

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN Kdr Ile 1016 y Val 1016 EN *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) EN MÉXICO

Tesis

Que presenta JOSUÉ MANUEL DE LA CRUZ RAMOS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Torreón, Coahuila

Mayo 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN Kdr Ile 1016 y Val 1016 EN *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) EN MÉXICO

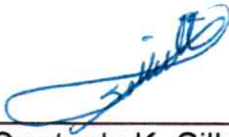
Tesis

Que presenta JOSUÉ MANUEL DE LA CRUZ RAMOS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA



Dr. Aldo Iván Ortega Morales
Director UAAAN



Dra. Quetzaly K. Siller Rodríguez
Director Externo UJED


Torreón, Coahuila

Mayo 2020

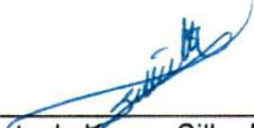
FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN Kdr Ile 1016 y Val 1016 EN *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE) EN MÉXICO

Tesis

Elaborada por JOSUÉ MANUEL DE LA CRUZ RAMOS como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Producción Agropecuaria con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría




Dr. Aldo Ivan Ortega Morales
Asesor principal



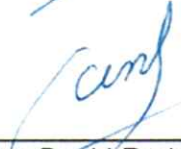
Dra. Quetzaly Karmy Siller Rodriguez
Asesor



Dr. Francisco Javier Sanchez Ramos
Asesor



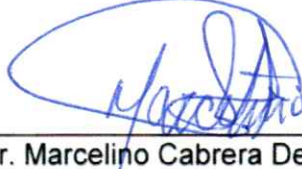
Dra. Ma. Teresa Valdez Perezgasga
Asesor



Dr. Américo David Rodriguez Ramirez
Asesor



Dra. Leticia R. Gaytán Alemán
Jefe del Departamento de Postgrado



Dr. Marcelino Cabrera De La Fuente
Subdirector de Postgrado

Agradecimientos

Dr. Aldo Iván Ortega Morales

Por su dedicación, comprensión, por compartir su experiencia académica, por guiarme para realizar una ciencia aplicada a favor de la salud pública y de mi desarrollo profesional. Mi eterno agradecimiento.

Dra. Quetzaly Karmy Siller Rodríguez

Un especial agradecimiento por su fe en mi trabajo profesional, lo que permitió la realización de una parte del experimento, así también por los consejos tanto en lo académico y en lo personal. Mi gran estima para usted.

Dr. Francisco Javier Sanchez Ramos

Por los consejos y por el apoyo a todas las ideas que me compartió, así como para no dejar de trabajar en el laboratorio a pesar de las adversidades.

Dra. Ma. Teresa Valdés Perezgasga

Me enseñó a no ser impaciente, ser práctico y por darme ánimo de trabajar, muchas gracias.

Dr. Américo David Rodríguez Ramírez

La perfección, la dedicación, la disciplina, el análisis y la entereza fue lo que usted me transmitió. Le agradezco.

Al Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP) de Tapachula, Chiapas, en especial a la Dra. Patricia, Dra. Karla Saavedra y al personal técnico del Laboratorio de Resistencia de Insecticidas por su invaluable apoyo y amistad en laboratorio (Alma, Paco, Ulisis, Jeovany, Brandon, Elsa, Andrea, Walter y a todo el quipo).

Dedicatoria

A Dios por todas las bendiciones que me da a lo largo de mi vida.

A mis queridos padres Norma Leticia Ramos Balderas y Miguel de la Cruz Rodríguez, por el apoyo que me brindaron durante todo mi desarrollo profesional, por todos los consejos que me dieron para hacer de mí una mejor persona.

A mis hermanos Miguel, Abdiel y Paulina porque ellos siempre me han apoyado en todas las cosas que he realizado en mi vida, por escuchar mis ideas, mis creencias, mis sueños y espero ser un hermano del cual estén orgullosos de tener.

A todos mis compañeros y amigos del Posgrado en especial, Lupita, Rahuel, Marroquin, Mónica, Aimir, Loya, Fili, Toño, Gabriela, Sary, mi carnal Homero, Amir, Luis Manuel Valenzuela. Tres años fueron suficientes para darme cuenta de que no solo quedarán como compañeros si no como grandes amigos.

En especial a mi amiga, confidente y novia Denisse Prone Olazabal, que siempre estuvo a mi lado en las buenas y en las malas, por brindarme no solamente amor y cariño, si no también consejo para todas mis acciones.

CARTAS DE ACEPTACIÓN Y ENVÍO DE LOS ARTÍCULOS

Aceptación de artículo

De: "Heliyon" <em@editorialmanager.com>

Fecha: 19 de septiembre de 2019, 6:49:22 GMT-5

Para: "Aldo Ortega" <agrortega@hotmail.com>

Asunto: Decision on submission HELIYON_2019_5302R1 to Heliyon

Responder a: "Heliyon" <info@heliyon.com>

Ms. No.: HELIYON_2019_5302R1

Title: Comparison of two DNA extraction methods from larvae, pupae, and adults of *Aedes aegypti*

Journal: Heliyon


Dear Dr Ortega,

Thank you for submitting your manuscript to Heliyon.

We have now received all of the editor and reviewer comments on your recent submission to Heliyon. Your paper should become acceptable for publication pending suitable minor revision outlined below.

We ask that you respond to each reviewer comment by either outlining how the criticism was addressed in the revised manuscript or by providing a rebuttal to the criticism. To allow easy sharing of your response with the editor and reviewers, we ask that you submit it as a separate word document alongside with your submission.

Envío de artículo

Buscar en el correo electrónico

Redactar

Recibidos 31

- Destacados
- Pospuestos
- Enviados
- Borradores 1

Josue ▾ +

No hay chats recientes.
[Inicia uno nuevo.](#)

acta.zoologica@inecol.mx
para mí ▾

ApreciableMaestría en Ciencias Josue Manuel De la Cruz Ramos:

Por este conducto me es grato comunicarle que su manuscrito científico titulado: "EXTRACTION AND QUANTIFICATION OF NUCLEIC ACIDS BY THE CTAB METHOD IN FRESH AND DIED ADULTS OF *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (DIPTERA: CULICIDAE) AT GÓMEZ PALACIO-DURANGO, MÉXICO" del cual es usted autor de correspondencia y enviado a nuestra revista ACTA ZOOLOGICA MEXICANA (N.S.) ha sido recibido. Su manuscrito será revisado por el Comité Editorial para analizar si el tema es adecuado y se siguieron las normas editoriales solicitadas. De cubrir los requisitos, el manuscrito será enviado al Editor Asociado correspondiente para posteriormente ser enviado al menos a dos árbitros especialistas en el tema, quienes determinarán lo más pronto posible las recomendaciones pertinentes. Para toda correspondencia futura relacionada con su manuscrito, le rogamos siempre citar el número de registro.

Con nuestro sistema de gestión de revistas en línea, podrá iniciar sesión en el sitio web de la revista y hacer un seguimiento de su progreso a través del proceso editorial:

URL del manuscrito:
<http://azm.ojs.inecol.mx/index.php/azm/author/submission/2278>

Nombre de usuario/a: josue

Índice General

Lista de cuadros.....	iii
Lista de figuras.....	iv
Resumen	v
Abstrac.....	vi
INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Genero Aedes	5
Taxonomía	6
Aedes aegypti.....	7
Autoecología de <i>A. aegypti</i>	8
Ciclo biológico de <i>A. aegypti</i>	9
Transmisión del virus del dengue.....	11
Control de vectores	11
Prevención y control del dengue	14
Control del mosquito <i>A. aegypti</i> en México	15
Estrategias de manejo de <i>A. aegypti</i>	16
Insecticidas.....	18
Mecanismos de Acción de los Insecticidas	20
Control químico en México	21
Permetrina.....	21
Efecto de la permetrina en mosquitos	22
Aplicación de permetrina para ULV	23
Resistencia a Insecticidas en Vectores	24

Detección de la Resistencia en una Población: Bioensayos	25
Mecanismos de Resistencia a Insecticidas	26
Resistencia por Sitio Blanco.....	27
Canales de Sodio	27
Resistencia kdr en el Mosquito <i>A. aegypti</i>	28
LITERATURA CITADA	29
Estudio 1	38
Comparison of two DNA extraction methods from larvae, pupae, and adults of <i>Aedes aegypti</i>	38
Estudio 2.....	52
EXTRACTION AND QUANTIFICATION OF NUCLEIC ACIDS BY THE CTAB METHOD IN FRESH AND DIED ADULTS OF <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus, 1762 (DIPTERA: CULICIDAE) AT GÓMEZ PALACIO-DURANGO, MÉXICO.....	52
CONCLUSIONES	59

Lista de cuadros

Cuadro 1. Mosquitos vectores, en América, patógenos que causan enfermedades en el hombre.....	13
Cuadro 2. Casos e Incidencia de Dengue por Entidad Federativa; México, 2019.....	14
Cuadro 3. Lista de Productos recomendados por el CENAPRECE para el Combate de insectos vectores de enfermedades.	19

Lista de figuras

Figura 1. Especies del genero <i>Aedes</i> : <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	5
Figura 2. Características principales de adultos y larvas.....	6
Figura 3. Clasificación taxonómica de la especie <i>A. aegypti</i>	7
Figura 4. Países donde se reportaron casos de dengue.....	8
Figura 5. Sitios ideales para la reproducción de mosquitos.....	9
Figura 6. Ciclo biológico de mosquitos.....	10
Figura 7. Transmisión del virus en mosquitos de la especie <i>Aedes aegypti</i>	11
Figura 8. Nebulizador o fumigador rociando para evitar la presencia de mosquito adulto como estrategia del combate al vector.....	16
Figura 9. Estructura química de la permetrina.....	22

Resumen

Los mosquitos son los artrópodos más importantes desde el punto de vista de la salud pública, debido a que pueden transmitir una gran cantidad de patógenos que pueden causar enfermedades a humanos y animales. En la presente investigación fueron analizados mosquitos *Aedes aegypti* recolectados en 10 localidades de México en el año 2017 y 2018, con la finalidad de obtener información sobre la frecuencia de la mutación “kdr” Ile1,016 localizada en el gen que codifica el canal de sodio que confiere resistencia a permetrina y DDT. Las frecuencias de la mutación Ile1,016 son probablemente provocadas por la alta presión de selección ejercida por el insecticida piretroide permetrina, que ha sido aplicado como adulticida por más de 10 años en México. Por lo tanto, los estudios que involucran los aspectos moleculares de esta y otras especies de mosquitos, están aumentando actualmente. Describimos la comparación entre dos técnicas de extracción de ADN, Chelex y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), para llevar a cabo la extracción de ADN en larvas, pupas y hembras adultas de *A. aegypti*. La técnica Chelex fue superior en la cantidad y pureza de ADN en comparación con la técnica CTAB en las tres etapas de la vida que probamos.

Palabras claves: *Aedes aegypti*, Kdr, ADN, Extracción, Mutación.

Abstrac

Mosquitoes are the most important arthropods from the point of view of public health, because they can transmit a large number of pathogens that can cause disease to humans and animals. In the present investigation, *A. aegypti* mosquitoes were analyzed. collected in 10 locations in Mexico from 2017 to 2018 in order to obtain information on the frequency of the “kdr” Ile1,016 mutation located in the gene that encodes the sodium channel that confers resistance to permethrin and DDT, finding that the Ile1,106 mutation the frequencies is probably caused by the high selection pressure exerted by the permethrin pyrethroid insecticide that has been applied as an adulticide for more than 10 years in Mexico. Therefore, studies involving the molecular aspects of this and other mosquito species are currently increasing. We describe the comparison between two DNA extraction techniques, Chelex and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), to carry out DNA extraction in larvae, pupae and adult *A. aegypti* females. The Chelex technique was superior in the amount and purity of DNA compared to the CTAB technique in the three stages of life we tested.

Keywords: *Aedes aegypti*, Kdr, DNA, Extraction, Mutation.

INTRODUCCIÓN

El mosquito de la fiebre amarilla, *A. aegypti* (L.) es una de las especies de mosquitos más comunes en las zonas urbanas y suburbanas de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Es originaria de África y está bien adaptada a las condiciones urbanas, convirtiéndose en una de las especies más comunes en asociación con los humanos (Kamgang *et al.*, 2018). *A. aegypti* se considera una de las especies más importantes para la salud pública, ya que es el vector principal de una serie de virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) que causan enfermedades en los seres humanos, como la fiebre amarilla, el dengue, el chikungunya y el zika, que están ampliamente distribuidos en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Jentes *et al.*, 2011; Roldan *et al.*, 2013).

Recientemente se ha estimado que más de 2.5 billones de personas viven en regiones con prevalencia de fiebre por dengue hemorrágico. El dengue es la segunda enfermedad tropical más importante, aproximadamente ocurren entre 50 a 100 millones de casos anuales de fiebre por dengue y 500,000 casos anuales de fiebre por dengue hemorrágico (Roldan *et al.*, 2013). El dengue se ha convertido en la enfermedad arboviral que causa más morbilidad y muerte en humanos, además de ocasionar pérdidas económicas importantes en países de tercer mundo y en vías desarrollo (WHO, 1997).

El dengue y el dengue hemorrágico representan un problema cada vez más grave para los países de América Latina, esto debido a que el control de esta enfermedad es costosa y además las epidemias producen un impacto negativo en el desarrollo socioeconómico de los países (Rodríguez, 2002), otra cuestión preocupante es que desafortunadamente la mayoría de los programas de control de vectores en todo el mundo están enfrentándose con desafíos operacionales a causa de la emergencia y desarrollo de resistencia a insecticidas en *A. aegypti* (Yaicharoen *et al.*, 2005).

Entre las medidas de control vectorial, el uso de insecticidas ha jugado un rol importante en las campañas de control del dengue. En las décadas de los 50's y

60's, el uso del insecticida DDT estuvo cerca de lograr la "erradicación" del mosquito *A. aegypti* en las Américas. Desafortunadamente, la combinación de diversos factores ocasionó la reinfestación de *A. aegypti* y posteriormente la emergencia y/o resurgencia del dengue. Uno de los principales factores que ha contribuido a la re-surgencia del dengue, ha sido la resistencia de *A. aegypti* a los insecticidas (Gubler, 1998). Inevitablemente, mientras que el uso de insecticidas sea la principal forma de control vectorial, la resistencia a insecticidas continuará siendo un factor que afecte directamente la incidencia de enfermedades emergentes y re-emergentes transmitidas por vectores (Brogdon y McCallister, 1998).

Actualmente, existen poblaciones de campo de *A. aegypti* con distintos niveles de resistencia a los principales grupos de insecticidas: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. (Hemingway, 1989; Rodríguez *et al.*, 2001). Peor aún, la redundancia en el modo de acción de los insecticidas, ha generado la selección de poblaciones de mosquitos con resistencia cruzada y/o resistencia múltiple. Estudios hablan sobre la resistencia en *A. aegypti* en diferentes regiones, por ejemplo, en Asia (Jirakanjanakit *et al.*, 2007), América Latina y el Caribe (Rawlins *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2006; Saavedra *et al.*, 2007; Ponce *et al.*, 2009). Existen dos tipos de mecanismos de resistencia a insecticidas con bases bioquímicas: 1) detoxificación por parte de enzimas como lo son Glutación S transferasas (GST), esterasas y oxidasas, previniendo que las moléculas de los insecticidas lleguen al sitio blanco, 2) alteración en el sitio blanco o sitio de acción el cual es donde la molécula se asocia para ejercer su acción tóxica que generalmente es a nivel del sistema nervioso (Brogdon and McAllister, 1998). Uno de los mecanismos de resistencia por sitio blanco es el llamado knock down resistance (kdr), el cual es un término usado en insectos que no pierden la coordinación inmediata ante la exposición de insecticidas piretroides y DDT, esto debido a una mutación puntual en el gen que codifica a la membrana del canal de sodio, la cual disminuye la asociación del insecticida en la membrana del canal. Por lo tanto, este trabajo se planteó

con la finalidad de actualizar los datos sobre la frecuencia de la mutación Ile1,016 y val 1016 de *A. aegypti* recolectadas en 10 localidades de México en el 2017 al 2019, comparar y evaluar el rendimiento de dos métodos de extracción de ADN en *A. aegypti* para análisis moleculares posteriores.

Hipótesis

La presión ejercida por los insecticidas en las poblaciones de *A. aegypti* desarrollará alta frecuencia de los mecanismos de resistencia según su zona geográfica.

Objetivo general

Determinar la frecuencia de la mutación Kdr ile 1016 y Val 1016 en mosquitos de la especie *A. aegypti*.

Objetivos específicos

- Obtener el porcentaje de resistencia que existe en las distintas poblaciones de *A. aegypti* mediante técnicas moleculares.
- Determinar el equilibrio genético que existe en las poblaciones de mosquitos.
- Comparar y evaluar el rendimiento de métodos de extracción de ADN en *A. aegypti* para análisis moleculares posteriores.

REVISIÓN DE LITERATURA

Genero *Aedes*

Los mosquitos del género *Aedes* son importantes vectores en la transmisión de enfermedades víricas, como el dengue, Zika, fiebre amarilla, chikungunya y fiebre del Nilo Occidental. Como consecuencia del cambio climático y la globalización, la infraestructura y el comportamiento social, las condiciones higiénico sanitarias entre otros factores, el área de distribución de estas especies se expande cada día más, son insectos hematófagos que ingieren los microorganismos patógenos junto con la sangre de los enfermos, y luego los inoculan a un nuevo portador al ingerir su sangre, por lo que se consideran estos mosquitos los vectores de enfermedades mejor conocidos. Aunque el género *Aedes* incluye otras especies, son el *Aedes aegypti* y el *Aedes albopictus* como se muestran en la figura 1, los de mayor potencial transmisor de enfermedades (Kamgang *et al.*, 2018). La mayoría de los mosquitos de Norteamérica pertenece al género *Aedes*.



Figura1. Especies del genero *Aedes*: *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

Por lo general las hembras tienen uñas dentadas, presentan sedas postestigmatales, faltan los pulvilos o son filamentosos, y el abdomen de la hembra tiende a ser puntiagudo con los cercos más largos que otros grupos; las larvas tienen sifones con un par de penachos o sedas posteroventrales y casi siempre

un pecten bien diferenciado como se muestra en la figura 2. Depositán los huevecillos individualmente en la superficie del agua, sobre el lodo, justo arriba del nivel del agua, si son especies que se crían en estanques o hasta en situaciones donde hay poca humedad, pero probabilidad de que se sumerjan. Frecuentemente las hembras son picadoras agresivas. Muchas especies tienen actividad diurna y la mayoría pican cerca del atardecer (Harwood y James, 1993). King (1975) han estudiado la genética de *Aedes*, incluyendo la genética formal, citogenética, habilidad para desarrollar patógenos de vertebrados, resistencia a insecticidas, quimioesterilización y otros temas relacionados.

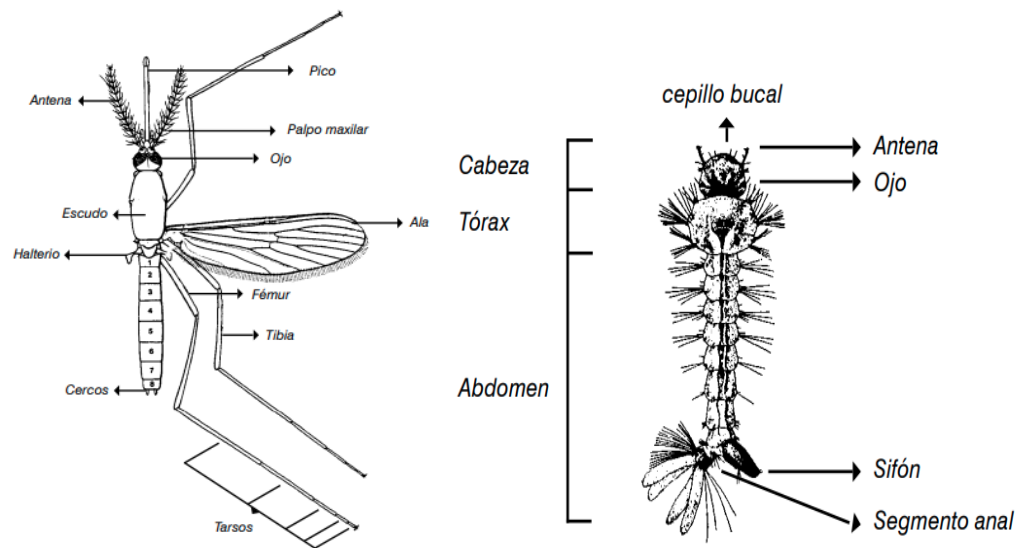


Figura 2. Características principales de adultos y larvas.

Taxonomía

En la actualidad *A. aegypti* se encuentra ampliamente distribuida en el Continente Americano (Ilbáñez *et al.*, 1995; Fernández, 2009; García *et al.*, 2011). La clasificación taxonómica de esta especie de acuerdo con Bates (1970), se describe en la figura 3.

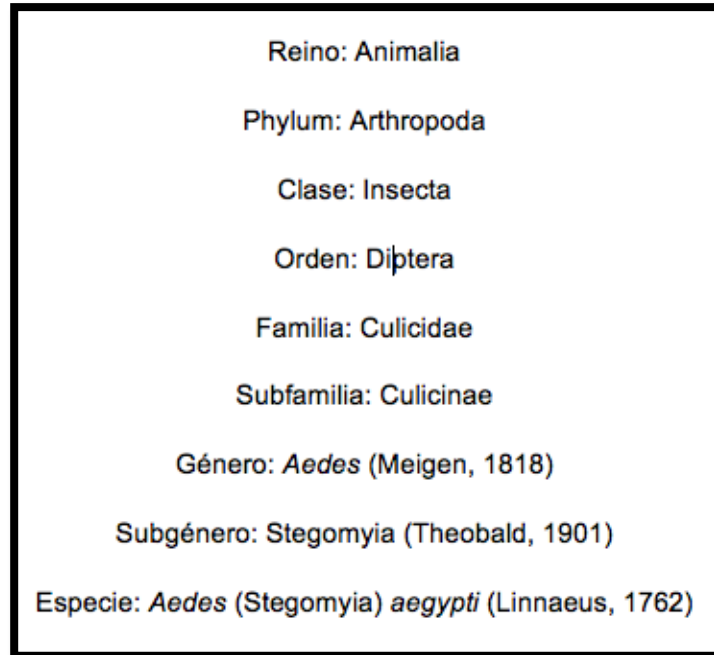


Figura 3. Clasificación taxonómica de la especie *A. aegypti*

Aedes aegypti

Aedes aegypti es un mosquito perteneciente al orden Díptera, familia Culicidae. Se distribuye ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales del globo, entre los 35° latitud Norte y 35° latitud Sur observándose en la figura 4. *A. aegypti* es un insecto con metamorfosis completa, su ciclo biológico consiste en cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. *A. aegypti* fue introducido en América durante no bien definidos tiempos de la colonización europea, motivando reiteradas epidemias de fiebre amarilla urbana, que ya se registraban previamente de forma focal en América precolombiana mediante otros mosquitos vectores autóctonos y de diversas áreas del continente (Chester *et al.*, 1997). Con excepción de Canadá y de áreas donde la altitud, temperatura u otras condiciones climáticas han impedido su colonización, *A. aegypti* infesta o a infestado todos los países del continente.



Figura 4. Países donde se reportaron casos de dengue (WHO,1997).

Autoecología de *A. aegypti*

Por tener la capacidad de colonizar distintos tipos de contenedores naturales de agua para su supervivencia y reproducción, *A. aegypti* es considerada una especie sinantrópica al encontrarse en distintos objetos y sitios como conchas de moluscos, cáscaras de frutos, huecos de árboles, y recipientes de uso doméstico como: jarrones, latas, floreros, pilas, tanques, cubetas, juguetes, corcholatas, canales de techo, además de otros (Fernández, 1999) , aunque tienen una marcada preferencia por recipientes de color oscuro y de boca ancha ubicados sobre el suelo y con poca exposición al sol, como las llantas de vehículos que son eliminadas y/o almacenadas , las cuales son un reservorio ideal para estos mosquitos como se observa en la figura 5. (Carrada *et al.*, 1984; Thiri6n, 2002; Morrison *et al.*, 2004; Fern6ndez, 2009). Por lo anterior, el manejo de estos recipientes ha contribuido en gran medida a favorecer la dispersi6n de *A. aegypti* a otras localidades, en donde el viento juega un papel importante, aunque al encontrar lo necesario en el ambiente dom6stico, no requieren desplazarse grandes distancias lo que representa un desaf6o para los programas de control y vigilancia epidemiol6gica del presente siglo (Rojas y Schmeda, 1992; Schmeda y Arias 1992; OMS, 1997; Fern6ndez, 2009).

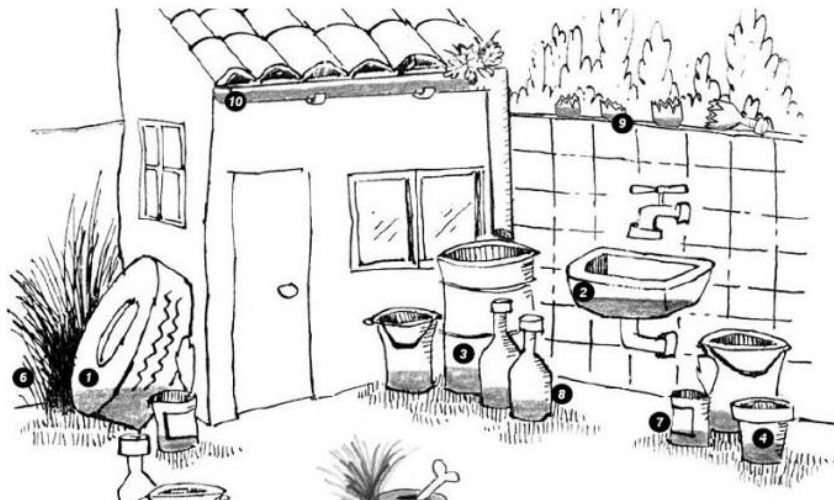


Figura 5. Sitios ideales para la reproducción de mosquitos.

Ciclo biológico de *A. aegypti*

Los huevecillos son depositados individualmente en sustratos húmedos que son sujetos a inundación, preferentemente recipientes artificiales domiciliarios y peridomiciliarios (Gordon, 1988). En condiciones ideales, la eclosión ocurre en un par de días, sin embargo, los huevecillos pueden mantener su viabilidad hasta por más de un año, dependiendo de la fuente de reservas y las condiciones ambientales (Eldridge, 2005). Los estadios larvarios se desarrollan en hábitats acuáticos, donde la principal fuente de alimento consiste en microbiota filtrada por las partes bucales de la larva. La duración del desarrollo larvario depende de la temperatura del agua, disponibilidad del alimento y densidad larvaria, variando entre 5 y 14 días. Después de este periodo, una segunda metamorfosis ocurre en la fase acuática para formar la etapa de pupa. La alimentación se detiene en la fase de pupa y después de uno a dos días emerge el adulto como se observa en la figura 6 (Eldridge, 2005) La etapa adulta consiste en un insecto volador pequeño. Las hembras poseen una probóscis larga, adaptada para succionar sangre a través de la piel. Los machos, por otro lado, presentan una probóscis larga adaptada para succionar jugos de plantas y otras fuentes de azúcar. En forma general ambos requieren carbohidratos como principal fuente de energía, sin embargo, las hembras dependen de sangre para obtener la energía necesaria

para la producción de huevecillos. Las hembras comienzan la búsqueda de sangre y la principal fuente de atracción son las trazas de dióxido de carbono y ácido láctico emanadas por el hospedero. Las horas con mayor actividad alimenticia, ocurren entre las 6:00 am a 8:00 am y de 4:00 pm a 7:00 pm (Fernández-Salas, 1999). Durante la alimentación, las hembras producen anticoagulantes, antihistamínicos y analgésicos que le permiten ingerir sangre a repleción. Después de la alimentación, las hembras entran en un periodo de reposo y las ovarias comienzan un proceso de ovogénesis que después de 3 a 4 días culmina en la oviposición de 50 a 120 huevecillos. Como la mayoría de los insectos hematófagos, *A. aegypti* es capaz de ingerir, incubar y transmitir distintos patógenos después de una alimentación de sangre infectada. En el año 1900, *A. aegypti* fue implicado biológicamente en la transmisión del virus de la fiebre amarilla y en 1903 en la transmisión del virus del dengue (Philip y Rozenboom, 1973).

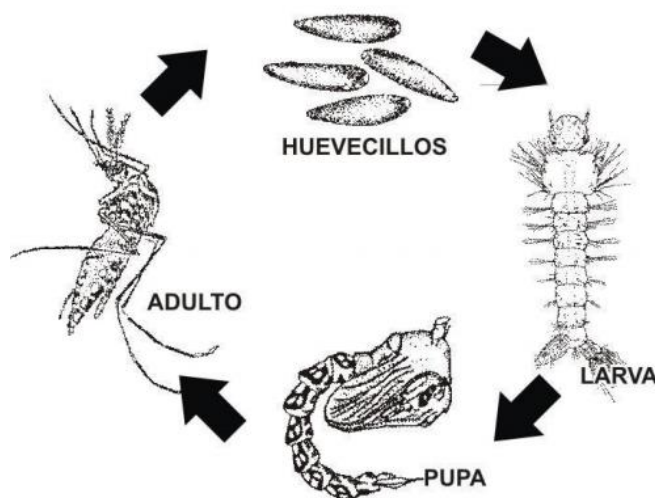


Figura 6. Ciclo biológico de mosquitos.

Transmisión del virus del dengue

En forma general, el virus del dengue debe cruzar la barrera del intestino medio del insecto y posteriormente dispersarse a otros órganos, entre ellos las glándulas salivales. Este proceso de incubación toma de 10 a 14 días. Una vez que el virus alcanza las glándulas salivales, el mosquito es considerado infeccioso y es capaz de transmitir el virus por el resto de su vida. La permisividad de un mosquito a infectarse y/o transmitir el virus, es conocido como competencia vectorial (Hardy, 1988). Las poblaciones de *A. aegypti* de México, varían en la susceptibilidad a infectarse con el virus del dengue tipo-2 mostrado en la figura 7 (Bennett *et al.*, 2002).

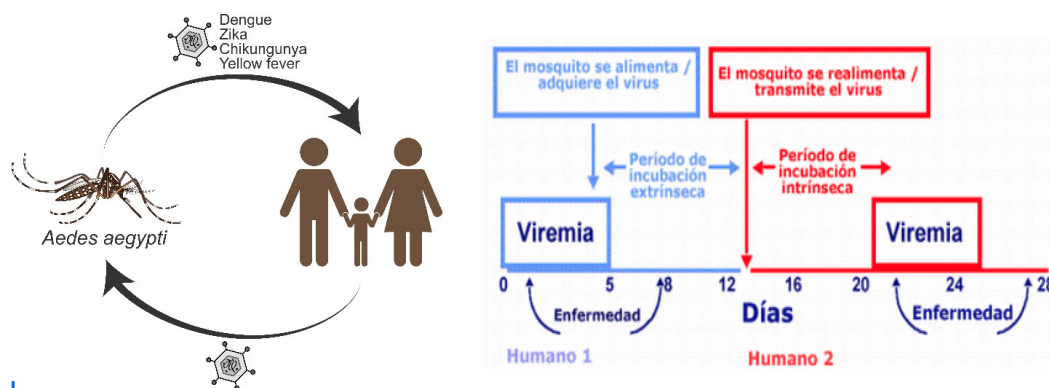


Figura 7. Transmisión del virus en mosquitos de la especie *Aedes aegypti*.

Control de vectores

Aproximadamente 390 millones de casos de infección por el virus del dengue ocurren por año en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo. Se calcula que hasta un 55% de la población mundial está en riesgo de contraer dengue, donde 824 millones de personas viven en entornos urbanos, el dengue, chikungunya y zika son las infecciones virales más importantes y generalizadas de los seres humanos en el mundo, transmitidas por mosquitos del género *Aedes* (Bhatt *et al.*, 2013). Actualmente, *A. aegypti* es considerado el principal vector del virus del dengue a nivel mundial, esto se debe a su amplia distribución geográfica,

su alto grado de susceptibilidad a infectarse con el virus, así como su cercana asociación con las habitaciones humanas. Este mosquito es considerado completamente antropofílico, mas aún, el hábito de tomar mas de una alimentación de sangre durante su ciclo gonotrófico incrementa su capacidad vectorial dramáticamente (Platt *et al.*, 1997). La transmisión del dengue ocurre en forma particular durante los meses del año con más lluvia y altas temperaturas, lo que propicia condiciones necesarias para el desarrollo larval en los hábitats donde se almacena agua (Gubler y Trent, 1994).

En los últimos 20 años, las epidemias de dengue, chinkungunya y zika han aumentado tanto en número como en magnitud, debido a la dispersión del mosquito *Aedes aegypti* (Cuadro 2), vector principal de los virus causantes de estas enfermedades, así como a las tendencias de sistemas de urbanización improvisados y viajes globales (Glubert & Clark, 1995). En vista de la ausencia de medicamentos terapéuticos o vacunas eficaces, el control de *A. aegypti* es actualmente la principal estrategia para la prevención de la transmisión del virus dengue, virus chinkungunya y virus del Zika visualizado en el cuadro (Morrison *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Mosquitos vectores, en América, patógenos que causan enfermedades en el hombre.

ESPECIE DE MOSQUITO	AGENTE PATOGENO	ENFERMEDAD
Anopheles albimanus Anopheles albitarsis* Anopheles aquasalis <i>Anopheles argyritarsis*</i> <i>Anopheles bellator</i> <i>Anopheles brasiliensis*</i> <i>Anopheles cruzii*</i> Anopheles darlingi*v <i>Anopheles neivai</i> <i>Anopheles nuneztovari*0</i> Anopheles pseudopunctipennis*v Anopheles punctimacula* <i>Anopheles triannulatus*</i>	<i>Plasmodium</i> spp. ¹⁾ (Protozoa)	Paludismo o malaria
Aedes aegypti*v <i>Haemagogus albomaculatus</i> <i>Haemagogus capricornii*</i> <i>Haemagogus equinus</i> <i>Haemagogus janthinomys*</i> <i>Haemagogus leucocelaenus*</i> <i>Haemagogus spegazzinii*</i> <i>Sabethes chloropterus*</i>	Virus Fiebre Amarilla	Fiebre Amarilla urbana
Aedes aegypti*v Aedes albopictus*	Virus Dengue	Dengue
<i>Anopheles albimanus</i> <i>Anopheles aquasalis</i> <i>Anopheles bellator</i> Anopheles darlingi* <i>Culex pipiens quinquefasciatus*</i> <i>Mansonia titillans*</i> <i>Ochlerotatus scapularis*</i> <i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>	<i>Wuchereria bancrofti</i> (gusano Nematoda) en América tropical	Filariosis o Elefantiasis
<i>Culex nigripalpus</i> Culex pipiens quinquefasciatus* Culex pipiens pipiens* <i>Culex tarsalis</i>	Virus Encefalitis de San Luis	Encefalitis de San Luis
Culex tarsalis <i>Culiseta melanura</i> Ochlerotatus albifasciatus*v <i>Ochlerotatus melanimon</i>	Virus Encefalitis Equina del Oeste	Encefalitis Equina del Oeste

Cuadro 2. Casos e Incidencia de Dengue por Entidad Federativa; México, 2019.

ESTADO	CONFIRMADOS ACUMULADOS				TASA DE INCIDENCIA*			
	DNG	DCSA	DG	TOTAL	DNG	DCSA	DG	TOTAL
VERACRUZ	5,862	653	150	6,665	70.84	7.89	1.81	80.54
JALISCO	4,233	902	569	5,704	51.11	10.89	6.87	68.87
QUINTANA ROO	594	331	38	963	33.86	18.87	2.17	54.90
MORELOS	265	654	41	960	13.19	32.55	2.04	47.78
CHIAPAS	567	1,123	291	1,981	10.30	20.39	5.28	35.97
OAXACA	859	320	65	1,244	20.92	7.79	1.58	30.29
SAN LUIS POTOSÍ	810	28	3	841	28.45	0.98	0.11	29.54
TABASCO	203	189	143	535	8.20	7.63	5.77	21.60
NAYARIT	144	75	41	260	10.97	5.72	3.12	19.81
HIDALGO	518	21	5	544	17.19	0.70	0.17	18.05
GUERRERO	230	175	251	656	6.32	4.81	6.89	18.01
COLIMA	69	51	6	126	8.95	6.61	0.78	16.33
PUEBLA	840	91	18	949	13.07	1.42	0.28	14.77
MICHOACÁN	624	37	7	668	13.23	0.78	0.15	14.17
YUCATÁN	121	61	8	190	5.44	2.74	0.36	8.53
CAMPECHE	21	20	7	48	2.18	2.08	0.73	4.99
TAMAULIPAS	156	19	6	181	4.22	0.51	0.16	4.89
NUEVO LEÓN	110	66	5	181	2.05	1.23	0.09	3.37
BAJA CALIFORNIA SUR	18	3	4	25	2.10	0.35	0.47	2.92
SONORA	56	15	2	73	1.81	0.49	0.06	2.36
GUANAJUATO	81	6	2	89	1.35	0.10	0.03	1.48
SINALOA	34	4	1	39	1.10	0.13	0.03	1.27
CHIHUAHUA	4	1	0	5	0.25	0.06	0.00	0.31
MÉXICO	45	3	1	49	0.25	0.02	0.01	0.27
COAHUILA	6	2	0	8	0.19	0.06	0.00	0.26
AGUASCALIENTES	3	0	0	3	0.22	0.00	0.00	0.22
QUERÉTARO	4	0	0	4	0.19	0.00	0.00	0.19
ZACATECAS	1	0	0	1	0.07	0.00	0.00	0.07
BAJA CALIFORNIA	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
CIUDAD DE MÉXICO	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
DURANGO	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
TLAXCALA	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
TOTAL	16,478	4,850	1,664	22,992	13.09	3.85	1.32	18.26

Las estrategias del control de vectores se basan en su mayoría en la aplicación de insecticidas químicos como el temefos en criaderos de larvas, y a través del uso de diferentes técnicas de fumigación como el ultra-bajo volumen (ULV), rociado residual y nebulizaciones intra-domiciliares con organofosforados, carbamatos y piretroides en culícidos adultos (Reiter, 2007; Morrison *et al.*, 2008).

Prevención y control del dengue

Depende en controlar al mosquito vector *A. aegypti* dentro y alrededor de los hogares donde ocurre la mayoría de la transmisión. En los últimos 25 años, se ha puesto mucho énfasis en la aspersión espacial de insecticidas (ULV) con el objetivo de eliminar a la etapa adulta, sin embargo, al menos que sean aplicados dentro de los hogares, estos usualmente son inefectivos (Gubler, 1989; WHO, 1997). Al parecer, la medida más efectiva para controlar al mosquito transmisor del dengue es a través de la reducción de criaderos de larvas, ya sea vía

eliminación de contenedores que almacenan agua o bien mediante el uso de larvicidas. En las décadas de los 50's y 60's, varias campañas para la erradicación de vectores de enfermedades fueron implementadas a nivel mundial, entre éstas, la erradicación del mosquito *A. aegypti*.

Desafortunadamente, todos estos programas han carecido de sustentabilidad, y una vez que el mosquito y la enfermedad fueron controlados, los limitados recursos para salud fueron transferidos a otros programas competentes. Como consecuencia, las poblaciones de *A. aegypti* reinfestaron e incluso invadieron nuevas regiones, al grado de que la ocurrencia de transmisión de dengue tiene ahora un nivel epidémico (Gubler, 1998b).

Actualmente, las campañas de control de *A. aegypti* consisten en la eliminación de criaderos de estadios larvarios y en casos de brotes de dengue, la aplicación espacial de insecticidas. Usualmente, la eliminación de pequeños utensilios que tienden a acumular agua en los patios de las casas, así como el tratamiento de larvicidas en los contenedores de agua necesarios para las actividades diarias, son realizados durante las campañas de prevención. En México, el principal insecticida utilizado para controlar a los estadios larvarios es el organofosforado temefós (Abate®). La medida de emergencia durante brotes o epidemias de dengue, consiste en la aplicación de insecticidas en nubes de gotas de ultrabajo-volumen (ULV). Los principales insecticidas utilizados para esta finalidad son el organofosforado malatión y varios piretroides, entre ellos, deltametrina, permetrina y lambda-cialotrina.

Control del mosquito *A. aegypti* en México

En México, en los últimos 6 años, los principales insecticidas utilizados para control del mosquito *A. aegypti*, han sido el larvicida organofosforado temefós (Abate®) y el adulticida permetrina junto con el sinergista piperonil butóxido

(Aquareslin®) (Norma Oficial Mexicana, S.S.A,1999). La nueva tendencia en los programas de control es proveer de sustentabilidad a los programas mediante el uso de estrategias de reducción larvaria basadas en la comunidad. La razón consiste en que el control de *A. aegypti* solo puede lograrse por la gente que vive en las casas donde la problemática ocurre y por la gente que crea los hábitats larvarios debido a sus estilos de vida. Estos programas de participación comunitaria requieren de un programa de educación para la salud extensivo. Desafortunadamente, esta medida resulta muy lenta, por lo cual se ha propuesto una combinación de estrategias, una que permita un éxito inmediato y otra que permita proveer de sustentabilidad. La efectividad de dichos programas aun no ha sido probada en campo, siendo un área de oportunidad para los programas de control de vectores (Fig.8).



Figura 8. Nebulizador o fumigador rociando para evitar la presencia de mosco adulto como estrategia del combate al vector.

Estrategias de manejo de *A. aegypti*

Existen diversos estudios taxonómicos realizados con *A. aegypti* (Carpenter y La Casse, 1955; Vargas, 1956; Bohart y Washino, 1978; Ibáñez y Martínez, 1994; Zapata - Peniche *et al.*, 2007), biológicos (Bates, 1970; Nelson, 1986), etológicos (Gadelha, 1985; Kettle, 1993), ecológicos (Barrera *et al.*, 1981; Herrera, 1999, Mazine *et al.*, 1996; Stein *et al.*, 2005), con énfasis en la dinámica poblacional

en larvas y adultos (Fernández *et al.*, 2005; Micieli *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2006, Azil *et al.*, 2010 ; Cruz *et al.*., 2010)), toxicológico s usando diversos insecticidas (Georghiou *et al.*., 1983; Brown 1986; WHO, 1992; Hemingway y Ranson, 2002; Flores *et al.*, 2006), de variabilidad genética de este mosquito (Leiva y Cáceres, 2004; Nene *et al.*, 2007), análisis genómico de genes involucrados en la detoxificación proteómica e interacción huésped - patógeno, como una estrategia de combate (Rodríguez - Cruz , 2002; Strode *et al.*, 2007).

El control de *A. aegypti* , se basa en los programas de manejo integrado de vectores (MMIV) , establecidos por las instituciones de salud a nivel mundial , en colaboración con la comunidad local y otros sectores públicos y privados, lo que incluye el control químico y biológico de este insecto, así como estrategias que tienen como objetivo combatir y controlar altas densidades poblacionales de este mosquito, a través de la movilización social, gestión ambiental, vigilancia epidemiológica de la enfermedad, vigilancia entomológica del vector, mejorar la eficacia de las acciones y reducir el costo de éstas. La nueva tendencia en los programas de control es proveer de sustentabilidad a los programas mediante el uso de estrategias de reducción larvaria basadas en la comunidad. La razón consiste en que el control de *A. aegypti* solo puede lograrse por la gente que vive en las casas donde la problemática ocurre y por la gente que crea los hábitats larvarios debido a sus estilos de vida. Estos programas de participación comunitaria requieren de un programa de educación para la salud extensivo. Desafortunadamente, esta medida resulta muy lenta, por lo cual se ha propuesto una combinación de estrategias, una que permita un éxito inmediato y otra que permita proveer de sustentabilidad. La efectividad de dichos programas aun no ha sido probada en campo, siendo un área de oportunidad para los programas de control de vectores.

Insecticidas

Los primeros insecticidas consistieron en sustancias químicas inorgánicas, tales como sulfuro (1000 A.C), arsénico (900 D.C), arsenato de plomo, cloruro de mercurio, ácido bórico y algunos jabones. Estas sustancias fueron clasificadas como venenos generales, usualmente se requerían grandes cantidades y se utilizaban principalmente para control marginal de plagas. El siguiente grupo utilizado se clasificó como insecticidas botánicos, incluyendo a la nicotina, rotenona y piretrinas. Este grupo presentaba mayor complejidad estructural, mayor potencial y más selectividad. La disponibilidad de los insecticidas botánicos fue limitada y su alto costo y su fotosensibilidad evitó que tuvieran un mayor impacto en plagas, hasta la fecha, las piretrinas han sido el botánico mas utilizado en los últimos dos siglos. El verdadero desarrollo científico de los insecticidas comenzó en 1867 con la formulación y uso del arsénical "Verde de París". Para la década de 1920, ya se habían dado a conocer muchas de las estructuras de los insecticidas botánicos usados desde 1800. Para 1930, la principal meta fue el descubrimiento de insecticidas orgánicos sintéticos. En esta época se optimizaron los sistemas de síntesis, identificación, búsqueda y la metodología para probar su actividad biológica.

En 1939, Müller descubrió la propiedad insecticida del primer insecticida sintético, el DDT (dicloro difenil tricloroetano). Después de este hallazgo, hubo un rápido aumento en el número de insecticidas descubiertos, la lista incluye otros insecticidas organoclorados con modos de acción similares o distintos al DDT (ejemplo hexacloruro de benceno). En 1945, el primer organofosforado (OFs) fue descubierto, seguido en 1953, por los carbamatos y una década después por los piretroides (Casida y Quistad, 1998). Estos cuatro grupos de insecticidas aun constituyen el 90 % del mercado en salud pública. Otros insecticidas se han adjuntado, tales como insecticidas bacterianos *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) y reguladores de crecimiento, sin embargo, el uso de dichos compuestos es limitado para muchos vectores de enfermedades debido a su alto costo y a que su modo de acción es específico para larvas. Entre los insecticidas botánicos, la

rotenona, rianodina, veratidina y azardiquina son utilizados como los ingredientes activos de cubé, riania, sabadilla y neem respectivamente, recientemente se han promovido intensivamente los programas de desarrollo y usos de los extractos de semillas del neem como lo mostrado en cuadro 3 (Murray, 2006).

Cuadro 3. Lista de Productos recomendados por el CENAPRECE para el Combate de insectos vectores de enfermedades.

INSECTICIDA	FORMULACIÓN	USOS APROBADOS
Adulticidas: Tratamientos espaciales UBV en exteriores		
d-fenotrina + butóxido de piperonilo 2%	Solución oleosa	Tratamientos espaciales
d-fenotrina + praletrina + butóxido de piperonilo 5%	Solución oleosa	Tratamientos espaciales
Fenotrina 10%	Solución oleosa	Tratamientos espaciales
Pirimifos-metil 49%	Concentrado emulsionable	Tratamientos espaciales
Bifentrina 9%	Microemulsión	Tratamientos espaciales
Bifentrina 1.5%	Insecticida liquido	Tratamientos espaciales
Clorpirifós-etil 13.62%	Solución oleosa	Tratamientos espaciales
Malatión 44%	Emulsión en agua	Tratamientos espaciales
Rociado en interiores: Insecticidas con acción residual.		
Deltametrina 25.380%	Gránulos dispersables en agua	Rociado en viviendas
Deltametrina 5%	Polvo humectable	Rociado en viviendas
Lambdacialotrina 9.7%	Polvo micro encapsulado	Rociado en viviendas
Lambdacialotrina 10%	Polvo humectable	Rociado en viviendas
Bifentrina 10%	Polvo humectable	Rociado en viviendas
Bnediocarb	Polvo humectable	Rociado en viviendas
Ciflutrina 10%	Polvo humectable	Rociado en viviendas
Propoxur 70%	Polvo humectable	Rociado en viviendas
Alfacipermetrina 5.83%	Suspensión concentrada	Rociado en viviendas

Mecanismos de Acción de los Insecticidas

Los cuatro principales grupos de insecticidas actúan a nivel del sistema nervioso de los insectos. Los insecticidas organoclorados actúan como basuras en los canales de sodio de las neuronas de los insectos, resultando altamente específicos y tóxicos para insectos (Chanteau *et al.*, 1994). Aunado a esto, tienen una larga residualidad (~15 - 30 años) y su costo de producción es muy bajo, desafortunadamente, su bio-acumulación en tejidos grasos de mamíferos y sus efectos dañinos a la fauna silvestre, ocasionaron su restricción y veta en los Estados Unidos a partir de 1972. Actualmente, el lindano, endosulfán y DDT son utilizados en forma importante para salud pública en ciertas partes del mundo. Los organofosforados y metil-carbamatos actúan mimetizando a la acetilcolina en las uniones sinápticas. Los organofosforados son convertidos en sus análogos oxon mediante la acción de monooxidasas antes de que actúen como inhibidores de la AchE. Estos insecticidas carecen de especificidad, resultando moderadamente tóxicos para mamíferos, sin embargo, la carencia de residualidad y bio-acumulación se convirtieron en las principales razones para incrementar su uso agrícola y en salud pública. Actualmente, 10 de los 20 insecticidas más utilizados en mercado, son organofosforados y carbamatos. Los insecticidas más utilizados para salud pública son los larvicidas temefós (OFs), propoxur (MCs) y el adulticida malatión (OFs). Los insecticidas piretroides tienen un modo de acción similar a los organoclorados, sin embargo, los piretroides ganaron popularidad por su baja toxicidad para mamíferos, por su rápido efecto aniquilante en insectos y su residualidad intermedia (2-6 meses) (Cywinska *et al.*, 2006).

Una gran variedad de moléculas de piretroides fueron introducidas en el mercado en 1970 y 1980, actualmente constituyen el 25% de la producción mundial de insecticidas. Para el mercado de salud pública son utilizados desde rociados residuales intradomiciliares, tratamiento de pabellones, cortinas, mosquiteros, así

como en sprays, carboncillos, etc (Hemingway *et al.*, 2004). Un reducido número de nuevas clases de insecticidas podrían utilizarse para control de vectores, sin embargo, el alto costo del desarrollo y registro de nuevos insecticidas, significa que los insecticidas deben ser desarrollados inicialmente por el mercado de la agricultura y después ser utilizados para el control de vectores.

En el mercado de salud pública, las actividades, perfil de seguridad del insecticida y su forma de aplicación deberán ser apropiados, además, el mercado debe ser lo suficientemente grande como para garantizar los costos de registro para su uso en salud pública.

Control químico en México

Durante muchos años en México el insecticida permetrina se usó con fines de controlar a *A. aegypti* en su etapa adulta, esto por establecimiento de la Norma Oficial Mexicana 032 (NOM-032-SSA2-2002), sin embargo la existencia de nueva información basada en evidencia científica hizo necesaria la modificación y actualización de la mayoría de los conceptos, métodos y estrategias de la de la Norma Oficial Mexicana 032, estas modificaciones fueron aprobadas por el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Prevención y Control de Enfermedades quedando como Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector.

Permetrina

La permetrina pertenece al grupo de los piretroides. Los insecticidas piretroides son ésteres del ácido crisantémico con un alto grado de lipofilia. En forma general este grupo incluye a los piretroides que contienen desciano-3-fenoxibencil u otros alcoholes en su estructura química. Muchos de los antiguos compuestos de Tipo-

1 carecientes del fenoxibencil, resultan inestables en condiciones ambientales, impidiendo su uso en cultivos de campo, por ejemplo: piretrinas, aletrina, tetrametrina (Fig.9). Sin embargo, la introducción del fenoxibencil en la permetrina mejoró la estabilidad química y permitió el uso de los piretroides en el campo (Bloomquist, 1999). El nombre científico de la permetrina es 3-fenoxibenzil (IRS)-cis-trans-3-(2,2- dichlorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato. Es un insecticida no sistémico con acción de contacto, estomacal y con un poco de efecto repelente. La dosis oral aguda LD50 para ratas es de 4000 y 6000 mg/kg para mezclas de isómeros cis:trans de 40:60 y 20:80 respectivamente (LD50 aguda percutánea para ratas es >4000 mg/kg) (Shafer *et al.*, 2005). La permetrina es tóxica para peces y abejas. En mamíferos ocurre la hidrólisis de enlaces éster y el compuesto es eliminado como un conjugado glicosilado.

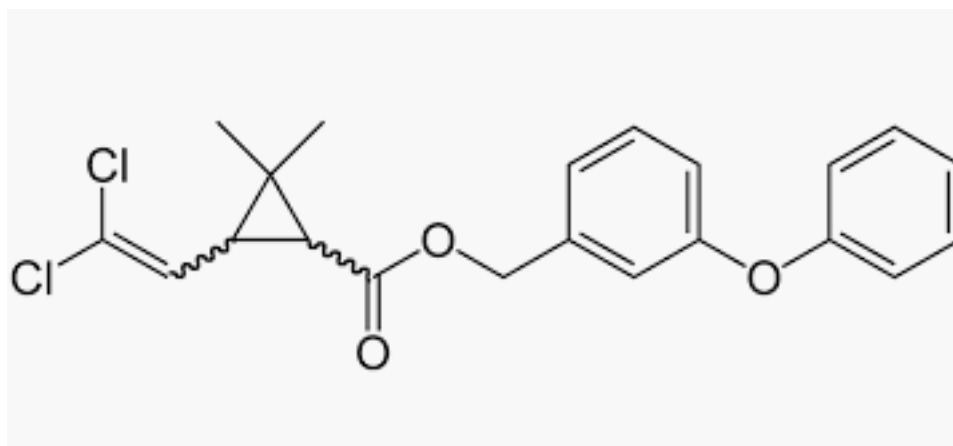


Figura 9. Estructura química de la permetrina.

Efecto de la permetrina en mosquitos

Los signos típicos de intoxicación por los piretroides del Tipo-1 incluyen hiperexcitabilidad y convulsiones en insectos. En insectos, los efectos de los piretroides (especialmente los del Tipo-1) pueden desarrollarse en 1 a 2 minutos después del tratamiento y pueden resultar en el derribe, es decir, la pérdida de la postura normal y de la locomoción. La exposición de humanos a cualquiera de

los dos tipos de piretroides puede causar parestesia, una sensación de quemazón o picazón de la piel, pero este efecto es más intenso con los compuestos del Tipo-2 (Bloomquist, 1999). La intoxicación con piretroides resulta de sus potentes efectos sobre la generación de impulsos nerviosos en el sistema nervioso central y periférico. En condiciones normales, las neuronas poseen un voltaje que traspasa las membranas, de unos -60 mV, en el lado interno. El impulso nervioso o potencial de acción consiste en una despolarización Na^+ , seguidos por un descenso del flujo hacia afuera de iones K^+ . Estos flujos de iones ocurren debido a la apertura y cierre de canales iónicos de proteínas que están empotradas dentro de la membrana nerviosa (canales de sodio dependiente de voltaje). El potencial de acción se propaga a lo largo del axón hasta llegar a las terminales nerviosas, donde estimula la liberación de los transmisores químicos. Los compuestos del Tipo-1 inducen picos múltiples de las descargas en los nervios sensoriales periféricos, nervios motores y en las neuronas dentro del sistema nervioso central (SNC). Todos estos efectos ocurren por la forma en que los piretroides se unen al canal de sodio, prolongando la corriente que fluye por los canales de sodio al hacer más lento o impedir el cierre de los canales (Soderlund y Knipple, 2003). La duración de las corrientes de sodio modificadas por los compuestos del Tipo-1 dura décimas o centésimas de milisegundos, mientras que las del Tipo-2 duran algunos minutos o aún más. Estos efectos sobre la corriente de sodio también causan un profundo incremento en la liberación de neurotransmisores de las terminales nerviosas. La sinápsis neuromuscular de los insectos es un blanco especialmente importante para los piretroides, como también para otros insecticidas. (Bloomquist, 1996).

Aplicación de permetrina para ULV

La forma de aplicación de la permetrina y otros pirteroides utilizados en el control del dengue, es mediante aerosoles espaciales de gota de ultra bajo volumen (ULV). Para que esta aplicación sea efectiva, las gotas de permetrina deben hacer contacto con los mosquitos en vuelo o en sitios de reposo,

desafortunadamente, esta medida ha demostrado ser inefectiva en muchos casos (Gubler, 1989; WHO, 2002). Ultimamente, se ha generado gran interés en nuevas formas de aplicación residual de piretroides en cortinas, paredes y otras superficies de reposo del mosquito *A. aegypti* (Karch *et al.*, 1995; Kroeger *et al.*, 2006). Estas medidas, como ha sido demostrado en el control de Anopheles, son más focalizadas, eficientizando el uso de insecticidas económica y ambientalmente.

Resistencia a Insecticidas en Vectores

Los programas de control de vectores han dependido principalmente del uso de insecticidas y muchos de los esfuerzos de control resultaron exitosos durante varias décadas. El primer insecticida utilizado para control de mosquitos fue el DDT. En 1955, la Organización Mundial de la Salud (WHO) llamó a la erradicación global de la malaria a través del uso de este insecticida. El uso de rociados de casas con DDT en programas de amplia escala, redujo dramáticamente la prevalencia de malaria en Asia (Phillips, 1983; Chen *et al.*, 2010). Por otro lado, los programas de aspersión aérea de temefós en los programas de control de la oncocercosis en Africa, casi eliminaron la ceguera de los ríos durante las décadas de los 70's y 80's (Curtis, 1989; Casquet *et al.*, 2011).

Para 1972, *Aedes aegypti* ya había sido erradicado del 73% del territorio y de 19 países (Gubler, 1989), sin embargo, en el mismo año, la resistencia al DDT fue reconocida como un problema serio y la campaña terminó antes que la meta de erradicación fuera alcanzada (Brown y Pal, 1971).

Los problemas de resistencia han continuado a pesar del uso de nuevos grupos de insecticidas. Alrededor de cien especies de mosquitos han generado resistencia a uno o más insecticidas (Hemingway y Ranson, 2000). El control de la malaria y dengue, han incluido algunos organoclorados (hexacloruro de benceno, DDT), organofosforados (meti-paratión, temefós, malatión y clorpirifos),

carbamatos (propoxur y carbosulfán) y piretroides (resmetrina, permetrina, fenotrina)(Ayesa *et al.*, 2006).

la presión pública debida a los efectos adversos del DDT hacia el ambiente, exigen su retiro del mercado en salud pública. Por otro lado, el retiro del DDT en las campañas de control de vectores en países del tercer mundo, ha sido relacionado con el aumento en la incidencia de la malaria en países de Africa (Roberts *et al.*, 1997). Ambos puntos de vista se están evaluando cautelosamente, antes de tomar una decisión definitiva sobre el uso de este insecticida.

Diversas especies de insectos vectores han desarrollado resistencia a los organofosforados. La resistencia de amplio espectro a organofosforados, o la resistencia específica para malatión están presentes en las principales especies vectoras del género *Anopheles* (Hemingway y Ranson, 2000), *Culex* (Hemingway y Karunaratne, 1998) y también en *Aedes aegypti* (Georghiou *et al.*, 1987; Vaughan y French-Constant, 1998; Rawlins, 1998; Bisset *et al.*, 2006). Los organofosforados y carbamatos tienen el mismo modo de acción y una vez que una población de insectos es resistente a alguno de los dos insecticidas, es muy probable que ocurra un fenómeno de resistencia cruzada (Villam y Hemingway, 1987).

Detección de la Resistencia en una Población: Bioensayos

En los bioensayos dosis-respuesta a insecticidas, muestras de insectos son expuestas a un rango de dosis de insecticidas, produciendo un rango de mortalidades en la muestra tratada. Al graficar los datos de mortalidad contra la dosis, una curva sigmoide es obtenida. Esta curva es transformada en una línea de respuesta recta, al transformar el logaritmo de la dosis y la mortalidad en escala probit (Hemingway y Ranson, 2005). La gráfica dosis-respuesta permite

al investigador establecer la dosis requerida para matar a un porcentaje dado de individuos tratados. Las cepas usualmente son caracterizadas por la dosis letal que mata al 50% (LD50) ó 95% (LD95) de los individuos. Por otro lado, cuando la dosis exacta que entra al organismo no se conoce, se puede calcular la concentración letal (ejemplo, LC50 ó LC95). La pendiente de la línea de respuesta es una medida de la variabilidad de la población, una línea con mayor inclinación de la pendiente indica la presencia de una cepa mas homogénea.

Por otro lado, están disponibles algunos ensayos bioquímicos simples para detectar la actividad elevada de los tres sistemas de enzimas (esterasas, glutation-s-transferasas y monoxigenasas) envueltas en el metabolismo de insecticidas (Brogdon, 1989; WHO, 1998; Crochu *et al.*, 2004). Otras pruebas bioquímicas y métodos moleculares basados en PCR han sido desarrollados para detectar alteraciones del sitio blanco del insecticida para algunos insectos vectores de enfermedades (Hemingway *et al.*, 2004).

Mecanismos de Resistencia a Insecticidas

La resistencia a insecticidas es el resultado de cambios genéticos que alteran atributos fisiológicos, morfológicos o de comportamiento en las especies. Los mecanismos de resistencia se dividen en cuatro categorías: penetración reducida, comportamiento, metabolismo elevado e insensitividad del sitio blanco. Por lo general, estos mecanismos no son específicos y confieren resistencia cruzada a otros tóxicos de estructura similar y en muchos casos, a compuestos químicamente no relacionados (Soderlund y Bloomquist, 1990).

Los genes de los principales sitios blancos: canales de sodio (para), receptores del ácido amino-butírico (GABA) y acetilcolinesterasa (AChE), han sido clonados y sus secuencias han sido comparadas entre insectos resistentes y susceptibles. Algunas mutaciones han sido asociadas con resistencia a

insecticidas, aunque en muchos casos no se ha elucidado el mecanismo de resistencia a nivel molecular (Albers *et al.*, 2013).

Resistencia por Sitio Blanco

Los organofosforados y carbamatos tienen su sitio blanco en la acetilcolinesterasa (AChE). La AChE hidroliza al neurotransmisor excitatoria acetilcolina en la membrana post-sináptica del nervio. La AChE de los insectos tiene una especificidad de sustrato intermedio entre la AChE de los vertebrados y la butiril-colinesterasa. La forma molecular predominante en insectos es un dímero globular anfífilo que se une a la membrana mediante un ancla glicopéptica. Alteraciones en la AChE en insectos resistentes a organofosforados y carbamatos resulta en una reducción o inhibición en la sensibilidad de la enzima por estos insecticidas (Asghar *et al.*, 2015).

Canales de Sodio

El rápido efecto de derribe que caracteriza a los insecticidas DDT y piretroides, es ocasionado por la activación persistente de los canales de sodio. Esta activación se debe a la forma en que los insecticidas se unen al poro del canal, prolongando el mecanismo de inactivación dependiente de voltaje. La reducción en la sensibilidad del canal de sodio dependiente de voltaje a la unión de los insecticidas es la causa del fenotipo resistente conocido como "kdr" presente en varias especies de insectos. Debido a que el canal de sodio es el sitio blanco del DDT y piretroides, muchos estudios en la década de los 80 y 90s se enfocaron en esta proteína. El canal de sodio dependiente de voltaje de los insectos, es una proteína transmembranal que contiene alrededor de 2108 aminoácidos plegados en cuatro dominios homólogos e hidrofóbicos (dominio I, II, III y IV), separados por uniones hidrofílicas. Cada dominio se compone de seis segmentos

transmembranales (sl-s6). Diversas especies de insectos resistentes al DDT y piretroides presentan alteraciones en el gen del canal de sodio. La asociación entre la resistencia kdr con modificaciones en el canal de sodio fue confirmada mediante estudios de unión de neurotoxinas (Bloomquist y Miller, 1986) y mediante estudios de mapeo genético. En estos últimos, se identificó una sola mutación en el dominio II segmento transmembranal 6 (DIIS6), asociada con la resistencia tipo kdr en *Musca domestica* (Williamson *et al.*, 1993).

La mutación kdr consistió en un cambio de nucleótidos de adenina a timina en el residuo Leucina\0\A, confiriendo un cambio de aminoácidos de leucina (Leu) a fenilalanina (Phe). Posteriormente, la misma mutación fue identificada en varias especies de mosquitos, tales como *An. gambiae*, *An. stephensi*, *An. sacharovi* y *Culex pipiens* (Martinez-Torres *et al.*, 1998; Martinez-Torres *et al.*, 1999; Luleyap *et al.*, 2002; Enayati *et al.*, 2003).

Resistencia kdr en el Mosquito *A. aegypti*

La resistencia tipo kdr (por sus siglas en inglés: knockdown resistance) es un mecanismo de resistencia seleccionado por insecticidas piretroides y DDT. Actualmente su principal forma de detección es mediante bioensayos, donde los insectos son expuestos a DDT o piretroides en conjunto con inhibidores de enzimas, tales como PBO y DEF, para descartar resistencia por mecanismos enzimáticos (Prapanthadara *et al.*, 2002; Brengues *et al.*, 2003). El primer reporte de resistencia tipo kdr en *A. aegypti*, ocurrió en Tailandia (1975) después de la falla en una campaña de control utilizando bioresmetrina. Los estudios genéticos de una cepa seleccionada de esta población, demostró la presencia de un solo factor de resistencia a piretroides (Rpy) presente en el cromosoma III. Este factor fue incompletamente dominante en herencia (Soderlund y Bloomquist, 1990).

LITERATURA CITADA

- Albers, C.N., Jensen, A., Bælum, J., Jacobsen, C.S., 2013. Inhibition of DNA polymerases used in Q-PCR by structurally different soil-derived humic substances. *Geomicrobiol. J.* 30 (8), 675–681.
- Asghar, U., Malik, M.F., Anwar, F., Javed, A., Raza, A., 2015. DNA extraction from insects by using different techniques: a review. *Adv. Entomol.* 3, 132–138.
- Azil, A., S. Long, S. Ritchie, C. Williams. 2010. The development of predictive tools for pre - emptive dengue vector control: a study of *Aedes aegypti* abundance and meteorological variables in North Queensland, Australia. *Trop Med Int Health.* 15 (110):11190 – 1197.
- Bates, M. 1970. The natural history of mosquitoes. Peter Smith, Gloucester, MA. 378 pp.
- Barrera, R., C. Machado, L. Bulla. 1981. La persistencia de criaderos, sucesión y regulación poblacional en tres Culicidae urbanos (*Culex fatigans* Wied., *C. corniger* Theo., y *Aedes aegypti* (L.)). *Acta Cient Venez.* 32: 386 – 393.
- Bennett KE., Olson KE, Munoz MdeL, Fernandez-Salas I. and JA. Farfan-Ale. 2002. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67: 85-92.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507.
- Bohart, R., R. Washino. 1978. Mosquitoes of California, 3rd ed. University of California Press. Division of Agricultural Sciences, Berkeley, CA. 126 – 134.

- Brown, A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes; a pragmatic review. *J. Am Mosq Control Assoc.* 2 (22): 123 – 140.
- Brogdon GW and Janet McAllister. 1998a. Insecticide Resistance and Vector Control. *Emerging Infectious Diseases.* 4: 605-613
- Carpenter, S., W. LaCasse. 1955.. Mosquitoes of North America (north of México). University of California. Press, Berkeley, Los Angeles, CA. 360p.
- Carrada, T., I. Vázquez. 1984. La ecología del dengue y el *Aedes aegypti*. Investigación preliminar. Tercera parte. *Salud Pública México.* 26(33):2297 - 311.
- Casquet, J., Thebaud, T., Gillespie, R.G., 2011. Chelex without boiling, a rapid and easy technique to obtain stable amplifiable DNA from small amounts of ethanol-stored spiders. *Mol. Ecol. Resour.* 12 (1), 136–141.
- Crochu, S., Cook, S., Attoui, H., Charrel, R.N., De Chesse, R., Belhouchet, M., Lemasson, J.J., de Micco, P., de Lamballerie, X., 2004. Sequences of flavivirus-related RNA virus persist in DNA from integrated in the genome of *Aedes spp.* mosquitoes. *J. Gen. Virol.* 85 (7), 1971–1980.
- Chanteau, S., Luquiaud, P., Failloux, A.B., Williams, S., 1994. Detection of *Wuchereira bancrofti* larvae in pooled mosquitoes by the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88 (6), 665–666.
- Chen, H., Rangasamy, M., Tan, S.Y., Wang, H., Siegfried, B.D., 2010. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS One* 5, e11963.
- Chester G, Moore C, Mitchell J. 1997. *Aedes albopictus* in the United States: Ten-Year presence and Public health implications. *Emerg Inf Diseases* 3(3):1-8.
- Coleman M, Hemingway J. 2007. Insecticide resistance monitoring and evaluation in disease transmitting mosquitoes. *J Pest Sci* 32: 69–76.

- Cruz, C., C. Sebrango, M. Cristo, C. Pina, M. Marquetti, Sánchez L. 2010. Comportamiento estacional y temporal de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Sancti Spíritus, 1 999 - 2007. Rev cubana Med Trop. 62(11):55 - 10.
- Cywinska, A., Hunter, F.F., Hebert, P.D.N., 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Med. Vet. Entomol. 20 (4), 413–424.
- Eldridge BF. 2005. Mosquitoes, the CulicidA. pp 95-11 en Biology of Disease Vectors (2nd ed) editado por W. C. Marquardt. Elsevier Academic Press.
- Dranee, K. Parakrama, J. Hemingway, C. Black, H. Ransona. 2007. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. Insect Biochem Molec Biol. 38(11):1113 – 123.
- Fernández, I. 2009. Biología y control de *Aedes aegypti*. Manual de operaciones. Editorial Universidad Autónoma de Nuevo León. Primera Edición. Monterrey, Nuevo León. 133p.
- Fernández, F., J. Lanaconne, 2005. Variaciones de tres índices larvarios de *Aedes aegypti* (LL.) (Diptera: Culicidae) y su relación con los casos de dengue en Yurimaguas, Perú, 2000 - 2002. Parasitología Latinoamerican.; 60:33 – 16.
- Fernández-Salas 1.1999. Biología y Control de *Aedes aegypti*. Manual de Operaciones. Editorial UANL. ISBN 968 7808 88 8, Monterrey, Mexico.
- Flores Adriana E., Grajales JS, Fernandez-Salas I, Ponce-Garcia G, Loaiza-Becerra Ma. H, Lozano S, Brogdon WG, Black IV WC, and B. Beaty. 2006. Mechanisms Of Insecticide Resistance In Field Populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico Journal of the American Mosquito Control Association: Vol. 22 (4): pp. 672-677.
- Gadelha, D. 1985. Biología e comportamento do *Aedes aegypti*. Rev. Bras. Mal. Trop. 37:229 - 36.

- García, C., L. García, L. Espinosa, C. Ley. 2011. Abundancia y distribución de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) y dispersión del dengue en Guasave Sinaloa, México. *Rev. Biol. Trop.* 59(44):11609 - 1619.
- Georghiou, G. 1971. Resistance of Insects and Mites to Insecticide and Acaricides and the Future of Pesticide Chemicals. In: Swift, J. E. (ed.) *Agricultural Chemicals Harmony or Discord for Food People and Environment*. Univ. California Div. Agr. Sci. 151p.
- Glubert, D. J., & Clark, G. G. (1995). Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem. *Emerging Infectious Diseases*, 1(2), 55–57.
- Gordon J. 1988. Health Education Research: Mixed strategies in health education and community participation: an evaluation of dengue control in the Dominican Republic. *Oxford University Press* 3(4): 399-419.
- Gubler, D.J. & Trent, DW. 1994. Emergence of epidemic Dengue: Dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infectious Agents and Disease* 2, 383-393.
- Gubler DJ. 1998 (b). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(3): 480-496.
- Harwood RF, James MT. 1993. *Entomología Médica y Veterinaria*, UTHEA, Noriega Editores. México D.F.
- Hemingway, J., L. Field, J. Vontas. 2002. An overview of insecticide resistance.
- Hemingway, J., R. G. Boddington, and J. Harris. 1989. Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. *Bull. Entomol.Res.* 79: 123-130.
- Herrera, F. 1999. *Ecología de Aedes aegypti*. Dugandia. Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad del Atlántico: 2(11):55 – 8.

- Ibáñez - Bernal, S., H. Gómez - Dantés. 1995. Los vectores del dengue en México: Una revisión crítica. *Salud Pùb. Méx.* 37:553 – 63.
- Ibáñez - Bernal, S., C. Martínez - Campos. 1994. Claves para la identificación de larvas de mosquitos comunes en las áreas urbanas y suburbanas de la República Mexicana (Diptera: Culicidae). *Folia Entomológica Mexicana.* 92:443.
- Jentes, E.S., Pomeroy, G., Gershman, M.D., Hill, D.R., Lemarchand, J., Lewis, R.F., Staples, J.E., Tomori, O., Wilder-Smith, A., Monath, T.P., 2011. Informal WHO working group on geographic risk for yellow fever. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination. 2010: Consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever *Lancet* 11 (8), 622–632.
- Jirakanjanakit N, Rongnoparut P, Saengtharatip S, Chareonviriyaphap T, Duchn S, Bellec C, Yoksan S. 2007. Insecticide susceptible/resistance status in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand during 2003-2005. *J Econ Entomol*, 100(2):545-550.
- Kamgang, B., Wilson-Bahun, T.A., Irving, H., Kusimo, M.O., Lenga, A., Wondji, C.S., 2018. Geographical distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and genetic diversity of invading population of *A. albopictus* in the Republic of the Congo. *Wellcome Open Res.* 3 (79), 1–8.
- Kamgang, B., Wilson-Bahun, T.A., Irving, H., Kusimo, M.O., Lenga, A., Wondji, C.S., 2018. Geographical distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and genetic diversity of invading population of *A. albopictus* in the Republic of the Congo. *Wellcome Open Res.* 3 (79), 1–8.
- Kettle, D. S. 1993. *Medical and Veterinary Entomology.* Cab International. UK: 125 - 131, 451 - 471.

- King RC. 1975. Handbook of Genetics. Vol.3 Plenum, Nueva York, p. 874.
- Leiva, N., O. Cáceres. 2004. Variabilidad genética de *Aedes aegypti* en algunas áreas del Perú usando Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP).
- Mazine, C., M. Macoris, M. Macoris - Andrighetti, S. Yasumaro, M. Silva, M. Nelson, P. Winc. 1996. Disposable containers as larval habitats for *Aedes aegypti* in a city with regular refuse collection: a study in Marilia, Sao Paulo State, Brazil. *Acta Tropica*. 62:11 - 13.
- Mieli, M., J. García, G. Martí. 2006. Dinámica poblacional de los estadios inmaduros del vector del dengue *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): un estudio longitudinal (11996 - 2000)). *Rev. Biol. Trop.* 54: 979 - 983.
- Morrison, A. C., Zielinski-Gutierrez, E., Scott, T. W., & Rosenberg, R. (2008). Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. *PLoS Medicine*, 5(3), 0362–0366.
- Morrison, A., H. Astete, C. Chapilliquen, G. Ramirez - Prada, A. Diaz, T.W. Scott. 2004. Evaluation of a sampling methodology for rapid assessment of *Aedes aegypti* infestation levels in Iquitos, Perú. *J. Med. Entomol.* 41: 502 – 510.
- Nelson, M. J. 1986. *A. aegypti*: Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud. Washington, DC. 50p.
- Nene, V., J. Wortman, D. Lawson, B. Haas, C. Kodira, Z. Tu, B. Loftus, Z. Xi, K. Megy, M. Grabherr, Q. Ren, E. Zdobnov, N. Lobo, K. Campbell, S. Brown, M. Bonaldo, J. Zhu, S. Sinkins, D. Hogenkamp, P. Amedeo, P. Arensburger, P. Atkinson, S. Bidwell, J. Biedler, E. Birney, R. Bruggner, J. Costas, M. Coy, J. Crabtree, M. Crawford, B. Debruyne, D. Decaprio, K. Eglmeier, E. Eisenstadt, H. El - Dorry, W. Gelbart, S. Gomes, M. Hammond, L. Hannick, J. Hogan, M. Holmes, D. Jaffe, J. Johnston, R. Ken

nedy, H. Koo, S. Kravitz, E. Kriventseva, D. Kulp, K. Labutti, E. Lee, S. Li, D. Lovin, C. Mao, E. Mauceli, C. Menck, J. Miller, P. Montgomery, A. Mori, A. Nascimento, H. Naveira, C. Nusbaum, S. O'leary, J. Orvis, M. Pertea, H. Quesneville, K. Reidenbach, Y. Rogers, C. Roth, J. Schneider, M. Schatz, M. Shumway, M. Stanke, E. Stinson, J. Tubio, J. Vanzee, S. Verjovski, D. Werner, O. White, S. Wyder, Q. Zeng, Q. Zhao, Y. Zhao, C. Hill, A. Raikhel, M. Soares, D. Knudson, N. Lee, J. Galagan, S. Salzberg, I. Pau Isen, G. Dimopoulos, F. Collins, B. Birren, C. Fraser - Liggett, D. Severson. 2007.. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 316: 1718 – 1723.

Organización Mundial de la Salud (OOMS). 1997.. Informe sobre la salud en el mundo. Editorial. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza.119 9p

Philip CB, Rozenboom LE. 1973. Medico-veterinary entomology: a generation of progress. In: Smith RF, Mittler TE, Smith CN, editors. History of entomology. Palo Alto (CA): Annual Reviews Inc.

Piatt KB., Linthicum KJ., Myint KS., Innis BL., Lerdthusnee K., Vaughn, DW. 1997. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *Am Jour Trop Med Hyg.* 57(2): 119-25.

Rawlins, S. C. 1998. Spatial distribution of insecticide resistance in Caribbean populations of *Aedes aegypti* and its significance. *Pan Am. J. Public Health* 4: 243D251.

Rodriguez, M. M., Bisset, J. A., De Armas, Y. and F. Ramos. 2005. Pyrethroid insecticide-resistant strain of *Aedes aegypti* from Cuba induced by deltamethrin selection. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21,437-445

Rodriguez M, Bisset J, Ruiz M, and A Soca. 2002. Cross-Resistance to Pyrethroid and Organophosphorus Insecticides Induced by Selection with Temephos

in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. J. Med. Entomol. 39(6): 882-888 (2002).

Rodríguez - Cruz, R. 2002. Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. Rev Cubana Med Trop. 54(33):1189 – 201.

Rodriguez, M. M., J. Bisset, D. Molina, L. Lauzan, and Soca A. 2001. Detection of resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from Cuba and Venezuela. J. Med. Entomol. 38: 623-628.

Rojas, A., G. Schmeda. 1992. Feeding Deterrence and Insecticidal Effects of Plants Extracts on *Lutzomyia longipalpis*. P hytoth Rese. 6:664 - 7.

Roldan, S., Santacoloma, L., Brochero, H., 2013. Estado de la sensibilidad a los insecticidas de uso en salud pública en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Casanare, Colombia. Biomedica 33 (3), 203–209.

Saavedra RK, Urdaneta ML, Rajatileka S, Moulton M, Flores A E, Fernandez SI, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, Ranson H, Hemingway, Black 4th WC. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. Insect Mol. Biol. 16: 785–798.

Schmeda, G., A. Arias. 1992.. A screening method for natural products on triatominae bugs. Phytother. Res. 6: 68 - 73.

Stein, M., G., W. Oria, J. Almiron, J., Willener. 2005. Fluctuación estacional de *Aedes aegypti* en Chaco, Argentina. Rev. Salud Pública. 39(44):5559 – 564.

Thiri6n, J. I. 2002. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) como transmisor del dengue en M6xico. Tesis UNAM Facultad de Ciencias: 134p.

Torres, T., R. Caballero, J. Barraza, J. Romero. 2006. Cultural Conceptions about

Dengue in Nayarit, Mexico. Dengue Bull. 30: 223 - 33.

Vargas, L., A. Martínez - Palacios. 1956. Anofelinos mexicanos, taxonomía y distribución. México, D.F Comisión Nacional para la Erradicación del Paludismo, Secretaría de Salubridad y Asistencia. 181p.

WHO, 1997. Dengue hémorragie Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control, 2 nd edition. Geneva.

World Health Organization. 1982 manual on environmental management for mosquito control, Geneva Geneva Switzerland.

Zapata - Peniche, A., P. Manrique - Saide, E. Rebollar - Téllez, A. Che - Mendoza, F. Manzanilla - Dzul. 2007.. Identificación de larvas de mosquito (Diptera: Culicidae) de Mérida, Yucatán, México y sus principales criaderos. Rev Biomed. 18(11):33 – 17.

Estudio 1

Comparison of two DNA extraction methods from larvae, pupae, and adults of *Aedes aegypti*

Josue M. de la Cruz-Ramos^{a, b}, Luis M. Hernandez-Triana^c, Cristina García-De la Peña^d, Vicente H. Gonzalez-Alvarez^e, James Weger-Lucarelli^f, Quetzaly Karmy Siller-Rodríguez^d, Francisco J. Sanchez Ramos^a, Americo D. Rodríguez^g, Aldo I. Ortega-Morales^{a, b, *}

^a Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, Periférico y carretera Santa Fe, 27084, Torreón, Coahuila, Mexico

^b Unidad de Investigaciones Entomológicas y de Bioensayos del estado de Durango, Periférico y carretera Santa Fe, 27084, Torreón, Coahuila, Mexico

^c Animal and Plant Health Agency, Virology Department, Wildlife Zoonoses and Vector Borne Diseases Research Group, Woodham Lane, New Haw, Addlestone, Surrey, KT153NB, UK

^d Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Universidad, 35010, Gómez Palacio, Durango, Mexico

^e Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Guerrero, Cijajinicuilapa, Guerrero, Mexico

^f Department of Biomedical Sciences and Pathobiology, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA

^g Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública, Tapachula, Chiapas, Mexico

* Corresponding author. E-mail address: agortega@hotmail.com (A.I. Ortega-Morales).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02660>

Received 3 June 2019; Received in revised form 13 September 2019; Accepted 11 October 2019

2405-8440/© 2019 Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

J.M. de la Cruz-Ramos et al. Heliyon 5 (2019) e02660

Abstract

Mosquitoes are the most important arthropods from the point of view of public health, due to the fact that they can transmit a large number of pathogens which can cause diseases to humans and animals. *Aedes aegypti* (L.) is one of the most important vector species in the world, since it can transmit numerous pathogens such as dengue, Zika, and chikungunya. Therefore, studies involving the molecular aspects of this and other mosquitoes species are currently increasing. In this report, we describe the comparison between two DNA extraction techniques, Chelex and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), for carrying out DNA extraction in larvae, pupae and adult female of *A. aegypti*. The Chelex technique was superior in the amount and purity of DNA as compared to the CTAB technique in the three life stages we tested.

Key Words: Microbiology, Genetics, Biochemistry, Molecular biology, Public health, *Aedes aegypti*, DNA extraction, Comparison, Chelex, CTAB.

1. Introduction

The yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (L.) is one of the most common mosquito species in urban and suburban areas in tropical and sub-tropical regions worldwide. It is native to Africa and is well adapted to urban conditions, becoming one of the most common species in association with humans ([Kamgang et al., 2018](#)). *Aedes aegypti* is considered one of the most important species for public health since it is the main vector for a number of arthropod-borne viruses (arboviruses) causing diseases in humans such as yellow fever, dengue fever, chikungunya, and Zika, which are widely distributed across tropical and subtropical regions worldwide ([Roldan et al., 2013](#); [Jentes et al., 2011](#)).

The number of molecular techniques available for entomological studies has grown enormously since the conception of the polymerase chain reaction or PCR. The presence of conserved regions in the DNA sequences, such as

mitochondrial, ribosomal, and nuclear DNA makes it possible to amplify fragments of organisms whose genome is unknown (Kocher *et al.*, 1989; Fitzpatrick *et al.*, 2010; Albers *et al.*, 2013). The use of a rapid and inexpensive DNA extraction technique that results in high quality DNA is essential for any PCR-based molecular tool. Therefore, the DNA extraction to be used is an essential step in many molecular protocols (Gupta and Preet, 2012).

The use of ready-made kits for the extraction and purification of genomic DNA using pre-made anion-exchange columns packaged with all necessary solutions to lyse the cells and solubilize the DNA makes the process significantly easier (Gupta and Preet, 2012). DNA extracting commercial kits of different brands are time efficient, but can be very expensive, especially in resource-poor nations. However, there are some low-cost DNA extraction techniques such as Chelex® 100 (referred to as “Chelex,” Bio-Rad® Lab. Hercules, CA, USA) and cetyltrimethylammonium bromide (referred to as “CTAB”). Chelex resins are composed of styrene-divinylbenzene copolymers containing paired iminodiacetate ions, which act as chelating groups in binding polyvalent metal ions (Ip *et al.*, 2015), while CTAB is a cationic surfactant added in the DNA extraction buffer, which dissociates and selectively precipitates DNA from histone proteins (Muhammad *et al.*, 2013). Other rapid techniques for obtaining DNA in vector groups such as blackflies and mosquitoes have been detailed by Hernandez-Triana *et al.* (2012, 2019) in which time and DNA recovery efficiency was assessed. These included adding legs directly into the PCR mix, sonicating legs placed in water, the use of alkaline lysis buffer (Hotshot technique).

Currently, there are a large number of PCR-based studies involving mosquitoes, for which DNA extraction is necessary, for example molecular taxonomy (Hebert *et al.*, 2003; Cywinska *et al.*, 2006), surveillance and detection of pathogens (Snounou *et al.*, 1993; Chanteau *et al.*, 1994; Crochu *et al.*, 2004), forensic studies (Spitaleri *et al.*, 2006), and detection of insecticide resistance genes (Martínez-Torres *et al.*, 2002; Brengues *et al.*, 2003).

Successful DNA amplification depends heavily upon the extraction technique

used ([De Armas et al., 2005](#); [Sagar et al., 2014](#); [Dai et al., 2017](#)), which might be correlated to the funds available to the researchers. In this study we aimed to compare and evaluate the performance of two DNA extraction methods, Chelex and CTAB, in larvae, pupae, and adults of *A. aegypti* for subsequent molecular analyses. These two methods were chosen for their known reliability in keeping the DNA stable for long periods of time and they were easy to obtain within our laboratory.

2. Materials and methods

2.1. Mosquito collection

Mosquito eggs of *A. aegypti* were collected in September 2017 from ovitraps placed in different locations of Gomez Palacio, Durango, Mexico. Eggs were hatched and reared to the fourth instar stage. A portion of fourth instar larvae and pupae were killed in hot water (60-80 C), while a portion of the adult females was killed in lethal chambers using chloroform vapors. All specimens were identified to species and immediately transferred to labeled vials with 90% alcohol and frozen at -40 C until analysis.

2.2. DNA extraction and visualization

A total of 60 specimens were used for DNA extraction: 10 specimens of each stage (larvae, pupae, and adult female) for each DNA extraction technique (Chelex and CTAB). Each specimen was placed in 1.5 ml (Eppendorf®) for DNA extraction and quantification of nucleic acids. The DNA extraction was performed in the Molecular Biology Laboratory of the UAAAN-UL using the methodology of Chelex for the standardized DNA extraction technique described by [Musapa et al. \(2013\)](#), where 300 µl molecular grade chelating resin (Chelex 100 Resin Bio-Rad®) was added to each sample. Following maceration, the sample was centrifuged at 10,000 RPM for 10 s and then the samples were incubated in a heating block at 56 C for 1 h. The samples were then vortexed to homogenize, and a further incubation was performed in a heating block at 100 C for 10 min

followed by centrifugation at 10,000 RPM for 10 min. Finally, 30–50 μ l of supernatant was recovered, which was stored at -20 C.

The technique of CTAB was performed according to described protocols (Tel-Zur *et al.*, 1999). Briefly, 100 μ l of CTAB was added to each sample for maceration and vortexed for 15 s, and then incubated in a heating block at 65 C during 20 min after which 200 μ l of chloroform was added to each sample and mixed by vortexing for 15 s, and centrifuged at 13,000 RPM for 5 min. The aqueous phase was transferred to new vials (1.5 ml), 100 μ l of cold isopropanol (-12 C) was added, and then samples were stored at -30 C for 15 min. Following the incubation, the samples were centrifuged at 13,000 RPM for 5 min. The supernatant was then decanted, followed by the addition of 100 μ l of cold 70% ethanol (-12 C) and centrifugation at 13,000 RPM for 3 min. The ethanol was then decanted and the pellets containing the DNA were dried in the vial at 24 C for 24 h. Finally, pellets were re-suspended adding 20 μ l of milliQ water and frozen at -20 C.

The amount of DNA concentration and purity (absorbance values) was measured using a spectrophotometer (Nanodrop, 2000; Thermo Scientific®). Extracted DNA (5 μ l of each sample) was visualized using agarose gels (0.8%) with 0.5X TBE buffer solution (Tris base, boric acid, 0.5M EDTA, pH 8.0) in an electrophoresis chamber for 30 min. DNA in the gels was visualized and photographed using a transilluminator (MultiDoc-It Digital Imaging System).

2.3. Statistics

Descriptive statistics of DNA concentrations and absorbance levels (260/280) for qualitative DNA in each specimen were calculated and data were transformed to $\log_{10}(x + 1)$ (Zar, 1999). We performed statistical analyses using a parametric model of Student's T-test to assess differences in the amount of DNA recovered following extraction and DNA absorbance quality levels for all specimens between techniques Chelex and CTAB. To compare the amount of DNA and absorbance levels among life stages tested (larvae, pupae and adult female) for each DNA

extraction technique, we performed analyses of variance (ANOVA). All statistical tests were considered significant with $P < 0.05$ and were made in PASW Statistics 18.

3. Results

Extracted DNA in agarose gels for both DNA extraction techniques is shown in [Fig. 1](#). Using the Chelex-based DNA extraction technique, the DNA concentrations from the larvae ranged from 115.4 – 188.9 ng/ μ l; pupae ranged from 97.8 – 189.2 ng/ μ l; and adults ranged from 292.4 – 459.7 ng/ μ l ([Table 1](#)). While using the CTAB technique, the concentrations of the larvae were 7.4–21.3 ng/ μ l; the concentrations of the pupae were 10.8–40.7 ng/ μ l; and the concentrations of the adults were 30.1–93.1 ng/ μ l ([Table 2](#)).

A significant difference in the amount of DNA from the larvae stage between techniques was observed ($t_{1/4} 19,877$, $df_{1/4} 18$, $P < 0.001$), where the highest DNA concentration was observed using Chelex extraction ($x_{1/4} 137.46$ ng/ μ l), while with the CTAB technique the DNA concentration was lower ($x_{1/4} 15.33$ ng/ μ l) ([Fig. 2](#)). However, the DNA absorbance levels between both techniques were similar ($t_{1/4} 0.395$, $df_{1/4} 18$, $P_{1/4} 0.697$) with averages of 1.96 and 1.95, respectively ([Tables 1 and 2](#)) (see [Fig. 3](#)).

A significant difference in the DNA concentration from the pupa stage between both techniques was observed ($t_{1/4} 16.142$, $df_{1/4} 18$, $P < 0.001$). The highest DNA concentration was observed using Chelex ($x_{1/4} 189.2$ ng/ μ l), while using CTAB, the DNA concentration was lower ($x_{1/4} 40.7$ ng/ μ l) ([Fig. 2](#)). The DNA absorbance levels between both techniques were different ($t_{1/4} -4.768$, $df_{1/4} 18$, $P < 0.001$) with averages of 1.81 and 2.04 respectively ([Tables 1 and 2](#)).

As in the larvae and pupa stage, a significant difference in the DNA concentration from adults between both techniques was observed ($t_{1/4} 14.901$, $df_{1/4} 18$, $P < 0.001$). The highest DNA concentration was observed using Chelex ($x_{1/4} 377.15$ ng/ μ l), while using CTAB, the amount of DNA concentration was lower ($x_{1/4} 61.77$

ng/ μ l) (Fig. 2). The DNA absorbance levels between both techniques were similar ($t = 0.036$, $df = 18$, $P = 0.972$) with averages of 2.04 and 2.02, respectively (Tables 1 and 2).

Using the Chelex DNA extraction technique, a significant difference in the DNA concentration among stages was observed ($F = 98.59$, $df = 2, 27$, $P < 0.001$); adults showed the highest DNA concentration as compared to larvae and pupae. In the DNA absorbance levels, a significant difference was also observed ($F = 22,448$, $df = 2, 27$, $P < 0.001$), where the mean of DNA concentrations from the pupae was lower than larval and adults means. Using the CTAB DNA extraction, a significant difference among stages was also observed ($F = 47.29$, $df = 2, 27$, $P < 0.001$), with adults producing the highest DNA concentration, as compared to larvae and pupae. In the DNA absorbance levels, no significant difference was observed among stages ($F = 2.44$, $df = 2, 27$, $P < 0.001$).

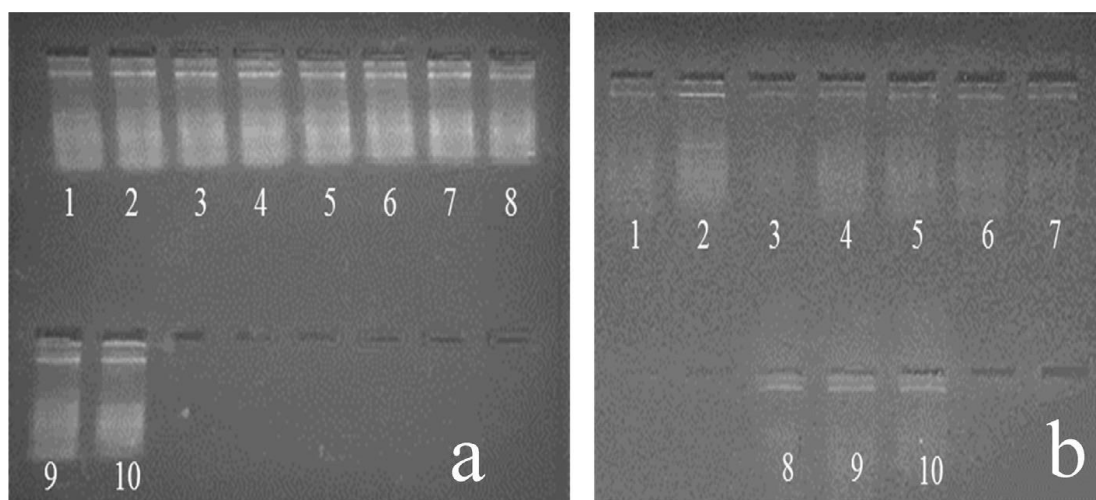


Fig. 1. Amplification of ten adult female samples of *A. aegypti* using the DNA extraction technique of Chelex (a), and CTAB (b).

Table 1

Descriptive statistics of DNA concentrations (ng/ μ l) and absorbance values of A260/A280 using the technique of Chelex. (SD) Standard deviation, (SE) Standard error.

Stage	Chelex					
	DNA			Absorbance		
	$\bar{x} \pm$ SD	SE	Min - Max ng/ μ l	$\bar{x} \pm$ SD	SE	Min - Max 260/280
Larvae (n = 10)	137.46 \pm 23.68	7.48	115.4–188.9	1.96 \pm 0.05	0.1	1.87–2.04
Pupae (n = 10)	150.81 \pm 32.79	10.37	97.8–189.2	1.81 \pm 0.07	0.02	1.69–1.98
Adult (n = 10)	377.15 \pm 49.68	15.71	292.4–459.7	2.04 \pm 0.08	0.03	1.84–2.1

Table 2

Descriptive statistics of DNA concentrations (ng/ μ l) and absorbance values of A260/A280 using the technique of CTAB. (SD) Standard deviation, (SE) Standard error.

Stage	CTAB					
	DNA			Absorbance		
	$\bar{x} \pm$ SD	SE	Min - Max ng/ μ l	$\bar{x} \pm$ SD	SE	Min - Max 260/280
Larvae (n = 10)	15.33 \pm 4.40	1.39	7.4–21.3	1.95 \pm 0.11	0.03	1.82–2.2
Pupae (n = 10)	16.32 \pm 8.88	2.80	10.8–40.7	2.04 \pm 0.13	0.04	1.83–2.25
Adult (n = 10)	61.77 \pm 21.73	6.87	30.1–93.1	2.02 \pm 0.02	0.01	2–2.06

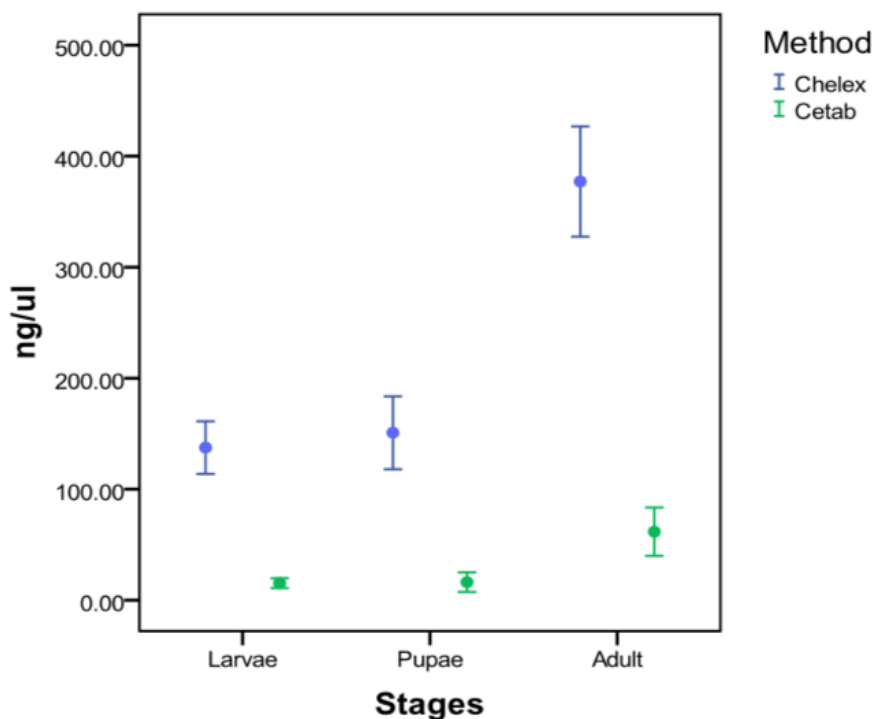


Fig. 2. Mean \pm standard deviation of DNA concentration in three different life stages of *Ae. aegypti* using the Chelex and CTEAB DNA extraction techniques. Using Student's t test we found significant difference between methods in larvae ($t = 19.877$, $df = 18$, $P < 0.001$), pupae ($t = 16.142$, $df = 18$, $P < 0.001$), and adults ($t = 14.901$, $df = 18$, $P < 0.001$).

4. Discussion

A large number of studies comparing DNA extraction techniques have been carried out using different types of organisms (for example [Haruyama et al., 2008](#); [Chen et al., 2010](#); [Gutiérrez-López et al., 2014](#); [Ridgeway and Timm, 2014](#)), including mosquitoes of medical importance ([Rivero et al., 2004](#); [Gupta and Preet, 2012](#); [Musapa et al., 2013](#); [Sarma et al., 2014](#); [Neiman et al., 2016](#)). One essential point in studies concerning insects of medical importance is the research of pathogenic agents in order to assess their potential vectorial role ([Desloire et al., 2006](#)). Given the medical importance of mosquito species such as *A. aegypti*, increasing studies involving molecular tools and biotechnological

assays are being carried out. Commercial DNA extraction kits as Qiagen DNeasy Blood and Tissue kits are cost-prohibitive, especially for developing countries. Accordingly, it is essential to identify effective and low-cost techniques of DNA extraction of mosquitoes for use in the developing world.

Using both DNA extraction techniques evaluated in this study, adult mosquitoes produced higher DNA concentrations as compared to those obtained from larvae and pupae. A possible explanation for this difference is that there were difficulties in the DNA extraction, specifically during manual cell lysis. It is possible that extraction from the different stages resulted in contamination by lipids, polysaccharides and proteins because the earlier stages are difficult to homogenize. In contrast, adult mosquitoes are small and fragile, with long and thin legs facilitating maceration and the use of reagents for DNA extraction ([Asghar et al., 2015](#); [Manuahe et al., 2016](#)).

In previous reports, the DNA extraction technique of Chelex has been recommended over other techniques such as DNAzol, DNeasy, Salting out and prepGEM when studying mosquitoes ([Asghar et al., 2015](#)) or other types of arthropods such as bees ([Gould et al., 2011](#)) and spiders ([Casquet et al., 2011](#)). CTAB DNA extraction has been successfully tested in other organisms such as beetles ([Chen et al., 2010](#)), maize ([Sahu et al., 2012](#)), and midges (Diptera: Chironomidae) ([Wang and Wang, 2012](#)), in which values of 35–42 ng/ μ l and an absorbance average of 1.83 have been obtained. These results are similar to those acquired in the present study.

When compared to the CTAB technique, the Chelex technique used fewer reagents, proved to be cheaper (\$350), safer and produced better results. Also, the processing time was shorter since it only took approximately 30–60 min, depending upon the experience of the technician as detailed in [Musapa et al. \(2013\)](#). In contrast, the standard protocol of the CTAB method used more than five reagents that are difficult to acquire for an average laboratory and its overall cost (\$440) was higher than Chelex. Furthermore, the CTAB procedure requires approximately 3 h 30 min and an additional 5–12 h to dry the DNA pellet, and to

resuspend it in ultrapure water for downstream use (Tel-Zur *et al.*, 1999). The advantages and disadvantages of both extractions mentioned above indicate that Chelex is preferable for most laboratories in terms of reagent availability, cost, time efficiency and DNA concentration.

According to the two DNA extraction methods compared in this study, we recommend the Chelex technique for the extraction of DNA from *A. aegypti* mosquitoes. This technique was superior to CTAB in terms of DNA concentration in all life stages we tested.

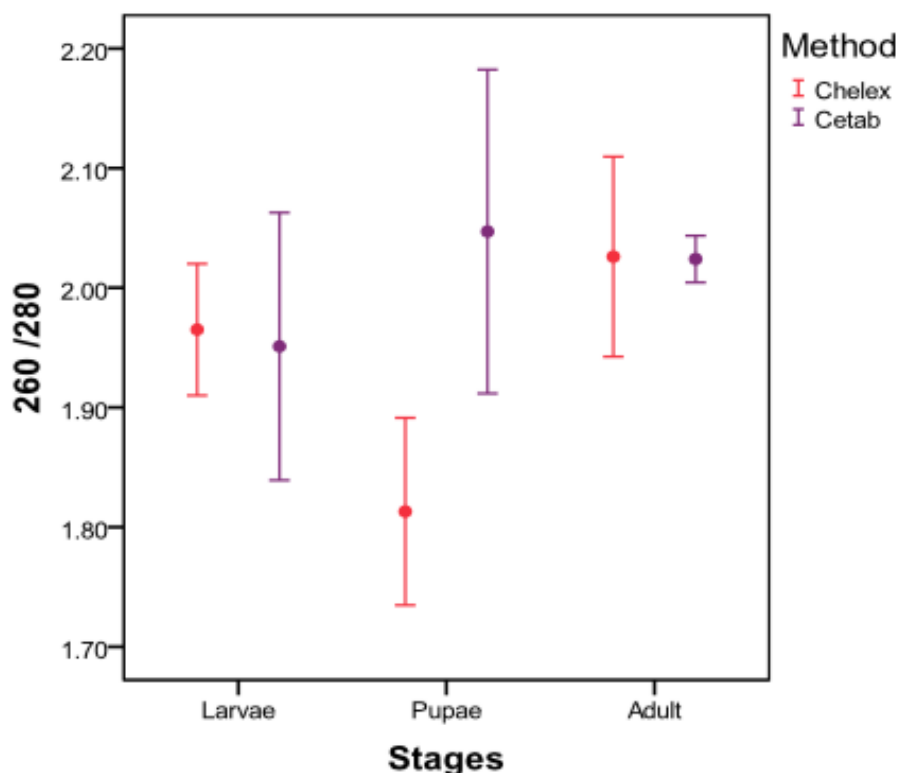


Fig. 3. Mean \pm standard deviation of DNA absorbance (260/280) in three different life stages of *Ae. aegypti* using the Chelex and CTAB DNA extraction techniques. Using Student's t test we found no significant difference between methods in larvae ($t = 0.395$, $df = 18$, $P = 0.697$), and adults ($t = 0.036$, $df = 18$, $P = 0.972$); pupae shown significant difference ($t = -4.768$, $df = 18$, $P < 0.001$), with averages of 1.81 and 2.04, respectively.

Declarations

Author contribution statement

Josue M. de la Cruz-Ramos: Conceived and designed the experiments, Analyzed and interpreted the data; Wrote the paper.

Luis M Hernandez-Triana: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Wrote the paper.

Cristina Garcí-De la Pen~a: Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Vicente H. Gonzalez-A lvarez, Am erico D. Rodríguez: Performed the experiments.

James Weger-Lucarelli: Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data.

Quetzaly Karmy Siller-Rodríguez: Conceived and designed the ex- periments; Contributed reagents, materials, analysis tools or data.

Francisco J. S anchez R amos: Analyzed and interpreted the data.

Aldo I. Ortega-Morales: Conceived and designed the experiments; Analyzed and interpreted the data; Contributed reagents, materials, analysis tools or data; Wrote the paper.

Funding statement

Luis M Hernandez-Triana would like to thank the Department for Environment Food and Rural Affairs (DEFRA), Scottish Government and Welsh Government through grants SV3045, and SE4113, and the EU Framework Horizon 2020 Innovation Grant, European Virus Archive (EVAg, grant no. 653316) for funding.

Competing interest statement

The authors declare no conflict of interest. Additional information

No additional information is available for this paper.

References

- Albers, C.N., Jensen, A., Bælum, J., Jacobsen, C.S., 2013. Inhibition of DNA polymerases used in Q-PCR by structurally different soil-derived humic substances. *Geomicrobiol. J.* 30 (8), 675–681.
- Asghar, U., Malik, M.F., Anwar, F., Javed, A., Raza, A., 2015. DNA extraction from insects by using different techniques: a review. *Adv. Entomol.* 3, 132–138.
- Brengues, C., Hawkes, N., N.J., Chandre, F., McCarroll, L., Duchon, S., Guillet, P., Manguin, S., Morgan, J.C., Hemingway, J., 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med. Vet. Entomol.* 17 (1), 87–94.
- Casquet, J., Thebaud, T., Gillespie, R.G., 2011. Chelex without boiling, a rapid and easy technique to obtain stable amplifiable DNA from small amounts of ethanol-stored spiders. *Mol. Ecol. Resour.* 12 (1), 136–141.
- Crochu, S., Cook, S., Attoui, H., Charrel, R.N., De Chesse, R., Belhouchet, M., Lemasson, J.J., de Micco, P., de Lamballerie, X., 2004. Sequences of flavivirus-related RNA virus persist in DNA from integrated in the genome of *Aedes spp.* mosquitoes. *J. Gen. Virol.* 85 (7), 1971–1980.
- Chanteau, S., Luquiaud, P., Failloux, A.B., Williams, S., 1994. Detection of *Wuchereira bancrofti* larvae in pooled mosquitoes by the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88 (6), 665–666.
- Chen, H., Rangasamy, M., Tan, S.Y., Wang, H., Siegfried, B.D., 2010. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm

beetles. PLoS One 5, e11963.

Cywinska, A., Hunter, F.F., Hebert, P.D.N., 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Med. Vet. Entomol.* 20 (4), 413–424.

Dai, Z., Webster, T.M., Enders, A., Hanley, K.L., Xu, J., Thies, J.E., Lehmann, J., 2017. DNA extraction efficiency from soil as affected by pyrolysis temperature and extractable organic carbon of high-ash biochar. *Soil Biol. Biochem.* 115, 129–136.

De Armas, R., Rodríguez, M.M., Bisset, J.A., Fraga, J., 2005. Modificación de un método de extracción de ADN genómico de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev. Colomb. Entomol.* 31 (2), 203–206.

Desloire, S., Valiente-Moro, C., Chauve, C., Zenner, L., 2006. Comparison of four methods of extracting DNA from *D. gallinae* (Acari: dermanyssidae). *Vet. Res.* 37 (5), 725–732.

Fitzpatrick, K.A., Kersh, G.J., Massung, R.F., 2010. Practical method for extraction of PCR-quality DNA from environmental soil samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (13), 4571–4573.

Gould, E.M., Taylor, M.A., Holmes, D.J., 2011. A more consistent method for extracting and amplifying DNA from bee wings. *Apidologie* 42 (6), 721–727.

Gupta, S., Preet, S., 2012. Protocol optimization for genomic DNA extraction and RAPD-PCR in mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Ann. Biol. Res.* 3 (3), 1553–1561.

Gutierrez-Lopez, J.M., de la Puente, K., Gangoso, R.C., Soriguer, J., Figuerola, J., 2014. Comparison of manual and semi-automatic DNA extraction protocols for the barcoding characterization of haematophagous louse flies (Diptera: hippoboscidae). *J. Vector Ecol.* 40 (1), 11–15.

Estudio 2

EXTRACTION AND QUANTIFICATION OF NUCLEIC ACIDS BY THE CTAB METHOD IN FRESH AND DIED ADULTS OF *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (DIPTERA: CULICIDAE) AT GÓMEZ PALACIO-DURANGO, MÉXICO

Josué Manuel de la Cruz-Ramos^{1,*}, Vicente Homero González-Álvarez³,
Aldo Iván Ortega-Morales^{1,2}

¹Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Unidad Laguna, Torreón, Coahuila, México

²Posgrado en Ciencias en Producción Agropecuaria, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro – Unidad Laguna, Torreón, Coahuila, México

³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, Universidad Autónoma de Guerrero, Cuajinicuilapa, Guerrero, México

Autor para correspondencia: josueramos1091@gmail.com

ABSTRACT: In the present study, extractions of genomic DNA were performed using the method of extraction of CTAB salts, taking as samples mosquitoes of the species *Aedes aegypti* from different points of the city of Gómez Palacio, Dgo. By means of this technique it was possible to extract DNA from fresh mosquitoes and stored at room temperature, being the fresh ones that obtained better results unlike the ones that had lower concentrations. At the moment of quantifying the amount of DNA, an average of 53 ng / μ L measured in the Nano Drop 2000® and an absorbance of 2.18 A260 / A280 were obtained. They were visualized in agarose gels at 0.8 percent in electrophoresis chamber. Obtaining good concentrations, which means that DNA, it is concluded that the CTAB method is an alternative for the DNA extraction of *Aedes aegypti* mosquitoes, it is recommended that it is better to use the extractive agents, although it is also possible to use dry organisms for these studies.

Key words: Extraction, *Aedes aegypti*, DNA, mosquito, CTAB.

INTRODUCTION

Aedes aegypti (L.) is one of the main mosquito species in the urban area, it is native to Africa, it's distributed and adapted to the tropical and subtropical regions of the world (Varma, 1989). All known mosquito species with public health importance, *Aedes aegypti* (L), is considered the most dangerous because it has the capacity to transmit the highest number of arboviral diseases to man (Roldan *et al.*, 2013). It has been reported as the main transmitter of different arboviruses: yellow

fever, dengue and dengue hemorrhagic fever (Jentes *et al.*, 2011; Simmons *et al.*, 2012) and chikungunya virus.

The dependence to the feeding of the blood by the mosquitos is part of its intrinsic character, since the proteins of the blood are essential nutrients for the production of eggs and the reproductive aptitude, doing that it is greater the contact with the people in urban zones (Townson, 1993; Chaves *et al.*, 2010). Mexico is one of the countries affected by these types of diseases due to the presence of *Aedes aegypti* almost in all territory. The number of molecular techniques available for entomological studies has grown enormously since the conception of the polymerase chain reaction or PCR. The presence of conserved regions in the DNA sequences, such as mitochondrial DNA, ribosomal DNA and nuclear DNA makes it possible to amplify fragments of organisms whose genome is unknown (Kocher *et al.*, 1989). Therefore it is essential to have a good extraction technique according to the organism used. Currently there are a large number of molecular studies for the species *Aedes aegypti* either for its identification, observe mutations, detect resistance genes. Molecular tools have greatly facilitated studies of these populations. However, the efficiency of genomic DNA extraction methods are fundamental for the effectiveness and accuracy of some studies. The extraction methods have different costs. There are some economics such as the CTAB or more expensive as are the extraction kits of different brands.

The extraction by CTAB method (cetyl trimethyl ammonium bromide) is suitable for extracting and purifying DNA from plants and animals. It is indicated to eliminate polysaccharides and polyphenolic compounds, obtaining a good quantity and quality of DNA. Therefore, the objective of this work is to evaluate the extraction method of CTAB salts with fresh and stored samples of the *Aedes aegypti* mosquito.

MATERIALS AND METHODS

Mosquito eggs were collected in different areas of the city of Gomez Palacio Durango - Mexico, the eggs were bred to reach the adult stage of the insect in the laboratory of the UAAAN-UL in 2016, the eggs were placed in emergency chambers for their hatching, the larvae were fed and reared until they reached the state of pupa, the pupae were separated and placed in jars to obtain the adults. Ten live adults and 10 adults with 5 months stored at room temperature were selected in 1.5 µL ependor tubes for the extraction and quantification of nucleic acids.

The DNA extractions were performed in the Molecular Biology Laboratory of the Antonio Narro Autonomous Agrarian University in Torreón Coahuila city, Mexico, using the methodology described for the DNA extraction method by CTAB (Annex 1) (Tel-Zur, 1999). For the visualization of DNA bands an agarose gel at .8% was prepared in a 75 volt electrophoresis chamber for 30 minutes and using a MultiDoc-It Digital Imaging System photodocument. To see the absorbance values and amount of DNA, a Nano Drop 2000® spectrophotometer was used. An analysis of variance was performed to see if there is a significant difference between fresh and stored specimens.

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction and quantification of genomic DNA using the CTAB method. For fresh mosquitoes of the species *Aedes aegypti* ten positive samples were obtained (Figure 1). The total genomic DNA was extracted individually to each insect similar to that reported by Haruyama *et al.*, (2008) Obtaining DNA concentrations from 30.1 to 93.1 ng / μ L, within the range ranged from 2 to 2.08 A260 / A280 (Table 1) this indicates that the quality was good in most samples. Like Fraga-Nodarse *et al.*, (2004) it can be considered that the CTAB method is an efficient method for DNA extraction in different types of tissues.

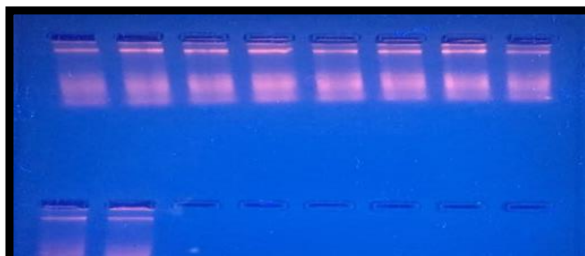


Figure 1. DNA bands in fresh adults of *Aedes aegypti* displayed on 0.08% agarose gels and photodocument.

Table 1. DNA concentrations in fresh adults of the species *Aedes aegypti* in (ng / μ L) and absorbance A260 / A280 from samples extracted with the CTAB method.

#	Species	Concentration of DNA ng/ μ L	absorbance 260/280
1	<i>Aedes aegypti</i>	93.1	2.06
2	<i>Aedes aegypti</i>	87	2.06
3	<i>Aedes aegypti</i>	56,5	2.1
4	<i>Aedes aegypti</i>	30,1	2.08
5	<i>Aedes aegypti</i>	58.5	2.09
6	<i>Aedes aegypti</i>	67	2.08
7	<i>Aedes aegypti</i>	87.2	2.07
8	<i>Aedes aegypti</i>	45.2	2.04
9	<i>Aedes aegypti</i>	37.1	2.02
10	<i>Aedes aegypti</i>	56	2

Mosquitoes stored at room temperature of the species *Aedes aegypti* ten positive samples were obtained (Figure 2). Obtaining concentrations of DNA from 6.7 to 18.8 ng / μ L, within the quality ranges of 1.92 to 2.54 were obtained A260 / A280 (Table 2) this indicates that the quality of the samples was good in most of the samples, Reineke *et al.*, (1998) mention that the CTAB method requires DNA purification for subsequent studies such as PCR and sequencing.

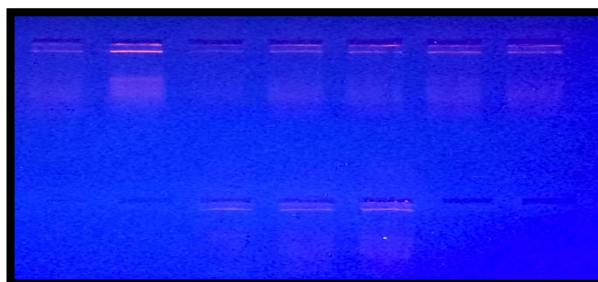


Figure 2. DNA strands in adults stored from *Aedes aegypti* displayed on 0.08% agarose gels and photodocument.

Table 2. Concentrations of DNA in adults stored in (ng / μ L) and Absorbance A260 / A280 of samples extracted with the CTAB method.

#	Species	Concentration of DNA ng/ μ l	Absorbance 260/280
1	<i>Aedes aegypti</i>	11	2.22
2	<i>Aedes aegypti</i>	6.7	2.31
3	<i>Aedes aegypti</i>	13.8	2.07
4	<i>Aedes aegypti</i>	12.2	2.15
5	<i>Aedes aegypti</i>	18.8	2.44
6	<i>Aedes aegypti</i>	7.4	2.54
7	<i>Aedes aegypti</i>	10.5	2.21
8	<i>Aedes aegypti</i>	16.6	1.92
9	<i>Aedes aegypti</i>	14.9	2.23
10	<i>Aedes aegypti</i>	11.3	2.19

The concentrations of nucleic acids had a considerable variation. The fresh samples obtained better results, possibly due to the fact that the DNA was not degraded with time and the extraction was done at the time, however the stored samples also contained nucleic acids in lower concentration and could be used for possible investigations with molecular identification by PCR (Fig. 3)

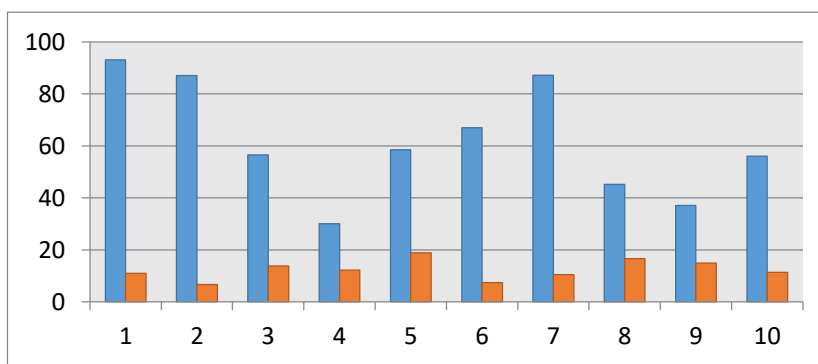


Figure 3. Genomic DNA (ng / μ L) concentration in fresh (blue) and stored samples (red) of the species *Aedes aegypti*.

Regarding the quality of the DNA extracted, it was very similar in fresh mosquitoes and stored

with an average of 2.18 A260 / A280, which indicates that the samples are viable for further studies as PCR (Fig 4.).

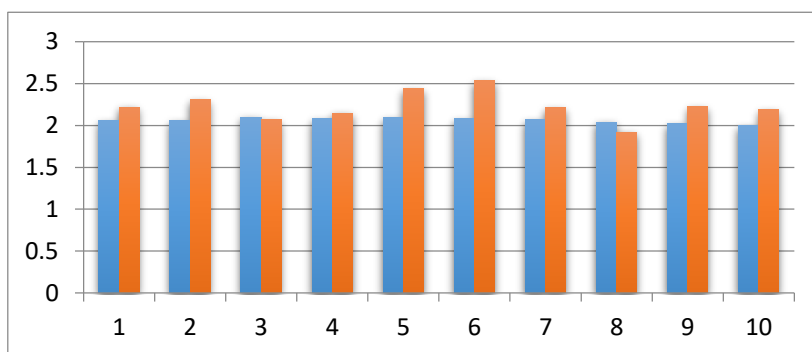


Figure 4. DNA quality in absorbance A260 / A280 in fresh (blue) and stored samples (red) of the species *Aedes aegypti*.

Analysis of Variance: with a level of significance of 0.5 in the DNA concentrations of fresh samples and stored with a calculated value of 6.61, unlike the critical value in table of 3.18 according to their degree of freedom, which concludes that there are significant differences in nucleic acid concentrations between fresh and stored mosquitoes.

CONCLUSION

DNA extraction in fresh and stored adults was positive in all samples, leaving as a precedent that it is better to extract fresh specimens and that even stored mosquitoes present viable DNA for future studies. For DNA concentrations by the CTAB method in fresh adults, ranges from 30.1 to 93.1 ng / μ L were obtained, which means that they contain a high concentration; the absorbance levels varied from 2 to 2.08 A260 / A280; what it means is that it has low purity and for the concentrations of DNA by the CTAB method in stored adults, tanks of 6.7 to 18.8 ng / μ L were obtained, which means that they contain a low concentration; the absorbance levels varied from 1.92 to 2.54 A260 / A280; What it means is that you have a considerable amount of DNA, but the quality is low. To which it is recommended to improve the method of extraction and preferably use fresh organisms observing a significant difference between the samples.

LITERATURE CITED

- Chaves, L. F., Harrington, L. C., Keogh, C. L., Nguyen, A. M., & Kitron, U. D. (2010). Blood feeding patterns of mosquitoes: random or structured? *Frontiers in Zoology*, 7(1), 3.
- Fraga-Nodarse, J., J. Rodríguez, O. Fuentes, M Castex y A. Fernández-Calienes. 2004. Comparación entre cinco métodos para la extracción de DNA de triatomas. *Revista Cubana Medica Tropical*. La habana, Cuba 56: 208-13.

- Haruyama, N., A. Mochizuki, P. Duelli, H. Naka and M. Nomura. (2008). Green lacewing phylogeny, based on three nuclear genes (Chrysopidae: Neuroptera). *Systematic Entomology* 32: 275–288.
- Jentes, E. S., Pomeroy, G., Gershman, M. D., Hill, D. R., Lemarchand, J., Lewis, R. F., Monath, T. P. (2011). The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: Consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(8), 622–632.
- Kocher, T. D., W. Thomas K., Meyer A., Edwards S.V., Pääbo S., Villa blanca F. X. & Wilson A. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Science* 86:6196-6200.
- Reineke A., Karlovsky P. And C. Zebitz P. (1998) Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. *Insect Molecular Biology* 7(1), 95 – 99.
- Roldán, S., Ardila, L. Santacoloma, H. Brochero (2013). Estado de la sensibilidad a los insecticidas de uso en salud pública en poblaciones naturales de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Casanare, Colombia. *Biomedica* 41(3), 203–209.
- Simmons, C. P., Farrar, J. J., Vinh Chau, N., & Wills, B. (2012). Dengue. *The New England Journal of Medicine*, 366(15), 1423–1432.
- Tel- Zur, 1999. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 24- 254.
- Townson, H. (1993). The biology of mosquitoes. Volume 1. Development, nutrition and reproduction. By A.N. Clements. *Bulletin of Entomological Research*, 83(2), 307.
- Varma, M. G. (1989) Geographical distribution of arthropod borne diseases and their principal vectors. Geneva: WHO/VBC/967

ANNEXED

Annexed 1. CTAB extraction method standardized by (De la Cruz, 2016) for *Ae aegypti* (Tel-Zur, 1999).

DNA extraction process (CTAB)

1. Cut the material (Insect) that is going to extract the DNA, keep it frozen.
2. Grind the tissue into sterile Eppendorf 1.5ul tubes (keep the tissue cold) 100ul of CTAB 2x is added.
3. Add 100ul of CTAB2x and mix in vortex 15 seconds.
4. Place the tubes with the fabric at 65 degrees Celsius in the thermoblock for 20 min.
5. Add 280 ul of cold chloroform and mix with vortex for 5 seconds.
6. Centrifuge for 5 min / 13000 rpm. Then the aqueous phase is deposited in sterile new tubes of 70 to 120 ul.
7. Add 280 ul of cold isopropanol. Leave the samples for 15 min on ice.
8. Centrifuge for 5 min / 13000 rpm. Isopropanol is decanted
9. Add 220 ul. 70% cold ethanol to wash the tablet, centrifuge 3 min / 13000 rpm. The ethanol is decanted.
10. Let the tablet dry at room temperature 1 hour.
11. Re-suspend the tablet with 30ul of millQ water and the samples are stored at -20 ° C.

CONCLUSIONES

Las mutaciones Ile1,016 y Val 1016 se estuvieron presentando en *Ae. aegypti* que fueron recolectadas en el año 2017 al 2018. Dentro de esta investigación también se pudo comprobar la viabilidad de dos técnicas de extracción de ADN en mosquitos de la especie *Ae. aegypti*, (Chelex 100 y CTAB).

La extracción de ADN en adultos frescos y almacenados fue positiva en todas las muestras, dejando como precedente que es mejor extraer muestras frescas y que incluso los mosquitos almacenados presentan ADN viable para futuros estudios. Para las concentraciones de ADN por el método CTAB en adultos frescos, se obtuvieron rangos de 30.1 a 93.1 ng / μ L, lo que significa que contienen una alta concentración; los niveles de absorbancia variaron de 2 a 2.08 A260 / A280; lo que significa es que tiene baja pureza y para las concentraciones de ADN por el método CTAB en adultos almacenados, se obtuvieron rangos de 6.7 a 18.8 ng / μ L, lo que significa que contienen una baja concentración; los niveles de absorbancia variaron de 1.92 a 2.54 A260 / A280; Lo que significa es que tiene una cantidad considerable de ADN, pero la calidad es baja. Para lo cual se recomienda mejorar el método de extracción y preferiblemente utilizar organismos frescos observando una diferencia significativa entre las muestras.

La identificación de los principales genes que controlan la resistencia es el primer paso para continuar con la meta del manejo integrado de insecticidas: monitoreo de genes específicos en campo y diseño de modelos que eviten la evolución de la resistencia a los pesticidas en mosquitos transmisores de enfermedades.