

## 1. INTRODUCCIÓN

El dengue representa en la actualidad una de las enfermedades más importantes transmitidas por mosquitos en México. La tendencia indica un incremento en muchos estados del País y la situación está empeorando debido a la circulación de los 4 serotipos, aunado a esto, la resistencia potencial del vector a los insecticidas. La resistencia a insecticidas de uso común tales como el malatión (adulticida) y temefos (larvicida) se ha incrementado en países Caribeños. En México se ha utilizado el mismo esquema de aplicación de insecticidas a partir de los 60's para el control de los vectores de paludismo y dengue e intensivamente a partir de los 80's (1978) cuando el dengue se reintrodujo a México y para antes de dos años ya había alcanzado incluso los estados del noreste de México (Méndez, 1992). Debido a lo anterior, podría suponerse que el uso intensivo de estos productos ha ejercido presión de selección en las poblaciones de *Aedes aegypti* y de esta manera se han seleccionado genes resistentes haciendo inefectivas las acciones de control.

La seriedad de la enfermedad transmitida por el mosquito *Ae. aegypti* es por la elevada tasa de letalidad ( % muertes en relación con % de enfermos) en la variante llamada dengue hemorrágico: desde 23.3% en 1994 hasta 2.4 % en 1999. Por otra parte, la situación que vive el estado de Veracruz es preocupante, ya que año tras año este estado reporta numerosos casos. Por ejemplo, para el año 2001 no fue la excepción, ya que ocupó el 1er lugar en casos de dengue clásico a nivel nacional con un total de 1975 (Boletín Epidemiológico, SSA, 2002).

Los programas de la Secretaria de Salud en México han utilizado, según las Normas Mexicanas, los siguientes insecticidas desde 1960, para el control de mosquitos tanto vectores de Paludismo como de Dengue: DDT en rociados residuales en paredes de viviendas, malationn en rociados espaciales de Ultra Bajo Volumen tanto para mosquitos del Dengue como del Paludismo; y , temefos o gránulos de Abate 1% en cuerpos de agua y recipientes domésticos para ambas especies larvarias de culícidos. Es obvio, que se ha ejercido una intensa presión de selección sobre estos vectores tanto por insecticidas utilizados en Salud Publica como por insecticidas dirigidos contra plagas agrícolas durante todo este tiempo. A pesar de que los programas de control de vectores de la SSA han cambiado en el ultimo año a piretroides solo para la fase adulta, hasta la fecha existe solo un reporte del estado de susceptibilidad de poblaciones larvarias del vector en Veracruz (Bobadilla, 2001) a insecticidas tales como malati6n, temefos, permetrina, cypermetrina y bifentrina. Sin embargo estudios sobre genética de resistencia del vector son nulos. Este trabajo representa el primer intento en detectar uno de los principales mecanismos que confieren resistencia al vector, específicamente a insecticidas organofosforados y carbamatos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Detección del gen de resistencia acetilcolinesterasa (ACE<sup>R</sup>) a insecticidas organofosforados y carbamatos en poblaciones adultas de *Aedes aegypti* del estado de Veracruz, México mediante la técnica de PCR.

### 2.2 Objetivos particulares

- 1) Detección del gen ACE<sup>R</sup> en poblaciones adultas de *Ae. aegypti* en 10 localidades del Estado de Veracruz.
- 2) Determinación de migración de genotipos resistentes en poblaciones de *Aedes aegypti* en el estado de Veracruz, México.

## 3. HIPÓTESIS

La Secretaria de Salud según las Normas Oficiales ha utilizado desde hace 20 años dos insecticidas para el control de larvas y adultos del mosquito transmisor. Abate 1% granular (temephos) como larvicida y malation 95% grado técnico para los mosquitos adultos (aplicados en rociados espaciales o Ultra Bajo Volumen-ULV). Ambos productos pertenecen al mismo grupo toxicológico: organofosforados. Considerando un uso tan prolongado e intensivo de estos dos insecticidas organofosforados, la posibilidad de poblaciones de *Aedes aegypti* con resistencia genética, son muy amplias.

## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Epidemiología del dengue

El Dengue es un Arbovirus de la familia Flaviviridae: esta representado por cuatro serotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 (CDC 1985). Su mecanismo de transmisión es por la picadura de mosquitos de la Familia Culicidae (que previamente se infectaron al picar a un individuo enfermo) y el hombre es su único reservorio conocido (excepcionalmente se infectan algunas especies de primates de América del sur. Aproximadamente después de 8-10 días de ser picado, el paciente presenta síntomas febriles e intenso dolor de músculos, articulaciones, cefaleas y dolor retroocular; todo esto lo lleva a la cama de ahí el nombre común de “Trancazo” o “Fiebre Quebrantahuesos”. Si los síntomas llegan solo hasta aquí esto se define como dengue clásico. El llamado Dengue Hemorrágico ocurre cuando el mismo paciente es infectado por segunda vez con cualquiera de los 4 serotipos, ya sea ese año o años después (Halstead 1977). Las manifestaciones son más dramáticas, pues a los síntomas del Dengue Clásico se añaden hemorragias de órganos internos, los sangrados por boca, recto y vagina se pueden presentar, esto es el prelude de un estado de coma o shock; y si el paciente no es tratado correctamente con suministro de plaquetas y electrolitos puede morir (OPS, 1994). La estacionalidad de esta enfermedad está asociada a la temporada de lluvias, usualmente el mayor porcentaje de todos los casos del estado de Veracruz se presentan en los meses de mayo-agosto. La llegada del invierno induce a los vectores a entrar en diapausa y la transmisión disminuye casi hasta reducirse. Por otra parte, el marco epidemiológico de la enfermedad esta favorecido por los hábitos domiciliarios del mosquito. Desde una preferencia por sangre humana hasta de 95% (Scout 1993), la presencia de recipientes domésticos dentro y fuera donde pone sus huevecillos:

bebederos de mascotas, plantas con agua, tambos de 200 litros, llantas usadas, floreros de panteones, y muchos más. Un factor importante en la epidemiología de la transmisión es la presencia de miles de estos criaderos en los suburbios de las ciudades, donde la población rural migra en busca de mejores condiciones de vida; pero por establecerse en asentamientos ilegales no cuenta con servicios públicos de agua y recolección de basura. Esta situación es muy común y los municipios del estado de Veracruz no son la excepción.

En la actualidad los virus del dengue de múltiples tipos son endémicos en muchos países tropicales. En Asia, los virus son altamente endémicos en la parte meridional de China y en Hainán, Viet Nam, Laos, Camboya, Tailandia, Myanmar, Bangladesh, la India, Pakistán, Sri Lanka, Indonesia, Filipinas, Malasia y Singapur; la endemidad es menor en Nueva Guinea, Nepal, Taiwán y gran parte de las islas del Pacífico. Desde 1981 han circulado en Queensland, norte de Australia, virus del dengue de varios tipos. Los cuatro serotipos son endémicos actualmente en África. En grandes áreas de África occidental los virus probablemente se transmiten en forma epizootica en monos. Desde 1977, en las Américas se ha observado la introducción la circulación sucesiva de los cuatro serotipos de virus en el Caribe y América Central y del Sur, y su extensión a Texas en 1980 y 1986. En la actualidad dos o más virus del dengue son endémicos o muestran periodicidad epidémica en México, casi todo el Caribe y América Central, Colombia, Bolivia, Ecuador, Perú, Venezuela, la Guayana Francesa, Guyana, Brasil y Paraguay. Las epidemias pueden surgir en cualquier sitio en que existan los vectores y se introduzca el virus, tanto en zonas urbanas como rurales (Benenson, 1997).

## World Distribution of Dengue - 2000

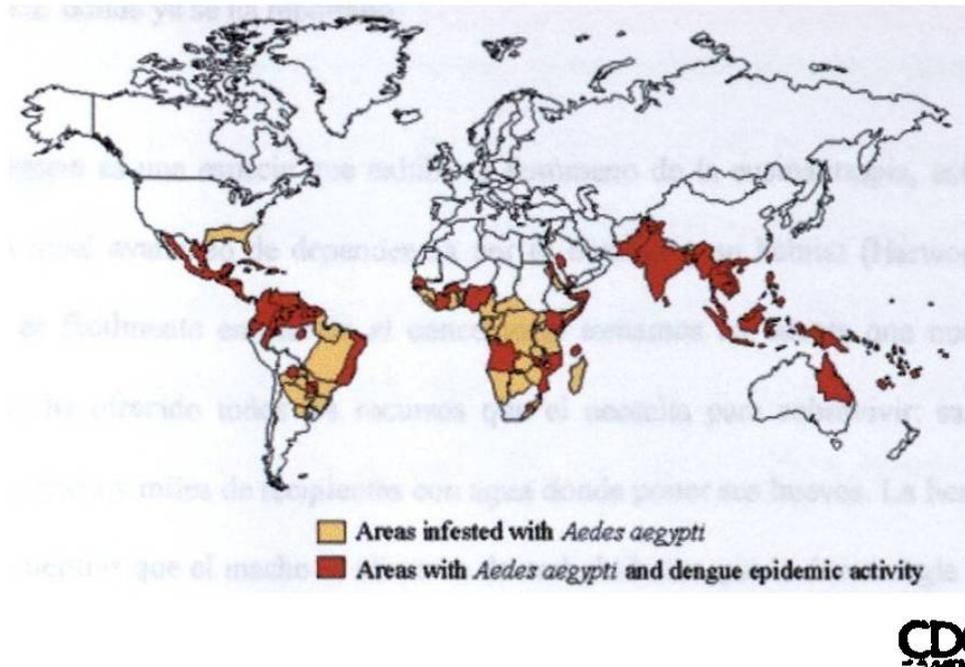


Figura 1. Distribución Mundial de *Aedes aegypti*

### 4.2 El vector del dengue

Aunque en el mundo hay varias especies de *Aedes* que transmiten el virus del Dengue, en México solo hay dos especies: *Aedes aegypti* y el recién llegado de Asia *Aedes albopictus*. Sin embargo, podemos atribuir 99% de todos los casos de Dengue a *Aedes aegypti*, pues este llegó probablemente en barriles con agua en los barcos españoles durante el siglo XVI (Fernández 1999), y se ha establecido en todas las regiones tropicales y templadas del Continente Americano. Mientras que *Aedes albopictus* fue detectado en el Puerto de Houston, Texas apenas en 1985; probablemente llegando en barcos con cargamentos de llantas usadas provenientes de Japón (Hawley 1998). Esta especie se

detectó desde 1988 en Matamoros, y hasta el año 2000 se conoce que ha iniciado su dispersión hacia otras regiones fronterizas de México (Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, y el norte de Veracruz). Hay sospechas que pueda entrar a Yucatán dada su cercanía con Cuba y Guatemala, donde ya se ha reportado.

*Aedes aegypti* es una especie que exhibe el fenómeno de la eusinantropia, esto se define como un nivel avanzado de dependencia por el hombre y su hábitat (Harwood y James, 1988); es fácilmente entendible el concepto si tomamos en cuenta que nuestra propia cultura le ha ofrecido todos los recursos que el necesita para sobrevivir: sangre humana en abundancia y miles de recipientes con agua donde poner sus huevos. La hembra es hematófaga, mientras que el macho se alimenta de carbohidratos que le dan energía para cumplir su función principal: copular. La sangre es requerida por la hembra para utilizar la proteína hemoglobina y transformarla en vitelo para sus 70-120 huevecillos que pondrá después de 4 días de haberse alimentado. Pero es esta hematofagia el factor fisiológico que favorece la transmisión de virus del Dengue. Se acepta que el virus dentro del mosquito necesita de 8-10 días para alcanzar las glándulas salivales, y por ende infligir picaduras infectivas (período extrínseco de incubación). Después de este tiempo, la hembra portará los virus toda su vida y será capaz de transmitirlos e infectar en cada ocasión que se alimente de otros seres humanos. En ocasiones que el mosquito es alejado por el huésped al intentar picarlo, este lo intentara de nuevo, ya que la hembra debe llenar su estomago pues tiene receptores de tensión que activarán las señales en su cerebro para iniciar la oogénesis; por lo tanto persiste y busca picar al mismo o diferente huésped (Clements, 1998). Este fenómeno se conoce como alimentación parcial múltiple, e incrementa el número de picaduras o casos de dengue potenciales. Dos hábitos más que hacen este vector un

excelente transmisor es su biorritmo de picadura, el cual es bimodal (Chadee, 1988), exhibiendo un pico de alimentación temprano en la mañana (7:00-9:00 horas am) y retomando mas picaduras después del crepúsculo (6:00-8:00 horas pm); ambos periodos sincronizados con el tiempo en que hay más actividad en las viviendas, escuelas y fabricas. Y finalmente, el mecanismo de alimentación llamado solenofagia; esto es la introducción precisa de la proboscis exactamente dentro de los vasos sanguíneos, igual que una jeringa hipodérmica; con elevadas probabilidades de inocular los virus. Indiscutiblemente *Aedes aegypti* es uno de los mosquitos con probada capacidad vectorial para transmitir virus, su abundancia en nuestras viviendas y las epidemias año tras año lo ratifican (Fernández, 1995).

### **4.3 Resistencia**

#### **4.3.1. Resistencia a insecticidas**

La FAO (1979) enmarca la resistencia como la capacidad desarrollada por una población determinada de insectos, al no ser afectada por la aplicación de insecticidas. Técnicamente se define a la resistencia como la habilidad complementaria y hereditaria propia de un individuo o conjunto de ellos, que los capacita fisiológica y etológicamente, para bloquear la acción tóxica de un insecticida por medio de mecanismos metabólicos y no metabólicos, y en consecuencia, sobrevivir la exposición de dosis que para otros seria letal (Lagunes y Villanueva,1995).

Los insecticidas juegan un papel central en el control de vectores de enfermedades tales como mosquitos, moscas, pulgas, piojos, chinches, etc. En 1955 la OMS propuso la erradicación global de una de las enfermedades más prevalecientes transmitidas por

vectores, la malaria, con el uso de rociados residuales intradomiciliarios de DDT. Sin embargo la euforia por los insecticidas terminó pronto y en 1976 la OMS revirtió su concepto de erradicación a control de la malaria. Los cambios en la política se debieron a la aparición de la resistencia al DDT en un gran número de mosquitos vectores. En 1975 la OMS reportó que una población de 256 millones de personas vivían en áreas donde la resistencia a DDT y/o los BHC (Bifenil Poli Clorinados) mermaron los esfuerzos para el control de la malaria. (Esto no incluyó a la región de África, en donde ocurren el 90% de los casos de Malaria y donde ya se había registrado resistencia de *Anopheles gambiae* al DDT, el principal vector de malaria.)

Los problemas de resistencia continuaron con la rotación a nuevos insecticidas, tales como los organofosforados, carbamatos y piretroides. Operacionalmente, muchos programas de control han cambiado de rociado residual dentro de las casas al uso focal de pabellones impregnados. Esta medida está limitada para los piretroides debido a su velocidad de matar y seguridad para la gente. En la actualidad la investigación se ha enfatizado en los mecanismos moleculares de la resistencia y su manejo racional, con la visión de controlar el desarrollo y la diseminación de poblaciones de vectores resistentes (Hemingway y Ranson 2000).

La resistencia se ha desarrollado a cada uno de los grupos toxicológicos insecticidas, incluyendo microbiales y reguladores del desarrollo de los insectos. Una detallada descripción práctica de resistencia a insecticidas podría permitir que las estrategias de control sean ajustadas imperando la excepción antes que la regla.

Se espera que la resistencia a insecticidas sea directamente afectada por la reemergencia de enfermedades infecciosas (Brogdon y McAllister 1998), y donde la resistencia no ha contribuido a la emergencia de enfermedades se espera que amenace el control de la enfermedad (WHO 1992). Sin embargo, un cuidadoso análisis de la información reciente acerca de resistencia de vectores (por ejemplo, la base de datos de la OMS y los registros de los programas de control de enfermedades) muestran que el efecto de la resistencia en los esfuerzos del control son aún desconocidos. Muchos reportes de resistencia de especies vectores están basados en un simple punto geográfico de un País y además información por años o décadas no actualizada. La investigación en cada problema de resistencia y su aplicación en el control de vectores no es práctica. Las medidas de control han sido seleccionadas para usarse, con frecuencia en momentos de emergencia. Aunque las alternativas para el control de vectores con insecticidas están disponibles, los problemas de resistencia a drogas (por eje. Malaria) o bien la disponibilidad o el costo de una vacuna (por eje. Encefalitis japonesa) hacen del control de vectores una opción importante (Krogstad 1996, Rodhain 1996). La reducción en la disponibilidad de insecticidas como resultado de resistencia se agrava por la eliminación del mercado de insecticidas no registrados para su uso en salud pública. Especialmente en la época pasada, el costo de mantener ciertos compuestos en el mercado fue más alto que el que se recuperaba por su uso. En suma a todo esto, el uso de insecticidas es también monitoreado y restringido por agencias reguladoras.

El número de poblaciones de insectos vectores resistentes es dependiente del volumen y frecuencia de aplicación de insecticidas utilizados para su control, además de las características inherentes de las especies involucradas. La mosca tse tse por ejemplo, fue

controlada de manera exitosa con rociados de DDT por muchos años, más sin embargo, nunca se desarrolló resistencia a este insecticida. Otro ejemplo de un insecto vector exhibiendo poca o nula resistencia a insecticidas es la chinche triatomina. En ambos casos podría explicarse en particular debido al ciclo de vida largo de las chinches y la producción de pocos juveniles de mosca tse tsé. En contraste, los mosquitos tienen todas las características requeridas para un rápido desarrollo de resistencia, incluyendo ciclos de vida corto y alta fecundidad (Hemingway y Ranson 2000).

#### **4.3.2 Mecanismos de Resistencia (Flores *et al*, FASPIN, 2001 en prensa)**

Los mecanismos de resistencia a insecticidas tienen una base bioquímica (Fig. 2). Las dos principales formas de resistencia bioquímica son: resistencia en el sitio blanco, la cual ocurre cuando el insecticida no se enlaza al sitio de acción y por otro lado las enzimas detoxificativas, las cuales ya sea por sus niveles elevados o modificación (esterasas, oxidasas o glutatión-transferasas (GST)) previenen que el insecticida alcance su sitio de acción. Un mecanismo adicional está basado en la respuesta térmica al estrés (Patil *et al* . 1996), pero aún no se ha determinado su importancia.

Los métodos bioquímicos y moleculares pueden detectar mecanismos de resistencia en insectos individualmente; por lo tanto, se puede confirmar la resistencia con el uso de pocos insectos. La identificación de mecanismos de resistencia ayuda a determinar el espectro de resistencia cruzada (Fig. 3), de esta manera facilita la elección de insecticidas alternativos, y permite el mapeo de áreas con poblaciones resistentes. Ensayos bioquímicos específicos se han desarrollado para todos los mecanismos de resistencia conocidos,

excepto los mecanismos modificados de receptores de sodio y GABA (Brogdon 1989, Brogdon y McAllister 1997).

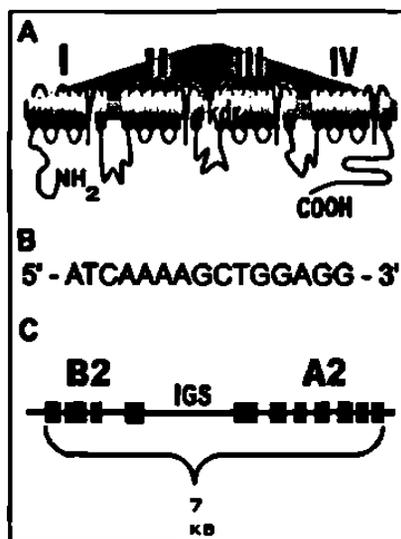


Fig. 2. Ejemplos de mecanismos de resistencia a nivel molecular. A. Una simple mutación en la región IIS6 del gene que confiere resistencia en el sitio blanco de acción de piretroides y DDT en *Anopheles gambiae*. El mismo codon mutado produce resistencia en insectos además de mosquitos, tales como cucarachas y moscas. B. Elemento regulatorio conocido como la "Barbie Box" que permite la inducción de genes de resistencia que codifican para oxidasas y esterasas detoxificativas. C. Amplición para Esterasas A2-B2. Más de 100 copias de este amplición podrían estar presentes en un simple mosquito. Este es un ejemplo de una familia de genes de esterasas amplificadas.

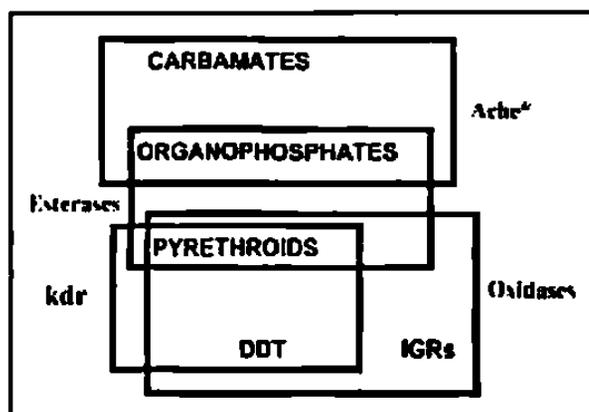


Fig. 3. Relaciones de resistencia cruzada de los diferentes grupos toxicológicos de insecticidas.

#### 4.3.3. Mecanismos de resistencia en el sitio blanco

La alteración de aminoácidos responsables para el anclaje del insecticida en un sitio específico ocasiona que sea menos efectivo o aún que no funcione. Por ejemplo, el blanco para los organofosforados y carbamatos es en sinapsis nerviosas colinérgicas, y el blanco para el DDT y piretroides sintéticos son los canales de sodio a nivel axónico. La resistencia cruzada entre DDT y piretroides puede producirse por un simple cambio en algún aminoácido (uno o ambos de los dos sitios conocidos) en el sitio de anclaje del insecticida en el canal sodio del axón (Miyazaki *et al* 1996, Williamson *et al* 1996). Esta resistencia cruzada parece producir un cambio en la curva de activación del transporte de sodio lo que ocasiona una baja sensibilidad a piretroides (Vais *et al* 1997). De manera similar, la resistencia a ciclodienos (dieltrin) es conferida por cambios en un simple nucleótido en el mismo codon del gen para receptores de Ace. Gama-aminobutírico (GABA) (Ffrench-Constant *et al* 1993). Se han identificado al menos cinco sitios mutados en el sitio de acción de la acetil-colinesterasa. Además se sabe que estos ocasionan una gradación en la sensibilidad a organofosforados y carbamatos.

#### 4.3.4. Mecanismos detoxificativos

Las enzimas responsables para la detoxificación de xenobióticos en los organismos son transcritas por miembros de gran número de familias multigene de esterasas, oxidasas y glutatión transferasas (GST). Quizás, el mecanismo de resistencia más común en insectos son diferentes niveles o actividad de esterasas detoxificativas que metabolizan (hidrolizan enlaces éster) un amplio rango de insecticidas. Estas comprenden seis familias proteicas pertenecientes a la superfamilia de las alfa/beta hidrolasas (Cygler *et al* 1993, Oakeshott *et al* 1993).

Las citocromo oxidasas P450 (también denominadas oxigenasas) metabolizan insecticidas a través de O-, S- e hidroxilación N-alkil, hidroxilaciones alifáticas y epoxidaciones, hidroxilaciones aromáticas, oxidación éster y oxidación nitrógeno y tio-éter (Wilkinson 1976). Las citocromo P450 pertenecen a una vasta superfamilia. De las 62 familias reconocidas de P450 en animales y plantas, al menos cuatro (familias 4, 6, 9,18) han sido aisladas de insectos. Las insecto-oxidasas P450 responsables de resistencia pertenecen a la familia 6, la cuál, como las esterasas, están presentes en Diptera como un grupo de genes (Maitra *et al* 1996). Los miembros del grupo se pueden expresar como alelos múltiples (arriba de 5) (Tomita *et al* 1995). Los niveles de oxidasas en insectos resistentes resultan de una sobre-expresión constitutiva más que amplificación (Tomita y Scout 1995, Carino *et al* 1994). Los mecanismos de sobreproducción de oxidasas en resistencia están bajo investigación y parecen ser resultado de factores cis- y trans-, asociados al fenómeno de inducción (Cohen *et al* 1994, Liu y scout 1997).

La mayoría de los organismos poseen múltiples GST de dos o más clases (Hayes y Pulford 1995). Por ejemplo, las GST implicadas en la resistencia al DDT están presentes como grupos de genes que han sido mezclados a través del genoma por recombinación (Zhou y Syvanen 1997). Se han caracterizado en vectores un número de genes resistentes, incluyendo múltiples formas en el mismo insecto.

#### **4.3.5 Resistencia a Reguladores de del desarrollo de Insectos (RDI), Ivermectinas y otros Agentes Microbiales.**

Los mecanismos iniciales que confirieron resistencia a los RDI estaban basados en oxidasas. La resistencia a las ivermectinas se debe a un sinnúmero de factores, incluyendo

la conjugación y alteración en el sitio blanco de acción (Clark 1995). Aunque los vectores no han demostrado aún resistencia en el campo.

Los agentes microbiales tales como *Bacillus sphaericus* y *B. thuringiensis* se consideran como insecticidas debido a que su agente activo son cristales tóxicos producidos por la bacteria. Los mecanismo de resistencia a *B. sphaericus* aún no están definidos (Rao *et al* 1995, Rodcharoen y Mulla 1996), pero parece que están involucrados múltiples mecanismos (Nielsen-Leroux *et al* 1997). La resistencia a *B. thuringiensis* es debido al reducido anclaje de la toxina en los peines del lumen del intestino medio de los insectos (Escriche *et al* 1995, Tabashnik *et al* 1996) o bien por la digestión de la toxina por proteasas (Séller *et al* 1996). Las 6 diferentes tipos de toxinas en *B.t.i.* usadas para el control de vectores se esperaba que retardaran o previnieran el desarrollo de mecanismos de resistencia, sin embargo, la resistencia a multitoxinas de *B.t.i.* ya ha aparecido (Tabashnik 1997, Cheong *et al* 1997).

#### 4.3.6 Resistencia y Control de Enfermedades

Para comprometer el control de vectores con el uso de insecticidas, el nivel de resistencia debería ser suficientemente alto para afectar adversamente la transmisión de la enfermedad. En muchos casos, el control de vectores podría no ser afectado por el nivel de resistencia. Por ejemplo, cierta actividad podría estar controlando solo el 75 % de la población del vector. Si, por ejemplo, el nivel de resistencia es más bajo del 10%, no afectaría los esfuerzos de control de la enfermedad, ante esta situación, debe incrementarse la vigilancia y el monitoreo de este fenómeno. El oeste de Kenya es un buen ejemplo operacional de coexistencia entre resistencia y control de enfermedades. La resistencia a

piretroides apareció rápidamente después de que se introdujeron pabellones impregnados (Rivet *et al* 1994). Después de dos años, el nivel de resistencia no había cambiado significativamente, posiblemente debido a la introducción masiva de genes susceptibles (Vullule *et al* 1996). Otras razones podrían explicar por que la presencia de genes de resistencia en vectores en una área control no significa que se está logrando un control efectivo. Por ejemplo, los genes de resistencia podrían no expresarse, o podrían expresarse en un estado alternativo de desarrollo del que está siendo controlado por el insecticida o el gen detectado podría ser miembro de una subfamilia de genes alternativos al que pudiera afectar el compuesto que está siendo usado.

#### **4.3.7 Manejo de poblaciones de vectores resistentes a insecticidas**

La práctica de utilizar un solo insecticida hasta la aparición de resistencia se convierte en un factor limitante que reduce rápidamente el número de insecticidas disponibles para el control de vectores. Rotaciones, mosaicos y mezclas de todos ellos han sido propuestas como herramientas para el manejo de la resistencia (Curtis 1985, Curtis *et al* 1993 y Roush 1989). Se han aplicado numerosos modelos matemáticos para estimar como estas herramientas podrían usarse de manera óptima (Tabashnik 1989). Sin embargo, estos modelos raramente se han probado bajo condiciones de campo en especial para insectos vectores, debido a las dificultades en estimar cambios en frecuencias de genes de resistencia en grandes muestras de insectos (Hemingway 1997). Con la ventaja de diferentes técnicas bioquímicas y moleculares para la estimación de frecuencia de genes de resistencia, las estrategias de manejo de resistencia en campo han llegado a ser más prácticas.

En México se ha hecho un intento a gran escala de usar rotaciones o mosaicos de insecticidas substituyendo el uso simple de DDT o de un piretroide específico (Hemingway *et al* 1997 y Penilla *et al* 1998). De esta manera se han monitoreado cambios en la frecuencia de genes de resistencia en *Anopheles albimanus* por cuatro años (Penilla *et al* 1998). Estos resultados podrían ayudar a establecer de manera racional estrategias a largo plazo del uso de insecticidas en los programas de control de enfermedades.

#### 4.3.8 Perspectivas para el manejo de la resistencia

La resistencia a los insecticidas en insectos vectores de enfermedades, aún a los piretroides, es generalizada. Con la disponibilidad de técnicas de monitoreo más fáciles y sensibles (Brogdon y McAllister 1998, Brogdon y Barber 1990, Brogdon y Barber 1990) el manejo de la resistencia estaría al alcance. Uno de los retos en el manejo de la resistencia es que los esfuerzos por controlar las enfermedades transmitidas por vectores están siendo más diversificados. El caso de la malaria es un ejemplo. En los años 50's, la OMS montó un esfuerzo global por erradicar la Malaria. La falla principal de esto fue causada por muchos factores, incluyendo resistencia del vector. Ahora el mejor prospecto de una estrategia global para el control de la malaria parece ser el uso de pabellones impregnados, debido a que son menos costosos que rociar paredes completas con un insecticida residual, son efectivos en reducción de mortalidad infantil y pueden ser manejados a través de un programa comunitario horizontal (Lengeler y Show 1996). Este tipo de control significa que el monitoreo de resistencia podría ser manejado e interpretado localmente.

#### 4.3.9 Prioridades para el futuro

El incremento en la diversidad de medidas de control de vectores podría requerir de desarrollo de métodos simples y continuos. Ahora bien, las preguntas que surgirían aquí serían: 1) ¿Como podrían los métodos bioquímicos y moleculares equipararse con las simples técnicas de bioensayo?, 2. ¿Como podrían simplificarse estos métodos para el personal poco entrenado que intente usarlos? Inicialmente la detección de la resistencia y el monitoreo en el campo podría continuarse basado en simples bioensayos y posteriormente con pruebas bioquímicas y herramientas moleculares. El entendimiento más profundo de cómo la resistencia se eleva y se mantiene por si misma en poblaciones requiere definitivamente de estudios genético-moleculares.

El conocimiento más completo de los mecanismos de resistencia a insecticidas en vectores de enfermedades procede de estudios con mosquitos. En el caso de otros vectores tales como triatominos, piojos, pulgas, garrapatas, etc., poco ha sido el seguimiento y vigilancia que se les ha dado. Lo más importante es que la detección de resistencia debe ser una parte integral de todos los programas de control. Los recursos para el control de vectores, aún bajo situaciones de emergencia son muy limitados en muchos Países, por lo que deben ser usados de la manera más efectiva como sea posible.

#### 4.4 Resistencia en Mosquitos

Los principales géneros son *Culex* vector de filariasis y Encefalitis Japonesa, *Aedes* de Dengue y Dengue hemorrágico y *Anopheles* de malaria. El rango de distribución de

malatión, pirifos metil y clorpirifos ; y al carbamato propoxur en 3 poblaciones de *Aedes aegypti* de los estados de Falcon y Aragua, Venezuela. En estos estados la resistencia fue baja (< 5 veces) para los anteriores excepto para clorpirifos el cual presentó una resistencia moderada (7 veces) y las pruebas bioquímicas demostraron la presencia elevada de esterases a pesar de que la acetilcolinesterasa insensible no estaba involucrada en la resistencia de estos insecticidas.

Interesantemente, Wirth y Georghiou (1999), quienes reportaron resistencia a malatión en *Ae. aegypti* en las Islas Virgenes, también encontraron altos niveles de resistencia a piretroides. Esto llama la atención debido a que en el año 2001, el programa Nacional de Control de vectores en México, en su nueva regulación establece el reemplazo de malatión por piretroides tales como permetrina, cyflutrina y bifentrina.

Una historia similar para el control de *Ae. aegypti* se encuentra en las islas Caribeñas de Trinidad y Tobago donde *Ae. aegypti* posee una atención especial en el área de Salud y donde el dengue 1, 2 y 4 son endémicos (Nathan y Knudsen 1991). El control de *Ae. aegypti* está basado en participación comunitaria, en la eliminación de contenedores de agua que sirven de sitios de cría, esto con un éxito variable. En Trinidad, gránulos de temefos al 1% son aplicados para el control de larvas en contenedores donde se almacena agua, mientras que el malatión se usa en aplicaciones ULV en periodos de alta prevalencia del mosquito y/o de casos de dengue. La resistencia a organofosforados ha sido detectada a bajos niveles en poblaciones de Trinidad, afectando tanto a estadios larvales como adultos (Rawlings y Wang 1995). En Santiago de Cuba mediante pruebas bioquímicas para la detección de los mecanismos de resistencia mediado por enzimas esterases, glutatió-n-s-

transferasas (GST) y acetilcolinesterasas, (AChE) en *Aedes aegypti* se demostró que las enzimas esterasas y GST intervienen en la resistencia a insecticidas, no resultando así para la AChE (Rodríguez *et al* 1999).

Poblaciones del mosquito *Culex pipiens* también se ha reconocido como resistentes al temefos en África a través de producir esterasas A2-B2 y A4-B4 (Ben Chiek y Pasteur, 1993). En la india, Raghavendra y cols. (1992) reportaron resistencia diferencial contra el malation en 2 subespecies de *Anopheles culicifacies*, vector de malaria. Esto fue investigado para explicar porque las densidades de estos vectores se incrementaban a pesar de los rociados con malation. En relación con estudios de resistencia utilizando métodos moleculares, estos son escasos y se ha escogido el modelo de *Culex pipiens*, mosquito común de las casas, como indicador de genes de resistencia. Así, Severini y cols. (1994) logró identificar con RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphism) un gen que codificó para esterasas B en un locus de DNA de *Culex pipiens* en Italia. Y otro grupo, en África occidental (Chandre y cols., 1997) mapeo la distribución geográfica de un gen (Ace<sup>R</sup>) de resistencia con el papel de hacer el vector insensible a la acetilcolinesterasa. En Cuba se presume que por primera vez en *Aedes aegypti* se encontró la presencia del gen AChE, aunque a baja frecuencia, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida se observó una banda fuertemente teñida con un valor de movilidad relativa de 0.779, la cual se nombro A4 (Rodríguez *et al* 1999), Bisset y cols (1999) determinaron la presencia de 3 fenotipos de esterasas B1, A6 y B6 las cuales aparecen como mecanismo de resistencia a *Culex quinquefasciatus* en Cuba. Evidentemente, no existe a la fecha un estudio que muestre la frecuencia y distribución de genes de resistencia con potencial como marcadores moleculares para insecticidas, se tiene referencia del diseño de técnicas para determinar

de mecanismos de detoxificación por enzimas esterasas elevadas y AchE modificada donde al parecer, la AchE alterada confiere un mayor valor adaptativo (Dieguez *et al*, 1999).

La resistencia a piretroides está surgiendo a pesar del optimismo que causó debido a su acción tóxica rápida y por ser uno de los grupos insecticidas más nuevos, por estas razones, se pensaba que no produciría resistencia en un lapso corto de tiempo (Malcom 1988). La resistencia a piretroides no se está presentando a través de un mecanismo único; en Guatemala, la resistencia a piretroides fue primeramente reportada en poblaciones de *Anopheles albimanus* resistentes a fenitrotión. Cuando se utilizó la deltametrina, las esterasas involucradas en resistencia a fenitrotión fueron estimuladas por presión de selección a producir resistencia cruzada a deltametrina (Brogdon y Barber 1990). En suma, se ha encontrado que la resistencia cruzada a DDT-permetrina es debida a oxidasas en el mismo mosquito. Un patrón similar de resistencia cruzada ha sido documentado para *Cx. pipiens* en Ohio. En un estudio de selección de una cepa de *Culex quinquefasciatus* resistente a lambdacialotrina en Santiago, Cuba se observó baja o ninguna resistencia cruzada a otros piretroides (deltametrina y cipermetrina), a un carbamato (propoxur) y a los insecticidas organofosforados (clorpirifos y metil-pirifos), sin embargo, se observó una alta resistencia cruzada a malatión (Rodríguez *et al* 1998); en otra localidad de Cuba (Camaguey) se estudiaron los niveles de resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides y se observó que después de 6 años de haber sido suspendida la aplicación de malation, aún se mantiene la resistencia a este químico, a la vez que hay resistencia cruzada a propoxur y el comienzo del desarrollo de mecanismos de detoxificación para deltametrina (Dieguez, *et al* 1999). Mecanismos de resistencia múltiple (dos o más mecanismos de resistencia en el mismo mosquito) está siendo utilizado en los

programas de control de vectores, haciendo una rotación secuencial de un químico de cierto grupo toxicológico alternado con otro de otro grupo.

El mecanismo más común de resistencia a piretroides es en el sitio blanco (resistencia knockdown). Este mecanismo ha sido detectado para *Ae. aegypti* en Puerto Rico e Indonesia además para el vector de encefalitis equina *Cx. quinquefasciatus* en Louisiana. Investigadores Franceses han detectado este mecanismo en *An. gambiae*, principal vector de malaria en África, esto en algunos países del oeste de África (Elissa *et al* 1993, Martínez Torres *et al* 1998). Este mecanismo de resistencia está relacionado con la similitud en el sitio de acción de piretroides y DDT.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Área de estudio.**

#### **5.1.1 Localización**

El Estado de Veracruz, México, se encuentra localizado en el Golfo de México; sus coordenadas geograficas extremas son: al norte 22°28', al sur 17°09' de latitud norte; al este 93°36', al oeste 98°39' de longitud oeste. El estado de Veracruz representa el 3.7% de la superficie del país. Este estado colinda al norte con Tamaulipas y el Golfo de México; al este con el Golfo de México, Tabasco y Chiapas; al sur con Chiapas y Oaxaca; al oeste con Puebla, Hidalgo y San Luis Potosí (Fig.4).

#### **5.1.2 Características**

##### **5.1.2.1 Demográficas.**

El estado de Veracruz cuenta con una población de 6,901,111 habitantes, de los cuales el 33.9 % son menores de 15 años y el 59.9 % son de 15- 64 años de edad.



**Fig.4 . Mapa del Estado de Veracruz, donde se ilustran las localidades de colecta.**

### **5.1.2.2 Fisiografía**

**El Estado de Veracruz abarca áreas que corresponden a siete provincias o regiones fisiográficas del país: Provincia de la Llanura Costera del Golfo, Provincia de la Sierra Madre Oriental, Provincia del Eje Neovolcánico, Provincia de la Sierra Madre del Sur,**

Provincia de la Llanura Costera del Golfo Sur, Provincia de la Cordillera Centroamericana y Provincias de las Sierras de Chiapas y Guatemala (Fig. 5).



Figura 5. Fisiografía del Estado de Veracruz

### 5.1.2.3 Climas

La ubicación geográfica de Veracruz le confiere características tropicales, pero éstas son modificadas en parte por la influencia de las serranías, fundamentalmente en el centro-

oeste. Como consecuencia de lo anterior, los climas se distribuyen paralelos a la costa, en dirección noroeste-sureste, de la siguiente manera: cálidos, semicálidos, templados, semifríos, fríos y semisecos, en los cuales predominan las lluvias de verano (Fig. 6)



Figura 6. Zonas climáticas del Estado de Veracruz

### 5.1.2.3.1 Climas cálidos húmedos y subhúmedos

Son los que comprenden una mayor área, aproximadamente un 80% de territorio veracruzano, se distribuyen en las Llanuras Costeras del Golfo Norte y del Golfo Sur, a una altitud máxima de 1,000 m. En estas regiones, la temperatura del mes más frío es superior a 18° C y la media anual mayor de 22°C.

#### **5.1.2.3.2 Climas semicálidos húmedos**

La zona más extensa con este clima, cuyas lluvias se distribuyen durante todo el año, abarca de Zontecomatlán (en la Huasteca) y algunas áreas del estado de Hidalgo, a Tlapacoya, Jalapa y Orizaba. Este clima constituye la transición de los cálidos a los templados.

#### **5.1.2.3.3 Climas Templados**

Se registran en las zonas con altitud entre 1,600 y 2,800 m. Las zonas con estas características se ubican al occidente de las semicálidas húmedas, por Huayacocotla, Villa Aldama y Ayahuatlulco. La temperatura media anual oscila de 12 a 18°C y la precipitación total anual de 500 a 2,500 mm.

#### **5.1.2.3.4 Climas semifrío y frío**

Se distribuye entre los 2 800 y 3 800 m.s.n.m. en el Cofre de Perote y el Pico de Orizaba. La temperatura media y la precipitación total anual fluctúan de 5 a 12°C y de 600 a 1,200 mm, respectivamente.

#### **5.1.2.3.5 Clima semiseco**

La presencia de áreas con clima semiseco templado con lluvias en verano en los alrededores de la ciudad de Perote y al oeste de la Huasteca, obedece al obstáculo que forman las elevaciones del Eje Neovolcánico y la Sierra Madre Oriental, las cuales no permiten la llegada de los vientos húmedos con igual intensidad, provocando con esto que

la precipitación total anual sea entre 400 y 500 mm, cantidad mucho menor que la que cae en los volcanes de los Tuxtlas. En dichas zonas la temperatura media anual es de 14°C.

#### **5.1.2.4 Hidrología**

Todas las corrientes que surcan el territorio de Veracruz, con excepción de los pequeños arroyos localizados en la ladera occidental del Cofre de Perote, pertenecen a la vertiente del Golfo de México. Por lo que respecta a los almacenamientos superficiales de agua dulce sólo la Laguna de Catemaco es importante. El potencial acuífero subterráneo de Veracruz está íntimamente relacionado con la porosidad y permeabilidad de los suelos y rocas presentes (Fig. 7).

##### **5.1.2.4.1 Aguas Superficiales**

###### **5.1.2.4.1.1 Región Hidrológica "Río Pánuco"**

Por la extensión que abarca es una de las más importantes del país, ocupa el cuarto lugar. La parte que le corresponde a Veracruz se localiza en el norte e incluye una amplia zona del distrito de riego "Río Pánuco-Las Ánimas-Chicayan-Pujol Coy". Asimismo, dentro del estado comprende parte de las cuencas "Río Pánuco", "Río Tamesí" y "Río Moctezuma".



La laguna de Tamiahua, una de las más grandes de la República Mexicana, se une con el río Pánuco a través de los canales Chijol, Calabozo, Wilson y laguna de Tampico Alto.

**5.1.2.4.1.3    Región                    Hidrológica**  
**"Papaloapan"**

Esta región abarca gran parte de la porción centro-sur de Veracruz, las corrientes que la integran tienen una disposición radial y paralela, controlada por algunas elevaciones de la Sierra Madre Oriental y el Eje Neovolcánico (el Cofre del Perote y el Pico de Orizaba). Las cuencas que la conforman son: "Papaloapan" y "Jamapa".

**5.1.2.4.1.4    Región                    Hidrológica**  
**"Coatzacoalcos"**

Corresponde a lo que geográficamente podría llamarse vertiente del golfo de la zona istmica, parte de la cual comprende el sur de Veracruz.

La región comprende parte de las cuencas "Tonalá-Lagunas del Carmen-Machona" y "Coatzacoalcos".

**5.1.2.4.1.5.   Región    Hidrológica    "Río**  
**Balsas"**

Ocupa una superficie mínima de la cuenca Atoyac, por el rumbo del Cofre de Perote.

#### **5.1.2.4.2 Aguas Subterráneas**

Las unidades de roca con posibilidades altas de almacenar agua subterránea susceptible de aprovecharse, están ubicadas al occidente del puerto de Veracruz e integrada en mayor proporción por conglomerados medianamente consolidados del Terciario. No obstante, el recurso ha sido utilizado de manera constante, provocando una sobreexplotación del acuífero.

#### **5.1.2.4.3 Zonas de Veda**

Desde 1976 opera en diversos lugares de Veracruz la veda elástica o parcial para la explotación de las aguas del subsuelo. Por ejemplo: las zonas de Alvarado, Oriental, Cuenca del Río Guayalejo, Minatitlán, Pueblo Viejo, entre otras

#### **5.1.2.5 Vegetación**

Dentro de los tipos de vegetación que se desarrollan en el estado, en orden decreciente de abundancia, se encuentran: selvas alta perennifolia, baja caducifolia y mediana subperennifolia; bosque mesófilo, manglar, sabana, bosques de pino-encino, de encino-pino y de pino; tular, palmar, popal, vegetación de dunas costeras y matorral con izotes (Fig. 8)

##### **5.1.2.5.1 Selvas**

En su conjunto, son las comunidades vegetales más abundantes en el estado. La selva alta perennifolia se localiza en partes de las sierras y de las planicies. Los suelos sobre

los que crece esta comunidad son diversos, pero en general sus horizontes superiores son ricos en materia orgánica.

Las comunidades primarias alcanzan una altura de 25 hasta 40 metro, están constituidas predominantemente por árboles siempre verdes.

Otra característica de estas selvas es la gran variedad de formas vegetales, ya que son frecuentes las epífitas, trepadoras leñosas, líquenes y palmas de diferentes tipos y herbáceas de grandes hojas.

La selva mediana subperennifolia se localiza en dos zonas del estado: una al norte de Tamiahua y sur de Tuxpan, conformada por vegetación secundaria; y la otra al sur de Córdoba, en los límites con Oaxaca. Se encuentra en climas semicálido húmedo con lluvias todo el año y semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano. Los suelos que sostienen esta selva son los acrisoles.

La selva baja caducifolia se localiza en el centro del estado, entre Jalapa y Alvarado y de las cercanías de Córdoba hasta la ciudad de Veracruz. Se desarrollan bajo clima cálido subhúmedo con lluvias en verano. Los suelos que la sostienen son de varios tipos, predominando los arcillosos, como vertisoles o feozems, y de poca profundidad.

#### **5.1.2.5.2 Bosques**

Los bosques, tanto de coníferas como mesófilo de montaña y algunos encinares, se localizan en dos porciones del estado: una en los límites con Hidalgo, en la subprovincia del Carso Huasteco; y la otra, mayor, en la parte central del estado, dentro de la provincia del Eje Neovolcánico.

El bosque mesófilo de montaña se encuentra en climas semicálido subhúmedo y templado húmedo con lluvias de verano, cuya precipitación total anual fluctúa entre 1 500 y 2 000 mm. Los suelos que la sustentan son los andosoles, derivados de cenizas volcánicas, de color negro; y los luvisoles, rojos y arcillosos.

Su composición florística es diversa, pero existen especies que son frecuentes, y en varios lugares tienden a dominar, como ocozote, mano de león, entre otras; y algunas especies de pino.

En la zona de los Tuxtlas hay comunidades muy particulares como los bosques de baja estatura (de 8 a 12 m) en las cimas del volcán San Martín y del Santa Marta.

Otro tipo de bosques de menor complejidad estructural y florística son los mixtos, en su mayoría de pino-encino, con alturas de 10 a 25 metros. También existen algunas áreas de bosque de pino y de oyamel en el Pico de Orizaba y el Cofre de Perote.

#### **5.1.2.5.3 Otros tipos de vegetación**

El manglar es una vegetación característica de las costas cálidas de México, se localiza en forma de manchones a todo lo largo de la costa veracruzana, sobre suelos inundables, generalmente salinos, anaerobios y muy ricos en materia orgánica. Alcanza de 3 a 8 m de alto.

La sabana es una comunidad formada por extensos pastizales con algunos árboles dispersos. Se desarrolla sobre terrenos planos con drenaje deficiente, por lo que en cierta

época del año se inunda. Se encuentra en forma de manchones dispersos entre el puerto de Veracruz y Lerdo de Tejada y al sureste de Acayucan, cerca del poblado Santa Isabel.

Otros tipos de vegetación son el tular, vegetación acuática dominada por plantas de 1 a 3 m de alto, de hojas angostas y alargadas, que se desarrollan en las cercanías de Coatzacoalcos sobre la llanura de inundación; el palmar, constituido por palma real o palma redonda, y el popal, también vegetación acuática.

#### **5.1.2.6 Agricultura**

Veracruz es uno de los estados que mayor aporte hace al sector agropecuario del país. Su producción es alta y variada, ligada principalmente al temporal. Ocupa un lugar destacado por el número que genera de productos básicos, entre ellos arroz, chile verde, haba y papa; de frutales, naranja, plátano y mango; y de productos industrializables como caña de azúcar y tabaco.

La agricultura de temporal es la dominante, su producción se consigue al sembrar en ciclos cortos (especialmente el de primavera-verano). Los cultivos principales en este tipo agrícola son: maíz, frijol, sorgo, arroz palay, café oro, naranja, mango, plátano, piña, limón agrio, mandarina, papaya, toronja, ciruela de almendra y coco fruta, además de tabaco, hule hevea, vainilla, chile verde, papa y sandía.

La alta productividad de la agricultura de temporal se debe, primeramente, a la buena precipitación y a que los suelos en llanuras, lomeríos y valles cuentan con las condiciones apropiadas para el buen desarrollo de los cultivos. Los suelos, en su mayoría,

tienen buena profundidad y carecen de obstrucciones superficiales. La fertilidad de los mismos es de moderada a alta.

La agricultura de riego no ha alcanzado una importancia significativa en el estado, debido primordialmente a las buenas condiciones del temporal, que permiten obtener altas producciones con inversiones bajas. Esta se concentra en los distritos de riego río Blanco, Actopan, río Pánuco y la Antigua, ubicados en las provincias fisiográficas denominadas Llanura Costera del Golfo Norte y del Golfo Sur; así como en pequeñas unidades dispersas por todo el estado.

Los suelos en que se realiza son profundos, sin limitantes superficiales o internas que obstruyan el laboreo con maquinaria agrícola. La fertilidad es buena. La variedad de cultivos es poca: caña de azúcar, maíz, arroz palay y papaya.

El pastizal cultivado se desarrolla por todo el territorio, pero fundamentalmente en la Llanura Costera del Golfo Norte. Las especies que se siembran frecuentemente son: estrella africana, guinea o privilegio, pangola y jaragua.

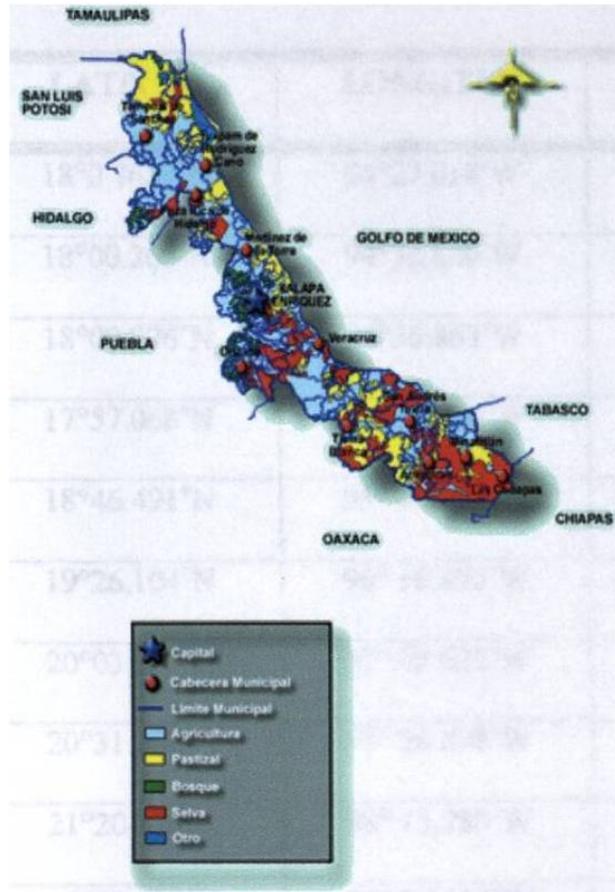


Figura 8. Principales tipos de vegetación del Estado de Veracruz

### 5.1.3 Localidades de colecta

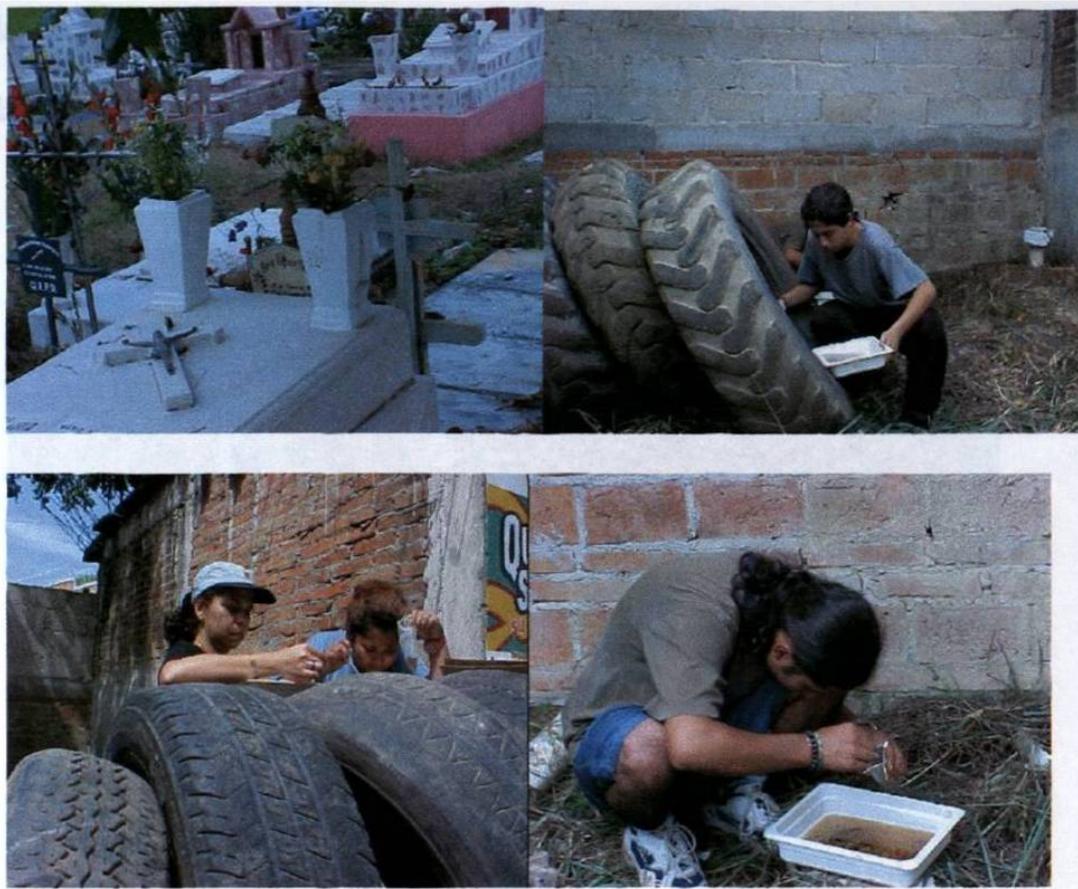
Las localidades muestreadas en este estado fueron las siguientes: Coatzacoalcos, Minatitlán, Cosoleacaque, Acayucan, Alvarado, Cempoala, Martínez de la Torre, Poza Rica, Tantoyuca y Panuco (Cuadro 1, Fig.4)

Cuadro 1. Coordenadas geograficas y altitud de las localidades a muestrear en el estado de Veracruz, México.

<b>LOCALIDAD</b>	<b>LATITUD</b>	<b>LONGITUD</b>	<b>msnm</b>
Coatzacoalcos	18°0.7683'N	94°27.018'W	52
Minatitlán	18°00.265'N	94°32.820'W	11
Cosoleacaque	18°00.276'N	94°36.863'W	49
Acayucan	17°57.068'N	94 °53.888'W	90
Alvarado	18°46.491'N	95° 45.795'W	20
Cempoala	19°26.104'N	96° 16.876'W	34
Martínez de la Torre	20°03.947'N	97° 03.622'W	65
Poza Rica	20°31.102'N	97° 26.898'W	79
Tantoyuca	21°20.276'N	98° 13.280'W	149
Pánuco	22°02.507'N	98° 10.937'W	22

## 5.2 Obtención de material biológico

Se seleccionaron 10 localidades del norte al sur del Estado de Veracruz., Las larvas se obtuvieron en criaderos conocidos donde el vector se reproduce: tambos de 200 litros, floreros de tumbas de panteón, llantas usadas en vulcanizadoras y cacharros en general. El material colectado fue llevado al laboratorio de Entomología Médica de la FCB-UANL, para su reproducción en el insectario (Fig. 9).



**Fig.9. Sitios de colecta de larvas de *Ae. aegypti* en diferentes localidades del Estado de Veracruz.**

### **5.3. Manejo de material biológico**

Las larvas se colocaron en charolas plásticas de 30X10cm, éstas fueron alimentadas con alimento balanceado para perros y Agar cerebro- Corazón en una mezcla finamente molida. Las pupas eran transferidas en vasos de 250 ml de capacidad y eran colocados en jaulas de cría de 30X30 cm. Los mosquitos adultos se alimentaron con agua y 10% de miel en algodones impregnados. Se ofreció a las hembras *Aedes* sangre de conejo para la producción de huevecillos. Se mantuvo una colonia representativa para cada una de las

localidades muestreadas. Las colonias se mantuvieron bajo condiciones de temperatura y humedad controladas ( $24\pm 2$  °C y 70% HR) (Fig. 10).



Fig. 10. Cría y mantenimiento de colonias de *Ae. aegypti* en insectario

#### 5.4 Extracción de DNA

Se extrajo el DNA de 100 mosquitos adultos hembras (de forma individual) para cada una de las localidades utilizando el método de extracción de sales de Cohen *et al* (1982). Este método consiste en lo siguiente: se coloca un mosquito en cada tubo eppendorf de 1.5 ml, se le agrega 25  $\mu$ l de buffer de maceramiento (buffer de maceramiento: NaCl 0.1, Sacarosa 0.2M, Tris HCl 0.1 M pH 9.1, EDTA 0.05M, SDS 0.05%). Se macera cada mosquito con un pistilo estéril hasta que no se vean partes del insecto. Se lava el pistilo con 25  $\mu$ l de buffer de maceramiento sobre la muestra en el tubo (el pistilo usado se coloca en una solución de HCl 1 M para lavar y esterilizar). Se homogeniza brevemente en un vortex (1 minuto aproximadamente), después de esto se incuban los tubos conteniendo el homogenato a 65°C por 30 minutos para desnaturalizar las proteínas, pasado este tiempo se adiciona a cada tubo aún caliente, 7  $\mu$ l de KAc 8M mezclando con golpes suaves. Enseguida

se incuba en hielo por un mínimo de 30 minutos para que el SDS precipite. Se centrifuga inmediatamente por 15 minutos a 14000-16000 xg y se transfiere el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril cuidando de que no lleve partículas de SDS. A este sobrenadante se le agregan 100 µl de etanol al 100% y se incuba en hielo durante 5 minutos para precipitar los ácidos nucleicos pasado este tiempo se colocan en la microcentrífuga y se centrifugan a 14000-16000 xg por 15 minutos. El paso siguiente es remover cuidadosamente el etanol y añadir 100 µl de etanol al 70 %, se centrifuga nuevamente por 15 minutos y se vuelve a remover el etanol una vez finalizado esto el pellet de DNA permanece en el tubo. El pellet se deja secar a temperatura ambiente y se resuspende en 100 µl de TE (Tris-HCl 1 M pH 7.5, 0.5 M EDTA pH 8.0) (Black y Detau, 1997).

#### **5.4.1 Calidad del DNA aislado**

Se mezclan 5 µl de DNA con 5 µl de Loading buffer para DNA (TBE 1X, azul de bromofenol y xylanocianol), ya mezclado se coloca en la ranura de un gel de agarosa (0.4 g de agarosa en 50 ml de TBE 1X) y se deja correr a un voltaje constante de 100 volts hasta que el azul de bromofenol corra hasta el final del gel.

#### **5.5 Técnica de PCR**

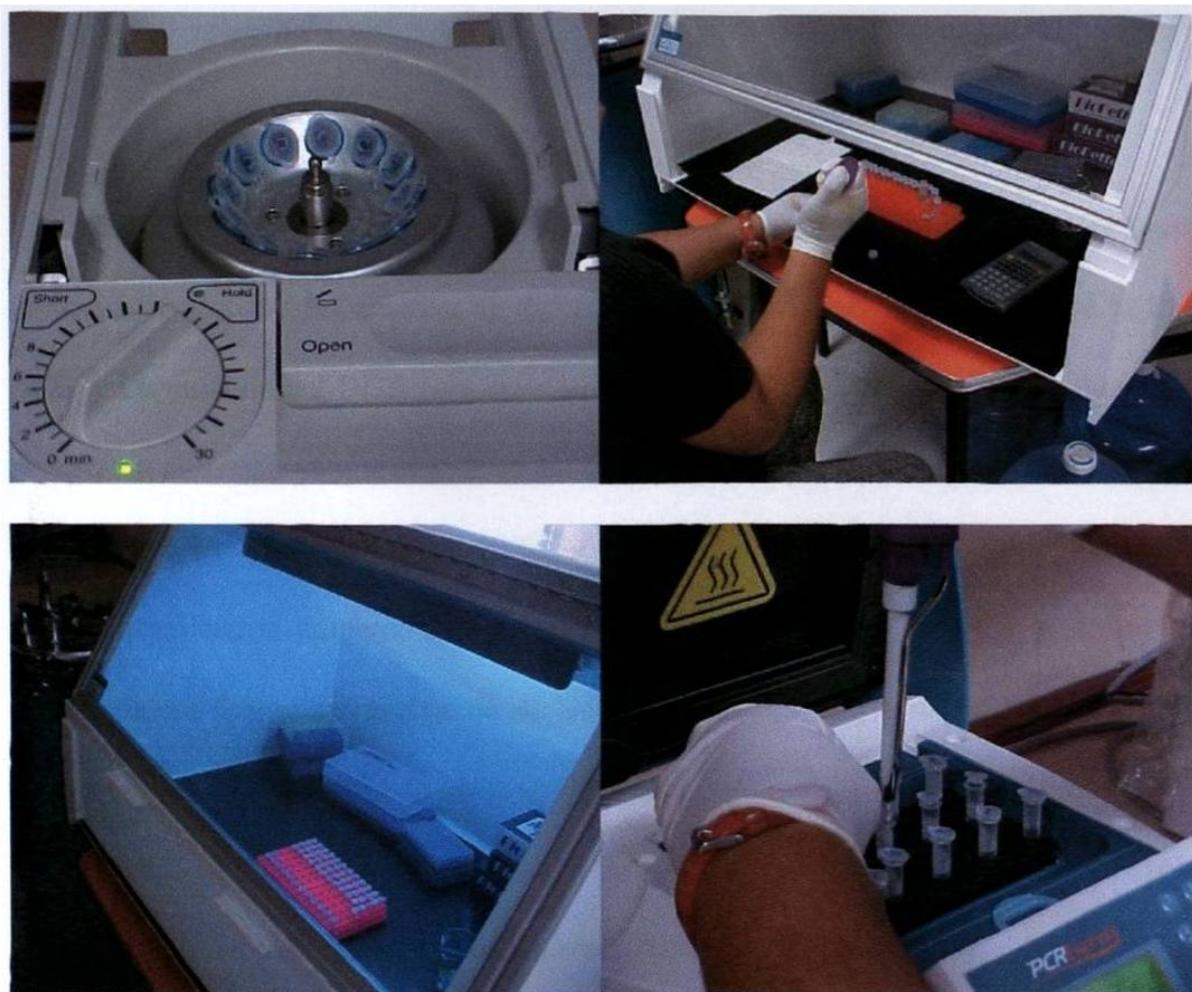
Los iniciadores o primers para los genes de resistencia que se monitorearon fueron donados por University of Colorado State, USA; estos ya están secuenciados y van dirigidos a localizar locus de acetil-colinesterasa mutada, siendo este un mecanismo de

resistencia para organofosforados y carbamatos. Para la reacción de PCR se utilizó un templado de DNA donde se agregaran los primers para cada uno de los genes de resistencia especificados. Para la amplificación del DNA por PCR se empleará el método descrito por Gorrochotegui y cols (2000), el cual consistió en lo siguiente se prepara la mezcla de reacción (dNTPs 20 mM, Buffer 10X, 500 p mol de cada primer, ddH<sub>2</sub>O) se colocan 48 µl de esta mezcla en un tubo de 0.5 ml, se exponen los tubos conteniendo la mezcla a luz ultravioleta por 10 minutos, después de esto se le adicionan 2 µl de DNA a cada tubo y se colocan en el termociclador. Se corre el programa para ACE, al finalizar el primer paso del programa se le añade 0.5 µl de Taq polimerasa a cada uno de los tubos y se continua con el programa (Fig. 11). La secuencia de bases para ACE<sup>R</sup> + Seq 5'-3': TCGGAGGATTGCCTGTAT y ACE<sup>R</sup> + 5'-3' :CGCTGCTTGCTTCTATGTATAATGC. Se utilizó un marcador de peso HyperLadderV (200 líneas) marca Bioline.

### 5.6 Electroforesis (geles de agarosa)

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa visualizando los fragmentos de DNA por tinción con bromuro de etidio para corroborar la amplificación (Fig. 12). Se detectó la presencia del gen ACE<sup>R</sup> por comparación con el marcador a 190 pares de bases.

**DETECCIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA ACETILCOLINESTERASA (ACE<sup>R</sup>) .....**



**Fig. 11. Técnica de PCR para detección de ACE<sup>R</sup> en mosquitos adultos de *Ae. aegypti***



**Fig. 12. Preparación de geles de agarosa para detectar presencia del gen ACE<sup>R</sup>**

## 6. RESULTADOS

Solo se detectó la presencia del gen para la localidad de Coatzacoalcos con 19 mosquitos positivos. En ninguna de las localidades se detectó la presencia de la banda ACE<sup>R</sup>. La mayoría del DNA para cada localidad se extrajo de hembras y machos de *Ae. aegypti* sin alimentar ya que cuando se realizó en hembras alimentadas no se obtuvieron las bandas de DNA. Mayormente se amplificó el DNA de hembras pero en los casos en que no había suficiente número, este se obtuvo de machos. Los 10 casos positivos para Coatzacoalcos fueron en machos de *Ae. aegypti* (Fig. 13). Este es un punto interesante a discutir, pues, en la mayoría de los procedimientos estándares como los de la OMS (1981) para detección de resistencia en mosquitos mediante la técnica de bioensayo, se establece que deban realizarse en hembras e incluso recién alimentadas (Cuadro 2).

Como lo establece Patil *et al* (1996) existen dos principales formas de resistencia bioquímica, resistencia en el sitio blanco, y enzimas detoxificativas. La determinación de ACE corresponde al primer tipo, que algunos autores lo clasifican dentro de mecanismo de resistencia no metabólico (Cuadro 3) (Lagunes y Villanueva 1994).

Se han identificado al menos cinco sitios mutados en el sitio de acción de la acetilcolinesterasa. Además se sabe que estos ocasionan una gradación en la sensibilidad a organofosforados y carbamatos.

La detección de gene ACE<sup>R</sup> podría explicar en primer instancia la variación de la susceptibilidad en la población de *Ae. aegypti* en la zona de Coatzacoalcos, aunque su

presencia no explica el nivel de resistencia en la población, debido a que estos genes podrían no expresarse o podrían expresarse en un estado alternativo de desarrollo del que está siendo controlado por el insecticida o el gen detectado podría ser miembro de una subfamilia de genes alternativos al que pudiera afectar el compuesto que está siendo usado (Vullule *et al* 1996). En el caso de Veracruz, como en todo el País, la presión de selección por organofosforados tales como malatión y temefos ha sido continua en por lo menos los últimos 20 años. Esto indicaría que al menos uno de los mecanismos (una de las mutaciones) para ACE insensible debiera ser común. Los resultados obtenidos indican una baja frecuencia en genotipos resistentes, específicamente para una mutación del gen ACE.

Cuadro 2. Presencia del gen ACE<sup>R</sup> en 10 localidades del Estado de Veracruz

LOCALIDAD	NUM. DE MOSQUITOS POSITIVOS
Coatzacoalcos	19
Minatitlán	0
Cosoleacaque	0
Acayucan	0
Alvarado	0
Cempoala	0
Martínez de la Torre	0
Poza Rica	0
Tantoyuca	0
Pánuco	0

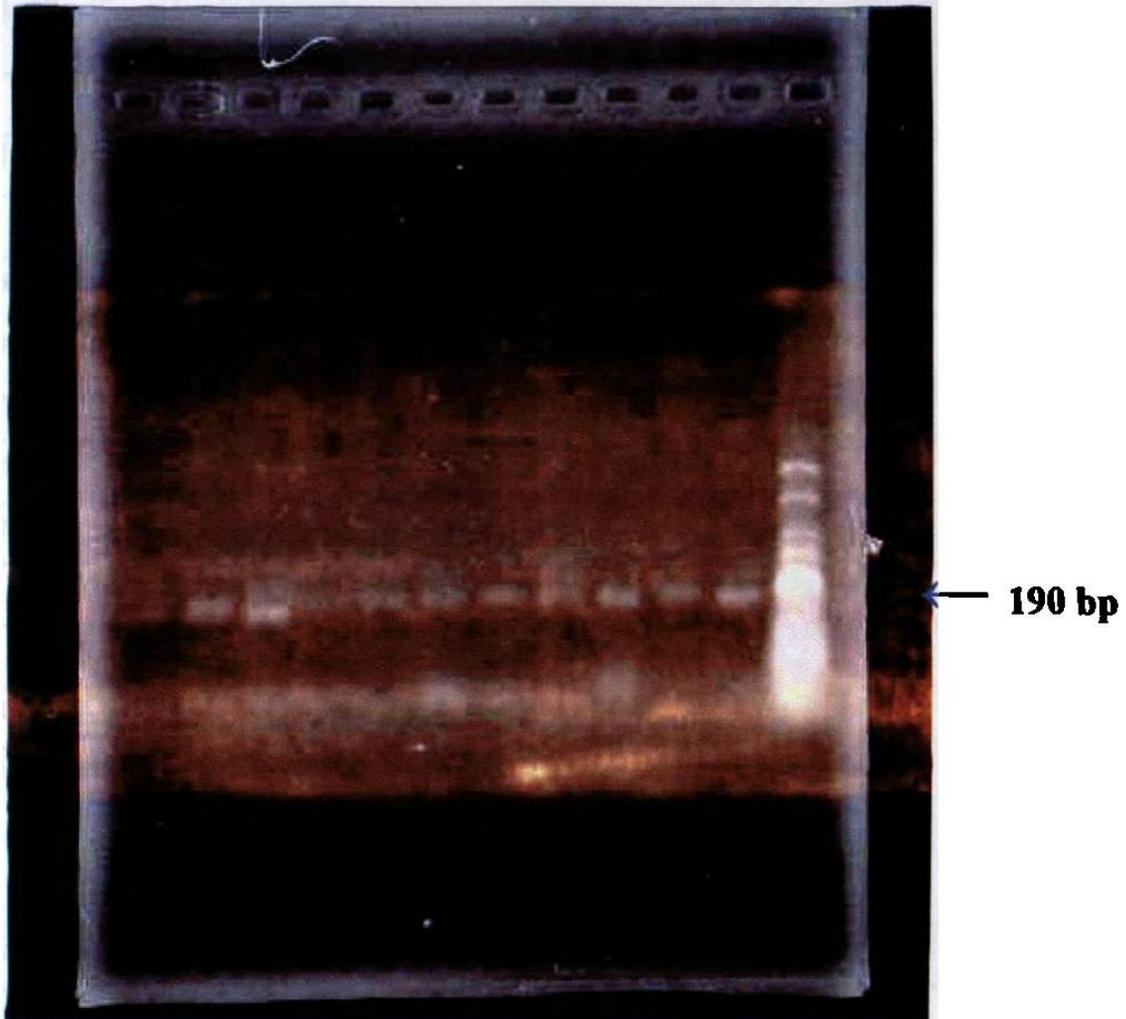


Figura.13. Banda de ACE<sup>R</sup> en geles de agarosa en mosquitos macho de Coatzacoalcos, Veracruz.

**Cuadro 3. Clasificación de mecanismos de resistencia en insectos**

<b>MECANISMOS DE RESISTENCIA METABOLICA</b>		
<b>MECANISMO</b>	<b>INSECTICIDAS</b>	<b>REFERENCIA</b>
FOM	Todos	Wilkinson, 1983
Esterasas	Organofosforados	Yasutomi, 1983
Carboxiesterasas	Malatión y Fentoato	Yasutomi, 1983
GHS-transferasas	Organofosforados y otros	Dauterman, 1983
DDTasas	Clorados del grupo OC-DDT	Metcalf, 1989
Hidrolasas	Fosforados y otros	Dauterman, 1983
<b>MECANISMOS DE RESISTENCIA NO METABOLICOS</b>		
Kdr	DDT y piretroides	Plapp, 1978
ACE insensible	Carbamatos y fosforados	Hama, 1983
Insensibilidad en el sitio de acción	Carbamatos, clorados del grupo del benceno y ciclodienos	Narahashi, 1983
Penetración reducida	Todos	Matsumura, 1983
Mayor excreción	Todo	Georghiou, 1972
Mayor almacenamiento	Todos	Georghiou, 1972

Bobadilla-Utrera (2001) al evaluar el estado de susceptibilidad de poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* en 10 localidades del Estado de Veracruz para insecticidas organofosforados y piretroides no encontró diferencia significativa en los valores de  $Cl_{50}$  y  $Cl_{95}$  entre las localidades, las cuales estaban comprendidas entre Martínez de la Torre (centro) hasta Minatitlán (Sur). Aunque no se incluyó Coatzacoalcos específicamente, Bobadilla establece para temefos un aumento en la susceptibilidad de las poblaciones larvarias de *Ae. aegypti* hacia el sur, no siendo el caso para malatión. Si analizamos lo

**DETECCIÓN DEL GEN DE RESISTENCIA ACETILCOLINESTERASA (ACE<sup>R</sup>) .....**

establecido por (Ffrench-Constant *et al* 1993) podríamos confirmar que la presencia de un sitio mutado en la acetil-colinesterasa produce una gradación en la sensibilidad al organofosforado.

**Cuadro. 4 Casos positivos a la presencia del gen ACE<sup>R</sup> de 10 localidades muestreadas del estado de Veracruz**

<b>Num. de mosquito</b>	<b>Coatzacoalcos</b>	<b>Minatitlán</b>	<b>Cosoleacaque</b>	<b>Acayucan</b>	<b>Alvarado</b>	<b>Cempoala</b>	<b>Mtz. de la Torre</b>	<b>Poza Rica</b>	<b>Tantoyuca</b>	<b>Panuco</b>
<b>1</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>2</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>3</b>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>4</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>5</b>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>6</b>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>7</b>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>8</b>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>9</b>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>10</b>	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Cont. Cuadro 4. Casos positivos a la presencia del gen ACE<sup>R</sup> de 10 localidades muestreadas del estado de Veracruz

Num. de mosquito	Coatzacoalcos	Minatitlán	Cosoleacaque	Acayucan	Alvarado	Cempoala	Mtz. de la Torre	Poza Rica	Tantoyuca	Panuco
11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
16	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
17	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
18	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Cont. Cuadro 4. Casos positivos a la presencia del gen ACE<sup>R</sup> de 10 localidades muestreadas del estado de Veracruz

Num. de mosquito	Coatzacoalcos	Minatitlán	Cosoleacaque	Acayucan	Alvarado	Cempoala	Mtz. de la Torre	Poza Rica	Tantoyuca	Panuco
21	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
23	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
24	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
25	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
26	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
27	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
28	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Cont. Cuadro 4. Casos positivos a la presencia del gen ACE<sup>R</sup> de 10 localidades muestreadas del estado de Veracruz

Num. de mosquito	Coatzacoalcos	Minatitlán	Cosoleacaque	Acayucan	Alvarado	Cempoala	Mtz. de la Torre	Poza Rica	Tantoyuca	Panuco
31	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
33	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
35	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
36	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
37	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
38	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
39	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
40	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo

Cont. Cuadro 4. Casos positivos a la presencia del gen ACE<sup>R</sup> de 10 localidades muestreadas del estado de Veracruz

Num. de mosquito	Coatzacoalcos	Minatitlán	Cosoleacaque	Acayucan	Alvarado	Cempoala	Mtz. de la Torre	Poza Rica	Tantoyuca	Panuco
41	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
42	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
43	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
44	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
45	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
46	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
47	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
49	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
50	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

## 7. CONCLUSIONES

Se detecta por primera vez en *Aedes aegypti* la presencia del gen ACE<sup>R</sup> para Coatzacoalcos, Veracruz aunque a baja frecuencia, mediante electroforesis en gel de agarosa se observó una banda fuertemente correspondiendo a 190 pares de bases.

Debido a que solo se procesan un número de muestras limitado (100 mosquitos por localidad), además de la baja frecuencia de la presencia del gen ACE<sup>R</sup> no se presentan evidencias suficientes para establecer la migración del gen en poblaciones de *Ae. aegypti* en el Estado de Veracruz .

## 8. LITERATURA CITADA

Benenson A.S. 1997. Manual para el Control de las enfermedades transmisibles. Décimo sexta edición. OPS. Pp 68-69

Bisset J.A., Navarro A, Marquett M.C., Mendazabal M.E., González B.M 1985. La abundancia larval de mosquito urbano durante la campaña de erradicación de *Aedes aegypti* y del dengue en Cuba. Rev Cub Med Trop , 37:161-168

Bisset J.A., M. M. Rodríguez, C. Díaz y L.A. Soca.1999. Caracterización de la Resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en *Culex quinquefasciatus* del estado de Miranda, Venezuela. Rev. Cubana Med. Trop., 51 (2):89-94

Black IV W.C., Du Teu N.M. (1987) RAPD-PCR and SSCP análisis for insect population genetic studies. Crampton J. Beard C:B., Louis C., Eds. The molecular Biology of Insect disease vectors : A methods Manual. New York: Chapman and Hill Publishers, pp. 361-373.

Brogdon, W. G. and J. C. McAllister. 1998. Insecticide resistance and vector control. CDC, Atlanta, GA, USA. 4(4): 12 pp.

Brogdon, W. G., J. C. McAllister. 1998. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in bottles. J. Am. Mosq. Control Assoc. 14(2): 159-164.

Brogdon W, G., A. M. Barber. 1990. Microplate assay of glutathione S-transferase activity for resistance detection in single-mosquito homogenates. Comp. Biochem. Physiol. 96B: 339-342.

Brogdon, W. G., J. C. McAllister. 1997. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 13: 233-237.

Brown, A.W.A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2: 123-140.

Carino, F. A., J.F. Koener, F.W. Plapp and R. Feyereisen. 1994. Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene Cyp6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24: 411-8.

Chadee, D.D. (1988). Landing periodicity of the mosquito *Aedes aegypti* in Trinidad in relation to the timing of insecticidal space-spraying. *Med. Vet. Entomol.* 2:189-192.

Chandree F.F., Darriet, J.M.C Doannio, F. Riviere, N. Pasteur and P. Guillet. (1997). Distribution of organophosphate and carbamate resistance in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in West Africa. *J. Med. Entomol.* 34 (6): 664-671.

Clark, J.M., J.G. Scott, F. Campos and J.R. Bloomquist JR. 1995. Resistance to ivermectins: extent, mechanisms, and management. *Ann. Rev. Entomol.* 40: 1-30.

Clements A.N. (1999). The biology of mosquitoes. Vol. 2. Sensory and Behavior. CABI Publishing Oxford, Inglaterra. ISBN 0 85 199313.

Cohen, M.B., J.F. Koener and R. Feyereisen. 1994. Structure and chromosomal localization of Cyp6A1, a cytochrome P450-encoding gene from the house fly. *Gene.* 146: 267-272.

Cheik, H.B. and N. Pasteur. (1993). Resistance to Temephos an Organophosphorous insecticide in *Culex pipiens* from Tunisia, North Africa. *J. Am. Mosquito Control Assoc.* 9(3):335-337.

Cheong H, R.K. Dhesi and S.S. Gill. 1997. Marginal cross-resistance to mosquicidal *Bacillus thuringiensis* strains in Cry 11A-resistant larvae: presence of Cry 11A-like toxins in these strains. *FEMS Microbiol Lett.* 153: 419-424.

Curtis, C.F. 1985. Theoretical models of the use of insecticide mixtures for the management of resistance. *Bull. Entomol. Res.* 75: 259-265.

Curtis C.F., N. Hill and S.H. Kasim. 1993. Are there effective resistance management strategies for vectors of human disease ? *Biol. J. Linn. Soc.* 48: 3-18.

Cygler, M., J.D. Schrag, J.L. Sussman, M. Harel, I. Silman and M.K. Gentry. 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. *Protein Sci.* 2: 366-382

Dieguez Fernández L., J.A. Bisset, M.M. Rodríguez, T. González, C. Díaz y R. Vázquez. 1999. Análisis comparativo de la resistencia a insecticidas en cepas de *Culex quinquefasciatus*, provenientes de Camagüey. *Rev. Cubana Med. Tropical*, 51(1):26-32

Escriche B, B. Tabashnik, N. Finson and J. Ferre. 1995. Immunohistochemical detection of binding of CryIA crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* in highly resistant strains of *Plutella xylostella* (L.) from Hawaii. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 388-395.

FAO. (1979). Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. *FAO Plant Protection Bull.* 27:29-32.

Fernández, S.I. (1995). El papel del vector *Aedes aegypti* en la epidemiología del Dengue en México. *Rev. Sal. Publ.* 37:45-51 (suplemento).

Flores, Adriana E., Mohammad H. Badii y Gustavo Ponce G. 2001. Resistencia a insecticidas en insectos vectores de enfermedades con énfasis en mosquitos. FASPYN (en prensa).

Fernández, S.I. (1999). Biología y Control de *Aedes aegypti*. Manual de operaciones. Editorial UANL. ISBN 968 7808 88 8. Monterrey, México.

Ffrench-Constant, R.H., J. Steichen, T.A. Rocheleau, K. Aronstein and R.T. Roush. 1993. A single amino acid substitution in a beta-aminobutyric acid subtype A receptor locus associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 1957-1961.

Gorrochotegui-Escalante, M.de L. Muñoz, I. Fernández-Salas, B.J.Beatty y W.C. Black IV. 2000. Genetic Isolation by distance among *Aedes aegypti* population along the Northeastern coast of México. Am. J. Trop. Med. Hy. 62(2):200-209.

Harwood R.F. and James M.T (1988). Entomología Médica y Veterinaria, Ed. LIMUSA, México, D.F.

Hayes, J.D. and D. J. Pulford. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 30: 445-600.

Hawley, W.A. (1988). The biology of *Aedes albopictus*. J. Am. Mosquito Control Asociation 4 (supplement).

Hemingway J. and H. Ranson. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Ann. Rev. Entomol. 45: 371-391.

Hemingway J, R.P. Penilla, A.D. Rodriguez, B.M. James and W. Edge. 1997. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. A large scale trial in Southern Mexico. *Pest. Sci.* 51: 375-382.

INEGI. 2002. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx).

Krogstad, D.J. 1996. Malaria as a reemerging disease. *Epidemiol. Rev.* 18: 77-89.

Keller, M., B. Sneh, N. Strizhov, E. Prudovsky, A. Regev and C. Koncz. 1996. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 365-373.

Lagunes T.A. y J.A. Villanueva (1995). Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados, México.

Lengeler, C., R.W. Snow. 1996. From efficacy to effectiveness: insecticide-treated bednets in Africa. *Bull World Health Organ.* 74: 325-332.

Liu, N. and J.G. Scott. 1997. Phenobarbital induction of Cyp6D1 is due to a *trans*-acting factor on autosome 2 in house flies, *Musca domestica*. *Insect. Mol. Biol.* 6: 77-81.

Maitra, S., S.M. Dombroski, L.C. Waters and R. Ganguly. 1996. Three second chromosome-linked clustered Cyp6 genes show differential constitutive and barbital-induced expression in DDT-resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Gene.* 180: 165-71.

Mazzarri M.B. and G.P. Georghiou. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field population of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11(3):315-322.

Méndez G. J. (1992). Manual para la prevención y Control del Dengue en México. Secretaría de Salud, Dir. Gen. Epidemiología, México, pp. 86.

Miyazaki, M., K. Ohyama, D.Y. Dunlap and F. Matsumura. 1996. Cloning and sequencing of the para-types sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). Mol. Gen. Genet. 252: 61-68.

Nielsen-Leroux, C., F. Pasquier, J.F. Charles, G. Sinegre, B. Gaven and N. Pasteur. 1997. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) larvae. J. Med. Entomol. 34: 321-327.

Oakeshott J.G., E.A. van Papenrecht, T.M. Boyce, M.J. Healy and R. J. Russell. 1993. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. Genetica. 90: 239-268.

Patil, N.S., K.S. Lole and D. N. Deobagkar. 1996. Adaptive larval thermotolerance and induced cross-tolerance to propoxur insecticides in mosquitoes *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. Med. Vet. Entomol. 10: 277-282.

Penilla, R.P., A.D. Rodríguez, J. Hemingway, J. L. Torres, J.I. Arredondo-Jimenez and M.H. Rodríguez. 1998. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in México. Med. Vet. Entomol. 12: 217-233.

Raghavendra K., K. Sarala, K. Subbarao, K. Vasantha, M.K.K. Pillai, and V.P. Sharma. (1992). Differential selection of Malationn resistance in *Anophales culicifacies* A and B (Diptera: Culicidae) in haryana State, India. J. Med. Entomol. 29 (2): 183-187.

Rao, D.R., T.R. Mani, R. Rajendran, A.S. Joseph, A. Gajanana and R. Reuben. 1995. Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a field population of *Culex quinquefasciatus*. J. A. Mosq. Control Assoc. 12: 247-250.

Raymond M. D. fourner, J. Berge, A. Cuany, J-M Bride and N. Pasteur. 1985. single-mosquito test to determine genotypes with on Acetylcholinesterase insensitive to inhibition to propoxur insecticide. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*; 1(4):425-427

Rivet, Y., M. Raymond, J.A. Rioux, A. Delalbre and N. Pasteur. 1994. Resistance monitoring in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from central-eastern France. *J. Med. Entomol.* 31: 231-239.

Rodcharoen, J. and M. S. Mulla. 1996. Cross resistance to *Bacillus sphaericus* strains in *Culex quinquefasciatus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 12: 247-250.

Rodhain, F. 1996. Donnes recents sur l'epidemiologie de l'encephalite japonaise. *Bull Acad. Natl. Med.* 180: 1325-1337.

Rodriguez M.M., J.A. Bisset, C. Diaz y L.A. Soca. 1998. Selección de una cepa de *Culex quinquefasciatus* resistente a lamdacialotrina y su espectro de resistencia cruzada a otros insecticidas. *Rev. Cubana Med. Trp.*, 50(2):129-132

Rodriguez M.M, J.A. Bisset, L.H. Mila, E. Calvo, C. Diaz y L.A. Soca. 1999. Niveles de resistencia y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. *Rev Cubano Med . Trop.*, 51(2):83-88

Roush R. T. 1989. Designing resistance management programmes: how can you choose? *Pestic. Sci.* 26: 423-42.

Scott, T.W., E. Chow, D. Strickman, P. Kittayapong, R. Wirtz and L.H. Lorenz. (1993). Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* (diptera:Culicidae) collected in a rural thai village. *J. Med. Entomol.* 5: 922-927.

Severini C., M. Marinucci and M. Raymond. (1994). Insecticide resistance in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Italy: esterase B locus at DNA level. *J. Med. Entomol.* 31 (3): 496-499.

SSA . (2001). Boletín de epidemiología. Sistema nacional de Vigilancia epidemiología. [www.ssa.gob.mx](http://www.ssa.gob.mx).

Tabashnik, B.E. 1989. Managing resistance with multiple pesticide tactics: theory, evidence and recommendation. *J. Econ. Entomol.* 82: 1263-1269.

Tabashnik, B.E., T. Malvar, Y.B. Liu, N. Finson, D. Borthakur and B.S. Shin. 1996. Cross resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2839-2844.

Tabashnik, B.E., Y.B. Liu, N. Finson, L. Masson and D.G. Heckel. 1997. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 1640-1644.

Tomita, T., N.Liu., F.F. Smith, P. Shridhar and J.G. Scott. 1995. Molecular mechanisms involved in increased expression of a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in the housefly, *Musca domestica*. *Insect. Mol. Biol.* 4: 135-140.

Tomita, T., J.G. Scott. 1995. cDNA and deduced protein sequence of Cyp6D1: the putative gene for a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 275-283.

Vais, H., M.S. Williamson, C.A. Hick, N. Eldursi, A.L. Devonshire and P.N. Usherwood. 1997. Functional analysis of a rat sodium channel carrying a mutation for insect knock-down resistance (kdr) to pyrethroids. *FEBS Lett.* 413: 427-332.

Vector resistance to insecticides. 1992. 15<sup>th</sup> report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. World Health Organ Tech. Rep. Ser. 818: 1-62.

Vulule, J.M., R.F. Beach, F.K. Atieli, D.L. Mount, J.M. Roberts and R.W. Mwangi. 1996. Long-term use of permethrin-impregnated nets does not increase *Anopheles gambiae* permethrin tolerance. Med. Vet. Entomol. 10: 71-79.

WHO. 1992. Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the expert committee on vector biology and control. In WHO Tech. Rep. Ser. 818: 1-55.

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

Williamson, M.S., D. Martinez-Torres, C.A. Hick and A.L. Devonshire. 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. Mol. Gen. Genet. 252: 51-60.

Wirth, M. C. and G. P. Georghiou. (1999). Selection and characterization of Temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, british Virgin Islands. J. Am. Mosquito control association. 15 (3): 315-320.

Zhou, Z-H, and M.A. Syvanen. 1997. A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*. Mol. Gen. Genet. 256: 187-194.



