



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

“EXPRESIÓN DE CARACTERES REPRODUCTIVOS Y
FENOTÍPICOS, EN UNA POBLACIÓN RESISTENTE DE
Aedes aegypti ANTE LA EXPOSICIÓN CONTINUA A
PERMETRINA Y COMPETENCIA LARVARIA”

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

POR:

Licenciado en Biología
Jose Valentin Uc Puc

Directores:

Dr. Pablo Manrique Saide
Dr. Víctor Parra Tabla
Dr. Gonzalo Vázquez Prokopec



Mérida, Yuc., México, junio de 2019

POSGRADO INSTITUCIONAL
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y MANEJO
DE RECURSOS NATURALES TROPICALES



UADY
UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN

**COORDINACIÓN GENERAL
DEL SISTEMA DE POSGRADO,
INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN**

POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**ALUMNO : LICENCIADO EN BIOLOGÍA
JOSÉ VALENTIN UC PUC**

SÍNODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO

**DR. ABDIEL MARTÍN PARK
CCBA-UADY**

**DRA. GABRIELA GONZÁLEZ OLVERA
CCBA-UADY**

**DR. JUAN MAGAÑA MONFORTE
CCBA-UADY**

**DR. JOSÉ SEGURA CORREA
CCBA-UADY**

**DR. HUGO DELFÍN GONZÁLEZ
CCBA-UADY**

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“Este trabajo no ha sido aceptado para el otorgamiento de un título. La tesis es resultado de las investigaciones del autor excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la FMVZ-UADY para la reproducción del documento con fines de intercambio bibliotecario”.

DEDICATORIA

A mi hijo mi motivación y alegría.

A Cecilia por su apoyo

A mis padres.

A mis hermanas.

A mis sobrinos, los cuatro fantásticos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.

A todo el personal de la Unidad Colaborativa para Bioensayos Entomológicos (UCBE) por su apoyo y facilidades para la realización del presente estudio.

A mi comité tutorial, por sus sugerencias en la realización de la tesis.

A mis sínodos, por sus recomendaciones finales.

A la Dra. Marissa Grossman y el Dr. Azael che, por su acompañamiento durante la realización de esta tesis, y por su amistad.

RESUMEN

El control químico ha generado la aparición de mutaciones que confieren resistencia en poblaciones de *Aedes aegypti*. La expresión de resistencia a insecticidas es un proceso evolutivo dinámico y complejo, que afecta la capacidad inmediata en la sobrevivencia de poblaciones, la fecundidad, la fertilidad, su capacidad competitiva en estados larvales, y caracteres fenotípicos como el tamaño corporal. Por tal motivo el conocimiento de los costos de estas mutaciones resulta de vital importancia para la comprensión de fenómenos poblacionales en los cuales se basan las estrategias de control. Mediante experimentos controlados en condiciones semi naturales se evaluó el efecto de la exposición continua a permetrina bajo diferentes niveles de competencia larvaria sobre la fertilidad (número de huevos depositados por las hembras), fecundidad (larvas emergidas en relación al número de huevos puesto a eclosionar) y la expresión fenotípica de la resistencia (resistencia al derribo) y el tamaño corporal (tamaño de ala) de una población de *Ae. aegypti* portadora de las mutaciones 1016 (V1016I) y 1534 (F1534C) asociadas a la resistencia a los piretroides. Los resultados mostraron que la fecundidad no fue afectada por estos factores, pero sí la fertilidad, observándose un impacto positivo en la fertilidad cuando los mosquitos fueron retados continuamente con insecticida permetrina y una alta competencia larvaria ($p < 0.05$). En contraste, presentaron un impacto negativo en la fertilidad cuando no fueron expuestos al insecticida y sí a una alta competencia larvaria ($p < 0.01$). El fenotipo de resistencia (resistencia al derribo) se mantuvo alto hacia la permetrina (derribo 4-7%) y relativamente menor a la deltametrina (76-88% y 92% de derribo sin exposición y con exposición continua a permetrina respectivamente). Finalmente, los datos generados no muestran un efecto sobre el tamaño de las alas entre los individuos resistentes al derribo y los derribados bajo los diferentes factores evaluados. Los resultados demuestran la importancia de la interacción de los factores evaluados sobre la fertilidad, demostrando que si bien las mutaciones *kdr* (asociada al fenotipo resistente al derribo) tienen un efecto importante en la dinámica poblacional, es el conjunto de interacciones a las que están sujetas las poblaciones las que determinan las características biológicas relacionadas a la adecuación de los individuos.

Palabras clave: Fertilidad, Fecundidad, presión de selección, deltametrina, permetrina.

SUMMARY

Chemical control has generated the appearance of mutations that confers insecticide resistance on *Aedes aegypti* populations. The expression of resistance to insecticides is a dynamic and complex evolutionary process, which affects the immediate capacity in the survival of populations, fecundity, fertility, competitive capacity in larval stages, and phenotypic characters such as body size. For this reason, knowledge of the costs of these mutations is of vital importance for the understanding of the population phenomena on which the control strategies are based. Through controlled experiments carried out under semi-field conditions, the effect of continuous exposure to permethrin under different levels of larval competition were evaluated on fertility (eggs oviposited by females), fecundity (larvae emerged from eggs put for hatching), phenotypic expression of resistance (knockdown resistance) and body size (size of wings) of *Ae. aegypti* population with mutations 1016 (V1016I) and 1534 (F1534C) associated with pyrethroid resistance. The results showed that fecundity was not affected by these factors. In contrast fertility showed a positive impact when mosquitoes were exposed continuously to permethrin and in high larval competition ($p < 0.05$), and a negative impact in high larval competition without exposition to permethrin ($p < 0.01$). Resistance phenotype (knockdown resistance) kept high to permethrin (4-7% of knockdown) and relatively low to deltamethrin (76-88% and 92% of knockdown without exposition and with continuous exposition to permethrin respectively). Finally, the results did not show an effect on wing size between knockdown resistant individuals and knockdown individuals under the different factors evaluated. The study demonstrated the importance of the interaction of evaluated factors on fertility, showing that, although kdr mutations (associated to knockdown resistant phenotype) could have an important effect on the population dynamics, is the diversity of interactions which determine the biological characteristics related to fitness of individuals.

Key words: Fertility, Fecundity, Continuous exposure, deltamethrin, permethrin.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	iv
SUMMARY	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPOTESIS	3
3. OBJETIVOS	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1 Factores ecológicos	5
4.2 Resistencia a insecticidas en <i>Aedes aegypti</i>	5
5. LITERATURA CITADA	8
6. ARTICULO CIENTÍFICO	1
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	23
AGRADECIMIENTOS	23
REFERENCIAS.....	24
7. CONCLUSIONES	27

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Diseño experimental.	16
Cuadro 2 Modelo Mixto Lineal Generalizado (GLMM) Poisson, diferencias en la fecundidad de mosquitos criados competencia larvaria (dos niveles), exposición insecticida (dos niveles) y sus interacciones.	20
Cuadro 3 Modelo Mixto Lineal Generalizado (GLMM) Poisson, diferencias en la fertilidad de mosquitos criados competencia larvaria (dos niveles), exposición insecticida (dos niveles) y sus interacciones.	20
Cuadro 4 ANOVA de dos vías de machos expuestos a la dosis diagnóstico de Permetrina (15 µg/ml) para determinar diferencias entre muertos y sobrevivientes de cada tratamiento.	22
Cuadro 5 ANOVA de dos vías de hembras expuestas a la dosis diagnóstico de Permetrina (15 µg/ml) para determinar diferencias entre muertos y sobrevivientes de cada tratamiento.	22
Cuadro 6 ANOVA de dos vías de machos expuestos a la dosis diagnóstico de Deltametrina (10 µg/ml) para determinar diferencias entre muertos y sobrevivientes de cada tratamiento.	22
Cuadro 7 ANOVA de dos vías de hembras expuestas a la dosis diagnóstico de Deltametrina (10 µg/ml) para determinar diferencias entre muertos y sobrevivientes de cada tratamiento.	23

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Sistemas de pruebas. 3
Figura 2	Diseño experimental. 4
Figura 3	Medición de la distancia de la incisión axilar (IA) hasta el ápice del ala (AA), excluyendo la franja marginal. 5
Figura 4	Variación en la fecundidad y fertilidad de individuos de <i>Ae. aegypti</i> resistentes a piretroides bajo diferentes presiones por exposición a insecticidas y por competencia larvaria durante 25 semanas. La línea punteada representa la exposición de individuos de la primera generación 7
Figura 5	Comparación de medias de la fecundidad y fertilidad de la generación inicial (semana 2) y final (semana 26) de los parentales de una cepa resistente de <i>Ae. aegypti</i> por cada uno de los tratamientos. Los círculos y los cuadrados representan las medias y las barras es (\pm) la desviación estándar de la media. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. 8
Figura 6	Comparación de medias del tamaño de las alas (micras) entre individuos derribados (caídos) y no derribados de una cepa resistente de <i>Ae. aegypti</i> por cada uno de los tratamientos. Los símbolos representan las medias y las barras es (\pm) la desviación estándar de la media. 9

1. INTRODUCCIÓN

La presión ejercida por el uso intensivo y extensivo de los insecticidas ha generado el desarrollo y evolución de la resistencia a uno o más de los cuatro principales grupos químicos de insecticidas en más de 500 especies de artrópodos de importancia médica, agrícola y veterinaria, comprometiendo el control de sus poblaciones (Whalon *et al.*, 2008; WHO, 2012). La resistencia es un proceso dinámico y complejo, en el que intervienen factores genéticos, fisiológicos, conductuales, ecológicos como respuesta a las intervenciones químicas ante los incrementos de las poblaciones (Ranson *et al.*, 2010).

La resistencia en insectos plaga genera un mayor incremento en la aplicación de insecticidas, reducción de la producción (cultivos y productos animales), daño ambiental y brotes en humanos y animales cuando los vectores no pueden ser controlados. La Organización Mundial de la Salud (WHO, 1976) ha nombrado a la resistencia a los insecticidas “el obstáculo más grande en el combate a las enfermedades transmitidas por vector”. La resistencia a insecticidas representa entonces un reto económico. Una estimación sugiere que el costo de la resistencia podría ser de \$1.5 billones de dólares tan sólo en los Estados Unidos (Pimentel *et al.*, 2005).

Ae. aegypti es un claro ejemplo de la rápida adaptación de las poblaciones bajo fuertes presiones de selección. En la actualidad se ha documentado la resistencia a muchos de los insecticidas usados en los programas de control de vectores en las poblaciones de *Ae. aegypti* de muchos países (Vontas *et al.*, 2012). En Latinoamérica se han reportado poblaciones de *Ae. aegypti* resistentes a insecticidas en países donde la transmisión del dengue es endémica, como Cuba, Brasil, Puerto Rico, Perú, Panamá, Venezuela and Colombia (Alvarez *et al.* 2006; Aparecida *et al.* 2004; Beserra *et al.* 2007; Chavez *et al.* 2005; Macoris *et al.* 2003; Pereira-Lima *et al.* 2006; Prieto *et al.* 2002; Rawlins 1998; Rodríguez *et al.* 2004; Rodriguez *et al.*, 2007; Salazar *et al.* 2007; Vargas *et al.* 2006).

En México, el uso extendido e intensivo del DDT en la industria agrícola desde 1950-1987 y su el uso prolongado e intensivo de los piretroides en salud pública durante los 90s, ejerció una intensa selección de presión para la evolución de la resistencia a los piretroides en *Ae. aegypti* (Bregues et al., 2003). En México, diversos reportes establecen que la resistencia a los piretroides en *Ae. aegypti* está mediada por mutaciones en el canal de sodio (mutaciones *kdr*), conocida como resistencia molecular (Aponte et al., 2011; Bobadilla-Utrera, 2010; Loroño-Piña et al 2013; Ponce-Garcia et al., 2009; Saavedra-Rodriguez et al., 2007; Siller et al., 2011) y por la detoxificación a través de enzimas oxidasas, esterasas y GST (Aponte et al., 2013; Flores, et al., 2006; Flores et al., 2005; Flores et al., 2009).

Existe una sólida evidencia de la resistencia a los piretroides en múltiples poblaciones de *Ae. aegypti* en México, incluyendo ciudades de importancia epidemiológica para la transmisión de arbovirus como la ciudad de Mérida (Chemendoza et al., 2018; Deming et al., 2016; Gonzalez et al., 2012; Ponce-García et al., 2009; Rodríguez et al., 2010; Saavedra-Rodríguez et al., 2007; Siller et al., 2009).

Los factores bióticos y abióticos pueden afectar los rasgos morfológicos, fisiológicos y conductuales de los organismos (Schneider *et al.* 2011), por lo que la presencia de mutaciones en los mosquitos puede repercutir en su aptitud biológica, en su ciclo de vida y capacidad vectorial (Grimstad & Walker, 1991; Muturi *et al.*, 2011; Alto & Bettinardi, 2013). En último punto es importante, toda vez que *Aedes aegypti* es una especie con importancia en salud pública al ser vector de arbovirus como el dengue, Zika, chikungunya y fiebre amarilla.

En este estudio se evaluaron los efectos asociados a la exposición continua de insecticidas a diferentes niveles de competencia intraespecífica en una población de *Ae. aegypti* resistente a piretroides sobre su fecundidad, fertilidad, expresión del genotipo resistente (sobrevivientes) y el tamaño de los individuos (v. g. tamaño de ala).

2. HIPOTESIS

La ausencia de exposición continua con insecticidas y baja competencia intraespecífica tendrá un efecto negativo sobre la adecuación de los individuos adultos en una población de *Ae. aegypti* resistentes a piretroides.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la exposición continua a permetrina bajo diferentes niveles de competencia larvaria sobre caracteres reproductivos y fenotípicos de una población de *Ae. aegypti* resistente a piretroides.

Objetivos específicos

Evaluar el efecto de la exposición continua a permetrina bajo diferentes niveles de competencia larvaria, en condiciones seminaturales durante 26 semanas, sobre la fertilidad y fecundidad de *Ae. aegypti* resistente a piretroides.

Determinar la proporción fenotípica de individuos resistentes a permetrina y deltametrina expuestos de manera continua a la permetrina y bajo diferentes niveles de competencia larvaria.

Comparar el tamaño de alas de individuos caracterizados fenotípicamente expuestos de manera continua a permetrina y bajo diferentes niveles de competencia larvaria.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

La estructura genética de las poblaciones es el resultado de una combinación de varios procesos contemporáneos e históricos como la capacidad de dispersión de la especie, el apareamiento, barreras ambientales y la demografía histórica (Balloux y Lugon-Moulin, 2002). Esta se puede ver afectada por los cambios ambientales, la humedad, la temperatura y la precipitación (Hales *et al.*, 2002; Polson, 2012), que sumadas a factores antropogénicos (Palumbi, 2001; Rice y Emery, 2003) afectan las poblaciones de *Ae. aegypti* y otros artrópodos, generando un proceso de adaptación y selección (Schofield *et al.*, 1999; Carroll *et al.*, 2005).

Este proceso se puede observar en la aparición de la resistencia a insecticidas en plagas agrícolas, e insectos con importancia veterinaria y en salud pública entre estos *Ae. aegypti*. La resistencia se define como "la capacidad heredada de un organismo o población para sobrevivir a una dosis de una sustancia tóxica, que resultaría letal para la mayoría de los individuos de una población normal de la misma especie" (Sawicki, 1987; Moberg, 1990), y la susceptibilidad se refiere a los individuos que mueren al ser expuestos a una dosis recomendada o establecida de un insecticida para la especie (WHO, 1957).

En la última década en *Ae. aegypti* sea observado una tendencia ascendente en la intensidad y distribución geográfica de la resistencia a insecticidas (Ponce-García *et al.*, 2009, Ranson *et al.*, 2010), generando reemergencia de la transmisión de dengue a nivel global (Messina *et al.*, 2014), subsecuentemente un incremento en las intervenciones químicas como respuesta a brotes, en los que se emplean insecticidas piretroides, generando una presión de selección direccional favoreciendo los genotipos homocigotos y heterocigotos resistentes, los cuales sobreviven y propagan sus alelos, afectando la tasa de propagación de la resistencia mermando el efecto de las acciones de control de las poblaciones (Ranson *et al.*, 2010).

4.1 Factores ecológicos

Existen diversos factores que intervienen en la aparición y dispersión de la resistencia o flujo génico dentro de las poblaciones naturales de *Ae. aegypti*, siendo un proceso complejo debido a sus características biológicas, específicamente a la capacidad de sus huevos de entrar en diapausa en condiciones desfavorables (Christophers, 1960; Nelson, 1986) y la limitada dispersión por vuelo (Harrington *et al.*, 2005).

La baja movilidad por vuelo y las barreras naturales implican que la escala de propagación de los genes entre áreas es reducida, provocando poca variación entre áreas cercanas, formando conglomerados genéticos (Getis *et al.*, 2003). Por lo que la selección de genes de resistencia se debe a la presión de selección local y la dinámica poblacional de *Ae. aegypti* dentro y fuera de las viviendas (Huber *et al.*, 2004).

En este aspecto la competencia por sitios de cría juega un papel importante, al generar áreas con competencia larvaria que reduce las reservas energéticas y la adecuación de los adultos, afectando algunos mecanismos de resistencia (e.g. canal de sodio), incrementando las tasas de mortalidad de individuos resistentes ante la exposición a insecticidas (Rivero *et al.*, 2011; Gillemaud *et al.*, 1998).

4.2 Resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*

En esta especie se ha reportado resistencia a los piretroides, el grupo de insecticidas con mayor uso, los cuales son químicamente ésteres (combinación de ácido y un alcohol) que surgen a partir de la estructura química de las piretrinas naturales extraídos de las flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Compositae), con las que comparten características toxicológicas. Son insecticidas de amplio espectro, actúan principalmente por contacto, poseen un coeficiente térmico invertido es decir tiene un mayor efecto en áreas con temperaturas bajas y tienen una toxicidad relativamente baja para los mamíferos. Sin embargo, tiene una alta

toxicidad para organismos acuáticos. Los piretroides actúan sobre la membrana nerviosa del sistema central y periférico ocasionando interferencia que provoca cambios conformacionales en las proteínas de la interfase lípido-proteína. Esto se debe a que una parte de la proteína que conforma los canales dependientes de voltaje tiene carga positiva, y como resultado de la interferencia prolongada del mecanismo de transporte iónico que fluye por los canales de sodio al hacer más lento o impedir el cierre de los canales bloqueando la conductividad de estos cationes y provoca parálisis nerviosa en los insectos intoxicados, mejor conocida como efecto de derribo o Knockdown (KD) siendo así que la sinapsis neuromuscular de los insectos es un blanco para los PYR y el diclorodifeniltricloroetano (DDT) (Zerva, 1997; Blomquist, 2003).

Según sus características químicas y el sitio de acción los piretroides se clasifican como de Tipo 1 y Tipo 2, dependiendo del alcohol sustitutivo: los del Tipo 1, no presentan el grupo α -ciano en la parte alcohólica de su estructura y actúan principalmente, sobre el sistema nervioso periférico; el Tipo 2, en su composición alcohólica cuentan con el grupo α -ciano y actúan sobre el sistema nervioso central (Miller, 1988).

En *Ae. aegypti* la resistencia a piretroides se debe a mutaciones en el sistema nervioso central del mosquito, específicamente en el canal de sodio (mutaciones KDR). Estas mutaciones se originan en NaV, una proteína transmembranal presente en los axones neuronales y compuesta por cuatro dominios homólogos (I-IV) cada uno con seis segmentos hidrofóbicos (S1-S6). En *Ae. aegypti* dos sitios están relacionados con la resistencia a los piretroides, 1016 (V1016I) y 1534 (F1534C) en los segmentos IIS6 e IIIS6, respectivamente (Dusfour *et al.*, 2015).

Otro factor que juega un papel importante es la resistencia metabólica, la cual involucra enzimas no específicas que desintoxican productos químicos lipofílicos ajenos al organismo, éstas incrementan la actividad de su centro catalítico con la finalidad de mejorar la desintoxicación sobre uno o más insecticidas. Entre las principales enzimas desintoxicadoras están las esterasas A y B involucradas en la

resistencia a OF, CAR y PYR, la glutathion-s-transferasa que es el mecanismo principal de resistencia a DDT y que a su vez confiere resistencia a PYR y OF, y los citocromos P-450 involucrados en la resistencia a PYR y CAR (Fonseca y Quiñones, 2005; Mohammad *et al.*, 2007).

En una perspectiva evolutiva, la selección de mutaciones que generan resistencia a insecticidas puede conducir a una serie de efectos secundarios en los rasgos de la historia de vida, ya que los genes que confieren resistencia a compuestos químicos están asociados a costos biológicos como: menor potencial reproductivo (fertilidad y fecundidad), mayor vulnerabilidad a la depredación en el estado larval, un incremento en el tiempo de desarrollo y menor tamaño de los individuos (Berticat *et al.*, 2002; Araujo, *et al.*, 2015). Esto resultado de la reasignación de recursos energéticos para la producción de enzimas desintoxicantes o la expresión fenotípica de los genes que confieren resistencia (Barbosa *et al.*, 2011; Rivero *et al.*, 2011). Por lo que en este trabajo se evaluó el efecto de la competencia larvaria y la presión de selección continua en una población resistente a piretroides para determinar costos asociados a parámetros reproductivos y su efecto en la respuesta fenotípica en condiciones semi naturales-naturales, con el fin de generar conocimiento que permita entender como algunos procesos bióticos y abióticos podrían afectar la adecuación y por ende, la capacidad vectorial de las poblaciones locales de *Ae. aegypti* resistentes a piretroides.

5. LITERATURA CITADA

- Alto, B, Bettinardi, D. 2013. Temperature and dengue virus infection in mosquitoes: independent effects on the immature and adult stages. *Am J Trop Med Hyg.* 88 (3): 497- 505.
- Aponte, H. 2011. Resistencia a insecticidas: Mecanismos metabólicos y mutaciones puntuales del sitio blanco de los Piretroides, en poblaciones de *Aedes aegypti* del estado de Guerrero. Tesis de maestría. Instituto nacional de salud pública centro regional de investigación en salud pública. Chiapas México.
- Aponte, H., P. Penilla, F. Dzul-Manzanilla, A. Che –Mendoza, A. López, F. Solis, P. Manrique-Saide, H. Ranson, A. Lenhart, P. McCall y A. Rodríguez. 2013. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero State, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107: 226–234.
- Araujo, D., M. Varjal, E. Mendonça, E. Barbosa, D. Elisama, D. Carvalho, B. Santana, L. Menezes y C. Junqueira. 2015. Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Parasites & Vectors* 8:662
- Balloux, F. y N. Lugon-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11:155–165.
- Barbosa, S., W.C. IV Black e I. Hastings. 2011. Challenges in Estimating Insecticide Selection Pressures from Mosquito Field Data. *PLoS Negl Trop Dis* 5(11): e1387. doi:10.1371/journal.pntd.0001387
- Berticat, C., G. Boquien, M. Raymond y C. Chevillon. 2002. Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet Res.* 79: 41–7.

- Bloomquist, J. 2003. Insecticidas: químicas y características. Radcliffe: Texto Mundial de manejo integral de plagas. Universidad de Minnesota. <http://ipmworld.umn.edu> (consultado el 19 de junio de 2014).
- Brown, J.E., C.S. McBride, P. Johnson, S. Ritchie, C. Paupy, H. Bossin, J. Lutomiah, I. Fernandez-Salas, A. Ponlawat, A.J. Cornel, W.C. IV Black, N. Gorrochotegui-Escalante, L. Urdaneta-Marquez, M. Sylla, M. Slotman, K.O. Murray, C. Walker y J.R. Powell. 2011. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. Proc. R. Soc. B 2011 278 2446-2454; DOI: 10.1098/rspb.2010.2469.
- Carroll, S., J. Loye, H. Dingle, M. Mathieson, T. Famula y M. Zalucki. 2005. And the beak shall inherit evolution in response to invasion. Ecology Letters 8: 944–951.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2010. Guideline for Evaluating Insecticide Resistance in Vectors Using the CDC Bottle Bioassay. Atlanta, Georgia 30333, USA. 56 pp.
- Che-mendoza A, Y. Contreras-Perera, V. Uc, G. Guillermo-May, A. Lenhart, P. McCall, H. Ranson, F. Dzul-Manzanilla, L. López –Damián y P. Manrique-Saide. 2014. Susceptibility of *Aedes aegypti* from Merida to insecticides employed for vector control in Mexico. The 24rd Latin American Symposium at the 80th AMCA Annual meeting. Seattle, Washington, USA.
- Christophers, S.R. 1960. *Aedes aegypti* (L.), the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. Cambridge University Press. GB. 784.
- Consortium, R. 2013. Heterogeneity of selection and the evolution of resistance. *Trends Ecol Evol* 28:110-118.
- Deming, R., P. Manrique-Saide, A. Medina Barreiro, E. Ulises Koyoc Cardaña, A. Che-Mendoza, B. Jones, K. Liebman, L. Vizcaino, G. Vazquez-Prokopec y

- Audrey Lenhart. 2016. Spatial variation of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* presents unique vector control challenges. *Parasites & Vectors*. 9:67. DOI 10.1186/s13071-016-1346-3
- Dusfour I, Zorrilla P, Guidez A, Issaly J, Girod R, Guillaumot L, et al. Deltamethrin resistance mechanisms in *Aedes aegypti* populations from three French overseas territories worldwide. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9: e0004226. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004226> PMID: 26588076
- Fonseca, I. y M. Quiñones. 2005. Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en salud pública. *Revista Colombiana de Entomología*. 31(2): 107-115.
- Getis, A., A. C. Morrison, K. Gray y T. W. Scott. 2003. Characteristics of the spatial pattern of the dengue vector, *Aedes aegypti*, in Iquitos, Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69:494–505.
- Guillemaud, T., Lenormand, T., Bourguet, D., Chevillon, C., Pasteur, N., Raymond, M. 1998. Evolution of resistance in *Culex pipiens*: allele replacement and changing environment. *Evolution* 52, 430–440.
- Grimstad, P., Walker, E. 1991. *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) and La Crosse virus. IV. Nutritional deprivation of larvae affects the adult barriers to infection and transmission. *J Med Entomol*. 28: 378 – 386.
- Hales, S., N. de Wet, J. Maindonald y A. Woodward. 2002. Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: an empirical model. *Lancet* 360: 830–834. PMID:12243917.
- Harrington, L., T. Scott, K. Lerdthusnee, R.C. Coleman, A. Costero, G.G. Clark, J. Jones, S. Kitthawee, P. Kittayapong, R. Sithiprasasna y J.D. Edman. 2005. Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *Am J Trop Med Hyg* 72(2):209-20.
- Hemingway, J., N.J. Hawkes, L. McCarroll y H. Ranson. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 34: 653-665.
- Huber, K., L. Le Loan, N. Chantha, y A. B. Failloux. 2004. Human transportation influences *Aedes aegypti* gene flow in Southeast Asia. *Acta Tropica* 90:23–29.

- Loroño, M., J. García, C. Machain, S. Gomez, G. Nuñez, M. Nájera, A. Losoya, L. Aguilar, K. Saavedra, S. Lozano, M. Beaty, W. Black, T. Keefe, L. Eisen y B.J. Beaty. 2013. Towards a Casa Segura: a consumer product study of the effect of insecticide-treated curtains on *Aedes aegypti* and dengue virus infections in the home. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 89: 385-397.
- Maestre, R., G. Rey, J. De las salas, C. Vergara, L. Santacoloma, S. Goenaga y M. Carrasquilla. 2009. Evaluación de la susceptibilidad de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a temefós en Atlántico – Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*. 35(2): 202-205.
- Messina, J, Brady, O, Scott, T, Zou, C, Pigott, D, Duda, K, Bhatt, S, Katzelnik, L, Howes, R, Battle, K, Simmons, C, Hay, S. 2014. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol*. 22 (3): 138 – 146.
- Miller, T. 1988. Mechanisms of Resistance to Pyrethroid insecticides. *Parasitology today*. 7: 8-12.
- Moberg, W. 1990. Understanding and combating agrochemical resistance. In: *Managing resistance to agrochemicals*; Green, M. N., LeBaron, H. M. y W. K.
- Mohammad, H., P. Badii y V. Garza. 2007. Resistencia en Insectos, Plantas y Microorganismos. *Cultura Científica y Tecnológica Universidad Autónoma de Ciudad Juárez*. 4 (18): 9-25.
- Muturi, E, Kim, C, Alto, B, Berenbaum, M, Schuler, M. 2011. Larval environmental stress alters *Aedes aegypti* competence for Sindbis virus. *Tropical Medicine and International Health*. 16 (8): 955- 964.
- Nelson, M. 1986. *Aedes aegypti*: Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C: 50.
- Palumbi, S.R. 2001. *The Evolution Explosion: How Humans Cause Rapid Evolution Change*. W.W. Morton, New York, NY, USA.
- Polson, K., W. Brogdon, S. Rawlins y D. Chadee. 2012. Impact of environmental temperatures on re- sistance to organophosphate insecticides in *Aedes aegypti* from Trinidad. *Revista Panamericana de Salud Pública* 32: 1–8.

- Ponce, G., A. Flores, S. Fernández, K. Saavedra, G. Reyes, S. Lozano, G. Bond, M. Casas, J. Ramsey, J. García, M. Domínguez, H. Ranson, J. Hemingway y E. Black. 2009. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in México. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 3(10): 531.
- Ranson, H., J. Burhani, N. Lumjuan y W.C. IV Black. 2010. Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA.net* 1, 1-12.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rice, K. y N. Emery. 2003. Managing microevolution: restoration in the face of global change. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1: 469–478.
- Rivero, M., A. Magaud, A. Nicot, J. Vézilier. 2011. Energetic Cost of Insecticide resistance in *Culex pipiens* Mosquitoes. *J Med Entomol*. 48(3): 694-700.
- Sawicki, R. 1987. Definition, detection and documentation of insecticide resistance. In: *Combating resistance to xenobiotics: Biological and chemical approaches*. Ford, M. G., Holloman. D. W., Khambay, B. P. S. y R. M. Sawicki (eds.), Ellis Horwood, Chichester, p. 105-11.
- Schneider, J., Chadee, D., Mori, A., Romero-Severson, J., Severson, D. 2011. Heritability and adaptive phenotypic plasticity of adult body size in the mosquito *Aedes aegypti* with implication for dengue vector competence. *Infect Genet Evol*. 11 (1): 11-16.
- Schofield C. J., L. Diotaiuti y J.P. Dujardin. 1999 The process of domestication in *Triatominae*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 375–378.
- Siller, Q., G. Ponce, S. Lozano y A. Flores. 2011. Update on the frequency of Ile1016 mutation in voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 27(4): 357-362.
- Whalon ME, Mota-Sánchez D, Hollingworth RM. Analysis of global pesticide resistance in arthropods. En: *Global pesticide resistance in arthropods*. Winslow, Reino Unido: CAB International, 2008: 1-31

- WHO (World Health Organization). 1957. Seventh report Expert Committee on insecticides. WHO Tech Report Ser; 37.
- WHO (World Health Organization). 2012. Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors. France: *World Health Organization, WHO Global Malaria Programme*
- WHO/HTM/NTD/VEM/WHOPES/2014.5 52.
- Zerba, E., Wallace, G., Picollo, M., Casabé, N., Licastro, S., Wood, E., Hurvitz, A., Andres, A.1997. Evaluación de la β -cipermetrina para el control de *Triatoma* infestans. *Revista Panamá Salud Publica*. 1(2): 133-137.

6. ARTICULO CIENTÍFICO

EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN CONTINUA A PIRETROIDES Y LA COMPETENCIA LARVARIA EN LA FERTILIDAD, FECUNDIDAD Y LA EXPRESIÓN FENOTÍPICA DE RESISTENCIA EN *Aedes aegypti*

VALENTÍN UC-PUC^{1,5}, MARISSA GROSSMAN², GONZALO VAZQUEZ-PROKOPEC³, VÍCTOR PARRA-TABLA⁴, AND PABLO MANRIQUE-SAIDE¹

¹ Unidad Colaborativa para Bioensayos Entomológicos, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México

² Department of Entomology, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, PA, USA.

³ Department of Environmental Sciences, Emory University, Atlanta, GA, USA.

⁴ Departamento de Ecología Tropical, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México

⁵ Corresponding author. Unidad Colaborativa para Bioensayos Entomológicos, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán. Km. 15.5 Carr. Mérida-Xmatkuil s.n., C.P. 97315. Mérida, Yucatán, MEXICO. Tel: +52-9999423200. Email: anubis_jv32@hotmail.com

RESUMEN

El uso de insecticidas para el control de *Aedes aegypti* genera cambios biológicos y de comportamiento en los individuos sobrevivientes, afectando la supervivencia, la capacidad reproductiva y la genética de la descendencia. En este estudio se evaluó el efecto de la presión continua con permetrina bajo diferentes niveles de competencia larvaria en la fertilidad, fecundidad, la respuesta biológica (fenotipo resistente) y el tamaño de alas de en una población de *Ae. aegypti* resistente a insecticidas piretroides. La fecundidad no fue afectada por estos factores, pero sí la fertilidad, observándose un impacto positivo en la fertilidad cuando los mosquitos fueron retados continuamente al insecticida permetrina y una alta competencia larvaria ($p < 0.05$). En contraste, presentaron un impacto negativo en la fertilidad cuando no fueron expuestos al insecticida y sí a una alta competencia larvaria ($p < 0.01$). El fenotipo de resistencia (resistencia al derribo) se mantuvo alto hacia la permetrina (derribo 4-7%) y relativamente menor a la deltametrina (76-88% y 92% de derribo sin exposición y con exposición continua a permetrina respectivamente). Finalmente, los datos generados no muestran un efecto sobre el tamaño de las alas entre los individuos resistentes al derribo y los derribados bajo los diferentes factores evaluados.

Palabras clave: *Aedes aegypti* L., exposición continua, densidad poblacional, permetrina, deltametrina.

El presente trabajo será enviado a Journal of American Mosquito Control Association por lo que el formato se encuentra de acuerdo con las instrucciones de dicha revista.

INTRODUCCIÓN

El uso de insecticidas es uno de los métodos principales para el control de las poblaciones del mosquito *Aedes aegypti* principal vector del dengue, chikungunya Zika ^[1,2]. De 1998 a 2009, los piretroides fueron los principales insecticidas empleados para el control de mosquitos adultos en México; la permetrina para nebulizaciones espaciales a ultra-bajo volumen y la deltametrina para el rociado intradomiciliario como respuesta a casos de dengue. En 2010, las autoridades de salud de México realizaron cambios en la lista de productos químicos autorizados para el control de vectores debido al reporte de altos niveles de resistencia a los piretroides y la presencia de mutaciones asociadas a la resistencia a piretroides -principalmente permetrina- en las poblaciones de *Ae. aegypti*. En esta nueva lista se incluyó el uso de organofosforados (malatión y clorpirifós) para nebulizaciones espaciales, y carbamatos (bendiocarb y propoxur) para el rociado intradomiciliario ^[3]. Sin embargo, los insecticidas pueden ejercer efectos tóxicos subletales afectando a los individuos sobrevivientes que aún cuentan con la capacidad de alimentarse, fungir como vector y reproducirse ^[4], lo cual genera la aparición de genotipos resistentes en las poblaciones ^[5,6,7].

En *Ae. aegypti* los mecanismos más conocidos de resistencia a insecticidas son causados por cambios fisiológicos en los individuos, alteraciones estructurales en el sitio blanco del insecticida, el aumento de la actividad de enzimas desintoxicadoras de insecticidas, cambios en la cutícula del mosquito y mutaciones en la proteína transmembranal del canal de sodio ("resistencia al derribo", ó kdr). Entre las mutaciones más conocidas están las sustituciones en los codones 1016 (V1016I) y 1534 (F1534C) en los dominios II y III del canal de sodio dependiente del voltaje asociadas a la resistencia de piretroides y al DDT ^[8-11].

La competencia larvaria en condiciones de alta densidad y la resistencia pueden afectar el tiempo de desarrollo, el peso corporal de pupas, la supervivencia, el tamaño de los adultos y la fecundidad, por lo que la interacción de ambos factores en condiciones naturales pudiera tener un papel importante en la expresión de genes que confieren resistencia, así como en la dinámica de las poblaciones ^[12,13].

A pesar de que diversos estudios han demostrado diferencias en cuanto a la aptitud entre individuos susceptibles y resistentes ^[14-18], no existen estudios en los que se evalué en conjunto el impacto de la competencia larvaria y la presión de selección por insecticidas. Siendo la interacción de estos dos factores de vital importancia para el entendimiento y manejo de la resistencia a insecticidas ^[19].

En este trabajo se evaluó el efecto de la presión de selección con permetrina y diferentes niveles de competencia larvaria, sobre la fertilidad y fecundidad y la respuesta biológica (fenotipo resistente) ante la dosis diagnóstica de permetrina (15 mg/ ml) y deltametrina (10 mg/ml) y la longitud del ala como un estimador del tamaño de los individuos ^[20] en una población de *Ae. aegypti* caracterizada como resistencia a piretroides de Yucatán.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

Se empleó la cepa de *Ae. aegypti* “Itzincab” proveniente de una población local del mismo nombre, sometida a presión de selección durante 10 generaciones con la insecticida permetrina [21]. Esta cepa fue caracterizada como resistente a permetrina (13.7% de efecto knockdown en bioensayos de susceptibilidad y frecuencias alélicas de 0.937 para la mutación F1534C y 0.595 para la mutación V1016I) y mantenida en condiciones seminaturales en casas experimentales (a una temperatura y humedad ambiental promedio de 32 ± 3 °C y $74 \pm 5\%$) en la Unidad Colaborativa para Bioensayos Entomológicos (UCBE), de la Universidad Autónoma de Yucatán, México.

Experimento 1. Efecto de la exposición continua con insecticidas y diferentes niveles de competencia sobre parámetros reproductivos

Se diseñó un experimento para evaluar el efecto de la exposición continua a un piretroide y diferentes niveles de competencia larvaria sobre parámetros reproductivos de fecundidad y fertilidad en la cepa resistente *Ae. aegypti* Itzincab.

Para el sistema de prueba se emplearon 20 jaulas BugDorm-2120F (60x60x60, MegaView Science) bajo dos tratamientos: con exposición a insecticida (10 jaulas) y sin exposición a insecticida (10 jaulas) (Fig. 1). La exposición continua al insecticida se hizo colocando una malla (150 x 150 cm) Olyset® Net (permetrina 2.0% w/w (+/- 0.3%)) en dos caras opuestas de cada jaula (Fig. x). En cada jaula se colocaron inicialmente 60 mosquitos *Ae. aegypti* adultos de la cepa Itzincab (30 machos y 30 hembras) de 1-3 días de edad. Posteriormente, en cada jaula se introdujo un recipiente para ovipostura (2 L de cap. con 1 L de agua y una pieza de papel pellón 40 x 15 cm cubriendo la pared interna del recipiente) (Fig. 1 (a)). Los adultos machos se alimentaron diariamente con agua azucarada al 10% y las hembras fueron alimentadas con sangre humana (mediante la introducción en la jaula del antebrazo de un voluntario) y posteriormente cada 5 días. Los sustratos de ovipostura se retiraban cada 4 días previo a la alimentación de las hembras. Posterior a 24 horas de embrionamiento se pusieron a eclosionar (en recipientes fuera de las jaulas experimentales) en recipientes rotulados con la información de procedencia (replica y tratamiento).

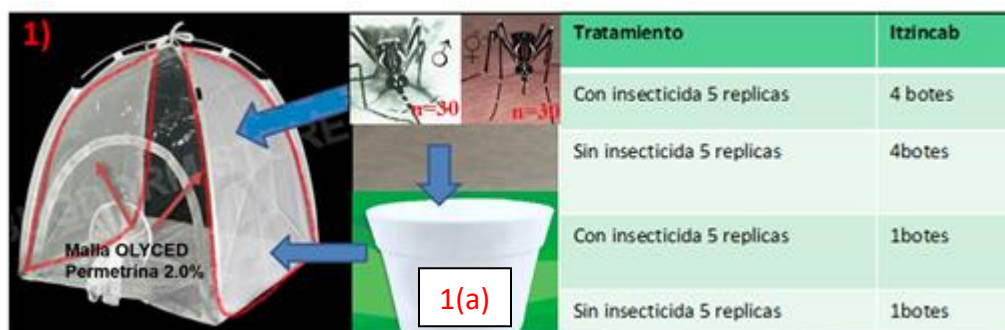


Figura 1. Sistemas de pruebas

se seleccionaron 200 larvas de los estadios I-II (emergidas en los primeros dos días) por replica y tratamiento y se colocaron de la siguiente manera por tratamiento (Fig. 2: en 5 jaulas se introdujo un recipiente por jaula con 200 larvas (simulando alta competencia larvaria) y en 5 jaulas restantes se introdujeron 4 recipientes por jaula de la misma capacidad con 50 larvas cada uno (simulando baja competencia larvaria)^[20]. Cada recipiente se mantuvo con un litro de agua y un sustrato de ovipostura (papel pellón 40 cm x 15 cm). Las larvas fueron alimentadas cada dos días colocando 0.025 g de polvo de hígado bovino (MP Biomedicals). Los inmaduros en fase de pupa se trasladaron a cápsulas de emergencia. El número de adultos machos y hembras que emergían se usaron para sustituir a los parentales muertos y mantener la proporción de 30 machos y 30 hembras por jaula experimental. Los sustratos de ovipostura de cada jaula se retiraban cada 4 días y se reponía por un sustrato nuevo. Los huevos eran contados y puestos a embrionar (en recipientes fuera de las jaulas) por 24 h. Las larvas y los adultos que emergían se usaron para mantener la densidad larvaria y proporción machos: hembras en cada jaula. El proceso como se describió en este párrafo se repitió durante 25 semanas (Fig. 2).

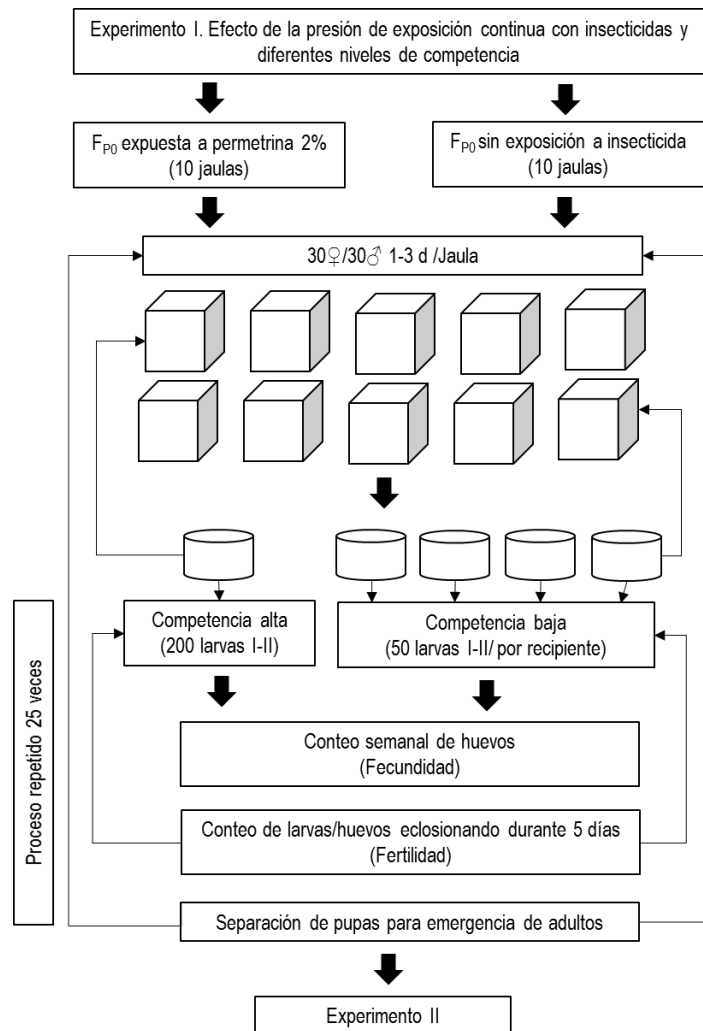


Fig. 2. Diseño experimental.

Análisis de datos

Los dos tratamientos (con y sin exposición de insecticidas) bajo dos diferentes niveles de competencia larvaria (baja y alta competencia) fueron evaluados en términos de la fecundidad y fertilidad a partir de los primeros parentales (F_{P0}). La fecundidad se calculó como el número promedio de huevos ($n=5$ réplicas) depositados semanalmente y la fertilidad como la proporción media de larvas ($n=5$ réplicas) emergidas en relación al número de huevos puestos a eclosionar durante 5 días (total de larvas emergidas/total de huevos puestos a eclosionar).

Con la finalidad de determinar si existen diferencias en la fecundidad y fertilidad de *Ae. aegypti* entre la primera generación de los parentales y la última (semana 2 a la 26) en cada uno de los tratamientos (con exposición a insecticida/competencia alta, con exposición a insecticida/competencia baja, sin exposición a insecticida/competencia alta y sin exposición a insecticida/competencia baja), los datos de fecundidad se analizaron con una la prueba de Wilcoxon y los datos de fertilidad mediante una prueba de t-pareada.

Experimento 2. Efecto de la presión con exposición continua a insecticidas y diferentes niveles de competencia sobre la respuesta biológica (fenotipo resistente) y el tamaño de ala

Se recolectaron 250 mosquitos *Ae. aegypti* adultos (125 hembras: 125 machos) emergidos de la última generación de cada jaula (réplicas) del experimento 1 para realizar bioensayos de susceptibilidad empleando el método de botellas del CDC ^[23]. Brevemente, en cada ensayo se expusieron grupos de 25 individuos de cada sexo en juegos de 4 botellas (Wheaton®): cuatro botellas impregnadas con deltametrina (10 µg del ingrediente activo en 1 ml de acetona por botella) y un control (1 ml de acetona sin insecticida). El mismo procedimiento se realizó usando permetrina (15 µg en 1 ml/botella). Los bioensayos se realizaron en condiciones ambientales de 32 (± 3) °C y 74 (± 5) % de humedad. Los mosquitos fueron expuestos al insecticida por 30 min y se registró el número de individuos derribados (efecto knockdown). Se consideró un individuo derribado cuando presentaba dificultad para volar y para sostenerse al momento de rotar la botella Wheaton ^[24].

Los mosquitos fueron separados por su estatus derribado o no derribado y por sexo. Los individuos vivos se sacrificaron a -20 °C. Con un estereoscopio y pinzas entomológicas se retiraron las alas de 15 hembras y 15 machos por cada estatus/insecticida de cada tratamiento ($n=2400$ individuos medidos). Las alas se montaron en portaobjetos y se midió la longitud máxima del ala con un microscopio AM4115ZT Dino-Lite Edge (con una precisión de 0.1 mm) según lo descrito por Pelizza ^[20], tomando la distancia de la incisión axial (IA) hasta el ápice del ala (AA) excluyendo las setas marginales fig. 3.



Figura 3. Medición de la distancia de la incisión axilar (IA) hasta el ápice del ala (AA), excluyendo la franja marginal.

Análisis de datos

El fenotipo resistente se determinó con los siguientes criterios basados en la tasa de derribo o efecto knockdown: derribo $<80\%$ en el tiempo diagnóstico indicó resistencia, $>97\%$ susceptibilidad y un derribo entre 80 y 97% indicó sospecha de resistencia. Para el análisis se emplearon los promedios de porcentaje de derribo para cada tratamiento.

Las medidas de las alas se emplearon para determinar diferencias fenotípicas en el tamaño corporal [25] entre los individuos expuestos (sobrevivientes y los muertos) a las dosis diagnósticas de deltametrina y permetrina en pruebas de botellas CDC. Para ello se empleó un ANOVA de dos vías en el programa R para cada tratamiento y sexo por separado.

RESULTADOS

Fecundidad y fertilidad

La variación en fecundidad y la fertilidad de la población resistente de *Ae. aegypti* bajo los tratamientos de exposición y sin exposición continua de insecticida y diferentes niveles de competencia larvaria se muestran en la figura 1.

En relación con la fecundidad no se encontraron diferencias significativas entre la primera generación de los parentales y la última generación en ninguno de los tratamientos (Fig. 4). Pero sí se encontraron diferencias significativas en la fertilidad entre la generación inicial y final, únicamente en dos tratamientos. Se observó un impacto positivo en la fertilidad cuando los mosquitos resistentes fueron retados o expuestos continuamente al insecticida permetrina y una alta competencia larvaria; y en contraste, presentaron un impacto negativo cuando no fueron expuestos al insecticida y sí a una alta competencia larvaria (Fig.5).

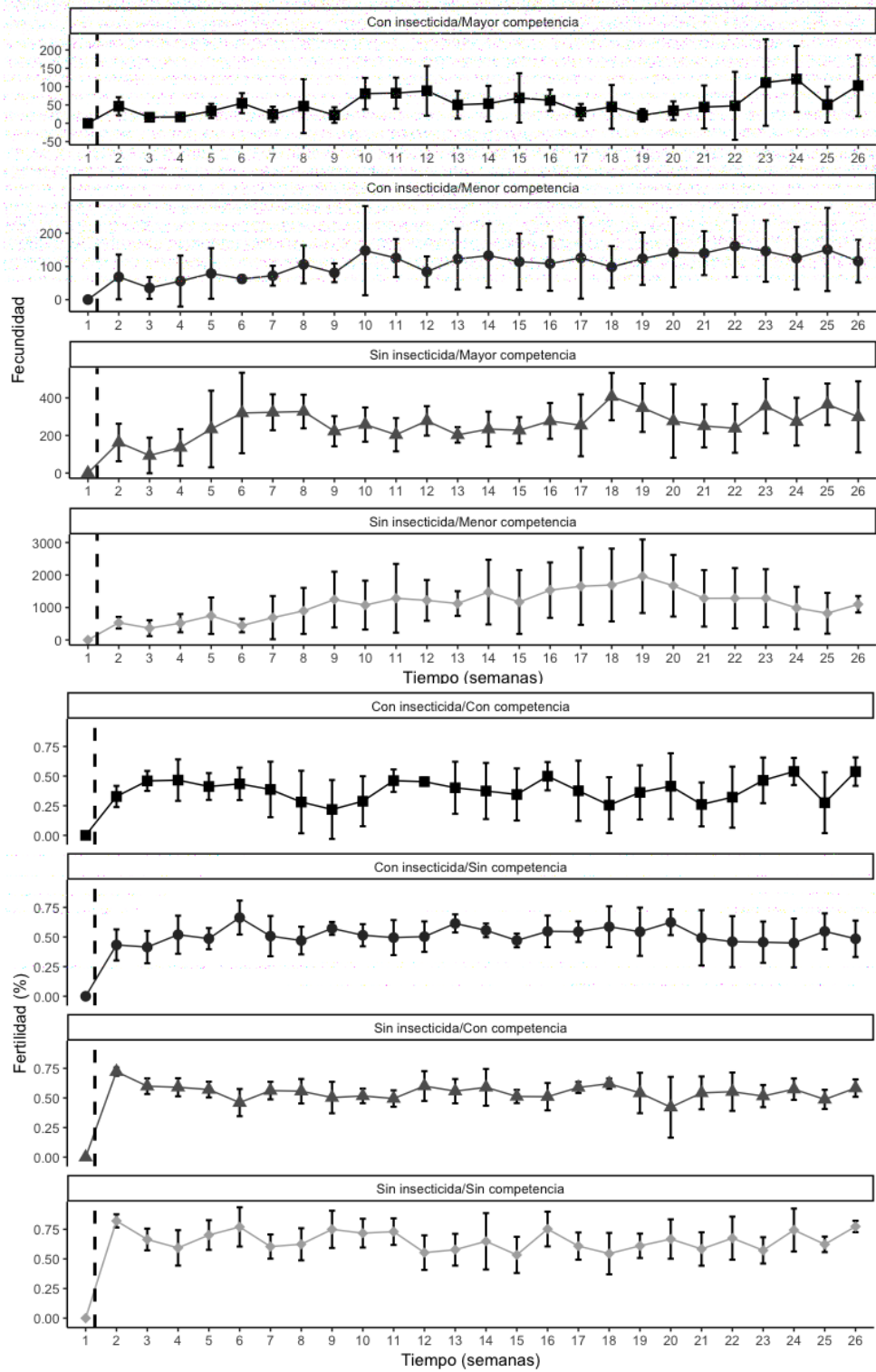


Figura. 4. Variación en la fecundidad y fertilidad de individuos de *Ae. aegypti* resistentes a piretroides bajo diferentes presiones por exposición a insecticidas y por competencia larvaria durante 25 semanas. La línea punteada representa la exposición de individuos de la primera generación.

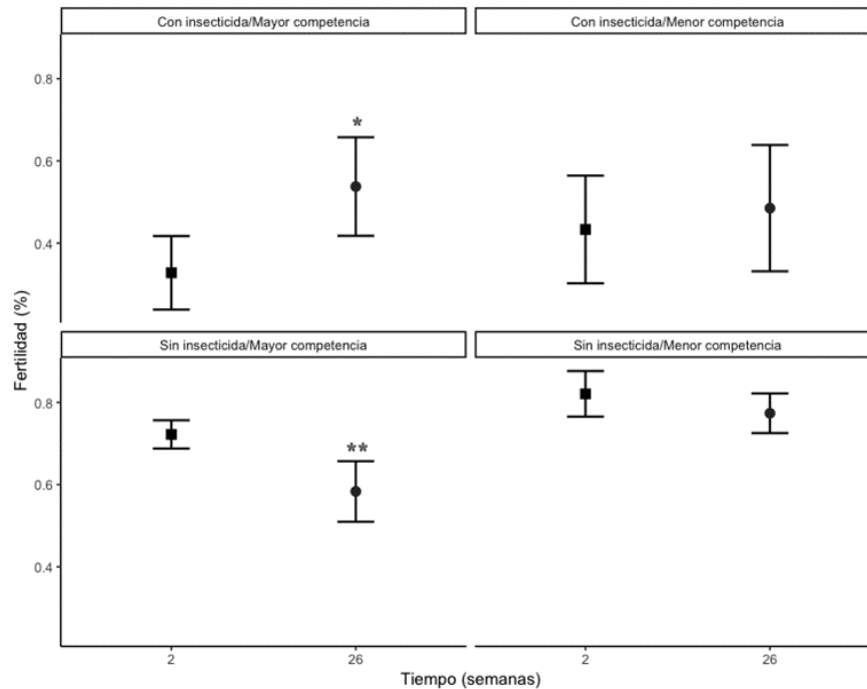


Figura. 5. Comparación de medias de la fecundidad y fertilidad de la generación inicial (semana 2) y final (semana 26) de los parentales de una cepa resistente de *Ae. aegypti* por cada uno de los tratamientos. Los círculos y los cuadrados representan las medias y las barras es (\pm) la desviación estándar de la media. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Fenotipo de resistencia y tamaño del ala.

En cuanto a la expresión de fenotipo resistente (resistencia al derribo), para el caso de la permetrina el efecto derribo en los tratamientos sin exposición a insecticidas fueron del 4% (± 1.87 SEM) en alta competencia larvaria y 5.2% (± 1.64 SEM) en baja competencia larvaria; y para los tratamientos con exposición continua a la permetrina del 7.2% (± 3.35 SEM) en alta competencia larvaria y de 5.4% (± 1.14 SEM) en baja competencia.

En el caso de la deltametrina se registraron tasas de derribo del 76% (± 7.24) en alta competencia y de 88% (± 19.84) en baja competencia ambos sin exposición continua al insecticida; y de 92% (± 7.15) en alta competencia y 92% (± 5.60) en baja competencia bajo presión continua con la permetrina.

Respecto al tamaño de las alas, no se encontraron diferencias significativas en el tamaño del ala entre los individuos derribados y no derribados tanto en mosquitos machos como en los mosquitos hembras expuestos a las dosis diagnóstico con permetrina y deltametrina (Figura 3): Sugiriéndose que no existe un efecto en el tamaño del ala que pudiera atribuirse a los factores de exposición continua a permetrina y el nivel de competencia larvaria.

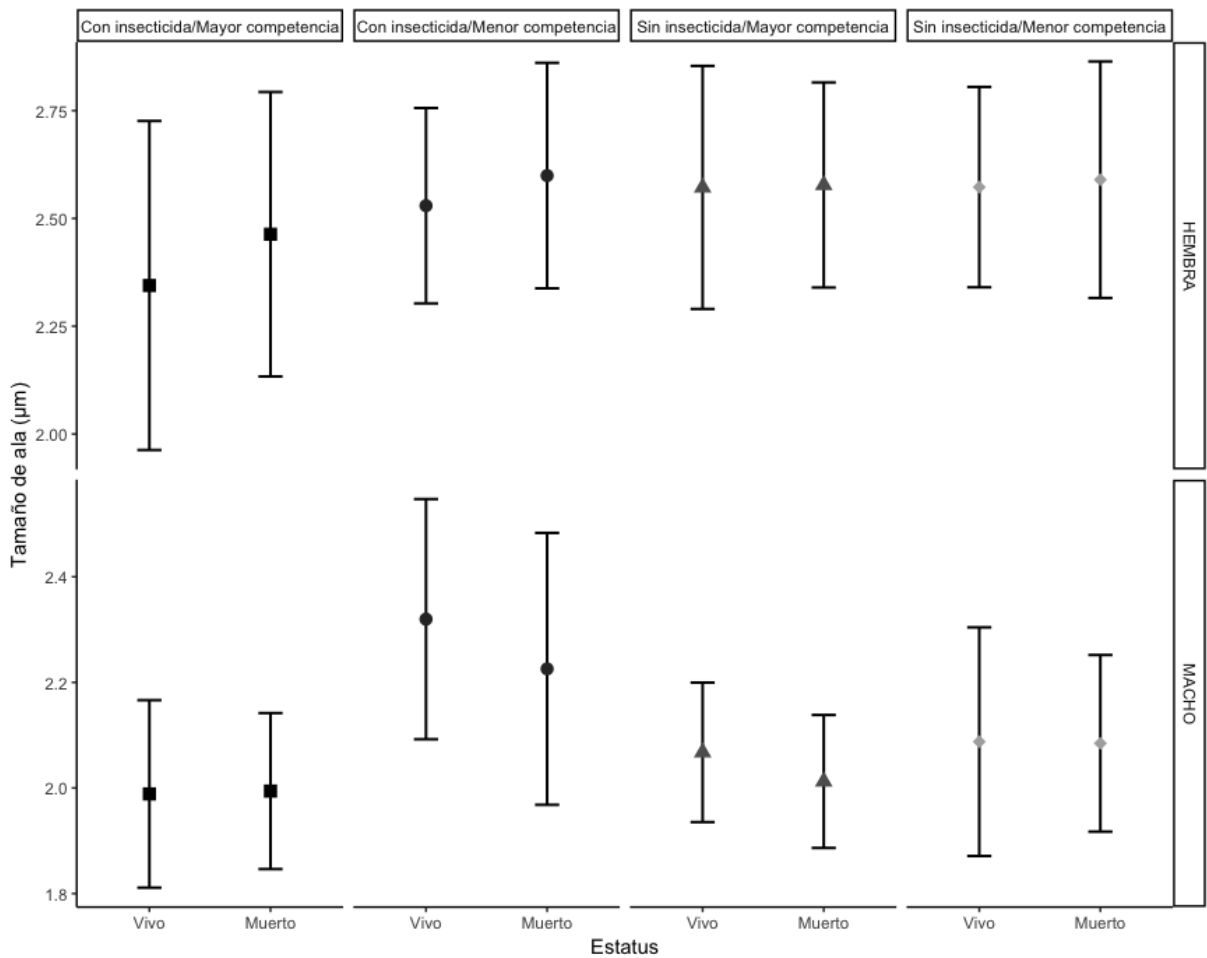


Figura. 6. Comparación de medias del tamaño de las alas (micras) entre individuos derribados (caídos) y no derribados de una cepa resistente de *Ae. aegypti* por cada uno de los tratamientos. Los símbolos representan las medias y las barras es (\pm) la desviación estándar de la media.

DISCUSIÓN

No se observaron diferencias en la fecundidad entre los tratamientos sin embargo para el caso de la fertilidad se observó que la presencia del insecticida generaba un efecto positivo. En la bibliografía se han reportado que las mutaciones KDR puede afectar diferentes aspectos de la biología de los insectos, su desarrollo, reproducción y la longevidad en poblaciones de insectos resistentes la fertilidad por costos de reasignación de recursos para desintoxicarse a la exposición a insecticidas que merman los recursos destinados a la reproducción, sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados sobre los costos de mutaciones KDR están sustentadas en comparaciones de poblaciones de campo de localidades en las que se ha detectado resistencia a insecticidas las cuales son comparadas con poblaciones de referencia criadas en condiciones óptimas. Estos efectos pueden variar dependiendo del tipo de insecticida, tiempo de exposición y el mecanismo involucrado en la resistencia. De igual forma se ha informado que la competencia tiene un efecto en la supervivencia de larvas, tiempo de desarrollo, que afectan el tamaño de los adultos y consumo de sangre de las hembras reduciendo la fecundidad [12-18, 27,28] sin embargo este efecto no se pudo observar en este estudio.

Los resultados del efecto de la exposición a permetrina en la fecundidad son similares a los encontrados en estudios con *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* realizados por Kumar *et al.* [28] y Kumar y Pillai [29] que reportan una disminución en la fecundidad y la fertilidad de hembras seleccionadas con deltametrina. Sin embargo, en un trabajo realizado por Li *et al.* [30] en hembras culex seleccionadas con deltametrina, señala una disminución en la fecundidad mas no en la fertilidad en hembras. En cuanto al efecto de la competencia larvaria un estudio realizado con poblaciones de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* este no encontró efectos en la fecundidad por competencia intra específica en larvas de *Aedes aegypti* y en tanto que la de *Aedes albopictus* se vio afectada por la competencia inter específica [31].

En cuanto a la expresión fenotípica se observa un porcentaje más alto de derribo para deltametrina en comparación a la permetrina este efecto es similar a lo reportado por Chandre *et al.*, [30] quien encontró en tres poblaciones de *Anopheles gambiae* una gran proporción de hembras con mutaciones KDR RR homocigóticas murieron por la exposición prolongada a insecticidas. Esto bien podría deberse a que el genotipo KDR no sea la única razón de la expresión fenotípica de la resistencia a insecticidas diversos factores que pudieran estar interactuando en la expresión fenotípica, que se ve afectada por las interacciones y el entorno al que están sujetos los insectos [32,33].

En cuanto a las diferencias en el tamaño del ala entre los individuos sobrevivientes y muertos solo se encontraron diferencias en las hembras y los machos expuestos a permetrina, sin embargo, en el caso de los machos se encontraron diferencias determinadas por el factor densidad poblacional. Lo cual resulta muy interesante ya que esto pudiera explicar parte de los resultados encontrados en cuanto a la fertilidad ya que algunos autores mencionan que el tamaño del macho repercute en la eficiencia de apareamiento de cada población. Debido a que el tamaño del macho puede afectar la cantidad de esperma transferido a las hembras [33,34]. Varios estudios han demostrado que los mosquitos macho y hembra más grandes son más fecundos [35-37].

CONCLUSIONES

Los resultados del estudio demuestran la importancia de la interacción de los factores evaluados ya que, si bien las mutaciones KDR juegan un papel importante en la dinámica poblacional, son el conjunto de interacciones a las que están sujetas las poblaciones las que determinan la expresión fenotípica de la resistencia tal como lo señalan nuestros resultados en los que se puede observar que los parámetros evaluados se ven afectados por ambos factores.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que los machos están teniendo un papel importante en la dinámica de las poblaciones con KDR por lo que deben ser considerados en los estudios de resistencia y en la dinámica poblacional ya que aportan genes a la siguiente generación, por lo que la actitud física y reproductiva deberá ser evaluada para determinar su efecto en la dinámica poblacional.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto recibió financiamiento de la National Science Foundation (NSF/DEB/DDIG #1601520), y CONACYT México (Project #255141 & Project #INFRA-251675). Agradecemos a todo el personal de la Unidad Colaborativa para Bioensayos Entomológicos UCBE por su apoyo y facilidades para la realización del presente estudio.

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no tienen intereses en conflicto.

REFERENCIAS

1. World Health Organisation. Pesticides and their application for the control of vectors and pests of public health importance. WHO/CDS/NTD/ WHOPEP/GCDPP/2006.1.
2. Zaim M, Guillet P. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends in Parasitology* 2002; 18: 161–163.
3. Garcia GP, Flores AE, Fernández-Salas I, Saavedra-Rodríguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, et al. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2009; 3(10): e531.
4. Simsek FM, Akiner MM, Caglar SS. Effects of sublethal concentration of Vectobac 12 AS on some biological parameters of the malaria vector *Anopheles superpictus*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2009; 8: 1326– 1331.
5. Hairston, N., C. Holtmeier, W. Lampert, L. Weider, D. Post, J. Fischer, C. Cáceres, J. Fox y U. Gaedke. 2001 Natural selection for grazer resistance to toxic cyanobacteria: evolution of phenotypic plasticity? *Evolution* 55: 2203–2214.
6. Ghalambor, C., J. McKay, S. Carroll y D. Reznick. 2007. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology* 21: 394–407.
7. Rasanen, K. y L. Kruuk. 2007. Maternal effects and evolution on ecological timescales. *Functional Ecology* 21: 408–421.
8. Hu Z, Du Y, Nomura Y, Dong K. A sodium channel mutation identified in *Aedes aegypti* selectively reduces cockroach sodium channel sensitivity to type I, but not type II pyrethroids. *Insect Biochemistry Molecular Biology*. 2011; 41(1):9–13.
9. Dusfour I, Zorrilla P, Guidez A, Issaly J, Girod R, Guillaumot L, et al. Deltamethrin resistance mechanisms in *Aedes aegypti* populations from three French overseas territories worldwide. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2015; 9: e0004226.
10. Saavedra-Rodríguez K, Urdueta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, et al. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*. 2007; 16:785-798.
11. Vera-Maloof FZ, Saavedra-Rodríguez K, ElizondoQuiroga AE, Lozano-Fuentes S, Black Iv WC. Coevolution of the Ile1, 016 and Cys1, 534 Mutations in the Voltage Gated Sodium Channel Gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Negl Trop*. 2015; 9: e0004263
12. Abrams PA. When does greater mortality increase population size? The long history and diverse mechanisms underlying the hydra effect. *Ecology Letters*. 2009; 12, 462–474.
13. Resetarits WJ. Oviposition site choice and life history evolution. *American Zoologist*. 1996, 36:205–215.
14. Martins AJ, Ribeiro CD, Bellinato DF, Peixoto AA, Valle D, Lima JB. Effect of insecticide resistance on development, longevity and reproduction of field or laboratory selected *Aedes aegypti* populations. *PLoS Negl Trop*. 2012; 7:e31889.
15. Diniz DF, de Melo-Santos MA, Santos EM, Beserra EB, Helvecio E, de Carvalho-Leandro D, et al. Fitness cost in field and laboratory *Aedes aegypti* populations associated with resistance to the insecticide temephos. *Parasit Vectors*. 2015; doi: 10.1186/s13071-015-1276-5.
16. Kumar S, Thomas A, Samuel T, Sahgal A, Verma A, Pillai MK. Diminished reproductive fitness associated with the deltamethrin resistance in an Indian strain of dengue vector mosquito, *Aedes aegypti* L. *Trop Biomed*. 2009; 26:155-164.
17. Belinato TA, Martins AJ, Valle D. Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107:916-922.

18. Plernsub S, Stenhouse SA, Tippawangkosol P, Lumjuan N, Yanola J, Choochote W, Somboon P. Relative developmental and reproductive fitness associated with F1534C homozygous knockdown resistant gene in *Aedes aegypti* from Thailand. *Trop Biomed*. 2013; 30:621-630.
19. World Health Organization. Management of insecticide resistance among vectors of public health importance: report of the ninth meeting of the Global Collaboration for development of Pesticides for Public Health (GCDPP). 2014.
20. Pelizza SA, Scorsetti AC, Tranchida MC. The sublethal effects of the entomopathic fungus *Leptolegnia chapmanii* on some biological parameters of the Dengue vector *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Science*. 2013; 13: 1-8.
21. Grossman MK, Uc-Puc V, Rodriguez J, Cutler DJ, Morran LT, ManriqueSaide P, Vazquez-Prokopec GM. 2018 Restoration of pyrethroid susceptibility in a highly resistant *Aedes aegypti* population. *Biol. Lett*. 14: 20180022.
22. Arrivillaga J, y Barrera R. Food as a limiting factor for *Aedes aegypti* in water-storage containers. *Journal of Vector Ecology* .2004. 29:11-20
23. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guideline for Evaluating Insecticide Resistance in Vectors Using the CDC Bottle Bioassay. Atlanta, Georgia 30333, USA, 2010; 56.
24. Brogdon WG, McAllister JC. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 1998; 14(2):159–64.
25. Briegel H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol*. 1990; 36:165-1722.
26. Telang A, Frame L, Brown MR. Larval feeding duration affects ecdysteroid levels and nutritional reserves regulating pupal commitment in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *The Journal of Experimental Biology*. 2007; 210, 854–864.
27. Leisnham PT, Juliano SA. Spatial and temporal patterns of coexistence between competing *Aedes* mosquitoes in urban Florida. *Oecologia*. 2009; 160, 343–352.
28. Kumar S, Thomas A, Samuel T, Sahgal A, Verma A, Pillai MKK. Diminished reproductive fitness associated with the deltamethrin resistance in an Indian strain of dengue vector mosquito, *Aedes aegypti* L. *Tropical Biomedicine*. 2009; 26: 155-164.
29. Kumar S, Pillai MKK. Correlation between the reproductive potential and the pyrethroid resistance in an Indian strain of filarial vector, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomology Research*. 2011. 101: 25-31.
30. Li X, Ma L, Sun L, Zhu C. Biotic characteristics in the deltamethrin-susceptible and resistant strains of *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae) in China. *Applied Entomology and Zoology*. 2002; 37: 305-308.
31. Noden BH, O'Neal PA, Fader JE, Juliano SA. Impact of inter- and intra-specific competition among larvae on larval, adult, and life-table traits of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* females. *Ecological Entomology*. 2015; 41:192–200.
32. Chandre F, Darriet F, Duchon S, Finot L, Manguin S, Carnevale P, et al. Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*. 2000; 14, 81–88.
33. Berticat C, Bonnet J, Duchon S, Agnew P, Weill M, Corbel V. Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC. Evolutionary Biology*. 2008; 8: 104.

34. Ponlawat A, Harrington LC. Age and body size influence male sperm capacity of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 2007; 44: 422–426.
35. Ponlawat A, Harrington LC. Factors associated with male mating success of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009; 80: 395–400
36. Okanda FM, Dao A, Njiru BN, Arija J, Akelo HA, Toure Y, et al. Behavioural determinants of gene flow in malaria vector populations: *Anopheles gambiae* males select large females as mates. *Malari Journal*. 2002; 1: 10.
37. Helinski ME, Harrington LC. Male mating history and body size influence female fecundity and longevity of the dengue vector *Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology*. 2011; 48: 202–211.

7. CONCLUSIONES

No se encontraron diferencias en cuanto a la fecundidad sin importar el tratamiento.

La fertilidad se ve afectada positivamente por la presencia de la permetrina.

Los tratamientos no generaron un efecto en el tamaño de los individuos ya que no se encontraron diferencias entre los individuos vivos y los muertos.

La población mostro tolerancia a la permetrina mas no a la deltametrina con un porcentaje de derivo del 92 % para deltametrina y de 7.2 para permetrina.