


DETERMINACIÓN DE DOSIS RESPUESTA Y RAZÓN DE RESISTENCIA EN LARVA DE *Aedes aegypti* L,1762 (CULICIDAE) A INSECTICIDAS PIRETROIDES Y ORGANOFOSFORADOS

Heriberto Miguel Villegas-Ramírez , Raúl Torres-Zapata, Eduardo Rebollar-Téllez, Iram Pablo Rodríguez- Sánchez, Mayra Alejandra Gómez-Govea, Gustavo Ponce-García.

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. Lab de Entomología Médica, Avenida Universidad s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolas de los Garza, N. L. C. P. 6645.

 Autor de correspondencia: h.villegasrmz28@gmail.com

RESUMEN. *Aedes aegypti* es el vector principal de los arbovirus como dengue, chikungunya, fiebre amarilla y zika. Sin embargo, existen factores macrodeterminantes responsables del desarrollo de las diferentes enfermedades como la falta de programas eficaces para el control de mosquito, el aumento en la población y el déficit de las condiciones sanitarias en zonas urbanas. Una de las principales estrategias utilizadas para la reducción de mosquitos es el control químico, donde los insecticidas organofosforados y piretroides son los más utilizados para el control de adultos y larvas. Temefos® es un insecticida organofosforado, que ha sido recomendado para el control de larvas en gran parte del mundo, mientras que los insecticidas piretroides como permetrina® son utilizados para el control de adultos. De acuerdo con lo antes mencionado, el presente trabajo se determinaron los parámetros dosis respuesta y la razón de resistencia en larvas de *Ae. aegypti* en la población de Guadalupe, N.L., y New Orleans con la finalidad de analizar el nivel de susceptibilidad en la población de campo y así presentar un manejo más racional de los insecticidas para el control de mosquitos.

Palabras clave: Larva, CL₅₀, CL₉₉, temefos® y permetrina®.

Determination of response dose and resistance ratio in *Aedes aegypti* L, 1762 (Culicidae) larvae to piretroid and organophosphorus insecticides

ABSTRACT. *Aedes aegypti* is the main vector of arboviruses such as dengue, chikungunya, yellow fever and Zika. However, there are macrodeterminant factors responsible for the development of different diseases and the lack of programs affected by mosquito control, the increase in population and the deficit of sanitary conditions in urban areas. One of the main strategies used for mosquito reduction is chemical control, where organophosphorus insecticides and pyrethroids are the most commonly used for the control of adults and larvae. Temefos® is an organophosphorus insecticide, which has been recommended for the control of larvae in much of the world, while pyrethroid insecticides such as permethrin® are used for adult control. In accordance with the aforementioned, the present work will determine the dose response parameters and the resistance ratio in *Ae. aegypti* larvae in the population of Guadalupe, N.L., and New Orleans with the determination of the analysis of the level of susceptibility in the population of the field and thus present a more rational management of insecticides for mosquito control.

Keywords: Larvae, CL₅₀, CL₉₉, temephos® and permethrin®.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores son una amenaza común para la salud mundial debido a la distribución mundial de diferentes tipos de estos (Liu *et al.*, 2019). Los mosquitos son comúnmente vectores que pueden transmitir una variedad de enfermedades infecciosas, tanto animales como humanas (Liu *et al.*, 2019). *Aedes aegypti* es el transmisor principal de diferentes enfermedades importantes, como el dengue y fiebre amarilla, también se ha asociado con los virus chikungunya y zika (Halstead, 2015; Musso *et al.*, 2015; Bottino-Rojas *et al.*, 2019; Viera *et al.*, 2020).

La propagación de los arbovirus emergentes representa un problema de salud pública mundial, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales que albergan las especies de mosquitos responsables de la transmisión de los diferentes virus (Silva *et al.*, 2019), Aproximadamente 120 millones de personas son infectadas en todo el mundo y 44 millones de personas con manifestaciones crónicas comunes por los diferentes arbovirus (Bernhard *et al.*, 2003; Maheswaran *et al.*, 2019). El hábito antropofílico y residencial de este mosquito, que prolifera en criaderos antrópicos artificiales, ha expuesto a más de la mitad de la población mundial al riesgo de estos patógenos (Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2019; OMS, 2019).

Una estrategia para la reducción de la carga asociada con las enfermedades causadas por estos arbovirus es el control de vectores, y esto se ha basado principalmente en la eliminación de criaderos y el uso de insecticidas químicos (Nkya *et al.*, 2013; Helvecio *et al.*, 2019). Los insecticidas organofosforados representan el 34 % de las ventas mundiales entre los cuales Clorpirifos, diazinon, malatión, paratión (Amiri *et al.*, 2018; Katsikantami *et al.*, 2019; Malakootian *et al.*, 2019) y temefos son utilizados como larvicidas para el control de mosquitos del género *Aedes* (Solís *et al.*, 2014; Mohiddin *et al.*, 2016).

La actividad larvicida es importante en el control del vector porque la eficacia en el agua contaminada, tiene actividad residual prolongada y se puede utilizar en cualquier estadio larvario (Chen *et al.*, 2005; Mohiddin *et al.*, 2016). Además, la deltametrina y la permetrina (clase piretroide) constituyen parte de los insecticidas comerciales y representan aproximadamente el 25 % del mercado mundial de insecticidas (Muthusamy *et al.*, 2014; Ramkumar *et al.*, 2015; Chansang *et al.*, 2018), se usan en todo el mundo como adulticidas a través de la pulverización espacial, la pulverización residual en interiores o los espirales para mosquitos (OMS, 2009).

Con base en los antecedentes que mencionan un incremento en las concentraciones de los insecticidas organofosforados y piretroides para el control del mosquito *Ae. aegypti*, el presente trabajo tiene como objetivo determinar la Dosis respuesta y la Razón de resistencia en una cepa de campo y susceptible, para así obtener un parámetro en la susceptibilidad a dichos insecticidas.

MATERIALES Y MÉTODO

Colecta de material biológico: Se realizaron muestreos en el área de estudio durante los meses de abril y mayo 2019, se colectaron larvas de distintos estudios, las cuales se obtuvieron del sitio de reproducción de los mosquitos (agua estancada en llantas) mediante el uso de bulbos. El material colectado se transportó en bolsas Whirl-Pak Nasco® dentro de termos conteniendo agua para minimizar el estrés al ser trasladado al laboratorio de Entomología Medica y Veterinaria de la UANL.

Establecimiento de la colonia en el laboratorio. Las larvas se colocaron en charolas de plástico de 35 x 25 cm conteniendo agua donde se realizó la colecta. Las larvas se alimentaron periódicamente con proteína de hígado de bovino en polvo (Liver poder MP Biomedicals, LLC) al 50 % diluido en agua, las cuales se mantuvieron a una temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa del 60 % y 12:12 L:O. Una vez que las larvas pasan al estadio de pupa, estas fueron transferidas a cámaras de emergencia, al emerger los mosquitos se trasladaron a jaulas de cría de 30 x 30 cm. Los mosquitos macho se alimentaron con agua azucarada al 10 % (fuente de carbohidratos) sobre algodones impregnados y las hembras con sangre de rata (*Rattus norvegicus*). Dentro de las jaulas se colocaron vasos de plástico con agua declorada y papel filtro como sustrato para la ovoposición. Al extraer las papeletas (con huevos) estas se dejaron secar sobre las charolas para su posterior almacenamiento y se colocaron nuevas papeletas para la obtención de más huevos. Los huevos colectados con las

papeletas se sumergieron en agua para la obtención de larvas y posteriormente adultos, hasta obtener la generación F₀ y F₁.

Pruebas de susceptibilidad a temefos y permetrina en larvas:

Preparación de solución stock

- Temefos (O, O, O’O’-tetrametil – O, O’-tiodi p-fenilen difosforotionato). Una solución stock diluida en etanol (50 mg/mL) se preparó a partir de temefos (97.7 % pureza, chem service. N-10996) de la cual posteriormente se seleccionaron concentraciones que producirán mortalidades del 10 al 90 %.
- Cis-Permetrina (3-fenoxyfenil), metil (1R,3R)-3-(2,2-dicloroetenil) 2,2- dimetilciclopropano -1-carboxilato. Una solución stock diluida en etanol (25mg/mL) se preparó a partir de permetrina (97.17 % pureza, chem service. N-11483) de la cual posteriormente se seleccionaron concentraciones que producirán mortalidades del 10 al 90 %.

Las pruebas de susceptibilidad se realizaron siguiendo la metodología propuesta por la OMS (2016): Ensayos Dosis respuesta y Dosis diagnóstico. Se utilizaron recipientes con una capacidad de 150 mL, se agregó 99 mL de agua destilada y 1 mL de la solución de insecticida, se dejó reposar por 10 minutos y se agregaron 20 larvas de estadio III tardío o IV temprano. Así mismo se incluyó un control con 99 mL de agua destilada más 1 mL de etanol. Cada concentración se realizó por triplicada, el tiempo de exposición fue de 24 horas y el criterio de mortalidad es el no movimiento o la adherencia de las larvas a los vasos.



Figura 1. Bioensayo Dosis Respuesta

Análisis de datos. Una vez obtenido los parámetros de mortalidad entre 10 a 90 %, se realizó el análisis para obtener la CL₅₀ y CL₉₉.

Los datos se analizaron en el programa IBM SPSS Statistics Provit (Versión 24, 2016) el cual se calculó la concentración letal 50 (CL₅₀) y la concentración letal 99 (CL₉₉), los intervalos de confianza con una P = 0.05, posteriormente se determinó la dosis diagnóstico (DD), la cual se calculó multiplicando la CL₉₉ por 2 (Flores, 2014).

La Dosis Diagnostico en temefos es descrita (OMS, 1998) la cual es de 0.0125 ppm.

Razón de resistencia. La razón de resistencia se determinó realizando la división de CL₅₀ y CL₉₉ de la población bajo estudio entro los obtenidos en la cepa susceptible New Orleans. Los resultados indican, que, si la RR es menor a 5, la población es susceptible, mayor o igual a 5, tolerante y si es mayor a 10, la población es considerada como resistente (Rawlins, 1998).

$$RRCL_{50} = \frac{CL_{50} \text{ Población de campo}}{CL_{50} \text{ Población susceptible}}$$

$$RRCL_{99} = \frac{CL_{99} \text{ Población de campo}}{CL_{99} \text{ Población susceptible}}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinaron los parámetros dosis respuesta y razón de resistencia en insecticidas temefos y cis-permetrina en las poblaciones de Guadalupe N.L. y la cepa susceptible New Orleans, estos valores se presentan en el cuadro 1. En temefos se para la población de Guadalupe presento una CL_{50} : 0.022 ppm y una CL_{99} : 0.0114 ppm, en la población New Orleans una CL_{50} : 0.071 ppm y una CL_{99} : 0.012 ppm, en la $RRCL_{50}$ se obtuvo 7.33, lo cual es moderadamente resistente y en RR_{99} : 9.5 de igual manera es modernamente resistente. En cis-permetrina para la población de Guadalupe obtuvo una CL_{50} : 0.071 ppm y una CL_{99} : 3.882 ppm, en la cepa New Orleans se obtuvo una CL_{50} : 0.001 ppm y una CL_{99} : 0.067 ppm, en la $RRCL_{50}$ se obtuvo 71 y en la $RRCL_{99}$ se obtuvo 57.94 lo que conlleva una resistencia en la población de Guadalupe.

Cuadro 1. Parámetro dosis respuesta (ppm) en poblaciones larvales del mosquito *Ae. aegypti* (cepa de campo) y (cepa de referencia) New Orleans.

Temefos					
Población	CL_{50} (ppm) LC	CL_{99} (ppm) LC	DD (ppm)	RR CL_{50}	RR CL_{99}
New Orleans	0.003 (0.003-0.004)	0.012 (0.009-0.019)	0.0125	*	*
Guadalupe	0.022 (0.019-0.026)	0.114 (0.080-0.207)	*	7.33	9.5
Cis-permetrina					
Población	CL_{50} (ppm) LC	CL_{99} (ppm) LC	DD (ppm)	RR CL_{50}	RR CL_{99}
New Orleans	0.001 (0.001-0.002)	0.067 (0.031-0.220)	0.134	*	*
Guadalupe	0.071 (0.056-0.091)	3.882 (1.841-12.343)	*	71	57.94

En México como en otros países se ha llevado el control de vectores transmisores de enfermedades por medio del uso de insecticidas, los mosquitos son capaces de desarrollar resistencia a la totalidad de los insecticidas usados para el control de estos, de manera que las dosis iniciales del tóxico efectivas (insecticida) no logran controlar a las poblaciones resistentes, provocando como respuesta contigua aumentar la frecuencia del tratamiento o la concentración del insecticida agravando el fracaso del control químico. En el presente trabajo se determinó el parámetro Dosis respuesta en la población de Guadalupe, N.L. y la población New Orleans (susceptible), junto con ello la razón de resistencia de los parámetros CL_{50} y CL_{99} para temefos y cis-permetrina, con el fin de analizar la susceptibilidad de la población de campo.

En esta investigación, la población de campo presento una CL_{50} de 0.022 ppm y una CL_{99} de 0.012 ppm para temefos, los cuales difieren con los valores reportados por Chávez *et al.* (2005) en 4 poblaciones de Perú, dichos valores fluctuaron entre 0.026 y 0.037 ppm, siendo más baja que los valores obtenidos en nuestro estudio y claramente más bajo para la población de New Orleans con una CL_{50} de 0.003 ppm y una CL_{99} de 0.012 ppm. Montella *et al.* (2007) menciona que temefos sea

reemplazado cuando la RR sea mayor a 3, debido a que los valores por arriba reduce la eficacia a tan solo 4 semanas. En nuestro estudio presentó una RRCL₅₀ de 7.33 y una RRCL₉₉ de 9.5, por lo que presenta una tolerancia a temefos y el uso del otro larvicida, aunque spinosad podría ser una opción viable.

Para el insecticida cis-permetrina que es más utilizado para el control de adultos en ULV, pero en este caso se utilizó como larvicida se obtuvieron una CL₅₀ de 0.071 ppm y una CL₉₉ de 3.882 ppm, junto con ello una RRCL₅₀ de 71 y una CL₉₉ de 57.94, Ocampo *et al.* (2000) obtuvo sobre las poblaciones de *Anopheles pseudopunctipennis*, donde determinaron una CL₅₀ de 0.0007 a 0.00141 ppm, esto indica una clara resistencia a los insecticidas piretroides, donde se presenta RRCL₅₀ setenta veces mayor en comparación con la cepa susceptible.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones y metodología con la que se llevó a cabo la presente investigación, se puede concluir:

Las diferencias en los valores de CL₅₀ y CL₉₉ a temefos y permetrina en poblaciones larvianas de *Ae. aegypti* en la localidad de Guadalupe N.L., nos indica variación en la susceptibilidad a estos insecticidas. Desde un punto de vista operacional el uso de temefos en México es viable pero una rotación con otro larvicida como el spinosad puede mantener la susceptibilidad por parte de los mosquitos y por parte de permetrina ya que el uso constante en el control de adultos ha provocado una resistencia.

De acuerdo con los resultados obtenidos la población de Guadalupe es tolerante en uso de insecticidas temefos y para el uso del insecticida cis-permetrina presento una alta resistencia comparado con la población susceptible.

LITERATURA CITADA

- Bottino-Rojas, V., Pereira, L.O.R., Silva, G., Talyuli, O.A.C., Dunkov, B.C., Oliveira, P.L., *et al.*, 2019. Regulación transcripcional no canónica de hemo oxigenasa en *Aedes aegypti*. *Sci. Rep.* 9(1), 13726. DOI: 10.1038/s41598-019-49396-3
- Chansang, A., Champakaew, D., Junkum, A., Jitpakdi, A., Amornlerdpison, D., Aldred, A. K. y Pitasawat, B. 2018. Sinergia en la eficacia adulticida de los aceites esenciales para la mejora de la toxicidad de la permetrina contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parásitos y vectores*, 13; 11(1): 417. DOI: 10.1186/s13071-018-3001-7
- Chavez, J. Córodva, O. e Y Vargas, F. 2005. Niveles de susceptibilidad a temefos en el vector transmisor del dengue en Trujillo, Perú. *An. Fac. Med. Lima*, 2005; 66(1) Versión impresa: 53:56 pp. ISSN 1025-5583
- Chen CD, Nazni WA, Lee H.L. y Sofian-Azirun M. Susceptibilidad de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* al temefos en cuatro sitios de estudio en el centro de Kuala Lumpur y el estado de Selangor, Malasia. Malaysian Society of Parasitology and Tropical Medicine. *Trop Biomed Journal* 2005; 22 (2): 207-16. Recuperado de <http://msptm.org/tropical-biomedicine/>
- Flores E. Adriana., 2014. Detección de resistencia a insecticidas en mosquitos con énfasis en *Aedes aegypti*. *Artrópodos y Salud* (Septiembre-Diciembre, 2014. Vol. I No. 2.). Recuperado de <http://www.artropodosysalud.com/>
- Halstead, S.B., 2015. Reaparición de chikungunya, anteriormente llamado dengue, en las Américas. *Emerg. Infectar. Dis.* 21 (4), 557e561. ISSN: 1080-6040 (print); 1080-6059 (web)
- Katsikantami, I., Colosio, C., Alegakis, A., Tzatzarakis, MN, Vakonaki, E., Rizos, AK, Sarigiannis, DA,

- Tsatsakis, AM, 2019. Estimación de la ingesta diaria y evaluación de riesgos de pesticidas organofosforados en base a biomonitorio datos: el enfoque de exposición interna. *Food Chem. Toxicol* 123, 57-71. ISSN: 18736351, 02786915
- Liu, B., Gao, X., Ma, J., Jiao, Z., Xiao, J., Hayat, M. A. y Wang, H. (2019). Modelando la distribución presente y futura de los vectores de arbovirus *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* bajo escenarios de cambio climático en China continental.
- Maheswaran, R., Baskar, K., Ignacimuthu, S., Maria Packiam, S. y Rajapandiyan, K. 2019. Bioactividad de *Couroupita guianensis* Aubl. Contra vectores filariales y dengue y peces no objetivo. *South African Journal of Botany*, 125, 46-53. ISSN: 0254-6299
- Malakootian, M., Shahesmaeili, A., Faraji, M., Amiri, H., and Silva Martinez, S. 2019. Advanced oxidation processes for the removal of organophosphorus pesticides in aqueous matrices: A systematic review and meta-analysis. *Process Safety and Environmental Protection Volume 134*, February 2020, Pages 292-307. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.12.004>
- Mohiddin, A., Lasim, A. M. y Zuharah, W. F. 2016. Susceptibilidad de *Aedes albopictus* de áreas de brotes de dengue a temefos y *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6 (4), 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.01.006>
- Musso, D., Cao-Lormeau, V.M. and Gubler, D.J., 2015. Zika Virus: Following the path of dengue and chikungunya?. *The Lancet Journals*, Volume 386 (Number 9990, Ed.1), p219-310. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61273-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61273-9)
- Muthusamy R. y Shivakumar MS. Selección de resistencia y mecanismos moleculares de resistencia a la cipermetrina en oruga peluda roja (*Amsacta albistriga* Walker). *Pesticidas Biochem Physiol.* 2014; 117: 54–61 pp. ISSN: 0048-3575
- Naddafi, K., Nabizadeh, R., Silva-Martinez, S., Shahtaheri, SJ, Yaghmaeian, K., Badiei, A., Amiri, H., 2018. Modelado de la degradación de clorpirifos por tio2 fotocatalisis bajo luz visible usando respuesta metodología de superficie. *Desalin Tratamiento de agua* 106, 220-225.
- Nkya, T.E., Akhouayri, I., Kisinza, W. y David, J.-P., 2013. Impacto del medio ambiente en la respuesta del mosquito a los insecticidas piretroides: hechos, evidencias y perspectivas. *Insecto Biochem. Mol. Biol.* 43, 407–416. Recuperado de <https://biochem-molbio.imedpub.com/>
- Pan American Health Organization (PAHO), 2018. Zika Virus Infection. Web: <https://www.paho.org/>
- Ramkumar G. y Shivakumar MS. 2015. Desarrollo de laboratorio de resistencia a permetrina y patrón de resistencia cruzada de *Culex quinquefasciatus* a otros insecticidas. *Parasitol Res.*, 114: 2553–60. ISSN: 1432-1955
- Rawlins, S. C. 1998. Distribución espacial de la resistencia a los insecticidas en las poblaciones caribeñas de *Aedes aegypti* y su importancia. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 4, 243-251. Recuperado de <https://www.paho.org/journal/es>
- Reyes-Solis Gdel C, Saavedra-Rodriguez K, Suarez AF, Black WC 4th. Mapeo QTL de las regiones del genoma que controlan la resistencia al temefos en las larvas del mosquito *Aedes aegypti*. *Plos Negl Trop Dis* 2014; 8 (10): e3177. Recuperado de <https://journals.plos.org/>
- Santos, V. S. V., Limongi, J. E. y Pereira, B. B. 2020. Association of low concentrations of pyriproxyfen and spinosad as an environment-friendly strategy to rationalize *Aedes aegypti* control programs. *Chemosphere*, (Volume 247-Jan 2020). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125795>Silva, sjrd,
- Paiva, MHS, Guedes, DRD, Krokovsky, L., Melo, fld, Silva, mald, *et al.*, 2019. Development and Validation of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Rapid Detection of ZIKV in Mosquito samples from Brazil. OMS (Organización Mundial de la Salud), *Scientific Reports volume 9*, (Article number: 4494). DOI: 10.1038/s41598-019-40960-5