente, ya que la WHO posee información no actualizada de décadas atrás, esto hace que el principal problema para utilizar esta técnica es el hecho de que no se han establecido tiempos de exposición y dosis para poblaciones locales de vectores así que los datos obtenidos mediante ésta técnica pueden complicarnos la selección de una real dosis discriminante para un plaguicida en particular mientras que la técnica del CDC nos permite establecer los niveles de resistencia para poblaciones colectadas en campo o bien proveniente de laboratorio actuales. En la tabla 2, se hace una comparación entre las técnicas mencionadas.

Tabla 2. Comparación entre las técnicas de la WHO (1981) y del CDC (1998) para obtención de la dosis diagnóstico.

CDC (1998)	vs	WHO (1981)
✓ Según el modo de acción de los insecticidas, el tiempo-mortalidad puede ser desde el primer minuto		× Tiene un tiempo establecido a 1 hora y 24 horas, no teniendo en cuenta el modo de acción del plaguicida que se está probando.
✓ Las pruebas son baratas y se pueden realizar en cualquier país incluyendo a los que se encuentran en vías de desarrollo.		× Las pruebas son caras, especialmente para los países donde puede estar presente la multiresistencia.
✓ En cualquier lugar del mundo se pueden conseguir botellas y vasos de precipitado de las medidas necesarias, sin necesidad de trámites complicados.		× Los procedimientos para obtener los kits de prueba son complicados. Las órdenes de compra en América tienen que pasar antes por oficinas de la OPS presentes en el país, a Washington, EUA; Génova, Italia e ir de regreso por la misma ruta.
✓ No se utiliza material que pueda caducar debido a los trámites para conseguirlo.		× Las papeletas después de todo este viaje, no es inusual que ya estén caducas.
✓ Se puede probar cualquier insecticida a cualquier concentración.		× Las papeletas no son viables para algunos compuestos.
✓ Los datos obtenidos son locales y por lo tanto tienen peso dentro de los programas de control del país.		× Son patrones globales que no tienen relevancia en los programas de control locales.

5.3.1.2. Técnicas bioquímicas para detección de resistencia

Los ensayos bioquímicos para mecanismos metabólicos son utilizados cuando se desea establecer el rol de las enzimas de resistencia de una manera rápida. Más de 30 ensayos pueden realizarse en un solo mosquito, esto es posible para probar algunos mecanismos de resistencia con repetición. Los ensayos de microplacas deben ser colorimétricos porque el análisis visual es necesario en los sitios de campo. Los modos de interpretar los dos tipos de mecanismos de resistencia (incremento en el metabolismo e insensibilidad del sitio de acción) son diferentes. La resistencia debido al incremento al metabolismo (detoxificación) es detectado por un incremento en el color de respuesta en un insecto resistente arriba del rango de valores para una población susceptible. Los microensayos de insensibilidad en el sitio de acción es la falta de un insecticida a una concentración particular para inhibir el sitio de acción de la enzima. Los métodos se pueden aplicar tanto a larvas como en adultos. Los niveles de enzimas pueden ser alterados drásticamente cuando los mosquitos son muertos bajo la presión de un producto

tóxico. En los ensayos bioquímicas se utilizan del mosquito la cabeza y el tórax, el abdomen servirá para las pruebas genéticas. El material se conserva a una temperatura de -70°C (Hemingway 1983; Hemingway *et al.* 1986; Hemingway *et al.* 1997).

5.3.1.2.1. Ensayo para acetilcolinesterasa alterada

Los organofosforados y carbamatos tienen como blanco a la acetilcolinesterasa (AChE). Esta hidroliza el neurotransmisor acetilcolina en la membrana post-sináptica. Alteraciones en AChE en insectos resistentes a estos tóxicos resultan en una sensibilidad decreciente para inhibir las enzimas de estos insectos. Solamente AChE1 parece estar involucrada en la resistencia. El ensayo para acetilcolinesterasa alterada, esta basado en la diferencia en la sensibilidad de la enzima al plaguicida resistente en comparación con el espécimen susceptible. El insecticida carbamato es generalmente utilizado como inhibidor, sin embargo, puede ser reemplazado por un análogo de un organofosforado bajo condiciones de laboratorio. En algunos ensayos, la enzima es preincubada con el insecticida antes de la adición del sustrato; en otros es incubado con el insecticida y el sustrato junto. La actividad de la enzima con el sustrato solo es determinada en los dos tipos de ensayo. Debe tenerse cuidado en la interpretación de los resultados si solamente un inhibidor es usado, como insensibilidad a carbamatos no es automáticamente implica insensibilidad a compuestos organofosforados y viceversa, al menos esto es general en el caso de mosquitos. Una variante de estos ensayos es usado en un laboratorio para la detección tentativa de la resistencia a compuestos organofosforados y carbamatos respectivamente de el mecanismo que involucra. El ensayo involucra pre-exposición del insecto al insecticida por un periodo fijo seguido de un análisis en microplaca buscando remanentes de la actividad de la acetilcolinesterasa (Brogdon and Barber, 1996).

5.3.1.2.2. Ensayo para actividad elevada de esterasas

Todas las esterasas actúan rápidamente atando y lentamente "envolviendo" al insecticida: secuestran a la molécula para luego rápidamente metabolizarlo. Un incremento en la actividad de las esterasas es un mecanismo común de resistencia, especialmente para los compuestos organofosforados. Este tipo de mecanismo puede ser detectado por filtros de las microplacas usando los sustratos generales α y β acetato naftil,

ya que su clasificación esta basada en sus preferencias por α ó β acetato naftil, además de su movilidad en los geles de policramina y su secuencia nucleótida. La superioridad de las esterasas en "atar" a los insecticidas en las cepas de insectos resistentes sugiere que esto ha sido positivo para que la presión de selección que ejercen los insecticidas mantenga elevado el número de alelos de las esterasas. Cuando se detecta actividad elevada de esteradas en algunos insectos resistentes como en el mosquito *Culex quinquefasciatus*, se le atribuye a la amplificación de genes, sin embargo los niveles altos de las esterasas no siempre son el resultado de amplificaciones, la expresión de α1 en *Cx. pipiens* se debe a un elemento regulador aun no identificado. Teniendo un nivel alto de esterasas también se puede proveer protección a otras enzimas importantes y el insecto se podrá defender con mayor efectividad contra otros insecticidas (Brogdon and Dickinson 1983; Bisset 1990).

5.3.1.2.3. Ensayos para actividad elevada de glutatión s-transferasa

Algunos tipos de resistencia a DDT y compuestos organofosforados están basados en glutatión s-transferasa. Las GSTs son enzimas multifuncionales que juegan un rol en la detoxificación de un gran rango de xenobióticos. Dos familias de insectos GST son reconocidos, y ambos parecen tener un rol en la resistencia de los insectos. En *Ae. aegypti* por lo menos dos GSTs están elevadas en insectos resistentes al DDT, mientras que en *An. gambie* un gran número de diferentes GSTs están elevadas, algunos son de clase I GSTs. La GST2 de *Ae. aegypti* esta sobre-expresado en todos sus tejidos excepto en los ovarios de los insectos resistentes. Donde este mecanismo se presenta, esta asociados con un incremento en la actividad del sustrato general: clorodinitrobenzeno (CDNB). Un ensayo con microplacas puede ser usado para detectar este mecanismo mediante la determinación de la cantidad de conjugación entre el glutatión reducido y el CDNB. La absorbancia que resulta este ensayo esta en el rango de color ultravioleta, hay que leerlo con filtros de 340 nm. En algunos insectos resistentes la sobre-expresión del gen GST es responsable de la producción de grandes cantidades de ésta enzima (Brogdon and Barber, 1996).

5.3.1.2.4. Ensayos para citocromo P450 monooxigenasas (P450s)

Las monooxigenasas son una familia de enzimas que se encuentran en muchos organismos incluyendo los insectos. Estas enzimas están involucradas en el metabolismo de xenobióticos y tienen un rol en los metabolismos endógenos. Las P450 ligan moléculas de oxigeno y reciben electrones de NAPH para introducir moléculas de oxigeno en el sustrato. La nomenclatura de la superfamilia P450 está basada en las secuencias del ácido amino homólogos, con todas las familias tienen el prefijo CYP seguido del número de familia, una letra para la subfamilia, y un número para el gen individual. Para los insectos P450s tienen asignados 6 familias, cinco son específicos para insectos, CYP4, tiene secuencia homologas con familias con otros organismos (Brogdon, 1989).

5.3.1.2.5. Comparación entre bioensayos y ensayos con microplacas

Los ensayos bioquímicos descritos arriba difieren ambos en la cantidad y calidad. El requerimiento mínimo es la habilidad para determinar si un mecanismo de resistencia está presente o no. Sin embargo hay que considerar que los costos entre los bioensayos y los ensayos con microplacas son diferentes pues hay que usar en el segundo químicos y aparatos costosos aun los bioensayos con papeletas son aun costosos pues hay que pedir este material a la WHO que además de caro para algunos personas, son muy difíciles cumplir con todos los tramites, además que en ocasiones ya las papeletas llegan caducas, aun la técnica de la botella tiene sus dificultades, si se lavan bien o no para que no tengan residuos de otros componentes, etc. Las pruebas bioquímicas son más capaces de detectar el nivel total de resistencia presente en una población tomando como base sólo una prueba (Brogdon and McAllister, 1998).