

EFFECTO DE LA PRESIÓN SELECTIVA POR ORGANOCOLORADOS (DDT),  
ORGANOFOSFORADOS (MALATIÓN), PIRETROIDES  
(LAMBDAIALOTRINA) Y CARBAMATOS (PROPOXUR) SOBRE UNA  
CEPA DE *Aedes aegypti*.

NEILA JULIETH MINA POSSU

UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION  
CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO E INVESTIGACIONES  
MÉDICAS  
CIDEIM  
SANTIAGO DE CALI  
2007

EFFECTO DE LA PRESIÓN SELECTIVA POR ORGANOCOLORADOS (DDT),  
ORGANOFOSFORADOS (MALATIÓN) PIRETROIDES (LAMBDAIALOTRINA) Y  
CARBAMATOS (PROPOXUR) SOBRE UNA CEPA DE *Aedes aegypti*.

NEILA JULIETH MINA POSSU

Trabajo de grado para optar al título de:  
Bióloga

Director:  
CLARA BEATRIZ OCAMPO  
Bióloga. M.Sc. Ph.D

Asesor:  
Myriam Janeth Salazar  
Biologa

Asesor:  
NELSON ROJAS  
Biologo. M.Sc.

UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION  
CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO E INVESTIGACIONES  
MÉDICAS  
CIDEIM  
SANTIAGO DE CALI  
2007

A mis padres Omar y Elvia, y mi hermano Omar  
Andrés.

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por ser la vida y la inspiración, por permitirme llegar..... y por los obstáculos que me dieron la fuerza.

Al departamento de Biología de la **Universidad del Cauca**, por contribuir a mi formación integral como Bióloga durante mi pregrado. De forma especial a todos mis compañeros y profesores, cada uno de los cuales me aportó desde su perspectiva particular. A **Nelson Rojas**, por su asesoría y por alentarme a buscar nuevos campos.

A la unidad de Entomología Médica, investigadores y personal del **Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas CIDEIM**, Cali, institución en la cual desarrolle mi trabajo de grado y financió la totalidad del proyecto. Especialmente a **Olga Lucia Barón** por ayudarme a resolver mis dudas y por sus consejos. A **Mauricio Pérez** por su colaboración con el análisis estadístico.

A la **Dra Clara Beatriz Ocampo**, quien dirigió este trabajo y me brindó la confianza y oportunidad de ingresar a CIDEIM. A ella le debo gran parte de mi formación como profesional y espero que se sienta orgullosa de los frutos cosechados en mí.....

A **Myriam Salazar** por la codirección de este trabajo, por sus enseñanzas, consejos y paciencia, por ser la persona que siempre estuvo dispuesta a enseñar y por acompañarme en todos los momentos difíciles a lo largo de este proceso.

A **Luis Ernesto Ramírez** por su ayuda siempre que lo requerí y por sus palabras de apoyo.

A mi compañera, amiga y hermana de corazón **Paola Andrea Caicedo** por ser la persona que es, por estar a mi lado en todos los momentos los amargos y dulces, por ser mi voz de aliento diaria, por su compañía y apoyo durante este y todos los momentos, por no dejarme desfallecer ni en los peores momentos. Al fin, la meta es de las dos.....

A mis compañeras **Julie Pauline Latorre, Eliana Henao y Lady Castro** por su compañía a largo de la carrera y por los momentos inolvidables. Especialmente a **Clara Muñoz y Elizabeth Londoño** por su infinita colaboración.

A mi familia, especialmente **Mis abuelos** y mi **Tia Elsy** por su continuo apoyo, comprensión y amor. A ellos la paciencia..... Gracias. A mi hermano **Omar Andrés** por la alegría y infinito amor.

A mis padres, por su sacrificio y ejemplo de fortaleza, por alentarme diariamente, por ser mi motor y la fuerza que me no me deja decaer. A ellos, la fuerza para sobrellevar los momentos difíciles aun cuando ni yo creía que los podía superar.... este logro es suyo..... Gracias

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>PREGUNTA DE INVESTIGACION</b> .....	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>21</b>
4.1	OBJETIVO GENERAL.....	21
4.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	21
<b>5</b>	<b>JUSTIFICACION</b> .....	<b>22</b>
<b>6</b>	<b>MARCO CONCEPTUAL</b> .....	<b>23</b>
6.1	DENGUE .....	23
6.2	AEDES AEGYPTI .....	24
6.2.1	Ciclo biológico.....	25
6.2.2	Distribución .....	27
6.2.3	Control .....	29
6.3	LOS INSECTICIDAS.....	30
6.4	RESISTENCIA.....	31
6.4.1	Factores operacionales en la resistencia .....	32
6.4.2	Mecanismos de resistencia a insecticidas .....	32
6.4.3	Bioquímica de la resistencia .....	33
6.4.4	Mecanismos para evaluar la resistencia .....	35
6.5	TABLAS DE VIDA.....	38
6.5.1	Construcción de una tabla de vida.....	39
6.5.2	Curvas de supervivencia.....	39
<b>7</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>46</b>
<b>9</b>	<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>34</b>
<b>10</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>36</b>
10.1	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	36
10.2	SALIDA DE CAMPO .....	37
10.3	OBTENCIÓN DE ADULTOS DE AEDES AEGYPTI .....	37
10.4	IMPREGNACIÓN DE BOTELLAS.....	39
10.4.1	Bioensayo con botellas CDC.....	40
10.5	ALIMENTACIÓN DE HEMBRAS DE AEDES AEGYPTI Y OBTENCIÓN DE HUEVOS .....	41

10.6	PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	44
10.7	TABLAS DE VIDA.....	47
10.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
<b>11</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
11.1	LA PARTE: PRUEBAS PRELIMINARES.....	49
11.1.1	Población proveniente de la Comuna 16.....	49
11.1.2	Presión selectiva en generaciones sucesivas a una población mixta proveniente de diferentes localidades de la ciudad de Cali.....	52
11.2	LA PARTE:.....	56
11.2.1	Presión selectiva por insecticidas en generaciones alternas a una población mixta proveniente de diferentes localidades.....	56
11.2.2	Pruebas en botellas impregnadas del CDC.....	58
11.2.2	Cambios en los mecanismos enzimáticos relacionados con resistencia a insecticidas (oxidasas de función mixta, esterases no específicas, acetilcolinesterasa modificada).....	60
11.2.3	Evaluación de los cambios biológicos en el vector como producto del proceso de selección con insecticidas.....	62
11.2.4	Evaluación de las posibles relaciones de resistencia cruzada.....	71
<b>12</b>	<b>DISCUSION.....</b>	<b>76</b>
12.1	RESULTADOS PRELIMINARES.....	76
12.2	POBLACIÓN MIXTA OBTENIDA DE DIFERENTES LOCALIDADES DE LA CIUDAD DE CALI Y CAMPO ALEGRE -HUILA.....	77
<b>13</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>82</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>84</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>91</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i> .....	25
Figura 2. Tórax de <i>Aedes aegypti</i> .....	26
Figura 3. Criaderos de <i>Aedes aegypti</i> .....	27
Figura 4. Mapa con la distribución de <i>Aedes aegypti</i> .....	27
Figura 5. Distribución de <i>Aedes aegypti</i> en Colombia. ....	28
Figura 6. Principales tipos de curvas de sobrevivencia . ....	40
Figura 7. Bandejas para eclosión.....	38
Figura 8. Esquema de registro en jaulas. ....	38
Figura 9. Alimentadores con membrana sintética. ....	43
Figura 10. Alimentación por membrana. ....	43
Figura 11. Tubo eppendorf (izquierda), macerador (derecha). ....	44
Figura 12. Microplaca. Se resalta en rojo la ubicación de los controles positivos y en azul la de los controles negativos. ....	45
Figura 13. Nivel de oxidasas de función mixta en una población de <i>Aedes aegypti</i> proveniente de la comuna 16.....	51
Figura 14. Nivel de esterases no específicas en una población de <i>Aedes aegypti</i> proveniente de la comuna 16.....	51
Figura 15. Porcentaje de Mortalidad de una población de <i>Aedes aegypti</i> proveniente de la cepa rockefeller frente a los insecticidas evaluados.....	53
Figura 16. Porcentaje de Mortalidad de la población de <i>Aedes aegypti</i> proveniente del Barrio Olaya herrera frente a los insecticidas evaluados. ....	53
Figura 17. Porcentaje de mortalidad de la población de <i>Aedes aegypti</i> proveniente de Petecuy frente a los insecticidas evaluados.....	54
Figura 18. Porcentaje de Mortalidad de la población de <i>Aedes aegypti</i> proveniente de Siloe frente a los insecticidas evaluados. ....	54
Figura 19. Porcentaje de Mortalidad de la de <i>Aedes aegypti</i> población proveniente de Lourdes frente a los insecticidas evaluados.....	55
Figura 20. Criaderos de <i>Aedes aegypti</i> .....	56
Figura 21. Comunas de la ciudad de Cali en las que se colectaron ejemplares de <i>Aedes aegypti</i> . ....	57

Figura 22. Tiempo letal 50 (TL50) y tiempo letal 100 (TL100) de la cepa de <i>Aedes aegypti</i> a través del proceso de selección con lambdacialotrina.....	59
Figura 23. Tiempo letal 50 (TL50) y tiempo letal 100 (TL100) de la cepa de <i>Aedes aegypti</i> a través del proceso de selección con propoxur. ....	59
Figura 24. Proteínas en población de <i>Aedes aegypti</i> sometida a presión por insecticidas .....	60
Figura 25. Niveles de oxidasas de función mixta en población de <i>Aedes aegypti</i> sometida a presión por insecticidas .....	60
Figura 26. Niveles de esterasas no específicas en una población de <i>Aedes aegypti</i> sometida a presión por insecticidas .....	61
Figura 27. ACEM en población de <i>Aedes aegypti</i> sometida a presión por insecticidas. ....	61
Figura 28. Porcentaje de eclosión de las cepas de <i>Aedes aegypti</i> comparado con la cepa rockefeller. ....	63
Figura 29. Porcentaje de Mortalidad de la filial 3 en comparación con la cepa Rockefeller y población mixta F1. ....	64
Figura 30. Porcentaje de Mortalidad de la filial 5 en comparación con la cepa Rockefeller y población mixta F1 .....	64
Figura 31. Curva de Supervivencia en el estadio de larva de una cepa de <i>Aedes aegypti</i> sometida a presión por DDT.....	67
Figura 32. Curvas de Supervivencia en el estadio de larva de una cepa de <i>Aedes aegypti</i> sometida a presión por lambdacialotrina. ....	67
Figura 33. Curva de supervivencia en el estadio de larva de una cepa de <i>Aedes aegypti</i> sometida a presión por propoxur.....	68
Figura 34. Numero promedio de huevos de hembras de <i>Aedes aegypti</i> , población mixta F1, cepas seleccionadas por DDT, lambdacialotrina y propoxur.....	69
Figura 35. Duración de vida o longevidad de las Cepas seleccionadas, Cepa rockefeller y Población mixta sin seleccionar.....	70
Figura 36. Porcentaje de mortalidad de adultos de <i>Aedes aegypti</i> de la cepa rockefeller frente a los insecticidas evaluados. ....	73
Figura 37. Porcentaje de mortalidad de adultos de <i>Aedes aegypti</i> de la cepa seleccionada con DDT frente a los insecticidas evaluados. ....	73
Figura 38. Porcentaje de mortalidad de adultos de <i>Aedes aegypti</i> de la cepa seleccionada con lambdacialotrina frente a los insecticidas evaluados.....	74

Figura 39. Porcentaje de mortalidad de adultos de *Aedes aegypti* de la cepa seleccionada con propoxur frente a los insecticidas evaluados.....74

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros para elaborar una tabla de vida horizontal o vertical. ....	39
Tabla 2. Pruebas bioquímicas.....	46
Tabla 3. Esquema de selección utilizado en la presión selectiva por insecticidas en la comuna 16. ....	49
Tabla 4. Tiempo (minutos) en el que se alcanzó el 50% de mortalidad de la población de la comuna 16 determinado en la filial 1. ....	50
Tabla 5. TL50 y TL100 de las cepas de <i>Ae. aegypti</i> sometidas a presión selectiva por diferentes insecticidas. Pruebas con botellas CDC. ....	58
Tabla 6. Prueba chi-cuadrado para comparación del porcentaje de eclosión entre las cepas.....	63
Tabla 7. Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de <i>A. aegypti</i> entre cepas Rockefeller, Población mixta, Propoxur, Lambdacialotrina y DDT.....	65
Tabla 8. Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de <i>A. aegypti</i> entre filiales de la cepa DDT.....	65
Tabla 9. Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de <i>A. aegypti</i> entre filiales de la cepa lambdacialotrina.....	65
Tabla 10. Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de <i>A. aegypti</i> entre filiales de la cepa Propoxur. ....	66
Tabla 11. Resultados de análisis del promedio de huevos por hembra por la prueba de Kruskal Wallis. ....	69
Tabla 12. Resultados de análisis de longevidad por la prueba de Kruskal Wallis. ....	70
Tabla 13. Porcentajes de mortalidad resultado de las evaluaciones a las cepas seleccionadas con DDT, Lambdacialotrina y Propoxur.....	72

## **LISTA DE SIGLAS**

**SIVIGILA:** Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública.

**CDC:** Center of Disease Control and prevention (centro para el control y la prevención de enfermedades).

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPS:** Organización Panamericana de la Salud

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. FORMATO DE PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE MOSQUITOS ADULTOS A INSECTICIDAS BOTELLAS CDC .....	91
Anexo 2. Formato para diligenciar datos para tabla de vida .....	92
Anexo 3. Análisis estadístico a Pruebas bioquímicas de la población proveniente Comuna 16. ....	93
Anexo 4. Análisis estadístico a Pruebas bioquímicas de la población mixta F1 y cepas seleccionadas.....	94
Anexo 5. Tabla de vida horizontal de Cepa Rockefeller y Población mixta sin seleccionar (Parental y filial 1). ....	98
Anexo 6. Tabla de vida horizontal de Cepas seleccionadas con DDT, lambdacialotrina y propoxur.....	100
Anexo 7. Pruebas estadísticas para comparar promedio huevos y promedio de días de duración de vida (Longevidad) entre cepas. ....	103

## 1 INTRODUCCION

El dengue es una infección viral que ha emergido como una de las enfermedades transmitidas por artrópodos más importantes en humanos en los últimos 20 años; se estima que mas de 100 millones de casos de dengue ocurren cada año en todo el mundo (OPS, 2002). Esta enfermedad presenta diferentes manifestaciones clínicas como la Fiebre por Dengue (FD), o formas más severas denominadas Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) y Síndrome de Choque por Dengue (SCD), las cuales pueden ser fatales para el individuo (Martínez, 1998).

Del virus dengue se conocen 4 serótipos denominados DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 (Gubler, 1998); los cuales son transmitidos por mosquitos del género *Aedes*. Dentro de las especies vectoras se encuentran *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti*. Sin embargo, el principal vector de virus dengue en el hemisferio occidental es *Aedes aegypti* el cual está presente en la mayor parte de las áreas tropicales o subtropicales comprendidas entre los 35° de latitud norte y los 35° de latitud sur (Gibbons y Vaughn, 2002). Este mosquito es un eficiente vector gracias a factores como su alta susceptibilidad a la infección con el virus, sus hábitos antropófilicos y su amplia distribución, que lo constituye como el vector mas eficiente del de dengue en la mayoría de países incluido Colombia (Gubler, 1998).

Por esta razón, durante muchos años se han establecido diferentes estrategias para el control de las poblaciones de *A. aegypti* que incluyen la utilización de químicos, educación a las comunidades y el manejo ambiental para eliminar los criaderos del vector. Actualmente la estrategia de control más utilizada es el manejo integral de plagas que consiste en la implementación conjunta de todas las alternativas enumeradas anteriormente.

La aplicación de insecticidas ha jugado un papel fundamental en el control de este mosquito, sin embargo la utilización de dichos químicos ha generado el fenómeno de resistencia en muchas poblaciones de *A. aegypti* y otros vectores de importancia en salud pública. La resistencia a insecticidas es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el desarrollo de la capacidad en una cepa de algún organismo para tolerar dosis de un tóxico que es letal para la mayoría de individuos en una población normal de la misma especie (OMS, 1991). La aparición de la resistencia varía a nivel local, de acuerdo con las características propias de las poblaciones y a la presión de selección a la que hayan sido sometidas.

Se conoce que la resistencia a insecticidas se debe principalmente a la modificación en la cantidad o actividad de algunas enzimas que metabolizan los compuestos de los insecticidas como oxidasas de función mixta, esterases no

específicas y glutatión-transferasas; o a la modificación del sitio blanco sobre el que actúa el insecticida (canales de Na<sup>2+</sup> y Cl<sup>-</sup>, enzima acetilcolinesterasa) (Brogdon, 1998). Los vectores resistentes pueden utilizar más de un mecanismo al mismo tiempo o un mecanismo puede causar resistencia para varios insecticidas.

La presión por insecticidas a las poblaciones de vectores varía de acuerdo con el sitio y las condiciones del medio donde se desarrollan los insectos. De esta forma, es importante el conocimiento local de las causas que generan la resistencia para evitar que los programas de control fallen.

Es necesario entonces, conocer el nivel de resistencia de las diferentes poblaciones de vectores y los mecanismos enzimáticos de detoxificación que estos utilizan. Para la evaluación de insecticidas y la detección de resistencia, existen diferentes métodos como: 1) el kit desarrollado por la OMS, 2) la pruebas en botellas impregnadas desarrolladas por el Dr. William Brogdon del Center for Disease Control de Estados Unidos (CDC) y 3) los bioensayos de la OMS utilizando larvas. Para establecer cuales son los mecanismos enzimáticos de resistencia se utilizan el test en microplacas y la electroforesis. El test en microplacas permite comparar los niveles enzimáticos de una población de campo con los de poblaciones susceptibles conocidas (Hemingway, 1989).

Sin embargo, para realizar comparaciones válidas entre diferentes poblaciones se hace necesaria la obtención de cepas resistentes de referencia que permitan adquirir datos más precisos sobre una situación local y sobre los mecanismos que están generando la resistencia. De esta forma, se logrará tener un control más eficaz de los vectores y racionalizar los esfuerzos que se hacen en aras de combatir este problema.

Este proyecto, basado en la importancia del problema de la resistencia a insecticidas y en los antecedentes de poblaciones de vectores resistentes encontrados en el país, evaluó el efecto de la presión por insecticidas de diferente composición química sobre la actividad de las enzimas relacionadas con resistencia en poblaciones de *A. aegypti* con historia de resistencia a insecticidas. De igual forma, se evaluaron los cambios en algunos aspectos biológicos del vector durante el proceso de selección.

Durante el proceso de selección y con la metodología implementada, se obtuvieron cepas con alto grado de resistencia a los insecticidas evaluados, las cuales podrían ser de gran utilidad en un futuro, para ser utilizadas como herramientas de referencia en estrategias de control vectorial y estudios moleculares.

## 2 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En la mayoría de los países latinoamericanos incluido Colombia, se ha reportado la resistencia de *A. aegypti*, principal vector del virus dengue, a diferentes clases de insecticidas principalmente organofosforados, carbamatos y DDT (Brogdon, 1989). El tipo y grado de resistencia varían de una región a otra y por tanto los esfuerzos que se hagan para combatirla deben basarse en el conocimiento de la situación local.

Por esta razón la determinación del nivel de resistencia y los mecanismos bioquímicos específicos que intervienen en ella son una herramienta en la toma de decisiones apropiadas en programas para el control de *A. aegypti*. En Colombia se ha registrado la resistencia de esta especie de mosquito a diversas clases de insecticidas, pero aun son necesarios estudios sobre los mecanismos enzimáticos que intervienen en el fenómeno de resistencia en diferentes localidades dentro del país.

Así mismo, se conoce que los diferentes ciclos de tratamiento con insecticidas pueden determinar las relaciones de resistencia cruzada y la efectividad en la aplicación de los programas de control con insecticidas. El estudio de los factores bioquímicos y moleculares que intervienen en la resistencia que se presenta en el país, podrían brindar conocimiento importante para el manejo del vector. De igual forma, la generación de cepas resistentes a diferentes insecticidas serviría como modelo para evaluar las variaciones biológicas y enzimáticos que podrían suceder en la población de *A. aegypti* del país si son sometidas a presión por estos insecticidas, además podría ser utilizada como referencia y representar a futuro una base para estudios moleculares.

Por todo ello, el presente trabajo evaluó los efectos de la presión selectiva con diversos insecticidas sobre poblaciones de *A. aegypti* con historia de resistencia a insecticidas, teniendo como base las siguientes preguntas: 1) ¿cómo varían los niveles enzimáticos relacionados con resistencia según la presión de selección aplicada?, 2) ¿qué efecto tiene la presión selectiva con insecticidas en algunos aspectos biológicos de la población de *A. aegypti*? y por último, 3) ¿es posible obtener cepas de *A. aegypti* resistentes a diversos insecticidas en condiciones de laboratorio?.

### 3 PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cuáles son los cambios a nivel biológico (fecundidad, viabilidad, longevidad) y enzimático (esterasas no específicas, oxidasas de función mixta y acetilcolinesterasa) en una cepa de *Aedes aegypti* sometida a presión de selección por diferentes clases de insecticida?

## 4 OBJETIVO

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la presión selectiva por organoclorados (DDT), carbamatos (propoxur), píretroides (lambdacialotrina) y organofosforados (malatión) sobre una cepa de *Aedes aegypti* y los cambios que se generan en sus mecanismos enzimáticos relacionados con resistencia.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Medir cambios en los mecanismos enzimáticos relacionados con resistencia a insecticidas (oxidasas de función mixta, esterasas no específicas, acetilcolinesterasa modificada) en una cepa de *Aedes aegypti* sometida a procesos de selección por insecticidas.

Evaluar si existen cambios biológicos en el vector como fecundidad, longevidad y viabilidad de huevos como producto del proceso de selección con insecticidas.

Identificar las posibles relaciones de resistencia cruzada que se puedan originar durante el proceso de selección con otros insecticidas.

## 5 JUSTIFICACION

La resistencia a insecticidas es un fenómeno de aparición relativamente rápida que se ha extendido como producto de la constante lucha contra plagas agrícolas y vectores de patógenos de importancia en salud pública, lo que ha contribuido en gran medida a la baja efectividad de los programas de control de insectos nocivos (Ferrari, 1996).

Por otra parte, la resistencia a insecticidas conlleva grandes costos económicos para las regiones donde se presenta, debido a las inversiones que se deben hacer para controlar su aparición y a las posibles aplicaciones ineficaces que se pueden hacer de los insecticidas cuando no se posee conocimiento de los niveles y mecanismos de resistencia presentes en cada región.

Estos hechos han influido en el aumento de la incidencia de varias enfermedades de transmisión vectorial, incluido el dengue, el cual es considerado como la segunda infección reemergente más importante entre las enfermedades tropicales, con un estimado de 100 millones de casos por año en todo el mundo (OMS, 1997). En Colombia, el principal vector del dengue es el mosquito *A. aegypti*, para el cual se ha reportado resistencia a temefos y malatión en Antioquia (Mazzari, 1995), y a DDT en varios departamentos del país (Morales *et al.*, 1998; Ocampo *et al.*, 2007)

La influencia de todos estos factores hace importante el conocimiento de las características propias de vectores como *A. aegypti*, que pueden determinar la aparición de resistencia, así como también los mecanismos bioquímicos que la generan y las posibles relaciones de resistencia cruzada a otros insecticidas que se puedan presentar. Los estudios sobre el efecto de la presión selectiva por insecticidas y la obtención de cepas resistentes a los mismos se han constituido en una herramienta para tal fin; este tipo de investigaciones además de profundizar en el conocimiento sobre los cambios en la biología del vector frente a la resistencia, sirven como referencia para la toma de decisiones y políticas de manejo de insecticidas. Del mismo modo, el proceso de selección posibilita la obtención de poblaciones con alto nivel de resistencia a los insecticidas probados, que a futuro, pudieran servir como referencia en otros estudios que abarquen componentes a nivel molecular.

Teniendo en cuenta que el mosquito *A. aegypti* es un vector de importancia en Colombia y que muchos de los esfuerzos de control se enfocan en esta especie, es importante conocer las variaciones en la biología y mecanismos bioquímicos de resistencia a insecticidas generados por este vector debido a la aplicación de insecticidas de uso común en Colombia.

## 6 MARCO CONCEPTUAL

### 6.1 DENGUE

El dengue es una enfermedad infecciosa producida por alguno de los cuatro serotipos del virus dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4), pertenecientes a la familia Flaviviridae y que son transmitidos al hombre por mosquitos vectores del género *Aedes* (Monath y Heinz, 1996). La especie vectora más importante en la transmisión del virus es *A. aegypti*, seguido por *A. albopictus* (Gonzalez *et al.*, 1998).

La transmisión del virus dengue es indirecta, a través de los vectores biológicos mencionados. Se realiza por la picadura del mosquito hembra infectado en un hospedero sano; las hembras del mosquito se infectan previamente cuando ingirien sangre de un hospedero con el virus. No hay transmisión por contacto directo con una persona enferma, sus secreciones, ni por contacto con fuentes de agua o alimentos (Chiparelli, 2005).

Clínicamente, la enfermedad puede manifestarse como una forma benigna autolimitada de fiebre indiferenciada llamada Fiebre por Dengue (FD), o como formas más severas denominadas Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) y Síndrome de Choque por Dengue (SCD), las cuales pueden ser fatales para el individuo (Martínez, 1998).

La infección por virus dengue es la enfermedad de dispersión vectorial más común a nivel mundial en lo que se refiere a la tasa de morbilidad, y cuya incidencia aumenta en las regiones tropicales de Centro y Suramérica (Torres, 2000). Se estima que cerca de 2.5 billones de personas procedentes de zonas urbanas, periurbanas y rurales están en riesgo de contraer la infección, con una incidencia anual de 50-100 millones de casos de fiebre por dengue y de 25-500 mil casos de fiebre hemorrágica por dengue (PAHO 1997; OPS 2000; Rodhain 1996; Gibbons y Vaughn 2002).

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la transmisión del virus dengue ha aumentado significativamente en el continente americano y algunas islas caribeñas. Para el año 2000, 25 países de Centro y Suramérica y del Caribe, registraron transmisión de dengue; entre ellos, 17 presentaron casos de dengue hemorrágico y 10 muertes debidas a esta causa. La subregión más afectada fue Suramérica, especialmente Brasil, Ecuador, Colombia, Paraguay y Venezuela (Chiparelli, 2005).

En Colombia, la primera epidemia del virus fue causada por el serotipo Den-2 y se presentó a mediados de 1971 en la Costa Atlántica, después de la interrupción del programa para erradicar el vector (1950-1970). La segunda epidemia fue en el año de 1975, donde aparecieron brotes por Den-3 en el interior del país; la tercera gran epidemia comenzó en 1977 y llegó a su punto máximo en 1978. El serotipo Den-4 se aisló por primera vez en 1982 en la Costa Atlántica (Boshell *et al.*, 1986).

El primer caso de dengue hemorrágico en el país se presentó en el año de 1989 en Puerto Berrio (Antioquia) y desde entonces el número de casos ha ido aumentando año tras año. Hasta la semana epidemiológica 52 del año 2002 se habían notificado 81.831 casos por dengue clásico y 5.245 casos por dengue hemorrágico (SIVIGILA, 2002).

La amplia distribución y la elevada incidencia de las infecciones por virus dengue están relacionadas directamente con la distribución de su principal vector, *A. aegypti*, y con el aumento de la densidad poblacional en grandes áreas urbanas. La falta de programas efectivos para contener el vector y el deterioro del ambiente urbano también son responsables (Isturiz *et al.*, 2000).

## **6.2 *Aedes aegypti***

En 1906, Ashburn y Graig demostraron que el agente causal del dengue era un virus transmitido por la picadura del mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762; en 1985 se encontró un nuevo vector, *A. albopictus*, de origen asiático (Chen *et al.*, 1993; Foster y Walter, 2002). Ambos vectores muestran actividades similares pero se resaltan las de *A. aegypti* por ser el vector de mayor influencia en la dispersión del dengue.

El mosquito *A. aegypti* es un artrópodo de la clase Insecta, orden Díptera, familia Culicidae y subfamilia Culicinae (Chiparelli, 2005), que tiene la capacidad de transmitir agentes causantes de enfermedades como el dengue y la fiebre amarilla, entre otras (Salvatella, 1997).

Esta especie de mosquito es propia de regiones tropicales y subtropicales dentro de los límites de 35° latitud norte y 35° latitud sur (Gibbons y Vaughn, 2002). Es altamente susceptible a temperaturas extremas y climas cálidos secos. Se plantea que el origen de *A. aegypti* es africano y se conocen tres variedades principales: *A. a. aegypti*, *A. a. formosus* y *A. a. queenslandensis*; la variedad *aegypti* es la más común en el mundo (Chiparelli, 2005) y la de mayor importancia en la salud pública mundial.

## 6.2.1 Ciclo biológico

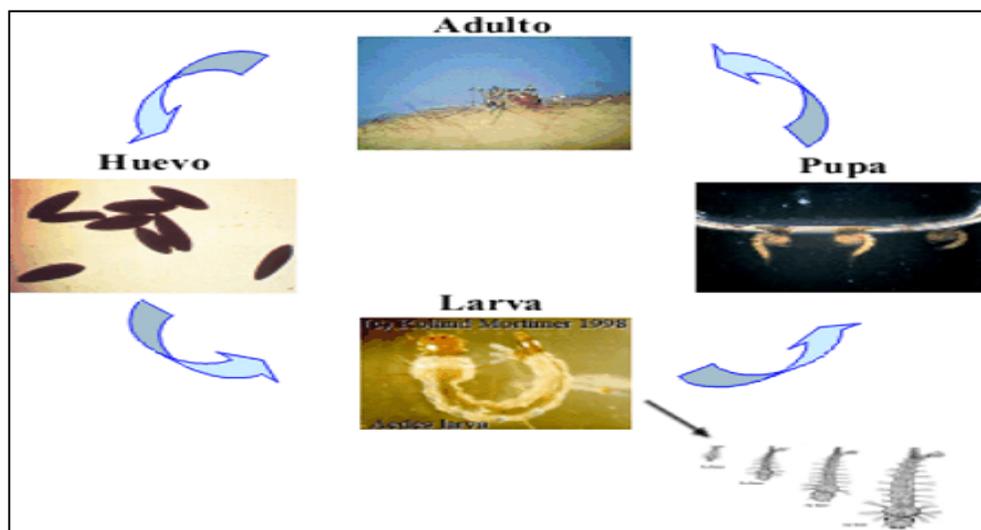
*A. aegypti* pasa por tres formas en su fase acuática (huevo, larva y pupa) y una fase aérea o de adulto (Figura 1). Su paso por los estadios de huevo, larva y pupa dura entre 7 y 13 días dependiendo de la temperatura y condiciones alimenticias (Secretaría de Salud de México, 2005).

Los huevos son inicialmente de color blanco, se tornan negros y alargados con el desarrollo del embrión, miden aproximadamente entre 0,5 y 1,0 mm, evolucionan en óptimas condiciones de temperatura y humedad en un lapso de 2 a 3 días, aunque soportan la desecación hasta por un año (Salvatella, 1997).

El estadio de larva comprende cuatro grados evolutivos denominados primero, segundo, tercero y cuarto, creciendo a lo largo de tres mudas desde una longitud de 1 mm en sus primeras etapas, hasta 6 o 7 mm. Poseen un sifón corto, cabeza y tórax casi tan anchos como el abdomen y fuertes espículas torácicas laterales quitinizadas. Se alimentan filtrando el zoo y fitoplancton del agua en la que habitan; están dotadas de movimientos verticales característicos entre el fondo y la superficie, adoptando forma de "S". Su desarrollo se completa de 5 a 7 días en condiciones favorables de nutrición y con temperaturas de 25 a 29°C. Son incapaces de resistir temperaturas inferiores a 10°C, o superiores a 44 o 46°C; a los 13°C son incapaces de pasar al estadio de pupa (Salvatella, 1997).

El estado de pupa corresponde a la última etapa de maduración de la fase acuática, durante el cual no requiere alimentación. Entre los 28 y 32°C, completa su desarrollo hasta la emergencia del adulto en 1 a 3 días. Las variaciones extremas de temperatura pueden dilatar este período (Salvatella, 1997) (Figura 1).

**Figura 1.** Ciclo biológico de *Aedes aegypti*.



La forma adulta del mosquito *A. aegypti* se caracteriza por tener un dorso con bandas de color plateado o amarillo blanquecino sobre fondo oscuro, y un dibujo característico en forma de lira en el dorso del tórax (Figura 2). Las patas están bandeadas conspicuamente y el último artejo de las patas posteriores es blanco; el abdomen de la hembra tiende a ser puntiagudo (Chiparelli, 2005). Vuelan pocos metros y pierden actividad por desecación o por debajo de 12-14°C, reposan en lugares frescos y semioscuros; la longevidad es de aproximadamente 3 a 8 semanas de acuerdo con la humedad del medio. Los machos se alimentan del néctar de plantas y las hembras son hematófagas de hábito diurno (Salvatella, 1997).

**Figura 2.** Tórax de *Aedes aegypti*.

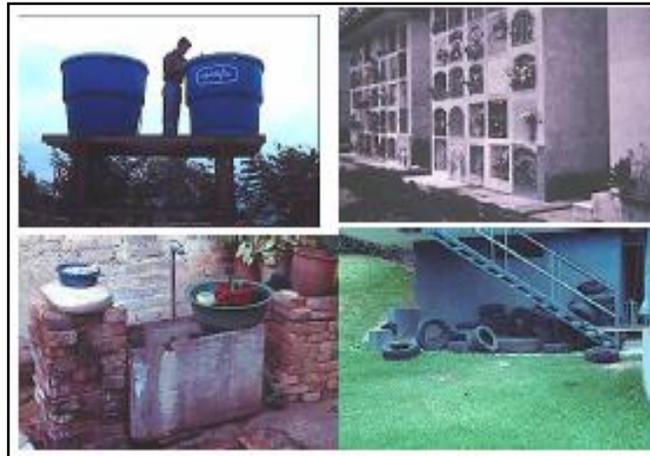


(FUENTE: INBio)

La sobrevivencia de los mosquitos depende de la capacidad para alimentarse, reproducirse, protegerse y dispersarse. Generalmente, el apareamiento se realiza cuando la hembra busca alimentarse. Una vez la hembra es copulada e inseminada, el espermatozoides que lleva es suficiente para fecundar todos los huevecillos que produce durante su existencia. A diferencia de otros géneros, se ha observado que *Aedes aegypti* se alimenta varias veces de uno o varios hospederos entre cada ciclo gonotrófico, lo que representa un factor de importancia en su capacidad como transmisor de microorganismos patógenos (Gibbons y Vaughn, 2002).

Sus hábitos son netamente antropofílicos y domésticos, con criaderos que van desde depósitos de agua dentro de la vivienda o el peridomicilio (jardines, construcciones anexas a la casa, patios, etc.), hasta aquellos ubicados en el exterior, como neumáticos, baterías viejas, recipientes de todo tipo, botellas y floreros, entre otros, que le sirven para poner sus huevos en la superficie del recipiente a la altura de la interfase agua-aire (Figura 3) (Secretaría de Salud de México, 2005).

**Figura 3.** Criaderos de *Aedes aegypti*.

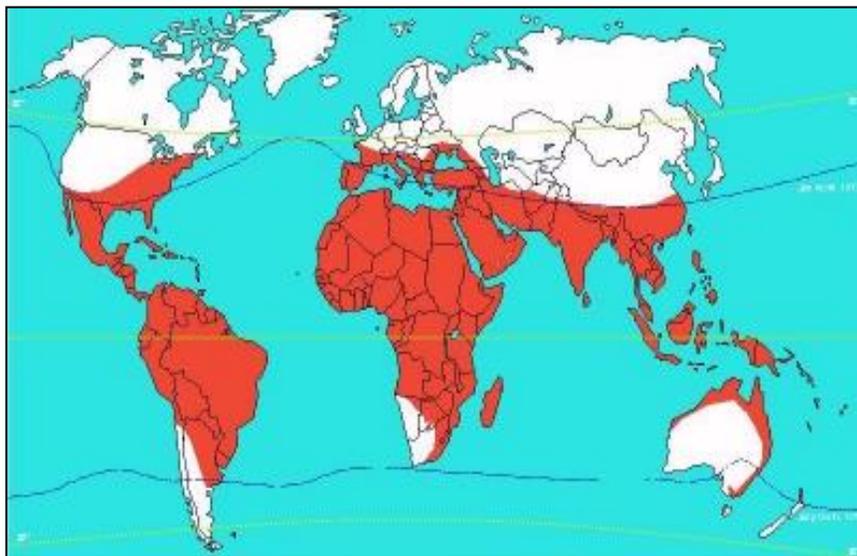


(En URL: [www.cenave.gov](http://www.cenave.gov))

### 6.2.2 Distribución

*A. aegypti* es una especie de mosquito importante en la salud pública mundial debido a su ya mencionada implicación como vector en enfermedades como el dengue y a su distribución cosmopolita (Figura 4) (Gubler, 1998).

**Figura 4.** Mapa con la distribución de *Aedes aegypti*.



■ Presencia de *Aedes aegypti*

(EN: Chiparelli, 2005)

Aunque es de origen africano, *A. aegypti* ha habitado en el Caribe por más de 350 años y se cree que tal vez fue introducido por barcos provenientes de África que cruzaban el Atlántico transportando esclavos hacia América, lo que produjo la diseminación del mosquito gracias al activo comercio entre las islas (Gibbons y Vaughn, 2002).

Exceptuando Canadá y algunas áreas donde la altitud y la temperatura han impedido su colonización, *A. aegypti* ha infestado todo los países del continente americano, y se ha convertido en una especie casi doméstica, predominando en áreas urbanas (PAHO, 1994), y convirtiéndose en el vector principal del virus dengue en el continente.

En Colombia, *A. aegypti* se distribuye en casi el 80% del territorio desde el nivel del mar hasta los 1800-2400 msnm (Figura 5). Los problemas de orden público que desplazan poblaciones, el abastecimiento de agua potable deficiente, la falta de orientación y saneamiento doméstico, son factores que conllevan a un aumento de criaderos de este mosquito (Padilla *et al.*, 1999).

**Figura 5.** Distribución de *Aedes aegypti* en Colombia.



(SIVIGILA, 2000)

La incidencia del dengue esta directamente relacionada con la distribución y densidad *A. aegypti*, por lo cual, una de las medidas de control de la enfermedad es la eliminación del vector; sin embargo, las campañas emprendidas con este fin no han resultado del todo exitosas (Boshell *et al.*, 1986).

Así, en 1950 el gobierno colombiano emprendió una campaña de vigilancia con la finalidad de erradicar *A. aegypti* del territorio nacional y evitar el riesgo de fiebre amarilla urbana; este programa se descontinuó en los años 70, después de declarar el territorio libre de este vector. Sin embargo, debido a la presencia de *A. aegypti* en Venezuela y a su resistencia al DDT, insecticida utilizado en ese tiempo, este mosquito reinfestó el país. Fue entonces cuando aparecieron las primeras epidemias por Dengue-2 en los años 1971-1972 (Boshell *et al.*, 1986).

### 6.2.3 Control

*A. aegypti* es un ejemplo de adaptación de una especie de mosquito al ámbito humano, con criaderos, hábitat, fuente de alimentación, desplazamientos activos y pasivos ligados al ámbito domiciliario.

Las características propias del mosquito y su capacidad vectorial han generado que durante décadas en Colombia y el mundo se diseñen diferentes estrategias para su control y erradicación, pero considerando la difusión del vector, la resistencia a insecticidas y su fácil adaptación a los ambientes humanos que contribuyen a su persistencia, son deducibles las dificultades para erradicarlo (Chiparelli, 2005). Por lo tanto, el enfoque actual ha cambiado el concepto de erradicación por el de control de las poblaciones de vectores.

Las acciones contra artrópodos vectores incluyendo *A. aegypti* van desde estrategias basadas en la participación comunitaria como la destrucción de criaderos y la utilización métodos de protección contra la picadura del vector con mallas y repelentes; la educación para fomentar el drenaje de aguas estancadas, y de otros depósitos artificiales de agua dispuestos en torno al hogar como tinajas, llantas, tubos de cercas, bebederos de animales, etc; y la participación activa en las acciones pertinentes para el control del vector .

Generalmente, para el control de las poblaciones de vectores, se utilizan métodos físicos (barreras, eliminación de criaderos), químicos (fumigaciones) y/o biológicos (modelos ecológicos depredador/presa dirigidos a la eliminación o control de cualquier depósito donde se desarrollen o puedan desarrollarse las larvas del mosquito) (Secretaría de salud de México, 2005).

El control biológico consiste en el uso de organismos biológicos (parásitos, depredadores y patógenos) o subproductos de estos para combatir los vectores. Estos agentes vivos deben poseer características ventajosas sobre el vector o regular poblacionalmente al mismo (Secretaría de salud de México, 2005).

El control químico se puede destinar tanto a los mosquitos inmaduros o a los adultos, esta estrategia es una de las más comunes y su componente principal es la aplicación de insecticidas (Secretaría de salud de México, 2005). El uso de larvicidas requiere colocar sustancias químicas para matar las larvas de los mosquitos en los recipientes que no se pueden eliminar fácilmente. Para eliminar los mosquitos adultos, el rociamiento de insecticidas de volumen ultrabajo (ULV) es ampliamente utilizado. El ULV utiliza máquinas que producen partículas muy pequeñas de insecticida, que son transportadas por las corrientes de aire (CDC, 2005).

### 6.3 LOS INSECTICIDAS

Los insecticidas juegan un rol importante en el control de la mayoría de los vectores de importancia en salud pública (Hemingway y Ranson, 2000). Estos químicos están agrupados en diferentes categorías pero en la actualidad los principales tipos de insecticidas utilizados para el control de vectores se clasifican de acuerdo a su estructura química en: organoclorados (OCs), organofosforados (OFs), carbamatos y piretroides, aunque comienzan a utilizarse en gran escala insecticidas de origen microbiano y reguladores del crecimiento (Bissett, 2002).

Los organoclorados fueron los primeros insecticidas en ser utilizados en gran escala. Como su nombre lo indica, poseen carbono y cloro en su estructura. Su toxicidad es bastante alta y actualmente su uso está prohibido en la gran mayoría de países. Los organofosforados son un grupo de insecticidas orgánicos que poseen fósforo en su estructura, además de otros elementos muy variados. Generalmente son miscibles en solventes orgánicos aunque algunos pueden serlo en agua. Los piretroides son ésteres del ácido crisantémico y su componente original son piretrinas naturales aisladas de la flor del *Chrysanthemum*. Los carbamatos existen como ésteres del ácido carbámico y sus componentes son habitualmente solubles en solventes orgánicos. Algunos carbamatos son alifáticos y son más solubles en agua (Bloomquist, 1999).

Los insecticidas penetran al cuerpo del insecto por varias vías, ya sea a través de la cutícula, por ingestión y absorción a través del intestino o a través de los espiráculos del sistema respiratorio. Asimismo, poseen diferentes mecanismos de acción de acuerdo con su composición y clasificación (Bissett, 2002).

Por ejemplo, los insecticidas organofosforados y carbamatos tienen como mecanismo de acción la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en las uniones sinápticas por fosforilación o carbamilación de su centro activo. Esta enzima es responsable de controlar la cantidad del neurotransmisor excitatorio acetilcolina en

la sinapsis. Por lo tanto, estos insecticidas actúan como análogos del neurotransmisor acetilcolina (Reiner, 1971).

Por otra parte y aunque aún sigue siendo estudiado el modo de acción a nivel molecular, los piretroides actúan a nivel de la membrana de las neuronas, produciendo un retardo en el cierre de los canales de sodio después de que el impulso inicial ha cesado. Este proceso se desencadena debido a una interferencia en los cambios conformacionales de los canales en la interfase lípido-proteína (Narahashi, 1985). Algunos organoclorados como el DDT, tienen el mismo mecanismo de acción que los piretroides, lo que puede dar origen a resistencia cruzada entre estos dos grupos de insecticidas químicamente diferentes.

Es importante resaltar que el uso de los insecticidas, la aplicación inapropiada de los mismos y el mal manejo de las dosis, junto con otros factores adicionales, ha ocasionado que los insectos y en especial los mosquitos, adquieran facultades para evadir o bloquear los mecanismos de acción de los insecticidas, generando el fenómeno de resistencia (Flores *et al.*, 2001).

#### **6.4 RESISTENCIA**

La resistencia a insecticidas ha sido definida por la OMS como la aparición en una población de insectos de la facultad de tolerar dosis tóxicas que normalmente ejercerían una acción letal (Uclaf, 1983). Según la FAO (1970), es una respuesta disminuida de la población de una especie de animales o plantas a un plaguicida o agente de control como resultado de su aplicación.

La resistencia a insecticidas fue documentada por primera vez en 1914 por Melander, en el *Journal of Economic Entomology*. Posteriormente se identificaron los fenómenos de resistencia cruzada para referirse al mecanismo por el cual un gen simple confiere resistencia a un número de químicos con el mismo sitio de acción, y se introdujo el concepto de resistencia múltiple, cuando 2 mecanismos de resistencia o más están operando en el mismo insecto. Cuando 2 mecanismos de resistencia actúan sobre un mismo insecticida, el nivel de resistencia es a menudo mucho mayor que la adición simple de los niveles de resistencia conferidos por ambos mecanismos de forma independiente (Bissetl, 2002).

### 6.4.1 Factores operacionales en la resistencia

Los factores operacionales de la resistencia son aquellos relacionados con la aplicación de los insecticidas y están bajo control humano, como son aquellos que tienen que ver con el tiempo, la dosis y la formulación de los plaguicidas que se usan (Bissetl, 2002).

El clima, el momento y la cobertura de la aplicación de los insecticidas puede ser muy importante. Para que un equilibrio inestable exista tienen que haber muy pocos supervivientes homocigotos dominantes para resistencia (RR) después del tratamiento inicial. Esto ocurrirá si la frecuencia del alelo R es baja, y también cuando el tamaño total de la población sea pequeño. Es deseable tratar a la población antes de que la frecuencia de individuos RR sea muy alta. La dosis del insecticida es un factor determinante de la dominancia (Bissetl, 2002).

La selección del insecticida a usar es muy importante. En general, hay un cierto grado de resistencia cruzada con otros plaguicidas de la misma clase. Dependiendo del mecanismo de resistencia, también puede presentarse la resistencia cruzada entre plaguicidas de diferentes clases (Bissetl, 2002). Es notable la resistencia cruzada que hay entre el DDT y los piretroides por causa de la expresión del gen mutado de los canales de sodio conocido como *kdr*, y entre carbamatos y organofosforados porque comparten el mismo sitio de acción (acetilcolinesterasa) (Flores *et al.*, 2001).

### 6.4.2 Mecanismos de resistencia a insecticidas

Existen diversos factores que facilitan que los insectos pueden empezar a generar resistencia o protección contra los insecticidas; según autores como Miller (1988) se clasifican así:

- *Resistencia por comportamiento*: el insecto no entra en contacto con el depósito del insecticida, porque puede reconocer o detectar la toxina y evitarla.
- *Resistencia a la penetración*: la composición del exoesqueleto se modifica inhibiendo o disminuyendo la tasa de penetración del insecticida.
- *Modificación del sitio blanco*: ocurre una modificación genética del sitio de acción para el insecticida, reduciendo la sensibilidad a la forma activa del insecticida (sitio insensible).
- *Resistencia metabólica*: las vías metabólicas del insecto se modifican para detoxificar o destruir el insecticida más rápido que los insectos susceptibles.

Este constituye el mecanismo de resistencia más común y las formas más importantes de resistencia metabólica incluyen la sobreexpresión de enzimas como las oxidasas de función mixta, las glutatión-transferasas y las esterasas no específicas.

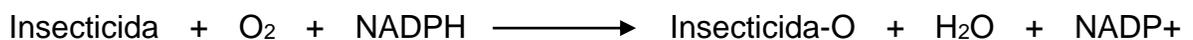
En los insectos, los mecanismos más relevantes y comunes de resistencia a insecticidas son la modificación del sitio blanco y la resistencia metabólica, por esto se va a profundizar en ellas en la parte bioquímica de la resistencia como parte importante para entender el proceso.

### 6.4.3 Bioquímica de la resistencia

#### 6.4.3.1 Metabolismo del insecticida

Es un proceso en el cual un estímulo químico promueve la actividad del sistema de detoxificación mediante la producción de enzimas adicionales (Terriere, 1984). Tres grupos de enzimas constituyen el principal sistema de detoxificación contra los cuatro grupos de insecticidas orgánicos: 1) oxidasas de función mixta involucradas en el metabolismo de insecticidas pertenecientes a todos los grupos, 2) las glutatión-transferasas, de importancia en el metabolismo de insecticidas organoclorados y organofosforados; y 3) las esterasas no específicas, las cuales degradan carbamatos, organofosforados y piretroides (Hemingway y Ranson, 2000).

Oxidasas de función mixta: se encuentran en la fracción microsomal de las células, su actividad no es específica y catalizan la siguiente reacción:



En las reacciones de la primera fase, catalizadas por estas oxidasas, aparecen las oxidaciones que requieren del oxígeno molecular y de la coenzima NADPH. Está comprobado que este sistema hidroxilante contiene, además del NADPH, una flavoproteína (NADPH-citocromo c reductasa), una ferroproteína y un citocromo especializado: el citocromo P-450 (Sotolongo y Vidal, 1988).

El citocromo P-450 está implicado como el factor principal en muchos casos de resistencia metabólica a carbamatos y también colabora en la detoxificación de insecticidas organofosforados, piretroides y DDT, entre otros (Hemingway y Ranson, 2000).

Glutatión-Transferasas (GSTs): Son enzimas multifuncionales y diméricas de gran importancia en la detoxificación metabólica de un amplio rango de xenobióticos y

son conocidas por estar involucradas en la resistencia de los insectos a los insecticidas organofosforados y a organoclorados como el DDT (Hemingway y Ranson, 2000). Han sido clasificadas dentro de 13 grupos diferentes con base en su secuencia de aminoácidos, propiedades inmunológicas y especificidad de sustrato (Fournier *et al.*, 1992).

Las GST proveen la forma más importante de resistencia metabólica al DDT a través de su dehidroclorinación al DDE (Lalah *et al.*, 1995). En *A. aegypti* se reconoce que mínimo 2 grupos de GSTs se sobreexpresan en mosquitos resistentes (Grant *et al.*, 1991) mientras que en *Anopheles gambiae* se reconoce que son varias las GSTs elevadas en mosquitos resistentes.

Esterasas: Este grupo de enzimas comprende 6 familias de proteínas que pertenecen a la superfamilia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas (Brogdon y Mcallister, 1998). Según Raymond. (1987), las esterasas se clasifican de acuerdo con su habilidad de hidrolizar sustratos de 2 tipos: las  $\alpha$ -esterasas hidrolizan preferentemente el 1-naftilacetato y las  $\beta$ -esterasas hidrolizan preferentemente el 2-naftilacetato.

#### **6.4.3.2 Sitio insensible**

Las alteraciones en los aminoácidos responsables del ligamiento de los insecticidas en el sitio de acción causan la disminución de la efectividad de los insecticidas o su completa ineffectividad (Brogdon y Mcallister, 1998). El primer caso de resistencia a través de este mecanismo se registro en la mosca doméstica resistente al DDT y se le denominó mecanismo de resistencia del *kdr* (resistencia por knockdown) y está asociada con un gen recesivo que también confiere resistencia a los piretroides. Ambos tipos de insecticidas actúan bloqueando la transmisión del impulso nervioso en los canales de sodio que son su sitio blanco primario (Brattsten *et al.*, 1986).

Un tipo de resistencia que involucra la inactivación del sitio blanco es la modificación de la acetilcolinesterasa (AChE), enzima que cataliza la hidrólisis del neurotransmisor excitatorio acetilcolina y es un componente clave en la sinapsis colinérgica del sistema nervioso central. En insectos, la AChE es la única colinesterasa y posee una especificidad de sustrato que es intermedia entre la AChE de los vertebrados y la butirilcolinesterasa. La AChE es el mayor blanco molecular de los insecticidas organofosforados y carbamatos (Anthony *et al.*, 1995)

## **6.4.4 Mecanismos para evaluar la resistencia**

### **6.4.4.1 Bioensayos**

Por décadas los métodos sencillos para la detección de resistencia han sido los bioensayos o pruebas de susceptibilidad de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1981). Su propósito es detectar la presencia de especímenes resistentes en una población de insectos tan pronto como sea posible; para ello la población es expuesta a un rango de concentraciones de un insecticida o a una serie de exposiciones a una concentración única de insecticida, lo que al graficarse, genera una línea recta entre el logaritmo de la concentración o del tiempo y las mortalidades encontradas; con los datos obtenidos se puede detectar la aparición de especímenes anormalmente tolerantes y observar los cambios en la frecuencia con la que aparecen en las poblaciones a través del tiempo (Cardona, 1985).

Para la realización de estas pruebas se debe calcular la dosis diagnóstica del insecticida, por lo que se establece la dosis letal 99 (DL99), definida como la dosis necesaria para que muera el 99% de la población susceptible. A partir de esta dosis, se obtiene la concentración diagnóstica para cada población en estudio que equivale al doble de la concentración a la cual muere el 99% de la población evaluada (Brooke *et al.*, 2001).

Los bioensayos son una herramienta útil para detectar la resistencia y para vigilar continuamente su progreso en una población; sin embargo, no permiten detectar los mecanismos responsables, ni la proporción de los fenotipos resistentes, cuando están en baja frecuencia. Como alternativa o complemento de este método surgieron las pruebas bioquímicas que permiten detectar los mecanismos que están ocasionando la resistencia.

Dentro de los bioensayos se cuenta con un nuevo método basado en botellas impregnadas, desarrollado en el CDC de Atlanta por el Dr. William Brogdon, que se basa en la determinación de la resistencia utilizando botellas de vidrio impregnadas con el insecticida. Los datos obtenidos necesitan ser comparados entre mosquitos susceptibles de cepas susceptibles de referencia y los mosquitos que están siendo evaluados. El límite de resistencia es determinado estableciendo el tiempo máximo y la dosis en la cual todos los mosquitos de la colonia susceptible mueren. Estas pruebas además permiten realizar cálculos como el del tiempo letal 50 (TL50) que equivale el tiempo que toma el 50% de los individuos en morir a la dosis expuesta.

#### 6.4.4.2 Pruebas bioquímicas

Los métodos bioquímicos pueden detectar mecanismos de resistencia en insectos individuales, y sirven para confirmar la resistencia utilizando un pequeño grupo de insectos (Brogdon, 1998). Los ensayos bioquímicos han sido desarrollados para todos los mecanismos de resistencia conocidos exceptuando los mecanismos de modificación de los canales sodio y los receptores de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Brogdon, 1989).

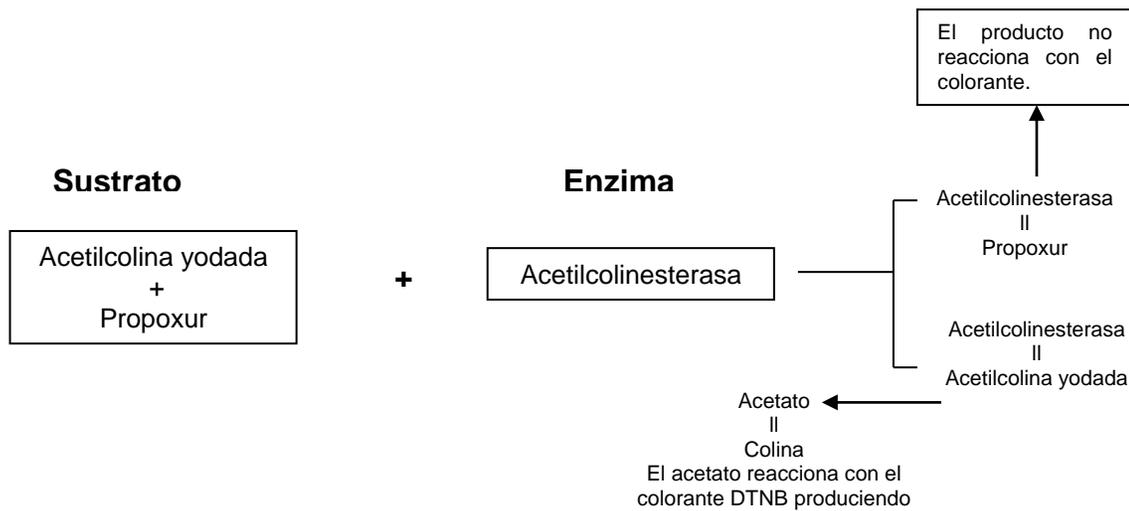
Las pruebas bioquímicas son ensayos colorimétricos que miden la actividad enzimática asociada con la manifestación o presencia de resistencia en insectos (Hemingway *et al.*, 1989). En estas pruebas es posible que al contacto con el homogenizado del mosquito a evaluar, se puedan identificar los mecanismos que están estableciendo la resistencia, ya que las enzimas actúan sobre sustratos específicos generando productos de estas reacciones químicas que se unen a un colorante específico, lo que provoca un cambio de color característico para cada enzima. Las variaciones colorimétricas se miden cualitativamente por observación o cuantitativamente en un espectrofotómetro (Brogdon, 1989).

Entre las pruebas bioquímicas más utilizadas para evaluar resistencia los mecanismos de resistencia encontramos:

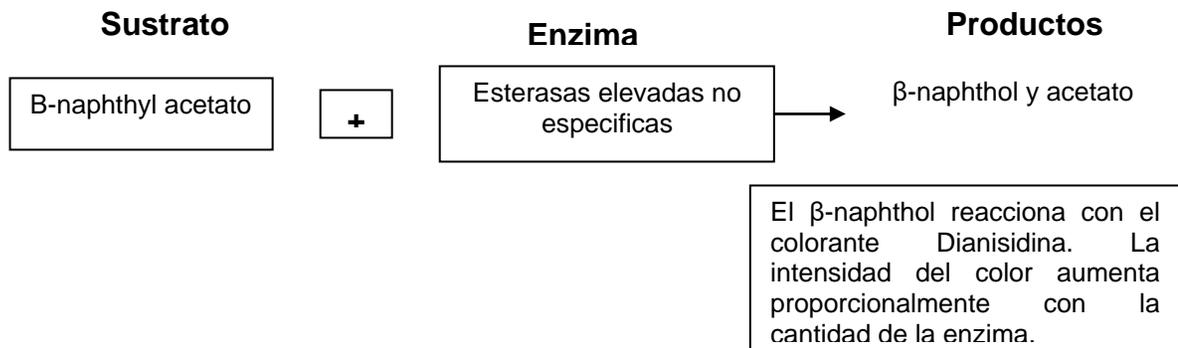
Prueba de la AChE insensible: Consiste en determinar si en la población evaluada existen insectos que hayan modificado su enzima acetilcolinesterasa y sean capaces de hidrolizar la acetilcolina en presencia de un bloqueador como un organofosforado o carbamato. En esta prueba la actividad de la enzima es medida por el incremento en la intensidad del color amarillo, cuantificada por la determinación de la absorbancia (Ferrari, 1996).

En esta prueba se inhibe la acetilcolinesterasa de los insectos, mediante la adición de propoxur (carbamato) en la placa junto con el sustrato de la enzima. Cuando la prueba es realizada en mosquitos susceptibles se produce una inhibición de la hidrólisis de acetilcolina gracias a que la AChE del mosquito se une al propoxur.

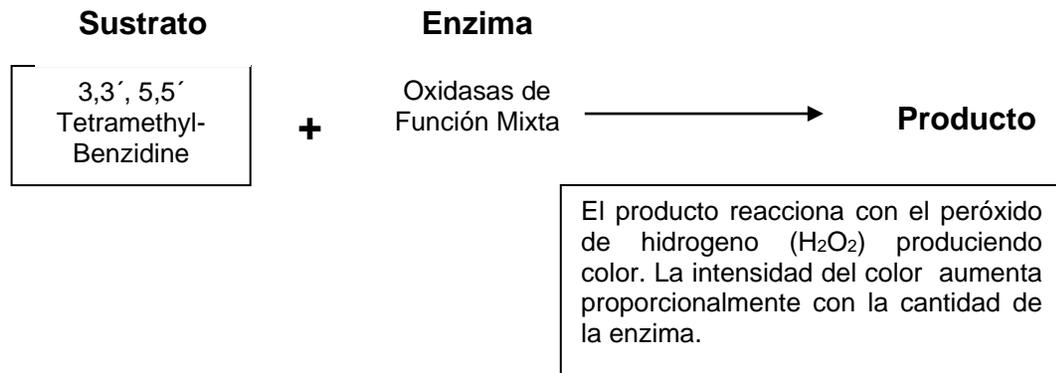
Por el contrario, cuando los ensayos son realizados en mosquitos resistentes, la acetilcolina es hidrolizada por la AChE insensible; el producto de la reacción es la tiocolina que reacciona con un colorante y genera una coloración amarilla. Esta prueba se basa en el principio de que las absorbancias varían directamente con la actividad de la acetilcolinesterasa insensible del mosquito (Brogdon, 1988). Las reacciones que pueden ocurrir se presentan en el siguiente esquema:



Prueba de esterasas no específicas elevadas: El color de la prueba se relaciona con los niveles de esterasas no específicas en el mosquito analizado. El sustrato de la enzima, ya sea 1- o 2-naftil acetato, es adicionado al homogenizado del mosquito, y es hidrolizado por las esterasas no específicas del mismo y convertido a naftol y ácido acético. En este caso la cantidad de naftol es directamente proporcional a la cantidad de esterasas en el mosquito. La prueba es cuantificada por adición en el final del periodo de incubación del colorante o-dianisidine que se une con el naftol. Los mosquitos que posean esterasas no específicas elevadas mostrarán un color púrpura (Brogdon, 1989). La reacción que ocurre es la siguiente:



Oxidasa de función mixta: Esta prueba es una forma indirecta de medir el nivel de enzimas que contienen grupos hemo en insectos individuales, lo cual puede hacerse correlacionándolos con la actividad de la peroxidasa del grupo. Esta prueba utiliza el TMBZ como sustrato y el peróxido de hidrógeno al 3% como catalizador (Brogdon, 1989). La reacción que ocurre es la siguiente:



## 6.5 TABLAS DE VIDA

Las tablas de vida representan una manera sintética de plasmar en forma cuantitativa las principales características de mortalidad y fecundidad de una población determinada (Rabinovich, 1978). En consecuencia, son un punto de partida para evaluar parámetros poblacionales como: longevidad, fecundidad y proporción sexual, que son útiles para tipificar y caracterizar una población.

Las tablas de vida por su construcción corresponden a dos tipos:

- **Tabla de vida horizontal o específica por edades:** Se basa en los sucesos que le ocurren a un número de individuos que hayan nacido al mismo tiempo ó cohorte real y se lleva un registro de ellos desde el nacimiento hasta su muerte (p.e: poblaciones de insectos con generaciones discontinuas). En este tipo de tablas de vida, se sigue a lo largo del tiempo el destino de los individuos, a medida que van siendo afectados por las diversas causas de mortalidad y finalmente se obtiene un registro directo del número de muertos que permite elaborar una tabla de vida específica por edades.
- **Tabla de vida Vertical o Temporal:** Está basada en una cohorte imaginaria obtenida a partir de la estructura de edades en un momento dado a base de una estimación muestral y con una superposición de generaciones. En este método los individuos han nacido a diferentes tiempos donde es un requisito reconocer e identificar las edades de los individuos de la población.

En esta clase de tablas de vida, se producen tablas de vida estáticas ya que es una “foto instantánea” de supervivencia dentro de la población durante un corto plazo. Además, requiere que la población no esté ni creciendo ni declinando y que no presente inmigración ni emigración (población estable). Una manera de

registrar la edad de muerte de un gran número de individuos, puede ser por captura y marcado o recobrando las marcas después de muerto.

### 6.5.1 Construcción de una tabla de vida.

La elaboración de una tabla de vida de un tipo u otro dependerá de la accesibilidad y facilidad que se tenga para obtener la información fundamental de mortalidad. La tabla de vida consta de una serie de columnas que se definen de la siguiente manera (Tabla 1):

**Tabla 1.** Parámetros para elaborar una tabla de vida horizontal o vertical.

Símbolo	Definición	Cálculo
<b>X</b>	Edad	
<b>N<sub>x</sub></b>	Numero de individuos a la edad x	
<b>No</b>	Numero de individuos total	
<b>L<sub>x</sub></b>	Proporción de sobrevivientes a la edad x.	$N_x / N_0$
<b>D<sub>x</sub></b>	Número de individuos que mueren entre las edades x-1 y x.	$N_{(x-1)} - N_x$
<b>Q<sub>x</sub></b>	Es la probabilidad de morir entre las edades x-1 y x.	$d_x / N_{(x-1)}$
<b>L<sub>x</sub></b>	Media de la probabilidad de supervivencia entre dos edades sucesivas.	$(l_x + l_{x+1}) / 2$
<b>T<sub>x</sub></b>	Número de días que quedan de vida a los sobrevivientes que han alcanzado la edad x, donde m es la edad máxima alcanzable.	$\sum_{m-x}^x L_x$
<b>E<sub>x</sub></b>	Expectativa de vida, indica cuánto vivirá en promedio, un individuo de la edad x.	$T_x / L_x$

Los parámetros determinados para la construcción de tablas de vida, permiten observar el comportamiento de una población y así construir patrones de supervivencia ( $l_x$ ), los cuales pueden ser graficados como curvas para facilitar su análisis.

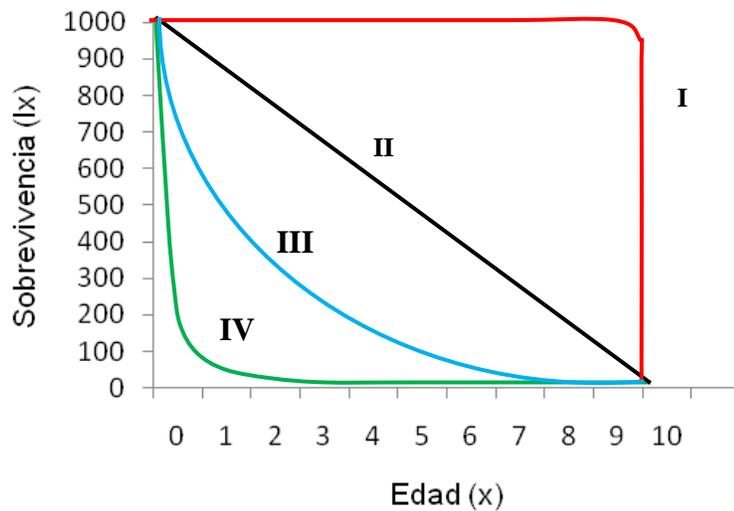
### 6.5.2 Curvas de supervivencia

El parámetro de supervivencia, se conoce como la probabilidad de supervivencia, dado que representa la proporción de individuos vivos a una cierta edad, en relación con el número inicial. Una curva de supervivencia resume los patrones de supervivencia de una población en función del tiempo. Los patrones de estas curvas, varían de una especie a otra dependiendo del

ambiente y de las circunstancias e incluso pueden variar dentro de una misma especie.

Según Deevey (1947) existen cuatro tipos de curvas de sobrevivencia (Figura 6).

**Figura 6.** Principales tipos de curvas de sobrevivencia .



(Rabinovich, 1972)

La *curva tipo I* corresponde a poblaciones cuya probabilidad de sobrevivir durante todas las etapas de la vida hasta prácticamente el final es constante e igual a 1, ocurriendo una muerte masiva hacia las edades finales o máximas de los individuos, es decir refleja una mortalidad concentrada en los individuos viejos.

La *curva de tipo II* representa una población en la cual hay un número constante de animales que muere por unidad de tiempo, independientemente del número de animales que han sobrevivido, es decir, al ser la curva una recta, significa que al aumentar la edad en una unidad el número de animales que mueren es el mismo para un incremento en edades jóvenes y para un incremento en edades avanzadas.

La *curva de tipo III* representa una población en la cual hay una fracción constante de animales vivos que mueren en cada uno de los intervalos de edad, es decir, el número de individuos que muere a medida que la población envejece es menor, dado que el número de sobrevivientes va disminuyendo con la edad.

En la *curva tipo IV* la mortalidad afecta fundamentalmente a los individuos jóvenes, cuando se han superado las etapas juveniles la mortalidad se reduce en grado considerable produciendo una supervivencia casi constante.

Las curvas de supervivencia son idealizadas y no se puede decir que ninguna de esas curvas es una curva típica o representativa de una población animal real, evaluada en las condiciones de campo normales, las cuales originan una serie de causas de mortalidad en individuos en la población. En general, dado que a medida que los individuos envejecen, se hacen susceptibles a diferentes causas de mortalidad, lo que se obtiene es una curva de supervivencia que representa una mezcla de algunos de los cuatro tipos de curvas.

## 7 ANTECEDENTES

*Aedes aegypti* desempeña una importante función en la transmisión de agentes virales causantes de enfermedades como el dengue y la fiebre amarilla, las cuales causan grandes impactos en salud pública (Hemingway y Ranson, 2000). Desafortunadamente una de las dificultades más frecuentes en el manejo y control de las poblaciones de este y otros vectores es la aparición de organismos resistentes a la acción de los insecticidas. Por ejemplo, el amplio uso del DDT (Diclorodifeniltricloroetano) en los años 40, resultó en un rápido desarrollo de resistencia hacia este insecticida en vectores como *A. aegypti*, *A. tritaeniorhynchus* y *A. sollicitans* (Brown, 1986).

Debido a la importancia que tienen los mosquitos vectores como *A. aegypti* en la salud pública, varios autores se han interesado por conocer los niveles y mecanismos de resistencia a insecticidas de estos mosquitos en diferentes países.

En 1960 se evidenciaron los primeros casos de resistencia a insecticidas organofosforados y carbamatos en *A. aegypti*. Fox y García (1961), reportaron una cepa en Puerto Rico resistente a malatión y diazinón. La capacidad de resistir al malatión se asoció con la destoxicación mediada por carboxilesterasas específicas.

De igual manera, durante los últimos años se ha reportado la resistencia a organofosforados por parte de otros mosquitos vectores. Rodríguez (2000), registro bajos niveles de resistencia a malatión en poblaciones de *A. aegypti* provenientes de Venezuela, Cuba y Brasil, en comparación con poblaciones de *Culex quinquefasciatus* de las mismas localidades. Los resultados de este trabajo, sugirieron que los altos niveles de resistencia presentados por *Culex* se asocian a un aumento en la expresión de las esterasas no específicas como principal mecanismo de detoxificación enzimática para este organofosforado. Así mismo, estudios realizados en el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri de Cuba, evidenciaron niveles moderados de resistencia a insecticidas organofosforados en poblaciones de *A. aegypti* por el mismo mecanismo enzimático. Estos estudios sugirieron que las glutatión-transferasas y la mutación *kdr* de los canales de sodio neuronales insensibles podrían ser otros mecanismos de acción que intervienen en la aparición de resistencia a metilpirimifos y cipermetrina respectivamente (Rodríguez, 2004).

Karunaratne y Hemingway (2001), determinaron los niveles de resistencia al malatión y la prevalencia del mecanismo de actividad carboxilesterasa sobre este producto entre diferentes géneros de mosquitos en Sri Lanka, empleando métodos

recomendados por la OMS. Los bioensayos se llevaron a cabo en muestras de mosquitos vectores como: *Culex quinquefasciatus*, *Culex tritaeniorhynchus*, *C. gélidas*, *Anopheles culicifacies*, *An. subpictus*; *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Mediante este estudio, se detectaron mecanismos de actividad carboxilesterasa específicos para el malatión en *An. culicifacies* y *An. subpictus*, dato indicativo de una alta tasa de metabolización del insecticida. Por el contrario, la resistencia de *C. quinquefasciatus* y *C. tritaeniorhynchus* al malatión está mediada por una resistencia de amplio espectro a los compuestos organofosforados, debida a unos niveles elevados de esterases no específicas que secuestran el malatión pero son incapaces de metabolizar el malatión. Las especies *C. gelidus*, *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* fueron susceptibles a malatión, probablemente debido a los bajos niveles de exposición a componentes organofosforados en comparación con mosquitos de otras poblaciones (Karunaratne y Hemingway, 2001).

Es importante considerar que estudios en poblaciones de *A. aegypti* realizados en diferentes países, han mostrado que este mosquito ha desarrollado resistencia frente a otros grupos de insecticidas. Esto dificulta aún más llevar a cabo programas de control vectorial y por tanto incrementa el riesgo de transmisión del dengue (Hemingway y Ranson, 2000).

En el caso de los piretroides se ha demostrado resistencia de *A. aegypti* en países como Cuba desde 1947 (Brown, 1986). De igual forma se ha identificado la resistencia a DDT en las poblaciones de *A. aegypti* de este país que puede estar asociada a niveles moderados de resistencia del vector a los piretroides (Brown, 1986).

Otros estudios, han encontrado casos de resistencia a piretroides en *A. aegypti* en Puerto Rico, causados por la mutación *kdr* que produce insensibilidad de los canales de sodio al insecticida y no por mecanismos metabólicos (Hemingway, 1989). En este mismo estudio, se midieron los cambios enzimáticos que se producen en el mosquito en asociación con la resistencia a insecticidas mediante pruebas bioquímicas. Los resultados reportaron resistencia frente a DDT y malatión en cepas de Trinidad y Virtudes en Puerto Rico y sugirieron las glutatión-transferasas como las causantes de la resistencia frente al DDT (Hemingway *et al.*, 1989).

En Colombia, *A. aegypti* es un importante vector del virus dengue. En este vector se han iniciado estudios de resistencia a insecticidas con el fin de implementar estrategias de control vectorial de mayor eficacia. Ocampo y Weson (2004), evidenciaron un aumento en las oxidasas de función mixta y las esterases no específicas como los mecanismos enzimáticos que podrían estar causando resistencia al organofosforado temefos en la ciudad de Cali, fenómeno que fue registrado por Suárez (1990) al mismo tiempo que se realizaba el estudio

bioquímico. Según Ocampo y Wesson (2004), las dinámicas poblacionales, niveles de enzimas asociadas a resistencia y la competencia vectorial, varían independientemente en los diferentes sitios y tiempos evaluados en la ciudad (Ocampo y Wesson, 2004).

Uno de los mecanismos empleados en los estudios de resistencia a insecticidas son los procesos de presión selectiva sobre poblaciones de mosquitos vectores en condiciones de laboratorio. La selección de cepas resistentes ha permitido evaluar factores como los mecanismos enzimáticos de resistencia y la influencia de este fenómeno en la biología de los mosquitos. Además, constituyen un excelente modelo para estudiar la resistencia a insecticidas en diferentes poblaciones (Chareonviriyaphap *et al.*, 2002). Sin embargo, pocos son los casos exitosos reportados de selección de cepas resistentes de *A. aegypti* para ser empleadas como referencia a nivel local (Rodríguez *et al.*, 2000).

Se conoce que estos procesos de selección afectan algunos aspectos demográficos de los mosquitos. Suárez (1998), registra una influencia negativa e inversamente proporcional en la reproducción y el crecimiento poblacional en una cepa de *C. quinquefasciatus* por parte de la presión selectiva con cipermetrina hasta su cuarta generación, mientras que aspectos como la supervivencia y longevidad de adultos se vieron favorecidos durante este proceso (Suárez, 1998).

Rodríguez *et al.*, (1998), registró la obtención de una cepa de referencia de *C. quinquefasciatus* resistente a lambdacialotrina, con el fin de evaluar la utilidad de este insecticida en el control de mosquitos en Cuba. Así mismo, se obtuvo una alta tasa de resistencia a lambdacialotrina con baja resistencia cruzada a organofosforados (malatión) después de una presión de selección durante 6 generaciones (Rodríguez *et al.*, 1998).

De igual manera, Chareonviriyaphap *et al.*, (2002) reportó la presión de selección durante 19 generaciones con deltametrina a una cepa de *An. minimus* en Tailandia. La selección de resistencia se realizó por exposición al insecticida usando el protocolo de la OMS. En cada generación se evaluó el LT50 (tiempo letal 50), observando un incremento de este en la generación 19 comparado con el LT 50 de la generación 1 (Chareonviriyaphap *et al.*, 2002).

En el trabajo realizado por Wirth y Georghiou (1999), se logró la selección de una cepa de *A. aegypti* resistente a temefos, que presentó resistencia cruzada con el piretroide permetrina.

El CIDEIM en conjunto con el Instituto Nacional de Salud (INS), el PECET de la Universidad de Antioquia y doce secretarías departamentales de salud, lideró un proyecto cuyo objetivo era evaluar el estado actual de resistencia de los vectores

de malaria, dengue y fiebre amarilla a los insecticidas más utilizados en el país para el control vectorial, a través de la realización de bioensayos de la OMS (larvas y adultos) y del CDC. En los sitios en los que se encontró indicios de resistencia se evaluaron los mecanismos enzimáticos responsables de generarla. Como resultados del trabajo, se registró total resistencia al DDT en todas las poblaciones de *A. aegypti* evaluadas. Adicionalmente, se realizaron las líneas base para la evaluación de la resistencia en el país y se inició una red de vigilancia y monitoreo de resistencia en Colombia.

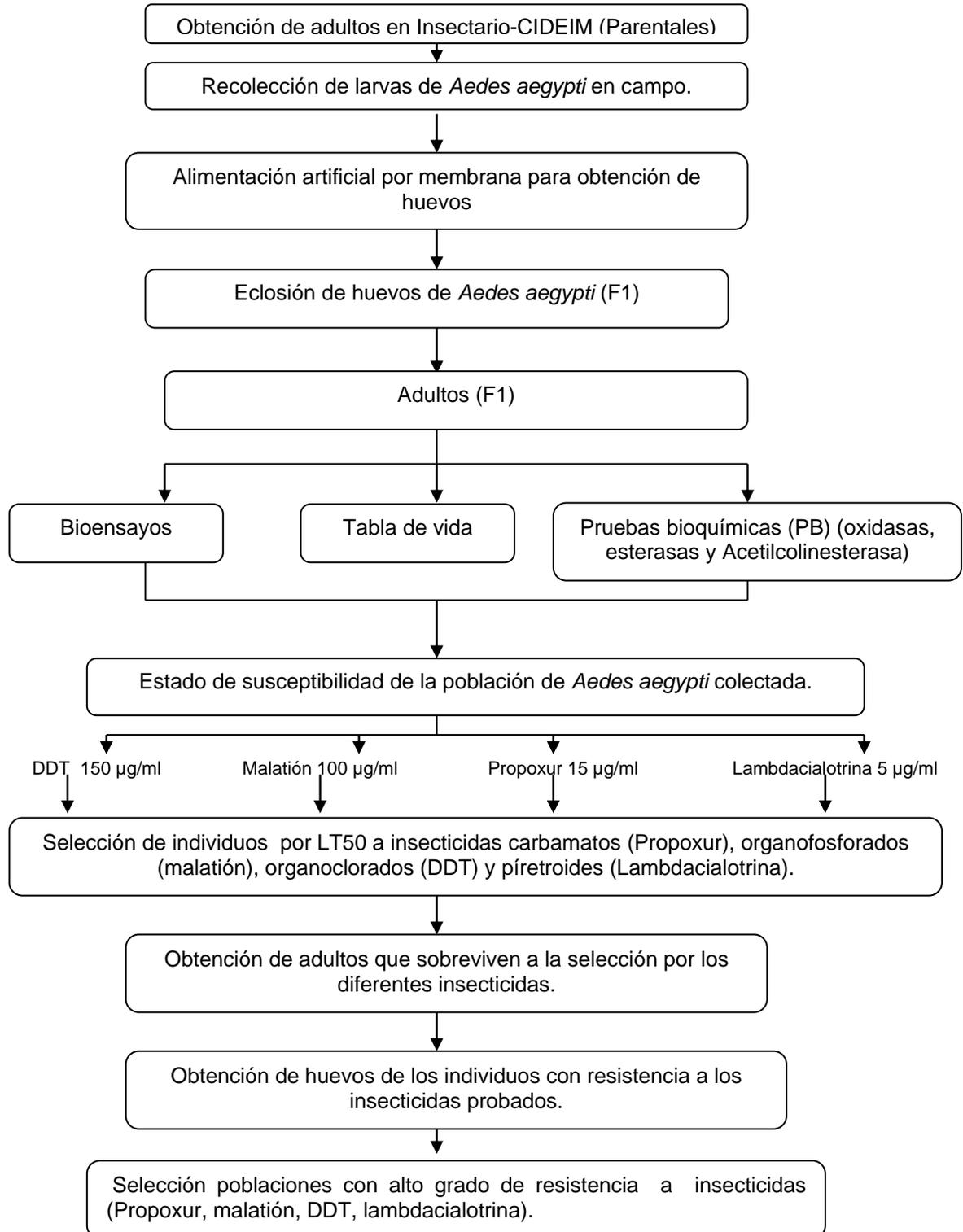
Teniendo en cuenta los reportes de resistencia hallados para *A. aegypti* a diferentes clases de insecticidas en varias regiones de Colombia (Ocampo y Wesson, 2001) y la necesidad de conocimiento sobre los mecanismos enzimáticos que intervienen en el fenómeno, se considero importante evaluar el efecto de la presión selectiva por diversos insecticidas sobre una cepa de *A. aegypti* en condiciones de laboratorio, para determinar los cambios que se generaban en los mecanismos enzimáticos relacionados con resistencia y en la biología del vector; con el fin de poder utilizar este conocimiento en el momento de evaluar estrategias de control vectorial. A través del proceso de selección se obtuvieron cepas resistentes, que a futuro, pueden servir como referencia en estudios de resistencia a insecticidas a nivel local.

## 8 HIPÓTESIS

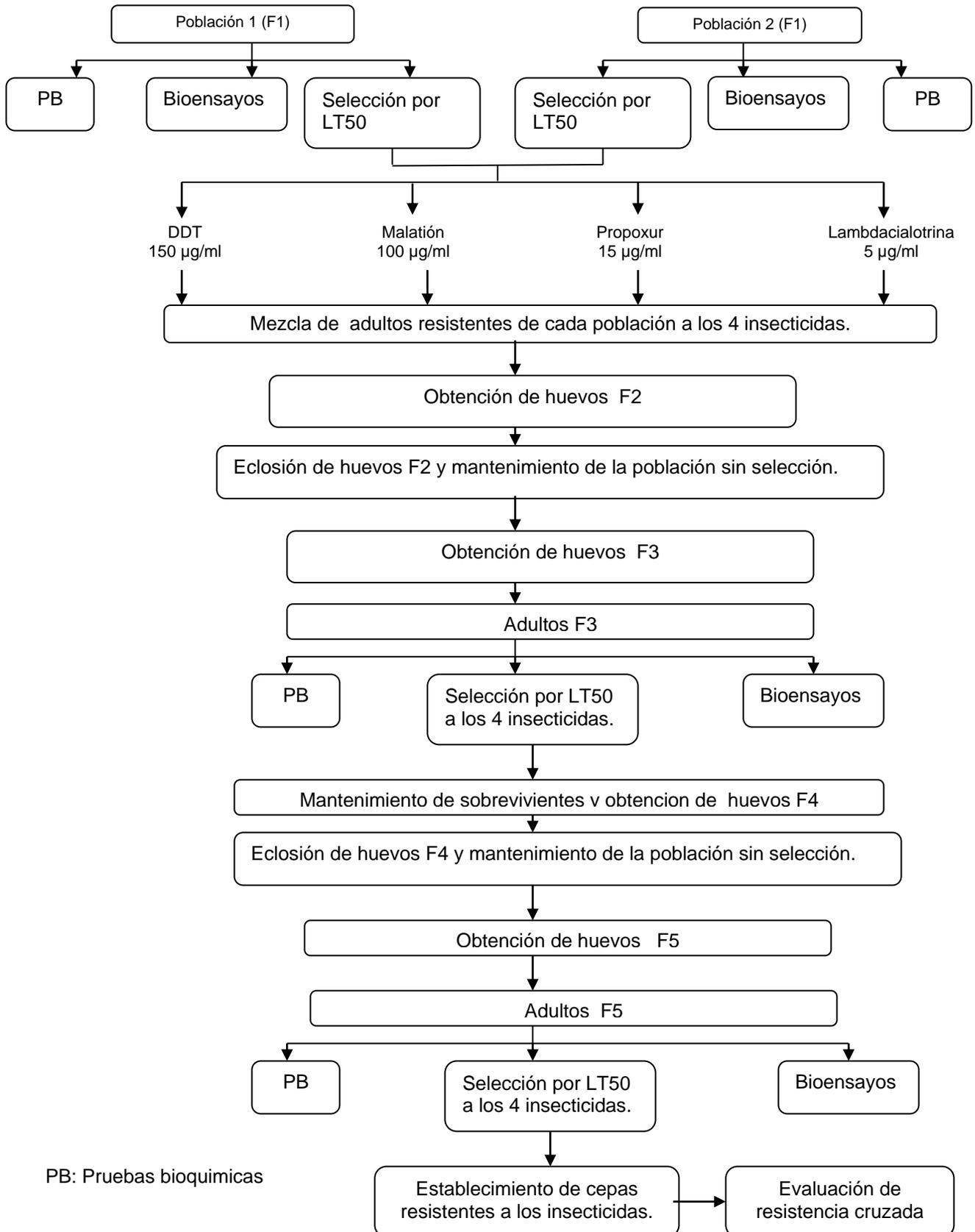
- La presión selectiva por diferentes tipos de insecticidas a individuos de una población de *Aedes aegypti* con historia de resistencia a insecticidas, evidenciaran los cambios en los mecanismos enzimáticos que intervienen en la resistencia a cada uno de los compuestos.
- La presión selectiva en la cepa de *Aedes aegypti* influirá en algunas de sus variables biológicas como viabilidad de huevos, tasa de reproducción, longevidad y supervivencia.

## 9 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### PROCEDIMIENTO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE CEPAS EN LABORATORIO



## ESQUEMA DE SELECCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE POBLACIONES SOMETIDAS A PRESIÓN POR INSECTICIDAS.



## 10 METODOLOGÍA

### 10.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

La población de *A. aegypti* utilizada para este trabajo estuvo conformada por ejemplares colectados en dos lugares diferentes. A estos individuos parentales se les alimento artificialmente para la obtención de huevos de filial 1.

Con los adultos de la filial se procedió a la realización de pruebas bioquímicas y bioensayos a los diferentes insecticidas con las dosis y los tiempos diagnósticos establecidas en el proyecto de evaluación de resistencia a insecticidas liderado por el CIDEIM, el INS y el PECET (DDT 150 µg/ml, lambdacialotrina 5 µg/ml, malatión 100 µg/ml, propoxur: 15 µg/ml). Con estos ensayos se determinaron los niveles iniciales de resistencia de las poblaciones. De igual manera se realizó el registro del tiempo letal 50 (LT 50) que equivale al tiempo en el que muere el 50% de la población expuesta a la prueba y además del tiempo en el que se alcanzo una tasa de mortalidad del 100% para cada población evaluada con cada insecticida.

Con estos datos, se realizó la selección a los diferentes insecticidas, utilizando el LT50 como punto de corte; es decir, los insectos que sobrevivieron a la exposición al insecticida a la dosis diagnóstica a partir del LT50, fueron considerados resistentes y se mantuvieron en colonia para obtener la siguiente generación filial. Este proceso se repitió de manera alterna, ya que después de una generación sometida a selección, sus descendientes no se expusieron al insecticida, reanudándose el proceso de selección en la siguiente generación. Este procedimiento se repitió sucesivamente durante 3 generaciones.

Durante las filiales presionadas con insecticidas la población fue evaluada por pruebas bioquímicas para contrastar los niveles y actividades de las diferentes enzimas de los mosquitos resistentes según el tipo de insecticida. Durante el proceso de selección se realizo una introducción de mosquitos provenientes de las mismas localidades, sometidos a los mismos procesos de selección con el fin de evitar la pérdida de viabilidad de los individuos por causa de la consanguinidad. Para realizar el anterior proceso y alcanzar los objetivos propuestos se realizaron los siguientes pasos:

## 10.2 SALIDA DE CAMPO

Se realizó una salida de campo para obtener *A. aegypti* parentales y posteriormente su descendencia en el laboratorio, a estos mosquitos se les elaboró una tabla de vida, que permitió estimar los datos requeridos para cumplir el objetivo de evaluar el efecto de la selección en algunas variables biológicas.

En este proyecto, se estableció una población mixta conformada por ejemplares colectados en diferentes localidades de la Ciudad de Cali escogidos de forma aleatoria y ejemplares de Campo Alegre (Huila), eclosionados en una sola bandeja. A esta población, se le aplicó el mismo procedimiento mencionado a continuación para la obtención de adultos y se seleccionaron aleatoriamente una cohorte de 63 individuos para hacer el registro de los datos de la tabla de vida de esta población parental.

Una vez obtenida la F1 se realizaron los procedimientos correspondientes para conseguir los datos de resistencia frente a los insecticidas de interés y se ejecutaron las pruebas bioquímicas para evaluar el nivel de actividad de las enzimas relacionadas con resistencia a insecticidas de la población.

La muestra a la cual se le realizó la tabla de vida, permitió establecer las posibles diferencias a nivel enzimático y biológico que se pudieron generar por causa de la consanguinidad y la presión de selección.

## 10.3 OBTENCIÓN DE ADULTOS DE *Aedes aegypti*

Para la obtención de adultos, inicialmente fueron utilizados los huevos obtenidos de hembras colectadas en campo y seleccionadas con los insecticidas a probar.

- a) Los huevos fueron colocados en bandejas de 34cm x 23cm con 2 litros de agua declorada, marcadas con la información correspondiente a la procedencia de los huevos, especie, y a la fecha en que fueron depositados en el agua (Figura 7).
- b) Las larvas se alimentaron diariamente con solución de hígado de res; durante este tiempo se efectuaron los cambios de agua pertinentes de acuerdo con la turbidez de la misma para evitar la mortalidad de los insectos.

- c) Las pupas se trasladaron a vasos desechables con agua de clorada y se colocaron dentro de jaulas plásticas que poseían malla y manga para permitir la emergencia de los adultos y facilitar su seguimiento.
- d) Sobre la malla de cada jaula se colocaron dos algodones humedecidos (uno con agua de clorada y otro con solución de sacarosa) para la alimentación de los mosquitos adultos. Las jaulas fueron marcadas con la información registrada en las bandejas además de la fecha correspondiente al día en que las pupas fueron separadas (Figura 8). Las colonias se mantuvieron en condiciones óptimas de laboratorio; (temperatura entre 23 y 28°C y una humedad relativa del 70%).

Durante el transcurso del proyecto se hizo necesario implementar mecanismos para evitar que factores como la consanguinidad interfirieran con la viabilidad de los individuos e impidieran que la presión selectiva se llevara a cabo; para esto, se obtuvieron ejemplares de otra localidad y se seleccionaron con el fin de refrescar la colonia y evitar que se perdiera la heterogeneidad dentro de la misma. Estos nuevos ejemplares de campo se llevaron al insectario de la Unidad de Entomología del CIDEIM para obtener adultos en las condiciones anteriormente mencionadas.

**Figura 7.** Bandejas para eclosión.



(CIDEIM, 2005)

**Figura 8.** Esquema de registro en jaulas.

**Población. *Aedes aegypti*. Filial**  
 Fecha:  
 Recolección de huevos:  
 Eclosión de huevos:  
 Obtención de pupas:  
 Número de pupas:

## 10.4 IMPREGNACIÓN DE BOTELLAS

Para la realización de los bioensayos necesarios en el proceso de selección por insecticidas se utilizó el método de botellas impregnadas del CDC. Este método corresponde a la metodología desarrollada por el Dr. William Brogdon (1989). Se utilizaron botellas de vidrio de 250 ml que se impregnaron por medio de pipetas de 1ml. Todo este proceso se llevo a cabo en cámara de extracción.

La impregnación de botellas con insecticidas fue un paso previo a la realización del procedimiento descrito en el numeral 10.3.1.

Se debía empezar por:

- Comprobar que las botellas estuvieran limpias, sin signos de grasa o restos de jabón en su interior.
- Marcar cada una de las botellas y su respectiva tapa, con el nombre y la concentración del insecticida que va a ser utilizado.
- Antes de utilizar el insecticida se agitaba muy bien, para asegurarse de que se disolviera bien antes de utilizarlo. Este paso era muy importante para el éxito de la prueba. La mezcla debía estar a temperatura ambiente.

El procedimiento de impregnación fue el mismo para el control y los tratamientos, excepto que para el control, solo se utilizó alcohol absoluto.

- ✓ Se tomo un mililitro (1ml) de la mezcla de insecticida y se agregó a la botella, asegurando que la parte superior (la que queda cubierta por la tapa), fuera humedecida. El insecticida debía escurrir por las paredes internas de la botella.
- ✓ Luego se tapo muy bien la botella y se giro durante uno o dos minutos, comprobando que el insecticida cubriera toda la superficie interna de la botella.
- ✓ La botella se invirtió (apoyada sobre la tapa) y se dejó en esta posición durante 1 minuto (de esta forma se aseguro que el insecticida entrara en contacto con el interior de la tapa).
- ✓ Se giró y esparció la mezcla nuevamente por las paredes de la botella durante otros 3 minutos.
- ✓ Posteriormente se destapó la botella y se colocó boca abajo sobre una superficie limpia para dejar que el alcohol de la mezcla del insecticida se evaporará. Se tuvo cuidado de no mezclar las tapas de las botellas.
- ✓ Las botellas se dejaron destapadas y protegidas de la luz, hasta que estuvieran completamente secas (2-3 horas), o hasta que no se

observaran rastros de humedad. Las botellas podían permanecer abiertas durante toda la noche.

#### **10.4.1 Bioensayo con botellas CDC**

Estas pruebas son un método simplificado para detectar la presencia de especímenes resistentes en una población de insectos a través de la exposición de los insectos a determinadas concentraciones de insecticidas, en botellas de vidrio. De esta manera, aproximadamente veinte mosquitos adultos de 3-6 días de edad alimentados con agua azucarada únicamente, se colocaron en cada botella impregnada, con el fin de realizar un proceso de selección de los mosquitos resistentes de acuerdo a la dosis y tiempo diagnóstico establecido previamente en el CIDEIM.

DDT: 150 µg/ml en 30 minutos.

LAMBDAALOTRINA: 5 µg/ml en 20 minutos.

MALATION: 100 µg/ml en 30 minutos.

PROPOXUR: 15 µg/ml en 15 minutos.

El procedimiento se llevo a cabo de la siguiente manera:

1. Con un aspirador bucal, se capturaron entre 20 y 30 mosquitos y se depositaron suavemente en la botella (primero en la botella control, y sin contabilizar el tiempo todavía). Se observó si alguno moría durante el traspaso, para descontar este número del total.
2. El mismo procedimiento fue realizado con las botellas impregnadas con insecticida, lo más rápidamente posible. El tiempo era contabilizado desde el momento en que se agregaran los mosquitos a la primera botella con insecticida. Si se requería probar varios insecticidas, era mejor hacerlo en varias rondas, para evitar la superposición en la medición de los tiempos de mortalidad.
3. Se contabilizó y anoto el número de mosquitos intoxicados (vuelo errático) y muertos por botella, cada cinco minutos, hasta completar 60 minutos. Teniendo en cuenta que el tiempo para las últimas botellas corría en relación con el tiempo medido para la primera.
4. El número total de mosquitos por botella era anotado, especificando el número de hembras muertas y de hembras vivas, si las hubiese (ver anexo 1).

A medida que transcurrió el proceso de selección se registró el LT50 que correspondía al tiempo en el que moría el 50% de los mosquitos, con el fin de visualizar el progreso (aumento o disminución) de la resistencia en la cepa (Anexo 1). Los tiempos de mortalidad obtenidos fueron comparados con los de la cepa Rockefeller susceptible de referencia procedente del CDC.

Los adultos sobrevivientes a estas pruebas fueron liberados dentro de una jaula por cada insecticida, la cual era debidamente marcada con el nombre del insecticida al cual fueron sometidos.

Luego del ensayo, las botellas impregnadas podían reutilizarse un número máximo de 3 veces, siempre y cuando se guardaran protegidas de la luz. Las botellas y tapas eran utilizadas nuevamente después de lavarlas cuidadosamente en la forma que se describe a continuación: las botellas eran lavadas con 1 ml de etanol comercial y luego tres veces con agua y jabón, utilizando un cepillo o churrusco para eliminar bien los residuos de insecticida. Al final de cada uno de los lavados, se enjuagaba muy bien con agua.

Posteriormente, las botellas se colocaban invertidas sobre una toalla absorbente hasta que estuvieran bien secas y no se observara residuo alguno en las paredes (observando al trasluz). Para comprobar si quedaban bien lavadas, se introducían mosquitos susceptibles, los cuales debían permanecer volando sin ningún problema durante un mínimo de 60 minutos.

## **10.5 ALIMENTACIÓN DE HEMBRAS DE *Aedes aegypti* Y OBTENCIÓN DE HUEVOS**

Las hembras de *A. aegypti*, obtenidas de la colección de larvas en la salida de campo, se alimentaron artificialmente con sangre, con el fin de recolectar y almacenar los huevos que serían utilizados para la obtención de nuevas generaciones de mosquitos. Gracias a que los huevos de *A. aegypti* presentan diapausa y tolerancia a la deshidratación fue posible almacenar los huevos de esta especie durante algún tiempo.

Con la alimentación artificial por membrana se buscaba simular las características de una alimentación normal de un mosquito sobre un hospedero vertebrado. Este proceso se realizó por un periodo de 1 a 2 horas, para lo cual se requería de la utilización de una membrana obtenida a partir del intestino del cerdo, así como de

bandas elásticas para ajustar la membrana sobre los alimentadores que están hechos en vidrio. Este proceso se efectuó de la siguiente forma:

- 1.** El intestino de cerdo se preservó en sal a una temperatura de 4°C. Se cortaba un trozo de intestino suficientemente grande para cubrir la abertura principal de los alimentadores de vidrio.
- 2.** El trozo de intestino era lavado en una bandeja con agua ultrapura varias veces hasta que quedara libre de sales.
- 3.** Con tijeras de disección fue abierto el intestino. Dependiendo del tamaño del alimentador se cortaba una porción de 20 a 30cm, este proceso era realizado con cuidado para no romper el intestino.
- 4.** La abertura principal del alimentador era cubierta, es decir, por el extremo donde los insectos tomarán la sangre, con el trozo de intestino. Se amarraba la membrana con las bandas de caucho verificando que hubiera quedado bien asegurado (Figura 9).
- 5.** Los alimentadores se montaban con las mangueras, las cuales estaban unidas a la bomba de vacío. Dos mangueras debían quedar dentro del baño maria, una para succionar el agua y la otra para devolver el agua. Las mangueras se debían asegurar muy bien para evitar que se soltaran y derramaran el agua dentro de la jaula (Figura 10).
- 6.** La sangre desfibrinada era colocada (la cual debía estar a temperatura ambiente) en los alimentadores de vidrio con una pipeta Pasteur de vidrio. La sangre se debía manipular con guantes y utilizando el succionador para tomar este líquido en la pipeta Pasteur.
- 7.** La bomba de vacío era encendida a una temperatura de 37°C para hacer recircular el agua del baño Maria.
- 8.** Las hembras de *A. aegypti* se alimentaban por un periodo de 1-2 horas. Durante este tiempo la membrana era humedecida cada 10 minutos para evitar que se endureciera.
- 9.** Después de dos días de haberse alimentado las hembras, se debía colocar un vaso con papel filtro humedecido con un poco de agua deionada, para la postura de huevos dentro de la jaula.

**Figura 9.** Alimentadores con membrana sintética.



(CIDEIM, 2005)

**Figura 10.** Alimentación por membrana.



(CIDEIM, 2005)

### ✓ Almacenamiento de huevos

- El papel filtro de los vasos dentro de las jaulas debía ser retirado cada dos días, y colocado sobre papel absorbente rotulado para que los huevos se secaran. Cuando esto hubiera ocurrido, el papel filtro se envolvía en papel absorbente.
- Posteriormente se introducían en bolsas resellables y se guardaban en recipientes plásticos en cuyo interior se encontraba una toalla absorbente humedecida, para una mejor conservación de los huevos. Los huevos no eran almacenados por un periodo mayor a 2 meses, ya que la viabilidad de estos disminuye.

## 10.6 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las pruebas bioquímicas permiten que al contacto con el homogenizado del insecto se puedan identificar los mecanismos que operan en la resistencia. Dado que las enzimas actúan sobre sustratos específicos, los productos de las reacciones químicas se unen a un colorante dando origen a un cambio de color característico para cada enzima.

Estas pruebas permitieron establecer cuales enzimas poseían mayor actividad en los insectos resistentes y la frecuencia de estos organismos en la muestra analizada, a través de diferencias en la lectura de absorbancia en microplacas.

Para detectar la resistencia a insecticidas basada en los mecanismos bioquímicos y mediante la medición de los niveles enzimáticos en mosquitos homogenizados individualmente, se evaluaron 60 mosquitos por población y se debieron realizar los siguientes procesos:

- Los mosquitos fueron sacrificados por congelación; posteriormente se adiciono un mosquito por vial. Por cada prueba se evaluaron 30 mosquitos.
- A estos mosquitos se les adiciono 100  $\mu$ L de buffer fosfato de pH 7.2 (PBS).
- Se procedía a su homogenización dentro del vial con la ayuda de un macerador (Figura 11).
- 

**Figura 11.** Tubo eppendorf (izquierda), macerador (derecha).

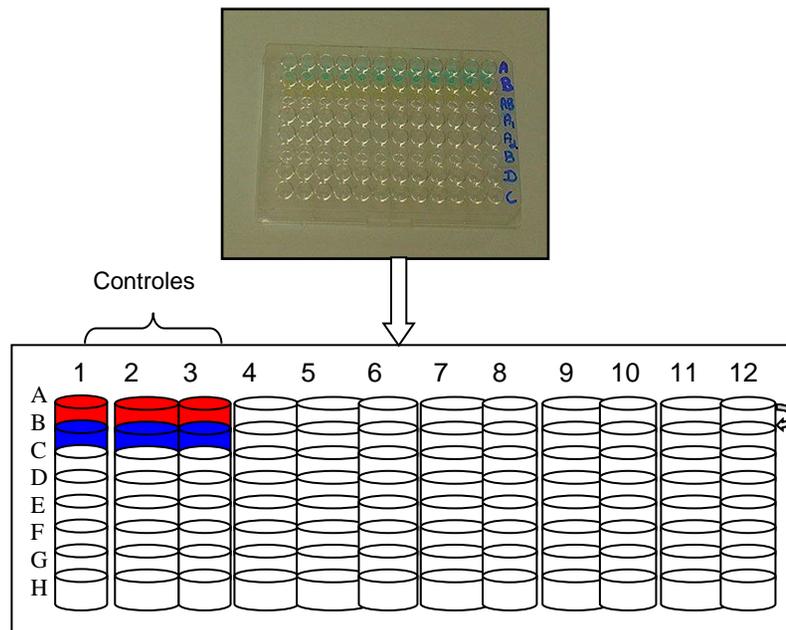


- 900  $\mu\text{L}$  más de buffer fosfato eran adicionados y se centrifugaba a baja velocidad para evitar la contaminación de la muestras con los residuos.

El homogenizado fue utilizado para sembrar en microplacas de 96 pozos, fondo plano, no estériles. Se utilizaron cuatro microplacas; en tres de ellas, se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de muestra por triplicado (300  $\mu\text{L}$  en total por placa) y en la cuarta, se sembraron 20  $\mu\text{L}$  por triplicado (60  $\mu\text{L}$  en total) por cada una de las muestras.

Las filas de las microplacas vienen marcadas con letras (A-H) y las columnas vienen numeradas (1-12). En estas placas los pozos A1, A2 y A3 se utilizaron para sembrar los controles positivos y los pozos B1, B2 y B3 para los controles negativos, por lo cual no se debía aplicar muestra de mosquito en ellos (Figura 12).

**Figura 12.** Microplaca. Se resalta en rojo la ubicación de los controles positivos y en azul la de los controles negativos.



Posteriormente, se realizaron las pruebas colorimétricas y la lectura de absorbancia en el lector de microplacas para cada grupo de enzimas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Pruebas bioquímicas

Prueba o enzima a evaluar	Sustrato	Colorante	Control Positivo +	Control Negativo	Longitud de onda (nm)	Tiempo de lectura en minutos
Proteínas		DYE	Albúmina	PBS	630	0
Oxidasas	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	TMB2	Citocromo C	PBS	630	0,10
Esterasas	β-naftilacetato	O- dianisidina	β-naftol	PBS	570	0
AcHE	Acetilcolina yodada	DTNB	Muestras de mosquitos a los que se les suministra acetilcolina yodada	-	405	0,10

**PROTEINAS:** para esta prueba se utilizó el Bio- Rad Protein assay DYE reagent concentrate, que reacciona con las proteínas totales de la muestra, agregando 200 µl en toda la placa , posteriormente se realizó la lectura de absorbancia en el lector a una longitud de onda de 630nm. En los controles positivos se sirvieron 2,5 µL de albúmina y se completaron a 100 µL con PBS.

**OXIDASAS:** a una solución 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine (TMBZ) y metanol preparada previamente se le adicionaron 75 ml de buffer acetato (pH = 5,0), después se adicionaban 200 µL de esta solución en toda la placa e igualmente 25 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se procedio a realizar su lectura de manera inmediata y 10 minutos después, a una longitud de onda de 630 nm. En los controles positivos se sirvieron 7,5 µL de una solución de Citocromo C y buffer fosfato y se igualo a 100 µL con buffer fosfato de potasio.

**ESTERASAS:** se agregarón 40 ml de PBS a una mezcla de β-naphthyl acetato y acetona preparada con anterioridad. De esta solución se adicionaron 100 µL en toda la placa y se dejaron incubar por 10 minutos. Pasado este tiempo se agregan 100 µL de una solución de o-Dianisidine tetrazotized y agua ultrapura, se incubaron durante dos minutos y se realizo su lectura a una longitud de onda de 570nm. Para los controles positivos de esta prueba se utilizan 40 µL de una solución de β-naphthol y completada a un volumen de 100 µL con PBS.

**ACETILCOLINESTERASA INSENSIBLE:** se depositaron 100 µL de una solución de acetilcolina yodada en los pozos 10, 11 y 12 de toda la placa para que estos sirvieran

de control positivo; en el resto la placa se adicionaron 100  $\mu$ L de una mezcla de acetilcolina yodada y propoxur, y 100  $\mu$ L de 5,5 Dithio-bis (DTNB). La lectura fue realizada en los tiempos 0 y 10 a una longitud de onda de 410 nm. Para todas las placas se utilizó como control negativo 100  $\mu$ L de buffer fosfato de potasio en cada pozo (B1, B2, B3). Los datos obtenidos en las lecturas fueron guardados con el nombre y fecha de la prueba en el software o programa del lector, posteriormente se procesaron en el programa Excel para obtener los histogramas de frecuencia y adicionalmente se registraron en el libro de experimentos.

## 10.7 TABLAS DE VIDA

Las tablas de vida representan una manera sinóptica y sintética de plasmar en forma cuantitativa las principales características de mortalidad y fecundidad de una población determinada (Rabinovich, 1980). En consecuencia, permiten describir el comportamiento de la mortalidad de una especie de acuerdo a su etapa de desarrollo y hacer comparaciones.

En este proyecto se realizó una tabla de vida horizontal, que permitiera registrar un gran número de larvas que hubieran eclosionado al mismo tiempo (cohorte), con el fin de llevar un registro de ellas desde la eclosión hasta su muerte (Rabinovich, 1980). La tabla de vida se realizó a un grupo de cada cepa.

Este registro, brindo información sobre el efecto de la presión selectiva con insecticidas en los estadios inmaduros de una cepa de *Aedes aegypti*. El seguimiento a parámetros biológicos como mortalidad y supervivencia de los estadios, porcentaje de eclosión y fecundidad proporciono información sobre las variaciones en algunos aspectos bioecológicos en la población sometida a presión por insecticidas.

Las tablas de vida se aplicaron en la población parental y las filiales de las cepas sometidas al proceso de selección. En el anteproyecto de este trabajo se contemplo realizar el seguimiento solo a la población parental y a las 3 cepas obtenidas (F5), lo que se modifico con el fin de realizar comparaciones que pudieran explicar las diferencias que se pudieran presentar. Para establecer los parámetros de longevidad y fecundidad, las hembras del grupo seguido durante la filial 5 fueron individualizadas en potes de ovipostura. A las hembras individualizadas se les proporciono una ingesta sanguínea y se mantuvieron con solución azucarada hasta su muerte.

Los parámetros que se buscaron establecer a partir del registro de los datos fueron:

- Supervivencia

- Duración media de cada estadio
- Número de huevos promedio por hembra
- Número de larvas eclosionadas
- Larvas muertas y su estadio
- Número de pupas vivas y pupas muertas
- Número de adultos obtenidos
- Longevidad

Todos estos datos se registrarán diariamente en un formato establecido para esta actividad (Anexo 2). Los parámetros establecidos para cada estadio fueron los siguientes:

**$a_x$**  : Número total de individuos observados al inicio de cada estadio.

**$l_x$**  : Proporción de la cohorte original que sobrevive al inicio de cada estado o estadio ( $N_x/N_0$ ). A fin de estandarizar los datos se considera  $l_0= 1,000$ .

**$d_x$** : Proporción de la cohorte original que muere en cada estadio  $d_x = l_x - l_{x+1}$

**$q_x$** : Tasa de mortalidad ( $d_x/l_x$ )

**$m_x$** : Número de huevos producidos por cada hembra sobreviviente.

## 10.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de absorbancia obtenidos en las pruebas bioquímicas, se consignaron en una base de datos, que se analizó mediante el programa SPSS. En este programa se corrió la prueba de Kolmogorov-Smirnov para validar la normalidad de los datos. De acuerdo con los resultados obtenidos (no normalidad), se escogió la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias significativas entre los datos (Anexos 3 y 4). Después de aplicar la prueba (Kruskal-Wallis) se determinó que pares de grupos eran diferentes por medio del procedimiento de Dunn (Datos no mostrados). Los resultados finales del análisis fueron graficados en Box-plot.

Para el análisis de las tablas de vida, los datos fueron analizados estadísticamente mediante pruebas como la prueba de “chi-cuadrado para Comparación de k proporciones para muestras independientes”, la cual permitió realizar comparaciones entre el porcentaje de eclosión de las cepas y sus filiales. La mortalidad de los estadios fue analizada mediante un modelo de regresión binomial, debido a que las variables respuesta eran conteos. La prueba de Kruskal Wallis fue utilizada para comparar el promedio de huevos y longevidad de las cepas (Anexo 7). Para establecer entre cuales grupos se presentaba diferencia se realizó el procedimiento de Dunn (Datos no mostrados).

## 11 RESULTADOS

### 11.1 I PARTE: Pruebas Preliminares

Al inicio de este proyecto se realizaron dos intentos de selección a partir de dos poblaciones de *Aedes aegypti* diferentes, la primera de una colonia pre-existente en CIDEIM proveniente de la comuna 16 de Cali y otra de diferentes localidades ubicadas en otras comunas de la misma ciudad. Estas poblaciones presentaron una alta mortalidad al realizarse selecciones con insecticidas en generaciones sucesivas, de tal forma que solo llegó a la 3<sup>era</sup> generación, donde se produjo la muerte de todos los individuos. Estos resultados preliminares se describen a continuación, ya que establecieron las bases para implementar la metodología de selección de cepas resistentes a insecticidas en este proyecto.

#### 11.1.1 Población proveniente de la Comuna 16.

Estudios realizados previamente en el CIDEIM mostraron que una población de *A. aegypti* proveniente de la comuna 16 presentaba resistencia al piretroide Deltrametrina, por lo cual se consideró que esta población era adecuada para iniciar un proceso de selección de cepas resistentes a insecticidas.

Los huevos obtenidos de hembras resistentes a deltametrina fueron eclosionados y expuestos a la presión selectiva con los insecticidas DDT (150 µg/ml), lambdacialotrina (15 µg/ml) y malatión (100 µg/ml). Las dosis diagnósticas utilizadas corresponden a las previamente calculadas en un estudio anterior para la metodología mediante botellas CDC (Ocampo, com.per). La exposición a los insecticidas se realizó como se muestra en la tabla 3. En resumen, la selección se realizó alternando los insecticidas durante 3 generaciones. Con este experimento se buscaba identificar resistencia cruzada. El insecticida malatión no pudo ser utilizado para la selección debido a que la cepa murió a la dosis diagnóstica (cepa susceptible).

**Tabla 3.** Esquema de selección utilizado en la presión selectiva por insecticidas en la comuna 16.

Población	Insecticida utilizado en cada filial		
	Filial 1	Filial 2	Filial 3
Comuna 16	DDT	Lambdacialotrina	DDT
		DDT	DDT
	Lambdacialotrina	DDT	Lambdacialotrina
		Lambdacialotrina	Lambdacialotrina

*a. Pruebas en botellas impregnadas del CDC*

Los adultos de la población de la comuna 16 Filial 1 que sobrevivieron a la exposición a cada insecticida fueron separados para el establecimiento de las cepas por cada insecticida. El parámetro establecido para realizar las selecciones fue el tiempo letal 50 (TL50). Inicialmente, el objetivo principal de este estudio era seleccionar los individuos que sobrevivían al TL50 durante varias generaciones para evaluar si se generaban cambios en los mecanismos enzimáticos evaluados como producto de la selección.

En las pruebas iniciales se detectó susceptibilidad completa al malatión, lo cual impidió que se realizara la presión con este insecticida y por tanto, no se estableció una cepa seleccionada por malatión. La población presentó alta resistencia al DDT con un TL50 9 veces superior al de la cepa susceptible rockefeller; de igual manera las pruebas realizadas con el piretroide lambdacialotrina mostraron que esta población presentaba niveles de resistencia a este insecticida ya que su LT50 era 3 veces superior al de la cepa rockefeller (Tabla 4).

Al llegar a la generación F4, los huevos de esta filial no eclosionaron y no fue posible la obtención de ejemplares para continuar con el proceso de selección, por lo que se produjo mortalidad total de las cepas.

**Tabla 4.** Tiempo (minutos) en el que se alcanzó el 50% de mortalidad de la población de la comuna 16 determinado en la filial 1.

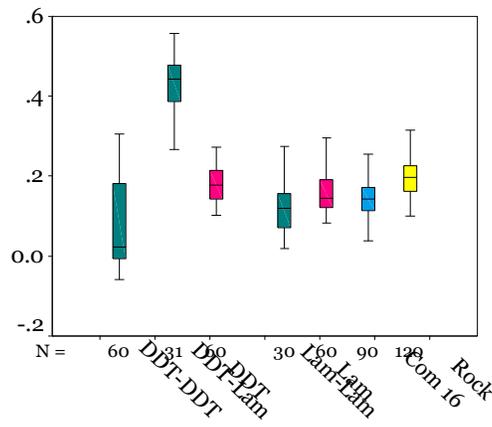
INSECTICIDA	Tiempo (minutos) en el que se alcanza el 50% de mortalidad (TL50)	
	Cepa Rockefeller	Comuna 16
DDT	15	135
Lambdacialotrina	15	45

*b. Cambios en los mecanismos enzimáticos relacionados con resistencia a insecticidas (oxidasas de función mixta, esterasas no específicas, acetilcolinesterasa modificada).*

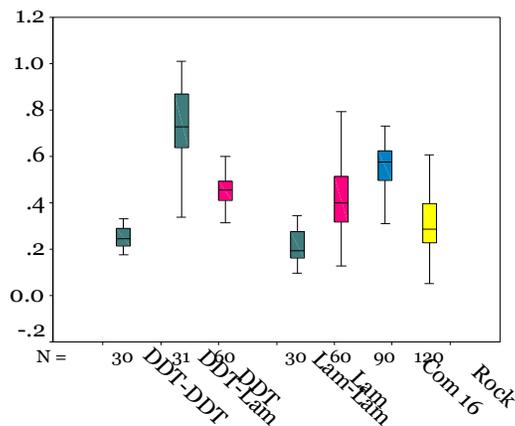
Mediante pruebas bioquímicas a la población inicial y a las cepas sometidas a los insecticidas se evaluaron los cambios que se pudieran presentar en los niveles de actividad de enzimas relacionadas con detoxificación de insecticidas, producto del proceso de selección. Se tomaron datos de las generaciones 1) sin seleccionar, 2) después de la 1ª selección y 3) Después de la 2ª selección. Los datos de absorbancia obtenidos en las pruebas de oxidasas de función mixta (OFM),

esterasas no específicas (ENE), acetilcolinesterasa modificada (ACEM) y proteínas para cada población, fueron registrados en una base de datos de Excel y luego fueron analizados mediante el programa SPSS. En las figuras 13 y 14, se describen los resultados obtenidos para los mecanismos de OFM y ENE para cada una de las generaciones expuestas a los insecticidas.

**Figura 13.** Nivel de oxidasas de función mixta en una población de *Aedes aegypti* proveniente de la comuna 16.



**Figura 14.** Nivel de esterasas no específicas en una población de *Aedes aegypti* proveniente de la comuna 16.



Rockefeller
  Sin seleccionar
  1 selección
  2 selección

El análisis de las pruebas bioquímicas muestra un aumento en el nivel de oxidasas de la cepa seleccionada con DDT y posteriormente con lambdacialotrina, en relación a los niveles que presentan la cepa rockefeller y la población inicial sin ninguna selección (Figura 13). La selección consecutiva con DDT o lambdacialotrina evidencian niveles de oxidasas por debajo de los niveles de la cepa rockefeller.

En los niveles de esterases no específicas, se observa que de igual forma, la cepa seleccionada con DDT y consecutivamente con Lambdacialotrina muestra un aumento en el nivel de esta enzima (Figura 14). La selección única con lambdacialotrina muestra aumento en el nivel de ENE en relación a la cepa rockefeller, pero al igual que las demás selecciones los niveles se mantienen por debajo de la población inicial que no ha sido sometida a selección.

Los adultos evaluados de las poblaciones en cada una de las filiales no demuestran presencia de individuos con ACEM, ni diferencias significativas en los niveles de absorbancia de esta prueba.

### **11.1.2 Presión selectiva en generaciones sucesivas a una población mixta proveniente de diferentes localidades de la ciudad de Cali.**

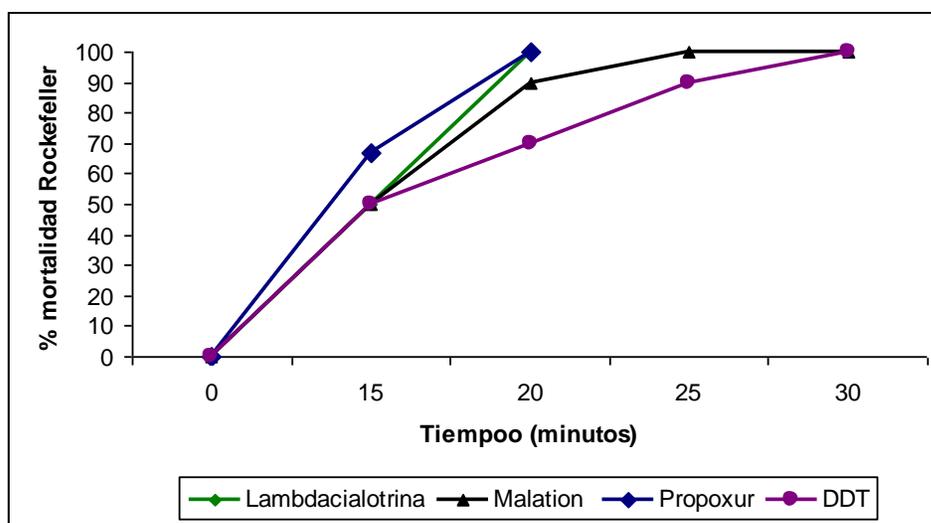
El segundo intento de selección fue desarrollado a partir de ejemplares de *Aedes aegypti* colectados en diferentes barrios de la ciudad de Cali como son Lourdes, Petecuy, Siloe y Olaya Herrera. Cada una de las poblaciones fue caracterizada mediante pruebas de botellas para establecer sus niveles de resistencia iniciales, con la finalidad de mezclar aquellas que mostraran mayores niveles de resistencia. La mezcla de las poblaciones tenía como finalidad establecer una población con niveles de resistencia de mayor variabilidad genética.

#### **a. Pruebas en botellas impregnadas del CDC.**

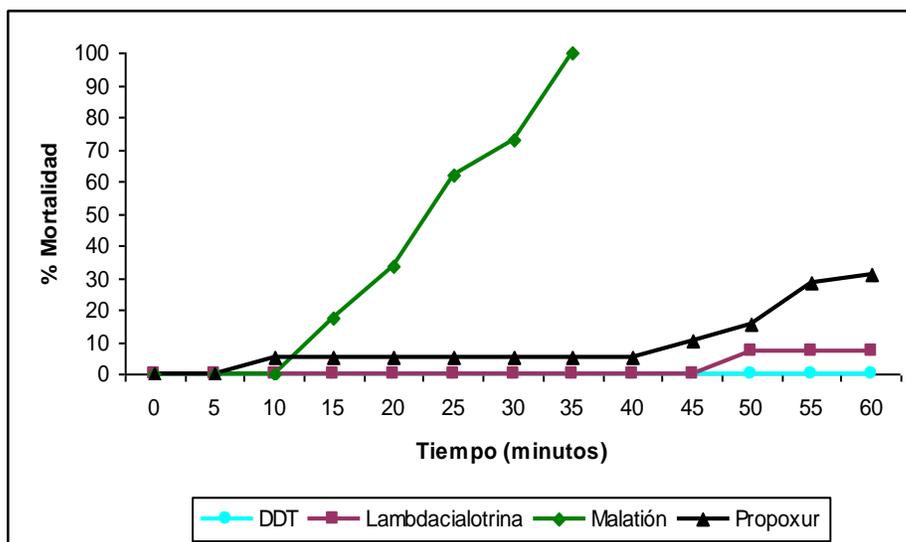
Los ejemplares obtenidos de Siloe, Petecuy, Lourdes y Olaya Herrera fueron alimentados para la obtención de la filial 1 de cada una de las poblaciones. A los adultos de la F1 se les realizaron pruebas CDC para los insecticidas propoxur, lambdacialotrina, DDT y malatión a las dosis diagnósticas mencionadas en la metodología, con el fin de establecer los niveles de resistencia iniciales de cada una de las poblaciones.

A estas poblaciones se les registró la mortalidad presentada cada 5 minutos frente a los insecticidas evaluados, hasta completar 60 minutos de seguimiento; los resultados de estas pruebas y de los ensayos realizados a la cepa susceptible de referencia rockefeller (Figura 15 a 19) fueron graficados.

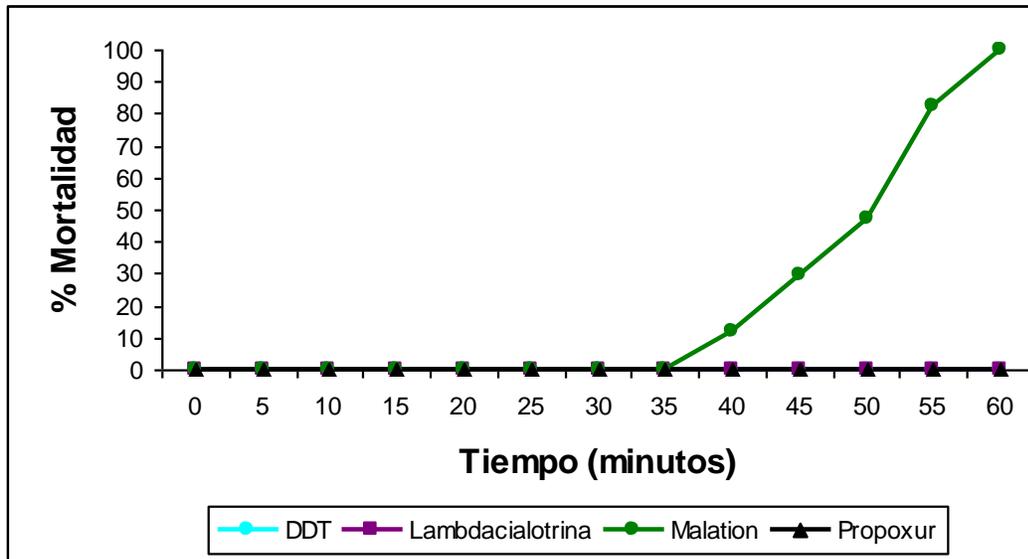
**Figura 15.** Porcentaje de Mortalidad de una población de *Aedes aegypti* proveniente de la cepa rockefeller frente a los insecticidas evaluados.



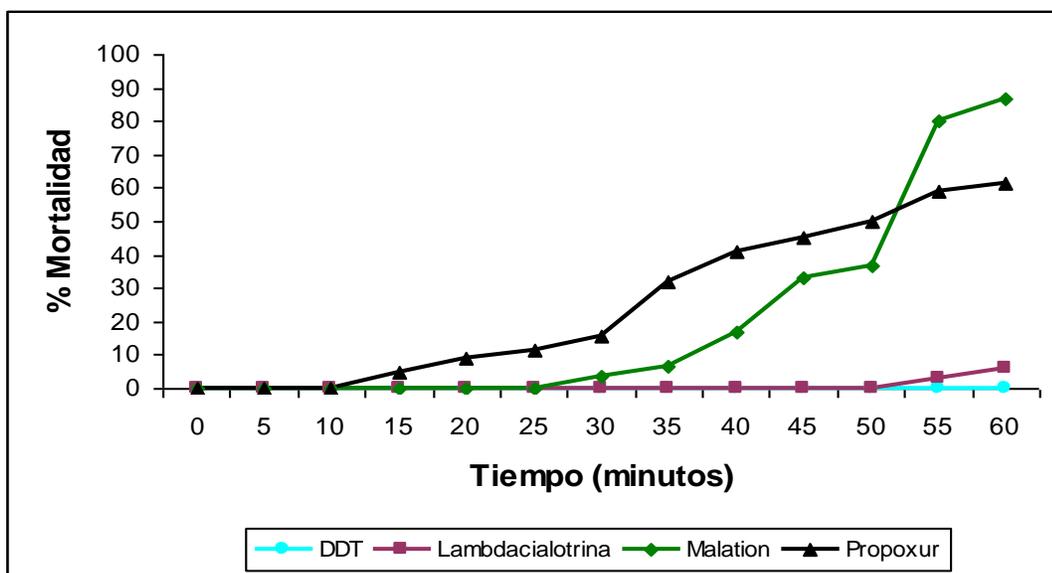
**Figura 16.** Porcentaje de Mortalidad de la población de *Aedes aegypti* proveniente del Barrio Olaya herrera frente a los insecticidas evaluados.



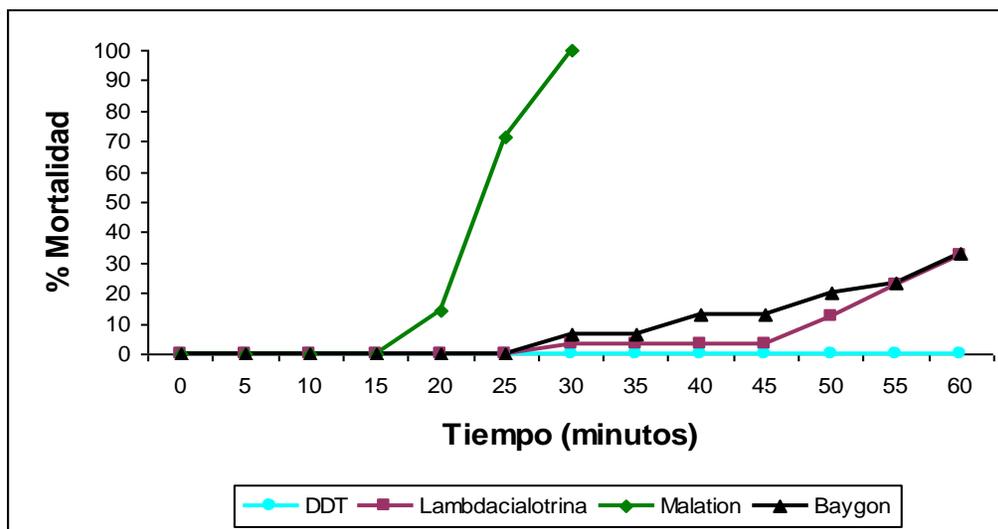
**Figura 17.** Porcentaje de mortalidad de la población de *Aedes aegypti* proveniente de Petecuy frente a los insecticidas evaluados



**Figura 18.** Porcentaje de Mortalidad de la población de *Aedes aegypti* proveniente de Siloe frente a los insecticidas evaluados.



**Figura 19.** Porcentaje de Mortalidad de la de *Aedes aegypti* población proveniente de Lourdes frente a los insecticidas evaluados.



Las poblaciones muestran un alto nivel de resistencia al insecticida organoclorado DDT, ya que durante los 60 minutos de exposición no se registró mortalidad por parte de los adultos (Figura 15 a 19). Así mismo, las graficas obtenidas frente a lambdaialotrina, evidencian que todas las poblaciones presentan resistencia a este insecticida, siendo la población de Petecuy la de mayor resistencia, debido a que no se observa ninguna mortalidad en el tiempo evaluado (60 min). Las poblaciones de Lourdes, Olaya Herrera y Siloe, presentaron un porcentaje de mortalidad por debajo del 50 % durante la prueba..

En la evaluación del organofosforado malati6n, la poblaci6n de Lourdes registr6 el 100% de mortalidad al tiempo diagnostico establecido con base en la cepa rockefeller (30 minutos). Las poblaciones de Olaya herrera, Siloe y Petecuy superaron el tiempo de mortalidad diagnostico, sin embargo, alcanzaron el 100% de la mortalidad en los 60 minutos.

Los registros obtenidos frente al insecticida propoxur evidencian niveles de resistencia en todas las poblaciones, ya que durante los 60 minutos de seguimiento no se produjo mortalidad superior al 50 % de los adultos evaluados, exceptuando los ejemplares provenientes de Siloe que registraron una mortalidad alrededor del 60% (Figura 18).

A pesar de que las poblaciones mostraron niveles de resistencia a los insecticidas evaluados, no fue posible seguir el proceso de selecci6n debido que hubo

mortalidad total durante la filial 2 por parte de las colonias, por lo que se decidió traer material de campo de las mismas localidades para recomenzar el proceso de colonización.

**b. Cambios en los mecanismos enzimáticos relacionados con resistencia a insecticidas (oxidasa de función mixta, esterasas no específicas, acetilcolinesterasa modificada).**

Adultos de los barrios Siloe, Petecuy, Lourdes y Olaya herrera fueron sometidos a pruebas bioquímicas para evaluar los niveles enzimáticos iniciales de cada una de las poblaciones, el análisis de las absorbancias arrojadas por las pruebas no mostraron variaciones en las enzimas de los ejemplares evaluados en comparación con los de la cepa susceptible de referencia rockefeller (datos no mostrados)

## **11.2 II. PARTE:**

### **11.2.1 Presión selectiva por insecticidas en generaciones alternas a una población mixta proveniente de diferentes localidades.**

**a. Obtención de ejemplares silvestres de *Aedes aegypti*:** Los ejemplares fueron obtenidos de criaderos naturales del mosquito en la ciudad de Cali como llantas, tarros, materas y albercas; las larvas y pupas se colectaron con la ayuda de goteros plásticos, cucharones y recipientes plásticos (Figura 20). Los barrios de los cuales se colectaron ejemplares fueron: Siloé-La Nave, Puerto Mallarino, Meléndez y Lourdes (Figura 21); en estas localidades se visitaron cacharrerías, montallantas, parqueaderos y lotes abandonados para la realización de los muestreos.

**Figura 20.** Criaderos de *Aedes aegypti*.



(CIDEIM, 2006)

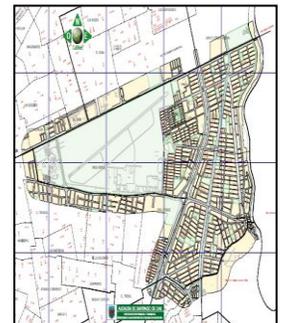
Los estadios inmaduros se llevaron al insectario de la Unidad de Entomología de CIDEIM para la obtención de adultos, procedimiento descrito en la metodología (punto 10.2). Los adultos fueron mantenidos y alimentados bajo condiciones de laboratorio para la obtención de su descendencia (F1)

**Figura 21.** Comunas de la ciudad de Cali en las que se colectaron ejemplares de *Aedes aegypti*.

Meléndez. Comuna 18



Lourdes y Puerto Mallarino.  
Comuna 7



Siloé. Comuna 20



*b. Establecimiento de la población mixta:* Para el trabajo experimental se estableció una población mixta obtenida a partir de la mezcla de adultos (F1) descendientes de los ejemplares colectados en la ciudad de Cali y de adultos (F1) obtenidos de una cepa proveniente de Campoalegre (Huila) con resistencia a los insecticidas DDT y lambdacialotrina. Ambas fueron mezcladas con el fin de obtener una población con historia de resistencia de mayor variabilidad. La susceptibilidad a insecticidas de la población mixta obtenida (F1) fue establecida inicialmente con la realización de pruebas de botellas impregnadas del CDC: DDT 150  $\mu\text{g/ml}$ , lambdacialotrina 5  $\mu\text{g/ml}$ , malatión 100  $\mu\text{g/ml}$  y propoxur 15  $\mu\text{g/ml}$  y pruebas bioquímicas

### 11.2.2 Pruebas en botellas impregnadas del CDC

Los adultos de la población mixta F1 que sobrevivieron a la exposición a cada insecticida fueron separados para el establecimiento de las cepas presionadas por cada insecticida. En la evaluación inicial de la población mixta, se detectó susceptibilidad al malatión, ya que los adultos morían en el tiempo diagnóstico establecido (30 minutos), lo que impidió que se realizara la presión con este insecticida, por ello, no se estableció una cepa seleccionada por malatión.

Por medio de las pruebas CDC descritas en la metodología, se realizó la presión selectiva en generaciones alternas al TL50 calculado para cada generación. Se determinó el tiempo letal 50 (TL 50) y el tiempo letal 100 (TL100) en las filiales sometidas a presión de selección (F1, F3 y F5). En la tabla 5 se describen los resultados obtenidos en los bioensayos realizados a las cepas durante las generaciones.

Los resultados indican que la población mixta presenta alta resistencia al DDT, ya que no hubo mortalidad de adultos durante 24 horas lo que indica que el TL100 de esta cepa a este insecticida es alrededor de 32 veces superior al TL100 de la cepa rockefeller.

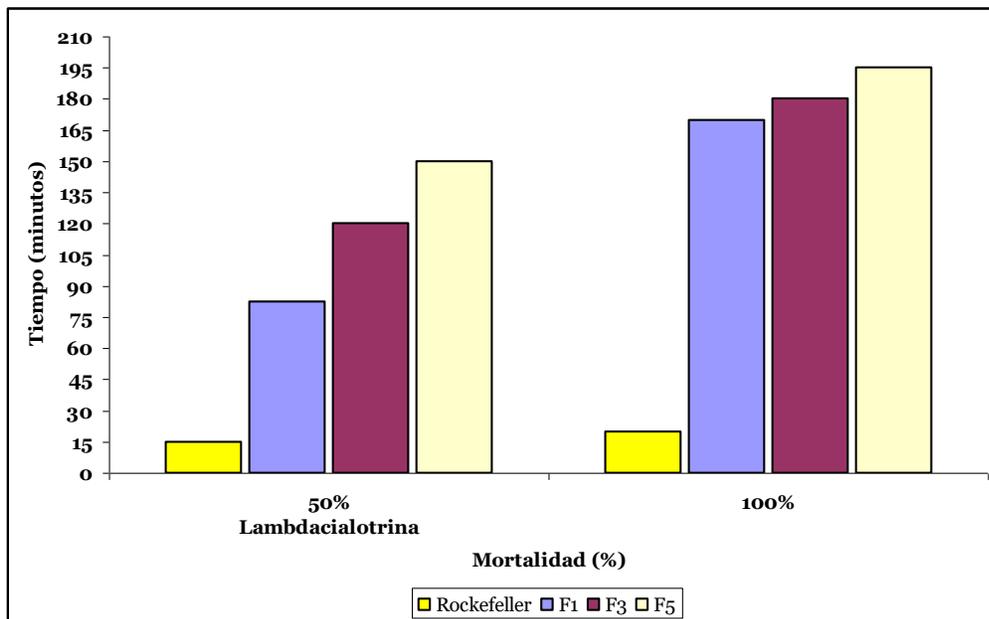
**Tabla 5.** TL50 y TL100 de las cepas de *Ae. aegypti* sometidas a presión selectiva por diferentes insecticidas. Pruebas con botellas CDC.

INSECTICIDA	FILIAL	TL50 en minutos	TL100 en minutos
DDT	Rockefeller	15	30
	F1	1440	1440
	F3	1440	1440
	F5	1440	1920
Lambdacialotrina	Rockefeller	15	20
	F1	82,5	170
	F3	120	180
	F5	150	195
** Malatión	Rockefeller	15	30
	F1	15	35
Propoxur	Rockefeller	10	30
	F1	112,5	215
	F3	120	206,25
	F5	180	270

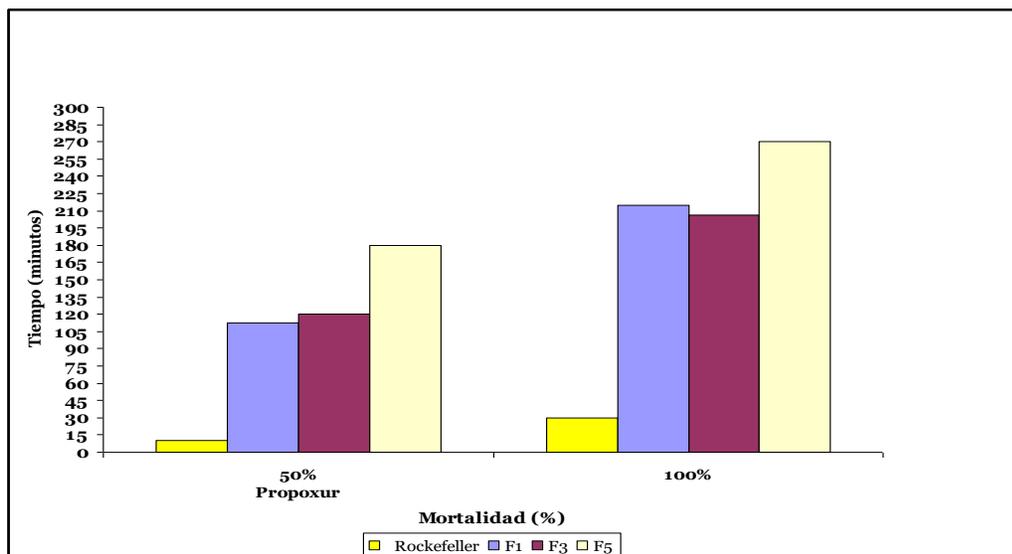
- Los tiempos equivalen al utilizado para la selección. \*\* Los resultados de insecticida solo se muestran para la F1 ya que no se continuó el proceso de selección.

Los datos obtenidos en los bioensayos son graficados a continuación para los insecticidas propoxur y lambdacialotrina, ya que fueron los que generaron aumento en el LT50 y LT100 durante el proceso de selección (Figuras 22 y 23). Los registros de las pruebas realizadas frente al DDT no fueron graficados ya que no se presentó mortalidad por un largo intervalo de tiempo.

**Figura 22.** Tiempo letal 50 (TL50) y tiempo letal 100 (TL100) de la cepa de *Aedes aegypti* a través del proceso de selección con lambdacialotrina.



**Figura 23.** Tiempo letal 50 (TL50) y tiempo letal 100 (TL100) de la cepa de *Aedes aegypti* a través del proceso de selección con propoxur.

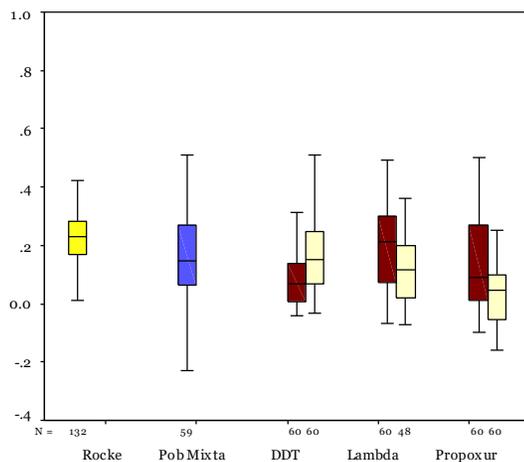


El TL50 para lambdacialotrina y propoxur en la filial 5 fue mayor que el TL50 de la cepa susceptible Rockefeller aproximadamente 10 veces para ambos insecticidas (Figura 22 y 23). Así mismo el TL100 para ambos insecticidas estuvieron por encima del de la cepa susceptible Rockefeller (13 veces para Lambdacialotrina y 9 veces para Propoxur). La gráfica de selección con lambdacialotrina muestra un aumento gradual de alrededor de 30 minutos en el TL50 a través de las generaciones. En general se observa un aumento gradual de la resistencia durante el proceso de selección.

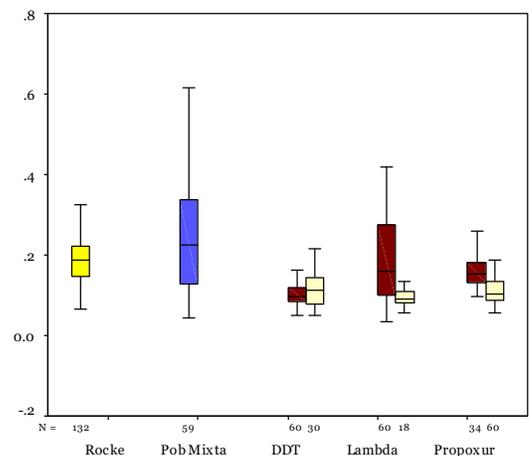
### 11.2.2 Cambios en los mecanismos enzimáticos relacionados con resistencia a insecticidas (oxidasa de función mixta, esterasas no específicas, acetilcolinesterasa modificada).

Se realizaron pruebas bioquímicas a la población inicial y las cepas sometidas a los insecticidas (F1, F3 y F5), con el fin de evaluar los cambios que se pudieran presentar en los niveles de actividad de las enzimas relacionadas con resistencia. Los resultados obtenidos en las pruebas de OFM, ENE, ACEM y proteínas para cada población se presentan en las figuras 24 – 27.

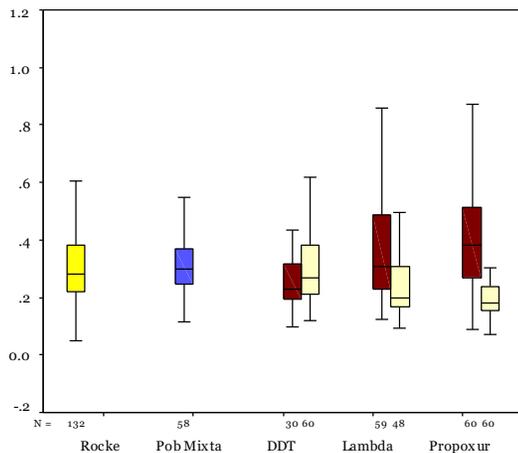
**Figura 24.** Proteínas en población de *Aedes aegypti* sometida a presión por insecticidas



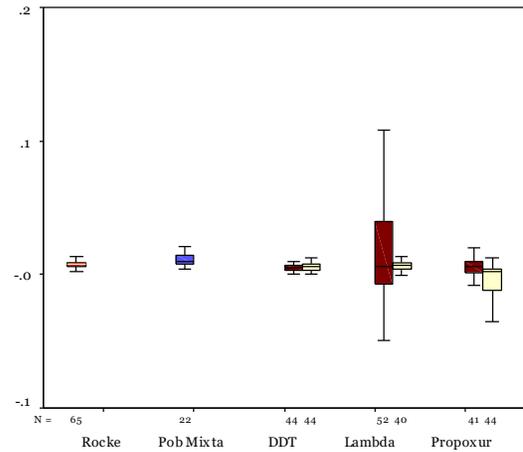
**Figura 25.** Niveles de oxidasa de función mixta en población de *Aedes aegypti* sometida a presión por insecticidas



**Figura 26.** Niveles de esterasas no específicas en una población de *Aedes aegypti* sometida a presión por insecticidas



**Figura 27.** ACEM en población de *Aedes aegypti* sometida a presión por insecticidas.



Rockefeller
  Población Mixta F1
  Filial 3
  Filial

Los niveles de las OFM no presentan aumento en las cepas seleccionadas en relación con la cepa rockefeller (Figura 25). Se observó que la población mixta F1 presentó los mayores niveles enzimáticos, sin embargo no existen diferencias significativas con la cepa control ( $\lambda=-1,01$ ;  $p>0,05$ ). A su vez, se observó en todas las cepas seleccionadas una disminución de esta enzima en la filial 5, las cuales están por debajo de las de la cepa rockefeller.

Del mismo modo, los niveles de ENE no evidencian aumento en ninguna de las generaciones para cada una de las cepas seleccionadas, en relación a la cepa rockefeller (Figura 26). Se obtuvieron diferencias significativas ( $H=7.554$ ;  $p<0,05$ ) entre las filiales de las cepas presionadas por insecticidas para las ENE, aunque estas diferencias hacen referencia a la disminución en los niveles de la enzima durante las generaciones. En la prueba para ACEM no se detectó presencia de individuos con actividad de ACEM en ninguna de las cepas (Figura 27).

### **11.2.3 Evaluación de los cambios biológicos en el vector como producto del proceso de selección con insecticidas.**

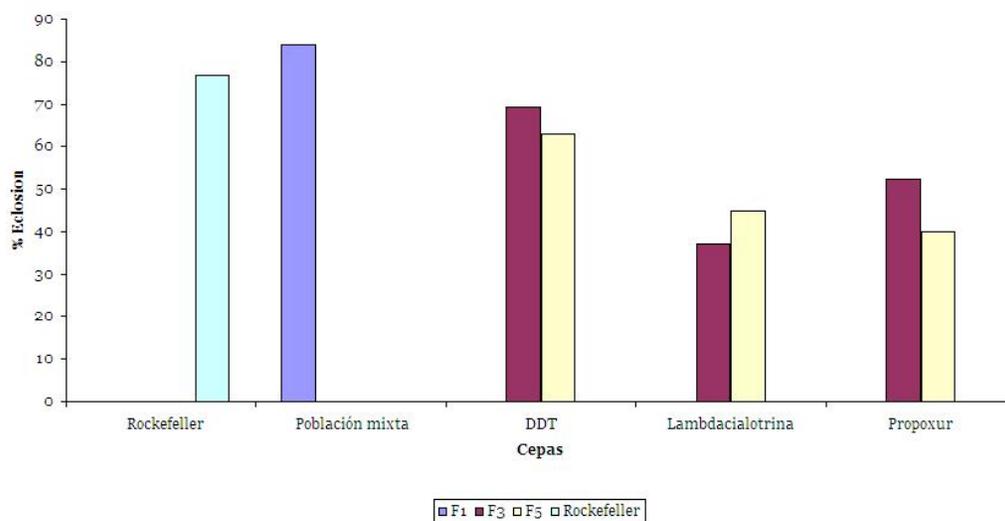
Para evaluar los posibles cambios biológicos que se podrían generar como producto de la presión selectiva por insecticidas en las cepas de *A. aegypti*, se realizó un registro por cada cepa del número de huevos eclosionados y la mortalidad de larvas, pupas y adultos en emergencia. Los registros fueron tomados a un grupo de individuos de las cepas en las filiales 1, 3 y 5 (generaciones sometidas a presión), de la cepa rockefeller y de la población mixta parental. Los datos se condensaron en tablas de vida horizontales para cada filial (Anexo 5 y 6).

Adicionalmente, a la población inicial (F1) y la final (F5) se les evaluó el promedio de huevos colocados por hembra y la duración de vida promedio de los adultos de cada cepa. Para esto se seleccionó un grupo de 70 huevos de cada cepa y se les realizó el seguimiento. Las eclosiones de todas las cepas se realizaron en las mismas condiciones de temperatura (27 C), humedad (70%), alimentación (2ml/2Lagua), fotoperíodo (día: noche; 12h:12h) y volumen de agua (2L). Los datos obtenidos permitieron evaluar parámetros como el porcentaje de eclosión, la supervivencia y mortalidad de los estadios y el número de huevos promedio por hembra. A continuación se hace una descripción de cada uno de ellos.

#### **11.2.3.1 Eclosión:**

Se estableció el porcentaje de eclosión de las diferentes cepas de *A. aegypti* a partir de una cohorte de huevos viables, examinados al estereoscopio. Los porcentajes obtenidos para cada cepa se presentan en la Figura 28.

**Figura 28.** Porcentaje de eclosión de las cepas de *Aedes aegypti* comparado con la cepa rockefeller.



La gráfica realizada a partir de los porcentajes de eclosión de las diferentes cepas de *Aedes aegypti* muestra una disminución a lo largo de la selección. Las cepas rockefeller y población mixta aunque no presentan un 100% de eclosión, en ambas cepas se presenta un porcentaje similar, por encima del 70%. Los porcentajes de eclosión de cada una de las cepas muestran diferencias significativas entre si (Tabla 6).

Las cepas seleccionadas por propoxur y DDT disminuyen su porcentaje de eclosión, durante la filial 5 en relación al generado por la filial 3. Se observaron diferencias significativas entre las filiales F3 y F5 de las cepas seleccionadas por lambdacialotrina y propoxur ( $p < 0,01$ ). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de eclosión entre las filiales de la cepa seleccionada con el DDT.

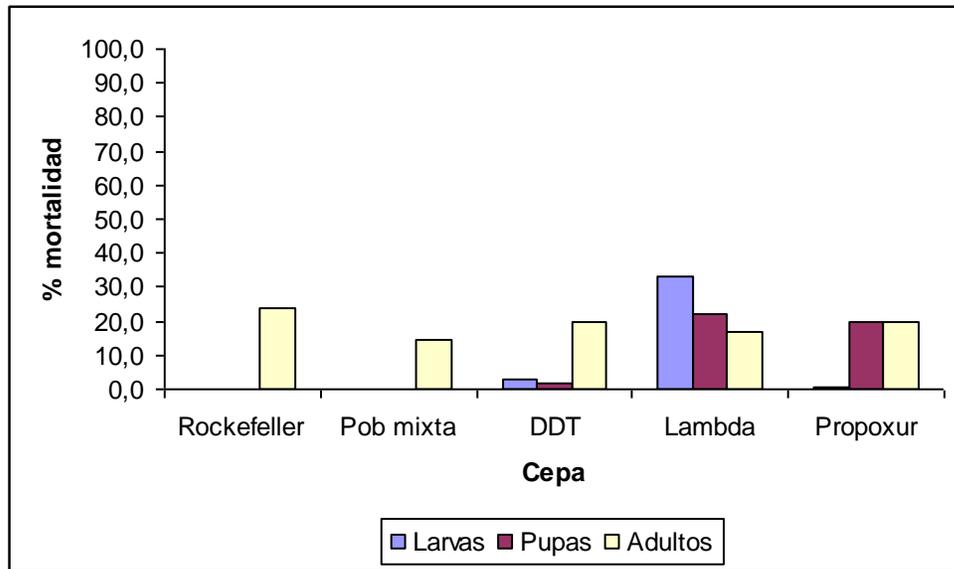
**Tabla 6.** Prueba chi-cuadrado para comparación del porcentaje de eclosión entre las cepas.

p media	q media	Chi-cuadrado	Valor p
0,681	0,319	211,977	0,000

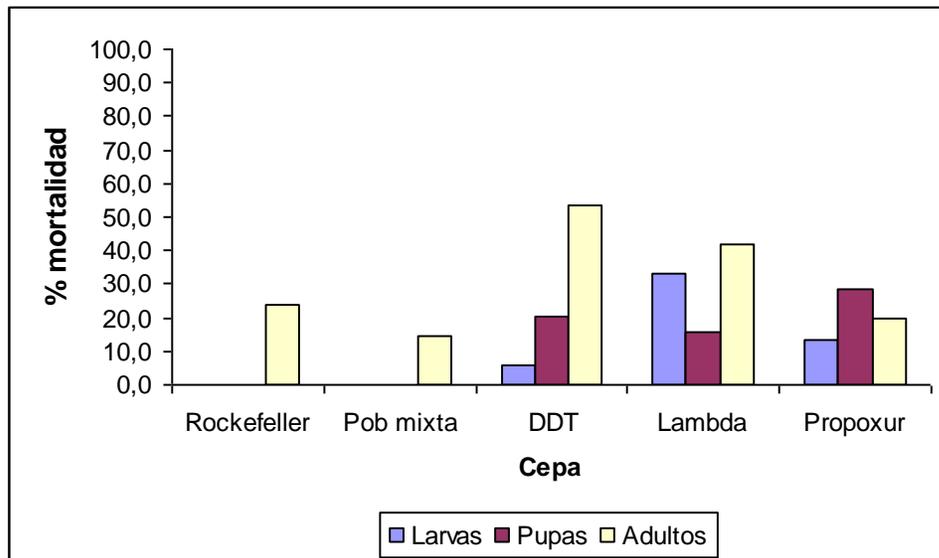
### 11.2.3.2 Mortalidad de las cepas en los diferentes estadios de desarrollo de *Aedes aegypti*.

A partir del registro diario de los datos de mortalidad (m) en larvas, pupas y adultos en emergencia en las tablas de vida, se determinó el porcentaje de mortalidad en cada estadio en cada una de las cepas (Figuras 29 – 30).

**Figura 29.** Porcentaje de Mortalidad de la filial 3 en comparación con la cepa Rockefeller y población mixta F1.



**Figura 30.** Porcentaje de Mortalidad de la filial 5 en comparación con la cepa Rockefeller y población mixta F1.



Se observó, que la mortalidad registrada en los diferentes estadios para cada cepa es variable entre cada una de ellas. La cepa rockefeller y la población mixta solo presentan mortalidades en el estado adulto. Durante la filial 3 las cepas presionadas por insecticidas muestran porcentajes de mortalidad en todos los estadios, siendo la cepa seleccionada con lambdacialotrina la que muestra el mayor porcentaje de mortalidad en el estadio de larva durante la F3 (Figura 29).

La mortalidad en los diferentes estadios de las cepas fue analizada estadísticamente por un modelo de regresión binomial negativo con el fin de establecer si existen diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad entre las cepas y entre sus filiales. Los resultados de estos análisis se presentan en las tablas de la 7 a 10.

**Tabla 7.** Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de *A. aegypti* entre cepas Rockefeller, Población mixta, Propoxur, Lambdacialotrina y DDT.

Variable	Error estándar	z	P >  z
Larva 1	111,54	0,62	0,534
Larva 2	9,431	1,74	0,083
Larva 3	9,401	1,52	0,129
Larva 4	1,709	1,60	0,109
Pupas	4,754	1,18	0,236
Adultos	0,0673		0,309

**Tabla 8.** Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de *A. aegypti* entre filiales de la cepa DDT.

Variable	Error estándar	z	P >  z
Larva 1	0	0	0
Larva 2	3.81e+07	0,00	0,997
Larva 3	0	0	0
Larva 4	0	0	0
Pupas	0,654	5,61	0,00
Adultos	0,151	2,02	0,044

**Tabla 9.** Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de *A. aegypti* entre filiales de la cepa lambdacialotrina.

Variable	Error estándar	z	P >  z
Larva 1	0	0	0
Larva 2	0	0	0
Larva 3	0	0	0
Larva 4	0	0	0
Pupas	0,139	-2,17	0,030
Adultos	0,204	0,30	0,761

**Tabla 10.** Modelo de regresión binomial negativo para comparar mortalidad de larvas, pupas y adultos de *A. aegypti* entre filiales de la cepa Propoxur.

Variable	Error estándar	z	P >  z
Larva 1	0	0	0
Larva 2	0,868	3,88	0,000
Larva 3	508	0,01	0,993
Larva 4	0	0	0
Pupas	0,116	-1,76	0,07
Adultos	0	0	0

El análisis de regresión binomial aplicado para comparar estadísticamente la mortalidad entre las cepas (Tabla 7), demuestra que no existe diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en la mortalidad de los diferentes estadios entre las cepas, lo que incluye la cepa rockefeller y la población mixta sin presión selectiva por insecticidas.

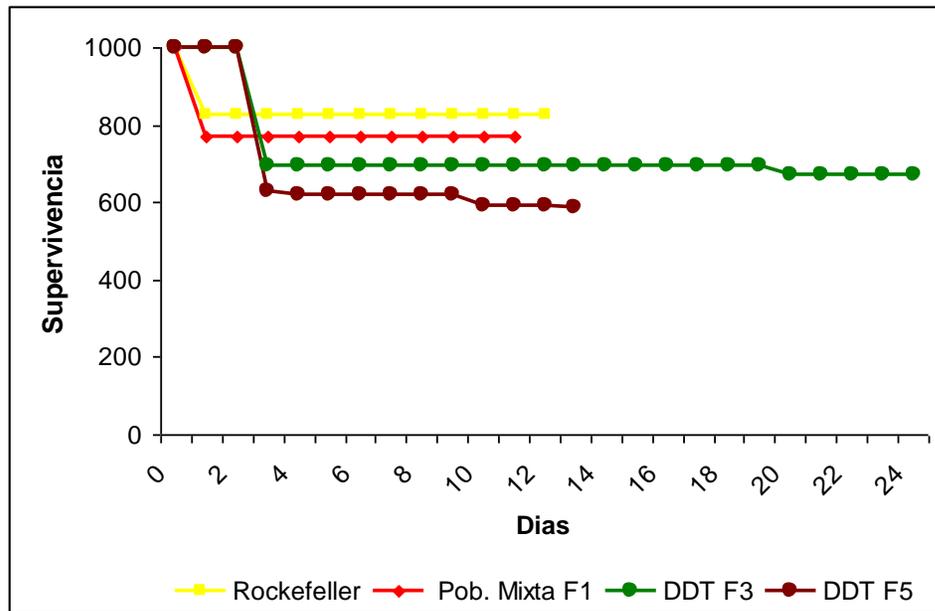
El análisis de las filiales de cada una de las cepas seleccionadas, mostraron diferencias significativas en algunos de los estadios evaluados (Tablas 8 - 10). Las filiales 3 y 5 de las cepas seleccionadas con DDT y lambdacialotrina no presentan diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en la mortalidad de los cuatro estadios larvales (Tabla 7 - 8), solo la cepa seleccionada con propoxur posee diferencia significativa  $p < 0,01$  en la mortalidad en el estado de larva 2 entre sus filiales (Tabla 10).

La cepa sometida a presión con el insecticida lambdacialotrina muestra diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) en la mortalidad producida en el estadio de pupa entre sus filiales (Tabla 9), al igual que la cepa presionada con DDT que además también posee diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en la mortalidad de adultos entre sus filiales (Tabla 8).

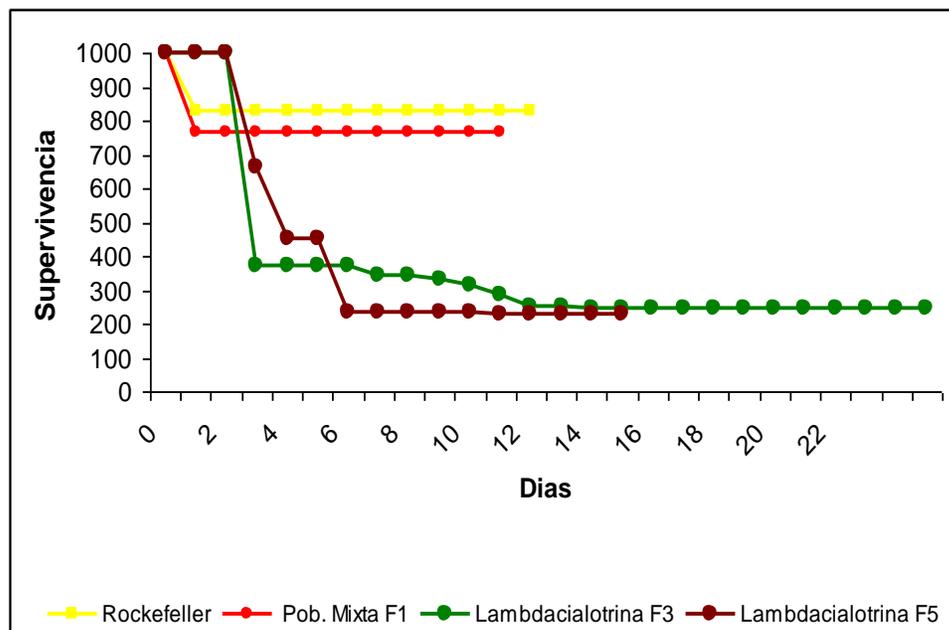
### 11.2.3.3 Supervivencia

La supervivencia diaria durante el estadio larval, fue colocada en curvas de supervivencia para comparar las filiales seleccionadas con la cepa rockefeller y la Población Mixta F1 sin seleccionar. Los resultados se observan en las figuras 31-33.

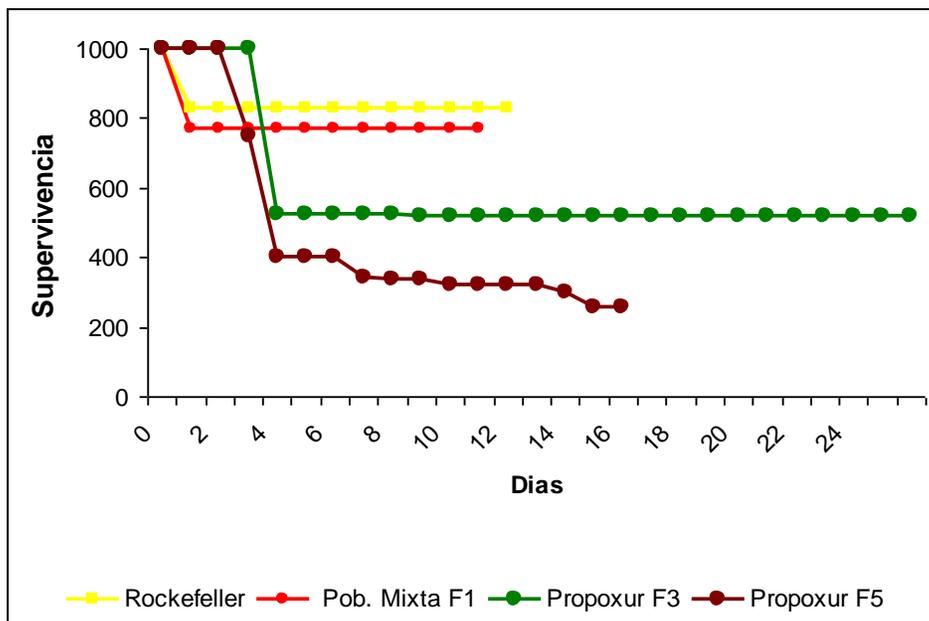
**Figura 31.** Curva de Supervivencia en el estadio de larva de una cepa de *Aedes aegypti* sometida a presión por DDT.



**Figura 32.** Curvas de Supervivencia en el estadio de larva de una cepa de *Aedes aegypti* sometida a presión por lambdacialotrina.



**Figura 33.** Curva de supervivencia en el estadio de larva de una cepa de *Aedes aegypti* sometida a presión por propoxur.



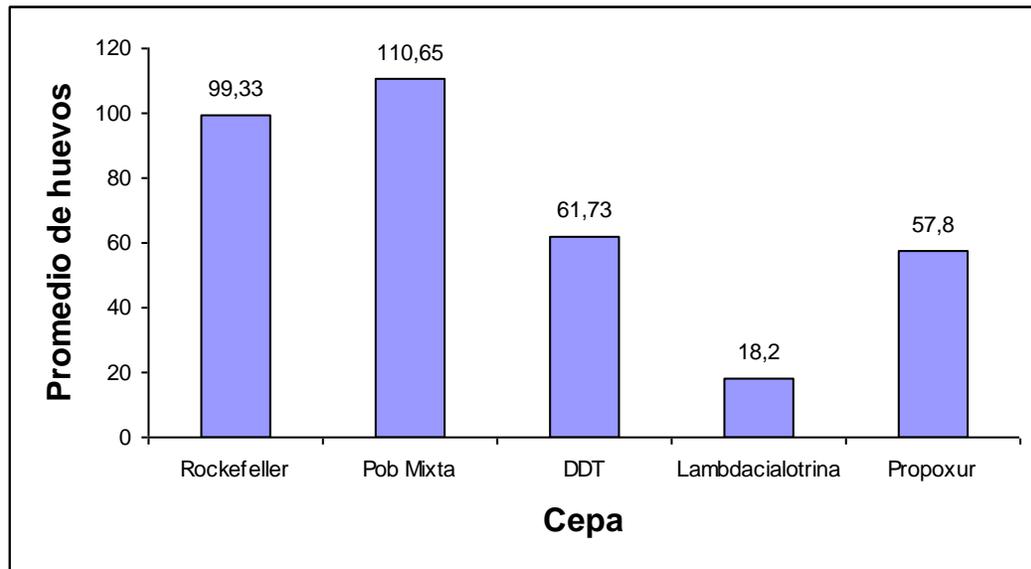
A partir de los datos y curvas se puede observar que a medida que avanza la selección por insecticidas de las cepas, disminuye la supervivencia de las mismas en estado de larva (Figura 31 a 33). Las 3 cepas seleccionadas por insecticidas presentaron una disminución en la supervivencia de la filial 5 con respecto a la filial 3. La menor sobrevivencia fue observada en la cepa seleccionada con lambdacialotrina, la cual en ambas generaciones presento una supervivencia del estadio no mayor al 250 (250/1000). La cepa seleccionada para DDT no presentó una disminución tan marcada de la supervivencia entre las filiales y en relación a las cepas Rockefeller y Población Mixta F1, como se observó en las cepas seleccionadas con lambdacialotrina y propoxur.

#### 11.2.3.4 Número promedio de huevos por hembra

Con la finalidad de evaluar el efecto que podría tener la selección por insecticidas en el promedio de huevos colocados por hembra, se individualizaron un grupo de hembras alimentadas con sangre en frascos de ovipostura de la población inicial

antes de la selección y al final de la selección (F5). Adicionalmente, se comparó con la cepa Rockefeller (Figura 34).

**Figura 34.** Numero promedio de huevos de hembras de *Aedes aegypti*, población mixta F1, cepas seleccionadas por DDT, lambdacialotrina y propoxur.



El número de huevos colocados por las hembras de la F1 es superior al de la cepa rockefeller y al de las cepas seleccionadas, sin embargo la población mixta solo muestra diferencias significativas con las cepas seleccionadas ( $\lambda = 3,91$ ;  $p < 0,05$ ). A través del proceso de selección el número de huevos colocados por cada hembra disminuye. La cepa presionada con lambdacialotrina es la que presenta el menor promedio de huevos (18,2) obtenidos de cada ejemplar. El análisis estadístico de los datos mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis muestra diferencia significativa ( $p < 0,01$ ) entre el promedio de huevos de las cepas (Tabla 11).

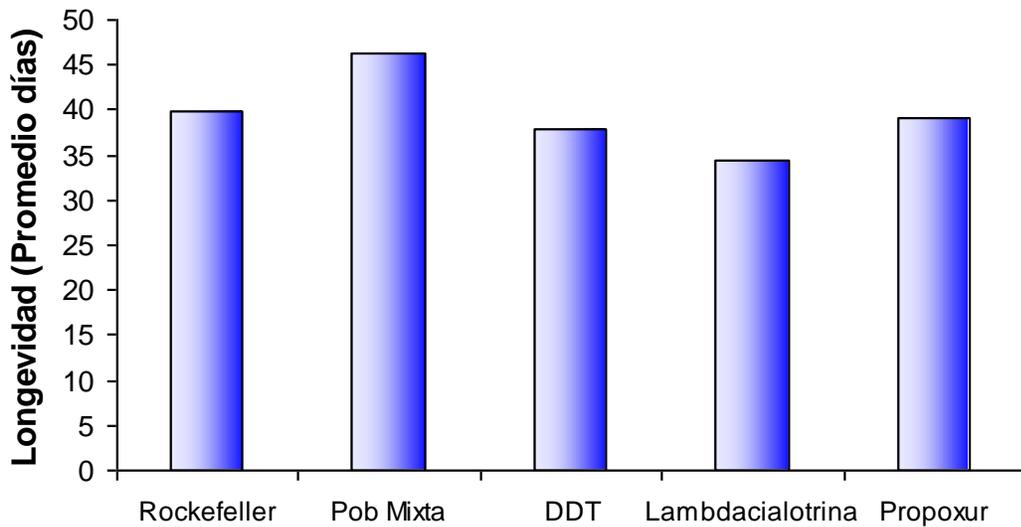
**Tabla 11.** Resultados de análisis del promedio de huevos por hembra por la prueba de Kruskal Wallis.

	Numero de huevos por hembra
Chi- square	31.913
df	4
p	0.000

### 11.2.3.5 Longevidad

Durante la filial 5 se realizó seguimiento a un grupo (n=70) de ejemplares de cada cepa seleccionada para determinar el tiempo de duración desde su eclosión hasta su muerte (longevidad). Los datos obtenidos fueron comparados con los de la cepa rockefeller y la población mixta F1 sin seleccionar. En la figura 35 se presentan las medias obtenidas para cada una de las cepas.

**Figura 35.** Duración de vida o longevidad de las Cepas seleccionadas, Cepa rockefeller y Población mixta sin seleccionar.



En cada una de las cepas se presentó alta variabilidad entre los ejemplares evaluados, sin embargo, los promedios obtenidos para cada una de ellas no revelan diferencias significativas entre las mismas (Tabla 12).

**Tabla 12.** Resultados de análisis de longevidad por la prueba de Kruskal Wallis.

	Días
Chi- square	8.825
df	4
p	.066

#### **11.2.4 Evaluación de las posibles relaciones de resistencia cruzada.**

Después de someter cada una de las cepas a la última presión selectiva durante la filial 5, se obtuvo la filial 6 para evaluar si el proceso selectivo a un insecticida específico podría generar resistencia cruzada con otros insecticidas.

Las cepas fueron sometidas a los insecticidas utilizados en el transcurso del proyecto y por los cuales no hubieran sido presionadas. Las cepas seleccionadas con Lambdacialotrina y propoxur no fueron sometidas al organoclorado DDT, ya que desde el inicio de este proyecto la población mostró altos niveles de resistencia al mismo.

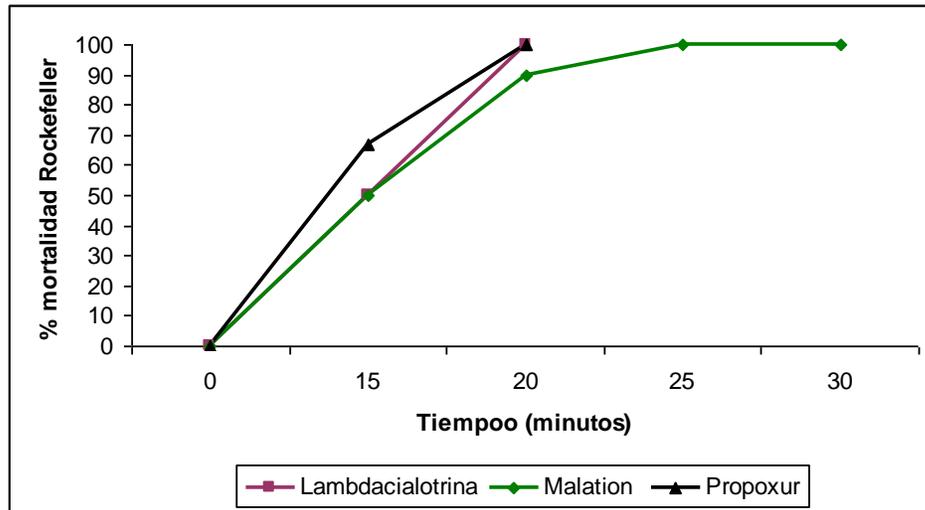
En los bioensayos realizados se tuvo dos botellas control, una con la ausencia del insecticida y otra con el insecticida pero con adultos de la cepa susceptible Rockefeller. Las pruebas fueron seguidas hasta completar el 100% de mortalidad de los adultos en cada una de las botellas. Los resultados de las pruebas son mostrados en la Tabla 13.

A partir de los porcentajes de mortalidad obtenidos en las pruebas se realizaron curvas de mortalidad que permitieron observar el comportamiento de los adultos frente a cada uno de los insecticidas utilizados. Estos datos son comparados con los de la cepa rockefeller (Figuras 36-39).

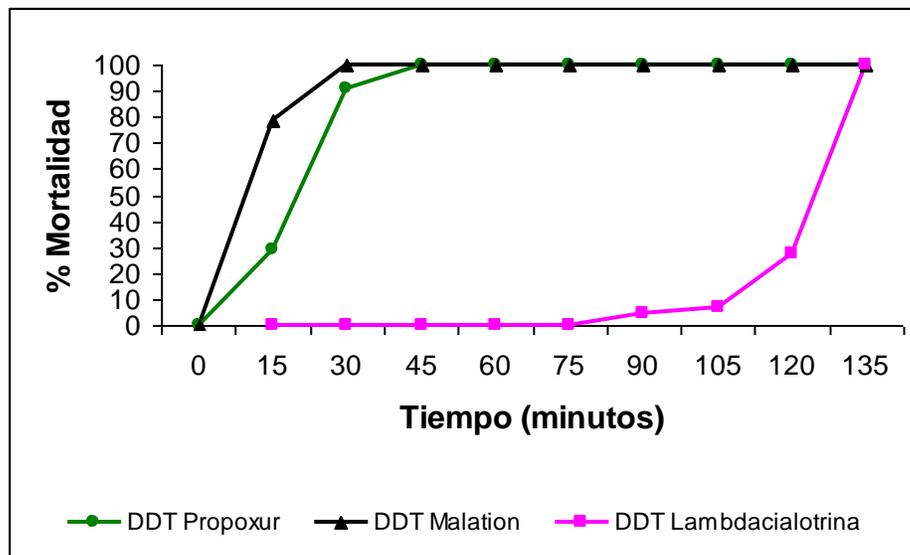
**Tabla 13.** Porcentajes de mortalidad resultado de las evaluaciones a las cepas seleccionadas con DDT, Lambdacialotrina y Propoxur.

CEPA	INSECTICIDA	n	Tiempo (minutos) Vs % Mortalidad									
			0	15	30	45	60	75	90	105	120	135
DDT	Labdacialotrina	62	0	0	0	0	0	0	4,60	6,85	27,30	100
	Malatión	86	0	78,53	100	-	-	-	-	-	-	-
	Propoxur	94	0	28,92	90,71	100	-	-	-	-	-	-
Labdacialotrina	Malatión	80	0	56,3	100	-	-	-	-	-	-	-
	Propoxur	89	0	0	11,38	30,68	41,65	77,50	88,88	100	-	-
Propoxur	Malatión	66	0	27,99	100	-	-	-	-	-	-	-
	Labdacialotrina	52	0	0	0	0	0	11,82	35,79	62,69	94,44	100

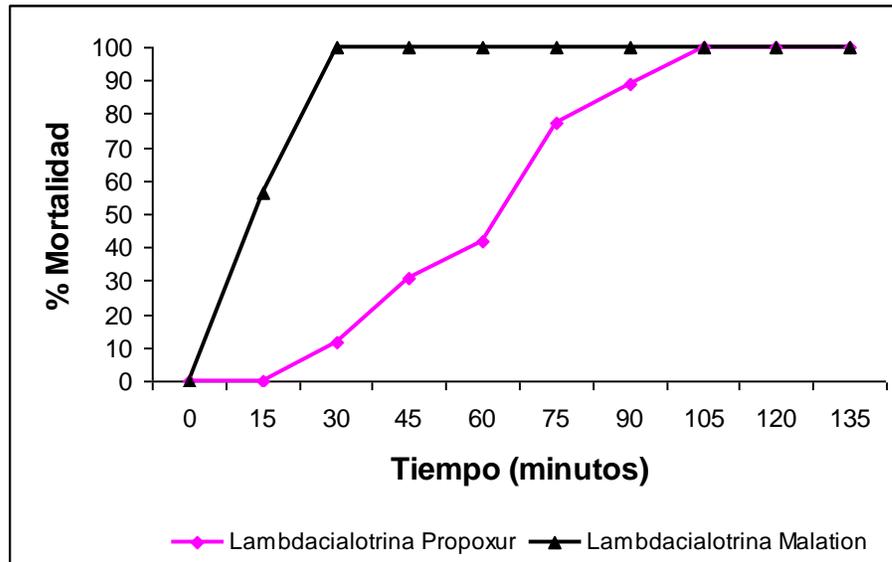
**Figura 36.** Porcentaje de mortalidad de adultos de *Aedes aegypti* de la cepa rockefeller frente a los insecticidas evaluados.



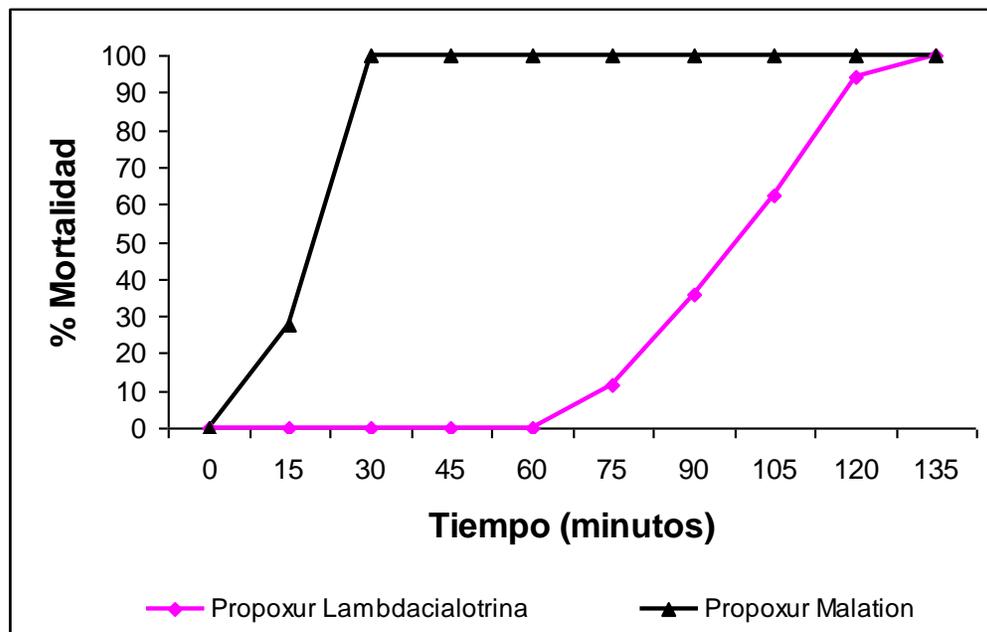
**Figura 37.** Porcentaje de mortalidad de adultos de *Aedes aegypti* de la cepa seleccionada con DDT frente a los insecticidas evaluados.



**Figura 38.** Porcentaje de mortalidad de adultos de *Aedes aegypti* de la cepa seleccionada con lambdacialotrina frente a los insecticidas evaluados.



**Figura 39.** Porcentaje de mortalidad de adultos de *Aedes aegypti* de la cepa seleccionada con propoxur frente a los insecticidas evaluados.



Los porcentajes de mortalidad mostrados por la cepa seleccionada para DDT, evidencian que mantiene niveles de susceptibilidad a los insecticidas propoxur y malatión (Figura 37). Cuando la cepa fue sometida al carbamato propoxur su TL100 solo supero en 10 minutos al registrado por la cepa de referencia. El tiempo registrado por la cepa seleccionada frente al malatión, es igual al que registra la cepa rockefeller para alcanzar el 100% de mortalidad. Caso contrario es lo sucedido con el insecticida lambdacialotrina para el que la cepa DDT muestra niveles de resistencia, con un TL100 aproximadamente 7 veces superior al de la cepa rockefeller (Figura 37).

La cepa presionada por el piretroide lambdacialotrina mantiene susceptibilidad al malatión, el TL100 obtenido para este insecticida es el mismo que registra la cepa rockefeller (Figura 38). Diferente es lo que ocurre frente al propoxur cuya mortalidad total es alcanzada a los 135 minutos, tiempo que es aproximadamente 7 veces superior al de la cepa susceptible.

Niveles de resistencia al insecticida lambdacialotrina, son observados en la cepa presionada por propoxur, cuyo TL100 es aproximadamente 7 veces superior que el de la cepa de referencia (Figura 39). La cepa presionada por propoxur mantiene la susceptibilidad al malatión al igual que las otras cepas.

En general, se puede decir que la presión selectiva por los insecticidas generó relaciones de resistencia cruzada entre los insecticidas propoxur y lambdacialotrina y entre el DDT y lambdacialotrina. Además, ninguno de los insecticidas utilizados ocasiono una disminución en el nivel de susceptibilidad frente al malatión.

## 12 DISCUSION

### 12.1 RESULTADOS PRELIMINARES

En los dos primeros intentos de colonización se realizó la presión selectiva en generaciones consecutivas. Esta metodología de selección permitió observar cambios en la resistencia a través de las generaciones, sin embargo en ambos casos se produjo la pérdida de la cepa en generaciones tempranas debido a la mortalidad total de los individuos. Los resultados preliminares obtenidos, establecieron las bases para implementar la metodología de presión selectiva en generaciones alternas, aplicada en este proyecto. Metodología que permitió alcanzar una filial más alta (F6) (realizada hasta el momento), de la conseguida en los anteriores intentos (F3).

En el primer experimento, la población obtenida de la comuna 16 mostró niveles de resistencia a la Deltametrina, por lo que se considero interesante realizar estudios a partir de esta población. Después de realizar presión selectiva por 2 generaciones con los insecticidas DDT y lambdacialotrina sobre los ejemplares de la población se encontraron resultados interesantes en los niveles de Oxidasas de Función Mixta (OFM) y Esterasas No Especificas (ENE).

El nivel de estas enzimas aumento en la cepa presionada inicialmente por DDT y de forma consecutiva por lambdacialotrina. Este fenómeno pudo deberse a que la presión consecutiva con los insecticidas provocaron una variación en los niveles de resistencia de la cepa que se reflejo en los niveles enzimáticos de los ejemplares. En estudios anteriores, se observó en poblaciones de *A. aegypti* de Cali un aumento en las enzimas OFM y las ENE ante la presión con insecticidas (Ocampo & Wesson, 2004). Aunque esta población de *A. aegypti* mostró cambios en los mecanismos de detoxificación evaluados, se produjo mortalidad total al llegar a la filial 4. Esta mortalidad pudo estar asociada a la presión ejercida de forma consecutiva, con insecticidas de diferentes grupos, lo, que pudo afectar el Fitnes<sup>1</sup> de los ejemplares y ocasionar el declive de la cepa. Se ha documentado que la presión sobre mosquitos de la especie *Culex quinquefasciatus* por algunos insecticidas del grupo de los piretroide y organofosforados afecta negativamente aspectos como la reproducción y el crecimiento poblacional, parámetros determinantes en el mantenimiento de una población (Suárez *et al*, 1998; Ferrari y Georghiou, 1981).

---

<sup>1</sup> Fitnes: palabra en inglés para eficacia biológica, éxito reproductivo, aptitud Darwiniana, valor selectivo o adaptativo.

En el segundo intento de colonización, los resultados iniciales de la población mixta obtenida de la ciudad de Cali evidenciaron niveles de resistencia en cada una de las localidades frente a los insecticidas evaluados, exceptuando al organofosforado malatión al cual presentaron susceptibilidad. Las poblaciones tuvieron alta resistencia al DDT, concordando con los estudios realizados por (Ocampo *et al*, 2007) en los que se encontró resistencia en todas las poblaciones de *A. aegypti* evaluadas de diferentes departamentos del país. Al igual que en la población de la comuna 16, la mortalidad total de los ejemplares impidió que se siguiera con el proceso de selección de esta población. Gracias a los resultados preliminares obtenidos en ambos intentos, se estableció la metodología de presión durante generaciones alternas.

## **12.2 POBLACIÓN MIXTA OBTENIDA DE DIFERENTES LOCALIDADES DE LA CIUDAD DE CALI Y CAMPO ALEGRE -HUILA**

En esta población se implemento la metodología de generaciones alternas. Durante las generaciones presionadas se evaluaron los mecanismos enzimáticos asociados con resistencia y algunos aspectos biológicos. En esta población se logro llegar a la filial 7, confirmando así que la metodología establecida permitía alcanzar una filial más alta a la conseguida en los anteriores intentos.

La evaluación de los niveles de resistencia de la población mixta evidencio que se tenia alta susceptibilidad al malatión y por tanto el establecimiento de una cepa resistente al mismo en la dosis diagnostica establecida no fue posible. Por el contrario la población mostró total resistencia al DDT coincidiendo con los resultados obtenidos previamente en los ejemplares de la comuna 16 y con lo reportado por Ocampo *et al*, 2007 para diferentes poblaciones de *A. aegypti* de Colombia.

Aunque desde el inicio, la población mixta poseía disminución en los niveles de susceptibilidad al propoxur y a lambdacialotrina, el nivel de resistencia aumento a lo largo del proceso de selección. El LT50 y el LT100 de las cepas seleccionadas con ambos insecticidas aumento en las generaciones presionadas; para la filial 5 el LT100 de la cepa seleccionada con lambdacialotrina fué 13 veces superior al de la cepa susceptible Rockefeller y aproximadamente 2 veces superior al de la población mixta F1 sin seleccionar. Resultados que coinciden con lo registrado en estudios para algunas especies como lo fue una población de la especie *An. albimanus* en Tailandia, la cual después de ser sometida a selección por un

piretroide (Deltametrina) durante varias generaciones aumento 3 veces su TL90 en relación a la población parental (Chareonviriyaphap *et al*, 2002).

La cepa seleccionada con propoxur aumento su TL50 y TL100 durante la presión selectiva, y alcanzó un valor de alrededor de 10 veces por encima del TL50 de la cepa control Rockefeller. La presión por este insecticida genero un TL100 9 veces superior que el de la cepa control, resultados interesantes si se tiene en cuenta que no existen muchos registros sobre la selección con carbamatos en poblaciones de mosquitos en condiciones de laboratorio.

Por su parte, la selección con el DDT no mostró variaciones en el proceso de selección durante el período evaluado (24 horas). Por lo tanto no se pudo calcular si hubo cambios en el TL50 y TL100. La baja mortalidad en esta cepa comparada con la cepa Rockefeller (TL100 = 30 min) indican que posee una alta resistencia a este insecticida. Estos hallazgos, junto con los resultados del estudio realizado en varios Departamentos del país, donde todas las poblaciones presentaron alta resistencia al DDT (Ocampo *et al.*, 2007) sugieren que la resistencia al DDT encontrada en las poblaciones de *A. aegypti* de Colombia es una resistencia que posiblemente esté fijada genéticamente.

Los cambios en los niveles de resistencia en *A. aegypti* observados en este trabajo y los registros de resistencia reportados por la Dra. Ocampo, sugieren que esta especie en Colombia presenta características que pueden favorecer la emergencia de resistencia cuando son presionadas por nuevos insecticidas.

Los niveles de resistencia alcanzados por las cepas no pueden ser explicados por los mecanismos enzimáticos evaluados en este trabajo, ya que las pruebas bioquímicas realizadas a la población mixta no mostraron aumento en el nivel de las OFM y ENE o presencia de individuos con ACEM durante el proceso de selección. Los niveles enzimáticos comparables con la cepa susceptible Rockefeller, obtenidos de cada una de las cepas seleccionadas, pueden deberse a que los mecanismos utilizados por la población para la detoxificación de los insecticidas son diferentes a los evaluados. Esto se ha observado en otros estudios, donde mosquitos del genero *Anopheles* presentaron resistencia a organoclorados y píretroides debido a otros mecanismos como son la detoxificación realizada por las Glutation transferasas (GST) (Kostaropoulos *et al.*, 2001; David *et al*, 2005) o a la mutación del gen *kdr* (Ranson *et al*, 2000). Sin embargo los resultados obtenidos en este estudio no nos permiten sugerir otros mecanismos que podrían estar involucrados.

Aunque la presión selectiva realizada con los insecticidas DDT, lambdacialotrina y propoxur no mostró aumento en los niveles enzimáticos de la población, si evidencio relaciones de resistencia cruzada por parte de cada una de las cepas.

En la selección por DDT después de 3 presiones en generaciones alternas la evaluación de la cepa mostró niveles de resistencia al insecticida lambdacialotrina, resultados que coinciden con los reportes realizados para una cepa de *A. aegypti* de Puerto Rico donde se asocio la resistencia a piretroides con la presión ejercida por el organoclorado DDT (Hemingway *et .al*, 1989).

Tanto las cepas seleccionadas con DDT como la seleccionada por propoxur dejaron ver niveles de resistencia cruzada con el insecticida lambdacialotrina. Sin embargo, se observó que la curva de mortalidad a este piretroide es menor que el mostrado inicialmente por la población F1 sin seleccionar. La selección por propoxur no genero resistencia al organofosforado Malatión. Este resultado es interesante, ya que en estudios anteriores se encontró que ambos insecticidas mostraban relaciones de resistencia cruzada y el mismo mecanismo de detoxificación (OFM y ENE) (Mazzari, 1995; Rodríguez, 1998). Nuestros resultados sugieren que es otro mecanismo el que está produciendo resistencia al propoxur en nuestras poblaciones.

Por su parte, la presión con lambdacialotrina mostró relaciones de resistencia con el carbamato propoxur. El TL100 de la cepa seleccionada con lambdacialotrina presentó una resistencia cruzada frente al propoxur de aproximadamente 5 veces superior al de la cepa Rockefeller. Resultados interesantes para futuros trabajos, si se tiene en cuenta que no existen muchos estudios que asocien la resistencia entre carbamatos y piretroides. La selección con lambdacialotrina no genero resistencia al organofosforado Malatión, resultados que difieren de los reportados para otras especies de mosquitos como *C. quinquefasciatus* en el cual se ha encontrado estrechas relaciones de resistencia entre los piretroides y organofosforados (Rodríguez *et al*, 1998).

Los niveles de resistencia obtenidos en cada una de las cepas produjeron resistencia cruzada con los otros insecticidas evaluados. No obstante, los TL100 de las cepas seleccionadas frente a los otros insecticidas no superaron a los mostrados por la población mixta F1 sin seleccionar al inicio del proceso de presión selectiva.

Además de la evaluación de los niveles y mecanismos de resistencia, en el estudio se midieron algunas variables biológicas a lo largo del proceso de selección. Con estas observaciones se pretendía evaluar el efecto que podría tener el fenómeno de resistencia en el fitness de las cepas. Aspectos como la eclosión de las cepas evidenciaron diferencias significativas entre ellas ( $p < 0,00$ ). Aunque en todas las cepas se observó que no todos los huevos eclosionan, sí se observó una menor eclosión en las cepas seleccionadas y un aumento en el tiempo de eclosión. Se sugiere que estas diferencias son debido al proceso de colonización de las cepas.

La mortalidad de los diferentes estadios entre las cepas no reveló diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre ellas cuando se compararon las cepas sin tener en cuenta las filiales. Sin embargo, sí se encontraron algunas diferencias significativas en algunos estadios de las filiales sugiriendo que pueden ser producto de la colonización, como ha sido sugerido para otras poblaciones de mosquitos sometidas a presión por diversos factores (Hardy *et al*, 1978).

La supervivencia graficada para cada una de las cepas, muestra una tendencia hacia la curva tipo IV, descrita en el marco teórico. Esto debido a que durante la primera etapa de los ejemplares ocurre una caída brusca que corresponde a la eclosión de huevos, una vez superada esta etapa la mortalidad se reduce en grado considerable y la supervivencia es casi constante (Rabinovich, 1972).

La evaluación final realizada al grupo de ejemplares de la filial 5 de las cepas presionadas que permitió realizar comparaciones en el promedio de huevos y longevidad de las cepas con la población mixta F1 y la cepa rockefeller. Mostró que el promedio de huevos encontrado en la cepa control y la población mixta es mayor al de las cepas seleccionadas y que además estos difieren significativamente entre sí ( $p < 0,00$ ). Resultados que sugieren un efecto en la fecundidad por la presión selectiva con insecticidas.

Estos resultados de fecundidad coinciden con estudios realizados en otras especies de mosquitos del género *Culex*, en los que se observó un efecto negativo por la presión con insecticidas en la fecundidad de los mosquitos. Al igual, que en lo encontrado en este trabajo, el número de huevos disminuyó significativamente después de realizar presión con insecticidas piretroides y organofosforados (Ferrari y Georghiou, 1981; Suárez *et al*, 1998).

El promedio de días de duración de vida de cada una de las cepas no mostró diferencias significativas entre las cepas seleccionadas con la cepa Rockefeller y la población mixta parental ( $p > 0,05$ ). Por tanto, no se puede establecer que la presión por insecticidas en este trabajo tenga un efecto sobre la longevidad de los ejemplares, lo que difiere de algunos resultados presentados para otras especies en las que se reportó un aumento en la longevidad de los mosquitos después de ser sometidos a presión por insecticidas (Suárez *et al*, 1998; Vasuki, 1992).

El proceso de selección implementado durante este trabajo permitió observar varios aspectos importantes en la utilización de insecticidas. El aumento en el nivel de resistencia y las relaciones de resistencia cruzada encontradas, nos pueden sugerir algunos de los efectos que podría tener la continua presión por insecticidas en poblaciones de campo en el país. Lo que es importante, si se tiene en cuenta, que la utilización de insecticidas es la estrategia de control más utilizada para el

manejo de vectores, incluyendo *A. aegypti*. El aumento en el TL50 y el TL100 de las cepas seleccionadas muestra como la presión en corto tiempo con el mismo insecticida, nos puede llevar a alcanzar altos niveles de resistencia. Esto representa un problema cuando se evalúan algunos de los manejos de insecticidas realizados, en donde se utilizan los mismos químicos por largos periodos de tiempo.

Un claro ejemplo, es el caso del DDT, insecticida manejado en las campañas realizadas para la erradicación de *A. aegypti* durante los años 50s (OMS, 2004) que resultaron en la resistencia a este insecticida. Los hallazgos encontrados en este trabajo y los reportados por Ocampo *et al* (2007, en preparación), demuestran una clara persistencia de la resistencia al insecticida en las poblaciones de *A. aegypti* evaluadas, a pesar de que no se usa en el país para el control de este vector desde los años 70s. Resistencia que debido a sus características podría estar fijada en la población, por lo cual la utilización del DDT como estrategia de control para *A. aegypti* ya no sería viable.

En el caso de los mecanismos de detoxificación evaluados, no se observaron variaciones en las enzimas evaluadas, no obstante la metodología realizada permitió obtener cepas con altos niveles de resistencia. Por lo que los ejemplares podrían ser utilizados en futuros estudios que evalúen otros mecanismos que puedan estar involucrados en el nivel de resistencia alcanzado por las cepas. De igual forma, las cepas pueden ser objeto de estudio para obtener un mayor entendimiento de la resistencia a nivel genético y molecular en las poblaciones del país,

Los resultados de este trabajo, constituyen un aporte al entendimiento del efecto de la presión selectiva por insecticidas. Adicionalmente, las cepas seleccionadas a los diferentes insecticidas podrán ser la base para averiguar en futuros estudios, cuales son los mecanismos de resistencia asociados. Estos estudios serán de mucha importancia para el país ya que en este trabajo, como en el previo de la red de resistencia a insecticidas realizado recientemente en el país, se revela que existen otros mecanismos, no conocidos, asociados con la resistencia a piretroides y carbamatos. Los resultados de este trabajo que identifican la facilidad con que nuestras poblaciones de *A. aegypti* pueden generar resistencia, sugieren que se debe tener un uso adecuado de los insecticidas en el país. Así mismo, abre la necesidad de buscar nuevas estrategias para el control vectorial que disminuyan la presión ejercida por los insecticidas actuales.

### 13 CONCLUSIONES

La colonización se hizo a partir de una población mixta (F1) obtenida de la mezcla de larvas de diferentes sitios de Cali y Campoalegre (Huila). Esta población mostró un porcentaje de eclosión del 84%, el cual disminuyó a lo largo del proceso de selección.

La población mixta mostró susceptibilidad completa al malatión, por lo cual no se realizó selección con este insecticida.

La población mixta mostró resistencia completa al DDT. Sin embargo, se continuó presionando con este insecticida para evaluar cambios a nivel biológico y enzimático.

Los insecticidas lambdacialotrina y propoxur generaron aumento en el TL50 y TL100 de las cepas a lo largo del proceso de selección, lo que generó que durante la filial 5 se obtuvieran cepas con un alto nivel de resistencia a ambos insecticidas. Este nivel de resistencia no estuvo asociado a ninguno de los mecanismos enzimáticos evaluados.

La presión con DDT no generó variaciones significativas en el TL50 y TL100 así como tampoco evidenció aumento significativo en los niveles de OFM y ENE en la cepa estudiada. Estos resultados como los reportados en el trabajo de la red de resistencia a insecticidas, sugieren que la resistencia al DDT insecticida puede estar fijada genéticamente en la población de *A. aegypti*.

Los porcentajes de eclosión de las cepas de *A. aegypti* presionadas por propoxur y DDT mostraron disminución a lo largo de la selección, lo que influyó directamente en el número de individuos utilizados en los bioensayos. La disminución en la eficacia de la eclosión puede deberse tanto a la presión de selección ejercida (efecto compensatorio o *trade off*) o al proceso de colonización en sí.

Los niveles de enzimas evaluadas (OFM, ENE y ACEM), no aumentaron significativamente a lo largo del proceso de selección. Probablemente se necesite continuar la selección durante más generaciones o la resistencia a insecticidas en esta población este siendo mediada por un mecanismo enzimático diferente.

La presión selectiva por insecticidas tuvo un efecto negativo sobre la fecundidad de las cepas. Las hembras de las cepas seleccionadas mostraron

un menor número de huevos comparado con los de la cepa rockefeller y población mixta F1 sin seleccionar.

No se presentaron diferencias significativas entre la longevidad de las cepas, por tanto no se puede establecer que la selección con insecticidas posea un efecto sobre la longevidad de las cepas.

El porcentaje de eclosión de las cepas seleccionadas fue menor al presentado por la cepa control Rockefeller y la población mixta filial 1, lo que sugiere que la presión por insecticidas produce un efecto negativo sobre la eclosión de los huevos.

La presión por DDT y propoxur generó resistencia cruzada con el piretroide lambda-cialotrina. Así mismo la selección realizada con el insecticida lambda-cialotrina resultó en relaciones de resistencia al carbamato propoxur. Ninguna de las cepas seleccionadas mostró resistencia cruzada al organofosforado malatión.

## BIBLIOGRAFIA

- ANTHONY, N *et al.* French-Constant, R. Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. FEBS Letters. (1995); p. 461-465.
- ARCE, H.M; ZAMAR M.I y NEDER, L. Tabla de vida y fecundidad de *Gargaphia torresi* costa Lima (Hemiptera: Tingidae) sobre girasol. Idesia. Vol.24, No.1 (2006); p. 37-40. ISSN 0718-3429.
- ASHBURN, P y CRAIG, C. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever infeccions. Vol 4 (1907); p. 325-440.
- BELLO, B; OLANO, V.A y PINZÓN, E. Distribución actualizada del mosquito *Aedes aegypti*, vector del dengue en Colombia. Laboratorio de Entomología, RNL, Instituto Nacional de Salud, Bogotá. Ministerio de la Protección Social. Bogotá. (2002).
- BISSETL, J.A. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Revista Cubana Medica Tropical . Vol.54, No.3 (sep.-dic. 2002); p.202-219. ISSN 0375-0760.
- BISSETL, J *et al.*, Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides in the southern house mosquito (Diptera:Culicidae) from Cuba. Journal of Medical Entomology. Vol 34, (1997); p. 244-246.
- BLOOMQUIST J.R. Insecticides: Chemistries and characteristics. En: National IPM network. University of Minnessota. (1999).
- BOSHELL, J *et al.* Dengue en Colombia. Biomédica. Vol. 6, No. 3-4 (1986); p. 101-105.
- BRATTSSEN, L.B *et al.* Insecticide resistance: Challenge to pest Management and basic research. Science. Vol 231 ( 2002) ; p. 1255-1260.
- BROGDON W.G. Microassay of acetylcholinesterase activitin small portions of single mosquito homogenates. Comp. Biochem Physiol. Vol. 90 (1988); p. 145-50.
- BROGDON, W.G. Biochemical resistance detection an alternative to bioassay. Parasitology Today. Vol.5 (1989); p. 56-60.
- BROGDON, W.G y MCALLISTER, J.C. Insecticide Resistance and Vector Control. Emerging Infectious Diseases. Vol. 4, No. 4 (1998); p. 605-613.
- BROGDON, W.G. Oxidase-Based DDT–Pyrethroid Cross-Resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. Pestic. Biochemic. Physiol. Vol 64 (1999); p. 101-111
- BROOKE, B.D *et al.* Bioassay and bioquemical analysis of insecticide resistance in southern African *Anopheles funestus* (Diptera:Culicidae). Bull Entomol. Res.Vol 91, (2001); p. 265-272.
- BROWN, A.W. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J Am Mosq Control Assoc.* Vol. 2 (1986); p. 123-162.

- CARDONA, C. Resistencia de insectos a insecticidas: Naturaleza, principios e implicaciones en el control de insectos. Miscelanea: Sociedad Colombiana de Entomologia. No 1. (1985); p. 2-7.
- CYGLER, M *et al.* Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. *Protein Sci.* Vol. 2 (1993); p. 366-382.
- CHAREONVIRIYAPHAP, T; RONGNOPARUT, P and JUNTARUMPORN, P. Selection for pyrethroid in a colony of *Anopheles minimus* species A, a malaria vector in Thailand. *Journal of Vector Ecology.* (2002); p. 226-229.
- CHIPARELLI, H. Dengue, una enfermedad emergente muy cerca de nuestro país. Montevideo, Uruguay. En URL: [www.infecto.edu.uy](http://www.infecto.edu.uy). (2005).
- CHEN, W.J *et al.* Vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) to Dengue 1 virus on Taiwan: Development of the Virus in orally and parenterally infected Mosquitoes. *J. Med. Entomol.* Vol. 30, No. 3 (1993); p. 524-530.
- CDC. Dengue fever. División of vector-borne infectious diseases. En URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/index.htm>. (2005)
- CYGLER, M *et al.* Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. *Protein Sci.* Vol. 2 (1993); p. 366-382.
- DAVID J. P *et al.* The *Anopheles gambiae* detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *PNAS office.* Vol. 12, No. 11. (2005); p. 4080-4084.
- DEEVEY, E. Life tables for natural populations of animals. *Q. Rev. Biol.* Vol. 22 (1947); p. 283–314.
- FAO. Pest resistance to pesticide in agriculture. Importance, recognition and countermeasures. En: Rome FAO.(1970); p. 32.
- FERRARI, J. Insecticide resistance. En : *The Biology of Disease Vectors.* Beaty B, Marquardt WC, eds. *The Biology of Disease Vectors.* Niwot, CO: University Press of Colorado. (1996); p.632.
- FERRARI, J.A y GEORGHIOU, G.P. Effect of insecticidal selection and treatment on reproductive potential of resistant, susceptible and heterozygous strains of the Southern house mosquito. *J Econ Entomol.* Vol 74 (1981); p. 323-327.
- FERRARI, J.A y GEORGHIOU, G.P. Esterase B1 activity Variation within and among insecticide resistant, susceptible and heterozygous Strains of *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). *J.Econ.Entomol.* Vol 83, No 5 (1990); p. 1704-1710.
- FEYEREISEN, R. Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicology letters.*(1995); p.83-90.
- FLORES, A.E; BADI M.H y PONCE, G. Resistencia a insecticidas en insectos vectores de enfermedades con énfasis en mosquitos. *Revista de salud pública y nutrición.* Vol. 2, No.4 (Oct-Dic 2001); p. 5-10

- FOSTER, W.A and WALKER, E. Mosquitoes (Culicidae). Medical and Veterinary Entomology. Elsevier Science (USA). (2002); p. 203-205.
- FOURNIER, D *et al.* Insect glutathione-S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistance to insecticide. J. Biol.Chem. Vol. 287 (1992); p. 1840-1845.
- FOX, I and GARCÍA, M.I. Multi-resistant *Aedes aegypti* in Puerto Rico and Virgin islands. Science. (1961); p.233:646.
- GIBBONS, R.V and VAUGHN, D.W. Dengue: an escalating problem. Clinical review. BMJ. Vol. 321, No. 29 (2002); p.1563-1566.
- GRANT, D.F; DIETZE, E.C and HAMMOCK, B.D. Glutathione Stransferase isoenzymes in *Aedes aegypti*: purification, characterization and isozyme specific regulation. Ins Biochem. Vol. 4 (1991); p. 421-33.
- GUBLER, D.J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Clinical Microbiology Reviews. Vol.11, No 3 (1998); p. 480-496.
- GUZMAN, M.G; KOURI, G y BRAVO, J.R. La emergencia de la fiebre hemorrágica del dengue en las Américas. Reemergencia del dengue. Rev Cubana Med Trop. Vol. 51 (1999); p. 5-13.
- GONZÁLEZ, G.; CABRALES, C. C y RINCÓN, B. Dengue y Dengue Hemorrágico. Revista de los Estudiantes de Medicina de la Universidad Industrial de Santander. MEDICAS UIS. Vol. 12. (Nov. –Dic. 1998); p. 327-332.
- HARDY, J. L *et al.* Selection of a strain of *Culex tarsalis* highly resistant to infection following ingestion of western equine encephalomyelitis virus. The American journal of tropical medicine and hygiene. Vol. 27, No 2 (1978); p. 313- 319.
- HEMINGWAY, J; BODDINGTON, R.G and HARRIS J. Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) from Puerto rico. Bull.ent.res. Vol. 79 (1989); p.123-130
- HEMINGWAY, J and RANSON, H. Insecticide resistance in Insects vectors of human disease. Annu Rev Entomol. Vol 45 (2000); p. 371-379.
- INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMITÉ. Insecticide resistance: causes and Management. En URRI:<http://www.irac-online.org>.
- ISTURIZ, R.E; GUBLER D.J and BREA, J. Dengue And dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. Infect Dis Clinics North Am. Vol. 14 (2000); p. 121-140.
- KARUNARATNE, S.H and HEMINGWAY, J. Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterasemechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. Bulletin of the World Health Organization. Vol. 79, No 11 (2001); p.1060-1064.
- KOSTAROPOULOS, I *et al.* Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. Insect Biochem Mol Biol. Vol. 31 (2001); p.313-319.

- KUNO, G and GUBLER, D.J. Factors influencing the transmission of dengue viruses. G, eds. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. London: CAB International. (1997); p. 61-68.
- LALAH, J.O *et al.* Glutathione S-transferases: alpha-naphthyl acetate activity and possible role in insecticide resistance. J Econ Entomol . Vol. 88 (1995); p. 768-70.
- LORENZ, B *et al.* The Effect Of Colonization Upon *Aedes aegypti* Susceptibility To Oral Infection With Yellow Fever Virus. J. Trop. Med. Hyg. Vol. 33, No 4 (1984); p. 494-690.
- MILLER, T.A. Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticides. Parasitology Today. Vol. 4 (1988); p. 8-12.
- MARTÍNEZ, E. Dengue y dengue hemorrágico. Editorial Universidad Nacional de Quilmes. Jacc Impresores S.A., Buenos Aires.(1998); p. 269 .
- MAZZARI, M.B. *Aedes aegypti* a insecticidas utilizados en salud publica. Boletín de la direccion de malorologia y saneamiento ambiental-Colombia. No 35 (1995); p.90-95.
- MAZARRI, M.B and GEORGHIU. G.P. Characterization of resistance to organophosphate carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezulea. J Am Mosq Control Assoc. Vol 5 (1995); ;p. 315-22.
- MELANDER, A. L. Can insect become resistant to spray? J. Econ. Entomol. (1914); p. 7,167.
- MONATH, T. P., HEINZ, F. X. Flavivirus. En: Fields Virology. FIELDS, B.N *etal*, Editors. 3 ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. (1996); p. 961-1034.
- MORALES, A; OLANO, V.A & FERRO,C. Laboratorio de Entomología,1934-1997.En: 80 años del INS. Una historia, Un compromiso. INS.Bogota.(1998); p.414
- MOURYA, D and HEMINGWAY, H. Changes in enzyme titres with age in four geographical strins of *Aedes aegypti* and their association with insecticide resistance. Medical and veterinary Entomology. Vol 7 (1993); p.11-16.
- NARAHASHI, T. Nerve membrane ionic channels as the primary target of pyrethroids. Neurotoxicology.Vol.6 (1985); p. 3-22.
- NATIONAL ACADEMY Of SCIENCES. Vector resistance. En URRL: <http://www.nap.edu/catalog/10651.html>.
- NORMAN, G. Emerging and resurging vector-borne diseases.Annu.Rev.Entomol. Vol. 44. (1999); p. 51-75.
- OCAMPO, C and Wesson, D. Understanding the role of *Aedes aegypti* en dengue transmission in Cali (Colombia) : Population genetics. insecticide resistance, and vector competence. Am J. Trop. Med. Hyg. Vol. 65 (2001); p.480

OCAMPO, C and Wesson, D. Population dynamics of *Aedes aegypti* from Dengue hyper-endemic urban setting in Colombia. Am J. Trop. Med. Hyg. Vol. 71 No. 4 (2004); p.506-13.

OCAMPO, C. Biochemical mechanism of insecticide resistance in *Aedes aegypti* from Cali, Colombia. En:65 annual meeting of the American mosquito control association.(1999); p. 21-24.

OCAMPO, C *et al.* Informe final: Evaluación del estado actual de la resistencia a insecticidas de los principales vectores de malaria, dengue y Fiebre amarilla urbana en Colombia e iniciación de la red nacional de vigilancia de la resistencia a insecticidas. CIDEIM. Cali: sn, 2007. p. 4-174.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Dengue haemorrhagic fever, diagnosis, treatment, prevention and control, OMS.No 2 (1997).

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Number of Reported Cases of Dengue & Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion). En URL: [www.paho.org](http://www.paho.org). (2004).

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Situación de la salud en las Américas, indicadores básicos, OMS, 2 ed, (2005).

OPS. Informe ops/hcp/hct/96.066. Taller para la promoción del combate al *Aedes aegypti*/Dengue. Asunción, Paraguay. (1996).

OPS. El dengue y la fiebre hemorrágica de dengue en las Américas: una visión general del problema. Boletín Epidemiológico. Vol 13, No. 1 (1992); p.10 -19.

OPS. Resurgimiento del dengue en las Américas. Boletín Epidemiológico. Vol. 18, No. 2 (1997); p. 1-6.

OPS. La Salud en las Americas. Publicacion cientfica. Washington, DC. Vol. I, No 569 (1998).

OPS. Definiciones de Casos. Dengue. Boletín Epidemiológico. Vol 21, No. (2000); p.14-15 .

OPS. Retorno del Dengue a las Américas, Llamada De Alerta A Los Sistemas De Vigilancia. Washington, DC. En URL: <http://www.paho.org/Spanish/DPI/100/100feature08.htm>. No, 21. (2002).

ORTEGA, M y MARZAL, M. Dengue : una revision.curso latinoamericano sobre enfermedades infecciosas.instituto de biomedicina.caracas venezuela.( 2004).

PADILLA, J.C *et al.* Diagnóstico y terapéutica de las enfermedades transmitidas por vectores en Colombia. Sociedad Colombiana de Parasitología y Medicina Tropical. (1999). p. 89-106.

PAHO - Pan American Health Organization. Re-emergence of Dengue in the Americas. Epidemiological Bulletin. Vol. 18, No. 2 (1997).

PAHO. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control. Scientific Publication. Washington. No. 548 (1994); p. 98.

RABINOVICH, J. E. Mortalidad y Tablas de vida. En: Ecología de Poblaciones Animales. Monografía. Organización Panamericana de la Salud. (1978); p. 39-60.

RABINOVICH, J. E. 1980. Introducción a la ecología de poblaciones animales. Editorial CECSA. Caracas- Venezuela. Capítulo 5 (1980); p. 313.

RANSON, H.B *et al.* Identification of a point mutation the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. Insect Mol Biol. Vol 9 (2000); p.491-497

RAYMOND, M. Detoxification esterases new to California, USA, in organophosphate resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. Vol. 24 (1987); p. 24-29.

REINER, E. Spontaneous reactivation of phosphorylated and carbamylated cholinesterases. Bull Entomol Res .Vol. 44 (1971); p.109-12.

RODHAIN, F. 1996. The situation of dengue in the world. Bull Soc Pathol Exot. Vol. 89, No.2; p. 87-90.

RODRÍGUEZ, M *et al.* Asociación de la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides con los mecanismos de resistencia observados en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Ciudad de La Habana. Rev .Cub Med Trop.Vol 47 (1995); p.154-9

RODRIGUEZ, M *et al.* Selección de una cepa de *Culex quinquefasciatus* resistente a lambdacialotrina y su espectro de resistencia cruzada a otros insecticidas. Rev Cubana Med Trop, M. Vol. 50, No.2 (1998); p.129-132. ISSN 0375-0760.

RODRIGUEZ, M *et al.* Malation resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* alter its use in *Aedes aegypti* control programs. J Am Mosq Control Assoc. Vol. 16 (2000); p. 324-330

RODRÍGUEZ, M *et al.* Resistencia cruzada a piretroides en *Aedes aegypti* de Cuba inducido por la selección con el insecticida organofosforado malation. Rev Cubana Med Trop. Vol. 55 (2003); p.105-11

RODRIGUEZ, M *et al.* Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. Rev Cubana Med Trop. Vol.56 (2004); p.54-60.

SALVATELLA A.R. *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)(Diptera, Culicidae), el vector del dengue y la fiebre amarilla. Instituto de higiene Universidad de la República Facultad de Medicina.Montevideo-Uruguay. (1997).

SECRETARIA DE SALUD DE MEXICO. Control del Dengue y Participación Comunitaria. En URL: [www.cenave.gov.mx](http://www.cenave.gov.mx). (2005).

SIVIGILA. Ministerio de salud. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana Epidemiológica N° 2. (2000-2002).

SIVIGILA (Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública). Boletín Epidemiológico Semanal. Semana Epidemiológica N° 2. (ene. 2002).

SOTOLONGO, M.G y VIDAL, A.N. Metabolismo y excreción de los compuestos extraños en: Elementos de Toxicología. La Habana: Editorial Pueblo y Educación. (1988); p.11-12.

SUÁREZ, S *et al.* Efecto de la resistencia a los insecticidas sobre algunos parámetros demográficos de 3 cepas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae), en condiciones de laboratorio. Rev Cubana Med Trop. Vol.50 (1998); p.124-128.

SUÁREZ, M.F *et al.* First record of DDTresistance in *Anopheles darlingi*.J.Am.Mosq.Control Assoc. Vol 6, No 1 (1990); p. 72-74

TERRIERE, C.L. Induction of detoxication enzymes in insects. Ann Rev Entomol .Vol 29 (1984); p.71-78.

TORRES, J. El dengue en América Latina: ¿una situación única. Monografía. (2000).

VASUKI, V. Adult longevity of certain mosquito species after larval and pupal exposure to sublethal concentration of an insect grow regulator, hexaflumuron. South Asian J Trop Med Public Health.Vol. 23, No 1 (1992); p. 121-4.

WIRTH, M.C and GEORGHIOU, G.P. Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, British Virgin Islands. J Am Mosq Control Assoc. Vol. 15, No 3 (1999); p. 315-320.

WHO. Instructions for Determining the Susceptibility or Resistance of Adult Mosquitoes to Organochlorine, Organophosphorous and Carbamate Insecticides, Unpublished document. (1981); p.

UCLAF, Roussel. Deltametrin. Monografía. (1983).

## ANEXOS

### Anexo 1. FORMATO DE PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE MOSQUITOS ADULTOS A INSECTICIDAS BOTELLAS CDC

Departamento:		Municipio:		Localidad:	
Fecha de la prueba:		Hora de la prueba:		Responsable:	
Tipo de insecticida:		Nombre del insecticida:		Concentración:	
Especie de mosquito:		Bioensayo N°:		Fecha de impregnación:	
Fecha de expiración:		No. de usos de la botella:		# de insectos por botella:	
Temp. Maxima:		Humedad Relativa:		Edad mosquitos:	

Tiempo (min.)	Botella 1		Botella 2		Botella 3		Botella 4		Control	
	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos
0										
5										
10										
15										
20										
25										
30										
35										
40										
45										
50										
55										
60										
Mortalidad 100%. T= ( ) min		( )		( )		( )		( )		
<b>TOTAL (hembras y machos)</b>										

**OBSERVACIONES:**

---



---



---



---



---



**Anexo 3.** Análisis estadístico a Pruebas bioquímicas de la población proveniente Comuna 16.

Test de Kruskal Wallis para establecer evaluar las diferencias entre las cepas y sus filiales.

**a.** Oxidasas de Función Mixta

INSEC2	N	Mean Rank
O1000	.00	120 276.81
	1.00	90 178.79
	3.00	60 202.82
	4.00	60 247.64
	5.00	60 134.50
	6.00	31 418.11
	7.00	30 151.93
	Total	451

Test Statistics

	O1000
Chi-Square	140.207
df	6
Asymp. Sig.	.000

**b.** Esterasas no específicas.

INSEC2	N	Mean Rank
PNE .00	120	139.79
	1.00	90 317.29
	3.00	60 210.22
	4.00	60 243.27
	5.00	30 92.77
	6.00	31 371.19
	7.00	30 66.70
	Total	421

Test Statistics

Chi-Square	238.256
df	6
Asymp. Sig.	.000

**Anexo 4.** Análisis estadístico a Pruebas bioquímicas de la población mixta F1 y cepas seleccionadas.

Test de Kruskal Wallis para evaluar las diferencias en los niveles enzimáticos entre las cepas y sus filiales

**a . Proteínas**

	INSEC2	N	Mean Rank
PRPN .00	132	360.95	
	1.00	59	278.89
	2.00	121	188.95
	3.00	108	285.03
	4.00	120	236.02
	Total	540	

Test Statistics

	PRPN
Chi-Square	84.381
df	4
Asymp. Sig.	.000

**b. Oxidasas de Función Mixta**

	INSEC2	N	Mean Rank
O1000	.00	132	317.23
	1.00	59	339.17
	2.00	121	164.07
	3.00	78	246.99
	4.00	90	160.41
	Total	480	

Test Statistics

	O1000
Chi-Square	137.174
df	4
Asymp. Sig.	.000

c. Esterasas no específicas.

<b>INSEC2</b>	<b>N</b>	<b>Mean RankS</b>
PNE .00	132	268.27
1.00	59	293.35
2.00	121	236.44
3.00	108	249.33
4.00	90	244.98
Total	510	

Test Statistics  
 Chi-Square 7.554  
 df 4  
 Asymp. Sig. .109

d. Acetilcolinesterasa Modificada

	<b>INSEC2</b>	<b>N</b>	<b>Mean Rank</b>
AC10A0	.00	70	215.71
	1.00	22	271.34
	2.00	89	136.75
	3.00	92	192.08
	4.00	88	163.98
	Total	361	

e. Proteinas

	<b>GEN</b>	<b>N</b>	<b>Mean Rank</b>
PRPN 0	132	360.95	
	1	59	278.89
	3	181	246.27
	5	168	222.58
	Total	540	

Test Statistics  
 PRPN  
 Chi-Square 64.742  
 df 3  
 Asymp. Sig. .000

## F. Oxidasas de Función Mixta

GEN	N	Mean Rank
O1000	0	132 317.23
	1	59 339.17
	3	181 196.43
	5	108 166.66
	Total	480

Test Statistics  
Chi-Square 119.125  
df 3  
Asymp. Sig. .000

## g. Esterasas no especificas.

GEN	N	Mean Rank
PNE	0	132 268.27
	1	59 293.35
	3	151 303.39
	5	168 189.13
	Total	510

Chi-Square 54.904  
df 3  
Asymp. Sig. .000

#### h. Acetilcolinesterasa Modificada

	GEN	N	Mean Rank
O1000	0	132	317.23
	1	59	339.17
	3	181	196.43
	5	108	166.66
	Total	480	

#### Test Statistics

	O1000
Chi-Square	119.125
df	3
Asymp. Sig.	.000

**Anexo 5.** Tabla de vida horizontal de Cepa Rockefeller y Población mixta sin seleccionar (Parental y filial 1).

**Tabla 14.** Tabla de vida horizontal para *Ae. aegypti* cepa Rockefeller.

ETAPA	n	lx	dx	qx	m
Huevo	300	1,000	52	0,17	17,33
Larva I	248	0,826	0	0	0
Larva II	248	0,826	0	0	0
Larva III	248	0,826	0	0	0
Larva IV	248	0,826	0	0	0
Pupas	248	0,826	0	0	0
Adultos	200	0,666	48	0,24	19,35

**Tabla 15.** Tabla de vida horizontal para *Ae. aegypti* parentales (Cali)

ETAPA	n	lx	dx	qx	m
Huevo*					
Larva I	63	1,000	0	0	0
Larva II	63	1,000	0	0	0
Larva III	63	1,000	0	0	0
Larva IV	63	1,000	0	0	0
Pupas	63	1,000	0	0	0
Adultos	63	1,000	0	0	0

\* El seguimiento se hizo a partir del estadio de larva I porque fue el material recolectado en la Ciudad de Cali.

**Tabla 16.** Tabla de vida horizontal para *Ae aegypti*. Población mixta (F1).

ETAPA	n	Lx	dx	qx	m
Huevo	250	1,000	58	0,23	23,2
Larva I	192	0,768	0	0,30	0
Larva II	192	0,768	0	0	0
Larva III	192	0,768	0	0	0
Larva IV	192	0,768	0	0	0
Pupas	192	0,768	0	0	0
Adultos	160	0,64	32	0,2	12,8

**Anexo 6.** Tabla de vida horizontal de Cepas seleccionadas con DDT, lambdacialotrina y propoxur.

**Tabla 17.** Tabla de vida horizontal *Ae. aegypti*. Cepa seleccionada con DDT F3.

ETAPA	n	lx	dx	qx	m
Huevo	677	1,000	207	0,30	30,5
Larva I	470	0,694	0	0	0
Larva II	470	0,694	0	0	0
Larva III	470	0,694	0	0	0
Larva IV	470	0,694	14	0,02	2,06
Pupas	456	0,673	9	0,01	1,32
Adultos	447	0,661	76	0,17	11,22

**Tabla 18.** Tabla de vida horizontal *Ae. aegypti*. Cepa seleccionada con DDT F5 repetición 1.

ETAPA	n	lx	dx	qx	m
Huevo	70	1,000	23	0,32	32,8
Larva I	47	0,671	0	0	0
Larva II	47	0,671	1	0,02	1,42
Larva III	46	0,657	3	0,06	4,28
Larva IV	43	0,614	0	0	0
Pupas	43	0,614	16	0,37	22,8
Adultos	27	0,385	7	0,25	10

**Tabla 19.** Tabla de vida horizontal *Ae. aegypti*. Cepa seleccionada con DDT F5 repetición 2.

ETAPA	n	lx	dx	qx	m
Huevo	70	1,000	29	0,41	41,4
Larva I	41	0,58	0	0	0
Larva II	41	0,58	0	0	0
Larva III	41	0,58	1	0,02	1,4
Larva IV	39	0,55	0	0	0
Pupas	39	0,55	0	0	0
Adultos	39	0,55	16	0,41	0,22

**Tabla 20.** Tabla de vida horizontal *Ae. aegypti*. Cepa seleccionada con lambdacialotrina F3

ETAPA	n	lx	dx	qx	m
Huevo	1514	1,000	952	0,628	62,8
Larva I	562	0,371	0	0	0
Larva II	562	0,371	141	0,25	9,31
Larva III	421	0,278	45	0,10	2,97
Larva IV	376	0,248	0	0	0
Pupas	376	0,194	82	0,218	5,41
Adultos	294	0,165	43	0,146	2,84

**Tabla 21.** Tabla de vida horizontal *Ae. aegypti*. Cepa seleccionada con Lambdacialotrina F5 repetición 1.

ETAPA	n	lx	dx	qx	m
Huevo	70	1,00	30	0,42	42,8
Larva I	40	0,571	30	0,75	42,8
Larva II	10	0,142	1	0,1	1,4
Larva III	9	0,128	0	0	0
Larva IV	9	0,128	0	0	0
Pupas	9	0,128	2	0,22	2,85
Adultos	7	0,100	4	0,57	5,71

**Tabla 22.** Tabla de vida horizontal *Ae. aegypti*. Cepa seleccionada con Lambdacialotrina F5 repetición 2.

ETAPA	n	lx	dx	qx	m
Huevo	70	1,000	47	0,67	67,1
Larva I	23	0,328	0	0	0
Larva II	23	0,328	0	0	0
Larva III	23	0,328	0	0	0
Larva IV	23	0,328	0	0	0
Pupas	23	0,328	3	0,13	4,28
Adultos	20	0,285	4	0,2	5,71

**Tabla 23.** Tabla de vida horizontal para *Ae. aegypti* Cepa seleccionada con propoxur F3.

ETAPA	n	lx	Dx	qx	m
Huevo	1145	1,000	545	0,47	47,5
Larva I	600	0,524	0	0	0
Larva II	600	0,524	5	0,08	0,83
Larva III	595	0,519	0	0	0
Larva IV	595	0,519	0	0	0
Pupas	595	0,519	117	0,196	10,2
Adultos	478	0,417	78	0,163	0,068

**Tabla 24.** Tabla de vida horizontal *Ae. aegypti*. Cepa seleccionada con propoxur F5 repetición 1.

ETAPA	n	lx	Dx	qx	m
Huevo	70	1,000	35	0,5	50
Larva I	35	0,500	0	0	0
Larva II	35	0,500	8	0,22	11,42
Larva III	27	0,385	1	0,03	1,42
Larva IV	26	0,371	2	0,07	2,85
Pupas	24	0,342	5	0,20	7,14
Adultos	19	0,271	9	0,47	12,85

**Tabla 25.** Tabla de vida horizontal *Ae. aegypti*. Cepa seleccionada con propoxur F5 repetición 2

ETAPA	n	lx	dx	qx	m
Huevo	70	1,000	49	0,7	70
Larva I	21	0,300	0	0	0
Larva II	21	0,300	0	0	0
Larva III	21	0,300	0	0	0
Larva IV	21	0,300	3	0,14	4,28
Pupas	18	0,257	7	0,38	10
Adultos	11	0,157	6	0,54	8,57

**n:** número promedio contabilizado; **lx:** sobrevivencia; **dx:** individuos muertos; **m:** porcentaje de mortalidad; **qx:** probabilidad de morir entre un estadio y otro (x-1 y x).

**Anexo 7.** Pruebas estadísticas para comparar promedio huevos y promedio de días de duración de vida (Longevidad) entre cepas.

**Tabla 26.** Test de Kruskal-Wallis para comparar promedio de huevos entre las cepas Rockefeller, población mixta, cepa presionada por DDT, cepa presionada por lambdacialotrina y cepa presionada por propoxur.

**Ranks**

CEPA Cepa	N	Mean Rank
HUEVOS Numero de huevos por hembra	12	34.75
rockefeller	17	41.15
Pob Mixta	11	21.05
DDT	10	7.95
Lambdacialotrina	5	22.50
Propoxur	55	
Total		

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	HUEVOS Numero de huevos por hembra
Chi-Square	31.913
df	4
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: CEPA Cepa

**Tabla 26.** Test de Kruskal-Wallis para comparar promedio de días de duración de vida (Longevidad) entre las cepas Rockefeller, población mixta, cepa presionada por DDT, cepa presionada por lambdacialotrina y cepa presionada por propoxur.

**Ranks**

CEPA Cepa	N	Mean Rank
DÍAS Dias	16	41.97
1 Rockefeller	12	56.33
2 Pob mixta	23	37.89
3 DDT	16	30.75
4 Lambdacialotrina	13	40.69
5 Propoxur	80	
Total		

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	DÍAS Dias
Chi-Square	8.825
df	4
Asymp. Sig.	.066

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: CEPA Cepa

## RECOMENDACIONES

- En el establecimiento de colonias de *Aedes aegypti*, es necesario mantener condiciones de laboratorio estables, como son: temperatura, humedad relativa, fotoperíodo, cantidad de alimento y volumen de agua, al igual que el número de ejemplares por bandeja a eclosionar y de adultos en las jaulas de mantenimiento. Estos parámetros evitan obtener altas tasas de mortalidad en cualquier estadio del ciclo de vida de *A. aegypti*.

- En las colonias de mosquitos se encuentran hormigas, generalmente cuando se produce mortalidad de adultos. Estas intervienen con la subsistencia de la colonia de insectos, por tanto es importante limpiar constantemente con alcohol el lugar de mantenimiento de los mosquitos y de las jaulas.
- La consanguinidad juega un rol importante en el éxito de supervivencia de una colonia de mosquitos, por tanto emplear un número grande de mosquitos (4000 a 5000) en los estudios de resistencia, es una buena estrategia para obtener mayor descendencia y así disminuir el grado de consanguinidad en las cepas a seleccionar.
- Para la realización de las pruebas bioquímicas es importante verificar todos los reactivos antes de ser utilizados, ya que algunos reactivos pueden presentar alguna variación (Ph, exposición a la luz entre otros), pueden interferir con el éxito de la prueba.
- Durante las pruebas de botellas impregnadas es de gran ayuda contar con adultos rockefeller en una de las botellas con insecticidas cuando se van reutilizar las botellas ya que permitirán verificar la eficacia del insecticida.