



El Colegio de la Frontera Sur

Distribución espacial del estado de resistencia a insecticidas y
los mecanismos mediados por enzimas de *Aedes aegypti* en
Tapachula, Chiapas, México

Tesis

presentada como requisito parcial para optar al grado de
Doctor en Ciencias en Ecología y Desarrollo Sustentable
Con orientación en Ecología de Artrópodos y Manejo de Plagas

Por

Francisco Solis Santoyo

2022



El Colegio de la Frontera Sur

Tapachula, Chiapas; 12 agosto de 2022.

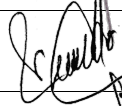
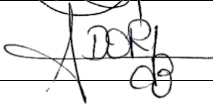
Las personas abajo firmantes, integrantes del jurado examinador de:

Francisco Solís Santoyo

hacemos constar que hemos revisado y aprobado la tesis titulada:

“Distribución espacial del estado de resistencia a insecticidas y los mecanismos mediados por enzimas de *Ae. aegypti* en Tapachula, Chiapas, México”

para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Ecología y Desarrollo Sustentable.

	Nombre	Firma
Director	Dr. Daniel Sánchez Guillen	
Co-Director	Dra. R. Patricia Penilla Navarro	
Asesor	Dr. Alfredo Castillo Vera	
Asesor	Dra. Rebeca González Gómez	
Sinodal adicional	Dra. Ariane Liliane Jeanne Dor Roques	
Sinodal adicional	Dra. Karla Saavedra Rodríguez	
Sinodal adicional	Dra. Angélica Aponte Hincapie	
Sinodal suplente	Dra. Farah Zamira Vera Maloof	

DEDICADO A:

A Dios

Porque haberme dado la vida, acompañado a lo largo de mi carrera, por ser mi luz en mi camino, darme la sabiduría y fortaleza para alcanzar mis objetivos.

Mis Padres: José Abelino Solis López y Yolanda Santoyo García†

Porque han sabido apoyarme y estar conmigo en los buenos y malos momentos, por la enseñanza de valores, trabajar y perseverar por lo que quieres. Y darme todo su amor. Mi amor por ellos es infinito.

A mis hermanos: Marisol, Juan Manuel, Claudia Yolanda, Jorge Luis y Nancy Berenice. Por la unión y el amor de familia que siempre hemos mantenido. Y donde mi corazón está dividido en cada uno de ellos. Ellos me dieron grandes enseñanzas y representan la fuerza para seguir luchando en la vida. Los Amo.

A mi hijo Christian

Por el amor que me ha dado en el transcurso de la vida y la fortaleza para poder seguir luchando por alcanzar metas en la vida. Y tener la dicha de poder ser padre. Te Amo Kikan al infinito y más allá.

Francisco Joshua y Xiomara Yolanda (Princesa)

Mis otros dos hijos que me han llenado de felicidad y me han enseñado a ver de otra forma la vida, entenderla y disfrutarla. Y darme esa gran lección de seguir luchando. Los Amo.

A mis sobrinos Alex y Ximena

Que me han llenado de felicidad y por darme su amor incondicional. Los Amo.

Amawy y Migue

Por brindarme su amor y momentos de alegría y por verme como familia. Migue Ti copiooo! Los Amo.

A mi amor Alma Delia (Princesa)

Me siento muy afortunado con la vida por premiarme al tenerte, no tengo palabras para agradecerte tu gran amor incondicional y por estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos. Te Amo ¡Amalela!

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado (CVU 590243. 2017-2020).

A la **Universidad de Colorado** por darme la oportunidad de poder trabajar los datos para mi trabajo de investigación.

A mi director de tesis, **Dr. Daniel Sánchez Guillén** por su valioso conocimiento, apoyo académico y paciencia durante toda mi estancia en el posgrado. Por su sincera amistad y estar siempre motivándome en los peores momentos. Mi más grande admiración. ¡Gracias! Amigo.

Al **Dr. Alfredo Castillo Vera** por el valioso conocimiento transferido a lo largo de este recorrido, por los sabios consejos y apuntalar en los momentos difíciles. Brindarme esa bonita y sincera amistad. Y enseñarme a ver la vida y valorarla. Mi admiración y respeto mi Amigo Doc.

A la **Dra. Rebeca González Gómez**, gracias por el valioso conocimiento y amistad otorgada, y por los ánimos que en todo momento me brindo en el transcurso de este camino. ¡Muchas Gracias!

A la **Dra. Patricia Penilla Navarro**, por su valioso conocimiento, apoyo incondicional en todo momento de este camino difícil y no dejarme caer. No tengo palabras para agradecerle a mi jefa, maestra y amiga. ¡Muchas Gracias Patita!

A la **Dra. Karla Saavedra Rodríguez**, agradecerle de manera muy especial por compartir su conocimiento, amistad, confianza y apoyo en todo momento en el proceso de este camino. ¡Muchas Gracias Karlita!

Al grupo de trabajo y amigos del **CRISP**, **Lizbeth A. Maldonado**, **Sandra Meza**, **Sandra Robles**, **Crecencio Díaz**, **Tavi Pérez**, **Brandon Velasco**, **Jeovani Roblero**, **Ulises Jiménez**, **Fabiola R. Ramos**, **Cynthia Socorro**, **Robi de J. Bonilla**, **Mercedes N. Mendoza**, **Fariiii Z. Vera**.

A **Paulina González**, por su valioso apoyo en los trámites de posgrado, su paciencia, amistad y ser el ángel de la guarda de los alumnos. ¡Muchas Gracias Pau!

Al **Dr. Jaime Gómez Ruiz†**, por su siempre valiosa disposición de enseñanza, consejos, amistad. Y siempre brindar una sonrisa y sabias palabras de aliento.

De manera muy especial a dos grandes **Amigos que están en un lugar especial:**

Al **Dr. Américo David Rodríguez†** por iniciarme en este difícil camino de la investigación, apoyándome siempre de manera incondicional. Por ser mi maestro, jefe, amigo a quien siempre tendré presente por sus enseñanzas y quien dejo huellas imborrables. Ameico, Ameico mi copias!!

Al **Dr. José Luis Torres Estrada†** (PPlui) a mi estimado PP le agradezco su amor a la ciencia, porque con sus anécdotas e historias de trabajo me convencieron para trabajar en el CIP. Y de ahí su valiosa amistad, consejos, regaños, enseñanzas hicieron que fuera uno de mis mejores amigos.

INDICE

RESUMEN	3
CAPÍTULO I.....	4
1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo General	7
2.2 Objetivos específicos	7
3. REVISIÓN DE LITERATURA	8
3.1 Clasificación taxonómica de <i>Aedes aegypti</i>	8
3.2 Biología de <i>Aedes aegypti</i>	8
3.3 <i>Aedes aegypti</i> - importancia médica.....	10
3.4 Dengue en México	11
3.5 Chikungunya en México	12
3.6 Zika en México	13
4. INSECTICIDAS.....	15
4.1 Organoclorados (OCLs)	16
4.1.1 Modo de acción de los organoclorados (OCLs).....	16
4.2 Organofosforados (OPs).....	16
4.2.1 Modo de acción de los organofosforados (OPs)	17
4.3 Carbamatos (CARBs)	17
4.3.1 Modo de acción de los carbamatos (CARBs).....	18
4.4 Piretroides (PIRs)	18
4.4.1 Modo de acción de los piretroides (PIRs).....	19
5. RESISTENCIA A INSECTICIDAS	19
5.1 Mecanismos de resistencia a insecticidas	19
5.1.1 Resistencia cuticular	20
5.1.2 Resistencia metabólica	20
5.1.2.1 Esterasas	21
5.1.2.2 Glutación S-transferasas (GSTs).....	21
5.1.2.3 Citocromo P ⁴⁵⁰	21
5.1.3 Alteración en el sitio de acción.....	22
5.2 Resistencia en <i>Aedes aegypti</i>	24
6. JUSTIFICACIÓN.....	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27

7.1 Área de estudio	27
7.2 Recolección de mosquitos.....	30
7.3 Identificación de mosquitos adultos.....	30
7.4 Bioensayos.....	31
7.4.1 Concentración letal 50 (CL_{50}).....	33
7.5. Ensayos bioquímicos	33
7.5.1 Acetilcolinesterasa (AChE).....	34
7.5.2 Esterasas	35
7.5.3 Glutathione S-transferasas (GST).....	35
7.5.4 Citocromos P^{450}	35
7.5.5 Proteínas.....	35
7.6 Detección de mutaciones asociadas a resistencia a insecticidas	36
7.6.1 Extracción de ADN.....	36
7.6.2 Amplificación de los alelos del canal de sodio	37
7.6.2.1 Alelo Val1016Ile (Gráfico 1).....	39
7.6.2.2 Phe1534Cys (Gráfico 2)	40
7.6.2.3 Ecuación Hardy-Weinberg	41
9. LITERATURA CITADA.....	43
 CAPÍTULO II - Insecticide resistance in <i>Aedes aegypti</i> from Tapachula,	
Mexico: Spatial variation and response to historical insecticide use	58
 CAPÍTULO III - Current enzyme-mediated insecticide resistance status of	
<i>Aedes aegypti</i> populations from a dengue-endemic city in southern Mexico	
.....	.96
 CAPÍTULO IV - CONCLUSIONES GENERALES.....	121

RESUMEN

Las poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Tapachula, Chiapas, México, se encuentran bajo presión constante de insecticidas para reducir la transmisión de dengue y otras enfermedades, lo cual provoca la aparición de poblaciones resistentes a insecticidas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la resistencia de *Ae. aegypti* de 26 sitios de Tapachula a piretroides, organofosforados y carbamatos, así como caracterizar los posibles mecanismos involucrados. La tasa de resistencia fenotípica para cada población de mosquitos se determinó comparando la concentración letal 50 (CL₅₀) para cada uno de los insecticidas por sitio con la CL₅₀ de una cepa susceptible. Se encontró resistencia a los piretroides en los 26 sitios de estudio, mientras que para organofosforados y carbamatos se observó baja resistencia. La resistencia genotípica caracterizada por el derribo (*kdr*) fue evaluada midiendo la frecuencia de las mutaciones Ile1016 y Cys1534 del canal de sodio de células nerviosas, cuyos rangos fueron de 0.16–0.71 y de 0.8–1 respectivamente. La resistencia de las poblaciones de mosquitos del año 2018 y 2020 estuvo asociada a niveles elevados de glutatión S-transferasas (GST) y de citocromos P⁴⁵⁰ en todas las poblaciones de mosquitos del 2018. Por otro lado, la actividad de β -esterasas, pNPA-esterasas y GST disminuyó en el 2020. La resistencia espacio-dependiente observada en este trabajo destaca la importancia de evaluar múltiples sitios dentro de regiones geográficas. La resistencia a piretroides y organofosforados observada en este trabajo está asociada a mecanismos metabólicos similares, con varios grupos de enzimas más efectivos que el incremento de una sola familia en particular. Estos resultados tienen serias implicaciones en el modo y tipo de insecticidas usados actualmente para el control de mosquitos en zonas urbanas.

PALABRAS CLAVES: Mecanismos, *kdr*, GST, pNPA, citocromos P⁴⁵⁰.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por vector (ETV) como dengue, fiebre amarilla, chikungunya y Zika, son transmitidas por la picadura del mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) infectado por un virus (OMS 2020). En México, las ETV representan un importante problema de salud pública: se estima que cerca del 60% del territorio nacional, en donde residen más de 50 millones de personas, presentan condiciones que favorecen la transmisión de las ETV según reportes del Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE 2014). La transmisión de dengue está presente en 26 de los 32 estados de la República Mexicana, con circulación de los cuatro serotipos (SSA 2022, Vázquez-Pichardo et al. 2011). También se han reportado los virus de chikungunya (Rivera-Ávila 2014) y Zika (Díaz-Quíñonez et al 2016) que causaron importantes brotes en diferentes estados de la república. En Chiapas, el dengue se considera endémico con casos todo el año y registros de brotes importantes desde 1980 (Narro-Robles y Gómez-Dantés 1995), así como brotes de chikungunya en el 2014 (Díaz-González et al 2015) y de Zika en el 2015 (Guerbois et al. 2015).

El control de las ETV está enfocado en reducir las poblaciones del vector con el uso de insecticidas. Los piretroides (PIRs) se han usado desde 1995, y la permetrina es la primera de este grupo, junto con el sinergista butóxido de piperonilo (BOP) en formulación acuosa (Aquareslin), que se usó por más de 10 años consecutivos (Bisset et al 2009). Los principales insecticidas utilizados en aplicaciones espaciales han sido el malatión, y algunos piretroides como la deltametrina y permetrina (Stenhouse et al 2013, Lumjuan et al 2011). Actualmente, dada la importancia de las ETV en México, el CENAPRECE a través de la Dirección del Programa de Enfermedades transmitidas por vector,

coordinados con los servicios estatales y su Programa de Prevención y Control de Dengue local, son quienes realizan la ejecución de las medidas de control. Una de las principales medidas es el uso de tratamientos con insecticidas dirigidos a la fase acuática y adulta del mosquito (Guzman et al 2010). Para ello, se consideran productos que están aprobados en la lista actualizada de insecticidas, además, de estar incluidos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-EM-003-SSA-2008).

En México, se han utilizado insecticidas del grupo de los organofosforados (OPs), de los cuales malatión el más usado como adulticida en aplicaciones espaciales Ultra Bajo Volumen (ULV, por sus siglas del inglés Ultra Low Volume), y larvicidas como el temefos (Abate®) en presentación de gránulos de arena al 1%. que se aplica en todos aquellos depósitos de agua que no pueden ser eliminados o destruidos dentro y alrededor de las casas (Rodríguez-Cruz 2002). Cabe destacar que la aplicación de insecticidas contra mosquitos vectores data desde 1940 con la introducción del dicloro difenil tricloroetano (DDT) para el control del vector de la malaria (Fernández-Bravo et al 2020) y plagas agrícolas. El uso desmedido del DDT provocó que poblaciones de mosquitos expresaran resistencia hacia este plaguicida desde principios de 1950 (Fernández-Bravo et al 2020).

Existen diferentes escenarios con relación a la posible aparición de resistencia hacia los insecticidas, donde se han encontrado involucrados diferentes mecanismos de resistencia como el metabólico (cuantificación enzimática) y la alteración en el sitio blanco (frecuencia alélica). Los cuales han sido objeto de múltiples estudios, no solo por ser un ejemplo interesante de la adaptabilidad de los insectos, sino porque es el principal motivo que favorece la transmisión de muchas ETV (Bisset 2002).

Esta investigación analizó el estado y distribución espacial de la resistencia de las poblaciones de *Ae. aegypti* a cinco insecticidas, incluidos dos piretroides (permetrina/deltametrina), dos organofosforados (clorpirifos/malatión) y un carbamato (bendiocarb), en Tapachula durante 2018 y 2020. También se registraron los cambios enzimáticos involucrados en la resistencia de las poblaciones de *Ae. Aegypti* a los insecticidas en ambos períodos. Y si la acetilcolinesterasa fue insensible a propoxur (AChEi). Así también, si los

resultados del 2018 se correlacionaron con la resistencia a insecticidas reportada para ese año.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar el estatus y distribución espacial de la resistencia hacia tres grupos toxicológicos (piretroides, organofosforados y carbamatos), y los posibles mecanismos involucrados en las poblaciones urbanas de *Ae. aegypti* de distintos sitios de la ciudad de Tapachula.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar la resistencia fenotípica calculada a partir de la concentración letal 50 hacia insecticidas de tres grupos toxicológicos: Piretroides (permetrina y deltametrina); Organofosforados (malatión y clorpirifós) y carbamatos (bendiocarb).
2. Cuantificar los niveles enzimáticos de α - y β -esterasas, glutatión-S-transferasas, pNPA-esterasas y citocromos P⁴⁵⁰ asociados al metabolismo de piretroides, organofosforados y carbamatos.
3. Determinar los cambios de las frecuencias de las mutaciones en el segmento 6 del dominio II del gen que codifica el canal de sodio, involucradas en la resistencia a piretroides.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Clasificación taxonómica de *Aedes aegypti*

Aedes aegypti (L.) es un mosquito perteneciente al orden Díptera, familia Culicidae y subfamilia Culicinae. La familia Culicidae se divide en tres subfamilias: Toxorhynchitinae, Anophelinae y Culicinae, dentro de las cuales las dos últimas subfamilias tienen especies de mosquitos de importancia médica. La subfamilia Culicinae incluye más de 3050 especies, pertenecientes a 109 géneros, de los cuales *Culex*, *Mansonia*, *Haemagogus*, *Sabethes* y *Psorophora* los más importantes en materia de salud son los géneros *Aedes*, (Service 2012).

3.2 Biología de *Aedes aegypti*

Aedes aegypti es un insecto con metamorfosis completa, su ciclo consta de cuatro etapas: huevo, larva, pupa (fase acuática) y adulto (fase aérea) (Fig. 1). Los huevos son depositados en sustratos húmedos que son sujetos a inundación, preferentemente recipientes artificiales domiciliarios y peridomiciliarios (Pilger et al 2011). En condiciones ideales, la eclosión ocurre en un par de días, sin embargo, los huevos pueden mantener su viabilidad hasta un año, dependiendo de la fuente de reserva y las condiciones ambientales (Gillett et al 1977; Jeffery et al 2012).

La etapa larval comprende cuatro grados evolutivos denominados estadios larvales: I, II, III y IV los cuales se diferencian en el tamaño y se desarrollan en ambientes acuáticos, donde la principal fuente de alimento consiste en microbiota (protozoos, bacterias, levadura y algas) (Benitez et al 1995). Morfológicamente las larvas tienen una cabeza pequeña y redondeada con antenas cortas y poco visibles, el tórax es reducido y más abultado que el abdomen y presentan dos prominentes espinas laterales y una hilera recta de 7 a 12 escamas del peine, en el octavo segmento abdominal. Presentan movimientos ondulantes y permanecen en posición vertical en la superficie del agua (Gordon 1988).

La duración de este periodo larvario varía entre 5-14 días dependiendo de factores como la temperatura del agua, disponibilidad de alimento y densidad larvaria. Una vez alcanzada la última fase larval ocurre una segunda metamorfosis para dar

origen a la fase de pupa, las cuales son pequeñas y presentan en su cefalotórax dos tubos respiratorios cortos y gruesos. Las pupas no se alimentan y generalmente se encuentran en la superficie del agua, por lo que quedan inmóviles (Beaty y Marquardt 1996). La etapa adulta consiste en un insecto volador pequeño de color negro con líneas de escamas plateadas (forma de lira) en el mesonotum. En esta fase hay dimorfismo sexual y diferencias en sus hábitos alimenticios, los machos son fitófagos con una probóscide larga y adaptada para succionar jugos de plantas y otras fuentes de azúcar, mientras que las hembras son de hábitos hematófagos, poseen una probóscide larga adaptada para succionar sangre a través de la piel (Beaty y Marquardt 1996).

La hembra se alimenta de sangre para la producción de huevos. Una vez que está obtiene alimentación sanguínea, aproximadamente de 1.5 a 6 μ l, la hembra oviposita un promedio de 50-120 huevos en un periodo de 72 h esto corresponde a un ciclo gonotrófico (Zettel y Kaufman 2008). *Aedes aegypti* tiene hábito preferentemente doméstico y antropofílico, reposa en el interior de las viviendas, con criaderos dentro y alrededor de la vivienda (Zettel y Kaufman 2008). Es una especie ejemplo de adaptación al ámbito humano con criaderos, hábitats, fuente de alimentación y desplazamiento activo y pasivo relacionado a su entorno (Reiter et al. 2003). Se ubica por debajo de los 1200 msnm, pero se ha registrado en alturas alrededor de los 2400 msnm (Eiman et al 2008).

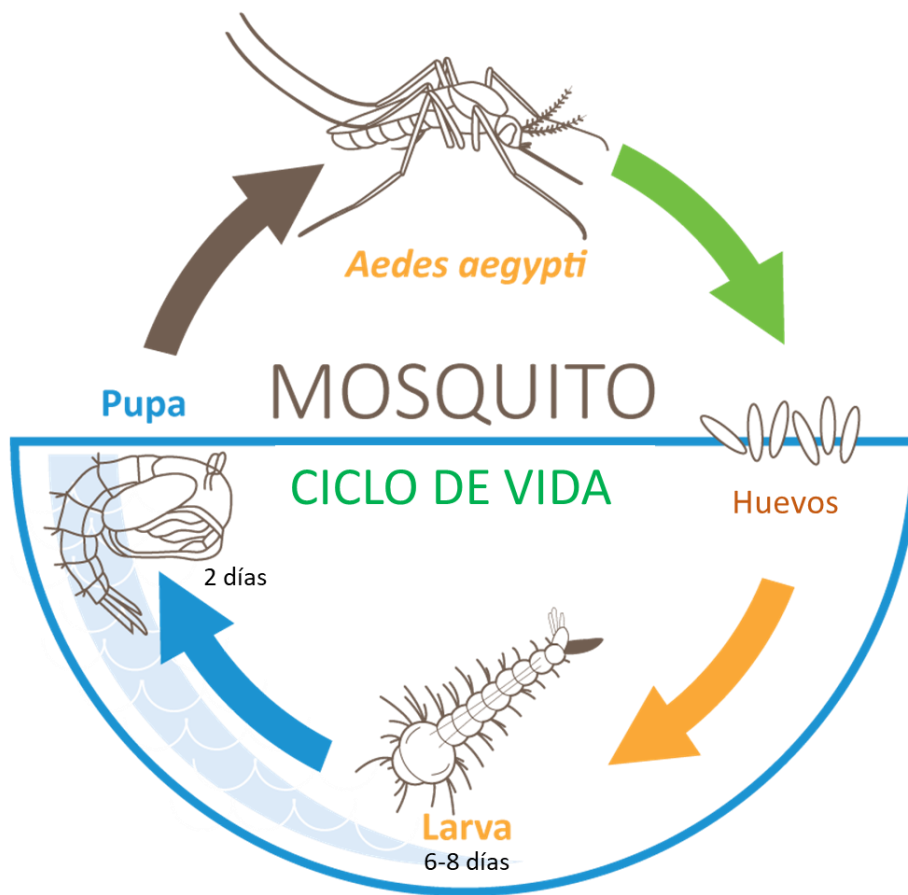


Figura 1. Ciclo de vida *Aedes aegypti*. Tomado de [https://prvectorcontrol.org/learn-protect/mosquito-life-cycle-prvcu-2/#iLightbox\[postimages\]/0](https://prvectorcontrol.org/learn-protect/mosquito-life-cycle-prvcu-2/#iLightbox[postimages]/0)

3.3 *Aedes aegypti* - importancia médica

El mosquito (*Aedes aegypti* o *Stegomyia aegypti*) no sólo es el principal vector de la enfermedad de la fiebre amarilla, sino también de otras enfermedades como fiebre del dengue, fiebre del chikungunya y fiebre del Zika (OMS 2020). Las hembras por su hábito hematófago son vectores de enfermedades y con gran habilidad para transmitir diferentes arbovirus. También, genera una molestia pública por el efecto de la picadura que producen irritación en la piel (Zettel y Kaufman 2008). Ante la ausencia de vacunas y medicamentos específicos para prevenir la enfermedad de dengue, Zika y chikungunya (Kantor 2018), la

estrategia de prevención y control a nivel mundial ha sido enfocada en la reducción de riesgo entomológico.

3.4 Dengue en México

Los casos de dengue se han incrementado alrededor del mundo en las últimas décadas (OMS 2017). En México, se encuentra presente desde la década de los años 70's con diferencias anuales en su incidencia y brotes epidemiológicos, principalmente en los estados de la región sursureste, pacífico y Golfo de México (SSA 2008). En la subregión del Istmo Centroamericano y México entre la semana 1 y la 49 del 2021 se notificaron 101 824 casos de dengue con una incidencia de 56 casos por 100,000 habitantes, incluidos casos de dengue grave (OPS/OMS 2021). Y en el mismo año 2021, se detectaron la circulación simultánea de todos los serotipos en Guatemala y México (OPS/OMS 2021). Es una de las principales prioridades de salud pública en México. Los estados de la República Mexicana que presentan mayor número de casos a inicios del 2022 son: Sinaloa, Jalisco y Chiapas, este último con la presencia de tres serotipos (Fig. 2) (SSA 2022).

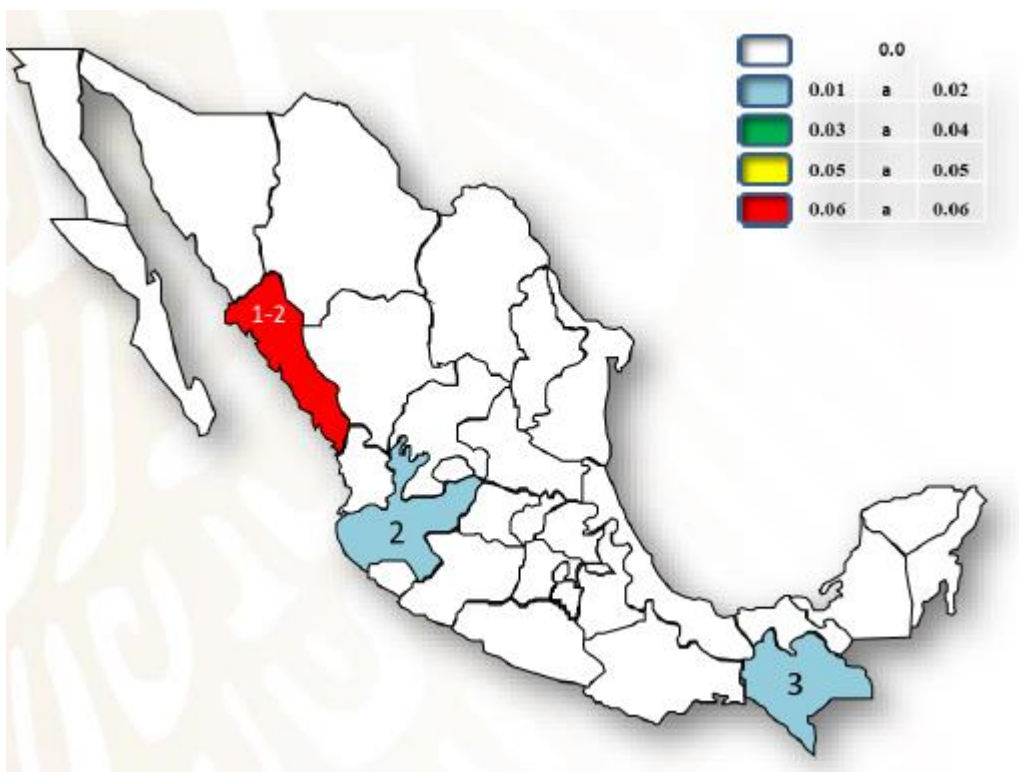


Figura 2. Incidencia y serotipos identificados por RT-PCR en tiempo real, México, 2022. Fuente: SINAVE/DGE/SALUD/Sistema Especial de Vigilancia Epidemiológica de Dengue con información al 10 de enero de 2022.

3.5 Chikungunya en México

El chikungunya es una enfermedad ocasionada por el virus Chikungunya perteneciente a la familia Togaviridae del género *Alfavirus*. La enfermedad es transmitida por la picadura de mosquitos infectados del género *Aedes*. La enfermedad fue reportada por primera vez en sur de Tanzania en 1952. Desde el 2004 se le considera una enfermedad endémica en algunas regiones de África y Asia, se han descrito casos en Latinoamérica, caribe y Europa (OMS 2011). En la actualidad esta enfermedad se ha detectado en casi 40 países de Asia, África, Europa y América (PAHO/OMS 2011). En el 2015 la OMS/OPS había confirmado 1,145 casos de transmisión autóctona y 11 casos importados para México (Secretaría de Salud 2015). En México en el 2021 se reportaron 4 casos autóctonos de fiebre Chikungunya (Cuadro 1) (SSA 2022). La enfermedad

presenta algunos síntomas similares con la enfermedad del dengue, ya que consiste en una sintomatología aguda con fiebre. Sin embargo, desarrolla erupciones en la piel a diferencia del dengue, y provoca una artralgia incapacitante. Actualmente no existe ningún medicamento específico o vacuna contra el virus, el tratamiento consiste en aliviar los síntomas (Pialoux et al 2007).

Cuadro 1. Casos confirmados de fiebre Chikungunya en México a la semana 52 del 2021.

Entidad Federativa	Casos confirmados	Defunciones
Coahuila	1	0
Guerrero	1	0
Oaxaca	1	0
Tabasco	1	0
Total	4	0

FUENTE: SINAVE/DGE/SS: Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Fiebre Chikungunya * Acceso al 31 de diciembre de 2021.

3.6 Zika en México

Esta enfermedad es causada por el virus del Zika, de la familia Flaviviridae, del género *Flavivirus*, de la la cual es transmitida por la picadura de un mosquito del género *Aedes* infectado (*Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*) (CDC 2022). Está relacionado con otras enfermedades similares, como la fiebre amarilla y la fiebre del Nilo Occidental, producidas por otros *Flavivirus* también transmitidos por mosquitos (Arredondo-García et al 2016). El virus del Zika fue identificado por primera vez en monos Rhesus en el bosque de Zika en Uganda en 1947. Posteriormente, en el año 1952 en África fue identificado en humanos, en los países de Uganda y la republica Unida de Tanzania. (OMS 2018).

En junio del 2007, se reportó el primer brote asociado al virus de Zika detectada en la isla de Yap, Estados Federados de Micronesia (Océano Pacífico). Esta fue la primera vez que el Zika se descubrió fuera de África (OMS 2018). En México, del 2015 al 2020 la Secretaría de Salud reporto 12,956 casos autóctonos de zika,

principalmente en Chiapas (821), Nuevo León (950), Yucatán (1,321) y Veracruz (2,105) (Cuadro 2) (SSA 2022).

Cuadro 2. Casos confirmados autóctonos de enfermedad por virus del Zika en México a la semana 52 del 2021.

Entidad Federativa	Casos Confirmados 2015-2020	Casos Confirmados 2021	Total
Aguascalientes	1	0	1
Baja California	3	0	3
Baja California Sur	115	0	115
Campeche	94	0	94
Coahuila	336	0	336
Colima	297	0	297
Chiapas	821	0	821
Durango	5	0	5
Guanajuato	5	0	5
Guerrero	888	0	888
Hidalgo	285	0	285
Jalisco	682	0	682
México	48	0	48
Michoacán	70	0	70
Morelos	548	34	582
Nayarit	709	0	709
Nuevo León	950	0	950
Oaxaca	537	0	537
Puebla	225	0	225
Querétaro	17	0	17
Quintana Roo	391	0	391
San Luis Potosí	534	0	534
Sinaloa	338	1	339
Sonora	448	0	448
Tabasco	376	0	376
Tamaulipas	802	0	802
Veracruz	2,105	0	2,105
Yucatán	1,325	0	1,325
Zacatecas	1	0	1
Total	12,956	35	12,991

FUENTE: SINAVE/DGE/SS: Sistema de Vigilancia Epidemiológica de enfermedad por virus del Zika * Acceso al 31 de diciembre de 2021.

4. INSECTICIDAS

Los insecticidas desde la perspectiva de Salud Pública son compuestos químicos utilizados para controlar o matar insectos portadores de enfermedades, se clasifican en orgánicos (contienen carbono) e inorgánicos, también se clasifican de acuerdo con su composición química, acción toxicológica o método de penetración (López-Carrillo 1993). Existen diversas clasificaciones de insecticidas, pero sin duda la más común es aquella que los agrupa de acuerdo con su estructura química y se clasifican en diversas familias (Grupos Toxicológicos) (Tabla 1) (López-Carrillo 1993). Las familias que son usadas en Salud Pública en el control de las ETV son: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides.

Tabla 1. Clasificación de los insecticidas, según la familia química (Grupos Toxicológicos).

Familia química	Ejemplos
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín
Organofosforados	Bromophos, diclorvos, malatión
Carbamatos	Carbaril, methomil, propoxur, bendiocarb
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
Piretroides	Cipermetrina, deltametrina, permetrina
Derivados bupiridilos	Cloromequat, dicuat, paraquat
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, piclram, sílvex
Derivados del ácido cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazine, ametrin, desmetrin, simazine
Compuestos orgánicos del estaño	Cihexatin, dowco, plictrán
Compuestos de origen inorgánicos	Arsénico, pentóxido, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio
Compuesto de origen botánico	Nicotina, aceite de canola

4.1 Organoclorados (OCLs)

Todos los compuestos que pertenecen a este grupo se caracterizan por la presencia de carbón, cloro, hidrogeno y algunas veces oxígeno, incluyendo un numero de enlaces C-Cl (Ware y Whitacre 2004). Algunas de sus propiedades son: baja volatilidad, químicamente estables, solubles en lípidos, lento grado de biotransformación y degradación. Hay cuatro principales familias de derivados organoclorados (Ware y Whitacre 2004):

Grupos

Ejemplos

Derivados del hexaclorociclopentadieno

Aldrin, dieldrín, endrín

Derivados del 2,2-difeniletano

DDT, metoxiclor, dicofol

Derivados del ciclohexano

Lindano

Los de estructura en forma de caja

Declorane, clordecon

4.1.1 Modo de acción de los organoclorados (OCLs)

Son insecticidas neurotóxicos que afectan el balance del intercambio de iones sodio y potasio dentro del axón de las neuronas, e impiden la transmisión de impulsos nerviosos, tanto en insectos como en mamíferos (Albert 1990). El DDT afecta la permeabilidad de los iones potasio, y reduce el transporte de este ion a través de la membrana, al mismo tiempo que altera los canales a través del cual pasan los iones de sodio. Estos canales se activan normalmente (se abren) pero una vez abiertos son inactivados (cerrados) lentamente, por lo cual interfieren en el transporte activo de sodio fuera del axón nervioso durante la despolarización de la membrana nerviosa. Esto provoca un aumento en la transmisión del impulso nervioso espontaneo que ocasiona la contracción, seguido por convulsiones y posteriormente la muerte. (Ware y Whitacre 2004).

4.2 Organofosforados (OPs)

El nombre se debe a que químicamente son diferentes de los fosfatos. El primer producto fue descubierto por el alemán Gerhard Schrader en 1934. Son excelentes inhibidores irreversibles de la enzima acetilcolinesterasa, imposibilitan

la hidrólisis de la acetilcolina esencial en la función del sistema nervioso. Los insecticidas organofosforados (malatión, temefós y fentió), normalmente son ésteres derivados de los ácidos fosfóricos, fosfónico, fosforotióico, fosforoditióico, fosfonotióico, que a veces tienen grupos de amidas o tilo. La mayor parte son sólo solubles en agua y tienen un alto coeficiente de partición aceite/agua y baja presión de vapor, la mayoría de los insecticidas organofosforados tiene baja solubilidad. La principal forma de degradación en el ambiente es la hidrólisis (Pehkonen y Zhang 2002).

4.2.1 Modo de acción de los organofosforados (OPs)

Son insecticidas neurotóxicos no sistémicos de amplio espectro, actúan por contacto, ingestión e inhalación, afectando al sistema nervioso central. Inhiben la enzima acetilcolinesterasa (AChE) al unirse a este receptor de manera irreversible, evitando que se lleve a cabo la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. La enzima AChE lleva a cabo la hidrólisis de la acetilcolina que se genera en las uniones nerviosas, hasta colina. En ausencia de AChE funcional, la acetilcolina liberada se acumula e impide la transmisión continua de los impulsos nerviosos a través del espacio sináptico en las uniones nerviosas. Esto ocasiona la pérdida de coordinación, convulsiones y finalmente la muerte (Cremllyn 1996).

4.3 Carbamatos (CARBs)

El desarrollo exitoso de los insecticidas organofosforados estimuló el estudio de otros compuestos que poseen actividad anti-colinesterasa. Uno de tales compuestos es el alcaloide fisostigmina o eserina, ingrediente activo del haba de Calabar *Phisostigma venenosum* Balfour (Ware 1999). Los insecticidas carbámicos (propoxur, bendiocarb, y carbaril) se distinguen por su carácter de selectividad ya que a pequeñas modificaciones en su estructura hacen que el producto tenga actividad contra algunas especies de insectos (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez 1994). Otra característica es la falta de correlación que existe en la actividad tóxica sobre diversos insectos y la toxicidad de mamíferos. Esta

particularidad también los distingue de los insecticidas fosfóricos, en los que la correlación es más estrecha.

La biotransformación de los carbamatos se realiza a través de tres mecanismos básicos: hidrólisis, oxidación y conjugación. La eliminación se hace principalmente por vía urinaria (Cremlyn 1986; Ware 1999).

4.3.1 Modo de acción de los carbamatos (CARBs)

Los carbamatos tienen un modo de acción casi idéntico al de los organofosforados, ya que actúan al inhibir a la enzima AChE. Pero la diferencia es que los carbamatos carbamitan a la AChE lentamente y en una forma reversible, que provoca una cinética más rápida que los organofosforados, mientras que los organofosforados fosforilan la AChE de manera irreversible (Ware 1999).

4.4 Piretroides (PIRs)

Los PIRs son compuestos sintéticos derivados de la estructura de la piretrina, toxinas contenidas en las flores del crisantemo. Las flores del *Crysanthemum cinerariaefolium* (Trevis) Sch. Bip. y de especies relacionadas contiene seis ésteres que contienen actividad insecticida (jasmolina I y II, cinerina I, II, piretrina I y II). Designadas colectivamente como piretrinas naturales (Vijerberg y Van den 1990). De las que solo tienen actividad insecticida son la piretrina I y II.

Todos los insecticidas PIRs son ésteres de ácidos carboxílicos (excepto un grupo de ésteres de oximas, aún no explotados comercialmente) compuestos de tres partes (mitad carboxílicos, enlace éster y mitad alcohólica) y generalmente no tienen más de tres centros quirales, localizados en los carbonos 1 y 3 del anillo del ciclopropano y en el carbono de la mitad alcohólica (Zerba 1988). Su modo de acción es interferir con el funcionamiento de los canales de sodio dependientes del voltaje de las neuronas (Silver et al 2014). Es decir, las células nerviosas afectadas por el químico producen descargas repetitivas lo que lleva a una parálisis y muerte del insecto (Ware 1999).

4.4.1 Modo de acción de los piretroides (PIRs)

Los piretroides comparten un modo de acción similar al DDT y son considerados como venenos axiónicos. Los piretroides actúan sobre el axón en el sistema nervioso central y periférico mediante la interacción de los canales de sodio y potasio de la misma forma que actúa el DDT, lo cual provoca parálisis nerviosa, convulsiones, hiperactividad y la muerte de los insectos (Albert 1990).

5. RESISTENCIA A INSECTICIDAS

Según la organización mundial de la Salud (OMS) la resistencia se define como una característica heredada que otorga una mayor tolerancia a un plaguicida o grupos de plaguicidas, de tal modo que los grupos resistentes sobreviven a una concentración del compuesto que normalmente sería mortal para la especie (OMS 1992). Los insecticidas han sido y seguirán siendo el componente principal de los programas globales para control de vectores (Schoof y Taylor 1972). El fenómeno de resistencia a insecticidas en los vectores de enfermedades ha tenido un impacto en los programas de control obligando a cambiar las estrategias de control (OMS 1986). Debido a que la resistencia no evoluciona a una misma velocidad en todas las especies de artrópodos se sugiere realizar pruebas periódicas para detectar la aparición de la resistencia en poblaciones expuestas a un compuesto químico (Georghiou 1994).

5.1 Mecanismos de resistencia a insecticidas

La resistencia a insecticidas se basa en la selección de genes mutantes y está documentada en muchos vectores de enfermedades (Brown y Aldridge 1971). Georghiou (1965) clasificó la resistencia en tres tipos: por el comportamiento, morfológica y fisiológica. Se mencionará la resistencia fisiológica ya que los insectos la desarrollan más en contra de los insecticidas.

Los insectos adquieren resistencia de dos formas, por adición de un mecanismo de protección, y sensibilidad en el sitio acción. Pasteur y Raymond (1996) corroboran en su revisión, y concluyen que la resistencia a insecticidas en muchas

especies de insectos se debe principalmente a (1) mutación en la proteína del sitio de acción de los insecticidas y (2) detoxificación incrementada del insecticida.

Con fines de control de vectores, los tipos de resistencia se agrupan en mecanismos de resistencia metabólicos y no metabólicos. Son mecanismos metabólicos cuando involucran cambios enzimáticos, y no metabólicos cuando se refiere a cambios en insensibilidad del sitio activo y el morfológico un cambio de grosor en la cutícula del insecto.

De manera general son: 1) resistencia cuticular, 2) resistencia metabólica, y 3) alteración en los sitios de acción.

5.1.1 Resistencia cuticular

Algunos insectos han desarrollado cutículas más gruesas o alteradas la cual reducen el grado de penetración de los insecticidas (Apperson y Georgiou 1975). Este mecanismo por sí mismo confiere bajos niveles de resistencia y llega a ser no importante cuando se presenta con otros mecanismos de resistencia, sin embargo, proporciona una protección amplia contra una variedad de insecticidas (Scott 1999). La manera más simple de determinar el índice de la penetración implica el exponer a los insectos a los insecticidas y después comparar la cantidad absorbida en un cierto plazo en las cepas resistentes y susceptibles. Un ejemplo es *Anopheles funestus* Giles en Sudáfrica, que presentó mayor grosor medio de la cutícula en las poblaciones resistentes a permetrina en comparación con aquellos caracterizados como menos resistentes o tolerantes (Wood et al 2010).

5.1.2 Resistencia metabólica

Este tipo de mecanismo se produce cuando la alta actividad de una o más enzimas actúa sobre una porción de insecticida de manera que lo secuestra o desintoxica la molécula, antes que alcance su sitio de acción en el insecto (Hemingway y Ranson 2000). Hay tres enzimas desintoxicantes importantes involucradas: esterasas, glutatión S-transferasas (GST) y monooxigenasas (Scott 1995; Hemingway y Ranson 2000).

5.1.2.1 Esterasas

Dentro de las esterasas también conocidas como carboxilesterasas se encuentran las que utilizan como sustrato a alfa y beta naftil acetato y las para-nitrofenilacetato. Las esterasas tienen la capacidad de hidrolizar enlaces ester presentes en muchos insecticidas; por lo tanto, se encuentran como participantes de la resistencia a insecticidas. Los estudios sobre la resistencia hacia los insecticidas han permitido el interés sobre las esterasas de los insectos y su principal clasificación se centra en las propiedades catalíticas de las esterasas y la interacción con los insecticidas (Montella et al 2012). El mecanismo más común en los mosquitos está modificado por los niveles o actividades de detoxificación de las enzimas esterasas, que metabolizan una determinada gama de insecticidas y que pueden conferir resistencia a OPs, CARBs, y rara vez a PIRs (Hemingway y Karunaratne 1998).

5.1.2.2 Glutación S-transferasas (GSTs)

Son de gran importancia en la detoxificación metabólica en los organismos y conocidas por estar involucradas en la resistencia a insecticidas en insectos. Se clasifican de acuerdo con la reacción que catalizan como alquil, aril y epoxitransferasas (Terriere 1984). Su mecanismo es a través del secuestro del glutatión, lo que permite solubilizarla y con ello facilitar mayor excreción del tóxico, el gen de GST clase *Epsilon*, GSTe2 es responsable de niveles de sobreexpresión cinco veces más en cepas resistentes que en cepas susceptibles (Ranson et al 2001). Las enzimas glutatión S-transferasas (GSTs) comúnmente confieren a los mosquitos resistencia al DDT (Prapanthadara et al 1993,1995) y puede conferir resistencia secundaria para organofosforados (Hemingway et al 1990), aunque recientemente también se ha encontrado correlacionada indirectamente con la resistencia a PIRs. (Vontas et al 2001; Penilla et al 2003).

5.1.2.3 Citocromo P⁴⁵⁰

Los mecanismos enzimáticos involucrados en la resistencia a los insecticidas incluyen enzimas encargadas de la desintoxicación como las oxidasas de función mixta (MFO) del citocromo P⁴⁵⁰. Dado el hecho que fueron de los primeros

genomas que se secuenciaron en *Anopheles gambiae* Giles (Holt et al. 2002) y *Ae. aegypti* (Nene et al. 2007), corresponden a una familia muy grande mayor a 100 enzimas (Jean-Philippe et al 2013). Los metabolitos de los citocromos P⁴⁵⁰, producto del metabolismo resultan ser más tóxicos, por ejemplo: hidroxilaciones de carbono, nitrógeno y oxígeno; las epoxidaciones, desulfuraciones oxidativas de organofosforados siempre producen metabolitos más tóxicos. Por otra parte, es posible que sea un reservorio para el desarrollo potencial de la resistencia en los insectos debido a su localización dentro de los organismos en cuerpos grasos (Casida y Quistad 1998). Las monooxigenasas están involucradas en el metabolismo de todos los insecticidas, al activar la molécula en el caso de los organofosforados o más comúnmente en la detoxificación (Hemingway y Ranson 2000). Una actividad alta de estas enzimas está asociada con la resistencia a PIRs en *An. stephensi* Liston, *An. subpictus* Grassi, *An. gambiae* (Brogdon et al 1997, Vulule et al 1994) y también se ha encontrado que confiere resistencia cruzada a DDT y PIRs en *An. albimanus* de Guatemala (Brogdon et al 1999).

5.1.3 Alteración en el sitio de acción

En este mecanismo de resistencia, se impide la interacción de las moléculas de insecticidas con el sitio de acción, lo cual ocasiona resistencia a diferentes grupos de insecticidas. El mayor cambio que provoca este mecanismo se debe a la sustitución de uno o más aminoácidos en la secuencia de la proteína en su sitio de acción. Hay por lo menos tres sitios de acción de insecticidas que pueden desarrollar alteraciones: acetilcolinesterasa (AChE), los canales de sodio y los receptores ácido gamma aminobutírico (GABA) (Hemingway et al 1990).

Los insecticidas OPs y CARBs actúan sobre la AChE en la sinapsis nerviosa del sistema nervioso central (SNC) de los insectos. El mecanismo de la AChE alterada usualmente confiere resistencia cruzada entre dos grupos de insecticidas (Ayad y Georghou 1975; Hemingway et al 1984; Raymond et al 1986). Mientras que la alteración en los canales de sodio confiere resistencia al derribo, conocida comúnmente como “*Kdr*” (siglas en inglés knock down resistance) contra el DDT y los PIRs (Miyazaki et al 1996; Williamson et al 1996). Finalmente, la alteración de

los receptores GABA en la entrada de los canales de cloro confiere resistencia a los ciclodienos en una amplia variedad de insectos (Ffrench-Constant et al 1991; Gholizadeh et al 2010).

Existen otros dos mecanismos propuestos que podrían ser considerados: incremento en la tasa de excreción y resistencia por comportamiento. Sin embargo, no existe casos documentados de excreción en mosquitos, lo cual sugiere que la importancia de este mecanismo es cuando se juntan con otros mecanismos (Rodríguez 2000). La resistencia por comportamiento involucra un cambio en la conducta del insecto, para evitar o minimizar el contacto y captación del insecticida. Un ejemplo es el mosquito *An. minimus* Teobald, que cambio el comportamiento de endofílico a exofílico (Bang 1985), y otro reporte en Tailandia, entre el 2000 y 2011 registró un decremento en la resistencia a los PIRs en poblaciones de anofelinos, y se asumió que fue debido al comportamiento de evitar el insecticida (Chareonviriyaphap et al 2013).

El mecanismo de acción de los insecticidas que alteran el sitio blanco se debe a la interacción entre el insecticida con el canal de sodio que ocasiona un prolongado mecanismo de inactivación dependiente de voltaje (Cossy 2018). Es decir, hay una sensibilidad del canal de sodio a la unión con el insecticida que ocasiona el efecto conocido como resistencia al derribo “*kdr*” de esta manera se interpreta al fenotipo de las poblaciones de mosquitos (Martinez-Torres et al 2018). El canal de sodio es una proteína transmembranal con 2108 aminoácidos agrupados en dominios homólogos (dominio I, II, III y IV), con uniones hidrofílicas, cada dominio con seis segmentos (Catterall 2001) (Figura 3). Básicamente, este mecanismo de resistencia por alteración en el sitio de acción está involucrado con la resistencia al DDT y los PYRs donde se han registrado mutaciones puntuales que ocasiona la insensibilidad al sitio blanco, y ocurre con la sustitución de aminoácidos en genes estructurales (Du et al 2016).

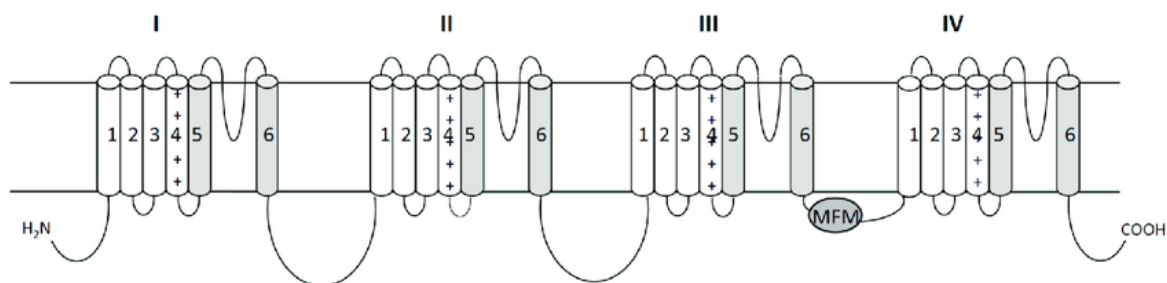


Figura 3. Topología del canal del sodio que muestra sus características estructurales: contienen cuatro dominios repetidos homólogos (Du et al. 2016).

5.2 Resistencia en *Aedes aegypti*

La resistencia a los insecticidas es uno de los principales obstáculos para el éxito del programa de control del vector. Es por ello que la vigilancia de vectores es importante para las decisiones efectivas. La resistencia a PIRs en poblaciones de *Ae. aegypti* se ha reportado en varios estados de México (Flores et al 2005, 2006, Flores et al 2016; Saavedra et al 2007; Aponte et al 2013; López-Solis et al 2020). La principal fuente del origen de la resistencia se debe al uso de PIRs desde 1996 hasta 2007 (CENAPRECE 2016). Estos estudios reportan las frecuencias de las mutaciones V1016I y F1534C, que involucran resistencia hacia los piretroides algunos también reportan los mecanismos de resistencia basados en las enzimas esterasas y GSTs. La mutación V1016I se propagó rápidamente en las poblaciones de *Ae. aegypti* de México simultáneamente con la intensificación del uso de PYRs debido a la aparición de brotes de dengue (Flores et al 2006).

Por otro lado, también se ha descrito mutaciones puntuales asociadas con la resistencia a DDT y PYR en el gen que codifica para el canal de sodio: V1016I, I1011M, I1011V y F1534C en *Ae. aegypti* (Saavedra-Rodríguez et al 2007, Harris et al 2010, Yanola et al 2011). Otra mutación en otras especies de mosquitos es la que se encontró en la acetilcolinesterasa (AChE), la cual confiere resistencia cruzada entre organofosforados y carbamatos (Ayad y Georghiou 1975), lo que representa uno de los mayores retos en el control de vectores (Hemingway y Ranson 2000).

La resistencia también puede estar regulada por señales epigenéticas como es la metilación del ADN que desempeñan un papel importante en la modulación de la

expresión génica (Rodríguez-Dorantes et al 2004). Estudios sugieren que este último mecanismo está involucrado por el silenciamiento parcial de los genes *GSTe7* o *GSTe2* de la familia épsilon, donde resultó en una mayor susceptibilidad a la deltametrina, lo que sugiere que las GSTs también pueden desempeñar un papel en la resistencia a los insecticidas piretroides (Lumjuan et al 2011; Stenhouse et al 2013).

Las mutaciones *kdr* y las de AChE pueden detectarse mediante pruebas diagnóstico-moleculares basadas en PCR, para discriminar entre individuos homocigotos susceptibles, homocigotos resistentes y heterocigotos (Martínez-Torres et al 1998).

La resistencia a piretroides ocurre en diversas poblaciones del mosquito *Ae. aegypti*, ya sea por resistencia cruzada con el DDT (Hemingway et al 1989) o bien, mediante mecanismos metabólicos relacionados con la resistencia a organofosforados y carbamatos. Se han realizado muchos trabajos que determinan el grado de resistencia en poblaciones de *Ae. aegypti* (Hemingway et al 1989; Saavedra-Rodríguez et al 2007; Aponte et al 2013), pero no hay uno donde se evalué a una escala más fina con un gran número de sitios en una ciudad y ver la distribución espacial de la resistencia.

6. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia de *Ae. aegypti* como vector de enfermedades como dengue, chikungunya, Zika y la fiebre amarilla, su control se ha realizado de forma intensiva y/o permanente durante todo el año con el uso de insecticidas. En consecuencia, las poblaciones de mosquitos se mantienen bajo intensa presión de selección, ocasionando la aparición de individuos resistentes a los grupos toxicológicos empleados, principalmente PIRs. La alta incidencia de ETV, principalmente dengue,

El estado de Chiapas tiene el mayor índice de casos de dengue endémico y la ciudad de Tapachula reporta la mayor incidencia de casos. Las condiciones climáticas tropicales de la región mantienen altas densidades de *Ae. aegypti* en todo el año. Esto ocasiona el constante uso de insecticidas para el control del vector y hace que sea una excelente área para el estudio de los mecanismos de resistencia en poblaciones de *Ae. aegypti*. En este sentido, realizar un estudio minucioso sobre la evaluación de la resistencia de las poblaciones de mosquitos en diferentes sitios permitirán conocer la distribución espacial y con ello realizar un mejor manejo del uso de insecticidas para control del vector y en consecuencia el control de la enfermedad.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Área de estudio

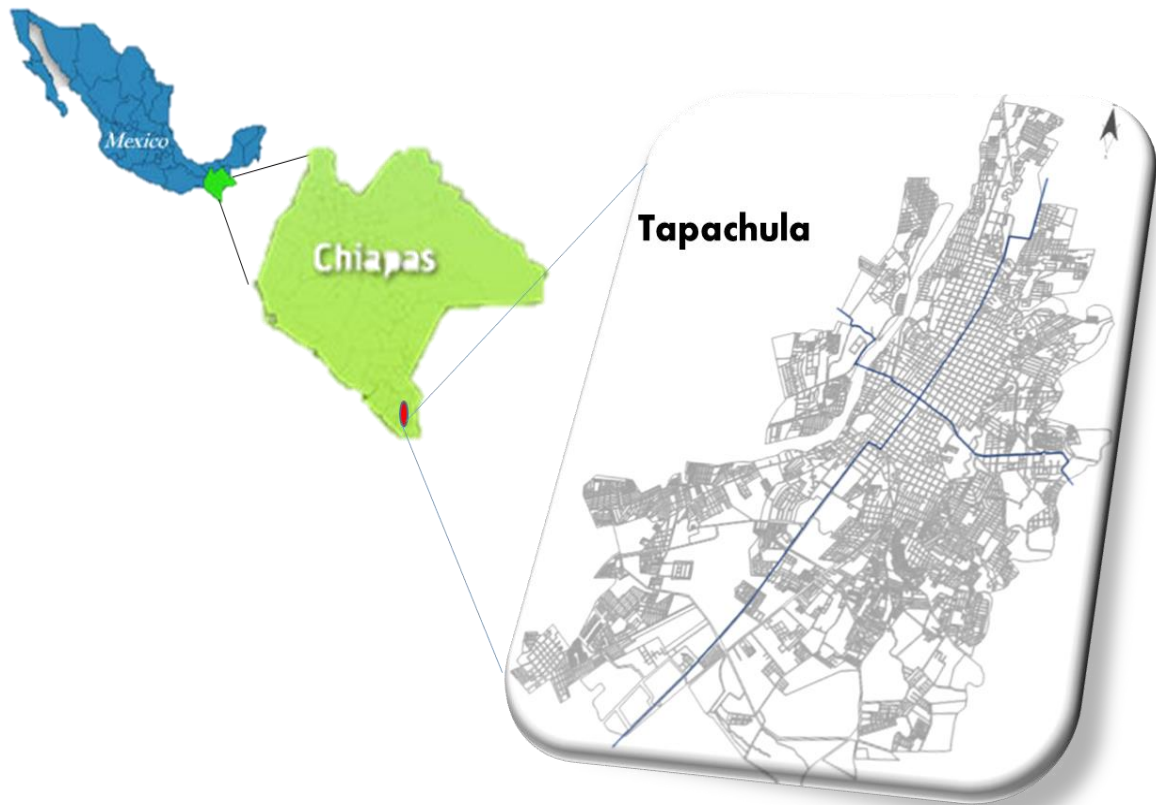
La ciudad de Tapachula se encuentra situada en la Región del Soconusco en la costa Sur del estado de Chiapas, México, frontera con Guatemala. Se localiza a 177 msnm, y sus coordenadas son 14°54'00" Norte y 92°16'00" Oeste, con una superficie 904 km². La temperatura media anual de Tapachula oscila entre 24 a 35 °C, con clima cálido tropical durante todo el año, siendo el período más cálido el mes de abril. Precipitaciones significativas, de 2653 mm en promedio el alta y la más baja de 503 mm en la mayoría de los meses con una estación seca corta. Es el segundo municipio a nivel estatal con mayor concentración poblacional (304,337 habitantes) (INEGI 2021).

Los muestreos se realizaron en 26 sitios distribuidos al azar de la ciudad de Tapachula. Para ello, se agruparon en cuatro cuadrantes: norte-oriental (I), sur-oriental (II), sur-poniente (III) y norte-poniente (IV) (Cuadro 3).

Dentro de cada cuadrante se seleccionaron seis conglomerados, cada conglomerado constó de nueve manzanas (Mapa 1) (Figura 4). Las recolectas de material biológico se obtuvieron de la manzana central de cada conglomerado.

Cuadro 3. Lista de los sitios de muestreo por cuadrante en la ciudad de Tapachula, Chiapas.

Conglomerado	Cuadrante	Sitio	Latitud	Longitud
1	I	Colinas del Rey	14°55'50.9"	92°14'50.2'
2		Galaxias	14°55'11.2"	92°15'06,5"
3		Barrio Nuevo	14°54'51. "	92°15'05.3"
4		San Juan de los Lagos	14°54'26.3"	92°15'13.4"
5		Coapantes	14°54'23.0"	92°14'57.1"
6		Bonanza	14°54'02.8"	92°14'31.7"
7	II	Galeana	14°54'00.2"	92°15'56.0"
8		16 de Septiembre	14°53'44.0"	92°15'42.1"
9		Calcáneo Beltrán	14°53'28.0"	92°15'43.4"
10		Benito Juárez 1	14°53'21.8"	92°16'04.1"
11		Benito Juárez 2	14°53'11.7"	92°16'10.3"
12		Emiliano Zapata	14°53'02.1"	92°16'14.2"
13	III	Raymundo Enríquez	14°52'01.4"	92°18'48.8"
14		Pobres Unidos	14°53'14.0"	92°17'6.1"
15		Palmeiras	14°53'22.1"	92°18'06.4"
16		Nuevo Milenio	14°53'24.8"	92°17'59.4"
17		Primavera	14°53'39.3"	92°17'38.6"
18		Democracia	14°54'23.7"	92°16'33.5"
19	IV	5 de febrero	14°55'33.7"	92°15'22.4"
20		Xochimilco 1	14°55'48.9"	92°15'37.8"
21		Xochimilco 2	14°56'02.2"	92°15'29.9"
22		Vergel 1	14°56'21.2"	92°15'52.4"
23		Vergel 2	14°56'32.9"	92°15'52.4"
24		Paraíso	14°56'35.2"	92°15'19.7"



Mapa 1. Ubicación de Tapachula, Chiapas en la República Mexicana.



Figura 4. Descripción de un conglomerado conformado de 9 manzanas y el sitio de muestreo.

De cada sitio de estudio se adquirieron imágenes aéreas (Dron DJI Phantom 4pro) para revisar el entorno arbóreo y buscar posible asociación entre ambiente y los niveles de resistencia. Las imágenes se analizaron con el programa ArcGis Desktop 10.8.1 y determinaron los porcentajes de cobertura por sitio, y se generaron correlogramas I de Moran para correlacionar la CL50 con cada uno de los cinco insecticidas probados.

7.2 Recolecta de mosquitos

Los huevos se recolectaron por medio de ovitrampas que se colocaron en el interior de las casas, ubicadas a cada lado de la manzana central de cada conglomerado. Las ovitrampas consistieron en cilindros de plástico color negro con capacidad de 1 L, se llenaron con agua al menos a un 50% de su capacidad. Como sustrato se utilizaron tiras de papel filtro absorbente (#650) en el interior con la finalidad de que las hembras depositaran sus huevos.

Las tiras de papel filtro con huevos se transportaron al insectario del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) las cuales se reemplazaron semanalmente. Una vez llegado el material al insectario, las tiras de papel se sumergieron en agua contenida en charolas de plástico (de 4 L de capacidad) para esperar la eclosión de larvas. Las larvas se distribuyeron en charolas de plástico con capacidad de 4L para su crecimiento. Posteriormente se alimentaron por un tiempo de 10 días pasando por cuatro estadios larvales y hasta la obtención de pupas. Se recolectaron las pupas las cuales se mantuvieron en recipientes cubiertos con una malla para la emergencia de mosquitos adultos.

7.3 Identificación de mosquitos adultos

Los mosquitos obtenidos se identificaron taxonómicamente según Rueda (2004) basados en el patrón del tórax (Figura 5). Se utilizaron aspiradores de vidrio para la identificación, con ayuda de un estereoscopio se observaron las escamas del tórax en forma de lira para *Ae. aegypti*, a través del tubo de vidrio y así se

descartaron otras especies. Una vez identificados los mosquitos, se colocaron en jaulas (dimensiones 30 x 30 x 30 cm) cada una de las poblaciones de estudio.

Los mosquitos hembras de cada sitio de estudio se alimentaron con sangre de conejo. Para asegurar la copula de la población se alimentaron a los 5 días de edad. La generación F₁ obtenida fue con la cual se realizaron los bioensayos de susceptibilidad, ensayos bioquímicos y ensayos moleculares. Como control se utilizaron mosquitos de la cepa New Orleans la cual es susceptible a insecticidas. Todos los mosquitos se criaron bajo condiciones ambientales controladas en el insectario a una temperatura de 27 ±2°C; humedad relativa de 70-80%, y fotoperiodo de 12 horas luz: oscuridad.

Escamas en forma de Lira



Ae. aegypti

Escamas en forma de espina larga



Ae. albopictus

Figura 5. Patrón de escamas en tórax de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Rueda, 2004).

7.4 Bioensayos

Los bioensayos se realizaron mediante el método biológico diseñado por el Centro para el control y prevención de Enfermedades (sigla en inglés CDC), (Brogdon y Chan 2012), para determinar el estado de resistencia en los mosquitos obtenidos de cada sitio de estudio. En este estudio fueron elaboradas curvas de dosis-respuesta de concentración letal 50 (CL₅₀) para cada uno de los insecticidas seleccionados (Tabla 2). Los resultados se compararon con la cepa New Orleans,

la cual presenta característica de ser susceptible a insecticidas y fue proporcionada por el insectario de la Universidad de Colorado, USA.

Todos los insecticidas utilizados corresponden a estándares analíticos con pureza de 98-99% (Chem Service Inc). Para cada uno de los insecticidas se prepararon soluciones stock de 1000 µg/ml que se disolvieron en acetona (marca Hycel reactivos químicos), y a partir de la cual se prepararon cada una de las concentraciones que componen la línea base (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diferentes concentraciones preparadas para los cinco insecticidas de los tres grupos toxicológicos.

Grupo toxicológico	Insecticida	Concentraciones (µg/ml) mosquitos de campo	Concentraciones (µg/ml) Ceba New Orleans
PYRs	Permetrina	10, 20, 40, 80, 160	0.8, 1.2, 2.4, 3.2, 6
	Deltametrina	1, 2, 4, 6, 8, 16	0.75, 0.1, 0.15, 0.2, 0.4
OPs	Malatión	2, 3, 4, 6, 8	2, 3, 4, 6, 8
	Clorpirifos	2, 4, 6, 8, 12	0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2
CARBs	Bendiocarb	0.5, 0.75, 1, 1.5, 3	0.25, 0.3, 0.4, 0.6, 1.2

Para el bioensayo se utilizaron botellas de 250 ml de vidrio boca angosta (Wheaton 4285), para asegurar que estaban libres de residuos de insecticidas, se colocaron mosquitos de la cepa New Orleans por 1h, si no había mosquitos derribados era apta para su uso.

Las botellas se recubrieron con 1 ml de cada concentración en toda la superficie interna. La impregnación de las botellas se realizó manualmente y se observó que el líquido se distribuyera en toda la superficie de la botella incluso el cuello, base y tapa con movimientos giratorios por un lapso de 2 min. Después, las botellas se colocaron en un agitador con rodillos (Wheaton®) por 3 min tapados. Se destaparon y se continuaron en agitación para la evaporación de la acetona por 3

min. Las botellas se colocaron en cajas protegidas de la luz hasta su uso. Los bioensayos se realizaron en condiciones de temperatura del laboratorio $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se realizaron los bioensayos con mosquitos hembra de 2-3 días de edad, se transfirieron con ayuda de un tubo succionador a cada una de las botellas en grupos de 15 – 20 mosquitos. Posteriormente, los mosquitos caídos y no caídos de cada una de las botellas se transfirieron a contenedores de plástico (vaso #12) donde se mantuvieron por 24 h con una torunda impregnado con solución azucarada al 10% (agua destilada + azúcar de caña). Después de las 24 h se registraron los mosquitos muertos y vivos. Cuatro réplicas se realizaron para cada una de las concentraciones a condiciones ambientales del laboratorio $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

7.4.1 Concentración letal 50 (CL_{50})

Para obtener las CL_{50} para cada insecticida se realizaron los análisis con el modelo de regresión logística QCal (<https://sourceforge.net/proyectos/irmaproj/files/Qcal/>) (Lozano-Fuentes et al 2012). La razón de resistencia (RR) se obtuvieron a partir de la división de la CL_{50} de la población de campo entre la CL_{50} de la cepa susceptible para cada uno de los insecticidas.

7.5. Ensayos bioquímicos

Se determinaron los mecanismos de resistencia basados en los niveles de enzimas que metabolizan a los insecticidas mediante ensayos bioquímicos siguiendo el protocolo descrito por Penilla et al. (1998). Se realizaron en el laboratorio de resistencia a insecticidas del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP). Los ensayos incluyeron esterasas generales, esterasas p-nitrofenil acetato (pNPA), GSTs, monooxigenasas P^{450} , y se identificaron las enzimas acetilcolinesterasa (AChEi) insensible. Se procesaron tres placas, cada una con 47 mosquitos (24 hembras y 23 machos) de cada sitio de la generación F1. Se colocaron mosquitos individuales en cada pozo de la microplaca de fondo redondo (Costar 3590) y se homogeneizaron en 200 μl de agua destilada.

Para el ensayo de AChE se tomaron dos dúPLICAS de 25 μl del homogeneizado crudo y se transfirieron con una micropipeta de 12 canales a una microplaca de

fondo plano. Se centrifugaron las placas con el resto de homogeneizado a 4000 rpm por 30 min a 4°C en una centrífuga de microplacas (CENTRA CL3R Thermo IEC). Una vez centrifugada, se tomaron alícuotas de 20 µl y se pasaron a placas de 96 pozos de fondo plano (Costar 3590) para los ensayos de P⁴⁵⁰ (monooxigenasas) y esterasas generales. Se realizaron los mismos procedimientos, pero con 10 µl para los ensayos de GSTs, esterasas pNPA y proteínas. En los controles se agregaron la misma cantidad de agua en lugar de muestra a los últimos dos pozos de la placa. Las placas con los homogeneizados se procesaron sobre hielo durante todo el análisis enzimático.

Cada uno de los ensayos enzimáticos se leyeron en un lector de placas (Thermo Scientific MultiskanTM FC) a determinada longitud de onda para cada ensayo bioquímico. Con las absorbancias obtenidas se determinaron las concentraciones para cada una de ellas en el programa Excel. Se realizaron análisis de normalidad y homocedasticidad con pruebas de Shapiro-Wilk y Levene ($\alpha= 0.05$). La actividad media o contenido enzimático de *Ae. aegypti* de cada sitio se compararon con la cepa New Orleans y se utilizaron las pruebas de Anova, Kruskal-Wallis y Dunnet, con una significancia del 95%. La correlación entre las actividades enzimáticas y los índices de resistencia (RR) reportados en 2018 (Solis-Santoyo et al 2021) se probaron mediante una prueba de Spearman y se analizaron con el software SPSS Statistics 26.

7.5.1 Acetilcolinesterasa (AChE)

La cinética de la reacción enzimática se monitoreo continuamente a una longitud de onda de 405 nm por 5 min en un lector de placas (Thermo ScientificTM MultiskanTM). Se calcularon los porcentajes de inhibición de la actividad de la AChE por el propoxur y se compararon con los pozos no inhibidos. Aquellos individuos que mostraron una inhibición de la AChE menor al 60% se consideraron resistentes (Weil et al 2004).

7.5.2 Esterasas

La actividad enzimática de α y β esterasas se leyeron a 570 nm en un punto fijo. Las densidades ópticas se compararon con las curvas estándares de concentraciones conocidas de α -naftol y β -naftol, respectivamente. Los resultados se reportaron en nmol de producto formado/min/ mg de proteína. La actividad de *p*NPA por individuo se reportaron como μ mol producto/min/mg de proteína usando un coeficiente de extinción de $(18,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ (Tomoyoshi et al 2011). Se midieron la actividad de las enzimas que utilizan el *p*NPA como sustrato, pero solo mide cuando hay alta actividad enzimática.

7.5.3 Glutathione S-transferasas (GST)

Se midieron la cinética enzimática a 340 nm por 5 min. La actividad de GST por individuo se reportaron como mmol CDNB conjugado/min/mg de proteína, usando el coeficiente de extinción $(9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1})$ de correlación para la longitud del volumen en el pozo (Habig et al 1974). Este ensayo mide la actividad de la enzima utilizando como sustrato GSH (glutathión reducido) y la conjugación del clorodinitrobenzeno.

7.5.4 Citocromos P^{450}

Se titularon las cantidades de citocromo P^{450} de cada mosquito de acuerdo con la técnica modificada por Penilla et al (1998). Las reacciones fueron leídas en punto fijo a 650 nm. La densidad óptica de cada lectura se compararon con la curva estándar de concentraciones conocidas de citocromo P^{450} . Los valores se reportaron como mmol de citocromo P^{450} /mg de proteína.

7.5.5 Proteínas

Se prepararon las soluciones de proteínas (BioRad) en una dilución de 1:4 en agua destilada (Bradford 1976). Se adicionaron 300 μ l de esta solución a los 10 μ l del homogeneizado crudo. Dos blancos se prepararon y fueron colocados por cada placa con 10 μ l de agua destilada y 300 μ l de solución Bio- Rad. Las reacciones se leyeron a 570 nm después de 5 min a temperatura ambiente. Los

valores de proteínas en mg/ml se calcularon para cada mosquito después de haberse correlacionado en una curva estándar de absorbancias de concentraciones conocidas de albúmina sérica de bovino.

7.6 Detección de mutaciones asociadas a resistencia a insecticidas

7.6.1 Extracción de ADN

ADN de los mosquitos se extrajeron aplicando el protocolo de Pat Romans (Black y DuTeau 1997), en el laboratorio de biología molecular del CRISP. Mosquitos individuales se colocaron en 50 µl de buffer de extracción (5M NaCl, sacarosa, Tris, 500 nM EDTA, SDS 10% en agua) dentro de un microtubo estéril de 1.5 ml. Los mosquitos se maceraron usando un pistilo de plástico y después se añadieron 50 µl más del mismo buffer. Se incubaron a 65°C por 30 min e inmediatamente se adicionaron 14 µl de acetato de potasio ($\text{KC}_3\text{H}_3\text{O}_2$) al 8 M a las muestras aun calientes. Los microtubos se agitaron en vortex por 10 s y se incubaron nuevamente por 30 min en hielo. Al finalizar la incubación en frio se centrifugaron por 15 min a 14000 rpm, los sobrenadantes se transfirieron a microtubos estériles.

Al sobrenadante se le agregaron 100 µl de alcohol al 100%, se agitaron suavemente y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron nuevamente durante 15 min a 14000 rpm. Los sobrenadantes se desecharon y las pastillas de ADN se lavaron con alcohol al 70%, se centrifugaron por 5 min a la misma velocidad. Se realizaron un último lavado a cada muestra con alcohol al 100% por 5 min de centrifugado. Finalmente, los sobrenadantes se desecharon y las pastillas se dejaron a temperatura ambiente hasta que el alcohol se evaporara. Finalmente, las pastillas de ADN se resuspendieron con 100 µl de buffer TE (Tris-EDTA), se mezclaron en vortex por 5 s y se almacenaron a 4°C para su posterior análisis molecular de genotipificación.

7.6.2 Amplificación de los alelos del canal de sodio

Las mutaciones se determinaron mediante la técnica de PCR-Tiempo Real (qPCR siglas en inglés) para cada uno de los alelos, mediante una curva de desnaturalización o disociación (Melting Curve). Los ensayos se realizaron en el laboratorio de biología molecular del CRISP. El reactivo usado para este procedimiento fue iQSyber mix (Biorad) y la qPCR se realizaron en el equipo CFX96 Biorad. Esta técnica se basa en la identificación del cambio de aminoácido mutante en el codón 1016 del gen del canal de sodio. Basadas en la transición A/G en la primera posición de 1016 codifica una sustitución a isoleucina (Iso 1016) para el caso de Val1016Ile (Saavedra-Rodriguez et al 2007). Mientras que, para la mutación Phe1534Cys, es de una fenilalanina a cisteína en la posición 1534 del dominio IIIS6 del canal de sodio (Yanola et al 2011).

Cuadro 5. Cantidades de los reactivos utilizados para preparación de la mezcla maestra en la reacción de PCR.

Val1016Ile			Phe1534Cys		
Reactivos	1 rx (µl)	96 rx (µl)	Reactivos	1 rx (µl)	96 rx (µl)
Agua _{dd}	9.88	949	Agua _{dd}	9.53	915
iQSyber mix	10.00	960.0	iQSyber mix	10.0	960
Val1016f	0.04	3.8	Cys1534+	0.66	6.4
Ile1016f	0.04	3.8	Phe1534+	0.20	19.3
Ile1016r	0.04	3.8	1534-	0.20	19.3
Volumen total (µl)	20	1920	Volumen total (µl)	20	1920

*Concentración primer 50 pmol /µl

Cuadro 6. Secuencias de primers.

Primer	Secuencia
Val₁₀₁₆f	GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCACAAATTGTTTCCACCCGCACCG
Ile₁₀₁₆f	GCGGGCACAAATTGTTTCCACCCGCACTGA
Ile₁₀₁₆r	TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC
Cys1534+	GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATGTG
Phe1534+	GCGGGCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATATT
1534-	TCTGCTCGTTGAAGTTGTTCGAT

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 20 µl (Cuadro 5 y 6), con una micropipeta se tomaron de la mezcla maestra, alícuotas de 19.5 µl para cada pozo de una microplaca de 96 pozos. A cada pozo se adicionaron 0.5 µl de ADN. En la misma placa, se colocaron muestras de ADN controles: homocigoto susceptible y homocigoto resistente (donados por Colorado State University, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences), además de un pozo sin ADN como control negativo.

Las condiciones de termociclado para el alelo Val1016Ile fueron:

- (1) 95 °C por 3 min (desnaturalización)
 - (2) 95°C por 10 s (ciclos de desnaturalización)
 - (3) 60°C por 10 s (alineación)
 - (4) 72°C por 30 s (extensión)
 - (6) 95 °C por 10 s (extensión final)
 - (7) rampa de 65°C a 95°C, incremento de 0.2°C por s (curva de fusión).
- } 39 ciclos

La estimación de las frecuencias alélicas se realizaron con la ecuación de Hardy Weinberg.

Las condiciones de termociclado para el alelo Phe1534Cys:

- (1) 95 °C por 3 min (desnaturalización)
 - (2) 95°C por 10 s (ciclos de desnaturalización)
 - (3) 57°C por 10 s (alineación)
 - (4) 72°C por 30 s (extensión)
 - (6) 95 °C por 10 s (extensión final)
 - (7) rampa de 65°C a 95°C incremento de 0.5°C por 5 s (curva de fusión).
- } 39 ciclos

Lectura de resultados:

Se registraron los alelos obtenidos de las curvas melting para cada muestra bajo los siguientes criterios:

7.6.2.1 Alelo Val1016Ile (Gráfico 1).

El pico de la curva con una temperatura de 79°C de disociación correspondieron al producto amplificado con el primer (oligo) corto, que es específico para el alelo A (triplete ATA para la Isoleucina o alelo tipo mutante, resistente)

El pico de la curva con una temperatura de 85°C correspondió al producto amplificado con el primer (oligo) largo, el cual es específico para el alelo G (triplete GTA para Valina o alelo tipo susceptible).

En nuestras muestras tres genotipos fueron posibles:

Figura 6a). AA, un solo pico a 79°C que correspondió a homocigoto resistente para Ile1016.

Figura 6b). GG, un solo pico a 85°C que correspondió a homocigoto susceptible para Ile1016.

Figura 6c). AG, ambos picos presentes (79°C y 85°C) correspondió a heterocigoto.

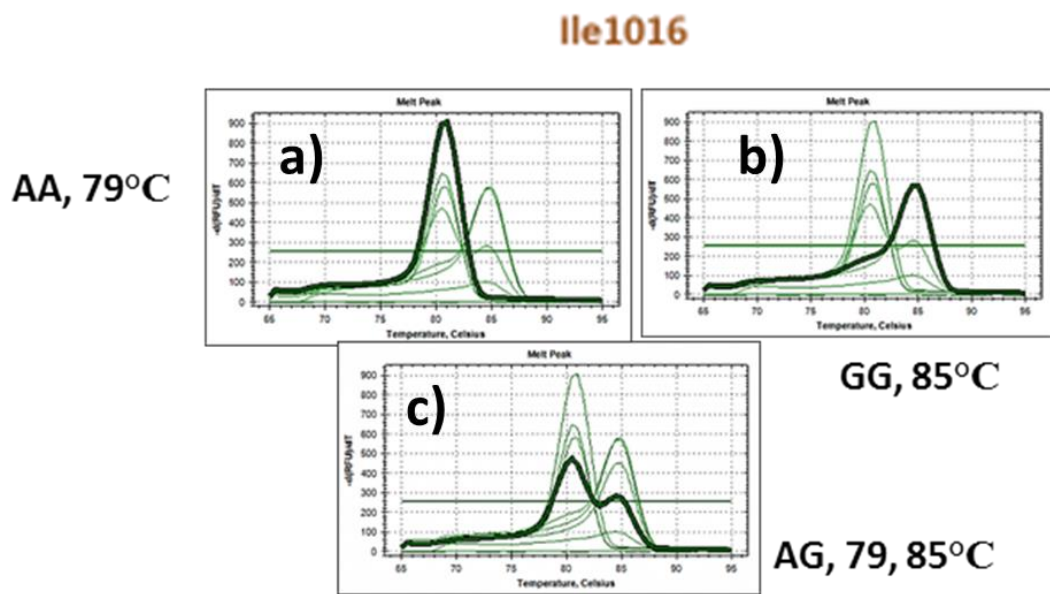


Figura 6. Curvas de fusión de la mutación Val1016Ile.

7.6.2.2 Phe1534Cys (Gráfico 2)

El pico de la curva con una temperatura de 80°C de disociación correspondió al producto amplificado con el primer (oligo) corto, que es específico para el alelo T (triplete TTC para la Fenilalanina o alelo tipo susceptible).

El pico de la curva con una temperatura 85°C correspondió al producto amplificado con el primer (oligo) largo, el cual es específico para el alelo G (triplete TGC para Cisteína o alelo tipo resistente).

En nuestras muestras tres genotipos fueron posibles:

Figura 7a). TT, un solo pico a 80°C que correspondió a homocigoto susceptible para Phe1534.

Figura 7b). GG, un solo pico a 85°C que correspondió a homocigoto resistente para Cys1534,

Figura 7c). TG, ambos picos presentes (80°C y 85°C) correspondió a heterocigoto.

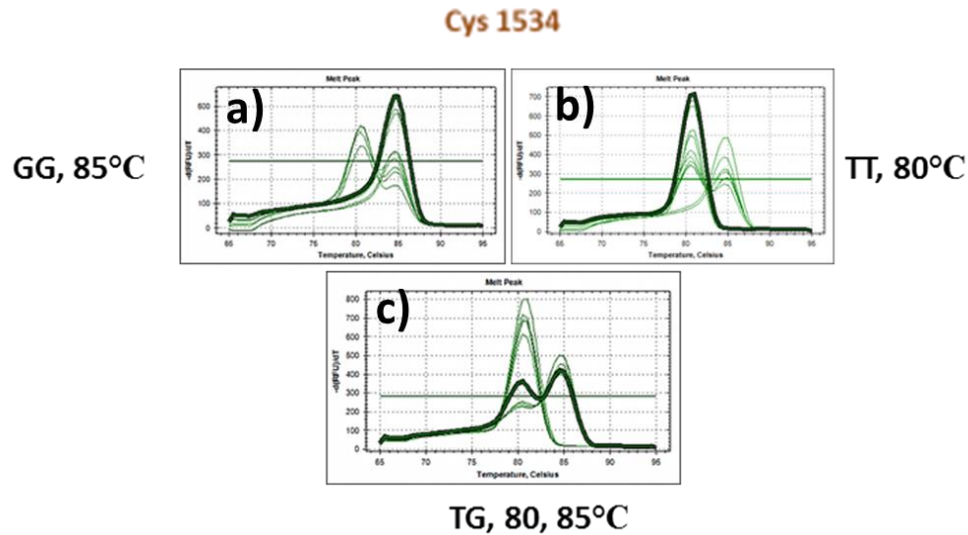


Gráfico 7. Curvas de fusión de la mutación Phe1534Cys.

7.6.2.3 Ecuación Hardy-Weinberg

Se calcularon las frecuencias del alelo mutante para cada población. Asimismo, se incluyeron el genotipo de cada mosquito y se contabilizaron el número de individuos con cada genotipo. Y la frecuencia total de los alelos se calcularon por medio de la siguiente fórmula:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Dónde:

p= Número de homocigotos GG

q= Número de homocigotos TT

pq= Número de heterocigotos TG

Para calcular la frecuencia del alelo:

$$\text{Frecuencia alelo homocigoto} = \frac{1 \times (\# \text{ heterocigotos TG}) + 2 \times (\# \text{ homocigotos GG})}{2 \times (\# \text{ total de mosquitos analizados})}$$

Las frecuencias más cercanas a 1 tienen mayores frecuencias del alelo resistente. El genotipo y las frecuencias alélicas se probaron para el equilibrio de Hardy-Weinberg (HW). La hipótesis nula es que existe equilibrio en la población, lo cual se verificaron con una prueba de Chi- cuadrado ($gl=1$ y valor de $p > 0.05$).

9. LITERATURA CITADA

- Albert AL. 1990. Los plaguicidas, el ambiente y la salud, 1ra. Edición. Editorial Centro de Ecodesarrollo. México. Pp 95-175.
- Aponte HA, Penilla RP, Dzúl-Manzanilla F, Che-Mendoza A, López AD, Solís F, Rodríguez AD. 2013. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107(2), 226–234. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.07.005>
- Apperson CS, Georgiou GP. 1975. Changes in cross-resistance spectrum resulting from methyl parathion selection of *Culex tarsalis* Coq. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 24(4), 698–703. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1975.24.698>
- Arredondo-García JL, Méndez-Herrera A, Medina-Cortina H. 2016. Arbovirus en Latinoamérica. *Acta pediátrica de México*, 37(2), 111-131. Recuperado en 17 de febrero de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912016000200111&lng=es&tlng=es.
- Ayad H, Georgiou GP. 1975. Based on Reduced Sensitivity of Acetylcholinesterase. *Journal of Economic Entomology*. 295–297.
- Bang YH. 1985. Implications in the control of malaria vectors with insecticides in tropical countries of South East Asia. Part. I. Insecticide resistance. *The Journal of Communicable Diseases*, 17(3), 199–218.
- Beaty BJ, Marquardt WC. 1996. *The biology of disease vectors*. Niwot, Colo: University Press of Colorado.
- Benítez A, Bolis M, Capote R, Castillo C, Lop F, Nathan M, Nelson M, Ocegüera R, Pincheiro F, Saenz R, et al. 1995. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para la prevención y control. Organización Panamericana de la Salud. Publicación científica n 548.
- Bisset JA. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54(3), 202-219. Recuperado en 29 de mayo de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602002000300005&lng=es&tlng=es.

- Bisset JA, Rodríguez MM, San Martín JL, Romero JE, Montoya R. 2009. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2009; 26:229–234.
- Black WC, DuTeau NM. 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies, pp. 361–373 in *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual*, edited by J. Crampton, C. B. Beard, and C. Louis. Chapman & Hall, New York.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-54. Chambers, Janice & Meek, Edward & Chambers.
- Brogdon WG, Chan A. 2012. Guideline for evaluating insecticide resistance in vectors using the CDC bottle bioassay. Atlanta: Division of Parasitic Diseases and Malaria, Center for Disease Control and Prevention. Disponible en: https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/ir_manual/ir_cdc_bioassay_en.pdf
- Brogdon WG, McAllister, JC, Corwin AM, Cordon-Rosales C. 1999. Independent Selection of Multiple Mechanisms for Pyrethroid Resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae), *Journal of Economic Entomology*, Volume 92, Issue 2, 1 April 1999, Pages 298–302, <https://doi.org/10.1093/jee/92.2.298>
- Brogdon WG, McAllister JC, Vulule J. 1997. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *Journal American Mosquitos Control Association*. 1997 Sep;13(3):233–237.
- Brown AW, Aldridge Pal. 1971. Insecticide resistance in arthropods / A. W. A. Brown, R. Pal, 2nd ed. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41685>
- Casida JE, Quistad GB. 1998. Golden age of insecticide research: Past, Present, or Future? *Annual Review of Entomology*, 43(1), 1–16. <http://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.1>

- Catterall WA. 2001. Physiology. A one-domain voltage-gated sodium channel in bacteria. *Science* (New York, N.Y.), 294(5550), 2306–2308. <https://doi.org/10.1126/science.1067417>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2022. Virus Zika. <https://www.cdc.gov/zika/es/index.html>. [consultado 01-junio-2022].
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE) 2014. Guía de acciones municipales para la prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. http://www.cenaprese.salud.gob.mx/programas/interior/portada_vectores.html [consultado 23-marzo-2022].
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). 2016. Monitoreo de Resistencia a Insecticidas (Adulticidas) utilizados en el Programa de Nacional Control de Vectores de México. Benjamín Franklin 132, Col. Escandón 2da. Sec.11800, Ciudad de México. <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/MonitoreoResistenciaInsecticidas2014.pdf>. [consultado 14-enero-2022].
- Chareonviriyaphap T, Bangs MJ, Suwonkerd W. 2013. Revisión de la resistencia a los insecticidas y el comportamiento de evitación de vectores de enfermedades humanas en Tailandia. *Vectores de Parásitos* 6, 280 (2013). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-280>
- Cossy IS. 2018. Interacción in sílico de deltametrina con la región (NO kdr) KPQ que inactiva el Canal de Sodio Voltaje Dependiente 5a humano. *Revista De La Facultad De Ciencias Médicas De Córdoba*, 13–14. <https://doi.org/10.31053/1853.0605.v0.n0.21105>.
- Cremlyn R. 1986. Plaguicidas Modernos y sus acciones bioquímicas. 2da. Edición. Editorial Limusa, S.A de C.V. México, D.F. Pp 99-141.
- Díaz-González EE, Kautz TF, Dorantes-Delgado A, Malo-García IR, Laguna-Aguilar M, Langsjoen RM, Fernández-Salas I. 2015. First report of *Aedes aegypti* transmission of chikungunya virus in the Americas. *American Journal*

- of Tropical Medicine and Hygiene, 93(6), 1325–1329.
<http://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0450>
- Díaz-Quiñonez JA, López-Martínez I, Torres-Longoria B, Vázquez-Pichardo M, Cruz-Ramírez E, Ramírez-González JE, Ruiz-Matus C, Kuri-Morales P. 2016. Evidence of the presence of the Zika virus in Mexico since early 2015. *Virus Genes*. Dec;52(6):855-857. doi: 10.1007/s11262-016-1384-0. Epub 2016 Aug 24. PMID: 27557815.
- Du Y, Nomura Y, Zhorov BS, Dong K. 2016. Evidence for Dual Binding Sites for 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT) in Insect Sodium Channels. *Journal of Biological Chemistry*. Feb 26;291(9):4638-48. doi: 10.1074/jbc.M115.678672. Epub 2015 Dec 4. PMID: 26637352; PMCID: PMC4813487.
- Eiman M, Introini M, Ripoll C, Almiron C, De Melo C, Gorla D, Gurtler R, Oliveira G, Micieli V, Schweigmann N, et al. 2008. Directrices para la prevención y control de *Aedes aegypti*. Ministerio de Salud. /-15 p.
- Fernández-Bravo S, Bertomeu-Sánchez J, Schifter-Aceves L. 2020. Adopción y producción estatal de DDT en México (1940-1980). *Estudios de Historia Moderna y Contemporánea de México*, n. 60: 257-292. e-issn 2448-5004, doi: 10.22201/iih.24485004e.2020.60.70144
- Fernández-Salas I. 2009. *Biología y control de Aedes aegypti*. Segunda edición. Tendencias científicas. Manual de operaciones Universidad Autónoma de Nuevo León. ISBN 978 607 320 6 124p.
- Ffrench-Constant RH, Mortlock DP, Shaffer CD, MacIntyre RJ, Roush RT. 1991. Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: an invertebrate gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), 7209–7213. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7209>
- Flores AE, Albeldano-Vazquez W, Fernandez-Salas I, Badii MH, Loaiza Becerra H, Ponce Garcia G, Beaty B. 2005. Elevated alpha-esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.

- Flores AE, Grajales JS, Fernandez-Salas I, Garcia GP, Becerra MH, Lozano S, Beaty B. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. Journal American Mosquitos Control Association. 22(4), 672–677. [http://doi.org/10.2987/8756-971x\(2006\)22\[672:moirif\]2.0.co;2](http://doi.org/10.2987/8756-971x(2006)22[672:moirif]2.0.co;2)
- Flores-Suarez AE, Ponce-Garcia G, Lopez-Monroy B, Villanueva-Segura OK, Rodríguez-Sánchez IP, Arredondo-Jiménez JI, et al. 2016. Current status of the insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico. In: Trdan Stanislav, editor. Insecticides Resistance. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/61526>
- Georghiou G. P. 1965. Genetic studies on insecticide resistance. Advances in pest control research, 6, 171–230. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5320974/>
- Georghiou GP. 1994. Principles of insecticide resistance management. Phytoprotection, 75(4), 51. <http://doi.org/10.7202/706071ar>
- Gholizadeh S, Karimi A, Bayat N. 2010. Characterization and comparative sequence analyzes of GABA receptor gene in Asian main malaria mosquito, *Anopheles stephensi*. Malaria Journal 9, O15 (2010). <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-S2-O15>
- Gillett JD, Roman EA, Phillips V. 1977. Erratic hatching in *Aedes* eggs: A new interpretation. Proceedings of the Royal Society of London. B.196223–232 <http://doi.org/10.1098/rspb.1977.0038>
- Guerbois M, Fernandez-Salas I, Azar SR, Danis-Lozano R, Alpuche-Aranda CM, Leal G, Garcia-Malo IR, Diaz-Gonzalez EE, Casas-Martinez M, Rossi SL, et al. 2016. Outbreak of Zika Virus Infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and First Confirmed Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes in the Americas. The Journal of Infectious Diseases, 214(9), 1349–1356. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw302>
- Guzman M, Halstead S, Artsob H. 2010. Dengue: a continuing global threat. Nature Reviews Microbiology. 8, S7–S16 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2460>

- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal Biological Chemistry*. 1974-249(22):7130-9. Available from: <http://www.jbc.org/content/249/22/7130.long>
- Harris AF, Rajatileka S, Ranson H. 2010. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010 Aug; 83(2):277-84. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0623. PMID: 20682868; PMCID: PMC2911171.
- Hemingway J, Boddington RG, Harris J, Dunbar S. 1989. Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) from Puerto Rico. *Bulletin of Entomological Research*. 79: 123-130. doi: 10.1017/S0007485300018630
- Hemingway J, Callaghan A, Amin AM. 1990. Mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* from Saudi Arabia. *Medical and Veterinary Entomology*, 4(3), 275–282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1990.tb00440.x>
- Hemingway J, Ranson H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45, 371–391.
- Hemingway J, Rowland M, Kissoon KE. 1984. Efficacy of pirimiphos methyl as a larvicide or adulticide against insecticide resistant and susceptible mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology*, 77(4), 868–871. <https://doi.org/10.1093/jee/77.4.868>
- Hemingway J, Karunaratne SH. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and Veterinary Entomology*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00082.x>
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JM, Wides R, et al. 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5591), 129–149. <https://doi.org/10.1126/science.1076181>

- Instituto nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2021. Censo de Población y Vivienda 2020. <https://www.inegi.org.mx/programas/ccpv/2020/#Microdatos>. [consultado 18-junio-2022].
- Jean-Philippe D, Hafany-Mahmoud I, Chandor-Proust A, Paine MJ. 2013. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 368(1612), 20120429. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0429>
- Jeffery JA, Clements AC, Nguyen YT, Nguyen LH, Tran SH, Le NT. 2012. Water Level Flux in Household Containers in Vietnam - A Key Determinant of *Aedes aegypti* Population Dynamics. *PLoS ONE* 7(7): e39067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039067>
- Kantor IN. 2018. Dengue, zika, chikungunya y el desarrollo de vacunas. *Medicina (Buenos Aires)*, 78(1), 23-28. Recuperado en 10 de junio de 2022, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802018000100005&lng=es&tlng=es
- Lagunes-Tejeda A, Villanueva-Jiménez JA. 1994. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados. México. 264 pp
- López-Carrillo L. 1993. Exposición a plaguicidas organofosforados. *Perspectivas en Salud Pública* N.º18. México: Instituto Nacional de Salud Pública. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-167674>
- López-Solís A, Castillo-Vera A, Cisneros J, Solís-Santoyo F, Penilla-Navarro R, Black IV W, Torres-Estrada JL, Rodríguez AD. 2020. Resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) de Tapachula, Chiapas, México *Salud Pública de México*, 2020; 62, 439-446. doi:<http://dx.doi.org/10.21149/10131>
- Lozano-Fuentes S, Saavedra-Rodríguez K, Black WIV, Eisen L. 2012. QCAL: a software application for the calculation of dose-response curves in insecticide resistance bioassays. *Journal American Mosquito Control Association*. 2012;28: 59–61. Available from: at:

- <https://www.researchgate.net/publication/224845565>. [consultado 20-abril-2020].
- Lumjuan N, Rajatileka S, Changsom D, Wichee, J, Leelapat P, Prapanthadara L, Ranson H. 2011. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(3), 203–209. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.12.005>.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology*. 1998 May;7(2):179-84. doi: 10.1046/j.1365-2583.1998.72062.x. PMID: 9535162.
- Miyazaki M, Ohyama K, Dunlap DY, Matsumura F. 1996. Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Molecular and General Genetics: MGG*, 252(1-2), 61–68.
- Montella IR, Schama R, Valle D. 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance--a review. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*. 2012 Jun;107(4):437-49. doi: 10.1590/s0074-02762012000400001. PMID: 22666852.
- Narro-Robles J, Gómez-Dantés H. 1995. El dengue en México: un problema prioritario de salud pública. *Salud Pública de México [en línea]*. 1995, 37(Su1), 12-20. ISSN: 0036-3634. <https://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=10609203>. [consultado 07-enero-2022].
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi Z, Megy K, Grabherr M, et al. 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5832), 1718–1723. <https://doi.org/10.1126/science.1138878>

Norma Oficial Mexicana NOM-EM-003-SSA2-2008. 2008. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector.

http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5062108&fecha=30/09/2008#gsc.tab=0. [Consultado 03-diciembre-2021].

Organización Mundial de la Salud (OMS). 1986. Resistencia de los vectores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas: décimo informe del Comité de Expertos de la OMS en Biología y Lucha Antivectorial [se reunió en Ginebra del 5 al 11 de noviembre de 1985]. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37395>. [consultado 04 junio-2022].

Organización Mundial de la Salud (OMS). 1992. Resistencia de los vectores de enfermedades a los plaguicidas: 15 informe del Comité de Expertos de la OMS en Biología de los Vectores y Lucha Antivectorial [se reunió en Ginebra del 5 al 12 de marzo de 1991]. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41768>. [consultado 02 junio-2022].

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2017. Dengue y dengue grave. Datos y cifras. Centro de prensa. <https://apps.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html>. [consultado 16 junio-2022].

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2018. Enfermedad por el virus de Zika. Datos y cifras. <https://apps.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html>. [consultado 05 junio-2022].

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2020. Chikungunya. Datos y cifras. Centro de prensa. <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/chikungunya>. [consultado 06 junio-2022].

Organización Panamericana de la Salud (OPS) / Organización Mundial de la Salud (OMS). 2021. Actualización Epidemiológica Dengue, chikunguña y Zika en el

- contexto de COVID-19: 23 de diciembre de 2021. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/55639/EpiUpdate23Dec2021_spa.pdf?sequence=2&isAllowed=y. [consultado 16-marzo-2022].
- Pan American Health Organization_/World Health Organization (PAHO/OMS). Preparedness and Response for Introduction in the Americas Chikungunya Virus. Washington, D.C. PAHO, © 2011. ISBN: 978-92-75-11632-6. <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/4009/chikungunyavirus.pdf?sequence=1>. [consultado 12-marzo-2022].
- Pasteur N, Raymond M. 1996. Insecticide Resistance Genes in Mosquitoes: Their Mutations, Migration, and Selection in Field Populations, *Journal of Heredity*, Volume 87, Issue 6, November/December 1996, Pages 444–449, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a023035>
- Penilla RP, Rodriguez AD, Hemingway J, Torres JL, Arredondo-Jimenez JI, Rodriguez MH. 1998. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in Mexico. *Medical Veterinary Entomology*. 1998.12, 217–233. [PubMed: 9737593]
- Penilla RP, Rodriguez AD, Hemingway J, Trejo A, López AD. 2003. Changes in Glutathione S- transferase levels in Mexican populations of *Anopheles albimanus* different insecticide selection pressures in the field. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86(2):63-71. DOI:10.1016/j.pestbp.2006.01.006
- Pehkonen, S, Zhang Qi. 2002. The Degradation of Organophosphorus Pesticides in Natural Waters: A Critical Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 32(1), 17–72. doi:10.1080/10643380290813444
- Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M. 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infectious Diseases*. 2007 May;7(5):319-27. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70107-X. PMID: 17448935.
- Pilger D, Lenhart A, Manrique-Saide P, Siqueira JB, da Rocha WT, Kroeger A. 2011. Is routine dengue vector surveillance in central Brazil able to accurately monitor the *Aedes aegypti* population? Results from a pupal productivity

- survey. Tropical Medicine International Health. 2011 Sep;16(9):1143-50. doi: 10.1111/j.1365-3156.2011.02818.x. Epub 2011 Jun 27. PMID: 21702871
- Prapanthadara L, Hemingway J, Ketterman AJ. 1993. Partial Purification and Characterization of Glutathione S-Transferases Involved in DDT Resistance from the Mosquito *Anopheles gambiae*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 47, 119-133.
- Prapanthadara L, Hemingway J, Ketterman AJ. 1995. DDT-resistance in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) from Zanzibar, Tanzania, based on increased DDT-dehydrochlorinase activity of glutathione S-transferases. Bulletin of Entomological Research, 85(2), 267-274. doi:10.1017/S0007485300034350
- Ranson H, Rossiter L, Ortellì F, Jensen B, Wang X, Roth CW, Collins FH, Hemingway J. 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. The Biochemical Journal, 359(Pt 2), 295–304. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3590295>
- Raymond M, Fournier D, Bride JM, Cuany A, Berge, J, Magnin M, Pasteur N. 1986. Identification of resistance mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from southern France: insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. Journal of Economic Entomology, 79(6), 1452–1458. <https://doi.org/10.1093/jee/79.6.1452>
- Rivera-Ávila RC. 2014. Fiebre chikungunya en México: caso confirmado y apuntes para la respuesta epidemiológica. Salud Publica Mex [Internet]. 11 de julio de 2014 [citado 3 de abril de 2022];56(4):402-4. Disponible en: <https://www.saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/7361>
- Rodriguez AD. 2000. Large Scale field evaluation of rotations and mosaic spraying as resistance management strategies in the coastal plain of Chiapas, México. Ph. D. Thesis, University of Wales. Pp.27-33.
- Rodríguez-Cruz R. 2002. Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. Revista Cubana de Medicina Tropical, 54(3), 189–201. Retrieved from

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602002000300004&lng=es&nrm=iso&tlng=es%5Cnhttp://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602002000300004&script=sci_arttext

- Rodríguez-Dorantes M, Téllez-Ascencio N, Cerbón MA., López M, Cervantes AI. 2004. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Revista de Investigación Clínica*, 56(1), 56-71. Recuperado en de junio de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762004000100010&lng=es&tlng=es
- Rueda L. 2004. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. *Zootaxa*; 2004- 589: 1-60. ISBN 1-877354-46-5. New Zealand. <http://www.mapress.com/zootaxa/>
- Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, Black WC. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 16(6), 785–798. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00774.x>
- Schoof H, Taylor RT. 1972. Recent advances in insecticides for malaria programs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 21(5), 807–812. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1972.21.807>
- Scott JA. 1995. The Molecular Genetics of Resistance: Resistance as a Response to Stress. *The Florida Entomologist*, 78(3), 399–414. <https://doi.org/10.2307/3495526>
- Scott JG. 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect biochemistry and molecular biology*, 29(9), 757–777. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(99\)00038-7](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(99)00038-7).
- Secretaria de Salud (SSA). 2008. Manual para la prevención y control del dengue México. http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/SSA_151_08_EyR_Dengue_170310.pdf. [consultado 05-marzo-2022].

- Secretaria de Salud (SSA). 2015. Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Infección por el Virus Chikungunya. Instituto Mexicano del Seguro Social. http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/ChikungunyaCENETEC_GER.pdf. [consultado 16-marzo-2022].
- Secretaria de Salud (SSA). 2022. Casos confirmados Autóctonos de Fiebre Chikungunya por Entidad Federativa SEMANA EPIDEMIOLOGICA 52, 2021. Dirección General de Epidemiología. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/691601/CuadroCasosyDefC_hik_SE52_2021.pdf. [consultado 01 junio-2022].
- Secretaria de Salud (SSA). 2022. Panorama epidemiológico de dengue. Semana epidemiológica 1 de 2022. Dirección General de Epidemiología. <https://www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-de-dengue-2021>. [Consultado 01/04/22].
- Service MW. 2012. Medical Entomology for Students. 5th Edition, Liverpool, United Kingdom: Cambridge. Doi: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511811012>
- Silver KS, Du Y, Nomura Y, Oliveira EE, Salgado VL, Zhorov BS, Dong K. 2014. Voltage-Gated Sodium Channels as Insecticide Targets. *Advances in Insect Physiology*. 2014;46:389-433. doi: 10.1016/B978-0-12-417010-0.00005-7. PMID: 29928068; PMCID: PMC6005695.
- Stenhouse SA, Plernsub S, Yanola J, Lumjuan N, Dantrakool A, Choochote W, Somboon P. 2013. Detection of the V1016G mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by allele-specific PCR assay, and its distribution and effect on deltamethrin resistance in Thailand. *Parasites and Vectors*, 6(1), 253. <http://doi.org/10.1186/1756-3305-6-253>
- Solis-Santoyo F, Rodriguez AD, Penilla-Navarro RP, Sanchez D, Castillo-Vera A, Lopez-Solis AD, Vazquez-Lopez ED, Lozano S, Black WC, Saavedra-Rodriguez K. et al. 2021. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* from Tapachula, Mexico: Spatial variation and response to historical insecticide use. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 15(9): e0009746. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009746>

- Terriere CL. 1984. Induction of detoxication enzymes in insects. Annual Review of Entomology, 29:71-8.
- Tomoyoshi F, Haruo S, Hideki K, Sappasith K, Sitthipong N, Soottawat B, Byung-SC. 2011. "Simple preparation of pacific cod trypsin for enzymatic peptide synthesis", Journal of Amino Acids, vol. 2011, Article ID 912382, 8 pages <https://doi.org/10.4061/2011/912382>.
- Vázquez-Pichardo M, Rosales-Jiménez C, Núñez-León A, Rivera-Osorio P, Cruz-Hernández S, Ruiz-López A, González-Mateos S, López-Martínez I, Rodríguez-Martínez JC, López-Gatell H, et al. 2011. Serotipos de dengue en México durante 2009 y 2010. Boletín Médico del Hospital Infantil de México, 68(2), 103-110. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462011000200005&lng=es&tlng=es. [consultado 05-febrero-2022].
- Vijverberg HP, Van den BJ. 1990. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. Critical Reviews in Toxicology. 1990;21(2):105-26. doi: 10.3109/10408449009089875. PMID: 1964560. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1964560/>
- Vontas JG, Small GJ, Hemingway J. 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. The Biochemical Journal, 357(Pt 1), 65–72. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570065>
- Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, Roberts JM, Mount DL, Mwangi RW. 1994. Reduced susceptibility of *Anopheles gambiae* to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya. Medical Veterinary Entomology. 1994 Jan;8(1):71–75.
- Ware GW. 1999. An introduction to insecticide. 3rd. edition. Department of Entomology University of Arizona. Tucson, Arizona. Pp 1-15. <http://www.bionica.info/biblioteca/Ware2002IntroductionInsecticides.pdf>. [consultado 02 junio-2022].

- Ware GW, Whitacre D. 2004. An Introduction to Insecticides. The Pesticide Book. Meister Publications. Willoughby, Ohio. <https://ipmworld.umn.edu/ware-intro-insecticides>. [consultado 05 junio-2022].
- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M. 2004. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00452.x>
- Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA. 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Molecular and General Genetics*.
- Wood, OR, Hanrahan S, Coetzee, M. 2010. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites Vectors* 3, 67 (2010). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-67>
- Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Somwang P, Prapanthadara L. 2011. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, 16(4), 501–509. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02725.x>
- Zerba E. 1988. Insecticidal activity of pyrethroids on insects of medical importance. *Parasitology Today* (Personal ed.), 4(7), S3–S7. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(88\)90079-8](https://doi.org/10.1016/0169-4758(88)90079-8).
- Zettel C, Kaufman P. 2008. Yellow fever mosquito. *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Insecta: Diptera: Culicidae). Universidad de Florida. Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. EENY- 434. 1-8p. <http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/214/193>.

CAPÍTULO II - Insecticide resistance in *Aedes aegypti* from Tapachula, Mexico: Spatial variation and response to historical insecticide use
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8475978/pdf/pntd.0009746.pdf>

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

RESEARCH ARTICLE

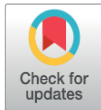
Insecticide resistance in *Aedes aegypti* from Tapachula, Mexico: Spatial variation and response to historical insecticide use

Francisco Solis-Santoyo¹, Americo D. Rodriguez^{1†}, R. Patricia Penilla-Navarro^{1*}, Daniel Sanchez², Alfredo Castillo-Vera², Alma D. Lopez-Solis³, Eduardo D. Vazquez-Lopez³, Saul Lozano⁴, William C. Black, IV⁵, Karla Saavedra-Rodriguez⁵

1 Instituto Nacional de Salud Pública, Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Tapachula, Chiapas, México, 2 El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula, Tapachula, Chiapas, México, 3 Jurisdicción Sanitaria VII, Tapachula Chiapas, Antiguo Hospital General de Tapachula, Tapachula, Chiapas, México, 4 Centers for Diseases Prevention and Control, Arboviral Diseases Branch, Fort Collins, Colorado, United States of America, 5 Colorado State University, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Arthropod Borne and Infectious Diseases Laboratory, Fort Collins, Colorado, United States of America

† Deceased.

* penilla@insp.mx



OPEN ACCESS

Citation: Solis-Santoyo F, Rodriguez AD, Penilla-Navarro RP, Sanchez D, Castillo-Vera A, Lopez-Solis AD, et al. (2021) Insecticide resistance in *Aedes aegypti* from Tapachula, Mexico: Spatial variation and response to historical insecticide use. PLoS Negl Trop Dis 15(9): e0009746. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009746>

Editor: Pattamaporn Kittayapong, Faculty of Science, Mahidol University, THAILAND

Received: December 29, 2020

Accepted: August 19, 2021

Published: September 27, 2021

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009746>

Copyright: This is an open access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the [Creative Commons CC0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) public domain dedication.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Abstract

Background

Insecticide use continues as the main strategy to control *Aedes aegypti*, the vector of dengue, Zika, chikungunya, and yellow fever. In the city of Tapachula, Mexico, mosquito control programs switched from pyrethroids to organophosphates for outdoor spatial spraying in 2013. Additionally, the spraying scheme switched from total coverage to focused control, prioritizing areas with higher entomological-virological risk. Five years after this strategy had been implemented, we evaluated the status and variability of insecticide resistance among *Ae. aegypti* collected at 26 sites in Tapachula.

Methodology/Principal findings

We determined the lethal concentrations at 50% of the tested populations (LC₅₀) using a bottle bioassay, and then, we calculated the resistance ratio (RR) relative to the susceptible New Orleans strain. Permethrin and deltamethrin (pyrethroids), chlorpyrifos and malathion (organophosphates), and bendiocarb (carbamate) were tested. The frequencies of the substitutions V1016I and F1534C, which are in the voltage-gated sodium channel and confer knockdown-resistance (*knR*) to pyrethroid insecticides, were calculated. Despite 5 years having passed since the removal of pyrethroids from the control programs, *Ae. aegypti* remained highly resistant to permethrin and deltamethrin (RR > 10-fold). In addition, following 5 years of chlorpyrifos use, mosquitoes at 15 of 26 sites showed moderate resistance to chlorpyrifos (5- to 10-fold), and the mosquitoes from one site were highly resistant. All sites had low resistance to malathion (< 5-fold). Resistance to bendiocarb was low at 19 sites, moderate at five, and high at two. Frequencies of the V1016I ranged from 0.16–0.71, while

**Insecticide resistance in *Aedes aegypti* from Tapachula, Mexico: spatial
variation and response to historical insecticide use**

Francisco Solis-Santoyo¹, Americo D. Rodriguez^{1†}, R. Patricia Penilla-Navarro^{1*},
Daniel Sanchez², Alfredo Castillo-Vera², Alma D. Lopez-Solis¹, Eduardo D.
Vazquez-Lopez³, Saul Lozano⁴, William C. Black IV⁵, and Karla Saavedra-
Rodriguez⁵

¹ Instituto Nacional de Salud Pública, Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Tapachula, Chiapas, México.

² El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula. Tapachula, Chiapas, México.

³ Jurisdicción Sanitaria VII, Tapachula Chiapas. Antiguo Hospital General de Tapachula, Tapachula, Chiapas, México.

⁴ Centers for Diseases Prevention and Control, Arboviral Diseases Branch, Fort Collins, Colorado, U.S.

⁵ Colorado State University, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Arthropod Borne and Infectious Diseases Laboratory, 1692 Campus Delivery, Fort Collins, Colorado, U.S.

† Deceased

* penilla@insp.mx

Abstract

Background. Insecticide use continues as the main strategy to control *Aedes aegypti*, the vector of dengue, Zika, chikungunya, and yellow fever. In the city of Tapachula, Mexico, mosquito control programs switched from pyrethroids to organophosphates for outdoor spatial spraying in 2013. Additionally, the spraying scheme switched from total coverage to focused control, prioritizing areas with higher entomological-virological risk. Five years after this strategy had been implemented, we evaluated the status and variability of insecticide resistance among *Ae. aegypti* collected at 26 sites in Tapachula.

Methodology/Principal findings. We determined the lethal concentrations at 50% of the tested populations (LC_{50}) using a bottle bioassay, and then, we calculated the resistance ratio (RR) relative to the susceptible New Orleans strain. Permethrin and deltamethrin (pyrethroids), chlorpyrifos and malathion (organophosphates), and bendiocarb (carbamate) were tested. The frequencies of the substitutions V1016I and F1534C, which are in the voltage-gated sodium channel and confer knockdown-resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides, were calculated. Despite 5 years having passed since the removal of pyrethroids from the control programs, *Ae. aegypti* remained highly resistant to permethrin and deltamethrin ($RR > 10$ -fold). In addition, following 5 years of chlorpyrifos use, mosquitoes at 15 of 26 sites showed moderate resistance to chlorpyrifos (5- to 10-fold), and the mosquitoes from one site were highly resistant. All sites had low resistance to malathion (< 5 -fold). Resistance to bendiocarb was low at 19 sites, moderate at five, and high at two. Frequencies of the V1016I ranged from 0.16– 0.71, while C1534 approached fixation at 23 sites

(0.8–1). Resistance profiles and *kdr* allele frequencies varied across Tapachula. The variability was not associated with a spatial pattern at the scale of the sampling.

Conclusion/Significance. Mosquito populations respond to selection pressure at a focal scale in the field. Spatial variation across sites highlights the importance of testing multiple sites within geographical regions.

Author summary

Aedes aegypti is a major vector of dengue, chikungunya, Zika, and yellow fever. In the absence of effective vaccines or treatments, the suppression of mosquito populations using insecticides commonly has been implemented by public health programs. Unfortunately, few insecticides are available to target adult mosquitoes with outdoor spraying. The mismanagement of insecticides can lead to resistance selection in mosquitoes, affecting our ability to control arboviral diseases. Ideally, screening insecticide susceptibility in local mosquito populations allows public health entities to support insecticide management strategies that will prevent the development of resistance. In this study, we evaluated insecticide resistance in *Ae. aegypti* collected across 26 sites in Tapachula, Mexico. The results reveal the response of populations to its historic use of insecticides. High resistance to pyrethroids, used for 10 years, but not in the previous 5 years, and moderate to high resistance to chlorpyrifos, an insecticide from a different toxicological group and used for the past 5 years, were confirmed. High variation in resistance across *Ae. aegypti* sites suggests that focal selection plays an important role in the evolution of insecticide resistance in the field. Screening several collections sites within a geographical region provides better evidence to support strategies of insecticide management.

Introduction

Aedes aegypti is the main vector of several arboviruses, including dengue, Zika, chikungunya, and yellow fever. The control of this mosquito species is challenging, mainly because it is highly adapted to urban and suburban areas and because it is widely dispersed in endemic regions [1]. Except for yellow fever, safe and effective treatments or vaccines for these diseases are still under study. Therefore, the suppression of *Ae. aegypti* remains the cornerstone to prevent transmission and control of outbreaks of these diseases [2].

Effective vector control involves several strategies, such as the elimination of potential breeding sites, application of chemical insecticides, and implementation of biological control. However, the application of chemical insecticides has become a common form of control because as a control is highly efficient and can be implemented promptly [3]. The most used insecticides in vector control have been the organophosphates temephos, used as a larvicide, and malathion, used as an adulticide by ultra-low volume application (ULV). Pyrethroids were introduced as adulticides in most Latin American countries in the 1990s [3]. In Mexico, according to the Mexican official policy for vector surveillance and control [4], the adulticide ULV formulation of permethrin, bioallethrin, and piperonyl butoxide (PBO) was used for more than 10 consecutive years (1999–2010). In the following 3–4 years, the pyrethroid d-phenothrin + PBO was introduced. Subsequently, the use of organophosphates returned in 2013, with chlorpyrifos and malathion being used as adulticides, while carbamates were recommended for indoor residual application [5].

The prolonged use of pyrethroid insecticides resulted in the evolution of resistance to them in *Ae. aegypti* worldwide, including Mexico, where failures in dengue control strategies are due in part to resistance [5]. Given that resistance to insecticides has been reported in populations of *Ae. aegypti* globally, the World Health Organization (WHO) recommends testing to ensure an effective insecticide management program. Decisions based on evidence of the resistance and/or susceptibility of *Ae. aegypti* will ensure a better selection of insecticides in vector control programs [6].

Two mechanisms of resistance to insecticides have been identified: resistance due to the enhanced metabolism of insecticides and insensitivity at the target site of the insecticides. Both mechanisms are involved in resistance to pyrethroids [7]. Knockdown resistance (*kdr*) refers to a phenomenon in which insects are not knocked down immediately after exposure to pyrethroids. *kdr* is caused by specific mutations at the voltage-gated sodium channel (VGSC), which is the target site for pyrethroids and DDT [8]. The amino acid substitutions V1016I [9], F1534C [10], and V410L [11,12] frequently have been associated with resistance to pyrethroids. Once these mutations are fixed in a population, reversion to susceptibility is difficult to achieve [9]. Therefore, the detection and characterization of *kdr* mutations in mosquito populations before resistance fixation occurs is essential for insecticide management strategies.

In Mexico, Chiapas is one of the states with the highest rate of endemic dengue cases. In particular, the city of Tapachula reports the highest incidence of dengue in the state [13], which is attributed to the proliferation of vectors that transmit

emerging and re-emerging diseases. Under the region's tropical climate conditions, *Ae. aegypti* maintains high densities throughout the year. Consequently, dengue and other arboviruses transmitted by this vector have been prevalent in the region for a long time [14].

In the context of insecticide resistance management, we investigated the status of insecticide resistance to five insecticides, including two pyrethroids (permethrin and deltamethrin), two organophosphates (chlorpyrifos and malathion), and one carbamate (bendiocarb) and the spatial distribution of such resistance in populations of *Ae. aegypti* throughout the city of Tapachula. We expect that after 5 years of heavy use of organophosphates and the removal of pyrethroids from vector control campaigns, pyrethroid resistance will be lower, whereas organophosphate resistance will appear in focal points of the city. We tested 26 collection sites located in the city of Tapachula. Each collection site consisted of nine blocks and these were selected based on vehicle access for outdoor spraying. To minimize the effects of mosquito migration by flight range (50 - 150 m), sites were located at least 250 m apart. The spatial correlation between resistance and geographical distance was calculated for the 26 collection sites. In addition, since Tapachula's vector control program uses a quadrant subdivision for spraying activities, we included a second analysis to test this source of variation by assigning sites to one of the four cardinal geographical quadrants (NE, NW, SE, and SW).

Materials and methods

Collections. The study was conducted in the city of Tapachula, Chiapas, located in southern Mexico at 177 meters above sea level. The 26 collection sites located in four quadrants in the city: Northwest (NW), Northeast (NE), Southwest (SW), and Southeast (SE) are shown in Table 1. The biological material was collected from January to April 2018 using ovitraps of 1-L capacity [15]. Twelve ovitraps were installed at each collection site. Ovitrap traps were made by hand with transparent, inert, non-toxic polypropylene (PP) cups of a 1 L capacity, and painted black on the outside following the guidelines for Entomological Surveillance with Ovitrap traps of the Mexican Ministry of Health (15). The interior of each ovitrap was lined with Whatman filter paper (No. 1) and filled with water to $\frac{3}{4}$ capacity; the paper was replaced weekly up to five times. The egg strips were transported to the insectary of the Regional Center for Research in Public Health/National Institute of Public Health (CRISP/INSP). The egg strips were submerged in 4 L of water in plastic containers (40 cm x 30 cm x 15 cm). On the third and sixth day, the hatched larvae were fed a diet of Harlan 5001 proteins, with 0.4 gr or 0.8 gr / 1.2 L for 1st-2nd stadium and 3rd-4th stadium at the 3rd and 6th day, respectively.

Table 1. Geographic location of 26 *Aedes aegypti* collection sites in Tapachula, Chiapas, Mexico, in 2018.

Quadrant	Site	Neighborhood	Abbreviation	Latitude	Longitude
Northeast					
	NE-1	Colinas del Rey	Col	14°55'50.9"	92°14'50.2
	NE-2	Galaxias	Gal	14°55'11.2"	92°15'06.5
	NE-3	Barrio Nuevo	Bar	14°54'51.0"	92°15'05.3
	NE-4	San Juan de los Lagos	SJL	14°54'26.3"	92°15'13.4
	NE-5	Coapantes	Coa	14°54'23.0"	92°14'57.1
	NE-6	Bonanza	Bon	14°54'02.8"	92°14'31.7
	NE-7	Centro (Country-Club)	CCC	14°54'22.7"	92°15'32.8
Southeast					
	SE-1	Galeana	Gal	14°54'00.2"	92°15'56.0
	SE-2	16 de Septiembre	16S	14°53'44.0"	92°15'42.1
	SE-3	Calcáneo Beltrán	Cal	14°53'28.0"	92°15'43.4
	SE-4	Benito Juárez 1	BJ1	14°53'21.8"	92°16'04.1
	SE-5	Benito Juárez 2	BJ2	14°53'11.7"	92°16'10.3
	SE-6	Emiliano Zapata	Zap	14°53'02.1"	92°16'14.2
Southwest					
	SW-1	Raymundo Enríquez	Ray	14°52'01.4"	92°18'48.8
	SW-2	Pobres Unidos	Pob	14°53'14.0"	92°17'6.1"
	SW-3	Palmeiras	Pal	14°53'22.1"	92°18'06.4
	SW-4	Nuevo Milenio	Nue	14°53'24.8"	92°17'59.4
	SW-5	Primavera	Pri	14°53'39.3"	92°17'38.6
	SW-6	Democracia	Dem	14°54'23.7"	92°16'33.5
Northwest					
	NW-1	5 de febrero	5Fe	14°55'33.7"	92°15'22.4
	NW-2	Xochimilco 1	Xo1	14°55'48.9"	92°15'37.8
	NW-3	Xochimilco 2	Xo2	14°56'02.2"	92°15'29.9
	NW-4	Vergel 1	Ve1	14°56'21.2"	92°15'52.4
	NW-5	Vergel 2	Ve2	14°56'32.9"	92°15'52.4
	NW-6	Paraíso	Par	14°56'35.2"	92°15'19.7
	NW-7	Centro (Nva. España)	CNE	14°54'35.0"	92°15'43.5

Aedes aegypti mosquitoes were identified to species and placed in cages (30 cm³). Females were bloodfed from rabbit (under accepted procedures by the Ethical Commission of the Instituto Nacional de Salud Pública) to obtain the F₁

generation. Environmental conditions consisted of a temperature of 27 ± 2 °C, 70–80% humidity, and a 12:12 hour photoperiod. We used the insecticide-susceptible New Orleans reference strain of *Ae. aegypti*, provided by Dr. William Black and maintained in the CRISP/INSP insectary.

Bioassays. The F₁ adults were exposed to the insecticides using a modified CDC bottle bioassay (Centers for Disease Control) [16]. Sigma brand technical grade insecticides were used to determine the lethal concentrations that killed 50% (LC₅₀) at each site. The pyrethroids permethrin (Type I) and deltamethrin (Type II), the organophosphates malathion and chlorpyrifos, and the carbamate bendiocarb were used to represent the toxicological groups used by vector control programs in Mexico.

To determine the LC₅₀, we tested five to six insecticide concentrations, which caused 10 to 90% mortality, in four replicates. Each insecticide LC₅₀ required approximately 500 mosquitoes. Table 2 shows the insecticide concentrations (µg/bottle) used to coat 250 ml Wheaton bottles using acetone as the solvent. During the bioassay, 15 to 20 (2-3 day old) females were gently aspirated into each bottle. The knockdown effect was recorded every 10 minutes for 1 hour. After 1 hour of exposure, the mosquitoes were transferred to plastic containers and maintained in the insectary to observe the mortality at 24 hours. The LC₅₀ of each insecticide was also determined for the susceptible New Orleans reference strain (NO) using a different set of insecticide concentrations (Table 2). Each insecticide LC₅₀ was replicated at least five times during a 7-month period. As control, a bottle impregnated only with acetone was used each time a test with field or susceptible mosquitoes was run.

Table 2. Concentrations ($\mu\text{g}/\text{bottle}$) used to determine the LC_{50} of five different insecticides in the bottle bioassay for field *Aedes aegypti* and the susceptible reference strain.

Class	Mode of action	Insecticide	Concentration in $\mu\text{g}/\text{bottle}$	
			Field colonies	New Orleans reference
PYRs	sodium channel activators	Permethrin	10, 20, 40, 80, 160	0.8, 1.2, 2.4, 3.2, 6
		Deltamethrin	1, 2, 4, 6, 8, 16	0.75, 0.1, 0.15, 0.2, 0.4
OPs	cholinesterase inhibitors	Malathion	2, 3, 4, 6, 8	2, 3, 4, 6, 8
		Chlorpyrifos	2, 4, 6, 8, 12	0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2
CARBs		Bendiocarb	0.5, 0.75, 1, 1.5, 3	0.25, 0.3, 0.4, 0.6, 1.2

PYRs = pyrethroids, OPs = organophosphates, CARBs = carbamates.

The LC_{50} , 95% confidence intervals, slope, intercept, and p values were determined using the binary logistic regression model with QCal software [17]. The null hypothesis (H_0) assumes the observed mortality curve adjusts to a binary logistic regression model. Thus, we expected p values higher than 0.05 to accept the H_0 . When the H_0 was rejected, the bioassay was repeated.

To estimate the level of resistance among sites, a resistance ratio (RR) was calculated by dividing the LC_{50} of the field sites by the LC_{50} of the NO strain. The RR criterion according to Mazzarri and Georgiou [18] classifies high resistance as RR values greater than 10, moderate resistance as RR values between 5 and 10, and low resistance as RR values less than 5.

Genotyping *kdr*-associated mutations. Genomic DNA was isolated from 50 F₁ individual female mosquitoes from each collection site following the method of Black and DuTeau [19]. The DNA was resuspended in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) and stored at -20 °C. The V1016I and F1534C mutations were genotyped according to the protocols of Saavedra-Rodríguez et al. [9] and Yanola et al. [10], respectively. The genotype and allelic frequencies were tested for Hardy-Weinberg (HW) equilibrium. The null hypothesis is that equilibrium is present in the population, which was verified with a chi-square test (df = 1 and *p* value > 0.05).

We tested the spatial variation of the LC₅₀s between the quadrants in the city using a linear model and ANOVA in R (car package). To test the hypothesis of resistance correlation with space, we created Moran's I correlograms as implemented in PASSaGE 2.0 [20]. Mosquitoes from different collection sites were considered neighbors if the sites were within 250 meters of each other. We expected that the LC₅₀s or *kdr* frequencies would be associated with geographical distance (i.e., that closer neighbor sites would show similar resistance levels, compared to those farther away). A second analysis to test the variation of the LC₅₀s and *kdr* frequencies between and within quadrants using a linear regression model and ANOVA in R (car package) was conducted. Since the city is uniformly sprayed during a cycle, we did not expect variation between or within quadrants. Correlation between *kdr* frequencies and LC₅₀'s for permethrin and deltamethrin was tested using a Spearman test.

Results

The geographic distributions of the resistance ratios (RR) for each insecticide in the 26 sites in Tapachula are shown in Fig 1. The LC₅₀ and confidence intervals for each of the five insecticides are shown in S1 Table. For the pyrethroids, we observed high levels of resistance widespread across sites. Fig 2A shows the permethrin RRs across Tapachula. High RRs were identified at 24 sites (RR from 11.4 to 43.1-fold). Only two sites—NE-3 and NW-2—showed moderate RRs (5.3 and 5.9-fold, respectively). The variation in RRs among quadrants was not significant ($F = 0.56$, $df = 3$, p value = 0.64). For deltamethrin, high RRs were determined in all 26 sites (10.6 to 101-fold). The variation among quadrants was not significant ($F = 1.08$, $df = 3$, p value = 0.37). Except for SW, all quadrants had at least one site with RR higher than 90-fold (Fig 2B).

Fig 1. Spatial distribution of insecticide resistance to five compounds in *Aedes aegypti* collected in Tapachula. The number above each bar corresponds to the resistance ratio (RR). The RR was calculated relative to the susceptible New Orleans reference strain. Map obtained from the National Institute of Statistics and Geography (INEGI). Digital Map of Mexico. MDM: <http://gaia.inegi.org.mx/mdm6>.

Fig 2. Pyrethroids resistance ratios (RRs) of *Aedes aegypti* collected in 26 sites across Tapachula in 2018. A) Permethrin and B) Deltamethrin. Dots represent the RR₅₀ with 95% confidence intervals for each site. Horizontal lines indicate the threshold for low resistance (< 5-fold), moderate resistance (5- to 10-fold) and high resistance (> 10-fold).

The RRs for cholinesterase inhibitors (organophosphates and carbamates) are shown in Fig 3. For chlorpyrifos (Fig 3A), the RRs varied from low at 10 sites (0.68- to 4.9-fold) to moderate at 15 sites (5.2- to 7.2-fold) to high at one site (10.2-fold). No significant difference in RRs was found between quadrants ($F = 1.08$, $df = 3$, p value = 0.37). For malathion (Fig 3B), low resistance (0.86- to 4.5-fold) was identified at all 26 sites. However, a significant difference was observed between quadrants ($F = 3.53$, $df = 3$, p value = 0.03), with SE showing a mean RR of 2.6-fold (95% CI 1.9- to 3.2-fold). Resistance to bendiocarb was low (1.2- to 4.8-fold) at 19 sites, moderate (7.3- to 9.9-fold) at five sites, and high (10.3- to 11.2-fold) at two sites. No difference between quadrants was identified ($F = 0.68$, $df = 3$, p value = 0.57).

Fig 3. Cholinesterase inhibitors resistance ratios (RRs) of *Aedes aegypti* collected in 26 sites across Tapachula in 2018. A) Chlorpyrifos (organophosphate), B) Malathion (organophosphate), and C) Bendiocarb (carbamate). Dots represent the RR₅₀ with 95% confidence intervals for each site. Horizontal lines indicate the threshold for low resistance (< 5-fold), moderate resistance (5- to 10-fold) and high resistance (> 10-fold).

Table 3. Genotype counts and allele frequencies for two *kdr*-associated substitutions (V1016I and F1534C) from *Aedes aegypti* collected at 26 sites in Tapachula. RR = homozygote resistant, RS = heterozygote, and SS = homozygote susceptible. * indicates a lack of Hardy-Weinberg equilibrium.

Site	Abv	N	V1016I genotypes				F1534C genotypes			C1534 frequency
			I/I RR	V/I RS	V/V SS	I1016 frequency	C/C RR	F/C RS	F/F SS	
NE-1	Col	48	4	23	21	0.32	47	1	0	0.99
NE-2	Gal	48	5	30	13	0.42*	39	8	1	0.90
NE-3	Bar	48	1	13	34	0.16	7	22	19	0.38
NE-4	SJL	48	6	22	20	0.35	47	1	0	0.99
NE-5	Coa	45	5	24	16	0.38	42	3	0	0.97
NE-6	Bon	48	8	22	18	0.4	43	5	0	0.95
NE-7	CCC	50	15	25	10	0.55	11	39	0	0.61*
Subtotal		335	44	159	132	0.37	236	79	20	0.82*
SE-1	Gal	48	12	28	8	0.54	42	6	0	0.94
SE-2	16S	48	5	29	14	0.4	48	0	0	1*
SE-3	Cal	48	7	25	16	0.41	46	2	0	0.98
SE-4	BJ1	48	4	28	16	0.38	46	2	0	0.98
SE-5	BJ2	48	11	25	12	0.49	47	1	0	0.99
SE-6	Zap	48	10	25	13	0.47	34	14	0	0.85
Subtotal		288	49	160	79	0.45	263	25	0	0.96
SW-1	Ray	48	5	28	15	0.39	48	0	0	1*
SW-2	Pob	48	14	21	13	0.51	47	1	0	0.99
SW-3	Pal	48	2	17	29	0.22	46	0	2	0.96*
SW-4	Nue	48	0	26	22	0.27*	48	0	0	1*
SW-5	Pri	48	8	22	18	0.39	47	1	0	0.99
SW-6	Dem	48	13	20	15	0.48	41	7	0	0.93
Subtotal		288	42	134	112	0.38	277	9	2	0.98*
NW-1	5Fe	48	9	22	17	0.42	48	0	0	1*
NW-2	Xo1	48	10	29	9	0.51	48	0	0	1*
NW-3	Xo2	48	1	21	26	0.24	48	0	0	1*
NW-4	Ve1	48	11	23	14	0.47	48	0	0	1*
NW-5	Ve2	50	8	17	25	0.33	2	37	11	0.41*
NW-6	Par	48	24	20	4	0.71	48	0	0	1*
NW-7	CNE	50	4	26	20	0.34	0	38	12	0.38*
Subtotal		340	67	158	115	0.43	242	75	23	0.82*
Total		1251	202	611	438	0.41	1018	188	45	0.89*

High allele frequencies of the resistant C1534 allele were determined at 22 of the 26 sites, ranging from 0.85 to 1.0. Lower frequencies (0.38–0.41) were found in NE-3, NW-5, and NW-7. While NE-7 was calculated with an intermediate value of 0.61. Most sites were in HW disequilibrium due to fixation of the resistant allele. We conducted a Spearman correlation test between the pyrethroid LC₅₀s and the expected frequencies of resistant homozygous genotypes. We found significant correlation coefficients among permethrin LC₅₀s, I1016/I1016 homozygotes ($S = 2588$, $\rho = 0.53$, p value = 0.002), and C1534/C1534 homozygotes ($S = 1966$, $\rho = 0.515$, p value = 0.004). Although it is known that C1534 shows protection only against permethrin (12), for deltamethrin a significant correlation was observed between the LC₅₀ and I1016/I1016 homozygotes ($S = 2643$, $\rho = 0.467$, p value = 0.008) and the C1534/C1534 homozygotes ($S = 2945$, $\rho = 0.507$, p value = 0.002). However, the significance for both insecticides disappeared when observations from the New Orleans reference strain were removed.

To assess the correlation of LC₅₀s with space, we generated Moran's I correlograms for each of the five insecticides (Fig 4). The analysis included all 26 collection sites. We did not detect a discernable pattern in any of the tested insecticides. We expected a positive correlation (Moran's I statistically > 0) between nearby sites, then as the distance increased (between the samples) the correlation would decrease, and later would turn negative (Moran's I statistically < 0). However, this was not observed. Although, few of the distance classes were statistically different from zero (eg. bendiocarb at 3250 m, 3750 m, 4750 m, and 6250 m; malathion at 1500 m; and deltamethrin at 3750 m, and 4250 m), a caveat in our analysis is the possibility that

there is autocorrelation at smaller distances than the ones we selected ($x < 250$ m). Our experimental design was not geared towards the detection of spatial correlation at smaller distances; there were a small number of samples below 250 meters.

Fig 4. Moran's I correlograms as implemented in PASSaGE 2.0 assessing the correlation of LC₅₀'s with space for permethrin (pyrethroid), deltamethrin (pyrethroid), chlorpyrifos (organophosphate), malathion (organophosphate), and bendiocarb (carbamate). The analysis included 26 collection sites in Tapachula, Chiapas, Mexico. *Aedes aegypti* mosquitoes from different collection sites were considered neighbors if the sites were within 250 meters of each other.

Discussion

Efforts to control *Ae. aegypti* populations are hindered by widespread insecticide resistance worldwide. Local insecticide resistance monitoring is necessary for the design of specific and successful resistance management programs [21]. In Latin America, pyrethroids have been used for adult mosquito control since the 1990s. The switch to pyrethroids was based on environmental concerns that led to the use of less toxic classes of insecticides [22]. In Mexico, vector control programs implemented the use of permethrin in 1999 and continued their use until 2010. Local selection pressure caused a rapid evolution of pyrethroid resistance in *Ae. aegypti* across Mexico [9,23-27], resulting in policy modifications that recommended the use of insecticides with different toxicological modes of action.

In Tapachula, vector control programs replaced the use of permethrin with a different Type I pyrethroid (d-phenothrin + piperonyl butoxide) from 2010 to 2013. In 2013, pyrethroids were replaced by the organophosphate chlorpyrifos, and in 2017, by malathion. This study reveals the current status and response of local *Ae. aegypti* populations to these insecticide shifts. Despite the switch to organophosphates in the last 5 years, we observed that high levels of pyrethroid resistance remain widespread in Tapachula. An assumption in insecticide resistance management is that insecticide resistance has negative fitness costs. Therefore, when insecticide pressure is removed, populations are expected to reverse to susceptibility [28,29]. Currently, we are conducting a study to determine the degree of loss of resistance to pyrethroids from 2016 to 2020 in this study area, which will demonstrate whether

mosquito populations in Tapachula are undergoing a process of decreasing resistance that will take several years. Another explanation is that pyrethroid resistance is maintained in *Ae. aegypti* populations by the domestic use of pyrethroids [30]. Surveys in Merida, Mexico, indicate that 85% of households took action to kill pests, and 89% exclusively targeted mosquitoes. Interestingly most of the aerosol spray cans contained pyrethroid insecticides [31].

Interestingly, RRs for deltamethrin—a Type II pyrethroid—were higher than permethrin RRs across sites. Deltamethrin was authorized by CENAPRECE for indoor residual use in 2009 for control of the malaria vector, but its use was restricted to rural areas. Therefore, direct selection pressure from the use of deltamethrin in public health is unlikely to be responsible for the high RRs in *Ae. aegypti* from Tapachula. Although all pyrethroids act at the same target site, the variability of resistance to their different types is attributed to different binding sites for Type I and Type II pyrethroids at the voltage-gated sodium channel. Additionally, the presence of enzymes that have a greater affinity to metabolize specific molecules within the same toxicological group might explain this variability [32].

Knockdown resistance (*kdr*) is a major mechanism of pyrethroid resistance in *Ae. aegypti* from Mexico. In this study, we measured the frequency of this mechanism by molecular tests that identify mutations that confer changes to amino acids in the VGSC. The allele frequencies of the resistant allele I1016 ranged from 0.4 to 0.7, and for the resistant allele C1534, from 0.85 to 1.0 (except for three sites that had ~0.4). Historical data of *kdr* mutations indicated that C1534 confers low level of resistance on its own, and that resistance increased dramatically when I1016

evolved from the V1,016/C1,534 haplotype in field mosquito collected in different places from Mexico (33). Those results demonstrated that I1016 was unlikely to have evolved independently, and that both mutations need coexist in the same mosquito in order to confer higher levels of resistance. Moderate correlations were significant between the resistant allele frequencies and the RRs for permethrin and deltamethrin only when including the New Orleans datapoints. This significance might be explained by most of the allele frequencies being distributed within a small range of variability.

This study was conducted after chlorpyrifos had been used for 5 years in outdoor spraying by vector control programs. Our results provide evidence of the response of *Ae. aegypti* populations to chlorpyrifos pressure. Ten sites showed low RRs, 15 sites showed moderate resistance, and one site was highly resistant. Interestingly, *Ae. aegypti* from all 26 sites were susceptible or had low RRs to malathion, thereby indicating that resistance to chlorpyrifos does not predict the lack of effectivity of malathion. Additionally, the RRs to bendiocarb were variable: mosquitoes from 19 sites had low RRs, those from three were moderate, and those from two were highly resistant. Only a few sites showed moderate to high resistance to both chlorpyrifos and bendiocarb (NE-5, NW-6, and SE-4). The lack of cross-resistance between organophosphates and carbamates suggests that the resistance mechanisms are not due to the insensitivity of their target site (the acetylcholinesterase) [34] and, in fact, no mutations have been found in *ace-1* gene in *Ae. aegypti* [35].

A survey in Veracruz, Mexico, identified high RRs to chlorpyrifos in Cosoleacaque (RR = 13.9), moderate RRs in Poza Rica (RR = 7.9), and low RRs in five sites in Veracruz [36]. By using a discriminating dose of 50 µg/bottle and 85 µg/bottle for 30 minutes, two additional studies were able to identify chlorpyrifos resistance in Mexico [26,37]. Since neither of these studies found a history of chlorpyrifos use in vector control programs, the resistance might be explained by indirect exposure to chlorpyrifos through the extensive use of this insecticide to control agricultural pests [36].

During vector control programs, the city of Tapachula is uniformly sprayed, using the same insecticide, frequency and intensity. More yet, we selected sites based in their accessibility to spraying-vehicles. Assuming that no spatial heterogeneity in frequency and intensity of spraying, we did not expect the high levels of variation in resistance profiles across the city. For example, significant heterogeneity in the frequency of *kdr* haplotypes was detected in *Ae. aegypti* collected between city blocks in a town of Yucatan, suggesting that selection for these haplotypes occurs at a fine spatial scale (37). However, in contrast to our study, insecticide application was highly variable in space and time, creating a mosaic of selection pressures. In our study, some sources of heterogeneity could occur from mosquito migration from untreated sites due to vehicle inaccessibility, including parks, cemeteries, steep and unpaved streets. A second source of insecticide pressure is by use of household aerosol insecticides. For example, in a previous study from Merida, Mexico approximately 87% of households used commercially available pyrethroid products to control mosquitoes in their homes (31). Future studies include an assessment of

this source of selection pressure in Tapachula.

The spatial variability in insecticide resistance observed across the 26 sites in Tapachula is likely associated with the presence or appearance of “hot spots or dengue foci,” which contribute to the persistent transmission of the diseases and therefore to focal areas with greater spray intervention [38]. In addition, the spatial variability of resistance highlights the importance of evaluating resistance in multiple sites within a defined geographic area for the application of appropriate vector control decisions. Although no geographical correlation/association/pattern between resistance was found in Tapachula, more specific and finer environmental characteristics must not be discarded in future studies. A previous study used mitochondrial ND4 haplotypes to determine gene flow patterns among 38 *Ae. aegypti* coastal collections in Mexico [39]. Three genetic clusters were identified, the Northeast, Pacific, and Yucatan peninsula. For all sites, genetic distances remained small below geographic distances of 90 km and became large at distances >150 km. The Pacific cluster had the highest gene flow and diversity. A second study in the Yucatan Peninsula showed high gene flow occurring across 27 *Ae. aegypti* collection sites located up to 150 km of distance. Single nucleotide polymorphism (SNPs) at eleven loci did not vary across sites, suggesting high levels of gene flow. In contrast, insecticide resistance loci, including *kdr* alleles (I1016 and C1534) were highly variable across sites, indicating that insecticide resistance offsets the homogenizing effects of gene flow [40]. In this study, we assume complete gene flow among collection sites because: 1) Tapachula belongs to the Pacific cluster, 2) *Ae. aegypti*

is well established throughout the year and, 3) collection sites are within 10 km of distance. However, this remains to be tested.

Conclusion

Despite more than 5 years having passed since the removal of pyrethroids from vector control programs in Tapachula, high levels of pyrethroid resistance and *kdr*-associated alleles persist in *Ae. aegypti* populations. Future resistance surveys will reveal if pyrethroid resistance is maintained in mosquito populations. We observed that, after 5 years of chlorpyrifos use in vector control programs, more than 50% of the sites have moderate to high chlorpyrifos resistance but complete susceptibility to malathion. Since malathion was introduced later in 2017, future studies to evaluate the selection of malathion resistance in the field are needed. Two different analyses were conducted 1) the spatial analysis included all 26 sites and, 2) the quadrant analysis to identify operational sources of heterogeneity. The quadrant analysis doesn't include a geographical component and has limitations. Insecticide resistance varied spatially, most likely as a consequence of the pattern of insecticide use combined with environmental factors. Based on the results of our study, we suggest that both of the studied organophosphates and the carbamate remain viable options for use in the control strategy for this vector. The return to a pyrethroid (at least permethrin and deltamethrin) for outdoor spraying is recommended when the levels of resistance have decreased to RR less than 10-fold and once mechanisms other than *kdr* have been elucidated for pyrethroid resistance.

Acknowledgments

The authors would like to thank Biol. Elsa Contreras, Geovanni Vázquez and Francisco Pozos from the Programme of Vector Control in Tapachula for contributions in the field work.

References

1. Amelia-Yap ZH, Chen CD, Sofian-Azirun M, Low VL. Pyrethroid resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southeast Asia: present situation and prospects for management. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):332. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2899-0>.
2. Roiz D, Wilson AL, Scott TW, Fonseca DM, Jourdain F, Muller P, et al. Integrated *Aedes* management for the control of *Aedes*-borne diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12: e0006845. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006845>.
3. Bisset JA, Rodriguez MM, San Martín JL, Romero JE, Montoya R. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Rev. Panam. Salud Pública*. 2009;26:229-234. Available from: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/9778/07.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
4. Norma oficial mexicana NOM-032-SSA-2002, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. México: Secretaría de Salud. 2002. Available from:

<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/032ssa2002.html>.

5. Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). Monitoreo de Resistencia a Insecticidas (adulcidades) Utilizados en el Programa Nacional de Control de Vectores en México. 2014. Available from: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/MonitoreoResistenciaInsecticidas2014.pdf>.
6. World Health Organization WHO. Report of the WHO world health statistics. monitoring health for the sustainable development goals (SDGs). 2016. Available from: https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2016/Annex_B/en/.
7. Soderlund DM, & Bloomquist JR. Molecular mechanisms of insecticide resistance. Pest Resist Arthropods. 1990;13:58–96. Available from: http://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0_4.
8. Dong K, Du Y, Rinkevich F, Nomura Y, Xu P, Wang L, et al. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. Insect Biochem Mol Biol. 2014;50:1–17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4484874/>
9. Saavedra-Rodriguez K., Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas, et al. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. Insect Mol Biol. 2007;16(6):785–798. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2583.2007.00774.x>.

10. Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Somwang P, Prapanthadara L. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. Trop Med Int Health. 2011;16(4):501–509. Available from: <http://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02725.x>.
11. Haddi K, Tome HVV, Du Y, Valbon WR, Nomura Y, Martins GF, et al. Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. Sci Rep. 2017;7:46549. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep46549>.
12. Saavedra-Rodriguez K, Maloof FV, Campbell CL, Garcia-Rejon J, Lenhart A, Penilla P, et al. Parallel evolution of vgsc mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. Sci Rep-UK. 2018;8: 6747. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-25222-0>
13. Plan de acción. Tapachula, México. 2018. Programa Ciudades Emergentes y Sostenibles (CES). 2018. Available from: <https://www.iadb.org/es/desarrollo-urbano-y-vivienda/programa-ciudades-emergentes-y-sostenibles>.
14. Boletín epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud, Mexico. 2019. Available from: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/451550/sem13.pdf>
15. Guía Metodológica para la Vigilancia Entomológica con Ovitrapas. Centro

- Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). Secretaria de Salud, Mexico City. 2015. Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/354685/Guia_Metodologica_para_Vigilancia_Entomologica_con_Ovitrapas.pdf.
16. Brogdon WG, Chan A. Instrucciones para la evaluación de la resistencia a insecticida en vectores mediante el ensayo biológico de la -botella de la CDC. 2012;1–28. Available from: http://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/ir_manual/ir_cdc_bioassay_es.pdf.
 17. Lozano-Fuentes S, Saavedra-Rodriguez K, Black W IV, Eisen L. QCAL: a software application for the calculation of dose-response curves in insecticide resistance bioassays. J Am Mosq Control. 2012;28: 59–61. Available from: at: <https://www.researchgate.net/publication/224845565>
 18. Mazzarri MB & Georgiou P. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* (L) from Venezuela. J Am Mosq Control Assoc. 1995;11:315-322. PMID: **8551300**.
 19. Black WC, DuTeau NM. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. The molecular biology of insect disease vectors: a methods manual. Cramton J BC LC, editor. Ney York. Chapman and Hall. 1997. Available from: https://doi.org/10.1007/978-94-009-1535-0_31
 20. Rosenberg, M.S., and C.D. Anderson. PASSaGE: Pattern Analysis, Spatial Statistics and Geographic Exegesis. Version 2. Methods Ecol Evol. 2011;2(3):229-232. Available from: <https://doi/abs/10.1111/j.2041->

210X.2010.00081.x

21. World Health Organization (WHO). Management of insecticide resistance in vectors of public health importance. Report of the ninth meeting of the global collaboration for development of pesticides for public health. ISBN 978 92 4 150824 7. 2014. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/145673/9789241508247_eng.pdf;jsessionid=28BBB4AE1572C138ABC8A62931DBA9F6?sequence=1
22. Macoris ML, Andrighetti MT, Macoris O, Vanessa C G, Carvalho, LÍdia RC, et al. Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2007;102(8):895-900. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000800001>.
23. Garcia GP, Flores AE, Fernandez-Salas I, Saavedra-Rodriguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, et al. Recent rapid rise of a permethrin knock down resistance allele in *Aedes aegypti* in Mexico. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(10):e531. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000531>
24. Flores AE, Ponce G, Silva BG, Gutierrez SM, Bobadilla C, Lopez B, et al. Wide spread cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) From Veracruz state Mexico. J Econ Entomol. 2013;106(2):959–969. doi: 10.1603/ec12284. PMID: 23786088; PMCID: PMC3980443. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23786088/>
25. Aponte HA, Penilla RP, Dzúl-Manzanilla F, Che-Mendoza A, López AD, Solis F, et al. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. Pest Biochem and Phys.

2013;107(2):226–234.

Available

from:

<http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.07.005>.

26. Kuri-Morales PA, Correa-Morales F, González-Acosta C, Moreno-Garcia M, Santos-Luna R, Román-Pérez S, et al. Insecticide susceptibility status in Mexican populations of *Stegomyia aegypti* (= *Aedes aegypti*): a nationwide assessment. *Med Vet Entomol*. 2018;32(2):162–174. Available from: <https://doi.org/10.1111/mve.12281>.
27. López-Solís A, Castillo-Vera A, Cisneros J, Solis-Santoyo F, Penilla-Navarro R, Black IV W, et al. (2020). Resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) de Tapachula, Chiapas, México *Salud Pública de México*. 2020;62:439-446. Available from: <http://dx.doi.org/10.21149/10131>.
28. Vera-Maloof FZ, Saavedra-Rodriguez K, Penilla-Navarro RP, Rodriguez-Ramirez A, Dzul F, Manrique-Saide P et al. Loss of pyrethroid resistance in newly established laboratory colonies of *Aedes aegypti*. *Plos Negl Trop Dis*. 2020;14(3): Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007753>.
29. Deming R, Manrique-Saide P, Medina Barreiro A, Cardeña EU, Che-Mendoza A, Jones B, et al. Spatial variation of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* presents unique vector control challenges. *Parasit Vectors*. 2016;9:67. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1346-3>.
30. Gray L, Sergio DF, Anuar MB, Vadillo-Sánchez J, González-Olvera G, Lenhart A, et al. Experimental evaluation of the impact of household aerosolized insecticides on pyrethroid resistant *Aedes aegypti*. *Sci Rep*.

2018;8:12535.

Available

from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6105583/>.

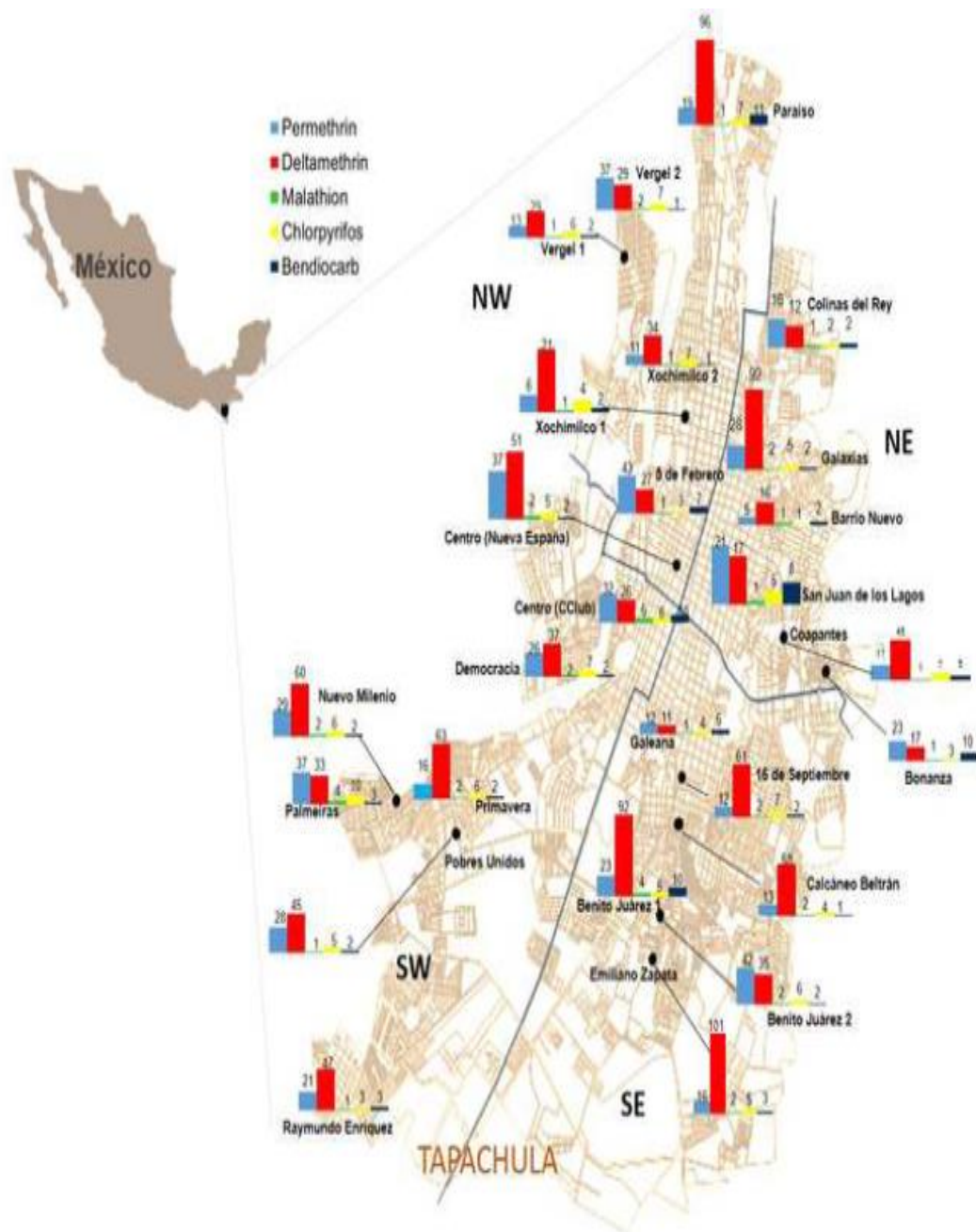
31. Loroño-Pino MA, Chan-Dzul YN, Zapata-Gil R, Carrillo-Solís C, Uitz-Mena A, García-Rejón JE, et al. Household use of insecticide consumer products in a dengue-endemic area in México. *Trop Med & Int Health*. 2014;19(10):1267-127. Available from: <https://doi.org/10.1111/tmi.12364>.
32. Nardini L, Christian RN, Coetzer N, Ranson H, Coetzee M, Koekemoer LL. Detoxification enzymes associated with insecticide resistance in laboratory strains of *Anopheles arabiensis* of different geographic origin. *Parasit Vectors*. 2012;5:113. doi:10.1186/1756-3305-5-113. PMID: 22676389. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3430573/>
33. Vera-Maloof FZ, Saavedra-Rodriguez K, Elizondo-Quiroga AE, Lozano-Fuentes S, Black IV WC. Coevolution of the Ile1,016 and Cys1,534 mutations in the voltage gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;9(12): e0004263. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004263>.
34. Mutero A, Pralavorio M, Bride JM, & Fournier D. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1994;91(13):5922–5926. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.13.5922>.
35. Weill, M., A. Berthomieu, C. Berticat, G. Lutfalla, V. Nègre, N. Pasteur, A. et al. “Insecticide resistance: a silent base prediction.” *Current Biology*. 2004;14(14): R552-R553. Available from: [https://www.cell.com/current-biology/pdf/S0960-9822\(04\)00486-5.pdf](https://www.cell.com/current-biology/pdf/S0960-9822(04)00486-5.pdf)

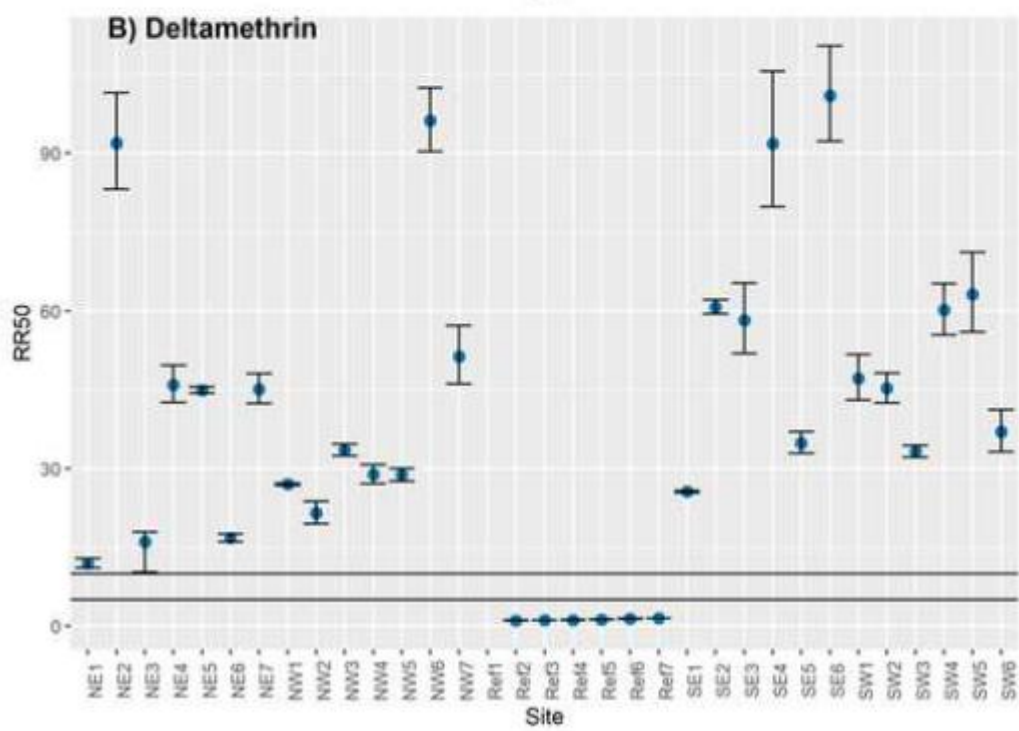
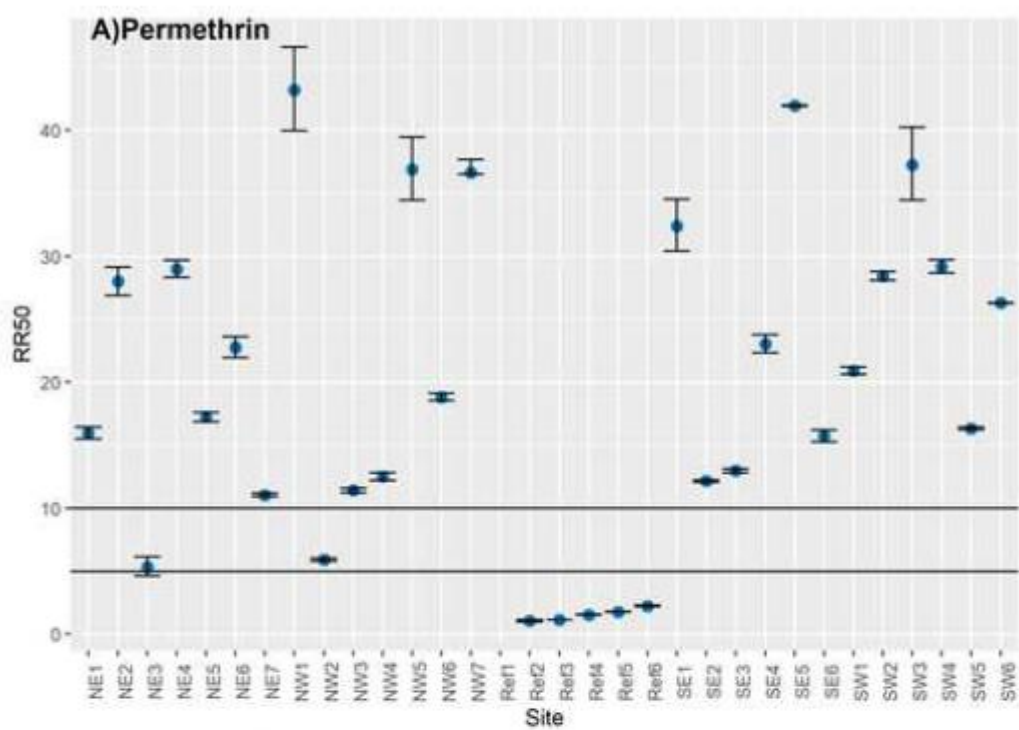
36. Lopez B, Ponce G, Gonzalez JA, Gutierrez SM, Villanueva OK, Gonzalez G. Susceptibility to chlorpyrifos in pyrethroid-resistant populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico. J Med Entomol. 2014;51(3):644–649. Available from: <https://doi.org/10.1603/me13185>.
37. Grossman MK, Rodriguez J, Barreiro AM, Lenhart A, Manrique-Saide P, Vazquez-Prokopec GM. Fine-scale spatial and temporal dynamics of *kdr* haplotypes in *Aedes aegypti* from Mexico. Parasit Vectors. 2019;12:1:20. Pmid: 30626410; PubMed Central PMCID: PMC6327429. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-3275-9>
38. Opondo KO, Weetman D, Jawara M, Diatta M, Fofana A, Crombe F, et al. Does insecticide resistance contribute to heterogeneities in malaria transmission in The Gambia? Malar J. 2016;15(15):166. doi: 10.1186/s12936-016-1203-z. PMID: 26980461; PMCID: PMC4793517. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26980461/>
39. Gorrochotegui-Escalante N, Gomez-Machorro C, Lozano S, Fernandez Salas I, Munoz ML, Farfan-Ale J, et al. Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. Am J Trop Med Hyg. 2002;66. 213-22. 10.4269/ajtmh.2002.66.213.
40. Saavedra-Rodriguez K, Beaty M, Lozano-Fuentes S, Denham S, Garcia-Rejon J, Reyes-Solis G, et al. Local evolution of pyrethroid resistance offsets gene flow among *Aedes aegypti* collections in Yucatan state, Mexico. Am J Trop Med Hyg. 2015;92(1):201-209. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0277>

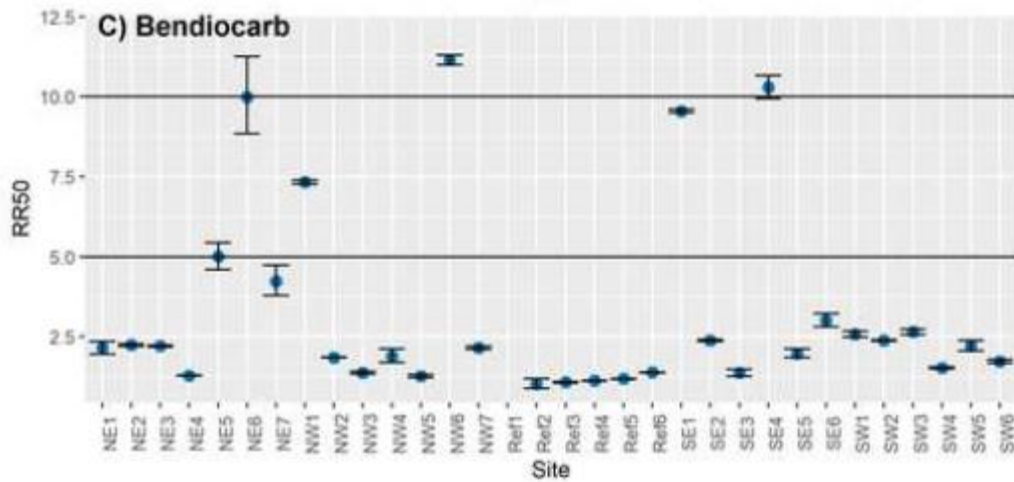
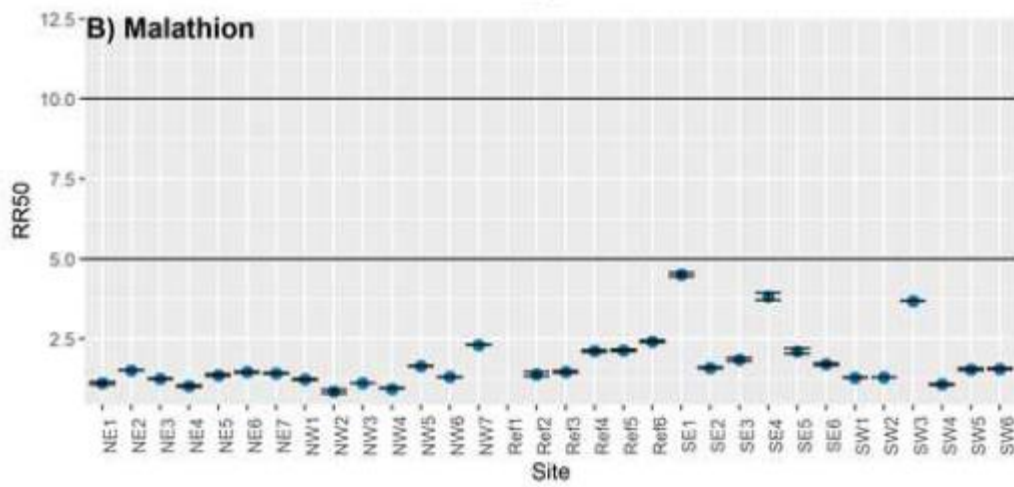
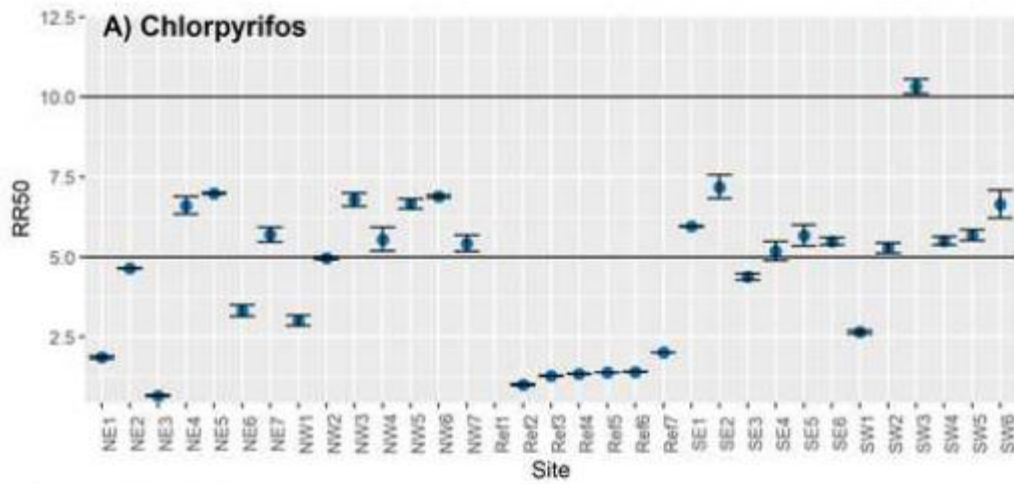
Supporting Information Legends

S1 Table. Lethal concentration to kill 50% (LC₅₀) for five insecticides at 26 *Aedes aegypti* sites in Tapachula, Chiapas, Mexico. The LC₅₀ is in micrograms (µg) of active ingredient per bottle. The 95% confidence intervals around the LC₅₀ are enclosed in parentheses. *p* values higher than 0.05 indicate the observed data fit the binary logistic regression model.

S2 Table. Genotype for two *kdr*-associated substitutions (V1016I and F1534C) per individual *Aedes aegypti* mosquito (n = 47 to 50) at 26 sites in Tapachula, Chiapas, Mexico. For V1016I: AA = homozygote for Ile₁₀₁₆, resistant; GG = homozygote for Val₁₀₁₆, susceptible; AG = heterozygote Ile₁₀₁₆/Val₁₀₁₆. For F1534C: TT homozygote for Phe₁₅₃₄, susceptible; GG = homozygote for Cys₁₅₃₄, resistant; TG = heterozygote Phe₁₅₃₄/Cys₁₅₃₄.







Fw: Paper Published: 'Insecticide resistance in *Aedes aegypti* from Tapachula, Mexico: Spatial variation and response to historical insecticide use'

Saavedra Rodriguez, Karla [Karla.Saavedra_Rodriguez@colo...]

Para: Alma Delia Lopez Solis; Francisco Solis Santoyo; Rosa Patricia Penilla Navarro

miércoles, 29 de septiembre de 2021 11:36 a.m.

Directiva de retención: 365_INSP_ELIMINACION_BANDEJA_ENTRADA (1 Año) Caduca: 29/09/2022

Respondiste el 29/09/2021 12:10 p.m..

nkq3@cdc.gov | 970-494-6693

From: Nett, Randall J. (CDC/DDID/NCEZID/DVBD) <gge5@cdc.gov>

Sent: Wednesday, September 29, 2021 8:13 AM

To: Nett, Randall J. (CDC/DDID/NCEZID/DVBD) <gge5@cdc.gov>

Subject: Paper Published: 'Insecticide resistance in *Aedes aegypti* from Tapachula, Mexico: Spatial variation and response to historical insecticide use'

Congratulations to Saul Lozano from EET, and our CSU and Mexican colleagues on publishing the manuscript titled "**Insecticide resistance in *Aedes aegypti* from Tapachula, Mexico: Spatial variation and response to historical insecticide use**" in the journal *PLOS Neglected Tropical Diseases*.

Authors in order are F Solis-Santoyo, AD Rodriguez, RP Penilla-Navarro, D Sanchez, A Castillo-Vera, AD Lopez-Solis, ED Vazquez-Lopez, [S Lozano](#), WC Black IV, K Saavedra-Rodriguez.

A link to the article can be found [here](#).

From the article:

Background

*Insecticide use continues as the main strategy to control *Aedes aegypti*, the vector of dengue, Zika, chikungunya, and yellow fever. In the city of Tapachula, Mexico, mosquito control programs switched from pyrethroids to organophosphates for outdoor spatial spraying in 2013. Additionally, the spraying scheme switched from total coverage to focused control, prioritizing areas with higher entomological-virological risk. Five years after this strategy had been implemented, we evaluated the status and variability of insecticide resistance among *Ae. aegypti* collected at 26 sites in Tapachula.*

Methodology/Principal findings

*We determined the lethal concentrations at 50% of the tested populations (LC_{50}) using a bottle bioassay, and then, we calculated the resistance ratio (RR) relative to the susceptible New Orleans strain. Permethrin and deltamethrin (pyrethroids), chlorpyrifos and malathion (organophosphates), and bendiocarb (carbamate) were tested. The frequencies of the substitutions V1016I and F1534C, which are in the voltage-gated sodium channel and confer knockdown-resistance (kdr) to pyrethroid insecticides, were calculated. Despite 5 years having passed since the removal of pyrethroids from the control programs, *Ae. aegypti* remained highly resistant to permethrin and deltamethrin (RR > 10-fold). In addition, following 5 years of chlorpyrifos use, mosquitoes at 15 of 26 sites showed moderate resistance to chlorpyrifos (5- to 10-fold), and the mosquitoes from one site were highly resistant. All sites had low resistance to malathion (< 5-fold). Resistance to bendiocarb was low at 19 sites, moderate at five, and high at two. Frequencies of the V1016I ranged from 0.16–0.71, while C1534 approached fixation at 23 sites (0.8–1). Resistance profiles*

De: Marianne Comparet [comparetm@isntd.org]
Enviado: miércoles, 13 de octubre de 2021 10:35 a.m.
Para: Rosa Patricia Penilla Navarro
CC: Kamran Rafiq
Asunto: Speaking invitation (online): ISNTD Bites & insecticide resistance (Tapachula)

Dear Dr Penilla-Navarro,

I hope that this email finds you well. I am writing to you given the recent publication of the paper "Insecticide resistance in *Aedes aegypti* from Tapachula, Mexico: Spatial variation and response to historical insecticide use".

It would be our honour to **invite you and/or co-authors to take part in our 8th annual ISNTD Bites conference on vector-borne diseases** - this will be held online on Wednesday October 27th 2021.

We have a session planned on Updates on Insecticide Resistance and felt that the findings and recommendations from your work would be an important and exciting addition to this session.

Our online conferences have been a very successful way to share worldwide and discuss findings with our wider audience and networks at the International Society for Neglected Tropical Diseases.

The session would last about 90 minutes including presentations and Q&A with our audience.

I would be glad to answer any further questions and I hope that you will consider participating and sharing these essential findings with our networks worldwide!

Many thanks for your consideration,

Marianne

Marianne Comparet
The International Society for Neglected Tropical Diseases
Director
+44 7568 370 523

Subscribe to the [ISNTD Newsletter](#).
Visit our Research Hub at www.isntd.org
Follow ISNTD and global health news on Twitter [@ISNTD_Press](#)

**CAPÍTULO III - Current enzyme-mediated insecticide resistance status of
Aedes aegypti populations from a dengue-endemic city in southern Mexico
(Artículo sometido a la revista de Salud Pública) Enzimas**

Estado actual de la resistencia a insecticidas mediada por enzimas en poblaciones
de *Aedes aegypti* de una ciudad endémica de dengue en el sur de México

^{1,2}Francisco Solís-Santoyo M en C, ¹Américo D. Rodríguez PhD†, ⁴William Black
PhD, ⁴Karla Saavedra Rodríguez PhD, ²Daniel Sánchez Guillén Dr, ²Alfredo
Castillo Vera Dr, ²Rebeca González Gómez Dra, ^{1, 2}Alma Delia López-Solis M en
C, ^{1*}Rosa Patricia Penilla Navarro PhD.

¹Instituto Nacional de Salud Pública, Centro Regional de Investigación en Salud
Pública. Tapachula, Chiapas México.

²El Colegio de la Frontera Sur. Departamento de Agricultura, Sociedad y
Ambiente. Ecología de Artrópodos y Manejo de Plagas. Tapachula, Chiapas.
México.

⁴Colorado State University, College of Veterinary Medicine and Biomedical
Sciences Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Arthropod-
Borne and Infectious Diseases Laboratory, Fort Collins, Colorado, United States of
America.

*Corresponding autor

SEGUNDO ARTICULO-ENVIADO

Original message -----

From: Salud Pública de México <saludpublicamex@gmail.com>

Date: 5/27/22 11:12 PM (GMT-06:00)

To: Rosa Patricia Penilla Navarro <patypenilla@outlook.com>

Subject: [SPM] Acuse de recibo de envío 13910

Resumen

Objetivo: Identificar la resistencia a insecticidas mediada por enzimas en *Aedes aegypti* de Tapachula, México. **Métodos:** Se realizaron ensayos bioquímicos para calcular los niveles de seis enzimas en 22 sitios colectados en Tapachula y se correlacionaron con la resistencia a insecticidas ya publicada. **Resultados:** Los mosquitos de campo tuvieron niveles más altos de α -esterasas en 15 (2018) y 12 sitios (2020), β -esterasas en 7 (2018) y 6 sitios (2020), glutatión-S-transferasas en 11 (2018) y 19 sitios (2020), pNPA-esterasas en 21 (2018) y 17 sitios (2020) y citocromos P⁴⁵⁰ en 20 (2018) y 22 sitios (2020) que la cepa susceptible. Los índices publicados de resistencia al malatión y la AChEi tuvieron una correlación moderada ($r=0.459$, $P=0.03$) en 2018. **Conclusiones:** Los altos niveles enzimáticos encontrados indican su contribución en la resistencia publicada a piretroides y organofosforados en mosquitos de Tapachula, pero aún es necesario confirmarlo con pruebas de metabolismo.

Palabras clave: mecanismos de resistencia a insecticidas, enzimas de metabolismo, acetilcolinesterasa insensible, *Aedes aegypti*.

Abstract

Objective: To identify the enzyme-mediated insecticide resistance in *Aedes aegypti* in Tapachula, Mexico. **Methods:** Biochemical assays were used to determine the elevated levels of six enzymes in 22 Tapachula sites and were correlated with the insecticide resistance published. **Results:** Field mosquitoes had higher levels of α -esterases at 15 (2018) and 12 sites (2020), β -esterases at 7 (2018) and 6 sites (2020), glutathione-S-transferases at 11 (2018) and 19 sites (2020), pNPA-esterases at 21 (2018) and 17 sites (2020), and cytochromes P⁴⁵⁰ at 20 (2018) and 22 sites (2020) than the susceptible strain. In 2018, there was a moderate correlation between previously documented malathion resistance ratios and AChEi ($r=0.459$, $P=0.03$). **Conclusions:** The elevated enzyme levels may play a role in the Tapachula mosquito's resistance to pyrethroids and organophosphates. Further research into metabolism is needed to confirm this.

Keywords: insecticide resistance mechanisms, metabolism enzymes, insensitive acetylcholinesterase, *Aedes aegypti*.

Introduction

Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae), vector of dengue, Zika, chikungunya, and yellow fever, is a mosquito species with a nearly global distribution; except for yellow fever, none of the other diseases have a vaccine. Epidemiological surveillance and vector control have been crucial in preventing and reducing the transmission of these diseases.¹

Aedes aegypti is widespread throughout Mexico and the prevalence of the four dengue serotypes maintains endemic and hyperendemic transmission.² Chemical control has been the most widely used method in vector prevention and control programs; consequently, targeted applications of adulticide insecticides such as pyrethroids (PYR), organophosphates (OP), and carbamates (CARB) are carried out, while larvicides such as temephos (OP), novaluron (benzoylurea), and spinosad (macrolide) are used to eliminate larval breeding sites.³ In addition to the limited number of chemicals available for the control of *Aedes aegypti*, insecticide resistance among mosquito populations has been a cause of concern. Insecticide resistance is known to be primarily mediated by two types of mechanisms: the first due to changes in the target site of insecticides, such as the kdr mechanism reported in pyrethroid resistant populations of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*⁴⁻⁵ and in acetylcholinesterase whose mutations in *Anopheles* render it resistant to insecticides (AChEi)⁶. The second mechanism is mediated by genome modifications that control the expression of enzymes involved in the detoxification of insecticides or alter their affinity to insecticides.⁷ Esterases,⁸⁻⁹ glutathione-S-transferases (GST),¹⁰ and cytochromes P⁴⁵⁰¹¹⁻¹² are most typically related with

resistance to PYRs,¹³⁻¹⁴ although esterases also are associated with resistance to OPs and CARB.¹⁵

In endemic regions, mosquitoes are under constant insecticide pressure. In Mexico, the vector control program applies insecticides in “transmission hot spots” where disease transmission is maintained.¹⁶ Thus, mosquito populations have responded to selection pressure at a focal scale in the field.¹⁷

Here, we investigate whether *Ae. aegypti* populations from Tapachula in 2018 and 2020 exhibited resistance mediated by overexpressed enzymes and whether their acetylcholinesterase was insensitive to propoxur (AChEI), as well as whether the results of 2018 were correlated with the resistance to insecticides reported for that year.

Materials and methods

Study site

Tapachula, Chiapas is located in southern Mexico on the border with Guatemala; it is a cosmopolitan city because of its high immigration activity, which has likely made it endemic to dengue fever with outbreaks occurring throughout the year. *Aedes aegypti* were collected from 22 sites in Tapachula¹⁷ between January to April of 2018 and 2020, using 12 ovitraps per site. The ovitrap consisted of a one-liter plastic container coated with a 15 cm-wide strip of #615 filter paper that was replaced weekly for four continuous months in order to collect sufficient eggs. The biological material was sent to the Centro Regional de Investigación en Salud Pública in order to produce adult mosquitoes. Emerged mosquitoes were identified to species following the Rueda method (2004).¹⁸ Mosquitoes were housed in an

insectary at $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 70 to 80% humidity, and 12:12 photoperiod of light-to-dark. The susceptible strain New Orleans (N.O.) was utilized as a reference colony and was maintained under identical conditions.

Biochemical assays

The biochemical assays were conducted according to Penilla et al. (1998).¹⁹ Two batches of 47 three-day-old female mosquitoes were individually homogenized in 200 μl of sterile distilled water and distributed in 47 of 96 wells of Corning #3590 plate. Duplicates of 25 μl of each homogenate were dispensed onto a 96-well microplate for the acetylcholinesterase (AChE) assay. The remaining homogenates were centrifuged at 4000 rpm/ 4°C /30 min, and the supernatants were distributed in duplicates into microplates placed on ice for α - and β - esterases (20 μl), *p*-nitrophenyl acetate (*p*NPA)- esterases (10 μl), GST (10 μl), cytochromes P^{450} (20 μl), and proteins (10 μl). Each microplate had two control wells with water in place of the homogenate. All enzymatic reactions were measured using a Thermo Scientific MultiskanTM FC Microplate Photometer.

AChE assay

Two microplates were prepared using 25 μl of the homogenate, 145 μl of phosphate-Triton buffer (Triton X-100 at 1% in 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.8), and 10 μl of DTNB solution (dithiobis-2-nitrobenzoic acid 0.01 M in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0). One of the duplicates included 25 μl of ASCHI substrate (Acetylthiocholine iodide 0.01M) while the other contained 25 μl of ASCHI substrate containing 0.2% propoxur 0.1 M. The kinetics of the enzymatic

reaction was continuously monitored at 405 nm for 5 min, after which the inhibition percentage of AChE by propoxur relative to the unfettered wells was determined.

α - and β esterase assays

Using duplicates of 20 μ l of the supernatant, the first duplicate was designated for α -esterases while the second was designated for β -esterases. The first duplicate received 200 μ l of the sodium α -naphthyl acetate solution (100 μ l of 30 mM α -NA in acetone in 10 ml of 0.02M phosphate buffer, pH 7.2), while the second received 200 μ l of the sodium β -naphthyl acetate solution. The reaction was halted by adding 50 μ l of the fast blue dye solution (22.5 mg of fast blue in 2.25 ml of distilled water and 5.25 ml of 5% sodium lauryl sulfate diluted in 0.1M sodium phosphate buffer pH 7.0) after 30 min at room temperature. The reaction product was measured at a wavelength of 570 nm at a fixed point. The results were reported in nmol of product generated per min/mg of protein.

pNPA-esterases assay

To duplicates of 20 μ l of each supernatant, 200 μ l of the substrate pNPA (p -nitrophenyl acetate 100 mM in acetonitrile, and 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, 1:100) was added. pNPA activity per individual was reported in μ mol/min/mg of protein using an extinction coefficient of $18,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,²⁰ and a wavelength of 405 nm for 2 min.

Glutathione-S-transferases assay

Each replicate containing 10 μ l of supernatant was mixed with 200 μ l of GSH/CDNB (10 mM reduced glutathione prepared in 0.1M phosphate buffer, pH 6.5, and 63 mM chlorodinitrobenzene diluted in methanol). Enzyme kinetics was measured at 340 nm for 5 min. GST activity per individual was reported in mmol of

conjugated CDNB/min/mg of protein, corrected for the length of the volume and using an extinction coefficient of $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.²¹

Cytochrome P⁴⁵⁰ assay

Each replicate containing 20 μl of supernatant was first mixed with 80 μl of potassium phosphate buffer (0.0625 M, pH 7.2). Then, 200 μl of TMB solution (0.01g of 3,3,5,5-tetramethylbenzidine diluted in 5 ml of methanol and mixed with 15 μl of 0.25M sodium acetate buffer, pH 5.0) were added in duplicate. Then, each well received 25 μl of the substrate (5% hydrogen peroxide). The reaction was incubated at room temperature for two hours and measured at a wavelength of 650 nm at a fixed point. The optical density of each individual mosquito was compared to the standard curve of known concentrations of cytochrome P⁴⁵⁰ 2B4 from rabbit. The results were reported in pmol of cytochromes P⁴⁵⁰/mg of protein.

Protein assay

Each 10 μl duplicate of the homogenate was mixed with 300 μl of the Bio-Rad solution (Dye Reagent Concentrated, BioRad) (Bradford, 1976)²² in a 1:4 dilution with distilled water. Following a 5 min incubation at room temperature, the reaction was measured at 570 nm. Each mosquito's protein concentration was determined and compared to the standard curve derived from the bovine serum albumin.

The mean activity or enzymatic content of *Ae. aegypti* populations from each site was compared to that of New Orleans using the Anova, Kruskal-Wallis and Dunnet's test, with a significance of 95%. The correlation between the enzymatic activities and the resistance ratios (RR) reported in 2018 was tested using a Spearman test using the software SPSS Statistics 26.¹⁷

Results

AChE

Compared to a susceptible strain, individuals with an AChE inhibition percentage by propoxur below 60% were considered resistant.²³ In our mosquito populations, the inhibition percentages by propoxur were significantly lower at 18 of 22 sites in 2018 (those of BANV being the lowest), and in 20 of 22 sites in 2020 (those of POUN being the lowest) compared to those of the N.O. ($P < 0.0001$, Tables 1 y 2). In 2018, mosquitoes from BEN1, POUN, ELV2, and PARA in 2018, and CABE and BEN2 in 2020, did not differ significantly from the N.O. The sites of COLR in 2018 and POUND in 2020 had the highest number of mosquitoes with an inhibition percentage $< 60\%$ (Table 3).

Table 1. Means and standard deviations ($\pm$ SD) of enzyme levels in *Ae. aegypti* collected from 22 sites in Tapachula, Chiapas, Mexico, in 2018.

Site	AChE	ALFA	BETA	GST	pNPA	p ⁴⁵⁰
COLR	56.65 $\pm$ 14.57*	0.00029 $\pm$ 0.00012*	0.00012 $\pm$ 0.00008	0.4369 $\pm$ 0.28588	0.073 $\pm$ 0.028*	0.0030 $\pm$ 0.0010*
GALX	60.96 $\pm$ 15.73*	0.00034 $\pm$ 0.00019*	0.00015 $\pm$ 0.00010	1.4240 $\pm$ 1.17298*	0.089 $\pm$ 0.044*	0.0028 $\pm$ 0.0013*
BANV	56.18 $\pm$ 15.01*	0.00018 $\pm$ 0.00011	0.00009 $\pm$ 0.00006	1.6064 $\pm$ 1.64665*	0.609 $\pm$ 0.618*	0.0031 $\pm$ 0.0014*
COAP	60.39 $\pm$ 20.07*	0.00057 $\pm$ 0.00036*	0.00033 $\pm$ 0.00028*	0.6018 $\pm$ 0.31426	0.146 $\pm$ 0.095*	0.0032 $\pm$ 0.0009*
BONA	62.84 $\pm$ 12.18*	0.00039 $\pm$ 0.00023*	0.00020 $\pm$ 0.00010*	0.3615 $\pm$ 0.23212	0.094 $\pm$ 0.028*	0.0030 $\pm$ 0.0011*
16SEP	65.96 $\pm$ 17.48*	0.00048 $\pm$ 0.00018*	0.00028 $\pm$ 0.00020*	1.6716 $\pm$ 1.99763*	1.539 $\pm$ 0.678*	0.0045 $\pm$ 0.0042*
CABE	66.71 $\pm$ 15.77*	0.00028 $\pm$ 0.00014*	0.00006 $\pm$ 0.00004	0.4934 $\pm$ 0.35696	0.077 $\pm$ 0.051*	0.0042 $\pm$ 0.0013*
BEN1	70.30 $\pm$ 14.42	0.00030 $\pm$ 0.00014*	0.00017 $\pm$ 0.00008	2.2137 $\pm$ 1.91904*	0.691 $\pm$ 0.798*	0.0037 $\pm$ 0.0013*
BEN2	59.11 $\pm$ 16.10*	0.00027 $\pm$ 0.00014*	0.00012 $\pm$ 0.00010	0.7592 $\pm$ 0.65603	0.634 $\pm$ 0.702*	0.0041 $\pm$ 0.0016*
EMZA	64.69 $\pm$ 14.56*	0.00021 $\pm$ 0.00010	0.00013 $\pm$ 0.00009	0.7583 $\pm$ 0.39092	0.072 $\pm$ 0.029*	0.0028 $\pm$ 0.0007*
RAEN	58.14 $\pm$ 19.22*	0.00039 $\pm$ 0.00031*	0.00032 $\pm$ 0.00030*	1.8688 $\pm$ 1.94031*	0.367 $\pm$ 0.361*	0.0056 $\pm$ 0.0037*
POUN	68.20 $\pm$ 17.39	0.00014 $\pm$ 0.00009	0.00009 $\pm$ 0.00008	0.6285 $\pm$ 0.39073	0.085 $\pm$ 0.036*	0.0048 $\pm$ 0.0018*
PALM	83.03 $\pm$ 8.49*	0.00011 $\pm$ 0.00007	0.00005 $\pm$ 0.00004	1.4655 $\pm$ 0.63214*	0.085 $\pm$ 0.028*	0.0029 $\pm$ 0.0015
NUMI	67.87 $\pm$ 14.46*	0.00032 $\pm$ 0.00020*	0.00009 $\pm$ 0.00006	1.9726 $\pm$ 0.82069*	0.080 $\pm$ 0.058*	0.0063 $\pm$ 0.0023*
PRIM	63.23 $\pm$ 12.27*	0.00021 $\pm$ 0.00010	0.00009 $\pm$ 0.00007	0.4940 $\pm$ 0.27010	0.055 $\pm$ 0.038	0.0035 $\pm$ 0.0012*
DEMO	57.96 $\pm$ 15.47*	0.00047 $\pm$ 0.00029*	0.00026 $\pm$ 0.00016*	0.4899 $\pm$ 0.37117	0.088 $\pm$ 0.041*	0.0030 $\pm$ 0.0013*

SDEF	65.19 ± 14.25*	0.00018 ± 0.00009	0.00006 ± 0.00003	1.8980 ± 1.60710*	0.089 ± 0.038*	0.0038 ± 0.0007*
XOC1	65.30 ± 14.44*	0.00051 ± 0.00042*	0.00036 ± 0.00035*	0.5878 ± 0.34250	0.099 ± 0.040*	0.0034 ± 0.0017*
XOC2	61.66 ± 16.67*	0.00023 ± 0.00010*	0.00007 ± 0.00004	0.5153 ± 0.31117	0.092 ± 0.028*	0.0031 ± 0.0007*
ELV1	57.15 ± 19.20*	0.00022 ± 0.00016	0.00010 ± 0.00006	1.1330 ± 0.64482*	0.266 ± 0.212*	0.0044 ± 0.0011*
ELV2	71.36 ± 20.12	0.00021 ± 0.00013*	0.00008 ± 0.00005	0.9572 ± 0.45122*	0.704 ± 0.819*	0.0037 ± 0.0009*
TOTAL	63.72 ± 16.75	0.00032 ± 0.00023	0.00016 ± 0.00018	1.100 ± 1.21	0.2627 ± 0.4784	0.0037 ± 0.00195
N.O	75.80 ± 8.96	0.000165 ± 0.00009	0.00014 ± 0.00005	0.3252 ± 0.22571	0.050 ± 0.024	0.0018 ± 0.0008

* = Significantly higher than the average for the New Orleans strain (P<0.05).

Table 2. Means and standard deviations (±SD) of enzyme levels in *Ae. aegypti* collected from 22 sites in Tapachula, Chiapas, Mexico, in 2020.

Site	AChE	ALFA	BETA	GST	pNPA	p ⁴⁵⁰
COLR	67.34 ± 13.1*	0.00034 ± 0.00022*	0.00011 ± 7.8E-05	0.57± 0.31*	0.168± 0.050*	0.0041± 0.0014*
GALX	56.02 ± 14.5*	0.00044 ± 0.00017*	0.00020 ± 1.3E-04*	0.44± 0.26*	0.197± 0.062*	0.0043± 0.0019*
BANV	54.50 ± 17.2*	0.00022 ± 0.00014	0.00006 ± 3.8E-05	1.22± 0.93*	0.185± 0.052*	0.0029± 0.0011*
COAP	55.01 ± 12.8*	0.00040 ± 0.00025*	0.00017 ± 1.3E-04*	0.42± 0.25*	0.141± 0.046	0.0032± 0.0018*
BONA	67.66 ± 9.9*	0.00029 ± 0.00013	0.00007 ± 4.8E-05	0.45± 0.25*	0.136± 0.037	0.0035± 0.0014*
16SEP	67.53 ± 14.7*	0.00039 ± 0.00020*	0.00022 ± 1.4E-04*	0.36± 0.19	0.137± 0.057	0.0021± 0.0008*
CABE	73.34 ± 10.1	0.00029 ± 0.00011	0.00012 ± 7.1E-05	0.53± 0.28*	0.189± 0.047*	0.0041± 0.0030*
BEN1	59.34 ± 13.4*	0.00035 ± 0.00015*	0.00012 ± 9.2E-05	1.14± 0.93*	0.207± 0.059*	0.0036± 0.0017*
BEN2	76.25 ± 8.4	0.00028 ± 0.00012	0.00017 ± 9.8E-05*	0.44± 0.20*	0.138± 0.047	0.0023± 0.0011*
EMZA	66.44 ± 13.5*	0.00034 ± 0.00023*	0.00014 ± 1.2E-04	0.38± 0.29	0.196± 0.084*	0.0052± 0.0049*
RAEN	69.90 ± 8.7*	0.00030 ± 0.00012*	0.00007 ± 3.7E-05	0.46± 0.27*	0.141± 0.040	0.0020± 0.0014*
POUN	52.00 ± 12.1*	0.00026 ± 0.00012	0.00008 ± 5.0E-05	0.48± 0.26*	0.168± 0.037*	0.0039± 0.0016*
PALM	63.12 ± 12.1*	0.00021 ± 0.00011	0.00005 ± 4.3E-05	0.43± 0.26*	0.256± 0.073*	0.0054± 0.0032*
NUMI	61.42 ± 10.2*	0.00025 ± 0.00010	0.00009 ± 6.6E-05	0.50± 0.32*	0.205± 0.059*	0.0035± 0.0024*
PRIM	67.70 ± 16.3*	0.00030 ± 0.00010*	0.00008 ± 4.1E-05	0.51± 0.23*	0.184± 0.041*	0.0026± 0.0009*
DEMO	62.22 ± 9.3*	0.00035 ± 0.00011*	0.00024 ± 1.3E-04*	0.37± 0.18*	0.195± 0.047*	0.0037± 0.0012*
SDEF	60.10 ± 13.8*	0.00047 ± 0.00019*	0.00018 ± 8.7E-05*	0.44± 0.24*	0.468± 0.329*	0.0031± 0.0019*
XOC1	55.36 ± 22.2*	0.00034 ± 0.00015*	0.00010 ± 7.4E-05	0.46± 0.22*	0.167± 0.039*	0.0031± 0.0016*
XOC2	64.61 ± 10.9*	0.00022 ± 0.00012	0.00009 ± 6.6E-05	0.40± 0.27*	0.167± 0.044*	0.0044± 0.0025*
ELV1	59.36 ± 16.5*	0.00027 ± 0.00017	0.00012 ± 8.5E-05	0.38± 0.22*	0.210± 0.062*	0.0037± 0.0029*
ELV2	63.53 ± 13.4*	0.00036 ± 0.00015*	0.00008 ± 5.0E-05	0.37± 0.26	0.350± 0.221*	0.0031± 0.0014*

PARA	62.67 ± 12.3*	0.00025 ± 0.00012	0.00016 ± 1.1E-04	0.52 ± 0.36*	0.181 ± 0.046*	0.0046 ± 0.0031*
TOTAL	63.02 ± 14.54	0.00032 ± 0.00017	0.00013 ± 0.00010	0.511 ± 0.43	0.1993 ± 0.12339	0.0036 ± 0.00233
N.O	77.82 ± 6.4	0.00022 ± 0.00015	0.00008 ± 0.00007	0.26 ± 0.14	0.113 ± 0.077	0.0013 ± 0.0009

* = Significantly higher than the average for the New Orleans strain (P<0.05).

Table 3. Number of mosquitoes with inhibition percentages of AChE by propoxur less than 60% from 22 populations of *Aedes aegypti* from Tapachula, collected in 2018 and 2020.

Site	COLR	GALX	BANV	COAP	BONA	16SEP	CABE	BEN1	BEN2	EMZA	RAEN
2018	52	31	48	38	31	23	25	16	40	28	41
2020	19	52	54	60	17	36	4	36	4)	27	13
Site	POUN	PALM	NUMI	PRIM	DEMO	5DEF	XOC1	XOC2	ELV1	ELV2	PARA
2018	26	2	20	29	40	25	27	37	38	26	25
2020	66	29	32	24	39	38	34	31	40	22	30

n=94, except BEN1(2020) and PARA(2020) n=93, PALM(2018) n=47.

α- and β- esterases

In year 2018, mosquitoes from 15 out 22 sites exhibited considerably higher levels of α -esterases (P<0.0001), with COAP mosquitoes having the highest levels (Table 1, Fig. 2a). In 2020, the number of locations with high levels of α-esterases than N.O. reduced to 12, with 5FEB having the highest levels (Fig. 3a and Table 2).

In 2018, seven of 22 sites (COAP, BONA, 16SEP, RAEN, DEMO, XOC1 and PARA) showed β-esterases levels significantly higher than those of the susceptible (P<0.001) (Table 1, Fig. 2b). In 2020, only 6 of the 22 sites (GALX, COAP, 16SEP, BEN2 DEMO and 5DEF) had greater levels than the susceptible (P<0.0001) (Table 2).

pNPA- esterases

In 2018, mosquitoes from 21 sites exhibited higher enzyme activity than N.O. (Table 2), with the greatest values observed in 16SEP. Only PRIMA mosquitoes did not differ significantly from N.O. mosquitoes (Fig. 2c). While in 2020, only 17 sites had significant higher levels than those of the N.O. ($P < 0.0001$) (Table 2), with the greatest levels in those of 5FEB (Fig. 3c).

Glutathione S-transferases

In 2018, high activity of GST were detected at 11 out of 22 sites compared to N.O. ($P < 0.001$) (Table 1, Fig. 2d). For the year 2020, the number of sites with significantly higher levels than those of N.O. ($P < 0.001$) increased to 19, with BANV exhibiting the highest values (Table 2 and Fig. 3d).

Cytochromes P⁴⁵⁰

In 2018, mosquitoes at 20 sites had significantly higher levels than N.O. ($P < 0.0001$) (Table 1). Only mosquitoes from PARA and PALM did not differ (Fig. 2e) from N.O. In 2020, mosquitoes from all sites had significantly higher levels than those of the N.O. ($P < 0.001$) (Table 2), with PALM having the highest levels (Fig. 1e). The mosquitoes from 16SEP and RAEN in 2018 and GALX, DEMO, and 5DEF in 2020 had the greatest amounts of all enzymes.

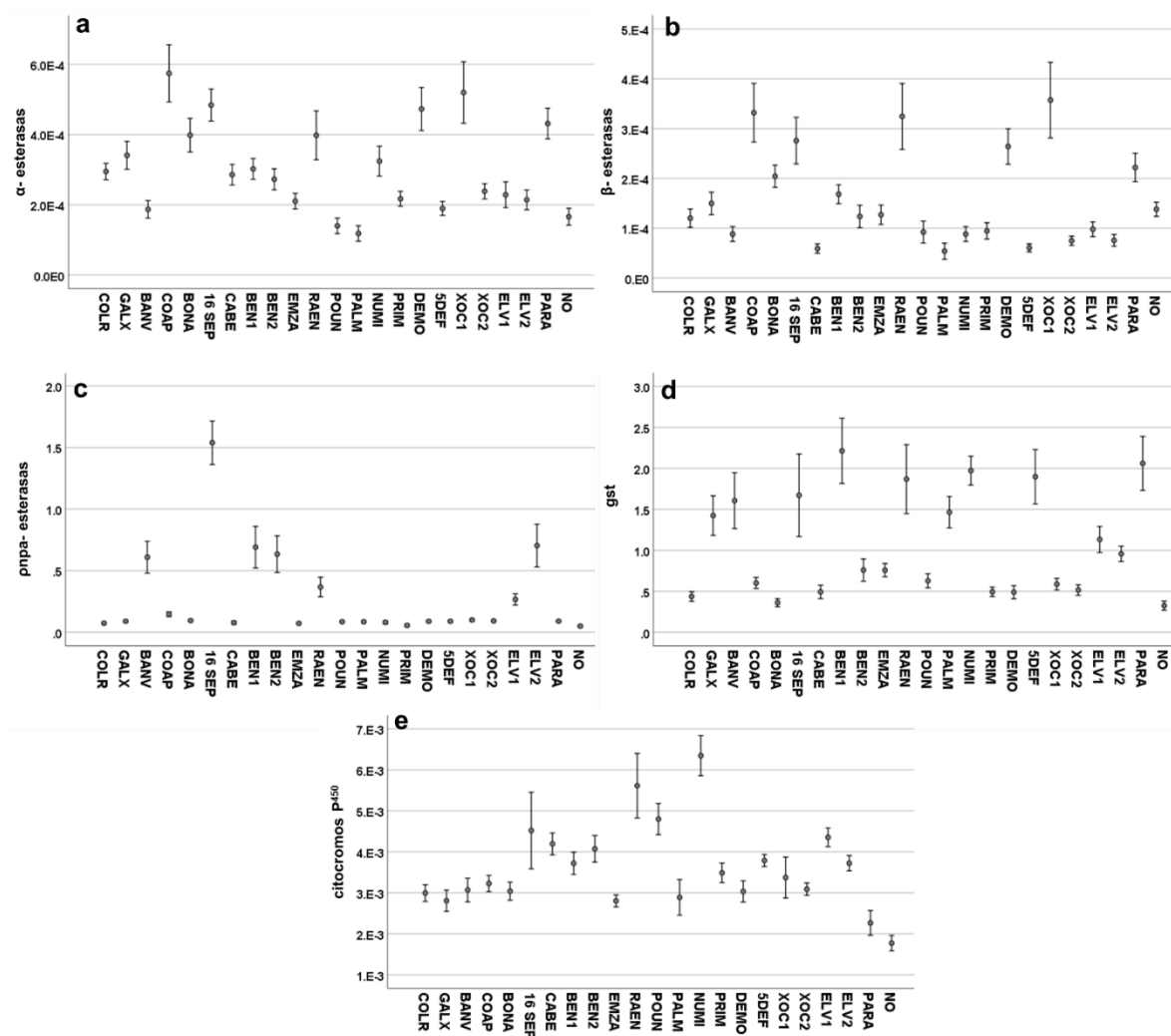


Figure 2. Means and standard deviations ($\pm$ SD) of enzyme activity among *Ae. aegypti* populations collected from 22 sites in Tapachula, Chiapas, Mexico in 2018: (a) α -esterases, (b) β -esterases, (c) pNPA-esterases; (d) GST, (e) cytochromes P₄₅₀.

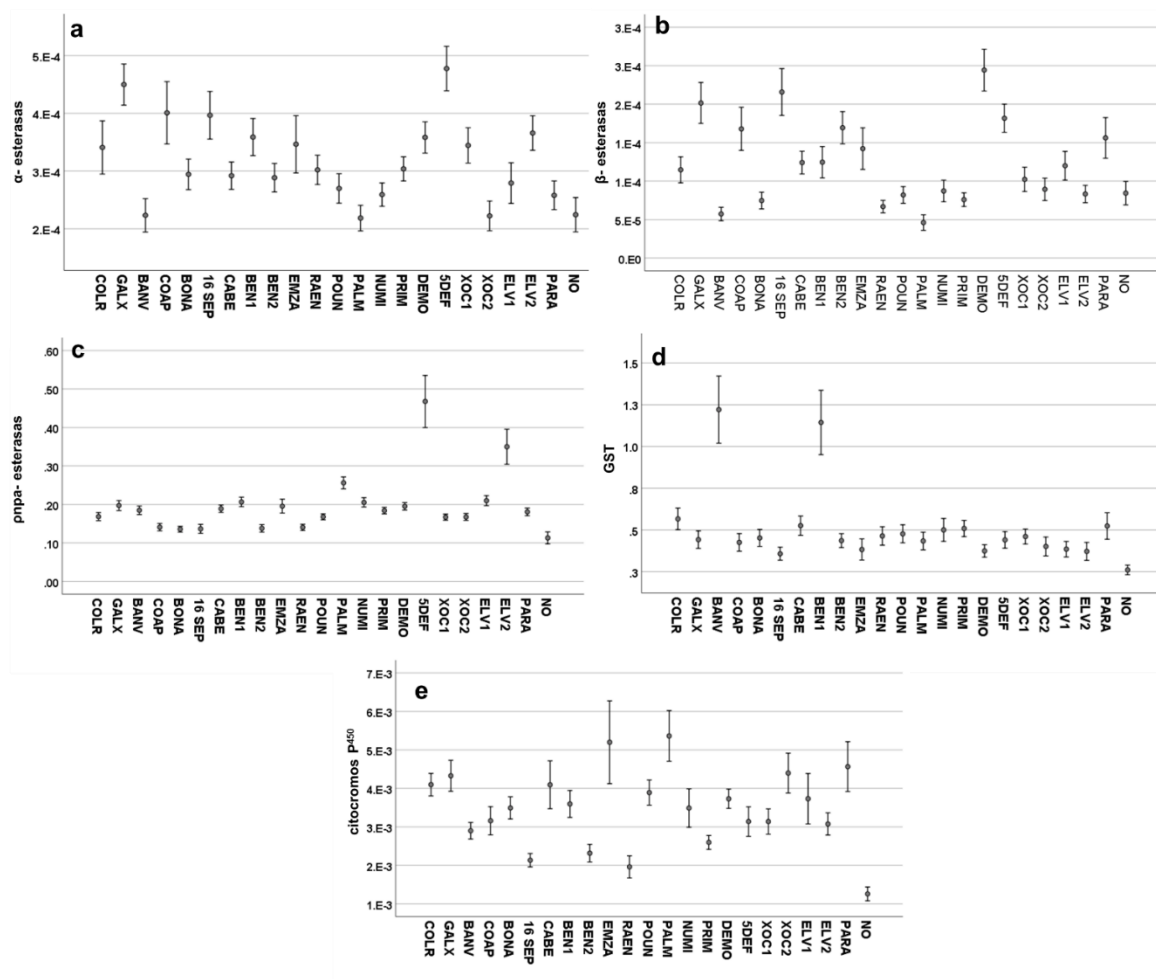


Figure 3. Means and standard deviations ($\pm$ SD) of enzyme activity among *Ae. aegypti* populations collected from 22 sites in Tapachula, Chiapas, Mexico in 2020: (a) α -esterases, (b) β -esterases, (c) pNPA-esterases; (d) glutathione S-transferases (GSTs), (e) cytochromes P⁴⁵⁰.

Enzyme levels between 2018 and 2020

Only GALX mosquitoes showed an increase in the levels of α - and β -esterases, pNPA-esterases, and cytochromes P⁴⁵⁰ from 2018 to 2020 ($P < 0.01$, Tables 1 and 2), whereas their GST levels declined significantly ($P < 0.0001$). The α -esterases levels of GALX, BEN1, EMZA, POUN, PALM, PRIM, 5DEF, and ELV2 mosquitoes

increased significantly ($P < 0.01$). β -esterases increased significantly in GALX, CABA, BEN2 and 5DEF ($P < 0.01$). The mosquitoes of 5DEF had the greatest levels of α - and β -esterases ($P < 0.0001$). The GST activities COLR y BONA increased significantly ($P < 0.01$). The activity of pNPA-esterases increased significantly in COLR, GALX, BONA, CABA, EMZA, POUN, PALM, NUMI, PRIM, DEMO, 5DEF, XOC1, XOC2 and PARA ($P < 0.0001$), with PRIM showing the greatest rise.

Significantly elevated amount of cytochromes P^{450} were detected in mosquitoes from COLR, GALX, EMZA, PALM, DEMO, XOC2 and PARA ($P < 0.02$), with those of GALX with the highest levels ($P < 0.0001$). The enzyme levels of the remaining mosquito populations fell between 2018 and 2020.

From 2018 to 2020, the levels of β - esterases, pNPA- esterases and GST among Tapachula's sites decreased significantly ($P < 0.001$, Tables 1 and 2). The levels of α -esterases and cytochromes P^{450} did not differ over the course of two years, only significantly with N.O. ($P < 0.001$, Tables 1 and 2). There was no difference in the percentage of AChE inhibition by propoxur from 2018 to 2020, only when compared to the N.O. ($P < 0.001$, Tables 1 and 2).

Discussion

The initial response of insects to insecticide exposure is an increase in their detoxification activity.²⁴ In general, esterases are involved with the metabolism of OP;²⁵⁻²⁶ however, they also contribute to cross-resistance with PYR and CARB.¹⁰ GSTs confer resistance through either direct metabolism of some insecticides or indirect protection against oxidative stress caused by insecticide exposure.²⁷⁻²⁸ In Mexican populations of *Ae. aegypti*, resistance to PYR has been attributed to

elevated levels of GST,⁹ especially in mosquito populations resistant to permethrin and deltamethrin from Tapachula in 2018,¹⁷ in this study, we report high levels of GST in 11 of 22 sites, confirming that it is a support mechanism in the oxidative stress caused by insecticide exposure. This latter mechanism likely favors deltamethrin resistance more than permethrin resistance, as permethrin resistance is particularly associated with KDR.²⁹ We also reported allele frequencies ranging from 0.16 to 0.7 for V1016I and from 0.85 to 1 for F1534C in the same 2018 populations.¹⁷ Since 2010, vector control programs in Mexico have decreased the use of PYRs, indicating that household insecticide use is likely selecting for resistance in these populations.

In Tapachula, we found 15 of 22 sites exhibiting high levels of α -esterases. Therefore, it cannot be ruled out that elevated α -esterases are related with tolerance to pyrethroids in Mexico.⁸ In our previous study¹⁷ we identified moderate chlorpyrifos resistance in 13 sites (RR= 5.2 – 7.2) and high chlorpyrifos resistance in PALM (RR = 10). From these, 9 sites had significantly elevated levels of α -esterases, suggesting they likely contribute to chlorpyrifos resistance. *Aedes aegypti* populations from Cuba, Costa Rica³⁰ and Veracruz, Mexico³¹ have been found to exhibit high levels of esterases and resistance to chlorpyrifos. In Mexico, chlorpyrifos is permitted for use in vector control, and it has been deployed in Tapachula in recent years as an ultra-low-volume space spray (ULV).³² High pNPA- esterase activity was also detected in 21 populations collected from Tapachula in both years. In addition, 20 of these populations also exhibited high levels of cytochromes P⁴⁵⁰, which rose by 2020.

Cytochromes P⁴⁵⁰ have been identified in *Ae. aegypti* PYR-resistant populations from Selangor, Malaysia.³³ These enzymes are involved in detoxification, as confirmed by the use of PBO synergizing with permethrin.³⁴ However, they are also involved in the bioactivation of Ops, converting them from their phosphorothioate form to a toxic oxon form that inhibits AChE.³⁵ AChE is the primary target of OPs and CARB; hence it becomes insensitive when mutations are selected under the persistent use of these insecticides.³⁶ Although no mutation has been identified in this enzyme in the dengue vector, we were able to identify propoxur-resistant mosquitoes among Tapachula sites, ranging from 2 to 52 out of 97 insects analyzed per site.

The elevated enzyme levels found in *Ae. aegypti* populations from Tapachula are strong indicators of their involvement in metabolic resistance to deltamethrin, permethrin, and chlorpyrifos.¹⁷ The combination of enzymes is typically more effective than the increase of a single family of enzymes in particular.¹¹ However, it is important to confirm this using insecticide metabolism tests.

These results demonstrate the value of incorporating biochemical assays into resistance monitoring as part of vector control programs activities, in order to obtain a diagnosis of the mechanisms of resistance and thereby improve the management strategies for insecticide resistance in this vector.

References

1. Wilson AL, Courtenay O, Kelly-Hope LA, Scott TW, Takken W, Torr SJ & Lindsay SW. The importance of vector control for the control and elimination

- of vector-borne disease. Plos Negl Trop. diseases 2020.14(1), e0007831.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007831>
2. Dantés HG, Farfán-Ale JA, Sarti E. Epidemiological trends of dengue disease in Mexico (2000–2011): A Systematic Literature Search and Analysis. Plos Negl Trop Dis 2014; 8(11): e3158. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003158>
 3. Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE). Monitoreo de Resistencia a Insecticidas (adulteraciones) Utilizados en el Programa Nacional de Control de Vectores en Mexico. 2014. Available from: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/MonitoreoResistenciaInsecticidas2014.pdf>.
 4. Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas, et al. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. Insect Mol Biol. 2007; 16(6):785–798. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00774.x> PMID: 18093007
 5. Aguirre-Obando OA, Martins AJ. & Navarro-Silva MA. First report of the Phe1534Cys *kdr* mutation in natural populations of *Aedes albopictus* from Brazil. Parasit Vectors 2017. 10, 160. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2089-5>
 6. Essandoh J, Yawson AE, & Weetman D. Acetylcholinesterase (Ace-1) target site mutation 119S is strongly diagnostic of carbamate and organophosphate resistance in *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles*

- coluzzii* across southern Ghana. Malaria journal, 2013. 12, 404.
<https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-404>
7. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol. 2004 Jul;34(7):653-65. doi: 10.1016/j.ibmb.2004.03.018. PMID: 15242706.
 8. Flores Adriana E, Albeldaño-Vázquez W, Fernandez-Salas I, Mohammad H. Badii, Haydeé LB, Ponce-Garcia G, et al. Elevated α -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico, Pestic Biochem Physiol, 2005. Volume 82, Issue 1, Pages 66-78, ISSN 0048-3575, <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2004.12.007>.
 9. Aponte HA, Penilla RP, Dzul-Manzanilla F, Che-Mendoza A, Lopez AD, Solis F, et al. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. Pest Biochem and Phys. 2013; 107(2):226–234. Available from: <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.07.005>.
 10. Flores AE, Grajales JS, Salas IF, Garcia GP, Becerra MH, Lozano S, et al. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. J Am Mosq Control Assoc. 2006. 22:672-7.
 11. French-Pacheco L, Rodríguez-Coto, MM, Bisset L, Juan A, Leyva R, Gutierrez-Bugallo G, et al. Actividad incrementada de las enzimas citocromo P450 monooxigenasas en cepas cubanas de *Aedes aegypti* de referencia, resistentes a insecticidas. Rev Cuba Med Trop [online]. 2013, vol.65, n.3

- [citado 2022-05-20], pp.328-338. Disponible en:
 <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602013000300006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0375-0760.
12. Jean-Philippe D, Hafany-Mahmoud I, Chandor-Proust A, Paine MJ. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 2013; 368(1612), 20120429. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0429>
 13. Constant-Av E, Koudou-G B, Louise B, Chouaibou M, Bonfoh B, Barry SJ, *et al*. Long-term trends in *Anopheles gambiae* insecticide resistance in Côte d'Ivoire. *Parasit Vectors* 2014. 7, 500. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0500-z>
 14. Riveron JM, Yunta C, Ibrahim SS, Djouaka R, Irving H, Menze BD, *et al*. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biol*. 2014 Feb 25;15(2): R27. doi: 10.1186/gb-2014-15-2-r27. PMID: 24565444; PMCID: PMC4054843.
 15. Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol*. 2000;45:371-91. doi: 10.1146/annurev.ento.45.1.371. PMID: 10761582.
 16. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Documento técnico para la implementación de intervenciones basado en escenarios operativos genéricos para el control del *Aedes aegypti*. ISBN: 978-92-75-32109-6. 2019. Washington D. C. <http://iris.paho.org>

17. Solis-Santoyo F, Rodriguez AD, Penilla-Navarro RP, Sanchez D, Castillo-Vera A, et al. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* from Tapachula, Mexico: Spatial variation and response to historical insecticide use. PLoS Negl. Trop. Dis. 2021. 15(9): e0009746. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009746>
18. Rueda L. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. Zootaxa; 2004- 589: 1-60. ISBN 1-877354-46-5. New Zealand. <http://www.mapress.com/zootaxa/>
19. Penilla RP, Rodriguez AD, Hemingway J, Torres JL, Arredondo-Jimenez JI, Rodriguez MH. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in Mexico. Med Vet Entomol 1998.12, 217–233. [PubMed: 9737593]
20. Tomoyoshi F, Haruo S, Hideki K, Sappasith K, Sitthipong N, Soottawat B, Byung-SC. "Simple preparation of pacific cod trypsin for enzymatic peptide synthesis", J of Amino Acids, vol. 2011, Article ID 912382, 8 pages <https://doi.org/10.4061/2011/912382>.
21. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem. 1974-249(22):7130-9. Available from: <http://www.jbc.org/content/249/22/7130.long>
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

- Anal Biochem. 1976. 72:248-54. Chambers, Janice & Meek, Edward & Chambers.
23. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. Insect Mol Biol. 2004 Feb;13(1):1-7. doi: 10.1111/j.1365-2583.2004.00452.x. PMID: 14728661.
 24. Martins AJ, Lins RM, Linss JG, Peixoto AA, Valle D. Voltage-gated sodium channel polymorphism and metabolic resistance in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* from Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2009; 81(1):108-115.
 25. Epelboin Y, Wang L, Giai Gianetto Q, Choumet V, Gaborit P, Issaly J, et al. CYP450 core involvement in multiple resistance strains of *Aedes aegypti* from French Guiana highlighted by proteomics, molecular and biochemical studies. PLoS ONE 2021. 16(1): e0243992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243992>
 26. Lima EP, Paiva MH, de Araújo AP, da Silva EV, da Silva UM, de Oliveira LN, et al. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. Parasit Vectors. 2011 Jan 12;4:5. doi: 10.1186/1756-3305-4-5. PMID: 21226942; PMCID: PMC3035027.
 27. Pavlidi N, Vontas J, Van Leeuwen T. The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. Curr Opin Insect Sci. 2018. 27:97-102. doi: 10.1016/j.cois.2018.04.007. Epub 2018 Apr 24. PMID: 30025642.
 28. Kostaropoulos I, Papadopoulos AI, Metaxakis A, Boukouvala E, Papadopoulou-Mourkidou E. Glutathione S-transferase in the defence

- against pyrethroids in insects. *Insect Biochem Mol Biol*. 2001. Mar 15;31(4-5):313-9. doi: 10.1016/s0965-1748(00)00123-5. PMID: 11222940.
29. Nardini L, Christian RN, Coetzer N, Ranson H, Coetzee M, Koekemoer LL. Detoxification enzymes associated with insecticide resistance in laboratory strains of *Anopheles arabiensis* of different geographic origin. *Parasit Vectors*. 2012 Jun 7;5:113. doi: 10.1186/1756-3305-5-113. PMID: 22676389; PMCID: PMC3430573. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-113>.
30. Rodríguez MM, Bisset JA, Fernández D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from some latinamerican countries. *J Am Mosq Control Assoc*. 2007; 24:420- 9.
31. Lopez B, Ponce G, Gonzalez JA, Gutierrez SM, Villanueva OK, Gonzalez G, et al. Susceptibility to chlorpyrifos in pyrethroid-resistant populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico. *J Med Entomol*. 2014 May;51(3):644-9. doi: 10.1603/me13185. PMID: 24897857; PMCID: PMC4122320.
32. Secretaria de Salud (SSA). Monitoreo de resistencia a insecticidas (adulticidas) utilizados en el programa nacional de control de vectores en México. 2014. Centro Nacional de Programas preventivos y control de enfermedades. http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/MonitoreoResistenciaInsecticidas2014_extenso.pdf. consultado 15/03/21.
33. Leong CS, Vythilingam I, Liew J.WK. Wong ML, Yusoff WS, Lau YL. Enzymatic and molecular characterization of insecticide resistance

- mechanisms in field populations of *Aedes aegypti* from Selangor, Malaysia. *Parasit Vectors*. 12, 236 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3472-1>
34. Smith LB, Kasai S, Scott JG. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: important mosquito vectors of human diseases. *Pest Biochem Physiol*. 2016;133:1–12.
35. Santori N, Buratti FM, Dorne JCM, Testai E. Phosmet bioactivation by isoform-specific cytochrome P450s in human hepatic and gut samples and metabolic interaction with chlorpyrifos. *Food Chem Toxicol: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. 2020. Sep;143:111514. DOI: 10.1016/j.fct.2020.111514. PMID: 32590074.
36. Alout H, Labbé P, Berthomieu A, Djogbénou L, Leonetti JP, Fort P, & Weill M. Novel AChE inhibitors for sustainable insecticide resistance management. *PloS One*. 2012. 7(10), e47125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047125>

CAPÍTULO IV - CONCLUSIONES GENERALES

En conclusión, a pesar de que han pasado más de 5 años de la eliminación de los piretroides de los programas de control de vectores en Tapachula, aún persisten altos niveles de resistencia a los piretroides, alelos asociados a *kdr* y niveles elevados de enzimas en poblaciones de *Ae. aegypti*.

Por otra parte, se encontró que la resistencia a los insecticidas varió espacialmente, muy probablemente como consecuencia del patrón de uso de insecticidas combinado con factores ambientales.

Los niveles elevados de enzimas que se encuentran en *Ae. aegypti* de Tapachula son fuertes indicadores de su participación en la resistencia metabólica a deltametrina, permetrina y clorpirifos. Sin embargo, es importante confirmar este mecanismo usando pruebas de metabolismo de insecticidas.

Las frecuencias alélicas de *kdr* del alelo resistente I1016 fluctuaron entre (0,16 y 0,71), y del alelo C1534 en 22 de los 26 sitios, con un rango de (0,85 a 1,0). Estas frecuencias nos demuestran su contribución con la resistencia encontrada a los piretroides.

Nuestros resultados demuestran una multiresistencia en las poblaciones de *Aedes aegypti* de Tapachula y el valor del monitoreo de resistencia como parte de las actividades de los programas de control de vectores, con el fin de obtener un diagnóstico de los mecanismos de resistencia y así mejorar las estrategias de manejo de la resistencia a insecticidas en este vector.