

Susceptibilidad y resistencia a insecticida en mosquito transmisor del dengue

Carlos M. de la Cruz-Gallardo,⁽¹⁾ Candelario Rodríguez-Pérez,⁽²⁾ Francisco J. Ocaña-Zurita⁽³⁾

cgallardo@saludtab.gob.mx

RESUMEN

El dengue es una enfermedad viral transmitida al hombre por el mosquito *Aedes aegypti*. El control y la prevención del dengue depende en gran medida de la aplicación de insecticidas y esta medida continúa siendo una de las estrategias importantes en el control del vector *Aedes aegypti*. La utilización racional de los insecticidas contra los mosquitos vectores de enfermedades requiere de la evaluación previa de la efectividad de los insecticidas, puesto que el uso intensivo y extensivo provoca resistencia en los vectores. En esta revisión se marcan los casos de resistencia en mosquitos *Aedes aegypti* describiendo la resistencia de éstos organismos a diferentes clases de insecticidas, además se explica el proceso de los mecanismos de resistencia, la metodología de los bioensayos propuesto por la OMS y la metodología de los Center for Disease Control and Prevention (CDC). La evaluación de la susceptibilidad y/o resistencia a través de bioensayos permite determinar los niveles de resistencia en poblaciones de *Aedes aegypti* y hacer una buena toma de decisión en el uso de los insecticidas para el control vectorial. **Palabras claves:** *Aedes aegypti*, insecticida, resistencia, bioensayos.

INTRODUCCIÓN

El dengue es una de las enfermedades más importantes transmitidas por vectores en todo el mundo y representa un problema de salud pública en México, su forma grave constituye la enfermedad viral de transmisión vectorial más importante en los países tropicales y subtropicales.¹

En el 2013 en la región de las Américas, se notificaron 2,35 millones de casos de dengue; 37,687 de ellos fueron dengue grave, en ese mismo año México registró 37 mil 890 casos confirmados, los cuales provocaron 40 defunciones;² estos datos ponen de manifiesto la amenaza sanitaria que impone la adopción de medidas extraordinarias debido a las importantes consecuencias que produce desde el punto de vista de la salud e indirectamente por su afectación a la economía de nuestro país.

El dengue se distribuye en áreas urbanas y según la OMS 2009, muchas zonas urbanas han tenido un crecimiento acelerado y desorganizado con una estructura deficiente de saneamiento, escenario que favorece la expansión de poblaciones de insectos vectores. El principal vector del dengue en las Américas es el mosquito *Aedes aegypti*, la circulación de los serotipos del virus del dengue se relaciona con la distribución geográfica del vector. Debido a la ausencia de una efectiva y eficaz vacuna que proteja la población en riesgo, el control vectorial es la medida más importante para la prevención e interrupción de la transmisión en caso de epidemia. Los insecticidas son un componente clave en el control de las poblaciones de insectos.³ La mayoría de los programas de control en los países con enfermedades endémicas dependen de insecticidas para controlar los vectores del dengue. Existen más de 130 especies de insectos vectores de enfermedades transmisibles, que han desarrollado resistencia a los insecticidas, de estos vectores más de 84 son especies de mosquitos.⁴ Dentro del gran número de especies de mosquitos resistentes a la acción de los insecticidas se encuentran el *Aedes aegypti* y el *Aedes albopictus*, que desempeñan un papel importante en la transmisión de enfermedades virales, esto se traduce en un problema de salud pública debido al

⁽¹⁾ Especialista en Salud Pública. Director de Programas Preventivos. Secretaría de Salud Tabasco, México.

⁽²⁾ Maestro en Ciencias Básicas Biomédicas. Coordinador de la Unidad de Investigación Entomológica. Secretaría de Salud Tabasco, México.

⁽³⁾ Maestro en Salud Pública. Jefe del Departamento de Vectores y Zoonosis. Secretaría de Salud Tabasco, México.

desarrollo de la resistencia a insecticidas.

Se conoce que el uso intensivo y extensivo de los insecticidas ha creado una presión de selección que ha favorecido el desarrollo y evolución de la resistencia, en más de medio millón de artrópodos de importancia en salud pública, agrícola y veterinaria. La resistencia se define como el desarrollo de la habilidad en una especie de insectos para tolerar dosis altas de tóxicos, los cuales resultarían letales a la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie.⁵ Para la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la resistencia surge como resultado de la aplicación extensiva de un insecticida.⁶ Por ello, la determinación y vigilancia periódica de la susceptibilidad a insecticidas debe ser un componente importante en cualquier programa de control químico de vectores.

En México, desde hace más de una década los insecticidas piretroides y en menor medida los organofosforados, han sido ampliamente utilizados como adulticidas para el control del mosquito que transmite el virus dengue, y representan el 25% del mercado de los insecticidas en el mundo.⁷ La resistencia se ha desarrollado en cada uno de los grupos de insecticidas, especialmente en los piretroides donde existen numerosos reportes sobre la resistencia en *Aedes aegypti*. El hecho de que la resistencia a un insecticida generalmente confiere resistencia cruzada a otros insecticidas, se convierte en el problema técnico más importante que enfrentan los programas de control de vectores. En cuanto a los insecticidas organofosforados, se conoce que la resistencia de *Aedes aegypti* a este grupo está generalizada en casi toda América.⁸ Son amplios los aspectos relacionados a susceptibilidad y resistencia del vector *Aedes aegypti* para tener un impacto general del uso de insecticidas aplicados para su control.

MATERIAL Y MÉTODO

Se efectuó una búsqueda bibliográfica exhaustiva basada en todo tipo de publicaciones relacionadas al tema, incluyendo artículos de revistas especializadas de diferentes países en los idiomas inglés y español, de organizaciones públicas como la Organización Mundial de la Salud y bases de datos diversas, estos artículos se obtuvieron utilizando motores de búsqueda y visitando diferentes páginas Web. La metodología de la revisión consistió en identificar los títulos de artículos de interés, utilizando las palabras claves "*Aedes aegypti*", "insecticida", "resistencia", "bioensayos." Se revisaron los resúmenes de todos los artículos y finalmente se seleccionaron aquellos que se encontraron disponibles en texto completo. Esta revisión bibliográfica se centró en publicaciones de los años más recientes y además fueron consultadas publicaciones originales de más años por considerarse publicaciones históricas con la finalidad de tener una revisión amplia y profunda sobre el tema.

DISCUSIÓN

Características de *Aedes Aegypti*

Aedes aegypti es el agente vector del dengue y es el principal objetivo de los programas de control de vectores. Usualmente se encuentra entre las latitudes de 35° al sur y 35° al norte, aunque también se ha encontrado hasta una latitud de 45° al norte.⁹ Su distribución es limitada por la temperatura. El *Aedes aegypti* es oriundo de África, pero se ha encontrado en el Caribe por más de 350 años.¹⁰ Es un insecto con metamorfosis completa, su ciclo biológico comprende cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. Los huevos son depositados individualmente en sustratos húmedos que están sujetos a contener agua preferentemente de lluvias en recipientes artificiales domiciliarios y peri-domiciliarios. En la Unidad de Investigación Entomológica de Tabasco, México, se ha observado que los huevos pueden mantener su viabilidad hasta por más de un año, dependiendo del manejo, cuidado y tratamiento de las papeletas de ovitrampas y las condiciones ambientales. Además en condiciones ideales de temperatura y humedad, la eclosión ocurre en poco menos de 24 horas. El crecimiento y desarrollo larvario depende de la temperatura del agua, la disponibilidad de la alimentación, y densidad larvaria. La metamorfosis de larva a pupa, sucede en la fase acuática, posterior a esto ya no se alimentan y de uno a dos días emerge el adulto.¹¹

Resistencia a insecticidas

En la mayoría de los países de América Latina incluyendo México, varios tipos de insecticidas han sido usados para el control del vector, ejemplo de esto fue el DDT organoclorado que se usó extensivamente en 1960 para el control de la malaria y seguido de esto pero de forma eventual se utilizó el insecticida organofosforado malatión como adulticida en aplicaciones espaciales en 1989.¹² El uso indiscriminado de insecticidas puede producir efectos notables en la biología del vector provocando cambios de comportamiento y cambios de sus funciones vitales, además propicia el desarrollo de resistencia a estos compuestos sintéticos en los insectos.¹³ El primer caso reportado de insectos resistentes a insecticidas sintéticos fue en 1946 cuando se detectó resistencia a DDT en moscas domésticas de Suiza y Dinamarca.¹⁴ Pero a finales de la década de los cuarenta, cuando se reportó por primera vez resistencia al DDT en las especies *Aedes tritaeniorhynchus* y *Aedes sollicitans* se observó resistencia en más de cien especies de mosquitos para uno o más insecticidas de uso en salud pública a nivel mundial. Para *Aedes aegypti* se ha reportado resistencia a moléculas de insecticidas tipo organoclorados, organofosforados, piretroides y carbamatos en países de América como Argentina, Brasil, México, El Salvador, Perú, Panamá, Venezuela, Cuba, Puerto Rico, entre

otros países del Caribe.¹⁵

El insecticida organofosforado temefos es comúnmente usado para el control larvario del vector del dengue por su costo-beneficio. Como una consecuencia de este amplio uso, se ha reportado resistencia a temefos en muchos países de Latinoamérica incluyendo Brasil, Cuba, El Salvador, Argentina, Bolivia, Venezuela, Perú, y Colombia. Bisset en el año 2001 observó que algunas cepas venezolanas de *Aedes aegypti* eran resistente a temefos y presentaban valores moderados de resistencia para clorpirifos, pero todas estas cepas mostraron niveles elevados de resistencia a pirimifos metil. Sin embargo cepas cubanas, colectadas en Santiago de Cuba, mostraron moderados niveles de resistencia a temefos y pirimifos metil, y altos niveles para clorpirifos.¹⁶

Los principales mecanismos de resistencia son: alteraciones en el sitio blanco de acción y la resistencia metabólica. La resistencia mediada por alteraciones en el sitio blanco de acción, ocurre cuando el insecticida no logra unirse a su sitio específico de acción en el organismo del vector, ya sea porque hay disminución en la sensibilidad del blanco o por alguna modificación en la unión de éste.¹⁷ La resistencia metabólica se basa en la presencia de niveles elevados de enzimas detoxificantes que contribuyen a disminuir la dosis efectiva de un insecticida evitando que llegue a su sitio de acción, la vía metabólica del insecto se modifica detoxificando el insecticida o negando el metabolismo del compuesto aplicado en su forma tóxica.⁵

Los tres sistemas de detoxificación más importantes que constituyen la resistencia metabólica en insectos son: las oxidasas microsomales, la glutatión s-transferasa, de importancia en el metabolismo de insecticidas organofosforados, y las carboxilesterasas, las cuales degradan carbamatos, organofosforados y piretroides.¹⁸ La resistencia a permetrina mediada por esterases ha sido evidenciada en México en poblaciones de *Aedes aegypti*.¹⁹ La mutación KDR (Knockdown) confiere resistencia a las clases más importantes de insecticidas en mosquitos adultos.²⁰ La resistencia a piretroides se ha extendido al sur de África y se ha reportado en 27 países, vectores de malaria.²¹ El mecanismo de resistencia a piretroides en mosquitos puede ser explicado por detoxificación metabólica.

Existen otros mecanismos de resistencia menos frecuentes como son la resistencia por comportamiento y por penetración disminuida a través de la cutícula. La resistencia dada por los cambios en el comportamiento de los insectos, se traduce en una disminución del contacto con el insecticida para aumentar la probabilidad de supervivencia en un entorno tratado con insecticida. Estos cambios pueden implicar una menor tendencia del mosquito a entrar en las casas rociadas o una mayor tendencia a alejarse de las superficies tratadas una vez que se hace el contacto. La resistencia por penetración es debido a los cambios en la cutícula de los insectos. La penetración reducida otorga por lo general sólo un bajo nivel

de resistencia, pero en combinación con otros mecanismos de resistencia, puede resultar potencialmente en un aumento importante en la resistencia.²²

Resistencia cruzada y resistencia múltiple

La resistencia a insecticidas es una consecuencia de cambios genéticos que alteran procesos bioquímicos. Dichos cambios ocurren a nivel individual, pero se hacen aparentes en toda una población de insectos cuando la proporción de resistentes es tal que se refleja en una falla en el control del vector.

El mecanismo por el cual un sólo gen confiere resistencia a un número de químicos del mismo grupo, es definido a través de la resistencia cruzada, en el cual un organismo presenta resistencia de forma simultánea a distintos insecticidas de un mismo modo de acción. Ese tipo de resistencia se ve reflejado en el caso de las fosfotriesterasas que brindan resistencia a varios organofosforados, o a diferentes grupos, como el gen *kdr* que confiere resistencia al DDT y a los piretroides.

La resistencia “Knockdown” hacia los piretroides es causada frecuentemente por mutaciones no sinónimas en la proteína transmembranal del canal de sodio dependiente del voltaje, la cual reduce la unión de los piretroides.²³ Estudios demuestran la presencia de mutación en el canal de sodio dependiente del voltaje asociado a la resistencia a piretroides *kdr*, originalmente encontrada en una población resistente a permetrina de Isla Mujeres, del sur de México.²⁴ La alteración de aminoácidos responsables para el anclaje del insecticida en un sitio específico, ocasiona que sea menos efectivo o que no funcione el insecticida. Por ejemplo, el blanco para los organofosforados y carbamatos es en la sinapsis nerviosa colinérgica, y el blanco para el DDT y piretroides sintéticos son los canales de sodio a nivel axónico.

La resistencia cruzada entre DDT y piretroides puede producirse por un simple cambio en algún aminoácido, en el sitio de anclaje del insecticida en el canal de sodio del axón. Esta resistencia cruzada parece producir un cambio en la curva de activación del transporte de sodio lo que ocasiona una baja sensibilidad a piretroides. La presencia de la mutación del aminoácido isoleucina en la posición 1016 en el canal de sodio dependiente del voltaje, es asociado con el gen *kdr* por piretroides, al igual que la sustitución del aminoácido isoleucina por la metionina en la posición 1011, el cual se asocia con baja sensibilidad, estos fueron evidenciados por ensayos electrofisiológicos.²⁵ La resistencia cruzada y múltiple ha aparecido en algunas especies, dificultando el control a través del uso de químicos. La resistencia múltiple ocurre cuando un mismo organismo presenta de forma simultánea resistencia a insecticidas con diferentes modos de acción. El término de resistencia múltiple no necesariamente involucra el término de resistencia cruzada, porque un insecto puede ser resistente a dos insecticidas o más y cada

resistencia puede ser atribuida a diferentes mecanismos.⁹

Medición de la susceptibilidad y/o resistencia en *Aedes Aegypti* adultos

La resistencia se ha detectado mediante la utilización de pruebas de susceptibilidad a insecticidas, conocidas también como bioensayos, basados principalmente en pruebas de dosis-mortalidad. Estos métodos permiten cuantificar el nivel de resistencia a insecticidas, pero no detectan los mecanismos responsables de ésta.²⁶ El bioensayo es considerado como cualquier método por medio del cual alguna propiedad de alguna sustancia o material, es medida en términos de la respuesta biológica que produce. Los objetivos de mayor importancia al realizar un bioensayo, se encuentran: la determinación de varios tóxicos contra una población de insectos, la determinación de la susceptibilidad de diferentes especies de artrópodos a un tóxico, así como la cantidad de un tóxico en un sustrato.

Desde la década de los 60's el método utilizado para detectar susceptibilidad y/o resistencia a insecticidas en mosquitos adultos a través de bioensayos es el propuesto por la OMS.²⁷ Para las pruebas de la OMS los mosquitos adultos se exponen a papeletas impregnadas con una concentración única de un insecticida durante un tiempo determinado. Los mosquitos luego se trasladan a un papel sin impregnar, donde se dejan reposar en condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y con una fuente energética que consiste en una solución azucarada. El criterio de mortalidad consiste en la evaluación de mosquitos evidentemente muertos a las 24 horas después de la exposición. Siguiendo la metodología de la OMS las poblaciones con más de 98 % de mortalidad se consideran susceptibles, aquellas con menos de 80 %, resistentes, y en aquellas con 80 a 98 %, se consideran valores de vigilancia para los cuales se debe corroborar la presencia o ausencia de resistencia. El procedimiento de los bioensayos de la OMS, evalúa la respuesta de las poblaciones naturales de los mosquitos a la dosis de ingrediente activo que debería ser eficaz en condiciones de campo.¹ La metodología de la OMS presenta algunas inconveniencias como son su elevado costo, debido principalmente al envío, disponibilidad de papeletas impregnadas y la no aplicación de las dosis diagnósticas en todas las especies de vectores, además de un requerimiento de cantidad considerable de ejemplares para establecer líneas bases susceptibles. En los últimos años se ha venido implementando el uso de la técnica de las botellas impregnadas, ideado por Investigadores del CDC (Centers for Disease Control and Prevention) de Atlanta quienes simplificaron la determinación de susceptibilidad o resistencia a insecticidas en mosquitos adultos, cambiando el protocolo original y utilizando botellas de vidrio impregnadas con soluciones de un grado estándar del insecticida en lugar

de las papeletas impregnadas, el objetivo de la técnica es medir el tiempo que tarda la concentración de un insecticida en llegar al sitio blanco de acción en el mosquito.²⁸ La técnica consiste en impregnar botellas de vidrio Wheaton de 250 ml de capacidad, adicionando 1ml del insecticida grado técnico o grado comercial y 1ml de acetona para la botella control. Se tapa la botella y se hace girar la solución en todas las direcciones, de tal manera que toda la superficie de las botellas quede impregnada con el insecticida. Posteriormente se deja secar sin la tapa por espacio de dos horas. Siguiendo este procedimiento se presume que la botella queda uniformemente impregnada. Pasado el tiempo de secado, se introducen todos los insectos a la vez y se registra el número de insectos muertos en periodos de tiempo definidos o hasta que se cumplan dos horas desde el inicio. Al igual que con otros ensayos biológicos de resistencia, los datos del ensayo biológico de las botellas de los CDC necesitan ser comparados con datos de mosquitos susceptibles o de una población que servirá como referencia. Para la interpretación de resultados en relación con estrategias de control, con un porcentaje mayor del 98% al 100% de mortalidad en el tiempo diagnóstico recomendado, indica susceptibilidad en la población, entre el 80% y el 98% de mortalidad sugiere la posibilidad de resistencia y debe ser confirmada; mortalidades menores al 80% en el tiempo diagnóstico recomendado sugiere resistencia.¹⁴ La ventaja de este procedimiento es que se obtiene una respuesta toxicológica directa de un insecto a una dosis de insecticida dado, además el método provee resultados considerablemente más rápidos al propuesto por la OMS, identificando el mecanismo involucrado en los cambios de susceptibilidad. Otro punto favorable de los ensayos con botellas, es que permiten realizar pruebas con sinergistas para determinar mecanismos de resistencia presentes en la población de estudios es decir, sustancias que se unen a las enzimas que ocasionan la resistencia, por lo que permiten actuar libremente a los tóxicos, hecho que queda reflejado en los valores de susceptibilidad en los insectos resistentes.²⁹ A partir de estas pruebas de bioensayos con los insectos sobrevivientes, se facilita la confirmación de individuos resistentes mediante los ensayos bioquímicos y moleculares.³⁰ Ya que los datos obtenidos son integrados a una serie de pruebas bioquímicas aplicados a la misma población de mosquitos, además de ser mucho más sensible y versátil en cuanto a la capacidad toxicológica en los cambios de la susceptibilidad en las poblaciones.²⁸

CONCLUSIÓN

El uso intensivo y extensivo de los insecticidas para el control del mosquito vector está provocando resistencia a insecticidas tipos organoclorados, organofosforados, piretroides y carbamatos en poblaciones del mosquito transmisor del

dengue. Es necesaria la vigilancia entomológica a través de la realización de bioensayos para evaluar la susceptibilidad y resistencia a los insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti*, con la finalidad de determinar los niveles de resistencia y hacer un buen uso de los insecticidas en el control de este vector. La técnica de las botellas impregnadas propuesta por el CDC resulta ser más sensible y permite detectar pequeños cambios de susceptibilidad, además esta técnica es de fácil uso, es más rápida y práctica.

REFERENCIAS

1. L. Santacoloma, B. Chaves y H. L. Brochero, «Estado de la susceptibilidad de poblaciones naturales del vector del dengue a insecticidas en trece localidades de Colombia,» *Biomédica*, n° 32, pp. 333-43, 2012.
2. «Nota descriptiva N°117 Marzo 2014,» <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>, visitado el 17 junio del 2014.
3. M. Guzman, S. Halstead, H. Artsob, P. Buchy, J. Farrar y et al, «Dengue: a continuing global threat,» *Nature Rev Microbiol*, p. 8:S7–S16, 2010.
4. G. Falero, «Pruebas de Susceptibilidad de Mosquito Adulto y Larvas a los Insecticidas y Bioensayos de las Aplicaciones Residuales Usadas en el Control de Mosquitos Vectores de Malaria y Dengue,» pp. 2 - 47, 2001.
5. B. Mohammad H. y v. Garza, «Resistencia en Insectos, Plantas y Microorganismos,» n° 18, pp. 9-25, Enero-Febrero 2007.
6. FAO, «Pest resistance to pesticide in agriculture,» Importance, recognition and countermeasures, p. 32, 1970.
7. L. Cáceres, R. José, G. Arsenio, T. Rolando y D. I. C. Manuel, «Determinación de la sensibilidad a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en poblaciones de *Aedes aegypti* Linneaus, 1762 (Diptera: Culicidae) de Panamá,» *Biomédica*, pp. 33(Supl.1):70-81, 2013.
8. I. Braga, J. Lima, S. S. Soares y D. Valle, «*Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe, and Alagoas, Brazil,» *Mem Inst Oswaldo Cruz*, pp. 99:199-203, 2004.
9. J. A. Bisset, «Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia,» *Rev. Cubana Med Trop*, pp. 54(3):202-2019, 2002.
10. K. A. Bruce, «*Aedes aegypti* and dengue in the Caribbean,» *Mosquito News*, vol. 43, n° 3, pp. 269-275, 1983.
11. B. Eldridge, *Mosquitoes, the Culicidae en Biology of Disease Vectors* (2nd ed), W. C. Marquart y et al., Edits., Elsevier Academic Press., pp. 95-11. 2005.
12. A. E. Flores,*, p. Gustavo Ponce, B. G. Silva, S. M. Gutierrez, C. Bobadilla, B. Lopez, R. Mercado, W. C. B, W. C y I. Black, «Wide spread cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (L.) from Veracruz State Mexico» *J Econ Entomol*. 106(2) p. 959–969, 2013 April.
13. H. van den Berg, M. Zaim M, R. Yadav, A. Soares, B. Amenshewa, A. Mnzava y et al, «Global trends in the use of insecticides to control vector-borne diseases,» *Environ Health perspect.*, n° 120(4), pp. 577-82, 2012.
14. G. William, Brongdon y PhD, «Instrucciones para la evaluación de la Resistencia a Insecticidas en Vectores mediante el Ensayo Biológico de la Botella de los CDC,» *Division of Parasitic Disease and Malaria. Centers for Disease Control and Prevention.*
15. R. Maestre-Serrano y D. Gómez-Camargo, «Dengue: Epidemiología, políticas públicas y resistencia de vectores a insecticidas,» *Rev.cienc.biomed.*, 4(2) pp. 302-317, 2013.
16. J. A. Bisset, M. M. Rodríguez, M. Darjaniva, C. Díaz y L. A. Soca, «Esterasas elevadas como mecanismo de resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*,» *Rev Cubana Med Trop*, vol. 53(1), pp. 37-43, 2001.
17. J. Hemingway y H. Ranson, «Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease» *Annu. Rev. Entomol*, p. 45:371 – 391, 2000.
18. C. L. Terriere, «Induction of detoxication enzymes in insects,» *Ann Rev Entomol*, vol. 29, pp. 71-8, 1984.
19. A. Flores, G. Reyes-Solis, I. Fernández Salas, F. Sánchez-Ramos y G. Ponce, «Resistance to permethrin in *Aedes aegypti* (L.) in northern Mexico, » *Southwestern Entomologist*, n° 34, p. 167-177, 2009.
20. A. Manjarres-Suarez y J. Olivero-Verbel, «Chemical control of *Aedes aegypti*: a historical perspective,» *Rev Costarr Salud Pública*, vol. 22, n° 1, pp. 68-75, 2013.
21. R. N'Guessan, N. Corine, A. K. Andreas B. Pelagie Boko y O. Abibathou, «Mosquito Nets Treated with a Mixture of Chlorfenapyr and Alphacypermethrin Control Pyrethroid Resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes in West Africa,» *plos one*, vol. 9, 2014.
22. J. Hemingway y H. Ranson, «Elsevier Academic Press,» *Control of Vectors and Mechanisms of Resistance*, Second Edition ed., 2005, p. 785.
23. K. Saavedra Rodríguez, G. Ponce García, I. Fernández Salas, R. Torres Zapata y A. E. Flores Suárez, «Mutación asociada a la resistencia a insecticidas piretroides en el mosquito transmisor de dengue (*Aedes aegypti*),» *Ciencia UANL*, vol. XI, n° 4, 2008.
24. R. Maciel-de-Freitas, F. Campos Avenda, R. Santos, G. Sylvestre, S. Costa Araujo, J. B. Pereira Lima, A. Jesus Martins, G. E. Coelho y D. Valle, «Undesirable Consequences of Insecticide Resistance following *Aedes aegypti* Control Activities Due to a Dengue Outbreak, » *Plos one* 9(3): e92424. doi:10.1371/journal.pone.0092424, 2014.
25. C. Brengues, N. Hawkes, F. Chandre, L. McCarroll, S. Duchon, P. Guillet y et al, «Pyrethroid and DDT cross resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene,»

- Med. Vet. Entomol. 2003, pp. 17:87-94. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00412.x>, 2003.
26. M. M. Rodríguez, J. A. Bisset, D. Molina, C. Díaz y L. A. Soca, «Adaptación de los métodos en placas de microtitulación para la cuantificación de la actividad de esterasas y glutatión-s-transferasa en *Aedes aegypti*,» *Rev Cubana Med Trop*, vol. 53(1), pp. 32-36, 2001.
27. Organización Mundial de la Salud, «Resistencia a los insecticidas y lucha contra vectores. Serie de informes técnicos No. 443. 17° informe del Comité de expertos de la OMS en insecticidas,» Ginebra: OMS, 1970.
28. W. Brogdon y J. McAllister, «Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles,» *J Am Mosq Control Assoc*, vol. 14, pp. 159-164, 1998.
29. A. Lagunes-Tejeda y J. Villanueva-Jiménez, «Toxicología y manejo de insecticidas,» Colegio de Postgraduados. México, p. 264, 1994.
30. M. d. L. Graca Macoris, M. T. Macoris Andrighetti, K. d. C. Rodríguez Nalon, V. Camargo Garbeloto y A. L. Cladas Junior, «Standardization of Biossays for Monitoring Resistance to insecticide in *Aedes aegypti*,» *Dengue Boletin*, vol. 29, 2005.