

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

Prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia de derribo a piretroides en el canal de sodio controlado por voltaje en poblaciones de *Aedes aegypti* en Centroamérica.

Francisco Josué López Hun

Biólogo

Guatemala, noviembre de 2018

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

Prevalencia de mutaciones asociadas a resistencia de derribo a piretroides en el canal de sodio controlado por voltaje en poblaciones de *Aedes aegypti* en Centroamérica.

INFORME DE TESIS

Presentado por

Francisco Josué López Hun

Para optar al título de

Biólogo

Guatemala, noviembre de 2018

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Byron Enrique Pérez Diaz	Vocal IV
Br. Pamela Carolina Ortega Jiménez	Vocal V

DEDICATORIA

A mi Padre Celestial quien me ha fortalecido en los momentos difíciles, y me ha bendecido con la oportunidad de lograr esta gran meta en mi vida.

A mi madre Alma Delia que amo tanto con todo mi corazón, con quien estoy infinitamente en deuda por todo su amor. A quien le debo todo lo que soy y a quien siempre ha velado constantemente por bienestar físico como espiritual. Y que me ha enseñado con su ejemplo y amor a cómo vivir correctamente en esta vida.

A mi padre Roberto a quien estaré infinitamente en deuda por su amor y apoyo incondicional. A quien se sacrificó por darme una mejor educación y calidad de vida. Y que me ha enseñado que con trabajo arduo y constante puedo cumplir con todas mis metas.

A mis hermanos Suly, Esteban y Jared con los que he compartido toda mi vida y a quienes amo.

A mi gloriosa universidad que me ha brindado la oportunidad de aprender tanto y me ha formado académicamente.

A mi País que amo tanto, del cual estoy orgulloso de pertenecer y agradecido con mi Padre Celestial por darme la oportunidad de haber nacido en él.

A la población guatemalteca quien con sus impuestos y su esfuerzo permitieron pagar mi formación académica

A mis amigos que me han ayudado y apoyado durante toda mi vida y durante mi paso por la Universidad.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Norma Padilla, jefe de la Unidad de la Unidad de Entomología y Ecología de Enfermedades Parasitarias del Centro de Estudios en Salud, por el préstamo de especímenes de *Aedes aegypti* de Centroamérica y su asesoramiento académico.

Agradezco al *M.Sc.* Edwin David Castañeda Manager del Laboratorio de Entomología y Ecología del Centro de Estudios en Salud, por haberme facilitado el uso de las instalaciones, equipo de laboratorio y por su asesoramiento académico.

Agradezco a la Dra. Carmen Elena Castillo, jefa del Insectario del Centro de Estudios en Salud, de la Universidad del Valle, por el uso de las instalaciones, equipo de insectario y por su asesoramiento académico.

Agradezco a la Dra. Lesly Álvarez González, Profesora de la Universidad de los Andes, por su asesoramiento académico referente a la determinación de mutaciones en el gen del canal de sodio en *Aedes aegypti*.

Agradezco a mi mentor *M.Sc.* Juan Carlos Lol de la Universidad del Valle de Guatemala, por su confianza en mi trabajo y ser mi tutor durante estos años.

Agradezco al Dr. Sergio Alejandro Melgar de la Universidad de San Carlos de Guatemala, por ser mi revisor de tesis.

Agradezco a todos mis catedráticos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, por todas sus enseñanzas y por ayudarme a crecer académicamente.

Agradezco a mis compañeros y amigos por su apoyo y enseñanzas durante este largo recorrido en la universidad.

Índice

1. Resumen	3
2. Introducción	5
3. Antecedentes	7
3.1 Género <i>Aedes</i>	7
3.1.1 <i>Aedes aegypti</i>	7
3.1.2 Distribución Geográfica	8
3.1.3 Ciclo biológico	8
3.2 Control vectorial	10
3.2.1 Control biológico	10
3.2.2 Control genético	10
3.2.3 Control químico	11
3.3 Piretroides	12
3.3.1 Resistencia a piretroides	14
3.3.2 Resistencia metabólica	15
3.3.2.1 Carboxilcolinesterasas	15
3.3.2.2 Glutation S-Transferasas	16
3.3.2.3 Citocromo P450 monoxigenasas	16
3.3.3 Resistencia por sitio blanco	17
3.3.3.1 Canal de sodio controlado por voltaje (Na_v)	17
3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	20
4. Justificaciones del trabajo	22
5. Objetivos	24
6. Hipótesis	24
7. Materiales y Métodos	25
7.1 Universo:	25
7.2 Materiales	25
7.3 Metodología	28
7.3.1 Selección de muestras	28
7.3.2 Extracción de ADN genómico en mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	28
7.3.3 Cuantificación de ADN	29
7.3.4 PCR convencional	29
7.3.5 Purificación de productos de PCR	30
7.3.6 Secuenciación y análisis de secuencias	30

7.3.7 PCR alelo específico	31
7.3.8 Análisis estadístico.....	32
7.3.8.1 Frecuencias alélicas y genotípicas.....	32
8. Resultados	34
8.1 Extracción de ADN genómico en mosquitos <i>Ae. aegypti</i>	34
8.2 PCR convencional para las mutaciones F1534C y V1016I.....	34
8.3 Genotipos para las mutaciones F1534C y V016I	35
8.4 Frecuencias alélicas para las mutaciones F1534C y V1016I.....	38
8.5 Frecuencias genotípicas para las mutaciones F1534C y V1016I.....	39
8.6 Intervalos de Wald, equilibrio de Hardy Weinberg y prueba de Fisher para las mutaciones F1534C y V1016I	40
9. Discusión	44
10. Conclusiones	55
11. Recomendación	56
12. Referencias	57
13. Anexos	73

1. Resumen

En la región de Centroamérica los virus del dengue, zika, chikungunya y la fiebre amarilla tienen una gran relevancia en salud pública. Estos virus son transmitidos por los mosquitos hembras de la especie *Aedes aegypti*. Esta especie es el principal vector de estos virus en la región por lo cual diversas estrategias son utilizadas para el control de este vector en la región. Estas estrategias se centran en el control químico utilizando principalmente insecticidas piretroides.

El uso extenso y prolongado de insecticidas piretroides en esta región puede causar resistencia al derribo en las poblaciones de este vector. Dicha resistencia puede desarrollarse mediante mutaciones no sinónimas en el gen del canal de sodio controlado por voltaje como; F1534C y V1016I. Por lo tanto es fundamental evaluar dicho mecanismo de resistencia para este vector con el fin de comprobar la efectividad de estos insecticidas y evitar el desarrollo de poblaciones resistentes al derribo por insecticidas piretroides.

Este estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia de las mutaciones F1534C y V1016I en el gen que codifica el canal de sodio controlado por voltaje, en individuos de la especie *Aedes aegypti* de Centroamérica. Para esto fueron seleccionados al azar, individuos sometidos a pruebas de resistencia a insecticidas piretroides de tres países: Panamá, Costa Rica y Guatemala. Estos individuos fueron analizados mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) alelo específico en tiempo real por cada mutación para determinar el genotipo de cada uno de los individuos e identificar las mutaciones F1534C y V1016I. Los resultados obtenidos muestran que la frecuencia alélica de la mutación F1534C para cada una de las localidades fueron; Limón, (Costa Rica) 1, Chorrera (Panamá) 1, Prados del Río (Guatemala) 0.98 y Chiriquí (Panamá) 0.9. La frecuencia alélica de la mutación V1016I para las localidades fueron; Limón 0.46, Prados del Río 0.47, Chorrera 0.72 y Chiriquí 0.73. Adicionalmente, no se encontró una diferencia significativa entre la presencia o ausencia de la mutación F1534C y el fenotipo susceptible o resistente al derribo por insecticidas piretroides en *Aedes aegypti* de Centroamérica. Para la mutación V1016I sí se encontró una diferencia significativa entre la presencia o ausencia de esta mutación y el

fenotipo susceptible o resistente al derribo por insecticidas piretroides en *Aedes aegypti* de Centroamérica.

De estos resultados podemos concluir primero la presencia de las mutaciones F1534C y V1016I en la región de Centroamérica. Segundo que el uso de DDT e insecticidas piretroides y la migración fueron factores fundamentales para favorecer la aparición de las mutaciones F1534C y V1016I en Centroamérica. Tercero que la resistencia al derribo por insecticidas piretroides en las poblaciones de *Aedes aegypti* de Centroamérica puede estar medida por factores múltiples y no exclusivamente por las mutaciones F1534C y V1016I en el canal de sodio controlado por voltaje. Cuarto evidenciar que si existe una asociación entre la presencia o ausencia de la mutaciones V1016I en el canal de sodio controlado por voltaje y la resistencia al derribo a insecticidas piretroides en las poblaciones de *Aedes aegypti* de la región Centroamericana. Quinto que los genotipos homocigóticos silvestre, homocigóticos mutante y heterocigótico se encontraron para las mutaciones F1534C y V1016I en la región de Centroamérica.

2. Introducción

Los mosquitos de la especie *Aedes aegypti* tienen una gran relevancia en el ámbito de la salud pública ya que cumplen un papel como vector principal de varios agentes causales de diferentes enfermedades. Entre los agentes infecciosos transmitidos por este vector se encuentran los virus de: dengue, zika, chikungunya y la fiebre amarilla, los cuales tienen una gran relevancia dentro de la región Centroamericana (Kantor, 2016).

En la región Centroamericana el clima cálido, la precariedad, la vulnerabilidad de los ministerios de salud y la deficiencia en la infraestructura urbana y rural, ha favorecido la distribución y reproducción de este mosquito dando como resultado la proliferación de estas enfermedades. Las estrategias utilizadas en la región Centroamericana para el control de este vector se han basado principalmente en el control químico utilizando insecticidas piretroides (Bisset, Rodríguez, San Martín, Romero, Montoya, 2009). A pesar del alto grado de eficiencia, de los insecticidas piretroides, el uso excesivo y prologando de estos puede generar presión selectiva sobre las poblaciones de *Aedes aegypti*, lo cual produce un aumento de las frecuencias relativas de los individuos resistentes (WHO, 1981).

En Latinoamérica las poblaciones de este vector han presentado resistencia a piretroides, por mutaciones en el gen del canal de sodio controlado por voltaje. Entre las mutaciones más importantes en dicho gen que se han reportado para esta región se encuentra: F1534C (Dong, *et al.*, 2014), y V1016I (Saavedra *et al.*, 2007), ambas relacionadas con resistencia al derribo por insecticidas piretroides. Para Centroamérica se han realizados pruebas de resistencia a insecticidas utilizando como método el bioensayo de la botella de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC). Los resultados de estas pruebas indican que las poblaciones de esta región presentan resistencia a insecticidas piretroides (Bisset, *et al.*, 2009; Ávila, Araujo, Herrera, 2010; Cáceres, Rovira, García, Torres, Cruz, 2013; Calderón, Troyo, 2016). Sin embargo, se desconoce en gran parte para todos los países de la región cuál es el mecanismo asociado a este fenómeno. Por lo tanto, debido al uso desmedido de insecticidas piretroides, tales como deltametrina y permetrina, en Centroamérica, es necesario evaluar los mecanismos de resistencia para este vector, con el propósito de garantizar la efectividad de estos insecticidas y evitar el riesgo de generar

poblaciones con un mayor grado de resistencia a los insecticidas mencionados. La determinación de la prevalencia de las mutaciones F1534C y V1016I en *Aedes aegypti* para Centroamérica es fundamental, ya que esto ayudará a mejorar las estrategias implementadas y desarrollar nuevas estrategias para el control de este vector.

Este es un estudio experimental, en el cual se determinó la prevalencia de las mutaciones F1534C y V1016I en el gen que codifica el canal de sodio controlado por voltaje en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* en Centroamérica. Para esto, los mosquitos colectados durante el 2017, en las diferentes localidades fueron sometidos a pruebas de resistencia a insecticidas piretroides, utilizando como método el bioensayo de la botella del CDC. Fueron seleccionados al azar, 50 individuos de los sometidos a pruebas de resistencia a insecticidas piretroides de tres países: Panamá, Costa Rica y Guatemala, con un total de 200 individuos. Estos individuos fueron analizados mediante PCRs alelo específicos en tiempo real por cada mutación para determinar el genotipo cada uno de los individuos e identificar las mutaciones F1534C y V1016I. Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de cada una de las poblaciones. También se estableció si existe una correlación entre la resistencia al derribo por insecticidas piretroides y las mutaciones F1534C y V1016I. Los resultados de esta investigación permitirán fortalecer las decisiones para establecer, cuando sea necesario, un cambio en las medidas de control vectorial para Centroamérica, región en la cual la transmisión de patógenos por *Aedes aegypti* representa un verdadero problema de salud pública.

3. Antecedentes

Los mosquitos de la familia *Culicidae* son los vectores de mayor importancia para la transmisión biológica de algunos de los agentes causantes de las enfermedades más importantes a nivel de salud pública alrededor del mundo (Mari, 2013). Las especies de mosquitos de mayor relevancia médica pertenecen, subfamilia *Anophelinae* con el género *Anopheles* y la subfamilia *Culicinae*, con los géneros *Culex* y *Aedes* vectores de diversos agentes patógenos (Beck, 1984).

3.1 Género *Aedes*

El género *Aedes* está representado por más de 700 especies (Wilkerson *et al.*, 2015; Giorina, Micheloud, Berron, Claus, 2016). Muchas de estas especies son vectores de virus y nemátodos responsables de varias enfermedades entre las cuales se encuentra la fiebre amarilla, dengue, zika, chikungunya y filariasis linfática. Entre los principales vectores de estos agentes infecciosos se encuentran *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Juliano and Lounibos, 2005).

Este género se encuentra en altas densidades en ambientes rurales y urbanos. Esto se debe a que el desarrollo larval se da en contenedores de agua limpia peri-domiciliares, lo cual incrementa el contacto con humanos y aumenta del contagio de enfermedades relacionadas a estas especies (Jansen and Beebe, 2010).

Las especies del género *Aedes* presentan ciertas características distintivas. En los adultos presentan patas anilladas y en sus pronotos presentan dibujos blancos o plateados, formados por escamas que resaltan del resto que las recubre (Berenguer, 2006). El abdomen en las hembras se caracteriza por estar recubiertos de cercos muy prominentes. Los estadios larvales se caracterizan por la presencia de un tubo sifónico al final de cada peine (Berenguer, 2006).

3.1.1 *Aedes aegypti*

Ae. aegypti tiene una gran importancia médica ya que es el principal vector de diferentes arbovirosis como: zika, dengue, chikungunya, y fiebre amarilla (Kotsakiozi, Soria, Caccone, Evans, Schama, 2017). La importancia de este vector radica en la evolución que este ha tenido para vivir todo su ciclo de vida desde larvas hasta adultos en suma proximidad con el ser humano, también al ser un vector antropofílico es capaz de transmitir un virus a múltiples hospederos, propagando múltiples agentes infecciosos de manera

eficiente (Patterson, Sammon, Garg, 2016). Este vector tiene una amplia distribución a nivel mundial.

3.1.2 Distribución Geográfica

Ae. aegypti es proveniente África, esta especie migró al continente Americano en barcos de esclavos durante el siglo XV al XVIII (Christophers, 1960; Tabachnick, 1991). Este vector tiene una distribución cosmotropical, entre los 20° S y 30° N, se encuentra principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del planeta. Tiene un rango altitudinal de 0 a 2000 metros sobre el nivel del mar (Suarez, Nelson, 1981; Tinker, Olano, 1993). En el continente Americano se encuentra totalmente relacionada a hábitats urbanos y rurales, por lo que se le considera una especie doméstica.

En la región Suramericana y el Caribe se llevaron programas de erradicación de dicho vector durante los años de 1940 a 1950 y a finales de la década de 1950 dichas regiones fueron declaradas libres de este vector (PAHO, 1997). La falta de seguimiento y la relajación de las campañas de erradicación de este vector, dio como resultado la reaparición de este vector en los países de estas regiones. Esto fue el resultado de la re-invasión proveniente desde regiones no erradicadas; como Venezuela, Estados Unidos y algunos países del caribe (PAHO, 1997).

3.1.3 Ciclo biológico

Ae. aegypti es un insecto con metamorfosis completa (holometábolo). Su desarrollo consta de dos etapas evolutivas bien diferenciadas: una etapa inmadura y una etapa adulta. La etapa inmadura consta de 3 fases bien diferenciadas entre sí: huevo, larva y pupa. La etapa adulta es aérea o terrestre y las 3 fases de esta etapa inmadura son acuáticas.

Huevo

Los huevos de esta especie miden aproximadamente 1mm de longitud y son fusiformes, ligeramente aplanados en un lado y más afilado hacia el extremo micropilar (Christophers, 1960). Tiene un color blanco al ser recién ovipuestos, pero después de dos horas se tornan negros (Mirsa, 1956). Los huevos son fecundados durante la postura y su desarrollo embrionario puede llevar hasta 48 horas, si las condiciones ambientales son húmedas y cálidas, por el contrario, esto puede prolongarse hasta cinco días a temperaturas bajas.

Estos huevos son capaces de resistir extensos períodos de desecación, los cuales pueden prologarse por más de un año. Esta característica de resistencia a la desecación es uno de los principales desafíos para su control. Esto permite que los huevos puedan transportarse a grandes distancias, lo cual permite la reinfestación a través de huevos que hayan permanecido ocultos en recipientes secos (Nelson, 1986).

Larvas

Las larvas de esta especie presentan 4 estadios, son exclusivamente acuáticas y durante este periodo se alimentan y están en crecimiento. Durante esta etapa la mayor parte del tiempo se encuentran alimentándose de materia orgánica. Para esto utilizan sus cerdas bucales en forma de abanico (Nelson, 1986).

Las larvas se caracterizan por tener en la base de los tubérculos del tórax espinas largas y puntiagudas, también estas larvas poseen un sifón corto en forma de barril con pecten y penachos subventrales compuestos por tres pelos. Otra de las características morfológicas distintivas se basa en que el segmento anal no está totalmente rodeado por una placa esclerotizada y en el peine del octavo segmento las hileras de escamas forman un tridente (Forattini, 1965).

Pupa

Las pupas al igual que las larvas son exclusivamente acuáticas, durante este estadio no se alimentan ya que su función principal es la metamorfosis al estadio adulto. Las pupas de esta especie se caracterizan por reaccionar a estímulos externos como las vibraciones. Cuando estas se encuentran inactivas se mantiene flotando en la superficie, lo cual facilita la emergencia a su etapa adulta (Nelson, 1986).

Las pupas presentan un cefalotórax globuloso conectado por un abdomen segmentado y curvo. En la parte anterior se encuentran los sifones respiratorios los cuales presentan un conducto respiratorio (Christophers, 1960).

Adulto

La fase de adulto es la fase reproductiva de esta especie la cual se caracteriza por tener palpos cortos, abdomen agudo y la pérdida de cerdas espiraculares. Entre las características más distintivas se encuentra el dibujo blanco en forma de lira de su pronoto (Berenguer, 2006)

La alimentación en esta fase para los machos consiste en líquidos con azúcares los cuales son tomados de frutos o flores, por el contrario, solo las hembras son hematófagas, ya que necesitan de la sangre para poder desarrollar los huevos (Christophers, 1960). Sin embargo, estas pueden también alimentarse de azúcares para poder sobrevivir. Los adultos se distinguen por ser de hábitos domésticos y rurales (Christophers, 1960).

3.2 Control vectorial

Múltiples métodos son utilizados para el control de este vector entre estos se encuentran; gestión ambiental, químico, biológico y genéticos (Baldacchino, Caputo, Chandre, Drago, Torre, Montarsi 2015). Los métodos de gestión ambiental; se basan en la eliminación de criaderos y evitar el contacto con el humano. Entre las actividades de estas estrategias se realizan programas de reciclaje a nivel municipal, instalación de cañerías confiables para el agua potable y el reemplazo de pozos sépticos por sistemas de cloacas (Baldacchino, *et al.*, 2015).

3.2.1 Control biológico

Los métodos de control biológico se basan en el uso de depredadores naturales de este vector y de toxoides biológicos. Diversos organismos han sido utilizados entre los cuales se encuentran; mosquitos del género *Toxorhynchites* (WHO, 1982), algunos copépodos como *Mesocyclops longisetus* (Marten, Cush, Fernandez, Boijas, Portillo, 1992) y peces como *Gambusia affinis* y *Poecilia reticulata*, los cuales se alimentan de los estadios larvarios de este vector (WHO, 1982).

3.2.2 Control genético

Los métodos genéticos consisten en la esterilización y modificación genética de mosquitos. Entre estos tenemos la técnica del insecto estéril. Esta se basa en la liberación de machos estériles los cuales han sido expuestos a radiación o han sido esterilizados a través de productos químicos, causando daños en el cromosoma del vector o mutaciones en el esperma del vector (Alphey, Benedict, Bellini, Clark, Dame, Service, 2010). Esta técnica ha tenido éxito en la eliminación de otros vectores como *Cochliomyia hominivorax* en el sur de los Estados Unidos, México y América Central. También ha tenido éxito en la eliminación de *Cx. quinquefasciatus* en florida y *Anopheles albimanus* en el Salvador (Patterson, Weidhaas, Ford, Lofgren, 1970).

3.2.3 Control químico

El control químico consiste en el uso de insecticidas sintéticos (Consoli & Lourenço, 1994; Rose, 2001). Estos insecticidas son sustancias sintéticas utilizadas para la prevención y control de plagas. (Solis, 2000). El uso de este método para el control de *Ae. aegypti* se desarrolla empleando un mínimo de insecticidas en donde se seleccionan aquellos productos más seguros, con baja toxicidad, alta eficiencia y que no contaminen el ambiente. Según el estadio del vector son utilizados larvicidas o adulticidas.

Los larvicidas son agentes químicos que matan o evitan el desarrollo de los mosquitos en su etapa inmadura (CDC, 2016). El método más usado para el control de estadios inmaduros de *Ae. aegypti* se basa en el tratamiento periódico de los criaderos con larvicidas (Grisales, Poupardin, Gómez, González, Ranson, 2013). Diversos larvicidas son utilizados entre los principales se encuentran temephos, piriproxifen, metropreno y diflubenzuro. El temephos es un insecticida organofosforado usado para el control de los estadios larvales de este vector, debido a su bajo costo y alta efectividad han sido utilizados comúnmente en Latinoamérica (WHO, 2009; Chavasse, Yap, 1997, Ranson, Burhani, Lumjuan, 2009). Sin embargo, en Brasil, Cuba, El Salvador, Argentina, Bolivia, Venezuela, Perú y Colombia se ha reportado resistencia a este insecticida (Grisales, Poupardin, Gomez, Gonzalez, Ranson, 2013). Como resultado del uso de piriproxifen en Colombia en las cuencas se ha observado la disminución de las larvas de este vector lo cual ha disminuido los casos de dengue en este país (Ocampo, Julieth, Carabali, Alexander, Osorio, 2014). En Italia el uso de diflubenzuro en cuencas redujo considerablemente las poblaciones de *Ae. albopictus* y *Cx. pipiens* (Bellini, Albieri, Carrieri, Colonna, Donati, Magnani, M. 2009).

Los adulticidas son insecticidas que atacan la etapa adulta del mosquito (Macheno, Kroeger, Ordoñez, 2001). Los adulticidas únicamente se aplican durante brotes epidémicos de algunas enfermedades transmitidas por este vector (Rodríguez, 2002). El control químico con adulticidas se basa en la fumigación espacial, fumigación residual, fumigación de barrera y el uso de cebos tóxicos (CDC, 2016).

Los insecticidas neurotóxicos se dividen en 4 grandes grupos los cuales están aprobados para el uso en salud pública, estos son: Organoclorados, Organofosforados, Carbamatos y

Piretroides. Estas familias de insecticidas son utilizadas para el control de mosquitos adultos siendo los más usados los insecticidas piretroides.

3.3 Piretroides

Los piretroides son considerados como uno de los insecticidas más eficientes y menos tóxicos (Omoto, 2000, p. 248). Estos tienen una capacidad letal en los insectos con tal solo una dosis baja, por lo tanto, los piretroides han sustituido completamente el uso de otras clases de insecticidas para el control de plagas (Omoto, 2000, p.248). Los piretroides representan el 23% de los insecticidas químicos en el mundo, lo cual representa casi una cuarta parte del mercado en todo el mundo (Schleier, Peterson, 2011). Estos son los más utilizados a nivel mundial para el control de *Ae. aegypti*. Además, los piretroides son la única clase de insecticidas aprobada por el Sistema de Plaguicidas de la Organización Mundial de la Salud para la impregnación de mosquiteros (WHO, 2007). Estos también son utilizados principalmente para el rociamiento peridomiciliar e intradomiciliar para el control de *Ae. aegypti*, los vectores de la malaria y para el control de plagas en la agricultura (CDC, 2016).

En 1980 los insecticidas piretroides fueron introducidos al mercado y debido a las grandes ventajas que presentaban han sido utilizados de una forma extensa a nivel mundial (Klaassen, 1996). Anualmente se utilizan en todo el mundo unas 39 toneladas de piretroides. El 76% se utiliza para el rociamiento espacial y el 24% para rociamiento peridomiciliar. Los países de la región del Pacífico occidental usan alrededor del 50% del uso global total de insecticidas piretroides, mientras que el continente Americano usa alrededor del 47%. El principal control de *Ae. aegypti* se ha realizado utilizando con cipermetrina (37%) y permetrina (45%), seguida de alfa-cipermetrina (14%) (Zaim, Jambulingam, 2007). Sin embargo, deltametrina es uno de los insecticidas que más se utiliza en Latinoamérica desde la década de 1990 (Bisset, Rodríguez, San Martín, Romero, Montoya, 2009).

Los insecticidas piretroides son moléculas sintéticas análogas del ácido crisantémico (piretroides I) y ésteres del ácido pirétrico (piretroides II), estos compuestos se encuentran naturalmente en las hojas de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Davies, Williamson, 2007, p.151-162). Se distinguen químicamente como piretroides tipo I, a los compuestos que carecen de un grupo alfa-ciano, como la piretrina, aletrina, tetrametrina, kade-trina,

resmetrina, fenotrina y permetrina. En países como Tailandia (Yaicharoen, Kiatfuengfoo, Chareonviriyaphap, Rongnoparut, 2005; Husham, Abdalmagid, Brair, 2010), Malasia (Wan, Nazni, Noramiza, Shafa'arKo'ohar, Hisham, Nor, 2010), Vietnam (Kawada, Higa, Komagata, Kasai, Tomita, Thi, 2009), El Salvador (Bisset, Rodríguez, Cáceres, 2003), Cuba (Rodríguez, Bisset, Ricardo, Pérez, Montada, Figueredo, 2010), México (García, Flores, Fernández, Saavedra, Reyes, Lozano, 2009), Brasil (Montella, Martins, Viana, Lima, Braga, Valle, 2007), Argentina (Lima, Silva, Galardo, Soares, Braga, 2003) y el continente africano utilizan permetrina para el control de dicho vector.

Las piretrinas tipo 2 se caracterizan por tener un grupo alfa-ciano, como la deltametrina, cipermetrina, fenpropantrin, cyfenotrin, fenvalerate y fluvalinate. (Davies, Williamson, 2007, p.151-162). En países como, Tailandia (Yaicharoen, Kiatfuengfoo, Chareonviriyaphap, Rongnoparut, 2005; Husham, Abdalmagid, Brair, 2010), Vietnam (Kawada, Higa, Komagata, Kasai, Tomita, Thi, 2009), Cuba (Rodríguez, Bisset, Ricardo, Pérez, Montada, Figueredo, 2010), Panamá, Brasil (Montella, Martins, Viana, Lima, Braga, Valle, 2007), Colombia (Ocampo, Salazar, Mina, McAllister, Brogdon, 2011), Guayana Francesa (ISAT, 2013) y la isla Martinica utilizan deltametrina para el control de dicho vector (Marcombe, Poupardin, Darriet, Reynaud, Bonnet, Strode, 2009).

Los insecticidas piretroides presentan varias ventajas tales como: son biodegradables, no son acumulativos, baja toxicidad para los humanos, aves y mamíferos. También tiene un bajo costo operativo y una alta toxicidad para los mosquitos. Entre los más comunes se encuentran la deltametrina, aletrina, cipermetrina, permetrina, resmetrina y tetrametrin (Marquardt, Demare, Grieve, 2000).

La acción de este insecticida es a nivel nervioso, lo cual genera una alteración de la transmisión del impulso nervioso (Marquardt, Demare, Grieve, 2000). El modo de acción de los piretroides se centra en el canal de sodio dependiente de voltaje (Na_v), este canal está conformado por proteínas transmembranas integrales, compuestas de cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno compuesto de seis hélices (S1-S6) conectadas por bucles (Schleier, Peterson, 2011). El efecto de los piretroides sobre el canal de sodio es estérico específico; este efecto consiste en la apertura de los canales de sodio prolongada debido a la presencia de este tipo de insecticida (Anandamo, 2015, p.20).

3.3.1 Resistencia a piretroides

La resistencia a insecticidas se define como la capacidad de una especie para soportar una dosis letal de sustancias tóxicas, la cual sería letal para la mayoría de los individuos de una población (Subramanyam, Hagstrum, 1996). Este fenómeno puede también tratarse de un caso típico de selección natural en donde se produce un aumento de las frecuencias relativas de los individuos pre-adaptados en la población, lo cual es resultado de la aplicación continua del mismo insecticida (Crow, 1957). Según la Organización Mundial de la Salud se ha reportado por lo menos resistencia a un insecticida en 64 países con malaria endémica (WHO, 2012).

Los mecanismos de resistencia a los insecticidas en los mosquitos pueden dividirse en 4 grandes categorías; penetración reducida, comportamiento, mutaciones no sinónimas que afectan a las proteínas objetivo de los insecticidas o comúnmente conocidas como mutaciones del sitio diana y resistencia metabólica. La reducción de la penetración de insecticidas se basa en la modificación cuticular del insecto (Balabanidou, Kampouraki, MacLean, Blomquist, Tittiger, Juarez, 2016; Wood, Hanrahan, Coetzee, Koekemoer, Brooke, 2010). Estos insectos pueden desarrollar cutículas gruesas o alteradas las cuales reducen la penetración de los insecticidas (Apperson y Georghiou, 1975). Este mecanismo confiere un bajo nivel de resistencia, pero en combinación con otros mecanismos de resistencia puede potenciarse, únicamente ha sido identificado en especies de *Anopheles*, sin embargo sigue siendo poco conocido como un mecanismo de resistencia en los mosquitos, y su importancia en las especies de *Aedes* aún debe ser confirmada (Balabanidou, Kampouraki, MacLean, Blomquist, Tittiger, Juarez, 2016; Wood, Hanrahan, Coetzee, Koekemoer, Brooke, 2010).

La resistencia por comportamiento ocurre cuando el insecto reduce o evita el contacto con los insecticidas. Estos insectos desarrollan un comportamiento que aleja a los individuos de los lugares donde se encuentran el insecticida (Rodríguez, 2008). El uso de insecticidas como el DDT y algunos piretroides como la permetrina, producen cambios en el comportamiento de los mosquitos como aumentar la proporción de escape o salida de los domicilios, también reducen la entrada de los mosquitos a los domicilios o disminuyen los tiempos de picadura (Lines, Myamba, Curtis, 1987; Mbogo *et al*, 1996). En Tailandia el uso DDT para rociamiento intradomiciliario como parte de una campaña de control de la

malaria modificó el hábito de reposo de *An. minimus*, de reposo intradomicial a extradomiciliar (Bang, 1985), Sin embargo, a pesar de los estudios ya mencionados no se tiene certeza si este mecanismo puede ser considerado como resistencia. Los 2 principales mecanismos de resistencia de los mosquitos del género *Aedes* son mutaciones del sitio diana y resistencia metabólica (Moyes, Vontas, Martins, Ng, Koou, 2017).

3.3.2 Resistencia metabólica

La resistencia metabólica es producida por la sobreexpresión o la actividad elevada, o un cambio de conformación en las enzimas que están involucradas en los procesos metabólicos, secuestro y excreción de insecticidas (Moyes, Vontas, Martins, Ng, Koou, 2017). Estas enzimas pueden también aumentar la actividad de su centro catalítico lo cual puede aumentar la especificidad sobre uno o más insecticidas. Las principales enzimas metabólicas involucradas en este tipo de resistencias son; Citocromo P450, Glutacion S-transferasa y Carboxilcolinesteras (Hemingway, Hawkes, McCarroll, Ranson, 2004).

3.3.2.1 Carboxilcolinesterasas.

Son enzimas que pertenecen al grupo de las esterasas, las cuales tienen una alta especificidad de sustratos, son capaces de metabolizar dichos sustratos mediante la hidrólisis de los enlaces éster. Estas enzimas tienen una estructura conformada por aminoácidos esenciales para el desempeño de su actividad catalítica, la mutación de alguno de estos amino ácidos puede producir la pérdida de su actividad catalítica (Redinbo, Potter, 2005).

Las enzimas esterasas pueden clasificarse por su secuencia nucleotídica, por su preferencia por los sustratos α o β naftol (α NA y β NA) o sus patrones electroforéticos (Gonzales, 2013). Las carboxilesterasas tienen un papel fundamental en la detoxificación y tolerancia de algunos insecticidas (Walker, Hopkin, Sibly, Peakall, 2001). El alto contenido de enlaces ésteres en algunos insecticidas y la sobreproducción de esterasas y el aumento de la actividad de éstas, da como resultado cepas de insectos resistentes a estos insecticidas. En los insectos resistentes, esta condición hace que el insecticida no alcance el sitio blanco, lo cual produce el aumento en las frecuencias de interacción esterasa-insecticida (Scott, 1995).

La sobreproducción de dichas enzimas se puede deber a la presión de selección que ejerce los insecticidas carbamatos y organofosforados. En *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* se ha detectado resistencia a temefos, la cual está relacionada a las alfa-esterasas CCEAE3A y CCEAE6A, debido a la amplificación genética en estas especies (Poupardin, R., Srisukontarat, Yunta, Ranson, 2014). En ambas especies CCEAE3A tiene la capacidad de metabolizar y secuestrar el temefos (Grigoraki, Balabanidou, Meristoudis, Miridakis, Ranson, Swevers, 2016).

3.3.2.2 Glutation S-Transferasas

Es una familia de enzimas que se encargan de catalizar la conjugación de glutatión endógeno a una gran cantidad y variedad de compuestos electrofílicos (Gonzales, 2013). Esto lleva a la protección de proteínas, ácidos nucleicos y macromoléculas. Estas enzimas diméricas multifuncionales se encargan de detoxificar una gran cantidad de xenobióticos (Rodríguez, 2008). Las Glutation S- Transferasas (GTS) de las clases Delta y Elipson han sido relacionadas con resistencia a insecticidas en mosquitos (Gonzales, 2013). Esta familia de enzimas ha sido reportada en una gran variedad de mosquitos, moscas y drosófilos.

En *Ae. aegypti* la sobreproducción de por lo menos dos grupos de estas enzimas están relacionadas con la resistencia al insecticida DDT (Gonzales, 2013). Las GTS de la clase épsilon en *Ae. aegypti* está asociada a resistencia a insecticidas a DDT y a insecticidas piretroides, esto debido a la dechloración directa sobre dichos insecticidas (Ranson, Hemingway, 2005). Estas enzimas brindan resistencia a insecticidas piretroides ya que actúan sobre lípidos producidos por la peroxidación de los piretroides, como resultado se protege a los tejidos de cualquier daño oxidativo (Rodríguez, 2008). Esto también produce un mecanismo de secuestro hacia las moléculas de los insecticidas piretroides lo que produce una protección pasiva (Kostaropoulos, Metaxakis, Boukouvala, Papadopoulou, 2001)

3.3.2.3 Citocromo P450 monoxigenasas

El Citocromo P450 (CYP-450) es una familia de hemoproteínas que se encuentra en una gran variedad de organismos. Estas enzimas son capaces de metabolizar una gran cantidad y variedad de xenobióticos y sustancias producidas por los mismos organismos (Santoyo, Montesinos, Barbosa, García, Rodríguez, Ramos, 2014). También estas tienen un amplio

rango de sustratos, pero comúnmente metabolizan sustratos lipofílicos y se producen moléculas solubles al agua o con grupos funcionales que permiten reacciones de conjugación y se promueve la excreción de estas (Gonzales, 2013).

Las monoxidasas han demostrado estar relacionada con la resistencia a insecticidas como el DDT, carbamatos e insecticidas organofosforados, ya que se ha evidenciado en cepas de insectos resistentes un nivel de actividad oxidativa mayor en comparación con cepas de insectos susceptibles (Saume, 1992).

3.3.3 Resistencia por sitio blanco

La resistencia por sitio blanco está basada en alteraciones en el sitio blanco o una disminución en la sensibilidad de éste, lo cual da como resultado que el insecticida no puede unirse al sitio específico de acción en el organismo (Hemingway, Ranson, 2000). Las mayorías de los sitios blancos de acción de los insecticidas son proteínas que desempeñan funciones fundamentales en el sistema nervioso de los mosquitos. Por lo tanto, cualquier mutación no sinónima en estas proteínas o en los sitios de acción pueden disminuir la afinidad de los insecticidas a su sitio o proteína diana con la cual produciría resistencia en el individuo (Davies, Field, Usherwood Williamson, 2007; Weill, Malcolm, Chandre, Mogensen, Berthomieu, Marquine, 2004). Las mutaciones no sinónimas se basan en el cambio de un nucleótido lo cual modifica el codón y producen un cambio de aminoácido, esto genera modificaciones en la estructura de la proteína codificante (Ramírez, Vargas, Tovilla, Frago, 2013). La mayoría de las mutaciones no sinónimas en los sitios diana que afectan a los insecticidas químicos como los piretroides se encuentran fijadas en los taxones (Davies, Field, Usherwood Williamson, 2007; Weill, Malcolm, Chandre, Mogensen, Berthomieu, Marquine, 2004). Se han encontrado tres blancos principales de acción de los insecticidas los cuales son afectados por la sustitución de un aminoácido en dicho sitio; enzimas acetilcolinesterasas sitios blancos de insecticidas organofosforados y carbamatos, receptores GABA, los cuales son el sitio blanco de los insecticidas cicloides y los canales de sodio de la membrana de células nerviosas, sitios de acción de los insecticidas organoclorados y piretroides (Moyes, Vontas, Martins, Ng, Koou, 2017).

3.3.3.1 Canal de sodio controlado por voltaje (Nav)

El canal de sodio está formado por un poro selectivo de iones de sodio situado en la membrana celular. Cuando la célula nerviosa está en reposo los canales de sodio se

encuentran cerrados, más cuando la membrana se despolariza los canales se abren. El flujo de iones a través de los canales de sodio activados son los responsables del aumento del potencial de acción de la célula. Posterior a la apertura los canales de sodio son rápidamente inactivados, este proceso es el responsable del descenso del potencial de acción (Dong, *et al.*, 2014). El canal de sodio controlado por voltaje está conformado por proteínas transmembrana integrales, compuestas de cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno compuesto de seis hélices (S1-S6) conectadas por bucles (Schleier, Peterson, 2011). El efecto de los piretroides sobre el canal de sodio es estérico específico; este efecto consiste en que la apertura de los canales de sodio se prolonga debido a la presencia de este tipo de insecticida (Anandamo, 2015, p.20).

Muchos estudios han confirmado que existen mutaciones Nav las cuales son conocidas como resistencia por noqueo (knock-down resistance, por su nombre en inglés), La resistencia por noqueo es causada por una reducción en la sensibilidad del sistema nervioso del insecto a los piretroides (Anandamo, 2015, p.20). Estas mutaciones son muy comunes en *Ae. aegypti* en donde se han reportado 10 mutaciones en 8 codones diferentes de los dominios II-IV.

Entre las principales mutaciones se encuentran F1534C, V1016I/G, S989P, I1011M/V. La presencia de estas mutaciones se puede deber al uso prolongado, permanente y desmedido de insecticidas piretroides para el control de este vector. La mutación S989P es el resultado de un cambio de una serina a prolina la cual se da en el codón 989 del dominio II (Srisawat, R., Komalamisra, N., Eshita, y., Zheng, M., Ono, K. 2010). Esta mutación está asociada a resistencia a piretroides tipo II como deltametrina. Esta mutación se encuentra en el continente asiático, particularmente en Tailandia (Grisales, Poupardin, Gomez, Gonzalez, Ranson, Lenhart, 2013).

Las mutaciones I1011V/M consisten en el cambio de una isoleucina a una valina o a una metionina en el codón 1011 en el dominio II. Ambas mutaciones están relacionadas a cypermetrina y deltametrina (Bisset, Rodríguez, Fernández, 2006; Lee, Choong, Goh, Ng, Lam, 2014). La mutación I1011V/M ha sido reportada para México, Cuba, Venezuela, México, Costa Rica, Nicaragua y Panamá (Saavedra *et al.*, 2007).

La mutación F1534C consiste en un cambio de una fenilalanina a una cisteína en el codón 1534 en el dominio III (Yanola, Somboon, Walton, Nachaiwieng, Prapanthadara, 2010).

Esta mutación confiere resistencia a piretroides I principalmente a permetrina y a DDT. La asociación de esta mutación con las mutaciones S989P y V1016G produce resistencia a deltametrina, esto se confirmó en cepas provenientes de Tailandia en donde individuos heterocigótico con las tres mutaciones presentaron resistencia a deltametrina (Plernsub, Saingamsook, Yanola, Lumjuan, Tippawangkosol, Sukontason, Somboon, 2016). La mutación F1534C es la más extendida a nivel mundial, ya que se encuentra en el continente asiático, africano y en Latinoamérica en países como México (Maloof, Saavedra, Elizondo, Lozano, 2015), Venezuela (Álvarez, Ponce, Saavedra, López, Flores, 2014), Colombia (Atencia, *et al.*, 2016) Islas Caimán (Harris, Rajatileka, Ranson, 2010), Islas Guadalupe, Nueva Guinea (Dusfour, Zorrilla, Guidez, Issaly, Girod, 2015) y Brasil (Linss, Brito, Garcia, Araki, Bruno, Lima, 2014), sin embargo para la región de Centroamérica no ha sido reportada.

Las mutaciones V1016I/G consisten en un cambio de aminoácido de valina a glicina para la mutación V1016G, o a isoleucina para la mutación V1016I, ambas ocurren en el codón 1016, del dominio II. Ambas mutaciones confieren resistencia a insecticidas piretroides del tipo I y II como permetrina y deltametrina (Bregues, Hawkes, Chandre, McCarroll, Duchon, Guillet, 2003; Stenhouse, Plernsub, Yanola, Lumjuan, Dantrakool, Choochote, 2013). Sin embargo hay estudios contradictorios que determinan que la mutación V1016I no confieren resistencia al derribo por insecticidas piretroides (Du, *et al.*, 2013). Para ambas variantes de la misma mutación, la resistencia a piretroides por derribo aumenta al estar en conjunto con la mutación F1534C, previamente descrita. Se ha descubierto que cuando la mutación V1016G se encuentra asociada con la mutación S989P aumenta el grado de resistencia a permetrina que encontrándose sola. La mutación V1016G ha sido reportada para una gran cantidad de países asiáticos entre los cuales se encuentran: Indonesia (Sayono, *et al.*, 2016), Tailandia (Rajatileka, Black, Saavedra, Trongtokit, Apiwathnasorn, McCall, 2008), Vietnam (Kawada, Higa, Komagata, Kasai, Tomita, Thi, 2009), Taiwan (Chang, Shen, Wang, Lin, Hsu, Dai, 2009), Bhutan (Yanola, Somboon, Walton, Nachaiwieng, Somwang, Prapanthadara, 2011), Myanmar (Kawada, Thaung, Kawashima, Maung, Thu, 2014), Singapore (Kasai, Komagata, Itokawa, Shono, Ng, Kobayashi, 2015), Malaysia (Ishak, Jaal, Ranson, Wondji, 2015) y China (Li, Kaufman, Xue, Zhao, Wang, Yan, 2015). Sin embargo, esta mutación no se ha reportado tanto para el continente

americano como para el continente europeo. Por otro lado, la mutación V1016I ha sido reportada para el continente americano en países como; Venezuela (Álvarez, Ponce, Saavedra, López, Flores, 2014), Colombia (Atencia, *et al.*, 2016) Islas Caimán (Harris, Rajatileka, Ranson, 2010), Islas Guadalupe, Nueva Guinea (Dusfour, Zorrilla, Guidez, Issaly, Girod, 2015) , Brasil (Linss, Brito, Garcia, Araki, Bruno, Lima, 2014), Nicaragua, Costa Rica y Panamá (Saavedra *et al.*, 2007).

3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente (Rodríguez, Barrera, 2015).

La PCR ha sido implementado para la detección de agentes etiológicos, pasando por genotipificación, análisis de enfermedades genéticas, oncológicas, amplificación y modificación de fragmentos de ADN (Bolívar, Rojas, García, 2014, p.26). Mediante la técnica de PCR se puede demostrar la presencia de agentes etiológicos, gracias a que se amplifica un fragmento del ADN genómico de los microorganismos (Pulido, Mogollón, Morales, Rincón, 2006).

Los elementos fundamentales en las reacciones de esta técnica son el templado (ADN o ADNc), los oligonucleótidos o cebadores, el ion magnesio, las soluciones amortiguadoras, agua y la enzima (Tamay, Ibarra, Velasquillo, 2013). Cada uno de estos elementos interactúa durante las tres etapas fundamentales de la reacción; Desnaturalización, hibridación y extensión. Dichas reacciones se llevan a cabo mediante termocicladores los cuales bajan y suben la temperatura en pasos discretos, precisos y preprogramados (Tamay, Ibarra, Velasquillo, 2013). Al finalizar la reacción de PCR se visualizan los productos de PCR, esto puede realizarse mediante dos métodos; el primer método consiste en la tinción del producto de ADN amplificado mediante bromuro de etidio, este colorante se intercala entre las dos hebras del producto (Garibyan, Avashia, 2013). El segundo método consiste en marcar los cebadores del PCR con fluoróforos antes de la amplificación por PCR. El análisis de los productos de PCR se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa, estos permite la separación de los productos de ADN en función del tamaño y carga (Garibyan, Avashia, 2013). Durante el tiempo se ha desarrollado diferentes técnicas de PCR entre las

cuales se encuentran; PCR anidado, PCR en tiempo real, PCR multiplex, PCR alelo específico etc.

3.4.1 PCR alelo específico

La reacción en cadena de la polimerasa alelo específica (AS-PCR), se basa en la detección de polimorfismos en un solo nucleótido (SNP) (Darawi, Ai-Vyrn, Ramasamy, Hua, Pin, Kamaruzzaman, Majeed, 2013). En esta PCR los cebadores específicos están diseñados para permitir la amplificación por la ADN polimerasa únicamente si el nucleótido en el extremo 3' del cebador complementa perfectamente con la base del alelo silvestre o con la variante (Darawi, et al., 2013). Al finalizar la reacción de PCR y después de la electroforesis se puede diferenciar los productos de PCR específicos los cuales permiten la diferenciación de los SNP. Se han implementado diferentes métodos para detectar la presencia de productos específicos de PCR. Entre estos métodos se encuentran los que se basan en la hibridación de la sonda la cual requiere sondas marcadas específicamente (Myakishev, Khiripin, Hu, Hamer, 2001) y los que se basan en el análisis de la curva de fusión en donde permite la diferenciación de los productos específicos de PCR por su temperatura de fusión (Germer, Higuchi, 1999).

La técnica de PCR alelo específico ha sido utilizada en un gran variedad de áreas de estudios entre las cuales se encuentran; farmacogenética, microbiología y trastornos genéticos. Esta técnica ha sido utilizada ampliamente para la detecciones de mutaciones en el gen que codifica el canal de sodio controlado por voltaje en *Aedes aegypti*. Durante 2007 fueron diseñados por primera vez PCR alelo específicos para las mutaciones I1011M, I1011V, V1016I y V1016G en *Aedes aegypti* (Saavedra et al., 2007). En dicho estudio fue detectada por primera vez la mutación V1016I en Islas Mujeres, México y en Santiago de Cuba. Durante el 2010 fue diseñado una PCR alelo específico para la mutación F1534C en donde dicha mutación fue identificada en Tailandia en poblaciones de *Aedes aegypti* (Yanola, Somboon, Walton, Nachaiwieng, Prapanthadara, 2010).

4. Justificaciones del trabajo

Los mosquitos hembras de la especie *Ae. aegypti* son de gran importancia para salud pública por ser el vector primario para varios virus arbóreos. Entre los cuales se encuentran el virus de dengue, chikungunya, zika y la fiebre amarilla (Kantor, 2016). Solamente en el 2016, para la región centroamericana, se reportaron 286,895 casos y 63 muertes por el virus del dengue (OPS, 2016). Durante este mismo año para el virus del zika se reportaron 5,491 casos (PAHO, WHO, 2016) y para el virus chikungunya se reportaron 866 casos y 1 muerte (OPS, OMS, 2016). Estos datos reflejan la gran importancia de estas enfermedades para la región centroamericana. (OPS, 2016).

Debido al gran número de casos reportados en la región el control del vector es una estrategia vital para la reducción de estas enfermedades. Para el control y la erradicación de *Ae. aegypti* uno de los métodos más utilizados es el control químico (Rodríguez, 2002) utilizando insecticidas tales como los piretroides, (Saavedra, Ponce, Fernández, Torres, Flores, 2007). La deltametrina, un piretroide, es uno de los insecticidas más utilizados en Latinoamérica desde la década de 1990 (Bisset, Rodríguez, San Martín, Romero, Montoya, 2009). El uso permanente y excesivo de piretroides ha tenido como resultado el desarrollo de resistencia a estos insecticidas. Esto se debe a la presión de selección que ejercen estos insecticidas sobre los genes resistentes en las poblaciones de *Ae. aegypti* (WHO, 1981). En Latinoamérica se han reportado mutaciones en el gen del canal de sodio controlado por voltaje en poblaciones de *Ae. aegypti*. Estas mutaciones confieren resistencia a insecticidas piretroides, entre estas se encuentran: F1534C asociada a resistencia a permetrina, V1016I asociada a deltametrina y permetrina (Dong, *et al.*, 2014) y I1011V/M asociada a resistencia a permetrina (Saavedra *et al.*, 2007).

En Centroamérica se han utilizado principalmente insecticidas piretroides para el control de *Aedes aegypti*. Sin embargo, en países como El Salvador (Bisset, *et al.*, 2009), Honduras (Ávila, Araujo, Herrera, 2010), Panamá (Cáceres, Rovira, García, Torres, Cruz, 2013) y Costa Rica (Calderón, Troyo, 2016), se han realizado pruebas de resistencia a insecticidas piretroides, donde los resultados indican que las cepas de esta especie presentan indicios de resistencia a esta familia de insecticidas. Es importante resaltar que para la mayoría de países de Centroamérica se desconoce o se tiene muy poca información de que mecanismo está involucrado en esta resistencia. Únicamente para Costa Rica, se ha realizado un estudio

relacionado con detoxificación enzimática, donde la resistencia a piretroides está relacionada a la familia de enzimas citocromo P450 monooxigenasas (Calderón, Troyo, 2016). Aunque, para toda la región centroamericana se desconoce si la resistencia a los piretroides está relacionada con las mutaciones F1534C, y/o V1016I y si la mutación F1534C se encuentra en la región. Por lo tanto, es necesario saber si estas mutaciones se encuentran en esta región y si son las responsables de producir resistencia a insecticidas piretroides. La detección temprana de estas mutaciones contribuirá, al mejoramiento y desarrollo de nuevas estrategias para el control de este vector en la región Centroamericana, con la expectativa de impactar significativamente en el riesgo de la transmisión.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general: Determinar la prevalencia de las mutaciones F1534C y V1016I en el gen que codifica el canal de sodio controlado por voltaje, en individuos de la especie *Aedes aegypti* colectados en Centroamérica.

5.2 Objetivos específicos:

5.2.1 Determinar en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* la presencia de las mutaciones F1534C y V1016I en el gen que codifica el canal de sodio controlado por voltaje.

5.2.2 Determinar la correlación entre la resistencia de derribo a insecticidas piretroides en mosquitos *Aedes aegypti* fenotípicamente resistentes al derribo y susceptibles al derribo por insecticidas piretroides, y la presencia o ausencia de las mutaciones F1534C y V1016I en el gen que codifica el canal de sodio controlado por voltaje.

5.2.3 Determinar el genotipo de los diferentes individuos de la especie *Aedes aegypti* en base a las mutaciones F1534C y V1016I en el gen que codifica el canal de sodio controlado por voltaje.

6. Hipótesis

La resistencia al derribo a insecticidas piretroides en las poblaciones de *Aedes aegypti* de la región de Centroamérica está asociada a las mutaciones F1534C y V1016I en el canal de sodio controlado por voltaje.

7. Materiales y Métodos

7.1 Universo:

Población: Mosquitos de la especie de *Aedes aegypti* de la región Centroamérica colectados durante el año 2017.

Muestra: Se seleccionaron 50 mosquitos de la especie *Aedes aegypti* sometidos a pruebas de resistencia a insecticidas piretroides (deltametrina y permetrina) de tres países; Panamá; (Chorrera y Chiriqui), Costa Rica (Limón) y Guatemala; (Prados del Río) lo cual da un total de 200 individuos. Basado en Marquardt, *et al.*, 2000, el tamaño de la muestra permitirá calcular las frecuencias alélicas y genotípicas con un intervalo de confianza del 95% para cada población según el país.

7.2 Materiales

Instrumentos

- Tubos de 1.5 – 2.00mL estériles
- Sharpie punta ultrafina
- Micro-pipeta de 0.5-10 μ L, 2-20 μ L, 20-200 μ L y 100-1000 μ L
- Pistilos plásticos estériles
- Papel absorbente
- Bolsa para descarte
- Gradillas para tubos de 1.5 o 2mL
- Beaker de 500 mL o un recipiente de descarte
- Beaker de 1000 mL para descartar
- Pinza entomológica
- Tubos para PCR 0.2mL
- Tubos de 1.5 mL
- Puntas bloqueadas de 0.5 - 10 μ L, 20- 200 μ L, y 100 - 1000 μ L
- Gradillas para tubos de 0.2 μ L y 1.5 mL
- Guantes de nitrilo
- Cinta Adhesiva
- Marcador con punta ultra fina
- Contenedor para descarte

- Bolsa roja para descarte
- Kimwipes
- Espátulas
- Gradilla fría para tubos de 0.2
- Placas ópticas para PCR en tiempo real
- Tiras de tubos ópticos para PCR en tiempo real
- Tapaderas para tubos ópticos
- Adhesivo para placas de PCR

Cristalería

- Botella con Rosca de 1L
- Erlenmeyer de 25mL
- Erlenmeyer de 50mL
- Probeta de 30mL
- Probeta de 50mL
- Botellas Wheaton con tapa de rosca de 250 mL
- Botella de vidrio 100 mL

Equipo

- Refrigeradora 4°C
- Congelador -20°C
- Centrífuga (Hettich Mikro 120, Hettich EBA 12R o Eppendorf 5418R)
- Termociclador (Applied Biosystems)
- Vortex
- Nanodrop (Thermo Fisher Scientific)
- Mini-Centrífuga
- Gradilla fría a -20°C para tubos de PCR 0.2mL
- Equipo de Computación
- Balanza Semianalítica
- Horno Microondas
- Sistema de Fundición de gel de Agarosa (Molde)

- Aspirador para mosquitos
- Cronómetro

Reactivos

- Go Taq® Hot Start Polymerase (Promega)
- 5X Green Go Taq Flexi Buffer (Promega)
- 5X Colorless Go Taq Flexi Buffer (Promega)
- MgCl₂, 25 nM (Promega)
- DNTPs 10mM Mix (Promega)
- Agua Destilada grado Biología Molecular (Gene Choice)
- DNAzol
- Etanol absoluto (Merck)
- Etanol 70 % (QUIMIPROVA)
- Agarosa Grado Molecular
- Bromuro de Etidio
- Buffer TBE 1X
- Buffer TBE 10X
- Acetona
- Deltametrina
- Permetrina
- SYBR Green

Cebadores

- Cebador reverso F1534; (Yanola *et al.*, 2010e)
- Cebador directo F1534 (Yanola *et al.*, 2010)
- Cebador directo C1534 (Yanola *et al.*, 2010)
- Cebador directo V1016 (Saavedra *et al.*, 2007)
- Cebador directo I1016 (Saavedra *et al.*, 2007)
- Cebador reverso I1016 (Saavedra *et al.*, 2007)
- Cebador AaNa31F (Harris *et al.*, 2010)

- Cebador AaNa31R (Harris *et al.*, 2010)
- Cebador IIS5-6_F (Nazawi *et al.*, 2017)
- Cebador IIS5-6_R (Nazawi *et al.*, 2017)

7.3 Metodología

7.3.1 Selección de muestras

Fueron seleccionados aleatoriamente 50 mosquitos susceptibles o resistentes a insecticidas piretroides, (deltametrina y permetrina) de cada localidad por cada país (Marquardt, *et al.*, 2000). Esta selección se realizó utilizando el programa Excel. Se enumeró cada mosquito según su localidad, luego se utilizó la función aleatoria donde se le asignó un número al azar del 0 al 1 para cada mosquito. Para realizar la selección al azar fueron seleccionados tanto los números generados al azar y los utilizados para la enumeración de las muestras. Luego se ordenaron los números aleatorios en forma ascendente, y se seleccionaron los primeros cincuenta individuos identificados por el número correlativo de la muestra.

7.3.2 Extracción de ADN genómico en mosquitos *Aedes aegypti*

ADN genómico fue extraído de todos los mosquitos seleccionados de manera individual. Los mosquitos fueron individualizados en tubos Eppendorf de 1.5 mL, a cada individuo se le agregó 100 μ L de DNazol y fue macerado con un pistilo de plástico estéril hasta no ver partes reconocibles. Se centrifugaron los tubos por 10 minutos a 10,400 rpm (Centrífuga Hettich Mikro 120) a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante de cada muestra a un nuevo tubo de 1.5 mL estéril rotulado con el número de muestra (ID) del mosquito, fecha y las siglas ADN. El pellet del macerado fue almacenado a -20°C para posteriores extracciones. Se agregaron 500 μ L de etanol absoluto a cada tubo que contenía el sobrenadante y fue mezclado por inversión 8 veces. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 3 minutos y luego se centrifugó a 6,600 rpm (Centrífuga Hettich Mikro 120) por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante de cada muestra fue removido y se lavó el pellet con 800 μ L de etanol 70%. Posteriormente fue mezclado por inversión 6 veces y centrifugado a 6,600 rpm (Centrífuga Hettich Mikro 120) por 5 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente se removió el sobrenadante de cada muestra, y el pellet fue lavado con 800 μ L de etanol 70%, se mezcló por inversión 6 veces y se centrifugó a 6,600 rpm (Centrífuga Hettich Mikro 120) por 5 minutos a temperatura ambiente. Una

vez más fue removido el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente, boca abajo sobre una toalla de papel dentro de una campana de flujo laminar hasta que se encontró totalmente seco. El secado tomó entre 30 a 45 minutos. Posteriormente se re-suspendió el pellet en 50µL de agua DEPC y fue almacenado a 4°C y se cuantificó inmediatamente utilizando el Nanodrop.

7.3.3 Cuantificación de ADN

Para la cuantificación de ADN genómico en cada una de las muestras fue utilizado el NanoDrop One (Thermo Scientific). Cada muestra fue agitada vigorosamente utilizando un vortex y centrifugada brevemente. Posteriormente se colocó un 1µL de agua DEPC en el NanoDrop One, la cual fue utilizada como blanco de lectura. Luego se colocó 1µL de cada muestra individualmente para ser cuantificada. Las muestras debieron tener una concentración mayor a 10 ng/µL para poder ser analizadas mediante PCR convencional.

7.3.4 PCR convencional

El ensayo de PCR convencional para el codón 1534 (500pb) y el codón 1016 (580pb) fue diseñado en base a los ensayos propuesto por Harris *et al.*, 2010 y Nazawi *et al.*, 2017 sin embargo, este fue utilizado para la obtención de controles por cada genotipo para ambas mutaciones. Para la PCR convencional para el codón 1534 en cada reacción tuvo un volumen de 50µL. En todas las reacciones la amplificación fue realizada utilizando agua ultra pura (26.50µL) buffer 5X Colorless Go Taq Flexi Buffer promega 1x (10µL), MgCl₂ promega 2.5mM (5µL), dNTPs´ 0.2 mM(5µL), hotstart go-taq promega 1.25 U(0.5µL), cebadores (AaNa31F y AaNa31R) a 0.5 µM (0.5µL) y de cada muestra 2µL a una concentración a 1.5 ng/µL. Los parámetros de amplificación para la reacción fueron los siguientes: activación a 95°C por 2 min durante 1 ciclo; desnaturalización a 94°C por 30 seg durante 35 ciclos; hibridación a 59°C por 30 seg durante 35 ciclos; extensión a 72°C por 1 min durante 35 ciclos; extensión final a 72°C por 10 min durante 1 ciclo.

Para la PCR convencional del codón 1016 cada reacción tuvo un volumen de 50µL. En todas las reacciones la amplificación se realizó utilizando agua ultra pura (24.75µL), buffer 5X Colorless Go Taq Flexi Buffer promega 1x (10µL), MgCl₂ promega 1.5mM (3µL), dNTPs´ 0.2 mM (5µL), hotstart go-taq promega 1.25 U (0.25µL), cebadores (IIS5-6_F y IIS5-6_R) a 2.5 µM (2.50µL) y se agregó 2µL de cada muestra a una concentración de 0.3ng/µL. Los parámetros de amplificación para la reacción fueron los siguientes:

activación a 95°C por 2 min durante 1 ciclo; desnaturalización a 94°C por 30 seg durante 40 ciclos; hibridación a 51°C por 30 seg durante 40 ciclos; extensión a 72°C por 1 min durante 40 ciclos; extensión final a 72°C por 10 min durante 1 ciclo. Los productos de amplificación fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% utilizando un marcador de masa molecular de 50 pb Novagen.

7.3.5 Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR de la región de interés fueron purificados utilizando el kit spin Prep PCR clean-up Kit (Merck). Por cada muestra utilizada como control se utilizó de 35µL a 45µL de producto de PCR. Se transfirió el producto de PCR a un tubo de 1.5mL, se agregaron 4 volúmenes del buffer SpinPrep buffer y la mezcla se agitó vigorosamente. En un tubo con capacidad para 2mL con un filtro del Kit SpinPrep se transfirió la mezcla realizada anteriormente a la unidad y se centrifugó a 10,000g x 1min. Se removió el filtro de la unidad y se descartó el material del tubo que recibe. Posteriormente se ensambló de nuevo el filtro en el tubo que recibe de 2mL y se agregó 400 µL de SpinPrep Bind Buffer, se centrifugó la unidad a 10,000 g x 1 minuto. Se removió el filtro de la unidad, se descartó el lavado y se ensambló de nuevo el filtro en el tubo de 2 mL. Se agregó 500µL SpinPrep Wash Buffer, se centrifugó la unidad a 10,000 g x 1min. Nuevamente se removió el filtro de la unidad, se descartó el lavado y se ensambló el filtro en el tubo de 2mL. Se centrifugó la unidad a 10,000 g x 4min y se transfirió el filtro de SpinPrep a un tubo receptor de 1.5mL del kit. Se agregó 50µL del SpinPrep Elute Buffer precalentado a 70°C a la unidad recién ensamblada luego se cerró el tubo y se incubó a 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó por 1 minuto a 10, 000 g para coleccionar el producto de PCR purificado.

7.3.6 Secuenciación y análisis de secuencias

Las muestras utilizadas como controles para cada genotipo por mutación fueron secuenciadas por MacroGen Inc. (Maryland, EEUU) usando los cebadores diseñados para la PCR convencional para la mutación F1534C y V1016I (Harris *et al.*, y Nazawi *et al.*). Se utilizaron 40 µL del producto purificado y 5µL por cebador a 5µM. Se utilizó el Programa FinchTV para visualizar los electroferogramas de cada una de las secuencias y determinar si estas eran aptas para ser analizadas. Los electroferogramas que presentaban ruido o que se encontraban sucios en la región de interés fueron enviados para ser resecuenciados. Para

la identificación y el análisis de las mutaciones se utilizó el programa Mega 6.00 (Tamura, Stecher, Kumar, 2015). Los individuos utilizados como controles presentaron los siguientes genotipos según las mutaciones: F1534/F1534 (Homocigótico silvestre), F1534/C1534 (Heterocigótico), C1534/C1534 (Homocigótico mutante) y V1016/V1016 (Homocigótico silvestre), V1016/I1016 (Heterocigótico) y I1016/I1016 (Homocigótico mutante).

7.3.7 PCR alelo específico

El ensayo de PCR alelo específico para la mutación F1534C y V1016I fue diseñado en base a los ensayos propuesto por Saavedra-Rodríguez *et al.*, y Yanola *et al.*, estos fueron utilizados para la genotipificación de cada una de las muestras. Para el PCR alelo específico para la mutación F1534C en cada reacción se tuvo un volumen de 20 μ L. En todas las reacciones la amplificación se realizó utilizando, 10 μ L SYBR Green 2X, 0.066 μ L del cebador C1534 (50 μ M), 0.2 μ L del cebador directo y reverso F1534 (50 μ M) y 1 μ L de ADN de la muestra a analizar a una concentración de 5ng/ μ L, llegando a un volumen final de 20 μ L con agua ultra pura libre de nucleasas. Los parámetros de amplificación para la reacción fueron los siguientes: activación a 95°C por 3 min durante 1 ciclo, seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 seg, 57°C por 10 seg, 72°C por 30 seg y 95°C por 10seg de extensión final. La curva de desnaturalización se determinó de 65 a 95°C con un incremento de 0.5°C cada 5 seg. Las muestras que tuvieron picos de 83°-85°C correspondieron al genotipo homocigótico mutante (C1534/C1534), las que presentaron dos picos uno a 80°C y otro a 85°C correspondieron al genotipo heterocigótico (F1534/C1534) y un solo pico a 80°C correspondió al genotipo homocigótico silvestre (F1534/F1534). En cada uno de los ensayos para esta mutación se utilizaron controles para cada genotipo.

Para la PCR alelo específico para la mutación V1016I en cada reacción se tuvo un volumen de 20 μ L. En todas las reacciones la amplificación se realizó utilizando 7.50 μ L agua ultra pura, 10 μ L SYBR Green 2X, 0.5 μ L del cebador I1016 (50 μ M), 0.5 μ L del cebador directo y reverso V1016 (50 μ M) y 1 μ L de ADN de la muestra a analizar a una concentración de 5ng/ μ L. Los parámetros de amplificación para la reacción fueron los siguientes: activación a 95°C por 2 min durante 1 ciclo, seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 seg, 60°C por 10 seg 72°C por 30seg y 95°C por 10 seg de extensión final. La curva de desnaturalización se determinó de 65 a 95°C con un incremento de 0.2°C cada 10 seg. Las muestras que tuvieron picos de 79°C correspondieron al genotipo homocigótico mutante (I1016/I1016),

las que presentaron dos picos uno a 79°C y otro a 85°C correspondieron al genotipo heterocigótico (V1016/I1016) y un solo pico a 85°C correspondió al genotipo homocigótico silvestre (V1016/V1016). En cada uno de los ensayos para esta mutación se utilizaron controles para cada genotipo.

7.3.8 Análisis estadístico

Para el cálculo de las frecuencias genotípicas para cada mutación se dividió el número de individuos del genotipo dividido por el número de individuos de la población. Para calcular las frecuencias alélicas para cada mutación (p) y cada alelo silvestre (p) se sumó el número de homocigóticos resistentes o silvestres dos veces y el número de heterocigóticos, dividido dos veces el número de individuos de la población. Se calcularon los intervalos de confianza para cada una de las frecuencias alélicas de las mutaciones (p) y de los alelos silvestres (p) utilizando un valor de confianza del 95%, estos valores se calcularon como intervalos de Wald utilizando la siguiente fórmula:

$$\tilde{p} \pm Z_{\alpha/2} \sqrt{\tilde{p}(1 - \tilde{p})/n}$$

7.3.8.1 Frecuencias alélicas y genotípicas

Se utilizó un valor crítico de Z de 1.96 el cual se ajustó al ser dividido entre dos, el valor de $\alpha = 0.05$, este valor se obtuvo antes de calcular los intervalos de confianza (Agresti, Coull, 1998).

Prueba de Hardy-Weinberg y correlación entre variables cualitativas

Las frecuencias genotípicas esperadas fueron calculadas para cada mutación suponiendo equilibrio de Hardy-Weinberg a partir de las frecuencias alélicas obtenidas mediante el procedimiento descrito anteriormente. Para calcular las frecuencias genotípicas esperadas para los genotipos homocigóticos se elevó al cuadrado el valor de la frecuencia alélica para cada alelo correspondiente al codón de interés; para el genotipo heterocigótico se multiplicaron la frecuencia alélica de todos los alelos entre sí, correspondientes al codón de interés donde se encuentre la mutación a evaluar y luego este valor se multiplicó por dos. Luego cada valor de frecuencia esperada por el equilibrio de Hardy-Weinberg se multiplicó por el número de individuos totales en la población, con la finalidad de realizar la prueba de Ji-cuadrado.

Posteriormente, para cada genotipo de cada mutación se restó el número de individuos homocigóticos esperados y observados para cada uno de los alelos el valor fue elevado al cuadrado y se dividió entre el número de individuos esperados. Este mismo procedimiento fue realizado para los valores de individuos heterocigóticos. Los valores obtenidos de cada genotipo homocigótico y heterocigótico para cada una de las mutaciones fueron sumados y se denominaron como los X^2 calculados. Estos valores fueron comparados con valor de X^2 teórico, con un grado de libertad y un valor de $\alpha=0.05$. Si el X^2 calculado era inferior al X^2 teórico, la hipótesis del equilibrio no será significativa por lo tanto la población está en equilibrio H-W. Si el X^2 calculado es superior al X^2 teórico, la hipótesis de equilibrio será significativa por lo tanto la población no estará en equilibrio H-W.

Para establecer si existe una correlación entre las variables cualitativas; presencia o la ausencia de cada una de las mutaciones con la resistencia a derribo o susceptibilidad al derribo de insecticidas piretroides se construyeron tablas de contingencia para las localidades de cada país y se realizó una para toda la región de Centroamérica seleccionando al azar 30 individuos susceptibles al derribo de insecticidas piretroides y 30 resistentes al derribo por insecticidas piretroides. Estas fueron evaluadas utilizando el test exacto de Fisher, con un grado de libertad y un valor de $\alpha=0.05$. Si el valor de p era mayor a 0.05 la hipótesis nula no era rechazada, por lo que no existía una asociación entre la presencia o ausencia de las mutaciones con la resistencia o susceptibilidad al derribo por insecticidas piretroides. Si por el contrario el valor de p era menor a 0.05 la hipótesis nula se rechazaba, por lo que sí existiría una correlación entre la presencia o ausencia de las mutaciones con la resistencia o susceptibilidad al derribo por insecticidas piretroides. Para este análisis fue utilizado el programa RStudio versión 3.3.1 (Otero, Medina, 2005).

8. Resultados

8.1 Extracción de ADN genómico en mosquitos *Ae. aegypti*

Fueron procesados 215 individuos hembras de la especie *Aedes aegypti* provenientes de 4 localidades: Limón, Costa Rica, Chiriquí, Panamá, Chorrera, Panamá y Prados del Río, Guatemala. El Cuadro 1 presenta los resultados de la extracción de ADN en mosquitos *Ae. aegypti* provenientes de los diferentes países de Centro América, según su localidad. De las 215 muestras procesadas en todas se logró extraer de forma exitosa ADN, para la amplificación del gen VSGC mediante PCR alelo específico para la mutación F1534C y V1016I.

Cuadro.1 Extracción de ADN en mosquitos *Aedes aegypti* seleccionados al azar de pruebas de resistencia a piretroides.

Localidad	No. individuos
Limón, Costa Rica	50/50
Prados del Río, Guatemala	53/53*
Chiriquí, Panamá	53/53*
Chorrera, Panamá	59/59*

*Se extrajeron más de 50 individuos para completar una población de 30 individuos resistentes y 30 individuos susceptibles fenotípicamente.

8.2 PCR convencional para las mutaciones F1534C y V1016I.

Para poder determinar los controles de cada genotipo para la mutación F1534C, se procesaron adicionalmente individuos de las localidades Limón y Puntarenas mediante PCR convencional, los resultados se presentan en el Cuadro 2; para esta mutación únicamente se encontró el genotipo homocigótico mutante para ambas localidades, por lo tanto, como control del genotipo homocigótico silvestre fueron utilizados individuos de la cepa New Orleans totalmente susceptibles a insecticidas piretroides y como control del genotipo heterocigótico fueron utilizados individuos de la cepa de Tocumen, Panamá. Para la mutación V1016I se procesaron adicionalmente individuos de las localidades Limón y Puntarenas mediante PCR convencional, los resultados se encuentran en el Cuadro 3. Únicamente para la localidad de Puntarenas se encontró el genotipo homocigótico Silvestre. En ambas localidades se encontró el genotipo heterocigótico y homocigótico mutante.

Cuadro.2 Muestras utilizadas para controles de los diferentes genotipos según las mutaciones F1534C.

Localidad	n	Genotipo		
		TT	TG	GG
Limón ,Costa Rica	14	14	0	0
Puntarenas, Costa Rica	8	8	0	0

TT: Homocigótico Silvestre, TG: F1534/C1534 Heterocigótico, GG: C1534 Homocigótico mutante, n: Tamaño de muestra.

Cuadro.3 Muestras utilizadas para controles de los diferentes genotipos según las mutaciones V1016I.

Localidad	n	Genotipo		
		GG	GA	AA
Limón ,Costa Rica	20	0	5	15
Puntarenas, Costa Rica	4	2	0	2

GG: homocigótico Silvestre, GA: V1016/I1016 heterocigótico, AA: I1016 homocigótico mutante, n: Tamaño de muestra.

8.3 Genotipos para las mutaciones F1534C y V016I

Según los resultados del PCR en tiempo real para la mutación F1534C presentes en el Cuadro 4, la población de Costa Rica, Limón y la población de Panamá, Chorrera presentaron únicamente el genotipo homocigótico mutante C1534/C1534. El genotipo homocigótico silvestre F1534/F1534 se encontró en una cantidad de individuos muy baja y únicamente se presentó en la población de Panamá, Chiriquí. Esta población también presentó el genotipo homocigótico mutante C1534/C1534 con un alto número de individuos. La población de Guatemala de Prados del Río fue la única población en presentar el genotipo heterocigótico F1534/C1534.

El Cuadro 5 presenta los resultados del PCR alelo específico para la mutación V1016I. En la población de Costa Rica, Limón presentó los tres genotipos para el codón 1016. El genotipo heterocigótico V1016/I1016 presentó el mayor número de individuos en esta población. El genotipo homocigótico silvestre presentó un mayor número de individuos que el genotipo homocigótico mutante.

La población de Guatemala, Prados del Río, presentó el mayor número de individuos heterocigóticos V1016/I1016 en comparación con la población de Limón, Chorrera y Chiriquí. En esta población se encuentran también los genotipos; homocigótico silvestre V1016/V1016 y homocigótico mutante I1016/I1016. La población de Chiriquí y Chorrera

presentaron el menor número de individuos homocigóticos silvestre V1016/V1016 y el mayor número de individuos homocigóticos mutante I1016/I1016. En esta población también se encontró el genotipo heterocigótico V1016/I1016.

Cuadro.4 Resultados de PCR alelo específico para la mutación F1534C en mosquitos *Aedes aegypti*.

Localidad	n	Genotipo		
		TT	TG	GG
Limón ,Costa Rica	50	0	0	50
Prados del Río, Guatemala	50	0	2	48
Chorrera, Panamá	50	0	0	50
Chiriquí, Panamá	50	3	1	46

TT: homocigótico Silvestre, TG: F1534/C1534 heterocigótico, GG: C1534 homocigótico mutante, n: Tamaño de muestra.

Cuadro. 5 Resultados de PCR alelo específico para la mutación V1016I en mosquitos *Aedes aegypti*.

Localidad	n	Genotipo		
		GG	GA	AA
Limón ,Costa Rica	50	19	20	11
Prados del Río, Guatemala	50	9	35	6
Chorrera, Panamá	50	5	18	27
Chiriquí, Panamá	50	5	16	29

GG: V1016 Silvestre, GA: V1016/I1016 heterocigótico, AA: I1016 homocigótico mutante, n: Tamaño de muestra.

Los Cuadros 6 y 7 se presentan los resultados del PCR alelo específico para las mutaciones F1534C y V1016I según la localidad de las poblaciones y el resultado de la prueba de la botella del CDC. Los individuos analizados por el ensayo de la botella del CDC de la población del Limón la mayoría presentaron el fenotipo susceptible al derribo por insecticidas piretroides. Todos los individuos resistentes y susceptibles al derribo por insecticidas piretroides presentaron el genotipo homocigótico mutante C1534/C1534. De la misma población, para la mutación V1016I los individuos fenotípicamente resistentes al derribo por insecticidas piretroides presentaron en mayor frecuencia el genotipo homocigótico silvestre. Los individuos fenotípicamente susceptibles a insecticidas piretroides para la mutación V1016I; presentaron en mayor frecuencia el genotipo heterocigótico V1016/I1016.

De los individuos analizados por el ensayo de la botella del CDC de la población de Prados del Río se presentó en mayor frecuencia el fenotipo susceptible a insecticidas piretroides únicamente 3 individuos presentaron el fenotipo resistente al derribo por insecticidas

piretroides. Para la mutación F1534C todos los individuos presentaron el genotipo homocigótico mutante, exceptuando 2 individuos fenotípicamente susceptibles a insecticidas piretroides los cuales presentaron el genotipo heterocigótico. Para la mutación V1016I los individuos fenotípicamente susceptibles al derribo por insecticidas piretroides, presentó en mayor frecuencia el genotipo heterocigótico V1016/I1016. De los individuos fenotípicamente resistentes para la mutación V1016I, se presentó en mayor frecuencia el genotipo homocigótico mutante I1016/I1016.

De los individuos analizados según el ensayo de la botella del CDC de la población de Chiriquí, la mayoría presentó el fenotipo susceptible al derribo por insecticidas piretroides únicamente 2 individuos fueron resistentes al derribo por insecticidas piretroides. Únicamente en esta localidad se encontró el genotipo silvestre F1534/F1534 para los países de Centroamérica analizados. Para la mutación V1016I los individuos fenotípicamente susceptibles al derribo por insecticidas piretroides presentaron en mayor proporción el genotipo mutante I1016/I1016. Los individuos fenotípicamente resistentes al derribo presentaron en la misma proporción individuos con el genotipo heterocigótico y homocigótico mutante. En comparación con todas las localidades, la localidad de Chiriquí de Panamá presenta el mayor número de individuos con el genotipo homocigótico mutante I1016/I1016.

De los individuos analizados según el ensayo de la botella del CDC de la Población de Chorrera, la mayoría presentó el fenotipo susceptible a insecticidas piretroides y únicamente 5 fueron resistentes al derribo por insecticidas piretroides. Para la mutación F1534C, todos los individuos susceptibles y resistentes al derribo por insecticidas piretroides presentaron el genotipo homocigótico mutante C1534/C1534. Para la mutación V1016I los individuos fenotípicamente susceptibles al derribo por insecticidas piretroides, presentaron mayormente el genotipo homocigótico mutante I1016/I1016. Los individuos fenotípicamente resistentes para la mutación V1016I, todos presentaron el genotipo homocigótico mutante I1016/I1016.

Cuadro 6. Resultados de PCR alelo específico según la localidad y la prueba de resistencia a insecticidas piretroides, para la mutación F1534C.

Localidad	n	Fenotipo	Individuos según pruebas de resistencia a piretroides	TG	GG	TT
Limón	50	Susceptible	41	0	41	0
		Resistente	9	0	9	0
Prados del Río	50	Susceptible	47	2	45	0
		Resistente	3	0	3	0
Chorrera	50	Susceptible	45	0	45	0
		Resistente	5	0	5	0
Chiriquí	50	Susceptible	48	1	44	3
		Resistente	2	0	2	0

TT: Homocigótico Silvestre, TG: F1534/C1534 heterocigótico, GG: C1534 homocigótico mutante, n: Tamaño de muestra.

Cuadro 7. Resultados de PCR alelo específico según la localidad y la prueba de resistencia a insecticidas piretroides, para la mutación V1016I.

Localidad	n	Fenotipo	Individuos según pruebas de resistencia a piretroides	GA	AA	GG
Limón	50	Susceptible	41	18	9	14
		Resistente	9	2	2	5
Prados del Río	50	Susceptible	47	35	4	8
		Resistente	3	0	2	1
Chorrera	50	Susceptible	45	18	22	5
		Resistente	5	0	5	0
Chiriquí	50	Susceptible	48	5	28	15
		Resistente	2	1	1	0

GG: Homocigótico Silvestre, GA: V1016/I1016 heterocigótico, AA: I1016 homocigótico mutante, n: Tamaño de muestra.

8.4 Frecuencias alélicas para las mutaciones F1534C y V1016I

Los cuadros 8 y 9 presentan las frecuencias alélicas del alelo mutante y el alelo silvestre para las mutaciones F1534C y V1016I según la localidad de las poblaciones. Para todas las poblaciones el alelo mutante C1534 presentó valores de frecuencia sumamente altos en comparación con el alelo silvestre. En la población de Costa Rica, El Limón y en la población de Panamá, Chorrera se observa la fijación del alelo mutante C1534. Las frecuencias alélicas para los alelos silvestre presentaron valores muy bajos. Para la mutación V1016I la frecuencia del alelo mutante I1016 para las poblaciones del Limón y Prados del Río presentó valores ligeramente menores que los valores de frecuencia del alelo silvestre V1016. La población de Chiriquí y Chorrera presentaron una mayor frecuencia del alelo mutante I1016 que el alelo silvestre V1016. Para ninguna de las poblaciones el alelo

mutante I1016 se encuentra fijado. La frecuencia del alelo C1534 presentó una mayor frecuencia que el alelo I1016 en todas las poblaciones (Fig. 1).

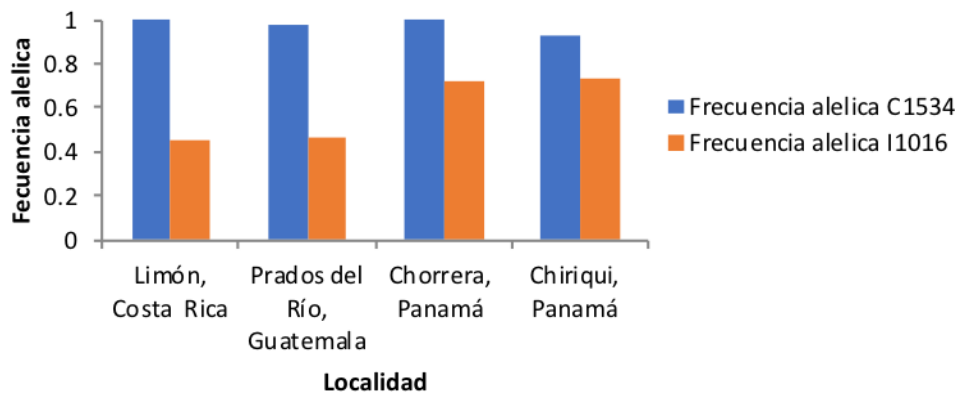
Cuadro 8. Frecuencias alélicas para la mutación F1534C por cada población según su localidad.

Localidad	Frecuencia alélica F1534	Frecuencia alélica C1534
Limón ,Costa Rica	0	1.0
Prados del Río, Guatemala	0.02	0.98
Chorrera, Panamá	0	1
Chiriquí, Panamá	0.07	0.93

Cuadro 9. Frecuencias alélicas para la mutación V1016I por cada población según su localidad.

Localidad	Frecuencia alélica V1016	Frecuencia alélica I1016
Limón ,Costa Rica	0.54	0.46
Prados del Río, Guatemala	0.53	0.47
Chorrera, Panamá	0.28	0.72
Chiriquí, Panamá	0.26	0.74

Figura 1. Frecuencias alélicas del alelo C1534 y I1016 en las poblaciones Limón, Prados del Río, Chorrera y Chiriquí.



8.5 Frecuencias genotípicas para las mutaciones F1534C y V1016I

Los cuadros 10 y 11 presentan las frecuencias genotípicas según las mutaciones F1534C y V1016I para cada una de las localidades. Para la mutación F1534C la población de Limón y Chorrera presentaron la frecuencia más alta del genotipo homocigótico mutante C1534/C1534 en comparación con todas las demás poblaciones, para este genotipo todas las poblaciones presentan frecuencias genotípicas entre 0.92 a 1 (Fig. 2). La población de

Chiriquí presentó la frecuencia más alta para el genotipo homocigótico silvestre F1534/F1534 y fue la única población en tener un valor de frecuencia para este genotipo diferente a 0 (Fig. 2). La población de Prados del Río presentó la frecuencia genotípica más alta para el genotipo heterocigótico F1534/C1534 (Fig. 2). Para la mutación V1016I los valores de frecuencias genotípicas para el genotipo silvestre V1016/V1016 se encuentran entre 0.1 a 0.38 donde la población del Limón presenta el valor más alto (Fig. 3). La población de Prados del Río presentó la frecuencia genotípica más alta para el genotipo heterocigótico V1016I (Fig. 3). Para la localidad del Limón y Chiriquí este genotipo presentó el mismo valor de frecuencia genotípica. Para el genotipo mutante I1016/I1016 la población de Chiriquí presentó el valor de frecuencia genotípica más alto (Fig. 3).

Cuadro 10. Frecuencias Genotípicas según la mutación F1534C para cada una de las poblaciones acorde a su localidad.

Localidad	F1534/F1534	F1534/C1534	C1534/C1534
Limón ,Costa Rica	0	0	1
Prados del Río, Guatemala	0	0.04	0.96
Chorrera, Panamá	0	0	1
Chiriquí, Panamá	0.06	0.02	0.92

Cuadro 11. Frecuencias Genotípicas según la mutación V1016I para cada una de las poblaciones acorde a su localidad.

Localidad	V1016/V1016	V1016/I1016	I1016/I1016
Limón ,Costa Rica	0.38	0.4	0.22
Prados del Río, Guatemala	0.18	0.70	0.12
Chorrera, Panamá	0.1	0.36	0.54
Chiriquí, Panamá	0.1	0.32	0.58

8.6 Intervalos de Wald, equilibrio de Hardy Weinberg y prueba de Fisher para las mutaciones F1534C y V1016I

Los cuadros 12 y 13 presentan un resumen del número de individuos por genotipo, la frecuencia alélica, los intervalos de confianza de Wald, el equilibrio de Hardy-Weinberg y la prueba de Fisher por cada una de las mutaciones V1016I y F1534C. La frecuencia del alelo mutante C1534 y I1016 para todas las poblaciones se encuentra dentro de los intervalos de Wald. En relación a la mutación F1534C, únicamente la población de Chiriquí no se encuentra en el equilibrio de Hardy -Weinberg. Para la mutación V1016I únicamente

la población de Prados del Río no se encontraba en el equilibrio de Hardy –Weinberg. Según los resultados del test exacto de Fisher en todas las poblaciones analizadas para las mutaciones F1534C no hay una relación entre la ausencia y presencia de la mutación y la resistencia o susceptibilidad a insecticidas piretroides. Sin embargo, únicamente la población de Prados del Río presentó una relación entre la ausencia y presencia de la mutación V1016I y la resistencia o susceptibilidad al derribo por insecticidas piretroides.

Cuadro 12. Resultados de las Frecuencias alélicas, Intervalos de Wald, equilibrio de Hardy Weinberg y prueba de Fisher para la mutación F1534C.

Localidad	n	TT	TG	GG	Frecuencias		Hardy-Weinberg(x^2)	Prueba de Fisher(p)
					alélica 1534C	95%IC		
Costa Rica, Limón	50	0	0	50	1.0	1.01-0.91	0	1
Guatemala, Prados del Río	50	0	2	48	0.98	1.00-0.88	0.02	1
Panamá Chorrera	50	0	0	50	1	1.01-0.91	0	1
Panamá Chiriquí	50	3	1	46	0.93	0.97-0.81	35.82	1

TT: Homocigótico Silvestre, TG: F1534/C1534 heterocigótico, GG: C1534 homocigótico, n: Tamaño de muestra

Cuadro 13. Resultados de las Frecuencias alélicas, intervalos de Wald, equilibrio de Hardy Weinberg y prueba de Fisher para la mutación V1016I.

Localidad	n	GG	GA	AA	Frecuencias		Hardy-Weinberg(x^2)	Prueba de Fisher(p)
					alélica 1016I	95%IC		
Costa Rica, Limón	50	19	20	11	0.42	0.59-0.33	1.6	1
Guatemala, Prados del Río	50	9	35	6	0.47	0.60-0.34	8.2	0.003
Panamá Chorrera	50	5	18	27	0.72	0.82-0.58	0.57	0.054
Panamá Chiriquí	50	5	16	29	0.74	0.84-0.59	1.42	1

GG: Homocigótico Silvestre, GA: V1016/I1016 heterocigótico, AA: I1016 homocigótico, n: Tamaño de muestra

Figura 2. Frecuencias genotípicas según la mutación F1534C para las poblaciones de Limón, Prados del Río, Chorrera y Chiriquí.

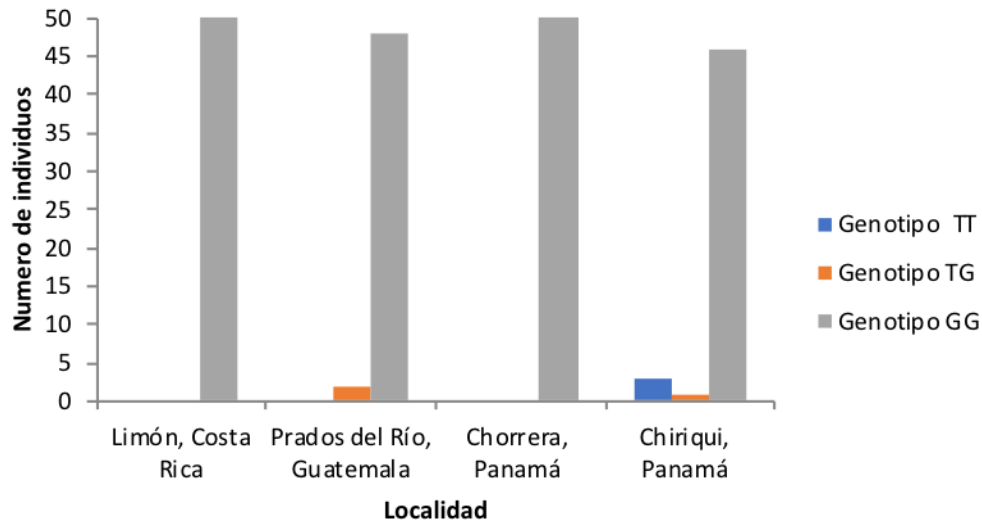
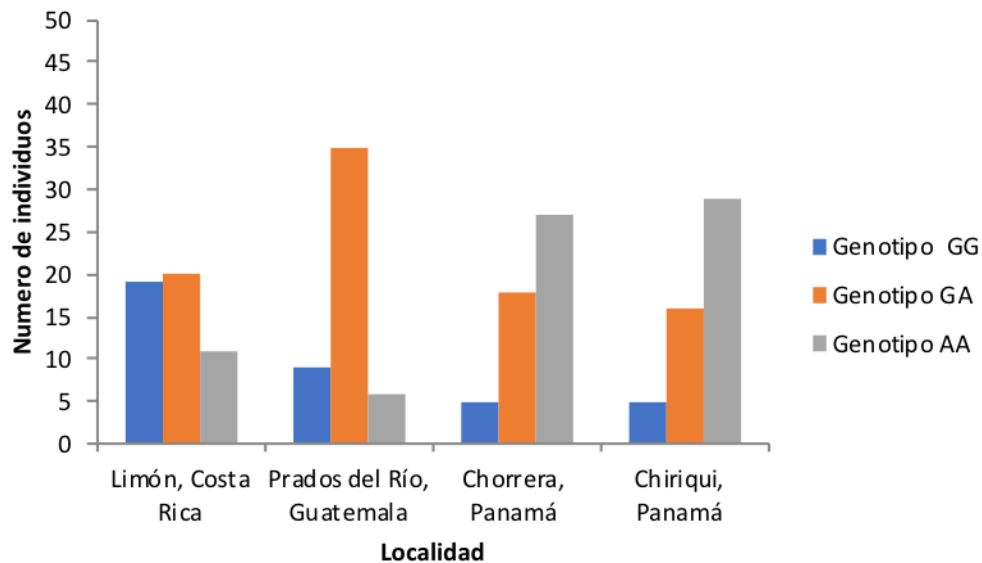


Figura 3. Frecuencias genotípicas según la mutación V1016I para las poblaciones de Limón, Prados del Río, Chorrera y Chiriquí.



8.7 Relación entre Fenotipo y Genotipo

El Cuadro 14 presenta el genotipo según la mutación F1534C y V1016I de 60 Individuos (30 resistentes, 30 Susceptibles) *Aedes aegypti* tomados de las poblaciones de Centroamérica y de la Prueba de Fisher realizada para establecer una relación entre las mutaciones F1534C y V1016I con la resistencia a derribo a insecticidas piretroides de *Ae. aegypti* en la región. El cuadro también presenta el número de individuos según su

genotipo, acorde a las mutaciones F1534C y V1016I. Se puede observar que el genotipo homocigótico mutante para la mutación F1534C se encuentra en mayor frecuencia entre los Individuos resistentes a insecticidas piretroides. También se observa que la para la mutación F1534C no existe una diferencia significativa entre la presencia o ausencia de esta con la resistencia a derribo por insecticidas piretroides en *Ae. aegypti* de la región de Centroamérica, por lo tanto no hay una relación entre ambas variables. Para la mutación V1016I los individuos resistentes presentaron la mayor frecuencia del genotipo homocigótico mutante y los individuos susceptibles presentaron en mayor proporción individuos con el genotipo heterocigótico y homocigótico silvestre. En la mutación V1016I se encontró una diferencia significativa entre la presencia y la ausencia de esta con la resistencia a derribo insecticidas piretroides, por lo tanto, sí podemos establecer que hay una asociación entre la presencia o ausencia de la mutación V1016I y la resistencia a insecticidas piretroides.

Cuadro 14. Resultados de la Prueba de Fisher para las mutaciones F1534C y V1016I en *Aedes aegypti* de Centroamérica.

Mutación	n	Fenotipo	Individuos según fenotipo	Individuos heterocigóticos	Individuos homocigóticos mutante	Individuos homocigóticos silvestre	Test de Fisher
F1534C	60	Susceptible	30	1	28	1	0.4915
		Resistente	30	0	30	0	
V1016I	60	Susceptible	30	12	8	10	0.0016
		Resistente	30	3	21	6	

9. Discusión

En este estudio se encontró la presencia de las mutaciones de resistencia al derribo (*kdr*, por sus siglas en inglés). La mutación F1534C se encontró por primera vez para la región de Centroamérica y V1016I a nivel local para Guatemala. Estas mutaciones se encontraron en las poblaciones de *Aedes aegypti* de Guatemala, Panamá y Costa Rica. La mutación F1534C se encontró totalmente fijada en la población del Limón en Costa Rica y de la Chorrera en Panamá. En la población Chiriquí de Panamá y la población de Prados del Río de Guatemala el alelo mutante F1534 se encuentra en una mayor prevalencia que el alelo silvestre, lo cual indica una fijación temprana de la mutación F1534C en ambas poblaciones. La mutación V1016I no se encontró fijada en ninguna de las poblaciones, sin embargo, dicha mutación presenta una alta prevalencia en cada una de las localidades. Únicamente en las poblaciones de Chiriquí y de la Chorrera el alelo mutante I1016 presenta una mayor prevalencia que el alelo silvestre. En todas las poblaciones de estudio se observó un número alto de individuos heterocigóticos para la mutación V1016I. También se observó que en todas las poblaciones el genotipo homocigótico resistente doble presenta el mayor número de individuos.

Se esperaba que existiera una asociación entre la resistencia al derribo por insecticidas piretroides en las poblaciones de *Aedes aegypti* de la región de Centroamérica y las mutaciones en el gen que codifica para el canal de sodio controlado por voltaje. Sin embargo, en ninguna de las poblaciones de estudio se encontró una asociación o relación entre la presencia o ausencia de la mutación F1534C en el gen que codifica el canal de sodio controlado por voltaje y la resistencia o susceptibilidad al derribo por insecticidas piretroides. Únicamente se encontró una asociación en la población de Prados del Río entre la presencia o ausencia de la mutación V1016I en el gen que codifica el canal de sodio controlado por voltaje y la resistencia o susceptibilidad al derribo por insecticidas piretroides.

La presencia de la mutación F1534C en Centroamérica puede deberse al uso del pesticida DDT y no al uso de insecticidas piretroides. En Centroamérica durante aproximadamente tres décadas se utilizó de forma permanente y extensa el DDT como parte de la campaña antimalárica (ISAT, 2001). En Costa Rica este pesticida fue utilizado para la erradicación de *Ae. aegypti*, la cual tuvo éxito a finales de los años 70. En Panamá el uso de este

insecticida en todo el país inicio en 1962, como parte del plan para reducción de la malaria en el país (MINSA, 2001) y Guatemala en 1950 inicia su uso en salud pública (MSPAS, 2001). También se utilizó en la agricultura en la región, de forma intensa principalmente en cultivos industriales de algodón en Guatemala (MSPAS, 2001) y banano en Costa Rica. Durante 1988 en Costa Rica se estableció la prohibición de este pesticida y la finalización del uso oficial, tanto en salud pública, como en la agricultura (ISAT, 2001), en 1985 en Panamá se da fin el uso de este, se prohíbe su uso en salud pública y en Guatemala el uso de este insecticida fue prohibido en 1980 tanto para salud pública como su uso en actividades agropecuarias (MSPAS, 2001).

Como resultado del uso excesivo y exclusivo durante tres décadas de DDT en la región de Centro América, se produjo, posiblemente una presión selectiva sobre la población de *Ae. aegypti* en favor de la mutación F1534C, ya que esta esta mutación presenta resistencia cruzada a derribo a este insecticida y a permetrina. Dicha presión de selección ejercida por el DDT pudo haber iniciado durante la campaña para el control del dengue en 1940-1950 (Kawada *et al.*, 2016). Durante esta campaña pudo haberse expandido la distribución de *Ae. aegypti* resistente a los insecticidas y es posible que durante esta época fue seleccionada dicha mutación F1534C (WHO, 1986).

Esta presión de selección que ejerció el DDT en la región puede verse respaldada por el desarrollo de resistencia a DDT y a insecticidas piretroides en poblaciones de *An. albimanus* provenientes de Escuintla, Guatemala (MSPAS, 2001). Por otra parte, el uso de insecticidas piretroides inició en Centroamérica durante los años 70 con fines agrícolas. En Costa Rica el uso de insecticidas piretroides inició en 1975, (Sanz, Lawrence, Pérez, 1997), actualmente la deltametrina y cipermetrina se usan para el control de *Ae. aegypti*. En Panamá, los piretroides se introdujeron entre 1970-1980 donde substituyeron a los insecticidas organoclorados en las actividades agropecuarias. Los insecticidas piretroides actualmente son los más utilizados para el control de *Ae. aegypti* en donde se hace uso exclusivo de deltametrina, lambdacihalotrina y ciflutrina (Caceres, Rovira, García, Torres, Cruz, 2013). Durante 1972 en Guatemala se inicia el uso de la deltametrina para el control de los vectores de la malaria en el departamento de Escuintla el cual se usa en la actualidad para el control de dicho vector (MSPAS, 2001). Este insecticida es utilizado en la impregnación de pabellones de larga duración y en el rociamiento intradomiciliar focal.

Por lo tanto, la mutación F1534C en Centroamérica (Calderón, Troyo, 2016) no debió haber sido generada por el uso de deltametrina, cipermetrina, lambdacihalotrina y ciflutrina ya que esta mutación está relacionada exclusivamente con permetrina (Du, *et al.*, 2013). Esta mutación reduce la sensibilidad del canal de sodio controlado por voltaje hacia la permetrina (Du, *et al.*, 2013) y ya que este insecticida no ha sido utilizado en la región no se le puede atribuir la aparición de dicha mutación. Sin embargo, el efecto residual de DDT y el temprano uso de este puede ser el resultado y legado de la aparición de esta mutación y la fijación de esta en la región (Bregues, *et al.*, 2003). Por el contrario, el uso del insecticida piretroide deltametrina sí pudo haber sido responsable de la aparición de la mutación V1016I en Centroamérica ya que esta mutación se encuentra relacionada con dicho piretroide. Su intenso uso en el pasado y en la actualidad puede estar ejerciendo presión de selección favoreciendo a la mutación V1016I lo cual se ve reflejado en el número de individuos considerablemente alto con la mutación V1016I en la población (Bregues, *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos en este estudio en relación con la mutación F1534C, coinciden con lo reportado en estudios realizados en Venezuela en poblaciones de *Ae. aegypti*, en las cuales se determinó que presentaban resistencia a permetrina, insecticida el cual no ha sido utilizado en este país. La aparición de dicha resistencia pudo ser producto del uso desmedido de DDT durante varias décadas, lo cual produjo presión de selección sobre el fenotipo resistente. Esto es producto de la resistencia cruzada que tiene la permetrina con DDT ya que ambos insecticidas comparten el sitio blanco, en el canal de sodio dependiente de voltaje (Álvarez, Ponce, Flores, 2016). Estudios bioquímicos realizados en poblaciones de *Ae. aegypti* de Rio Piedras, Puerto Rico en 1987, demostraron que dicha población presentaba resistencia a insecticidas piretroides. Esta resistencia a piretroides no estaba medida por mecanismos metabólicos si no por resistencia al derribo (KDR) producida por la resistencia cruzada entre insecticidas piretroides y DDT. Esto se vio evidenciado mediante el análisis electrofisiológico en la unión neuromuscular de insectos resistentes donde estos presentaban insensibilidad nerviosa. Dicho mecanismo fue seleccionado en la población por la exposición temprana de DDT o por la aplicación de volumen ultrabajos de malation y bioresmetrina (Hemingway, Boddington, Harris, Dunbar, 1989). Durante 2013 se analizó la resistencia a insecticidas piretroides y DDT en 13 cepas de diferentes

localidades alrededor del mundo. Los resultados de este estudio indicaron que tres cepas provenientes de las localidades de Belén, Brasil; Semarang, Guyana e Indonesia; presentaron resistencia a insecticidas piretroides y a DDT, sin estar relacionada con la enzima glutatión-S-transferasa, esto indica la aparición de mecanismos de resistencia en sitios blanco para dichos insecticidas. La presencia de dicha resistencia a insecticidas piretroides y DDT se debe al uso temprano de DDT en dichas localidades como estrategia para la eliminación y control del vector de la malaria y al efecto residual que tiene este insecticida. Esto se ve reflejado en los radios de resistencia en donde el DDT presenta un mayor radio que la permetrina, evidenciado por la aparición de la mutación F1534C por resistencia cruzada a DDT (Bregues, *et al.*, 2003).

A pesar de los estudios mencionados anteriormente, hay evidencia de que la mutación F1534C podría tener relación con la resistencia a deltametrina, por lo que el uso de deltametrina en la región de Centroamérica posiblemente contribuyó a la aparición de esta mutación en la región. En Venezuela durante el año 2014 fue seleccionada mediante deltametrina una cepa proveniente de Pampanito durante 15 generaciones. Se observó en dicho estudio que la frecuencia alélica de la mutación aumentó en la primera generación de 0.2 a 0.5, sugiriendo que la deltametrina puede ejercer cierta presión de selección sobre la mutación F1534C y que puede haber una relación con esta mutación (Álvarez, Ponce, Saavedra, López, Flores, 2014). También en India se encontró en poblaciones de *Ae. aegypti* relación entre la mutación F1534C y la resistencia al derribo por deltametrina (Kushwah, Dykes, Kapoor, Adak, Singh, 2015).

La aparición de la mutación V1016I concuerda con lo observado en otros estudios. En Brasil se analizaron 7 poblaciones de diferentes localidades para detectar y determinar la frecuencia de la mutación V1016I. Fueron genotipificados mosquitos susceptibles y resistentes a deltametrina de cada una de las localidades. Se encontró la mutación en 5 de las 7 poblaciones analizadas, encontrando que la mayor frecuencia de la mutación V1016I estuvo presente en individuos resistentes a deltametrina. Adicionalmente, fueron analizadas 9 poblaciones encontrándose que 5 de éstas presentaban la mutación V1016I. Es importante mencionar que en las poblaciones de Nova Iguacu se analizó durante el 2003 y no se encontró dicha mutación sin embargo durante este estudio realizado en el 2008 dicha mutación se encontró en la población con una frecuencia alélica de 0.625 (Martins, Lima,

Peixoto, Valle, 2009). Se determinó que la presencia de esta mutación y la alta frecuencia de individuos resistentes a deltametrina en la población puede ser el resultado de una fuerte presión de los insecticidas piretroides debido a su uso desde el 2000. En otro estudio, fueron seleccionadas 2 cepas provenientes de Santiago de Cuba e Isla Mujeres en México, la selección se hizo utilizando permetrina y deltametrina. Se observó que la presión de estos insecticidas aumentó la frecuencia de la mutación V1016I. Lo cual indica que existe una relación entre los piretroides tipo I y tipo II con dicha mutación (Martins, Lima, Peixoto, Valle, 2009).

Otro de los mecanismos involucrados en la aparición y la fijación de la mutación F1534C y la aparición de la mutación V1016I en la población de *Ae. aegypti* en Centro América puede ser la migración. La capacidad que tiene los huevos de *Ae. aegypti* de resistir a la desecación y la asociación que tiene este vector con el ser humano es una relación que favorece el transporte y movilización de este. La localidad de el Limón, Costa Rica es una área portuaria, los barcos, los contenedores, el desplazamiento humano y los patrones comerciales y agrícolas no solo han favorecido la migración de este vector, sino también la diseminación y fijación de esta mutación en esta provincia (Juliano, Lounibos, 2015). Prueba de esto es que se han encontrado barcos con este vector provenientes de México, Colombia, Brasil e Islas Caimán, países en los cuales dicha mutación se encuentra presente (MINSA, 2008). También en Chiriquí, Panamá es posible que la migración haya producido la aparición de la mutación F1534C y V1016I ya que este en este distrito se encuentran 3 puertos; Armulles, Pedregal y Charco Azul, los cuales sirven para la exportación de azúcar, importación de fertilizantes y abastecimiento de combustibles (Gobpan, 2004). Sin embargo, aunque dicho distrito ocupa el segundo lugar entre las provincias que tiene una población migrante sumamente grande, esta también es una provincia muy rica en turismo (Ecoambiente, 2009). La migración en el distrito de Chorrera, Panamá pudo ser un factor fundamental en la aparición de dichas mutaciones ya que este distrito es considerado un distrito dormitorio, pues diariamente la población viaja hacia la capital de Panamá donde laboran (URS holdings, 2007). Los factores mencionados pudieron facilitar la movilización de la mutación F1534C y V1016I de países donde se encuentra presente hacia el distrito de Chiriquí y Chorrera.

Estudios anteriores coinciden con las ideas que la resistencia por mutaciones KDR puede ser producto de la migración de individuos con dichas mutaciones. En Ghana mediante un análisis filogenético se logró determinar que el intrón que se encuentra entre el exón 20, 21 y la mutación F1534C tiene relación entre un tipo de intrón que se encuentra en el Sur este de Asia y en América. Esto sugiere que la mutación F1534C se introdujo a Ghana desde otro continente. Esto podría ser por motivo de las actividades humanas como el comercio de neumáticos usados, lo cual pudo dar lugar a la distribución generalizada de la mutación puntual F1534C en Ghana (Kawada *et al.*, 2016). En Malasia se logró determinar la presencia de la mutación V1016G con una frecuencia muy baja. Sin embargo, la presencia de dicha mutación en este país se atribuyó a la migración de individuos con dicha mutación. Esto debido a que la mayoría de países vecinos de Malasia como: Taiwán, Indonesia y Tailandia la poblaciones de *Ae. aegypti* presenta esta mutación (Ishak, Jaal, Ranson, Wondji, 2015).

Por otra parte, la falta de asociación entre la mutación F1534C y la resistencia a derribo por insecticidas piretroides que se obtuvo en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Centro América y la falta de asociación de la mutación V1016I en individuos de las poblaciones de Limón, Chorrera y Chiriqui puede deberse a las concentraciones altas que presentaban los insecticidas piretroides (deltametrina; 10 ng/μL y permetrina 15ng/μL) con las que se realizaron los ensayos de resistencia. Dichas concentraciones pudieron haber matado a los individuos resistentes, heterocigóticos y homocigóticos resistentes (Kushwah, Dykes, KapoorAdak, Singh, 2015).

Estos resultados contradicen los estudios realizados en las Islas Caimán donde se encontró una relación entre la resistencia a permetrina y la mutación F1534C. Esto debido a que de los 50 individuos resistentes al derribo por permetrina todos presentaron la mutación F1534C y presentaron el genotipo homocigótico resistente, también se determinó que la mutación V1016I estaba correlacionada con la resistencia al derribo por permetrina (Harris *et al.*, 2010). En Tailandia también se encontró que dos cepas provenientes de dos diferentes distritos en las cuales, una presentaba resistencia a DDT y la otra a DDT y a permetrina, mostraron una relación entre la resistencia al derribo por insecticidas piretroides y DDT y la mutación F1534C. Se realizaron cruces entre individuos susceptibles y resistentes donde se obtuvo una F1, los individuos resistentes indicaron que

la resistencia era autosómica y altamente asociada a individuos que presentaban el genotipo homocigótico mutante. También se llegó a la conclusión que la resistencia a permetrina no solo está medida por la mutación homocigótica F1534C en *Ae. aegypti* sino también por una función mixta oxidasa (Yanola, Somboon, Walton, Nachaiwieng, Prapantadara, 2010). En estudios realizados en 2013 se encontró que la mutación F1534C en la región IIS6 del canal sodio redujo la sensibilidad considerablemente a permetrina pero no a deltametrina cuando se expresa en el ovocito de *Xenopus* (Du, *et al.*, 2013).

Sin embargo, hay estudios que coinciden con la falta de relación entre las mutaciones V1016I, F1534C y la resistencia a insecticidas piretroides encontrada en Centroamérica. En Indonesia durante el 2017 no se pudo establecer una relación entre la mutación F1534C y la resistencia al derribo por permetrina (Hamid, Prastowo, Ghiffari, Taubert, Hermosilla, 2017). También en Vietnam durante 2009; se encontró que en el distrito de Bith Son el 35% de los individuos analizados presentaron la mutación F1534C y al norte del país se encontró que el 26% de la población de individuos analizados presentó dicha mutación. Sin embargo, no se pudo establecer una relación entre el índice de susceptibilidad y la frecuencia del alelo mutante. Dicho estudio justifica sus resultados con la presunta presencia de algún otro mecanismo el cual brindara resistencia a insecticidas piretroides y se asociara con dicha mutación (Kawada *et al.*, 2009).

En India durante 2015 se trató de determinar la relación entre la mutación F1534C y la resistencia a DDT y permetrina, se encontró que el 35% de la población analizada era resistente a DDT y el 76% era resistente a permetrina, dichos individuos fueron analizados mediante PCR-RFLP para la detección de la mutación, determinando la frecuencia alélica de las poblaciones se encontraba entre (0.41-0.79). Sin embargo, no se encontró una relación entre la mutación y la resistencia a DDT y permetrina, lo cual pudo ser el resultado de que la dosis discriminante usada haya matado a los individuos resistentes al derribo (Kushwah, Dykes, Kapoor, Adak, Singh, 2015). También cabe la posibilidad de que esta mutación se encuentre en coexistencia con otra mutación como la V1016I.

En el presente estudio, únicamente se encontró una relación para la población de Prados del entre la mutación V1016I y el fenotipo de resistencia al derribo a insecticidas piretroides en la población de Prados del Río y la población de Centroamérica conformada por 30 individuos resistentes y 30 individuos susceptibles al derribo por insecticidas piretroides

tomados al azar de las poblaciones de estudio de Centroamérica. Esto puede indicar que a diferencia de las otras poblaciones de estudio (Chiriquí, Chorrera y Limón), la población de Prados del Río y Centroamérica pudieron haber desarrollado la suficiente resistencia al derribo a las concentraciones de insecticidas piretroides a las cuales fueron sometidos debido al uso intenso que se hace de piretroides en esta localidad. La presencia de la mutación F1534C pudo haber potenciado y aumentado la resistencia a deltametrina que confiere la mutación V1016 en esta población lo cual puede explicar la relación entre la mutación V1016I y el fenotipo según la resistencia al derribo por insecticidas piretroides (Maloof, Saavedra, Elizondo, Lozano, 2015).

Este resultado coincide con estudios realizados en 2007 en donde se realizó la selección a dos cepas de *Ae. aegypti*; las cuales fueron sometidas a permetrina y deltametrina. La cepa de Santiago de Cuba fue seleccionada utilizando deltametrina y en la cepa de Isla Mujeres se utilizó permetrina. Se observó que en ambas poblaciones el alelo mutante I1016 aumentó rápidamente al ser sometido a dichos insecticidas piretroides y que únicamente los individuos con el genotipo homocigótico mutante sobrevivieron en las pruebas a insecticidas piretroides. Por lo tanto, se llegó a la conclusión que esta mutación está relacionada a la resistencia al derribo por insecticidas piretroides (Saavedra *et al.*, 2007).

La falta de asociación entre la mutación V016I y el fenotipo según la resistencia al derribo a insecticidas piretroides en las poblaciones de Limón, Chorrera y Chiriquí puede deberse al bajo número de individuos resistentes analizados. Durante este estudio por poblaciones se analizaron entre 2 a 9 individuos resistentes por población. El número de individuos resistentes tan reducido pudo haber reducido la precisión del test de Fisher. Por lo tanto, la prueba pudo haber sido incapaz de determinar la diferencias significativas entre la mutación V1016I y el fenotipo susceptible y resistente al derribo por insecticidas piretroides en dichas poblaciones (García, Bernal, López, 2013). Esto pudo comprobarse ya que al aumentar el número de individuos a 30 por fenotipo (resistente y susceptible), provenientes de las localidades de estudio, se encontró una relación, entre la presencia y la ausencia de la mutación V1016I y el fenotipo resistente y susceptible de *Ae. aegypti* de la región de Centroamérica. Sin embargo, estos resultados concuerdan con estudios realizados en el 2013 en donde se encontró que la mutación V1016I en la región IIS6 del canal sodio no

redujo la sensibilidad a permetrina ni a deltametrina cuando se expresa en el ovocito de *Xenopus* (Du, *et al.*, 2013)

En el presente estudio se encontró que la mutación F1534C presentó una mayor frecuencia que la mutación V1016I, una coocurrencia de ambas mutaciones y en todas las poblaciones se observó una frecuencia alta del genotipo doble resistente. Esto puede deberse a que la mutación F1534C evolucionó antes que la mutación V1016I, ya que presenta un bajo costo de aptitud y poca resistencia hacia insecticidas piretroides. Por lo tanto, sería muy poco probable que la mutación V1016I evolucionara y apareciera antes que la mutación F1534C, ya que esta mutación V1016I presenta un costo alto de aptitud. Por lo tanto, la mutación V1016I aparecerá únicamente en presencia de la mutación F1534C al existir una presión alta con insecticida piretroides, ya que las dobles mutaciones confieren una mayor resistencia a insecticidas piretroides (Maloo, Saavedra, Elizondo, Lozano, 2015).

Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con varios estudios realizados alrededor del mundo. En Venezuela donde se determinó la frecuencia de las mutaciones F1534C y V1016I. En dicho estudio se pudo observar que la mutación F1534C en todas las localidades de estudio presentó una frecuencia alélica mucho más alta que la mutación V1016I. También se realizó la selección de 15 generaciones utilizando deltametrina en donde se encontró que la frecuencia alélica de la mutación F1534C aumentó de 0.35 a 1 y la mutación V1016I aumentó de 0.02 a 0.50. Dichas diferencias entre las frecuencias alélicas sugiere que la mutación V1016I tiene un efecto negativo sobre la aptitud de las poblaciones de *Ae. aegypti* (Álvarez, Ponce, Saavedra, López, Flores, 2014). Resultados similares se encontraron en la Guayana Francesa, Guadalupe y Nueva Caledonia, en el 2015 se encontró que la frecuencia de la mutación F1534C se encontraba fijada en Guayana Francesa, en la isla Guadalupe se encontró que individuos resistentes a deltametrina el 88% presentó la mutación y en individuos susceptibles el 77%. La mutación V1016I en individuos resistentes a deltametrina de Guayana Francesa y la isla Guadalupe se presentó un 92% y 77% respectivamente, en individuos susceptibles la mutación se encontró en un 65% y 79%. Únicamente, en la población de Guayana se observó una correlación entre la mutación y el genotipo resistente. También el número de individuos con el genotipo doble homocigótico resistentes se encontró en mayor proporción en todas las poblaciones.

La atribución de la coocurrencia de ambas mutaciones en la población se atribuye a que ambas mutaciones aumentan la resistencia a insecticidas piretroides (Dusfour, Zorrilla, Guidez, Issaly, Girod, 2015). En el estado de Guerrero en México, también se encontró una coocurrencia de la mutación F1534C y V1016I. Se secuenciaron 6 individuos que tuvieran la mutación F1534C o la mutación V1016I. De estos 6 individuos; 2 presentaron el genotipo homocigótico mutante para ambas mutaciones, 1 individuo presentó el genotipo heterocigótico para la mutación F1534C y el genotipo homocigótico mutante para la mutación V1016I, los otros tres individuos únicamente presentaban el genotipo homocigótico resistente para la mutación F1534C. Según estos resultados la coocurrencia que tiene ambas mutaciones tiene una ventaja selectiva (Aponte, *et al.*, 2013). Las Poblaciones de *Ae. aegypti* de África en un estudio también presentaron una frecuencia alta de la mutación F1534C; sin embargo, únicamente se encontró un individuo heterocigótico de la mutación V1016I. Esto de igual forma se atribuyó a que la mutación V1016I presenta un costo alto de aptitud por lo tanto no será favorecida para ser seleccionada si no aparece en conjunto con la mutación F1534C (Maloof, Saavedra, Elizondo, Lozano, 2015). En las poblaciones de Brasil no se encontró evidencia de ningún haplotipo que presentara únicamente la mutación V1016I ya que siempre se encontraba presente únicamente en individuos que presentaran la mutación F1534C. Sin embargo, se llegó a concluir a que la mutación V1016I sí puede presentarse de forma independiente, aunque presentaría una frecuencia demasiado baja debido a su costo alto de aptitud, lo que concuerda con lo encontrado en el presente estudio (Linss, Brito, Garcia, Araki, Bruno, Lima, 2014).

Los resultados obtenidos en este estudio sobre la presencia y la ausencia de la mutación F1534C y V1016I, las frecuencias alélicas para cada mutación y la relación que éstas tienen con la resistencia al derribo por insecticidas piretroides, sugieren modificaciones urgentes en los programas de control vectorial utilizando insecticidas piretroides en Centroamérica. Estos sugieren un cambio del uso de insecticidas piretroides hacia otras moléculas o la constante variación de estas periódicamente y la implementación de otras medidas de control para *Ae. aegypti* en la región de Centroamérica. Estos cambios deben de realizarse para eliminar y evitar la movilización y diseminación de las mutaciones F1534C y V1016I hacia otros países de la región donde estas no se encuentran presentes.

También sugieren la importancia de un monitoreo y vigilancia constante a la susceptibilidad de las poblaciones de *Ae. aegypti* a los insecticidas piretroides de uso en la región de Centroamérica, para la detección temprana y prevenir la fijación de las mutaciones F1534C, V1016I y otras mutaciones también asociadas a la resistencia por derribo por insecticidas piretroides. Debe tomarse en cuenta los resultados de este estudio a la hora de tomar decisiones trascendentales concerniente al control químico de *Ae aegypti* en Centroamérica.

10. Conclusiones

1. En la región de Centroamérica se encontró presente la mutación F1534C y V1016I.
2. El uso de DDT e insecticidas piretroides y la migración fueron factores que favorecieron la aparición de las mutaciones F1534C y V1016I en la región y la fijación de la mutación F1534C en Costa Rica y en la localidad de Chorrera, Panamá.
3. La resistencia al derribo por insecticidas piretroides en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Centroamérica puede estar medida por múltiples factores y no exclusivamente por las mutaciones F1534C y V1016I en el canal de sodio controlado por voltaje.
4. No existe evidencia de una relación entre la presencia o ausencia de las mutaciones F1534C en el canal de sodio controlado por voltaje y la resistencia al derribo a insecticidas piretroides en las poblaciones de *Ae. aegypti* de la región de Centroamérica.
5. Existe evidencia de una relación entre la presencia o ausencia de las mutaciones V1016I en el canal de sodio controlado por voltaje y la resistencia al derribo a insecticidas piretroides en las poblaciones de *Ae. aegypti* de la región de Centroamérica.
6. Para las mutaciones F1534C y V1016I se encontraron los genotipos homocigóticos silvestres, homocigóticos mutante y heterocigótico en la región de Centroamérica.

11. Recomendación

1. Utilizar la dosis LD50 en los ensayos de resistencia a insecticidas piretroides para poder establecer una relación entre la resistencia y la presencia o ausencia de las mutaciones F1534C y V1016I en el canal de sodio controlado por voltaje y la resistencia al derribo a insecticidas piretroides en diferentes poblaciones de diferentes localidades de *Ae. aegypti* de la región de Centroamérica.
2. Aumentar el número de individuos resistentes a una muestra mayor o igual a 25 individuos para establecer una relación entre la presencia o la ausencia de las mutaciones F1534C, V1016I y el fenotipo susceptible o resistente al derribo por insecticidas piretroides, para cada una de las localidades de estudio.
3. Realizar un análisis filogenético de *Ae. aegypti* en el exón 31 y el exón que se encuentra entre el intrón 20 y 21 de muestras provenientes de Centroamérica, Norteamérica, Suramérica y Asia. Esto con el fin de establecer si hubo un flujo genético de las mutaciones F1534C y V1016I y para poder determinar si la aparición de estas mutaciones en Centroamérica se debe a la migración de estas de Suramérica, Norteamérica o Asia.
4. Realizar pruebas bioquímicas para detectar la sobreexpresión y la actividad de enzimas relacionadas a la resistencia de insecticidas piretroides junto con el análisis de la presencia o ausencia de las mutaciones F1534C y V1016I, para establecer si la resistencia a insecticidas piretroides en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Centroamérica está ligada a factores múltiples.

12. Referencias

Álvarez, C., Ponce, G., Saavedra, K., López, B., Flores, E. (2014). Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. *Pest Management Science*. 71: 863–869. doi:10.1002/ps.3846.

Álvarez, C., Ponce, G., Flores, E. (2016). Mechanisms of Permethrin resistance in two populations of *Aedes aegypti* in western Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 56: 43-52.

Agresti, A., Coull, A. (1998) Approximate is better than ‘exact’ for interval estimation of binomial proportions. *American Statistical Association* 52:119–126.

Alphey, L., Benedict, M., Bellini, R., Clark, G., Dame, A., Service, W., *et al.* (2010). Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 10:295–311.

Al Nazawi, A. M., Aqili, J., Alzahrani, M., McCall, P. J., & Weetman, D. (2017). Combined target site (kdr) mutations play a primary role in highly pyrethroid resistant phenotypes of *Aedes aegypti* from Saudi Arabia. *Parasites & Vectors*, 10, 161. <http://doi.org/10.1186/s13071-017-2096-6>

Anandamo, A. (2015). *Neurotoxicidad de Insecticidas piretroides*. Evaluación de riesgo. Madrid; España.

Aponte, H., Navarro, A., Manzanilla, R., Mendoza, F., López, A., Solis, A., Saide, F. *et al.*, (2013). The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 107. 226–234. 10.1016/j.pestbp.2013.07.005.

Apperson and Georghiou. (1975). Changes in Cross-Resistance Spectrum Resulting from Methyl Parathion Selection of *Culex tarsalis* Coq. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. ;24: 698- 703

Atencia, M., Pérez, M., Jaramillo, M., Caldera, S., Cochero, S., Bejarano, E. (2016). Primer reporte de la mutación F1534C asociada con resistencia cruzada a DDT y piretroides en *Aedes aegypti* en Colombia. *Biomédica*, 36(3), 432-437. doi:<https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2834>.

Ávila, G., Araujo, R., Herrera, G. (2010). Situación Epidemiológica del dengue en Honduras período 1991-2010. *Revista Médica de Honduras*, 28(3): 113-168.

Balabanidou, V., Kampouraki, A., MacLean, M., Blomquist, J., Tittiger, C., Juarez, P. *et al.* (2016). Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113: 9268–73. pmid:27439866

Baldacchino F, Caputo B, Chandre F, Drago A, Torre A, Montarsi F, et al. (2015). Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. *Pest Management Science*, 71: 1471–1485.

Bang, Y. H. 1985. Implications in the control of malaria vectors with insecticides in tropical countries of Southeast Asia. *Indian Society for Malaria and Other Communicable Diseases* 1:199-218

Beck, J. (1984). *Parasitología Médica*. 3ra. Edición. México; Interamericana.

Bellini, R., Albieri, A., Carrieri, M. Colonna, R., Donati, L., Magnani, M. *et al.* (2009). Efficacy and lasting activity of four IGRs formulations against mosquitoes in catch basins of northern Italy. *Europ Mosq Bull* 27:33–46 (2009).

Berenguer, J. (2006). *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. Barcelona. España; Ediciones de la Universidad de Barcelona.

Brengues, C., Hawkes, J., Chandre, F., McCarroll, L., Duchon, S., Guillet, P., *et al.* (2003). Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology*, 2003;17:87–94. doi: 10.1046/j.1365-2915.2003.00412.x.

Bisset, A., Rodríguez, M., Cáceres, L. (2003). Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en 2 cepas de *Aedes aegypti* de Panamá. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 55(3):191-195.

Bisset, J., Rodríguez, M., Fernandez, D. (2006). Selection of insensitive acetylcholinesterase as a resistance mechanism in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Santiago de Cuba. *Journal of Medical Entomology*, 2006;43: 1185–9. pmid:17162951

Bisset, J., Rodríguez, M., San Martín, J., Romero, J., Montoya, R. (2009). Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador, *Revista Panamericana de Salud Pública*, 26(3); p. 229-234.

Bolívar, A., Rojas, A., García, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 3(1) p.25-33

Calderón, Ó., Troyo, A. (2016). Evaluación de la resistencia a insecticidas en cepas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de la Región Caribe de Costa Rica. *Revista Cubana De Medicina Tropical*, 68(1).

Cáceres, L., Rovira, J., García, A., Torres, R., & De la Cruz, M. (2013). Determinación de la sensibilidad a insecticidas organofosforados, carbamato y piretroides en poblaciones de *Aedes aegypti* Linneaus, 1762 (Díptera: Culicidae) de Panamá. *Biomédica*, 33 (Sup1), 70-81.

Center for Disease Control and Prevention. (2010). Instrucciones para la Evaluación de la Resistencia a Insecticida en Vectores mediante del Ensayo Biológico de la Botella de los CDC. United States of America; Atlanta.

Center for Disease Control. (1980). Biología y control del *Aedes aegypti*. Vector Topics, 4;77 CDC. United States of America; Atlanta.

Chang, C., Shen, K., Wang, T., Lin, H., Hsu, L., Dai, M. (2009). A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39:272–278. doi: 10.1016/j.ibmb.2009.01.001.

Chavasse, C., Yap, H. (1997). World Health Organization. Division of Control of Tropical Diseases. Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva

Christophers, R. (1960). *Aedes aegypti: The yellow fever mosquito*. Londres; Cambridge University Press.

Consoli, R. & R. Lourenço de Oliveira. 1994. *Principais mosquitos de importancia sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro. Brasil; Fiocruz.

Crow ,J.(1957).Genetics of insecticide resistance to chemicals. *Annual Review of Entomology*, 2;227–246.

Darawi, M. N., Ai-Vyrn, C., Ramasamy, K., Hua, P. P. J., Pin, T. M., Kamaruzzaman, S. B., & Majeed, A. B. A. (2013). Allele-specific polymerase chain reaction for the detection of Alzheimer’s disease-related single nucleotide polymorphisms. *BMC Medical Genetics*, 14, 27.<http://doi.org/10.1186/1471-2350-14-27>

Davies, T., Williamson, M.(2007): DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *Life*, 59(3); 151–162

Davies, E., Field, M., Usherwood R., Williamson, S. (2007). A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Molecular Biology*, 16: 361–75. [pmid:17433068](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17433068/)

Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., Zhorov, B. (2014). Molecular Biology of Insect Sodium Channels and Pyrethroid Resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 50, 1–17. <http://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.012>

Du, Y., Nomura, Y., Satar, G., Hu, Z., Nauen, R., He, Y., Dong, K. (2013). Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(29), 11785–11790. <http://doi.org/10.1073/pnas.1305118110>

Dusfour, I., Zorrilla, P., Guidez, A., Issaly, J., Girod, R., *et al.* (2015). Deltamethrin Resistance Mechanisms in *Aedes aegypti* Populations from Three French Overseas Territories Worldwide. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(11): e0004226. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004226>

Ecoambiente. (2009). “Linea de trnsmision 230kV Lorena-Prudenciagualaca-Guasquitas”. Chiriqui; Panamá.

Forattini, S. (1965). *Entomología Medica*. Brasil. Universidad de Sao Paulo.

Gariyban, L., & Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), e6. <http://doi.org/10.1038/jid.2013.1>

García, G., Flores, E., Fernández, I., Saavedra, K., Reyes, G., Lozano, S., *et al.* (2009) Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México. *PLoS Neglect Tropical Diseases*. 3(10):e531.

García, J., Bernal, A., López, J. (2013). Calculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investigación en Educación Médica*, 2(8):217-224.

Germer, S., Higuchi, R. (1999). Single-tube genotyping without oligonucleotide probes. *Genome Research*.9:72–78.

Giorina, V., Micheloud, A., Berron, I., Claus, D. (2016) *Aspectos generales de los virus Dengue, Chikungunya y Zika*. Buenos aires. Argentina; Universidad Nacional del Litoral.

Grigoraki, L., Balabanidou, V., Meristoudis, C., Miridakis, A., Ranson, H., Swevers L, *et al.* (2016) Functional and immunohistochemical characterization of CCEae3a, a carboxylesterase associated with temephos resistance in the major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016;74: 61–7. pmid:27180726

Grisales, N., Poupardin, R., Gomez, S., Gonzalez, I., Ranson, H., *et al.* (2013) Temephos Resistance in *Aedes aegypti* in Colombia Compromises Dengue Vector Control. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7(9): e2438. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002438>

Gonzales, G. (2013). *Resistencia a insecticidas en el mosquito vector del dengue Aedes aegypti (L) en dos épocas de transmisión de la enfermedad en Mérida Yucatán*. Universidad Autónoma de México. México

Hamid, P. H., Prastowo, J., Ghiffari, A., Taubert, A., & Hermosilla, C. (2017). *Aedes aegypti* resistance development to commonly used insecticides in Jakarta, Indonesia. *PLOS ONE*, 12(12), e0189680. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0189680>

Harris, A., Rajatileka, S., Ranson, H. (2010). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2010;83: 277–284. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0623

Hemingway, J., Boddington, R., Harris, J., & Dunbar, S. (1989). Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. *Bulletin of Entomological Research*, 79(1), 123-130. doi:10.1017/S0007485300018630

Hemingway, J., Hawkes, J., McCarroll, L., Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 653–65. pmid:15242706

Hemingway, J., Ranson, H. (2000). Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. *Annual Review of Entomology*, 45:371 – 391.

Husham, O., Abdalmagid A., Brair, M.(2010) Status Susceptibility of dengue vector; *Aedes aegypti* to different groups of Insecticides in Port Sudan City - Red Sea State. Sudan. *Journal of Public Health*, 5(4):199-202.

Instituto de Salud, Ambiente y Trabajo. (2013). Diagnóstico situacional del uso de DDT y el control de la malaria. Informe regional para México y Centroamérica. México, D.F. Sin año, Disponible en http://www.cec.org/Storage/44/3646_InfRegDDTb_ES_EN.pdf. Consultado en Abril de 2018

Ishak, H., Jaal, Z., Ranson, H., Wondji, S. (2015). Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (*kdr*) in the dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Malaysia. *Parasit Vectors*; 8:181. doi: 10.1186/s13071-015-0797-2.

Jansen, C., Beebe, W. (2010). The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes and Infections*, 12; 272–279.

Juliano, A., P Lounibos, L. (2005). Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. *Ecology Letters*. 8, 558–574.

Juliano, A., Lounibos, P. (2015). Ecology of invasive mosquitoes: Effects on resident species and on human health. *Ecology Letters*. 2005;8:558-74. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00755>

Kantor, I. (2016). Dengue, Zika y Chikungunya. *Medicina (Buenos Aires)*, 76(2), 93-97.

Kasai, S., Komagata, O., Itokawa, K., Shono, T., Ng, C., Kobayashi, M., *et al.* (2015). Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2014;8:e2948. doi: 10.1371/journal.pntd.0002948.

Kawada, H., Higa, Y., Futami, K., Muranami, Y., Kawashima, E., *et al.* (2016). Discovery of Point Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel from African *Aedes aegypti* Populations: Potential Phylogenetic Reasons for Gene Introgression. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10(6): e0004780. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004780>

Kawada, H., Higa, Y., Komagata, O., Kasai, S., Tomita, T., Thi, N., *et al.* (2009) Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2009;3:e527. doi: 10.1371/journal.pntd.0000527

Kawada, H., Oo, Z., Thaug, S., Kawashima, E., Maung, N., Thu, M., *et al.* (2014). Co-occurrence of point mutations in the voltage-gated sodium channel of pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Myanmar. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8:e3032. doi: 10.1371/journal.pntd.0003032.

Kotsakiozi P, Gloria-Soria A, Caccone A, Evans B, Schama R, *et al.* (2017) Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil, the major vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(7): e0005653. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005653>

Kostaropoulos, I., Papadopoulos, I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., Papadopoulou, E. (2001). The role of glutathione S-transferases in the detoxification of some

organophosphorus insecticides in larvae and pupae of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pest Management*, 57(6):501-8

Klaassen, C. (1996). *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 5ta edicion. Nueva York, Mc Graw Hill.

Kushwah, S., Dykes, L., Kapoor, N., Adak, T., Singh, P. (2015). Pyrethroid-Resistance and Presence of Two Knockdown Resistance (kdr) Mutations, F1534C and a Novel Mutation T1520I, in Indian *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9(1): e3332. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003332>.

Lee, L., Choong, H., Goh, L., Ng, C., Lam, G.(2014). Bioassay and biochemical studies of the status of pirimiphos-methyl and cypermethrin resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore. *Tropical Biomedicine*, 31: 670–9. pmid:25776592

Lima, B., Da, P., Silva, C., Galardo K., Soares, S., Braga, A., *et al.*(2003). Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the State of Rio de Janeiro and Espírito Santo, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(3):329-333

Li, X., Kaufman, E., Xue, D., Zhao, H., Wang, G., Yan, T., *et al.* (2015) Relationship between insecticide resistance and *kdr* mutations in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southern China. *Parasit & Vectors*, 8:325. doi: 10.1186/s13071-015-0933-z.

Lines, D., Myamba, J., Curtis, F. (1987). Experimental hut trials of permethrin impregnated mosquito nets and curtains against malaria vectors in Tanzania. *Medical and Veterinary Entomology*, 1;37–51

Linss, J., Brito, L., Garcia, A., Araki, A., Bruno, R., Lima, J. (2014). Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasit & Vectors*, 7; 25. doi:10.1186/1756-3305-7-25

Lofgren, S., Dame, A., Breeland, G., Weidhaas, E., Jeffery, G., Kaiser, R. (1974). Release of chemosterilized males for the control of *Anopheles albimanus* in El Salvador. 3. Field methods and population control. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 23:288–297.

Macheno M., Kroeger, A., Ordoñez, J. (2001). *No más Problemas de salud Causados por insectos*. México; Editorial Paz de México.

Mbogo, M., Baya, M., Ofulla, O., Githure, J., Snow, W. (1996). The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. *Medical and Veterinary Entomology*, 10, pp. 251–259.

Mari, R. (2013). Estudio faunístico de los mosquitos (Díptera, Culicidae) de la comarca del Somontano de Barbastro y su posible relevancia en la difusión del paludismo. *Anales de Biología*, 35;123-134. doi: <http://dx.doi.org/10.6018/analesbio.0.35.18>

Maloof, V., Saavedra, K., Elizondo, E., Lozano S. (2015). Coevolution of the Ile1,016 and Cys1,534 Mutations in the Voltage Gated Sodium Channel Gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2015;9: e0004263. doi:10.1371/journal.pntd.0004263.

Marten, G., Cush, M., Fernandez, E., Boijas, G., Portillo, H. (1992). Mesocyclops longisetus and others forms of biological control for *Aedes aegypti* larvae in the integrated dengue control project, El Progreso, Honduras. Mexico. México DF.; Ministry of Health.

Marcombe, S., Poupardin, R., Darriet, F., Reynaud, S., Bonnet, J., Strode, C., *et al.* (2009). Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics*, 2009; 26 (10):494.

Marquardt, W., Demaree, R., Grieve, R.(2000). *Parasitology and Vector Biology*. 2da edicion edition. Hardcourt Academic Press. Estados Unidos.

Martins, A. J., Lima, J. B., Peixoto, A. A. and Valle, D. (2009), Frequency of Val1016Ile mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* Brazilian populations. *Tropical Medicine & International Health*, 14: 1351-1355. doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02378.x

Ministerio de Salud de Panamá. (2001). Diagnostico situacional del uso del DDT y el control de la malaria en Panamá. Panamá.

Mirsa, A. (1956). Datos experimentales sobre aspectos bioecologicos del *Aedes aegypti*, desarrollados en el laboratorio. *Revista de Sanidad y Asistencia social*, 341.

Ministerio de Salud de Costa Rica. (2001). Diagnóstico Situacional de la malaria y el uso de DDT en Costa Rica. San José; Costa Rica.

Ministerio de Salud de Costa Rica. (2008). Efectos del clima, su variabilidad y cambio climático sobre la salud humana en Costa Rica. San José; Costa Rica.

Ministerio de Salud y Asistencia Social. (2001). Diagnóstico Situacional del Uso de DDT y el Control de la Malaria en Guatemala. Guatemala.

Montella, R., Martins, J., Viana, F., Lima, B., Braga, A., Valle, D. (2007). Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(3):467-477.

Moyes, L., Vontas, J., Martins, J., Ng C., Koou, Y. (2017) Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(7): e0005625. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005625>.

Myakishev, M., Khiripin, Y., Hu, S., Hamer, HD. (2001) High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers. *Genome Research*, 11:163–169. doi: 10.1101/gr.157901.

Nelson, J. (1986). *Aedes aegypti*: biología y ecología. U.S.A. Organización Panamericana de la Salud.

Ocampo, B., Julieth, N., Carabali, M., Alexander, N., Osorio, L. (2014). Reduction in dengue cases observed during mass control of *Aedes* (*Stegomyia*) in street catch basins in an endemic urban area in Colombia. *Acta Tropica*, 132:15–22

Ocampo, B., Salazar, J., Mina, J., McAllister, J., Brogdon, W. (2011). Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Tropica*, 118 (1):37-44.

Omoto, C.(2000) *Modo de Ação dos Inseticidas e Resistência de Insetos a Inseticidas*. In Bases e Técnicas de Manejo de Insetos. Brazil; Universidade Federal de Santa Maria.

Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. (2016). Número de casos reportados de chikungunya en países o territorios de las Américas 2016 casos acumulados. Estados Unidos.

Organización Mundial de la Salud. (2016). Número de casos reportados de dengue y dengue grave en las Américas. Estados Unidos.

Otero, J., Medina, E. (2005). Análisis de datos Cualitativos. México, Universidad Autónoma de México.

Pan American Health Organization, World Health Organization. (2016). Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015-2016. United States of America; Washington D.C.

Patterson, J., Sammon, M., & Garg, M. (2016). Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *Western Journal of Emergency Medicine*, 17(6), 671–679. <http://doi.org/10.5811/westjem.2016.9.30904>

Pan American Health Organization. (1997). The feasibility of eradicating *Aedes aegypti* in the Americas. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 1: 68–72. pmid:9128110

Patterson, S., Weidhaas, E., Ford, R., Lofgren, S.(1970). Suppression and elimination of an island population of *Culex pipiens quinquefasciatus* with sterile males. *Science*, 168:1368–1370

Poupardin, R., Srisukontarat, W., Yunta, C., Ranson, H. (2014). Identification of carboxylesterase genes implicated in temephos resistance in the dengue vector *Aedes Aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 8: e2743. pmid:24651719

Plernsub, S., Saingamsook, J., Yanola, J., Lumjuan, N., Tippawangkosol, P., Sukontason, K., Somboon, P. (2016). Additive effect of knockdown resistance mutations, S989P, V1016G and F1534C, in a heterozygous genotype conferring pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. *Parasites & Vectors*, 9:417. <http://doi.org/10.1186/s13071-016-1713-0>

Pulido, A., Mogollón, J., Morales, H., Rincón, M.(2006). Estandarización y Aplicación de la técnica de PCR- Anidado para la detección *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinaria y de Zootecnia*, 53; p.22-32

Ramírez, J., Vargas, G., Tovilla, C., Fragoso, J. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta medica de Mexico*, 149:220-8.

Ranson, H., Hemingway, J. (2005). Mosquito glutathione transferases. In: Sies H, Packer L, editors. *Gluthione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases*. 226–41.

Ranson, H. Burhani, J. Lumjuan, N. (2009) Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA.net Journal* 1 (1).

Rajatileka, S., Black, C., Saavedra, R., Trongtokit, K., Apiwathnasorn, C., McCall, J. et al. (2008) Development and application of a simple colorimetric assay reveals widespread distribution of sodium channel mutations in Thai populations of *Aedes aegypti*. *Acta Tropica*, 108:54–57. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.08.004.

Redinbo, R., Potter, M. (2005). Mammalian carboxylesterases: from drug targets to protein therapeutics. *DRUG DISCOVERY TODAY*, 1; 10 (5): 313.

Rodríguez, R. (2002). Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54(3), 189-201.

Rodriguez, M. (2008). *Estudios de la resistencia a insecticidas en Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri.

Rodríguez, S., Barrera, S. (2004). La reacción en la cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. 2(4); p.323-335.

Rodríguez, M., Bisset, J., Ricardo, Y., Pérez. O., Montada, D., Figueredo, D., et al. (2010) Resistencia a insecticidas organofosforados en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Santiago de Cuba, 1997-2009. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 62 (3):217-223.

Rose R. 2001. Pesticide and Public Health: Integrated Methods of Mosquito Management. *National Center for Infectious Diseases*, 7(1):17-23.

Saavedra, K., Urdaneta, L., Rajatileka, S., Moulton, M., Flores, E., Fernández, I., Bisset, J., Rodríguez, M., McCall, J., Donnelly, J., Ranson, H., Hemingway, J., Black, C. (2007). A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 16: 785–798. doi:10.1111/j.1365-2583.2007.00774.x

Saavedra K., Ponce, G., Fernández, I., Torres, R., Flores, A. (2007). Mutación asociada a la resistencia a insecticidas piretroides en el mosquito transmisor de dengue (*Aedes aegypti*). *Ciencia UNAL*, 11(4).

Santoyo, J., Montesinos, A., Barbosa, R., García, S., Rodríguez, D., Ramos, T. (2014). El Citocromo P-450. *Revista del Hospital Juarez de México*, 81(4): 250-256

Sanz, J., Lawrence, P., Pérez, J. (1997). Uso de plaguicidas en la Agroindustria de Costa Rica. Costa Rica.

Saume, R. (1992). *Introducción a la química y toxicología de insecticidas*. Industria gráfica Integral. Maracay. Venezuela

Sayono, S., Hidayati, P., Fahri, S., Sumanto, D., Dharmana, E., Hadisaputro, S. *et al.* (2016). Distribution of voltage-gated sodium channel (Nav) alleles among the *Aedes aegypti* populations in central Java Province and its association with resistance to pyrethroid insecticides. *PLoS One*, 11:e0150577.

Schleier, J., Peterson, R.(2011): Pyrethrins and Pyrethroid Insecticides. In Green Trends in Insect Control. Cambridge. *Royal Society of Chemistry*, 94–131

Silva, A., Santos, J., Martins, A.(2014). Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids. *Biomed Central*, 7(450) p.2.

Solis, C. (2000). Alternativas Diversas para el Combate y Optimización de Estrategias en el Manejo de Mosquitos Culícidos en la Zona Metropolitana de Monterrey N. L. México. Universidad Autónoma de Nuevo León. Mexico

Srisawat, R., Komalamisra, N., Eshita, Y., Zheng, M., Ono, K, et al. (2010) Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Applied Entomology and Zoology*, 45: 275–282

Stenhouse, A., Plernsub, S., Yanola, J., Lumjuan, N., Dantrakool, A., Choochote, W., *et al.* (2013). Detection of the V1016G mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by allele-specific PCR assay, and its distribution and effect on deltamethrin resistance in Thailand. *Parasit & Vectors*, 6:253. doi: 10.1186/1756-3305-6-253.

Suarez, F., Nelson, M. (1981) Registro de Altitud *Aedes aegypti*. *Biomedica*, 1;225.

Subramanyam B, Hagstrum D.(1996). *Resistance Measure and Management*. In Integrated Management of Insects in Stored Products. New York; USA.

Tabachnick J. (1991). Evolutionary genetics and arthropodborne disease: The yellow fever mosquito. *American Entomologist*, 37:14-24.

Tamay, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigacion en discapacidad*, 2(2): 70-78.

Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2015). Mega (6) [Software]. Recuperado de <https://www.megasoftware.net/>

Tinker E., Olano A., (1993). Ecología del *Aedes aegypti* en un pueblo de Colombia, Sur America. *Biomedica*, 13:5-14.

URS holdings. (2007). Proyecto de ampliación del canal de Panamá. Panamá.

Walker, H., Hopkin, P., Sibly, M., Peakall, D. (2001). Principles of Ecotoxicology. Taylor and Francis, UK.

Wan, O., Nazni, A., Noramiza, S., Shafa'arKo'ohar, S., Azirol-Hisham, A., Nor, R. (2010) Vertical dispersal of *Aedes* (*Stegomyia*) spp. in high-rise apartments in Putrajaya, Malaysia. *Malaysian Society of Parasitology and Tropical Medicine*, 2010; 27(3):662-667.

Weill, M., Malcolm, C., Chandre, F., Mogensen, K., Berthomieu, A., Marquine, M., *et al.* (2004). The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology*, 2004;13: 1–7. pmid:14728661

Wilkerson, R., Linton, M., Fonseca, D., Schultz, T., Price, D., Strickman, D. (2015) Making Mosquito Taxonomy Useful: A Stable Classification of Tribe Aedini that Balances Utility with Current Knowledge of Evolutionary Relationships. *PLoS ONE*, 10(7): e0133602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133602>

Wood, R., Hanrahan, S., Coetzee, M., Koekemoer, L., Brooke, D. (2010). Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites & Vectors*.

World Health Organization. (1981). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva.

World Health Organization. (1982). Manual on environmental management for mosquito control. Geneva.

World Health Organization. (1986). Prevention and control of yellow fever in Africa. Prevention and control handbooks. Disponible en : <http://www.who.int/iris/handle/10665/39154>. Consultado en Junio de 2018.

World Health Organization. (2007). Insecticide-Treated Mosquito Nets: a WHO Position Statement. Geneva.

World Health Organization. (2012). Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors (GPIRM). Geneva.

World Health Organization. (2009) Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. Geneva: World Health Organization. x, 147 p. p

Yaicharoen, R., Kiatfuengfoo, R., Chareonviriyaphap, T., Rongnoparut, P. (2005) Characterization of deltamethrin resistance in field populations of *Aedes aegypti* in Thailand. *Journal of Vector Ecology*, 30(1):144-150.

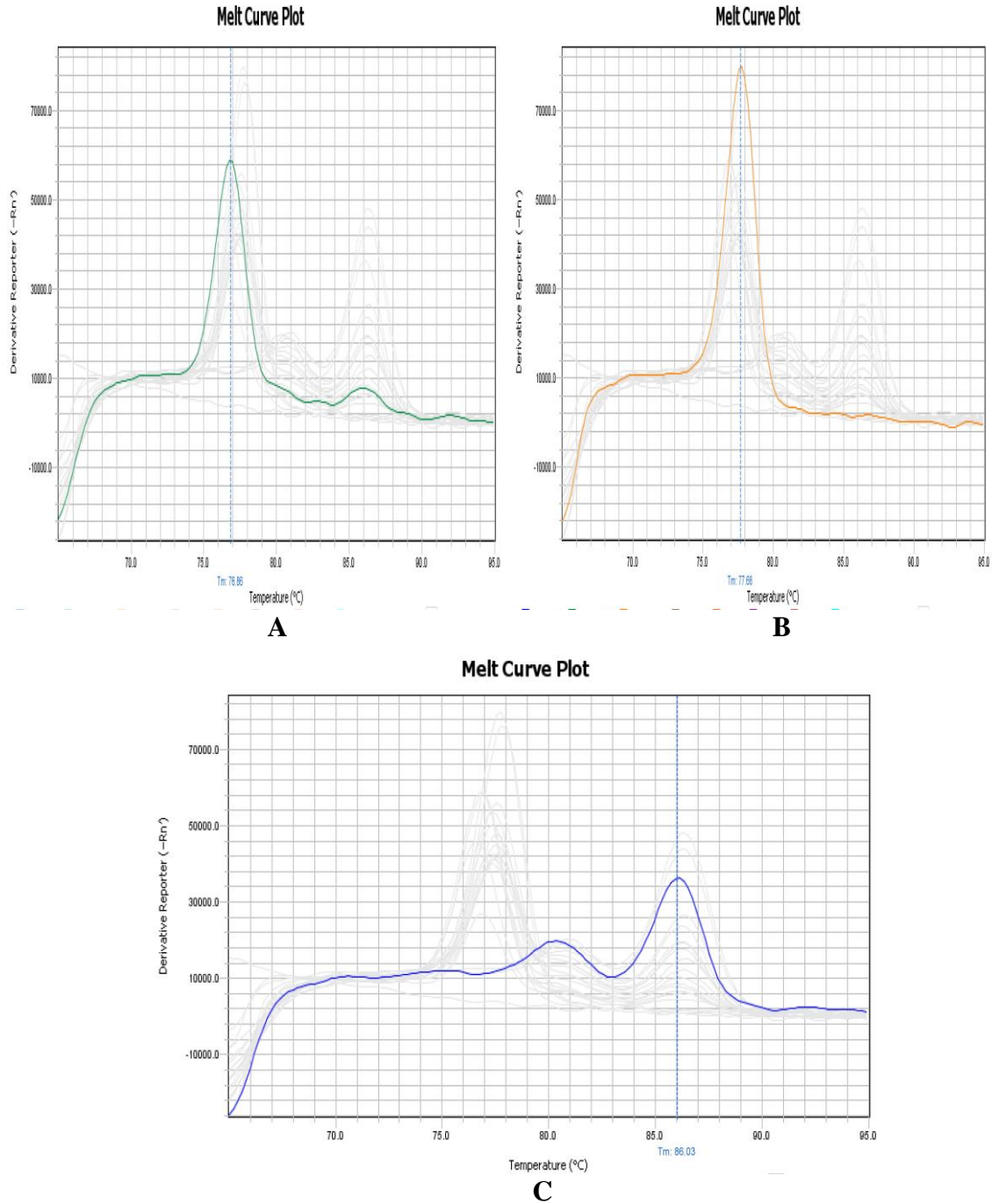
Yanola, J., Somboon, P., Walton, C., Nachaiwieng, W., Prapanthadara, L. (2010). A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96:127–31.

Yanola, J., Somboon, P., Walton, C., Nachaiwieng, W., Somwang, P., Prapanthadara, A. (2011). High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Tropical Medicine & International Health*, 16:501–509. doi: 10.1111/j.1365-3156.2011.02725.x.

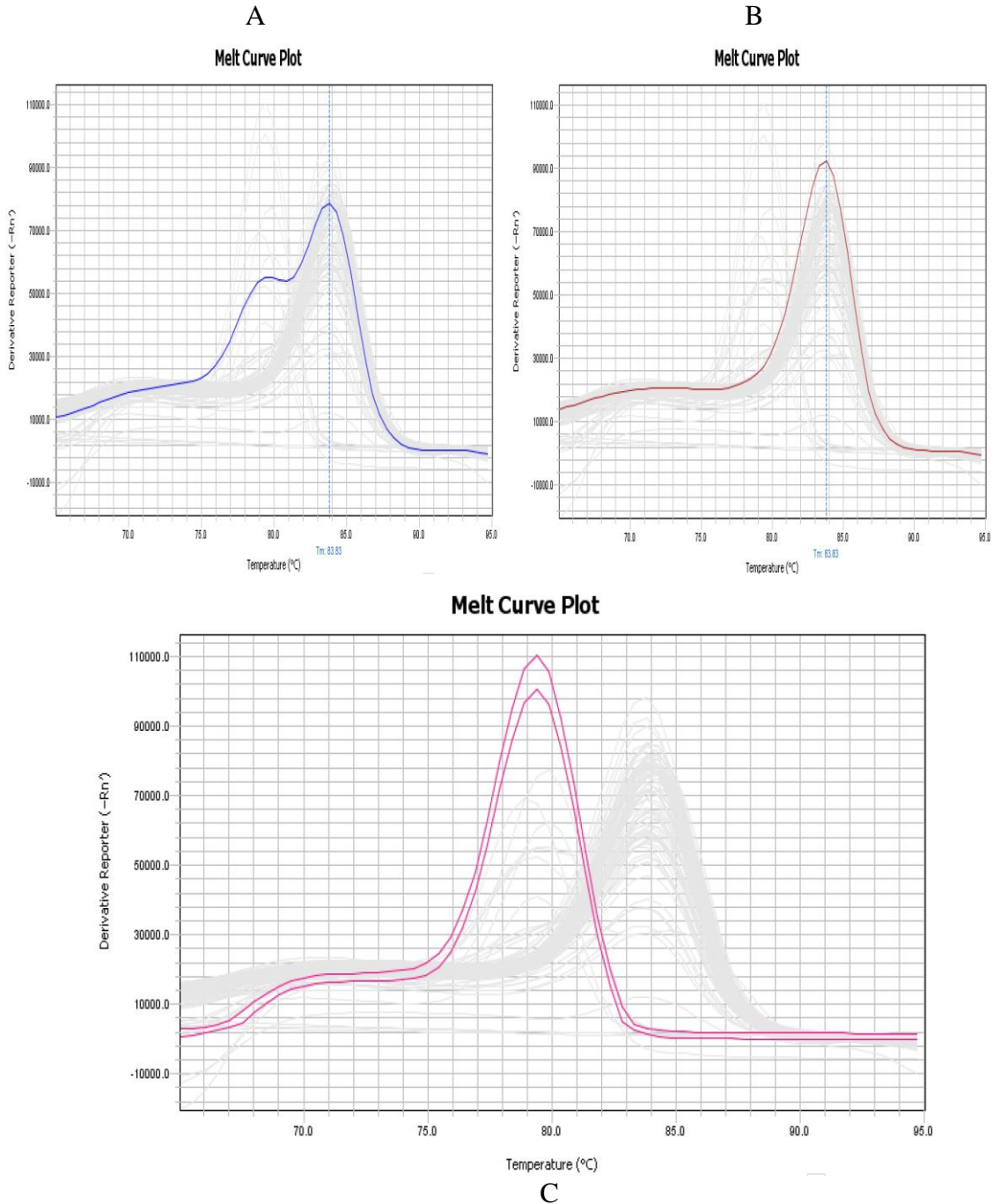
Zaim, M., Jambulingam, P. (2007). *Global insecticide use for vector-borne disease control. In World Health Organization. Department of Control of Neglected Tropical Diseases (NTD) WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES)*. 3th ed. Geneva. WHO Library Cataloguing-in-Publication

13. Anexos

Anexo 1. A: Curva de fusión en *Ae. aegypti* de la mutación V1016I para el genotipo heterocigótico. **B:** Curva de fusión en *Ae. aegypti* de la mutación V1016I para el genotipo homocigótico mutante. **C:** Curva de fusión en *Ae. aegypti* de la mutación V1016I para el genotipo homocigótico silvestre.



Anexo 2. A: Curva de fusión en *Ae. aegypti* de la mutación F1534C para el genotipo heterocigótico. **B:** Curva de fusión en *Ae. aegypti* de la mutación F1534C para el genotipo homocigótico mutante. **C:** Curva de fusión en *Ae. aegypti* de la mutación F1534C para el genotipo homocigótico silvestre.



Anexo 3. Cuadro de contingencia de las localidades de estudio para las mutaciones F1534C en *Ae. aegypti*.

Localidad	Fenotipo	No. Individuos con la mutación	No. De individuos sin la mutación	Total
Limón	Susceptible	41	0	41
	Resistente	9	0	9
Total		50	0	50
Prados del río	Susceptible	45	2	3
	Resistente	2	0	47
Total		47	2	50
Chorrera	Susceptible	45	0	45
	Resistente	5	0	5
Total		50	0	50
Chiriquí	Susceptible	44	4	48
	Resistentes	2	0	2
Total		46	4	50

Anexo 4. Cuadro de contingencia de las localidades de estudio para las mutaciones V1016I en *Ae. aegypti*.

Localidad	Fenotipo	No. Individuos con la mutación	No. De individuos sin la mutación	Total
Limón	Susceptible	9	32	41
	Resistente	2	7	9
Total		11	39	50
Prados del río	Susceptible	5	42	47
	Resistente	3	0	43
Total		8	42	50
Chorrera	Susceptible	22	23	45
	Resistente	5	0	5
Total		27	23	50
Chiriquí	Susceptible	28	20	48
	Resistentes	1	1	2
Total		29	21	50

Anexo 5. Cuadro de resultados PCR alelo específicos para cada una de las muestras de Limón, Costa Rica de estudio para las mutaciones F1534C y V1016I en *Ae. aegypti*.

ID muestra	Resultado PCR F1534C	Resultado PCR v1016I
5-S-18	Resistente	Heterocigótico
5-S-57	Resistente	Resistente
1-S-54	Resistente	Heterocigótico
5-R-7	Resistente	Susceptible
1-S-37	Resistente	Susceptible
1-S-39	Resistente	Heterocigótico
5-R-11	Resistente	Resistente
1-S-56	Resistente	Heterocigótico
5-S-48	Resistente	Heterocigótico
5-S-51	Resistente	Resistente
5-S-38	Resistente	Heterocigótico
5-S-9	Resistente	Resistente
5-S-45	Resistente	Susceptible
1-S-36	Resistente	Resistente
1-S-20	Resistente	Heterocigótico
1-S-65	Resistente	Heterocigótico
5-S-87	Resistente	Susceptible
1-S-60	Resistente	Resistente
1-S-68	Resistente	Susceptible
5-S-16	Resistente	Susceptible
5-S-55	Resistente	Susceptible
5-S-11	Resistente	Resistente
5-R-13	Resistente	Susceptible
1-S-52	Resistente	Heterocigótico
5-S-14	Resistente	Heterocigótico
5-S-86	Resistente	Heterocigótico
5-S-28	Resistente	Heterocigótico
5-S-17	Resistente	Susceptible
5-S-54	Resistente	Susceptible
1-S-69	Resistente	Susceptible
5-S-76	Resistente	Heterocigótico
1-S-43	Resistente	Susceptible
1-S-75	Resistente	Susceptible
1-S-15	Resistente	Susceptible
1-S-34	Resistente	Heterocigótico
1-S-27	Resistente	Resistente
1-S-24	Resistente	Resistente
1-S-14	Resistente	Heterocigótico

5-S-62	Resistente	Heterocigótico
5-S-77	Resistente	Susceptible
1-S-17	Resistente	Heterocigótico
1-S-31	Resistente	Heterocigótico
1-S-2	Resistente	Susceptible
1-S-5	Resistente	Resistente
1-R-1	Resistente	Susceptible
1-R-6	Resistente	Resistente
1-R-9	Resistente	Susceptible
1-R-11	Resistente	Susceptible
1-R-15	Resistente	Heterocigótico
1-R-20	Resistente	Heterocigótico

Anexo 6. Cuadro de resultados PCR alelo específicos para cada una de las muestras de Prados del Río, Guatemala de estudio para las mutaciones F1534C y V1016I en *Ae. aegypti*.

ID muestra	Resultado PCR F1534C	Resultado PCR v1016I
7-S-8	Resistente	Heterocigótico
6-S-41	Resistente	Susceptible
6-S-44	Resistente	Heterocigótico
7-S-12	Resistente	Resistente
7-S-55	Resistente	Heterocigótico
6-R-8	Resistente	Resistente
7-S-71	Resistente	Heterocigótico
6-S-18	Resistente	susceptible
6-S-51	Resistente	Heterocigótico
7-S-52	Resistente	Susceptible
6-S-54	Resistente	Susceptible
7-S-42	Resistente	Heterocigótico
6-S-52	Resistente	Heterocigótico
7-S-23	Resistente	Heterocigótico
6-S-33	Resistente	Heterocigótico
7-S-25	Resistente	Resistente
6-S-22	Resistente	Heterocigótico
6-S-59	Resistente	Heterocigótico
6-R-5	Resistente	Resistente
7-S-46	Resistente	Susceptible
6-S-12	Resistente	Heterocigótico
6-S-26	Resistente	Heterocigótico
7-S-14	Resistente	Resistente
7-S-58	Resistente	Heterocigótico
7-S-43	Resistente	Heterocigótico
7-S-34	Resistente	Heterocigótico
7-S-45	Resistente	Heterocigótico
7-S-10	Resistente	Heterocigótico
7-S-9	Resistente	Heterocigótico
6-S-35	Heterocigótico	Heterocigótico
7-S-37	Resistente	Heterocigótico
7-S-40	Resistente	Heterocigótico
6-S-69	Resistente	Heterocigótico
6-S-70	Resistente	Susceptible
6-S-60	Resistente	Susceptible
6-S-61	Resistente	Resistente
6-S-42	Resistente	Heterocigótico

6-S-30	Resistente	Heterocigótico
6-S-47	Resistente	Heterocigótico
7-S-19	Resistente	Heterocigótico
7-S-66	Heterocigótico	Heterocigótico
7-S-3	Resistente	Heterocigótico
7-S-51	Resistente	Heterocigótico
6-S-2	Resistente	Heterocigótico
6-S-3	Resistente	Heterocigótico
6-S-49	Resistente	Heterocigótico
6-R-4	Resistente	Susceptible
6-S-17	Resistente	Heterocigótico
7-S-27	Resistente	Susceptible
7-S-59	Resistente	Resistente
6-R-9	Resistente	Resistente
6-R-2	Resistente	Resistente
6-R-7	Resistente	Susceptible

Anexo 7. Cuadro de resultados PCR alelo específicos para cada una de las muestras de Chorrera, Panamá de estudio para las mutaciones F1534C y V1016I en *Ae. aegypti*.

ID muestra	Resultado PCR F1534C	Resultado PCR v1016I
9-S-114	Resistente	Susceptible
8-S-57	Resistente	Heterocigótico
8-S-65	Resistente	Resistente
8-S-3	Resistente	Heterocigótico
8-S-23	Resistente	Susceptible
9-S-123	Resistente	Resistente
8-S-27	Resistente	Heterocigótico
8-S-13	Resistente	Susceptible
9-S-83	Resistente	Resistente
9-S-48	Resistente	Heterocigótico
9-S-49	Resistente	Resistente
8-S-16	Resistente	Heterocigótico
8-R-70	Resistente	Resistente
9-S-62	Resistente	Resistente
8-S-68	Resistente	Resistente
8-S-37	Resistente	Resistente
8-S-26	Resistente	Heterocigótico
9-S-85	Resistente	Heterocigótico
8-R-73	Resistente	Resistente
9-S-97	Resistente	Resistente
9-S-56	Resistente	Heterocigótico
9-S-91	Resistente	Resistente
9-S-6	Resistente	Heterocigótico
8-S-40	Resistente	Resistente
9-S-57	Resistente	Susceptible
8-S-35	Resistente	Susceptible
8-S-8	Resistente	Heterocigótico
9-S-27	Resistente	Susceptible
8-R-96	Resistente	Resistente
9-S-17	Resistente	Heterocigótico
9-S-61	Resistente	Resistente
9-S-18	Resistente	Heterocigótico
8-R-85	Resistente	Resistente
9-S-51	Resistente	Resistente
9-S-120	Resistente	Resistente
8-R-81	Resistente	Resistente
8-S-45	Resistente	Heterocigótico
9-S-53	Resistente	Heterocigótico

9-S-110	Resistente	Resistente
8-S-38	Resistente	Heterocigótico
9-S-29	Resistente	Resistente
9-S-30	Resistente	Heterocigótico
9-S-105	Resistente	Resistente
9-S-37	Resistente	Resistente
9-S-60	Resistente	Resistente
9-S-73	Resistente	Resistente
8-S-30	Resistente	Resistente
8-S-4	Resistente	Heterocigótico
9-S-90	Resistente	Resistente
8-S-58	Resistente	Heterocigótico
8-R-100	Resistente	Resistente
8-R-99	Resistente	Resistente
8-R-97	Resistente	Resistente
8-R-74	Resistente	Resistente
8-R-84	Resistente	Susceptible
8-R-83	Resistente	Resistente
8-R-89	Resistente	Resistente
8-R-91	Resistente	Resistente
8-R-92	Resistente	Resistente

Anexo 8. Cuadro de resultados PCR alelo específicos para cada una de las muestras de Chiriquí, Panamá de estudio para las mutaciones F1534C y V1016I en *Ae. aegypti*.

ID muestra	Resultado PCR F1534C	Resultado PCR v1016I
10-S-16	Resistente	Resistente
10-S-55	Resistente	Susceptible
11-S-56	Resistente	Resistente
11-S-51	Resistente	Susceptible
11-S-89	Resistente	Resistente
11-S-9	Resistente	Resistente
11-S-52	Heterocigótico	Heterocigótico
10-S-31	Resistente	Heterocigótico
11-S-58	Resistente	Resistente
10-S-45	Resistente	Resistente
11-S-72	Resistente	Heterocigótico
10-S-78	Resistente	Heterocigótico
10-S-51	Resistente	Heterocigótico
11-S-89	Resistente	Susceptible
11-S-74	Resistente	Resistente
10-S-24	Resistente	Resistente
10-S-40	Susceptible	Heterocigótico
11-S-70	Resistente	Resistente
10-S-30	Resistente	Heterocigótico
10-S-81	Resistente	Heterocigótico
11-S-26	Resistente	Heterocigótico
11-S-97	Resistente	Resistente
11-S-24	Resistente	Resistente
10-S-11	Resistente	Heterocigótico
10-S-4	Susceptible	Susceptible
11-S-92	Resistente	Heterocigótico
10-S-69	Resistente	Resistente
11-S-12	Resistente	Heterocigótico
10-R-1	Resistente	Heterocigótico
11-S-49	Resistente	Resistente
11-S-44	Resistente	Resistente
10-S-5	Resistente	Resistente
11-S-36	Resistente	Resistente
11-S-100	Resistente	Heterocigótico
11-S-20	Resistente	Resistente
11-S-30	Resistente	Resistente
11-S-35	Resistente	Resistente
11-S-19	Resistente	Resistente

11-S-6	Resistente	Heterocigótico
11-S-59	Resistente	Heterocigótico
11-S-57	Resistente	Resistente
10-S-18	Resistente	Resistente
11-S-54	Resistente	Resistente
10-S-73	Resistente	Resistente
11-S-67	Resistente	Resistente
11-S-34	Resistente	Resistente
10-R-8	Resistente	Resistente
10-S-29	Resistente	Resistente
10-S-65	Resistente	Susceptible
10-R-4	Resistente	Resistente
10-R-7	Resistente	Resistente
10-R-10	Resistente	Resistente
11-S-7	Resistente	Resistente



Francisco Josué López Hun
Autor



Dr. Carmen Elena Castillo
Asesor de Tesis



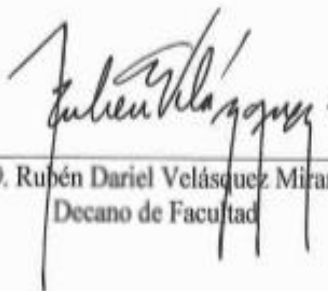
Licdo. Edwin David Castañeda
Asesor de Tesis



Dr. Sergio Alejandro Melgar
Revisor de Tesis



Licda. Ana Rosalito Barrios Solís de Rodas
Directora de Escuela



Ph.D. Rubén Dariel Velásquez Miranda
Decano de Facultad