

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS



MECANISMOS BIOQUIMICOS DE RESISTENCIA
EN *Aedes aegypti* (L) A PERMETRINA EN LOS
ESTADOS DE COLIMA Y JALISCO, MEXICO.

T E S I S

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE QUIMICO BACTERIOLOGO
PARASITOLOGO

P R E S E N T A

CAROLINA ELENA CORONADO AVILA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
DICIEMBRE DE 2005

TL
QL536
.C67
2005
c.1



1080170734

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS



MECANISMOS BIOQUIMICOS DE RESISTENCIA
EN *Aedes aegypti* (L) A PERMETRINA EN LOS
ESTADOS DE COLIMA Y JALISCO, MEXICO.

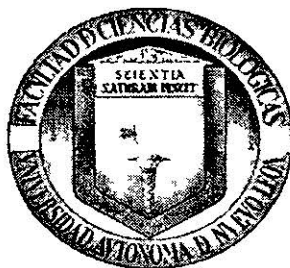
T E S I S
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE QUIMICO BACTERIOLOGO
PARASITOLOGO

P R E S E N T A
CAROLINA ELENA CORONADO AVILA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
DICIEMBRE DE 2005



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS



**MECANISMOS BIOQUIMICOS DE RESISTENCIA EN *Aedes aegypti* (L) A
PERMETRINA EN LOS ESTADOS DE COLIMA Y JALISCO, MEXICO.**

TÉSIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE QUÍMICO
BACTERIÓLOGO PARASITOLOGO**

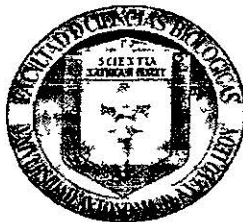
PRESENTA:

CAROLINA ELENA CORONADO AVILA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L

DICIEMBRE DEL 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE RESISTENCIA EN *Aedes aegypti* (L) A
PERMETRINA EN LOS ESTADOS DE COLIMA Y JALISCO, MEXICO.**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE QUÍMICO
BACTERIOLOGO PARASITOLOGO DE:**

CAROLINA ELENA CORONADO AVILA

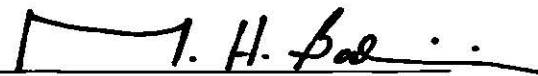
COMISION DE TESIS



DRA. ADRIANA E. FLORES SUAREZ.
Presidente



DR. GUSTAVO PONCE GARCIA
Secretario



DR.. MOHAMMAD H. BADI ZABEH
Vocal

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L

DICIEMBRE DEL 2005

Dedicatoria

A mi padre Gabino Coronado Sánchez:

Aunque ya no está aquí, le agradezco por ser un apoyo en mi vida tan solo con ser mi padre gracias.

A mi madre Norberta Ávila López:

Le doy gracias por su preocupación y apoyo en mi vida así como por ser excepcional en todos los sentidos como mujer, madre, hija..

A mis hermanos, que son muy importantes para mí ya que en todo momento me dan su apoyo en a lo largo de mi carrera, en momentos difíciles en donde la familia es lo mejor en la vida de cualquier ser humano.

A mis familiares por sus buenos consejos y preocupación al ayudarme en todo momento. Gracias por aprender cada día algo nuevo de todos ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis.

Dra. Adriana E. Flores, Por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo además del apoyo brindado en el tiempo que duro mi estancia en el Laboratorio de Entomología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Gracias por los consejos y su apoyo para la realización de la presente tesis. GRACIAS.

Al Dr. Gustavo Ronce Garcia, Por ser tan paciente y tener muy buena disponibilidad y ser una muy amable y buena persona, además de su apoyo y consejos no solo en la realización de la tesis sino como persona. Gracias.

Dr. Mohammad H. Badii. le doy las Gracias por ser parte de mi comité de tesis y por todos los conocimientos que aprendí de usted en clase.

A mis amigos de generación, Abigail, Jonathan, Carolina, Aurora, Diana, Mónica, Claudia, Francisco, Nelly, Marcial quienes son excelentes personas para conmigo.

A mis compañeros del Laboratorio de Entomología Médica, Haydee, Lupita, Dulce, Nydia, y Karla.

Al CONACYT ya que la presente tesis fue financiado dentro del proyecto 37408-N “ASSESSING THE SIGNIFICANCE OF INSECTICIDE RESISTANCE ON *Aedes aegypti* (L.) IN MEXICO”

RESUMEN

Se determinó el estado de susceptibilidad y mecanismos de resistencia de *Aedes aegypti* (L.), en 3 localidades del estado de Colima: Colima, Tecoman y Manzanillo y del estado de Jalisco 2 localidades Puerto Vallarta y Tequila. Se realizaron colectas en los criaderos típicos del vector, tales como llantas y floreros de panteones. Para establecer las colonias en el insectario de Entomología Médica; cada colonia debe de permitir obtener al menos mil hembras adultas sin alimentar y de la generación F2 debido a que ocurre una dilución en la expresión de enzimas detoxificativas, los mosquitos hembras se sometieron al insecticida permetrina para establecer la dosis diagnostico y determinar los mecanismos bioquímicos de resistencia. Se obtuvo una dosis diagnostico de 86µg/ml para el estado de Colima y 100µg/ml para Jalisco, para esto se utilizo el Método del CDC llamado "Bioensayo de botella, Brogdon de 1998 (b).

En cuanto a la determinación de las pruebas bioquímicas se analizaron 6 diferentes enzimas, Acetilcolinesterasa (AChE), Acetilcolinesterasa insensible, glutatión-S-transferasa (GST), βesterasas, αesterasas y Oxidasas utilizando la metodología de Brogdon y Mc.Allister 1998 en las cuales el homogenato del mosquito se corren por triplicado. Las absorbancias obtenidas del lector de placas se pasaron a una base de datos en Excel y estas se compararon con la cepa susceptible de New Orleans para obtener la proporción de tolerancia de los individuos.

Utilizando el análisis de varianza (ANOVA) completamente al azar, ($\alpha = 0.05$ y 0.01) la prueba de Tukey en la cual se determino las diferencias de medias entre las tres localidades para el estado de Colima y dos poblaciones para el estado de Jalisco y con la cepa susceptible de New Orleans.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	2
2.1 Epidemiología.....	2
2.1.1Epidemiología en América.....	2
2.1.2Epidemiología en México.....	5
2.1.3 Incidencia de <i>Ae. aegypti</i> en los estados de Colima y Jalisco.....	6
2.1.4Reporte semanal sobre comportamiento del dengue en México.....	7
2.2 Distribución geográfica del vector y sus reservorios.....	8
2.3Clasificación Taxonómica.....	9
2.4 Características morfológicas del vector.....	9
2.4.1 Ciclo de vida.....	10
2.4.2 Hábitos	11
2.5 Tipos de Insecticidas.....	13
2.5.1 Organoclorados	13
2.5.2 Organofosforados.....	13
2.5.3 Carbamatos	14
2.5.4 Piretroides.....	14
2.6 Origen bioquímico de los piretroides.....	14
2.6.1 Modo de acción de los piretroides.....	16
2.6.2 Metabolismo de los piretroides.....	18
2.7 Resistencia.....	19
2.7.1 Tipos de Resistencia.....	21
2.7.2 Mecanismos de Resistencia.....	22
2.7.2.1 Mecanismos de Resistencia al sitio blanco.....	22
2.7.2.2 Mecanismos detoxificativos.....	25
2.8 Control del Vector.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo general.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4 HIPOTESIS.....	28
5. MATERIAL Y METODO.....	29

5.1 Área de estudio.....	29
5.1.1 Colima.....	29
5.1.2 Jalisco.....	30
5.2 Obtención de material biológico.....	31
5.3 Ensayos (Determinación de la dosis diagnóstico).....	32
5.3.1 Metodología en la preparación de botellas.....	32
5.3.2 Selección de Individuos utilizando D.D.....	33
5.4 Enzimas de resistencia (Ensayos en Microplacas Brogdon <i>et al</i> 1984,1998,1990, 1997).....	34
5.4.1 Esterasas no específicas alfa.....	35
5.4.2 Beta esterase.....	36
5.4.3 Oxidasas.....	36
5.4.4 Acetilcolinesterasa.....	37
5.4.5.- Acetilcolinesterasa insensible.....	37
5.4.6 Glutathion s- transferasa.....	38
5.5 Análisis de resultados.....	39
6 RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	40
6.1 Dosis Diagnostico del estado de Jalisco.....	40
6.2 Dosis Diagnostico del estado de Colima.....	41
6.3 Actividad enzimática y umbral de Tolerancia.....	42
6.4 Comparaciones de las tablas del análisis de ANOVA y de comparación de medias de las seis enzimas tratadas en Jalisco.....	48
6.4.1 Comparación de la enzima Alfa esterase de individuos que no sobrevivieron.....	48
6.4.2 Comparación de la enzima Beta esterase de individuos que no sobrevivieron.....	48
6.4.3 Comparación de la enzima Oxidasas en individuos que no sobrevivieron.....	49
6.4.4 Comparación de la enzima Acetilcolinesterasa en individuos que no sobrevivieron.....	49
6.4.5 Comparación de la enzima Acetilcolinesterasa insensible en individuos que no sobrevivieron.....	50
6.4.6 Comparación de la enzima Glutathion-S-transferasa en individuos que no	50

sobrevivieron.....	
6.5 Comparaciones de las tablas del análisis de ANOVA y de comparación de medias de las seis enzimas tratadas en Jalisco.....	51
6.5.1 Comparación de la enzima Alfa esterasa de individuos que sobrevivieron.....	51
6.5.2 Comparación de la enzima Beta esterasa de individuos que sobrevivieron.....	51
6.5.3 Comparación de la enzima Oxidasas en individuos que sobrevivieron.....	52
6.5.4 Comparación de la enzima Acetilcolinesterasa en individuos que sobrevivieron.....	52
6.5.5 Comparación de la enzima Acetilcolinesterasa insensible en individuos que sobrevivieron.....	53
6.5.6 Comparación de la enzima Glutation-S-transferasa en individuos que sobrevivieron.....	53
6.6 Comparaciones de las tablas del análisis de ANOVA y de comparación de medias de las seis enzimas tratadas en Colima.....	61
6.6.1 Comparación de la enzima Alfa esterasa de individuos que no sobrevivieron.....	61
6.6.2 Comparación de la enzima Beta esterasa de individuos que no sobrevivieron.....	61
6.6.3 Comparación de la enzima Oxidasas en individuos que no sobrevivieron.....	62
6.6.4 Comparación de la enzima Acetilcolinesterasa en individuos que no sobrevivieron.....	62
6.6.5 Comparación de la enzima Acetilcolinesterasa insensible en individuos que no sobrevivieron.....	63
6.6.6 Comparación de la enzima Glutation-S-transferasa en individuos que no sobrevivieron.....	63
6.7 Comparaciones de las tablas del análisis de ANOVA y de comparación de medias de las seis enzimas tratadas en Colima.....	64
6.7.1 Comparación de la enzima Alfa esterasa de individuos que sobrevivieron.....	64

6.7.2 Comparación de la enzima Beta esterasa de individuos que sobrevivieron.....	64
6.7.3 Comparación de la enzima Oxidasas en individuos que sobrevivieron.....	65
6.7.4Comparación de la enzima Acetilcolinesterasa en individuos que sobrevivieron.....	65
6.7.5Comparación de la enzima Acetilcolinesterasa insensible en individuos que sobrevivieron.....	66
6.7.6 Comparación de la enzima Glutation-S-transferasa en individuos que sobrevivieron.....	66
7. CONCLUSIONES.....	75
8. LITERATURA CITADA.....	76
9. ANEXOS.....	81

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Mecanismos de resistencia de mosquitos adultos vivos en el estado de Jalisco.....	42
Tabla 2.- Mecanismos de resistencia de mosquitos adultos muertos en el estado de Jalisco.....	42
Tabla 3.- Mecanismos de resistencia de mosquitos adultos vivos en el estado de Colima.....	43
Tabla 4.- Mecanismos de resistencia de mosquitos adultos muertos en el estado de Colima.....	43
Tabla 5.- Proporción de Resistencia (R) de mosquitos adultos vivos en Jalisco.....	44
Tabla 6.- Proporción de Resistencia (R) de mosquitos adultos muertos en Jalisco.....	44
Tabla 7.- Proporción de Resistencia (R) de mosquitos adultos vivos en Colima.....	45
Tabla 8.- Proporción de Resistencia (R) de mosquitos adultos muertos en Colima.....	45
Tabla 9.- Proporción de Resistencia (R) de mosquitos adultos vivos y muertos en los Estados de Jalisco y de Colima.....	46
Tabla 10. -Valores del análisis de ANOVA y de comparación de medias de las seis enzimas tratadas en dos localidades del estado de Jalisco en poblaciones sobrevivientes y no sobrevivientes.....	47
Tabla 11.- Valores del análisis de ANOVA y de comparación de medias de las seis enzimas tratadas en tres localidades del estado de Colima en poblaciones sobrevivientes y no sobrevivientes.....	60
Tabla 12.- Comparación de Pares Medias y Análisis de Varianza de seis enzimas en Puerto Vallarta y Tequila.....	73
Tabla 13.- Comparación de Pares Medias y Análisis de Varianza de de seis enzimas en Colima, Tecoman y Manzanillo.....	74
Tabla 14.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Alfa esterasas de individuos que no sobrevivieron en Jalisco.....	81
Tabla 15.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Beta esterasas de individuos que no sobrevivieron en Jalisco.....	82
Tabla 16.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Oxidasas en individuos que no sobrevivieron en Jalisco.....	83
Tabla 17.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolinesterasa.....	84

en individuos que no sobrevivieron en Jalisco.....	
Tabla 18.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolinesterasa insensible en individuos que no sobrevivieron en Jalisco.....	85
Tabla 19.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Glutation-S-transferasa en individuos que no sobrevivieron Jalisco.....	86
Tabla 20.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Alfa esterasas en individuos que sobrevivieron en Jalisco.....	87
Tabla 21.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Beta esterasas en individuos que sobrevivieron en Jalisco.....	88
Tabla 22.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Oxidasas en individuos que sobrevivieron en Jalisco.....	89
Tabla 23.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolinesterasa en individuos que sobrevivieron en Jalisco.....	90
Tabla 24.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolinesterasa insensible en individuos que sobrevivieron en Jalisco.....	91
Tabla 25.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Glutation-S-transferasa en individuos que sobrevivieron en Jalisco.....	92
Tabla 26.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Alfa esterasas de individuos que no sobrevivieron en Colima.....	93
Tabla 27.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Beta esterasas de individuos que no sobrevivieron en Colima.....	94
Tabla 28.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Oxidasas en individuos que no sobrevivieron en Colima.....	95
Tabla 29.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolinesterasa en individuos que no sobrevivieron en Colima	96
Tabla 30.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolinesterasa insensible en individuos que no sobrevivieron en Colima.....	97
Tabla 31.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Glutation-S-transferasa en individuos que no sobrevivieron Colima.....	98
Tabla 32.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Alfa esterasas en individuos que sobrevivieron en Colima.....	99
Tabla 33.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Beta esterasas en individuos que sobrevivieron en Colima	100
Tabla 34.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Oxidasas en individuos que sobrevivieron en Colima	101
Tabla 35.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolonesterasa	102

en individuos que sobrevivieron en Colima.....	
Tabla 36.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolonesterasa	103
insensible en individuos que sobrevivieron en Colima	
Tabla 37.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Glutation-S-	104
transferasa en individuos que sobrevivieron en Colima.....	

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Mapa de regiones con Dengue y D.H.....	3
Figura 2.- Casos de Dengue en las Americas.....	4
Figura 3.- www.cenave.gob.mx/dengue/default/.43	5
Figura 4.- Casos de dengue hemorrágico por edad.....	7
Figura 5.- Mapa con la distribución de <i>Aedes aegypti</i>	8
Figura 6.- Hembra de <i>Aedes</i> del estado de Colima alimentándose.....	9
Figura 7.- Ciclo biológico de <i>Aedes</i>	10
Figura 8.- Alimentación diurna de <i>Aedes</i>	12
Figura 9.- Tipos de habitats de <i>Aedes</i> en cuba.....	13
Figura10.- Ejemplos de mecanismos de resistencia a nivel molecular.....	22
Figura 11.- Mapa del estado de Colima.....	29
Figura 12.- Mapa que muestra la ubicación del estado de Colima.....	30
Figura 13.- Papeleta de oviposición con huevecillos de <i>Aedes</i> y técnica de botella.....	31
Figura 14.- Homogenización de cabeza y tórax del mosquito.....	34
Figura 15.- Llenado de placas.....	34
Figura 16.- Prueba de alfa y beta esterasa.....	35
Figura 17.- Prueba enzimática de Oxidasas.....	36
Figura 18.- Prueba de Acetilcolinesterasa.....	37
Figura 19.-. Prueba de Acetilcolinesterasa insensible y material y reactivos para realizar la prueba de GST.....	38
Figura 20.- Dosis diagnóstico del estado de Jalisco.....	40
Figura 21.- Dosis diagnóstico del estado de Colima.....	41
Figura 22.- Proporción de Resistencia.....	46
Figura 23.- Distribución de Frecuencias en donde se grafican las absorbancia contra % de Frecuencias, revelando la actividad enzimática para α esterasa. Jalisco.....	54
Figura 24.- Distribución de Frecuencias en donde se grafican las Absorbancia contra % de Frecuencias, revelando la actividad enzimática para Beta esterasa.....	55
Figura 25.- Distribución de Frecuencias en donde se grafican las Absorbancia contra % de Frecuencias, revelando la actividad enzimática para Oxidasa.....	56
Figura 26.- Distribución de Frecuencias en donde se grafican las Absorbancia contra % de Frecuencias, revelando la actividad enzimática para Acetilcolinesterasa.....	57
Figura 27.- Distribución de Frecuencias en donde se grafican las Absorbancia contra % de Frecuencias, revelando la actividad enzimática para Acetilcolinesterasa insensible.....	58
Figura 28.- Distribución de Frecuencias en donde se grafican las Absorbancia contra	59

% de Frecuencias, revelando la actividad enzimatica para Glutation S Transferasa.....	
Figura 29.- Distribución de Frecuencias en donde se grafican las Absorbancia contra	67
% de Frecuencias, revelando la actividad enzimatica para α esterasa en Colima.....	
Figura 30.- Distribución de Frecuencias en donde se grafican las Absorbancia contra	68
% de Frecuencias, revelando la actividad enzimatica para Beta esterasa.....	
Figura 31.- Distribución de Frecuencias en donde se grafican las Absorbancia contra	69
% de Frecuencias, revelando la actividad enzimatica para Oxidasa.....	
Figura 32.- Distribución de Frecuencias en donde se grafican las Absorbancia contra	70
% de Frecuencias, revelando la actividad enzimatica para Acetilcolinesterasa.....	
Figura 33.- Distribución de Frecuencias en donde se grafican las Absorbancia contra	71
% de Frecuencias, revelando la actividad enzimatica para Acetilcolinesterasa	
insensible.....	
Figura 34.- Distribución de Frecuencias en donde se grafican las Absorbancia contra	72
% de Frecuencias, revelando la actividad enzimatica para Glutation S Transferasa.....	

1. INTRODUCCIÓN

El orden Díptera constituye uno de los grupos más diversificados de insectos, de los cuales se estima que en México podrían encontrarse entre 20,000 y 30,000 especies. El dengue es una enfermedad transmitida por el mosquito *Ae. aegypti* el cual en nuestro país está ampliamente establecido al poseer las condiciones óptimas para su desarrollo, aunado a las costumbres de la población en las que radica una falta de cultura al no tener un buen aseo de plantas, patios y material inservible como llantas, envases de plástico o vidrio; además la falta de servicios como lo es agua potable, vivienda, servicio de recolección de basura.

En el estado de Colima es uno de los estados que presenta mayor incidencia de casos de dengue ya que en el 2003 se suscitaron 367 casos en donde hubo 1 defunción, aunque para el estado de Jalisco no se presentaron casos en ese año para el 2003 el número de casos fue de 590, mostrándonos que hay una alta incidencia. Los sistemas de control y prevención son llevados a cabo por la Secretaría de Salud en donde principalmente se usa insecticidas como temefos (abate), malatión, permetrina dando buenos resultados, aunque el uso prolongado puede generar resistencia provocando un problema de índole ambiental, económico y de salud pública en la comunidad. Los insecticidas a emplear son de tipo organofosforados, organoclorados, y recientemente permetrinas entre otros, ya que son los que están en el mercado para el control de mosquitos; se evalúa la resistencia generada a través de pruebas bioquímicas de seis enzimas participantes en la resistencia. La investigación se ha enfatizado en los mecanismos moleculares de la resistencia y su manejo racional, para controlar el desarrollo y diseminación de poblaciones de vectores resistentes. El fin del estudio es conocer los mecanismos que le permiten al vector generar resistencia, para hacer un buen uso de planes de control y prevención específicamente en los diferentes puntos de la república mexicana tal es el caso de los estados de Colima y Jalisco. Así como sirva de referencia en otros lugares por medio de la comparación de especies, climas, distribución geográfica, tipos y nivel de resistencia al insecticida piretroide a través de la actividad enzimática y genética de poblaciones.

2. ANTECEDENTES

2.1 EPIDEMIOLOGIA

Las primeras epidemias de dengue se reportaron entre 1789 y 1780 en Asia, África y Norteamérica. Entonces se le llamó “Fiebre quebrantahuesos”, debido a los fuertes dolores musculares, articulares y óseos que sentían los enfermos. Hoy, de acuerdo a un documento de la Sociedad Chilena de Infectología, “alrededor de dos tercios de la población mundial vive en áreas de riesgo y la enfermedad se ha constituido en la segunda enfermedad tropical más importante después de la malaria, con aproximadamente 50 a 100 millones de casos, y 500 mil muertos al año por dengue hemorrágico”. En Asia, los virus son altamente endémicos en la parte meridional de China y en Hainán, Viet Nam, Laos, Camboya (kampuhea), Tailandia, Myanmar (Birmania), Bangladesh, la India, Pakistán, Sri Lanka, Indonesia, Filipinas, Malasia y Singapur; son endémicos en menor grado en Nueva Guinea, Bangladesh, Queensland, norte de Australia, virus del dengue de varios tipos. Sobre este mosquito han sido numerosos los estudios que se han realizado desde que J. Finlay en el siglo XIX, lo describiera como el agente transmisor de la fiebre amarilla. Hoy se sabe que está asociado con la transmisión de dengue, en sus formas clásica y hemorrágica. En 1909, se identificó al mosquito *Ae. aegypti* como el vector más importante, y el dengue se transformó en una de las principales preocupaciones de salud de muchos países americanos. Por ello, en las décadas de 1950 y 1960 la Organización Panamericana de la Salud, OPS, promovió en América una campaña continental para eliminar a *Aedes* en la región. El éxito de la operación derivó en que, hacia 1962, 18 países y varias islas del Caribe habían logrado erradicar el mosquito. Sin embargo, la enfermedad reapareció en los años 70, diseminándose nuevamente por varios países americanos. Antes, en 1970, sólo nueve países tenían epidemias de fiebre hemorrágica del dengue (FHD); para 1995 se cuadruplicó el número de países afectados alcanzando 41 naciones. En este punto la Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que cada año existen más de 50 millones de casos infectados por el dengue. Es decir, dos mil 500 millones de personas dos

quintas partes de la población mundial están en riesgo de padecer la enfermedad. (Cajade, 2003).

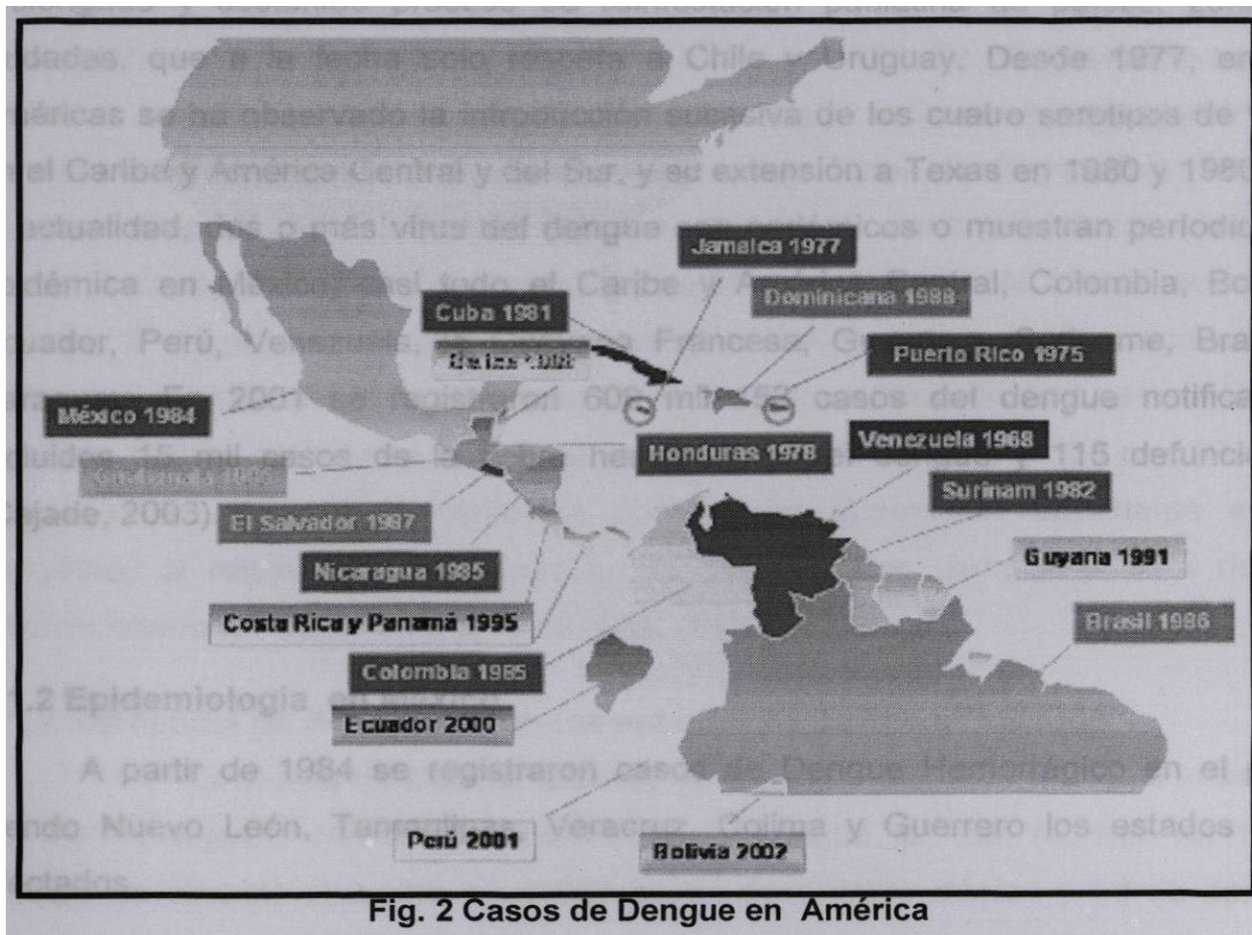


Fig. 1 Mapa de regiones con Dengue y Dengue Hemorrágico. Los puntos amarillos indican epidemias recientes (datos de OMS).

2.1.1 Epidemiología en América

Las epidemias con comprobación laboratorial comienzan en Trinidad en 1953-1954, cuando se logra el aislamiento del virus de tipo 2, o en la de Venezuela y la cuenca del Caribe en 1963-1964, con serotipificación del virus 3. La actividad de la enfermedad en América ha ido en aumento con brotes en el Caribe y las Antillas, como la epidemia de Colombia a mediados de los 70 por el serotipo 1, o la que este mismo virus provocó a partir de 1977 en Jamaica, con extensión a las otras islas caribeñas, Centroamérica y Colombia, Venezuela y Guayana.

Casos de Dengue Hemorrágico en América, según año y país de ocurrencia.

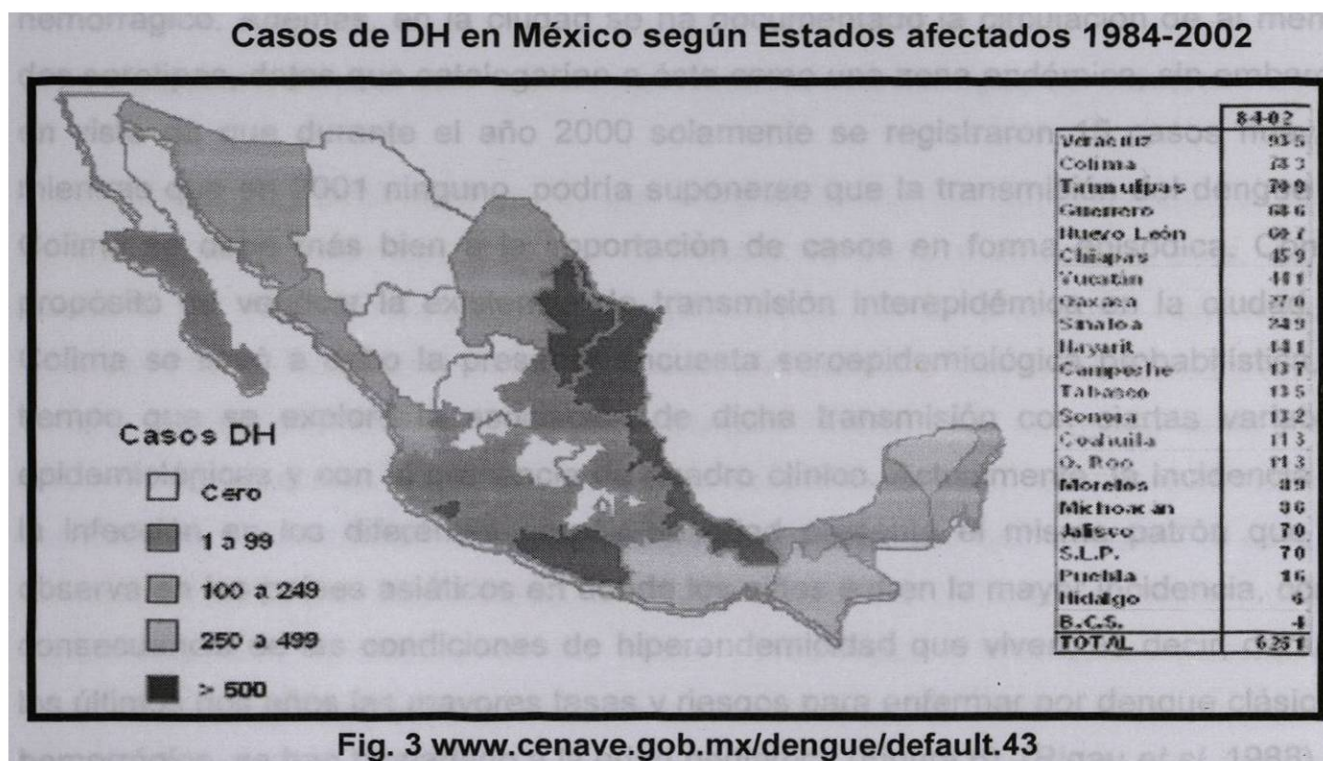


Posteriormente, el virus se introdujo en Norteamérica llegando a México, y en 1980 al estado de Texas (Estados Unidos). Pero las epidemias más importantes de la región ocurrieron en Cuba en 1981 y en Venezuela de 1989 a 1990. La epidemia en Cuba, motivada por el arribo del virus tipo 2, totalizó 344.203 casos notificados, de los cuales 10.312 fueron graves, con 158 defunciones. En el caso de Venezuela, la transmisión de los serotipos 1, 2 y 4, entre octubre de 1989 y abril de 1990, motivaron 8.619 casos notificados, con 117 defunciones y presencia comprobada de casos de fiebre hemorrágica de dengue. En 1986, sobreviene la epidemia en Río de Janeiro, que posteriormente se propaga a otros estados. Desde esas fechas, Brasil ha mantenido una casuística anual de esta enfermedad, que alcanzó a 45.238 afectados en 1994. No se han registrado, hasta la fecha, casos en la región sur (Paraná, Santa Catarina y Río Grande del Sur) del país. En la subregión del Cono

Sur (Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay), *A. aegypti* ha desarrollado un prolongado y sostenido proceso de reinfestación paulatina de países, zonas y ciudades, que a la fecha solo respeta a Chile y Uruguay. Desde 1977, en las Américas se ha observado la introducción sucesiva de los cuatro serotipos de virus en el Caribe y América Central y del Sur, y su extensión a Texas en 1980 y 1986. En la actualidad, dos o más virus del dengue son endémicos o muestran periodicidad epidémica en México, casi todo el Caribe y América Central, Colombia, Bolivia, Ecuador, Perú, Venezuela, la Guayana Francesa, Guyana y Suriname, Brasil y Paraguay. En 2001 se registraron 609 mil 152 casos del dengue notificados, incluidos 15 mil casos de la fiebre hemorrágica del dengue y 115 defunciones (Cajade, 2003).

2.1.2 Epidemiología en México

A partir de 1984 se registraron casos de Dengue Hemorrágico en el país, siendo Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Colima y Guerrero los estados más afectados.



Los primeros enfermos en el Instituto de Seguro Social fueron registrados por la delegación Yucatán en 1984. Colima notificó 4 casos en 1985; mas tarde Nuevo León informa un caso en 1986 y Tamaulipas otro en 1989. En 1990 se reportaron 5 casos de los cuales correspondieron 2 a Sinaloa y 3 a Guerrero; de igual forma, durante 1994 se registraron 9 casos en las delegaciones de Campeche (1 caso), Quintana Roo (2 casos), Sinaloa (1 caso), México (1 caso importado), Veracruz Norte (1 caso) y Yucatán (3 casos). A partir de 1995, con la identificación del serotipo 3 en el país se presenta un crecimiento explosivo en la magnitud del problema; en ese año, 14 delegaciones notificaron un total de 346 casos. Al año siguiente la cifra asciende a 546, para descender a 378 en 1997 y 120 en 1998. Sin embargo, en 1999 nuevamente se observa un incremento importante en la morbilidad al registrarse 460 casos en 12 delegaciones, aunque el 97% de los mismos ocurrieron solamente en 3 de ellas. (Rigau, 1998).

2.1.3 Incidencia de *Ae. aegypti* en los estados de Colima y Jalisco.

La ciudad de Colima, México, es una zona permanentemente infestada por *Aedes aegypti*, con brotes epidémicos de dengue, el más reciente en 1997, cuando se alcanzó una cifra de 4 851 casos de dengue clásico y 59 de dengue hemorrágico. Además, en la ciudad se ha documentado la circulación de al menos dos serotipos, datos que catalogarían a ésta como una zona endémica, sin embargo, en vista de que durante el año 2000 solamente se registraron 15 casos nuevos, mientras que en 2001 ninguno, podría suponerse que la transmisión del dengue en Colima se debe más bien a la importación de casos en forma episódica. Con el propósito de verificar la existencia de transmisión interepidémica en la ciudad de Colima se llevó a cabo la presente encuesta seroepidemiológica probabilística, al tiempo que se exploró la asociación de dicha transmisión con ciertas variables epidemiológicas y con la presencia de cuadro clínico. Actualmente, la incidencia de la infección en los diferentes grupos de edad presenta el mismo patrón que se observa en los países asiáticos en donde los niños sufren la mayor incidencia, como consecuencia de las condiciones de hiperendemicidad que viven; es decir, durante los últimos dos años las mayores tasas y riesgos para enfermar por dengue clásico y hemorrágico, se han trasladado a la edad pediátrica (Figura 6), (Rigau *et.al*, 1988).

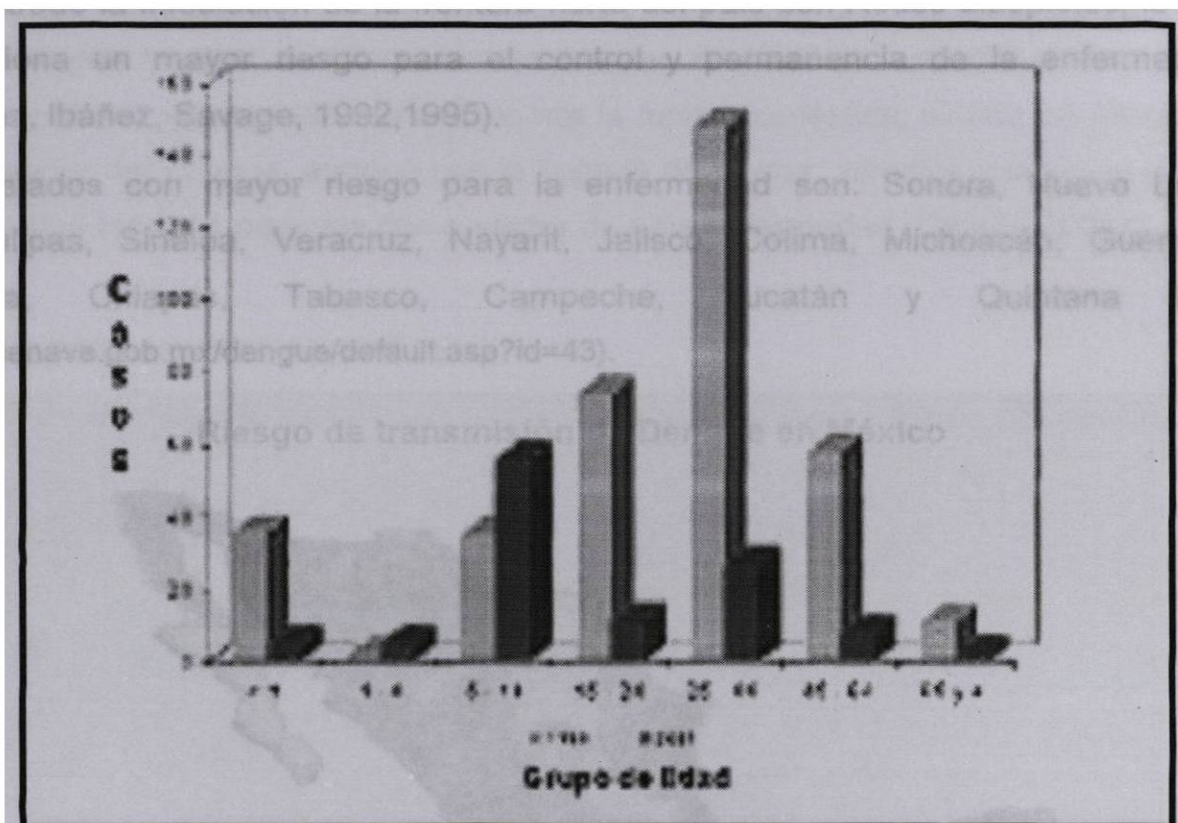


Fig. 4: Casos de Dengue Hemorrágico por Grupo de Edad en Población Derechohabiente 1999 - 2001.

2.1.4 Reporte semanal sobre el comportamiento del dengue en México

Hasta la semana número 32, que comprende del 4 al 10 de agosto del 2002, se han confirmado un total de 2 mil 394 casos de dengue en todo el país, de los cuales 2 mil 126 corresponden a dengue clásico y 268 a dengue hemorrágico, incluidas tres defunciones, una en el estado de Colima y dos en Veracruz (Revista vértigo, 2002). En México el vector ha ganado terreno y su desplazamiento hacia sitios no considerados anteriormente como propicios para su reproducción ha sido demostrado. Actualmente, más del 70% de las entidades que integran el país se encuentran infestadas por el *Aedes aegypti* y aunque no todas han registrado brotes importantes, la diseminación de los diferentes serotipos a localidades nuevas, así como la circulación simultánea de varios de ellos en una misma zona implican un riesgo latente para agravar el problema. Por otro lado, estudios recientes han

países. Ambos vectores pertenecen al subgénero *Stegomyia*. Su posible origen fue en el cinturón tropical de África, donde ocurren dos formas: una doméstica y una selvática. En América y México solo existe la forma doméstica, siendo en México el único vector del dengue, aunque con la llegada de *Aedes. albopictus* existe el riesgo de que este también participe como vector de esta enfermedad (Cajade,2003).

2.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

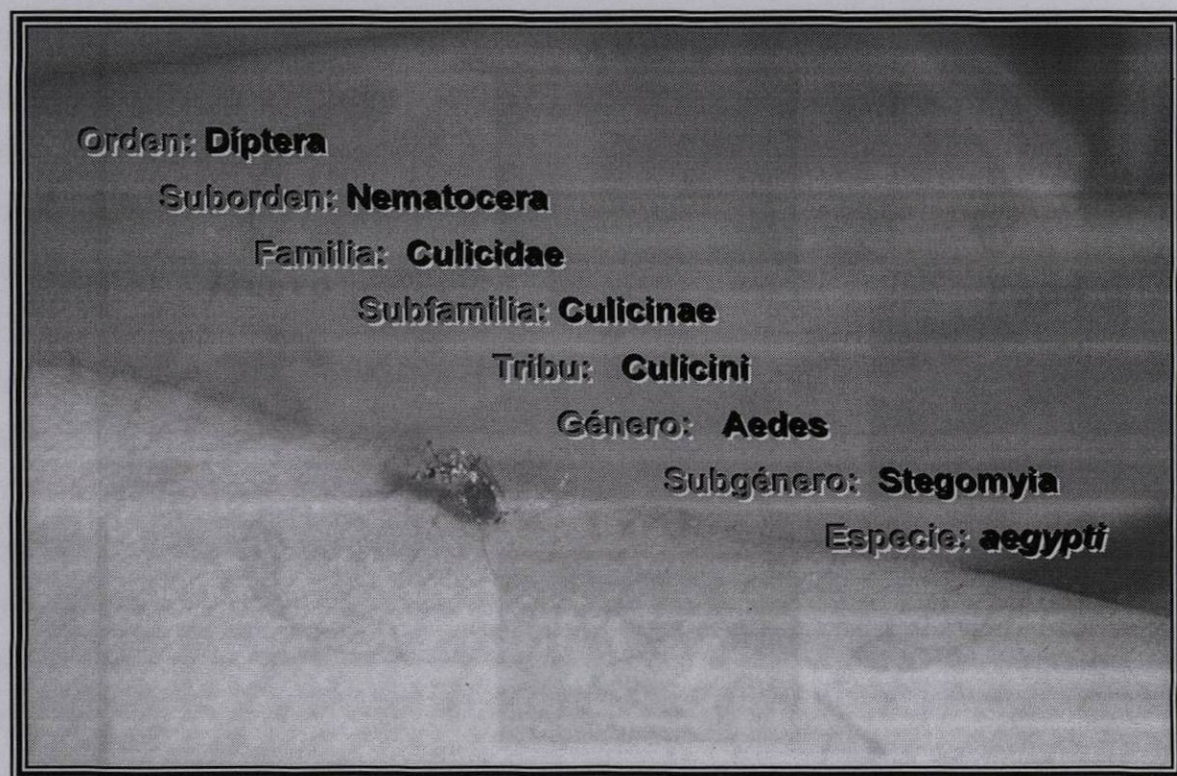


Fig 6. Hembra de *Ae. aegypti* de Colima alimentándose.

2.4 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL VECTOR

El mosquito *Ae. aegypti* es el vector más importante de los virus del dengue, de la fiebre amarilla urbana y otras arbovirosis (Lineo,1762). El tamaño depende de la concentración de nutrientes en el agua donde se desarrollaron las larvas. Su aspecto es la presencia de bandas blancas en sus patas y un dibujo en forma de lira en la cara dorsal del tórax (Hudson, *et al*, 2003).

2.4.1 Ciclo de vida:

El ciclo de vida de este mosquito presenta cuatro etapas marcadas sucesivas: huevo, cuatro estadios larvales, pupa y adulto. Los estadios larvales y el estado de pupa constituyen las etapas inmaduras y se desarrollan en el ambiente acuático; en contraste, la etapa adulta y reproductiva del insecto que representa la parte final del ciclo, se desarrolla en el ambiente terrestre y está adaptada para el vuelo y la dispersión.

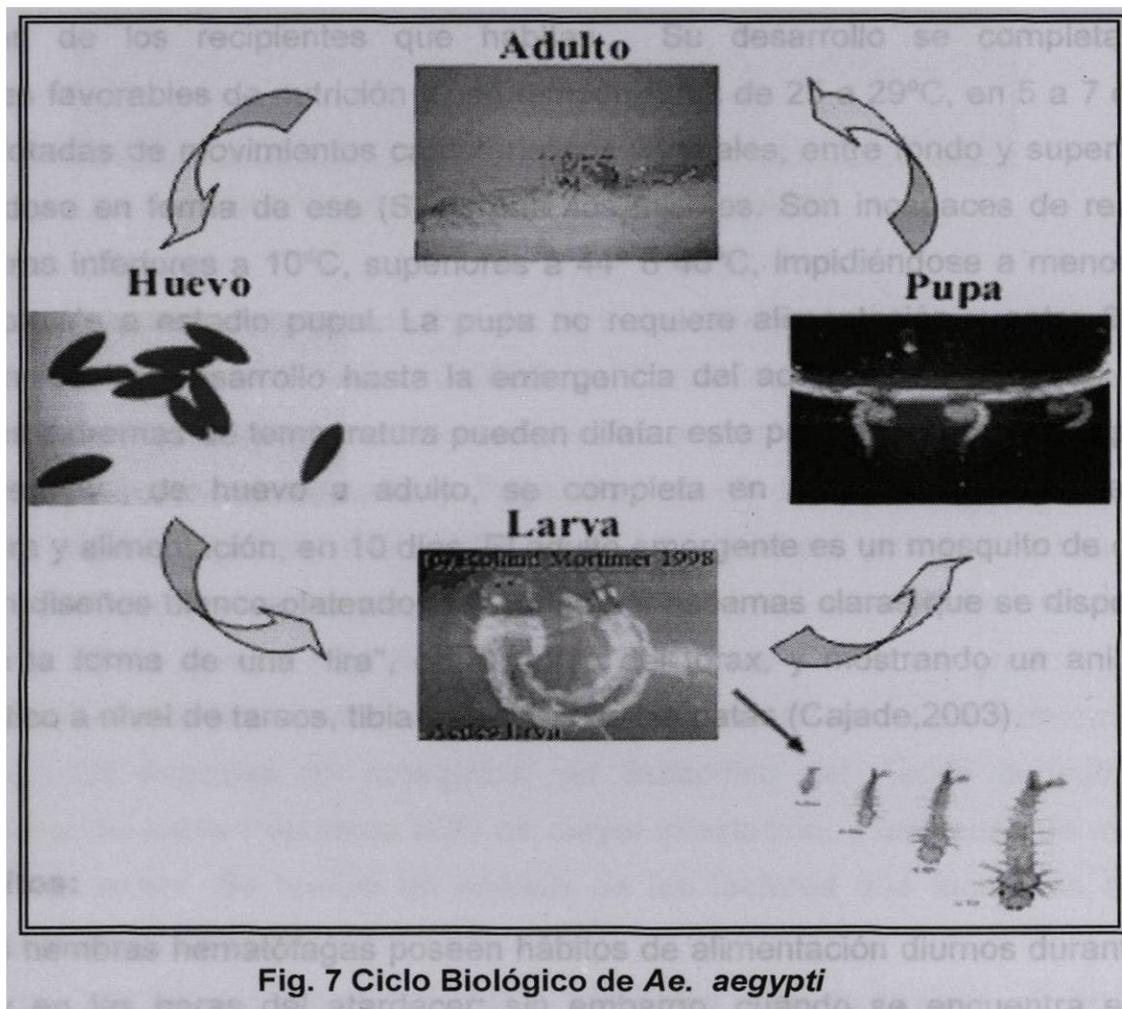


Fig. 7 Ciclo Biológico de *Ae. aegypti*

Los huevos, menores al milímetro de largo, son inicialmente de color blanco, para tornarse negros con el desarrollo del embrión, que evoluciona en óptimas condiciones de temperatura y humedad en un lapso de 2 a 3 días. Con posterioridad a ese período, los huevos son capaces de resistir desecación y temperaturas extremas con sobreviven de siete meses a un año. La mayor parte de cada postura

es de eclosión rápida, mientras un porcentaje reducido constituye los llamados huevos resistentes, inactivos o residuales, capaces de largas sobrevivencia.

Las larvas que emergen inician un ciclo de cuatro estados larvarios, creciendo a lo largo de tres mudas desde un largo de 1 mm a los 6 o 7 mm finales. Estas larvas, que poseen como caracteres morfológicos típicos fuertes espículas torácicas laterales quitinizadas, peine de escamas unilineal en octavo segmento y sifón con forma de oliva corta, que destaca por su color negro se alimentan con el zoo y fitoplancton de los recipientes que habitan. Su desarrollo se completa en condiciones favorables de nutrición y con temperaturas de 25 a 29°C, en 5 a 7 días, estando dotadas de movimientos característicos verticales, entre fondo y superficie, disponiéndose en forma de ese (S) durante los mismos. Son incapaces de resistir temperaturas inferiores a 10°C, superiores a 44° o 46°C, impidiéndose a menos de 13°C su pasaje a estadio pupal. La pupa no requiere alimentación y entre 28° y 32°C, completa su desarrollo hasta la emergencia del adulto en 1 a 3 días. Las variaciones extremas de temperatura pueden dilatar este período. El ciclo completo de *Ae. aegypti* de huevo a adulto, se completa en óptimas condiciones de temperatura y alimentación, en 10 días. El adulto emergente es un mosquito de color negro, con diseños blanco-plateados formados por escamas claras que se disponen simulando la forma de una "lira", en el dorso del tórax, y mostrando un anillado característico a nivel de tarsos, tibia y fémures de las patas (Cajade,2003).

2.4.2 Hábitos:

Las hembras hematófagas poseen hábitos de alimentación diurnos durante la mañana y en las horas del atardecer; sin embargo, cuando se encuentra en el interior de las viviendas puede alimentarse por la noche, si hay luz. Viven en depósitos de agua, ubicados en objetos o construcciones, como neumáticos, baterías viejas, recipientes de todo tipo, botellas, floreros y piletas, entre otros, le sirven a *Ae. aegypti* para establecer sus criaderos en agua limpia, con bajo tenor orgánico y de sales disueltas, mediante la puesta de huevos en la superficie del recipiente a la altura de la interfase agua, aire (Stambouljan, 2002).

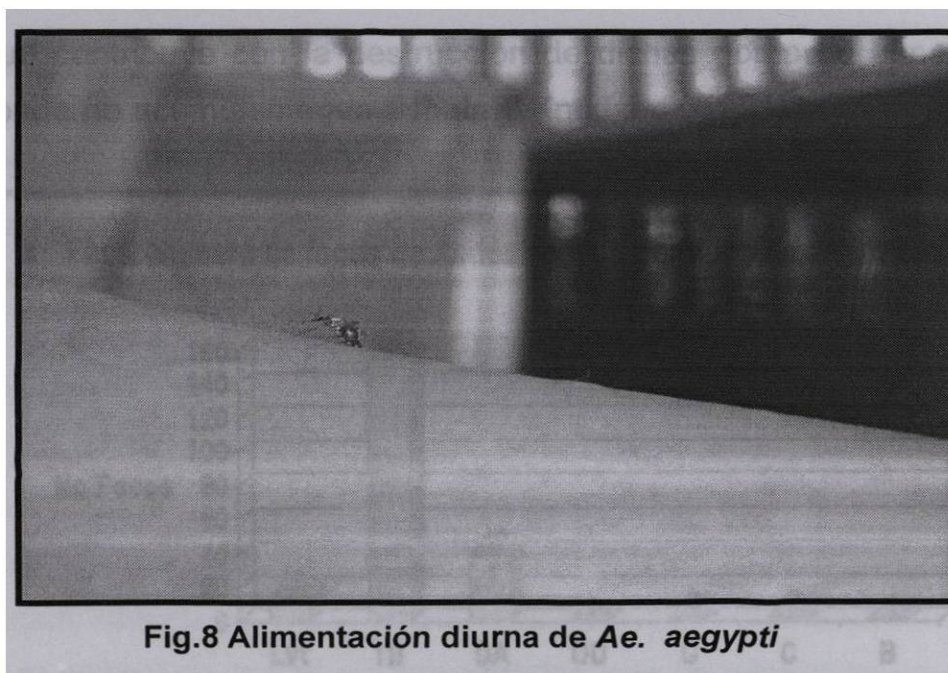
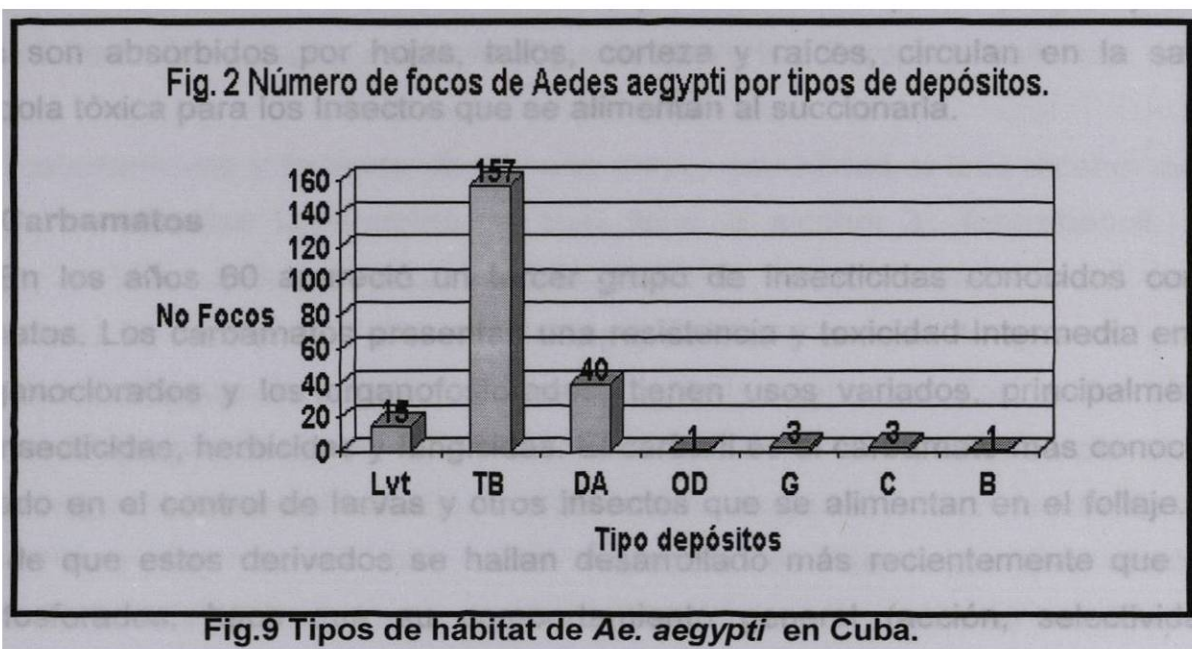


Fig.8 Alimentación diurna de *Ae. aegypti*

Se realizó un trabajo descriptivo de la incidencia y comportamiento del *Ae. aegypti*, desde el año 1997 hasta el 2002, en el municipio de Jiguaní, Cuba. Se determinaron los depósitos más utilizados por *Ae. aegypti* y para ello se empleó la clasificación realizada por Armada y Trigo. Se trabajó con: tanques bajos (TB); tanques elevados (TE); depósitos artificiales (DA); cisternas, pozos y aljibes (C), barriles y toneles (B) y otros depósitos (OD). Además se consideraron los focos encontrados en la gomas (G), no incluida en ninguno de estos grupos y las larvitrapas (Lvt), sistema este introducido al medio por el hombre para determinar la presencia de especies de mosquitos, en específico del *Aedes aegypti*. Se analizaron los Consejos Populares (CP) de mayor infestación, y las zonas de mayor incidencia del vector. Se realizó un análisis de los factores que incidieron en la positividad de los mismos (Armada, Trigo 1981).

En la mayoría de los casos estos depósitos son destruibles, o no son necesarios tenerlos con agua, pues no constituyen una fuente de almacenamiento de agua. Los recipientes artificiales que más se encontraron fueron tasas de baños en desuso, recipientes abandonados en los patios, fregaderos o lavaderos con agua que no es utilizada, entre otros. Situación similar ocurre con las gomas, que aunque se describe como sitios habituales de cría, existe una incidencia muy baja en el municipio. La preferencia del mosquito por las gomas es muy conocida por las

familias, lo que contribuye con la destrucción de dichas gomas o almacenamiento bajo techo, donde no acumulen agua (Nhatan, Knudsen , 1991).



2.5 TIPOS DE INSECTICIDAS

2.5.1 Organoclorados

Son los primeros insecticidas por contacto residual desarrollados a partir de los cuarenta, estos compuestos provocaron una revolución en el combate de los insectos, por su amplio intervalo o espectro de acción y su bajo costo, se han usado de manera intensiva para controlar plagas agrícolas y de importancia médica. Poseen baja toxicidad para mamíferos y otras especies de sangre caliente, sin embargo, sus residuos son de gran persistencia en el ambiente, además debido a su alto grado de afinidad por los lípidos, se acumulan en los tejidos grasos de muchos organismos a través del proceso de la biomagnificación en la cadena trófica.

2.5.2 Organofosforados

Son más tóxicos para vertebrados que los compuestos organoclorados y no son persistentes en el medio ambiente, principal causa que motivó la sustitución en

el uso de los organoclorados por los OF's. La mayoría de los organofosforados actúan como insecticidas de contacto, fumigantes y de acción estomacal, pero también se encuentran materiales sistémicos, que cuando se aplican al suelo y a las plantas son absorbidos por hojas, tallos, corteza y raíces, circulan en la savia haciéndola tóxica para los Insectos que se alimentan al succionarla.

2.5.3 Carbamatos

En los años 60 apareció un tercer grupo de insecticidas conocidos como carbamatos. Los carbamatos presentan una resistencia y toxicidad intermedia entre los organoclorados y los organofosforados, tienen usos variados, principalmente como insecticidas, herbicidas y fungicidas. El carbaril es el carbamato más conocido y utilizado en el control de larvas y otros insectos que se alimentan en el follaje. El hecho de que estos derivados se hallan desarrollado más recientemente que los organofosforados, hace que su comportamiento general (acción, selectividad, metabolismo, etc.) no haya alcanzado el desarrollo que se ha realizado con los insecticidas OF. Los carbamatos actúan, al igual que los OF inhibiendo a la ACE en las sinápsis nerviosas.

2.5.4 Piretroides

A partir de los setentas, comenzó a utilizarse el grupo de los piretroides, insecticidas con baja toxicidad para mamíferos y nula acumulación en el ambiente. Muy utilizados contra larvas de lepidópteros, en especial de desfoliadores noctuidos de cultivos, también contra plagas caseras y recientemente se les ha autorizado en México y otros países para ser utilizados contra plagas de granos almacenados (Lagunes, 1982).

2.6 ORIGEN BIOQUIMICO DE LOS PIRETROIDES

El piretro es un insecticida de contacto obtenido de las flores *Chrysanthemum cinerariifolium* (Compositae) que se ha usado como insecticida desde el año 400 a. de c., en tiempos del rey Jerjes de Persia (hoy Irán). Se le conocía como polvo de Persia y se presume que fue empleado para combatir los piojos humanos. También

hay evidencias de que era común usarlo en el Medio Oriente para aumentar el vigor masculino. Ha sido usado desde hace muchos años como insecticidas en la región del Cáucaso, donde fue exportado en el siglo XIX a Dalmacia (Yugoslavia) y después introducido a Japón y algunas regiones de Africa, Europa y América.

Posteriormente y tratando de dar aún mayor estabilidad al lado alcohol de la molécula, se sintetizó la fenotrina, la cual tiene el alcohol 3 -fenoxibencil. Sin embargo, el lado ácido de esta molécula tiene la cadena isobunetil del ácido crisantémico, la cual puede ser afectada por oxidaciones, por lo que no es lo suficiente estable para la mayoría de las necesidades agrícolas. Para evitar dicha oxidación, los grupos metil del ácido crisantémico fueron reemplazados por cloro, para dar origen a la permetrina. Esta molécula tiene mayor actividad insecticida que la fenotrina y es más estable en la superficie de las hojas que muchos organofosforados y carbamatos, aunque la permetrina no aumenta su toxicidad en mamíferos. Por otra parte, estudios metabólicos realizados en insectos y mamíferos, indican que las piretrinas naturales son poco sensibles al ataque de las esterasas, por que provienen de alcoholes secundarios. Por otro lado, la fenotrina y la permetrina tienen su origen en alcoholes primarios, lo cual hace que la estructura del éster sea susceptible de ser hidrolizada con relativa facilidad por las esterasas. Para evitar la hidrólisis, se agregó un grupo ciano (CN) al carbón de dichos alcoholes, lo que los transformó en alcoholes secundarios, que hacen al éster menos susceptible de ser atacado por esterasas. Como ejemplo de esta modificación, se tiene a la cipermetrina, que es simplemente la permetrina con un grupo ciano. La cipermetrina tiene mayor actividad insecticida y es un poco más tóxica a mamíferos. Investigaciones posteriores dieron como resultado la síntesis de la decametrina, similar a la cipermetrina, pero con átomos de bromo en vez de los de cloro en la parte ácida de la molécula. La decametrina es considerada el insecticida lipofílico más tóxico que se ha sintetizado, ya que la DL_{50} para moscas domésticas y catarinas de la mostaza es de 0.03 mg kg^{-1} . Los piretroides dihalovinílicos, son muy prometedores como insecticidas por su elevada toxicidad, una razonable fotoestabilidad y su baja toxicidad para mamíferos. Como ejemplo, se tiene al

fenvalerato y al fluvalinato, los cuales a pesar de tener bloqueados teóricamente todos los lugares de ataque metabólico, no resultan tan tóxicos como otros piretroides, y un ejemplo de ellos es la decametrina. Se ha observado que el fenvalerato, es más estable en el medio, lo cual probablemente se deba a la semejanza del lado ácido del fenvalerato con el DDT. La actividad insecticida de los piretroides, al igual que los insecticidas del grupo del DDT, muestra un coeficiente de temperatura negativo, a diferencia de los organofosforados y ciclodienos. Esto se debe a la similitud en el modo de acción, ya que pareciera que a menor temperatura, las moléculas se hacen más firmes, lo cual permite un mejor bloqueo de los canales poro de la membrana neuronal (De Vries y Georghiou, 1979).

La química de los piretroides y su modo de acción son clasificadas como de Tipo 1 o Tipo 2, dependiendo del alcohol substitutivo. El grupo del Tipo 1 está definido de una manera bastante amplia e incluye los piretroides que contienen desciano-3-fenoxibencil u otros alcoholes. Muchos de los antiguos compuestos de Tipo 1 del grupo del que no es fenoxibencil (*por ejemplo*, piretrinas, aletrina, tetrametrina) son inestables en condiciones ambientales y ésta característica impide su uso en cultivos de campo. La introducción del fenoxibencil (*por ejemplo*, permetrina) o ciertos alcoholes halogenados (*por ejemplo*, teflutrina) mejoraron la estabilidad química y permitieron el uso de los piretroides en el campo. Los piretroides del Tipo 2 están definidos de una manera más estrecha en términos de su estructura química. Específicamente, ellos contienen un alcohol a-ciano-3-fenoxibencil, el cual aumenta la actividad insecticida aproximadamente por un factor de 10. Aún más, en algunos importantes piretroides del Tipo 2 se ha alterado la porción ácido de la molécula para incluir un anillo fenílico (*por ejemplo*, fenvalerato y fluvalinato). El estereoisomerismo de los piretroides es importante para su acción tóxica (Bloomquist, 2003).

2.6.1 Modo de acción de los piretroides

Se ha mostrado que pequeñas alteraciones en la estructura y configuración de los piretroides, pueden influir considerablemente en su potencia como

insecticida. Estudios realizados con aletrina, hace suponer que este piretroide taponas las entradas de los iones de sodio (Na), o que la molécula de la aletrina se introduce en la membrana nerviosa por las regiones intercaniculares, lo que trae como consecuencia que dichos canales sean afectados por fuerzas intermoleculares. En insectos tratados con piretroides, la parálisis nerviosa se debe a cambios que se producen en la membrana. Al ser bloqueados los canales de sodio, alteran la conductividad del ión en tránsito, causada por la activación de estos canales dependientes del voltaje (Soderlund, 1989).

Por otra parte, se ha encontrado que los piretroides estimulan las descargas de impulsos nerviosos, con la consecuente paralización del cuerpo. Además, se ha observado que las piretrinas no afectan a la colinesterasa. Los piretroides producen el derribo instantáneo en los insectos voladores, mientras que en los mamíferos muestran una toxicidad general baja. Su acción primaria es sobre el sistema nervioso; algunos estudios histológicos han revelado una gran desorganización del tejido nervioso. La capacidad para recuperarse de los efectos de dosis subletales de piretroides en los insectos, se debe a la rápida desintoxicación enzimática in vivo, probablemente por medio de oxidasas microsomaes. Los piretroides afectan tanto al sistema nervioso central como al periférico de los insectos tratados, lo que ocasiona descargas repetidas, seguidas de convulsiones. Se ha observado que la aplicación de concentraciones mayores de piretroides, da como resultado el bloqueo total de la transmisión. Por otro lado, la descarga repetida producida por la aletrina en la cuerda nerviosa de la cucaracha, muestra un coeficiente de temperatura positivo, lo que indica la improbabilidad de que dicho efecto sea la única causa de la actividad insecticida. La acción bloqueadora de los piretroides en la transmisión nerviosa muestra, sin embargo, un coeficiente de temperatura negativo, debido probablemente a un aumento de la desintoxicación a mayores temperaturas. En insectos, los piretroides del Tipo 2 causan principalmente ataxia y descoordinación, mientras que en mamíferos producen coreoatetosis (retorsiones sinuosas) y salivación. En insectos, los efectos de los piretroides (especialmente los del Tipo 1) pueden desarrollarse en 1-2 minutos después del tratamiento y pueden resultar en la

caída, es decir, la pérdida de la postura normal y de la locomoción. La exposición de humanos a cualquiera de los dos tipos de piretroide puede causar parestesia, una sensación de quemazón o picazón de la piel, pero este efecto es más intenso con los compuestos del Tipo 2. La intoxicación con piretroides resulta de sus potentes efectos sobre la generación de impulsos nerviosos tanto dentro del sistema nervioso central como del periférico. En condiciones normales, las neuronas poseen un voltaje que traspasa las membranas, de unos -60 mV, en el lado interno. El impulso nervioso o potencial de acción consiste en una despolarización transitoria (onda positiva) cuya onda de ascenso es impulsada por un influjo de iones Na^+ , seguidos por un descenso del flujo hacia afuera de iones K^+ (Bloomquist, 2003).

2.6.2 Metabolismo de los piretroides

La unión éster de los piretroides constituye un sitio vulnerable a la molécula. Estudios realizados con moscas domésticas tratadas con piretrina I y cinerina I, revelan que la hidrólisis de la unión éster, es un importante mecanismo de detoxificación. Los estudios sobre el metabolismo de la piretrina I, piretrina II y aletrina, realizados en ratas, revelan que dicho metabolismo involucra modificaciones oxidativas, tanto en la parte ácida como en la parte alcohólica, así como hidrólisis del grupo metoxycarbonil de la piretrina II, e hidrólisis de la unión éter. Estas reacciones contribuyen a que se presente baja toxicidad para mamíferos, brindando alta seguridad en su uso. Investigaciones recientes han demostrado la existencia de diferencias en el metabolismo de las aletrinas y piretrinas en mamíferos. Las ratas rompen el enlace del éster carboxílico ciclopropano en la aletrina, pero este rompimiento no ocurre en el caso de la piretrina. Aunque las piretrinas son fácilmente descompuestas por oxidación y luz ultravioleta (UV), su acción se puede prolongar adicionando antioxidantes y absorbentes de UV. Sinergistas antioxidantes como el butóxido de piperonilo, probablemente actúan bloqueando la oxidación inicial de los piretroides. Entre los piretroides que tienen actividad prolongada en el campo están la permetrina, cipermetrina y decametrina. Los principales mecanismos de resistencia a piretroides son: Insensibilidad en el sitio

de acción, también llamado kdr, penetración reducida al piretroide, mayor metabolismo del insecticida por oxidasas y esterasas (Lagunes, 1995).

2.7 RESISTENCIA

La OMS define resistencia como el desarrollo de una habilidad en una cepa de algunos organismos a tolerar dosis de un tóxico que serían letales para la mayoría de individuos de una población normal de la misma especie. Esta definición es adecuada si reconocemos que la resistencia tiene bases genéticas, y es el resultado de cambios en su composición genética de una población como resultado directo de efectos selectivos de un tóxico. La resistencia es un cambio en la respuesta a la exposición a insecticidas, y es una característica poblacional, no de especie. La FAO (1979) enmarca la resistencia como la capacidad desarrollada por una población determinada de insectos, al no ser afectada por la aplicación de insecticidas. Técnicamente se define a la resistencia como la habilidad complementaria y hereditaria propia de un individuo o conjunto de ellos, que los capacita fisiológica y etológicamente, para bloquear la acción tóxica de un insecticida por medio de mecanismos metabólicos y no metabólicos, y en consecuencia, sobrevivir la exposición de dosis que para otros sería letal (Lagunes y Villanueva, 1995).

El grado de resistencia fue determinado al insecticida malatión en adultos de *Ae. aegypti* cepa Arrecife, en la ciudad de Puerto Rico, utilizando las siguientes concentraciones del producto 0.8, 1.6 y 3.22%, sobre padres y hasta la generación 12, exponiéndolos por 1 hr., registrando los resultados a las 24 hr. Los resultados obtenidos fueron de 34% de mortalidad, en padres y 3% de mortalidad en la F12 a la concentración de 0.8; en la concentración de 1.6 los padres presentaron 72% y la F12 presentó el 14% de mortalidad, por último en la concentración más alta se encontró 100% de mortalidad en padres y 57% en la F12. Posteriormente utilizaron malatión al 0.4% y expusieron los padres a diferentes tiempos (60, 120, 180 y 240 min.) observando 11, 65, 78 y 91% de mortalidad respectivamente (Fox, 1973).

El primer paso en la identificación de un problema potencial de resistencia, es detectar los cambios en la susceptibilidad de una población de vectores a través de bioensayos, ensayos bioquímicos e inmunológicos y ensayos moleculares. La resistencia se detecta por medio de pruebas toxicológicas que consisten en estudiar la mortalidad provocada por dosis crecientes de tóxico. De este modo se puede caracterizar cada población por una curva que se puede comparar con la de una población susceptible de referencia. El número de poblaciones de insectos vectores resistentes, es dependiente del volumen y frecuencia de aplicación de insecticidas utilizados para su control, además de las características inherentes de las especies involucradas. Los mosquitos tienen todas las características requeridas para un rápido desarrollo de resistencia, incluyendo ciclos de vida corto y alta fecundidad. En la actualidad la investigación se ha enfatizado en los mecanismos moleculares de la resistencia y su manejo racional, con la visión de controlar el desarrollo y la diseminación de poblaciones de vectores resistentes (Hemingway, Ranson, 2000).

Determinaron el grado de resistencia en 2 poblaciones de campo de *Ae. aegypti*, colectadas en Maracay, Venezuela y los resultados obtenidos los compararon con la cepa susceptible Rockefeller. El grado de resistencia se evaluó, basándose en la CL_{95} ; determinando que la resistencia a los organofosforado (OP) temefos, malatión, metil pirifos y el carbamato propoxur fue baja (<5 veces) (Tabla 1); la resistencia para clorpirifos (OP), permetrina y λ - cianotrina (piretroides) fue moderada (7 veces). La resistencia a piretroides no es afectada por DEF o butóxido de piperonilo. Esto sugiere la presencia de otros mecanismos semejantes que alteran la sensibilidad en el sitio activo (Kdr). Muestras bioquímicas mostraron gran actividad de esterasas en las cepas de campo, mientras que la Acetilcolinesterasa insensible, no fue involucrada en la resistencia a organofosforados y carbamatos. La determinación de estos resultados podrán ser considerados en un futuro dentro de los programas de control de *Ae. aegypti*, para los organofosforados y piretroides que se utilizan en el control de vectores en muchos países de Centro y Sudamérica (Mazzari y Georgiou, 1995).

Además existen otros mecanismos de resistencia, pero se considera que son secundarios. En 1940, se descubrió que al formular el piretro con aceite de ajonjolí, se aumenta la efectividad, aunque el aceite por sí mismo no tiene acción insecticida. La actividad sinergista del aceite mostró depender de compuestos que contenían grupos metileno- dioxifenilo, como los del sinergista sesamex. Trabajos posteriores dieron como resultado el descubrimiento de diversos sinergistas del piretro: uno de los más comunes es el butóxido de piperonilo. Los insecticidas piretroides resultan la esperanza en el control químico de vectores, pero su uso en los últimos años ha generado resistencia a alguno de ellos, como es el caso de la deltametrina, todavía resultan muy eficaces otros como lambdacialotrina y cipermetrina (Rodríguez 1995).

En suma, se ha encontrado que la resistencia cruzada a DDT-permetrina es debida a oxidasas en el mismo mosquito. Un patrón similar de resistencia cruzada ha sido documentado para *Culex. pipiens* en Ohio. En un estudio de selección de una cepa de *Culex quinquefasciatus* resistente a lambdacialotrina en Santiago de Cuba se observó baja o nula resistencia cruzada a otros piretroides (deltametrina y cipermetrina), a un carbamato (propoxur) y a los insecticidas organofosforados (clorpirifos y metil-pirifos), sin embargo, se observó una alta resistencia cruzada a malatión (Rodríguez ,1998).

2.7.1 Tipos De Resistencia

Resistencia cruzada: cuando se trata de una población de una plaga con aplicaciones reiteradas de un solo químico, esa población adquiere también resistencia a otros químicos análogos. Este fenómeno obedece al hecho de que todos los insecticidas semejantes o estrechamente afines tienen la misma forma de acción y es por ello que el mecanismo de defensa del insecto resistente, es eficaz también contra el nuevo insecticida.

Resistencia Múltiple: se le llama así cuando una plaga consigue resistir a dos o más plaguicidas con diferentes clases o formas de acción; Esto ocurre cuando la plaga tiene varios mecanismos de defensa, con los cuales hace frente a diferentes tipos de insecticidas (Lagunes, 1995).

2.7.2 Mecanismos de resistencia

El mecanismo de resistencia no metabólico llamado *kdr* ("know- down resistance" o "resistencia al derribo"), le confiere resistencia ala acción de la parálisis rápida ocasionada por el DDT y los piretroides. El *kdr* está relacionado con alteraciones en las propiedades de los canales de sodios, esto se ha interpretado como una reducción en el número y la densidad de sitios activos en la membrana neural sin embargo, no se ha podido confirmar esta hipótesis en otros casos. No obstante se ha demostrado que la resistencia al derribo está relacionada con modificaciones selectivas de sólo algunas de las propiedades de reconocimiento de las neurotoxinas en los canales de sodio. De tal modo que la reducción en el número y la densidad de los canales de sodio, representa uno de varios posibles fenotipos del *kdr*, lo que también se puede relacionar con cambios en la composición de los lípidos en la membrana nerviosa tipo *kdr* (Souderlund *et al.*, 1989).

Los mecanismos de la resistencia del insecticida (en comparación con los comportamientos de la evitación del insecticida importantes en el control de los vectores de la malaria) tienen una base bioquímica Figura No. 2 (Brogdon , 1998a).

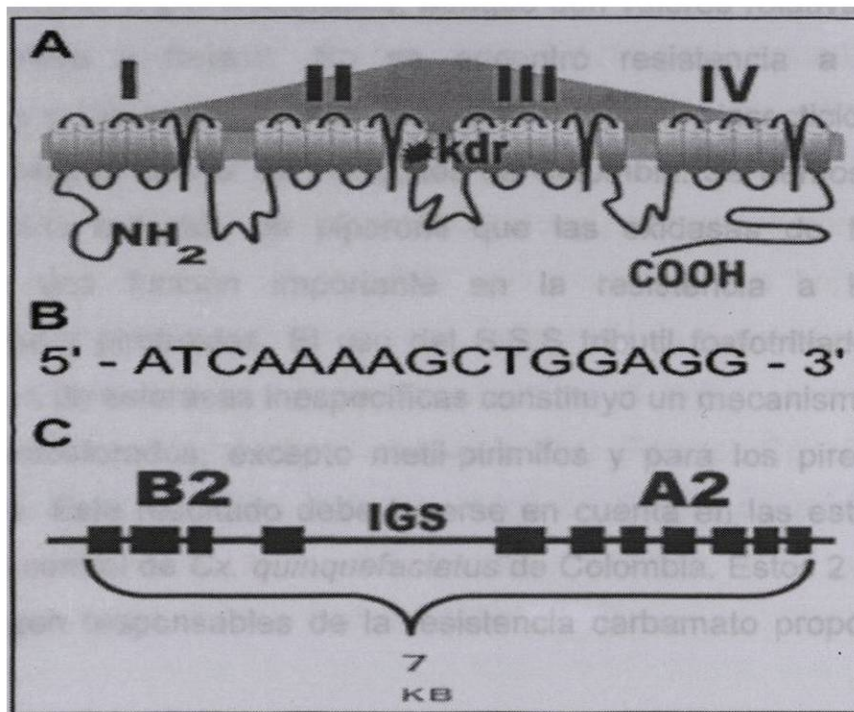


Figura 10.- Ejemplos de mecanismos de resistencia a nivel molecular. A. Una simple mutación en la región IIS6 del gene que confiere resistencia en el sitio blanco de acción de piretroides y DDT en *Anopheles gambiae*. El mismo codon mutado produce resistencia en insectos además de mosquitos, tales como cucarachas y moscas. B. Elemento regulatorio conocido como la "Barbie Box" que permite la inducción de genes de resistencia que codifican para oxidasas y esterasas detoxificativas. C. Amplicón para Esterasas A2-B2. Más de 100 copias de este amplicón podrían estar presentes en un simple mosquito. Este es un ejemplo de una familia de genes de esterasas amplificados.

Las dos principales formas de resistencia bioquímica son: resistencia en el sitio blanco, la cual ocurre cuando el insecticida no se enlaza al sitio de acción y por otro lado las enzimas detoxificativas, las cuales ya sea por sus niveles elevados o modificación (esterasas, oxidasas o glutatión-transferasas (GST)) previenen que el insecticida alcance su sitio de acción. Un mecanismo adicional está basado en la respuesta térmica al estrés (Patil, 1996).

El estado de resistencia en una cepa de *Cx. quinquefasciatus* procedente de una localidad de la ciudad de Medellín, Colombia, se determinaron los niveles de susceptibilidad y/o resistencia a 5 insecticidas organofosforados (malatión, metil-pirimifos, clorpirifos, temefos y fention), 4 piretroides (cipermetrina, deltametrina, permetrina y lambdacialotrina) y un carbamato (propoxur). Se observó resistencia a todos los insecticidas organofosforados, aunque con valores relativamente menores para metil-pirimifos y fention. No se encontró resistencia a los piretroides lambdacialotrina y cipermetrina ni al carbamato propoxur, insecticidas que pueden ser muy útiles para el control de mosquitos de Colombia. Se demostró mediante el uso del sinergista butóxido de piperonil que las oxidasas de función múltiple desempeñaron una función importante en la resistencia a los insecticidas organofosforados y piretroides. El uso del S.S.S tributil fosfotritiado reveló que la sobre producción de esterasas inespecíficas constituyó un mecanismo de resistencia para los organofosforados, excepto metil-pirimifos y para los piretroides excepto lambdacialotrina. Este resultado debe tenerse en cuenta en las estrategias que se cayan a usar el control de *Cx. quinquefasciatus* de Colombia. Estos 2 mecanismos de resistencia no son responsables de la resistencia carbamato propoxur. El análisis

electroforetico revelo la presencia de las esterasas B6, A6 y B6, que presumimos tiene una función impotente en la resistencia. (Rodríguez MM, 1998).

La resistencia a temefos en 2 poblaciones de *Culex pipiens* colectadas en Sayada (medio este de Tunisia), encontrando bajos niveles de resistencia (2 veces). La resistencia fue sinergizada para un inhibidor de esterasas (DEF). Determinando además 2 juegos de esterasas sobre producidas (A2-B2 y A4-B4) que intervienen en la resistencia; siendo estas encontradas en por lo menos el 50% de los insectos examinados, en otro 3% de los insectos se encontraron Acetilcolinesterasa insensible. Después de poner bajo presión con temefos una muestra de las larvas por varias generaciones, se observo un incremento en la resistencia de 9 veces. Encontrando en todos los mosquitos la esterasa A2-B2 y Acetilcolinesterasa insensible. Por otra parte revelaron la presencia de 3 genes de resistencia para este insecticida (Cheikh y Pasteur, 1993).

2.7.2.1 Mecanismos de resistencia en el sitio blanco

La alteración de aminoácidos responsables para el anclaje del insecticida en un sitio específico ocasiona que sea menos efectivo o aún que no funcione. Por ejemplo, el blanco para los organofosforados y carbamatos es en sinapsis nerviosas colinérgicas, 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 (uno o ambos de los dos sitios conocidos) en el sitio de anclaje del insecticida en el canal sodio del axón (Miyazaki, 1996; Williamson, 1996). Esta resistencia cruzada parece producir un cambio en la curva de activación del transporte de sodio lo que ocasiona una baja sensibilidad a piretroides (Vais, 1997). De manera similar, la resistencia a ciclodienos (dieltrin) es conferida por cambios en un simple nucleótido en el mismo codon del gen para receptores de ácido Gamma-aminobutírico (GABA) (Ffrench-Constant, 1993). Se han identificado al menos cinco sitios mutados en el sitio de acción de la acetilcolinesterasa. Además se sabe que estos ocasionan una gradación en la sensibilidad a organofosforados y carbamatos.

2.7.2.2 Mecanismos detoxificativos

Las enzimas responsables para la detoxificación de xenobióticos en los organismos son transcritas por miembros de gran número de familias multigene de esterasas, oxidasas y glutatión transferasas (GST). Quizás, el mecanismo de resistencia más común en insectos son diferentes niveles o actividad de esterasas detoxificativas que metabolizan (hidrolizan enlaces éster) un amplio rango de insecticidas. Estas comprenden seis familias proteicas pertenecientes a la superfamilia de las alfa/beta hidrolasas (Cygler. 1993, Oakeshott 1993).

Las citocromo oxidasas P450 (también denominadas oxigenasas) metabolizan insecticidas a través de O-, S- e hidroxilación N-alquil, hidroxilaciones alifáticas y epoxidaciones, hidroxilaciones aromáticas, oxidación éster y oxidación nitrógeno y tio-éter (Wilkinson 1976). Las citocromo P450 pertenecen a una vasta superfamilia. De las 62 familias reconocidas de P450 en animales y plantas, al menos cuatro (familias 4, 6, 9 y 18) han sido aisladas de insectos. Las insecto-oxidasas P450 responsables de resistencia pertenecen a la familia 6, la cuál, como las esterasas, están presentes en Díptera como un grupo de genes (Maitra, 1996). Los miembros del grupo se pueden expresar como alelos múltiples (arriba de 5) (Tomita, 1995).

Los niveles de oxidasas en insectos resistentes resultan de una sobre-expresión constitutiva más que amplificación (Tomita y Scout 1995, Carino, 1994). Los mecanismos de sobreproducción de oxidasas en resistencia están bajo investigación y parecen ser resultado de factores cis- y trans-, asociados al fenómeno de inducción (Cohen, 1994, Liu y Scott, 1997). La mayoría de los organismos poseen múltiples GST de dos o más clases (Hayes y Pulford, 1995). Por ejemplo, las GST implicadas en la resistencia al DDT están presentes como grupos de genes que han sido mezclados a través del genoma por recombinación (Zhou y Syvanen 1997).

En *Cx. quiquefasciatus* (Say) del Rio Quibú, los niveles de resistencia declinaron significativamente desde 1986 hasta 1997, sobre todo a malatión, no resultó así para los piretroides, donde se observó un incremento de la resistencia

durante este período de 11 años. El mecanismo de esterasas elevadas se incrementó a una frecuencia de 1 al igual que hubo un incremento en la frecuencia del mecanismo de AChE. Hasta 1986 se seleccionó en esta una población la esterasa B1, responsable de la resistencia a malatión, pero no a piretroides. A partir del uso de piretroides para el control en esta área se seleccionaron dos nuevos fenotipos de esterasas, nombradas A6 y B6, en apariencia relacionadas con la resistencia a piretroides (Bisset , 2000).

2.8 CONTROL DEL VECTOR

La disponibilidad de insecticidas ha disminuido como resultado de la resistencia y se ha exacerbado por efectos de registro en el mercado, los cuales son restringidos en cuanto a tiempo, especialmente a partir de la pasada década (Brogdon y McAllister, 1998). Los insecticidas utilizados en las campañas anti-malaria han incluido a los BHC, organofosforados, carbamatos y piretroides. Otros grupos insecticidas tales como las benzifenil-ureas y *Bti* (*Bacillus thuringiensis* var *israelensis*) tienen un uso limitado en mosquitos. La tendencia en el manejo de la resistencia es el cambio en el tipo de insecticida (Flores, 2001).

La Secretaría de Salud según sus Normas Oficiales (NOM-032-SSA2-2002) esta utilizando principalmente dos insecticidas para el control del mosquito: abate para larvas y permetrina para adultos Abate 1% granular (temephos) como larvicida y permetrina 10.9 ingrediente activo para los mosquitos adultos (aplicados en rociados espaciales o Ultra Bajo Volumen-ULB). Algunas de las características por las cuales se utiliza el grupo de los organofosforados es por no ser persistentes en el ambiente y los piretroides ha recibido mucha atención debido a su baja toxicidad para mamíferos, casi nula acumulación en el medio ambiente y gran utilidad como alternativa en el combate de plagas agrícolas (Lagunes, 1995).

Los mosquitos pueden controlarse a través de dos tipos de estrategias:

1. Indirectas, al eliminar los sitios de cría.
2. Directas, eliminando a larvas o adultos a través del control físico, biológico o químico (Olkowski *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el estado de susceptibilidad y/o mecanismos de resistencia de *Ae. aegypti*, al insecticida permetrina en los estados de Colima y Jalisco.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la dosis del insecticida piretroide permetrina en poblaciones de *Ae. aegypti* de: Colima (Tecomán, Manzanillo y Colima) y Jalisco (Puerto Vallarta y Tequila).
- Determinar mecanismos bioquímicos de resistencia mediante 6 pruebas enzimáticas: alfa esterase, beta esterase, oxidasa, acetilcolinesterasa, acetilcolinesterasa insensible y glutatión s- transferasa.

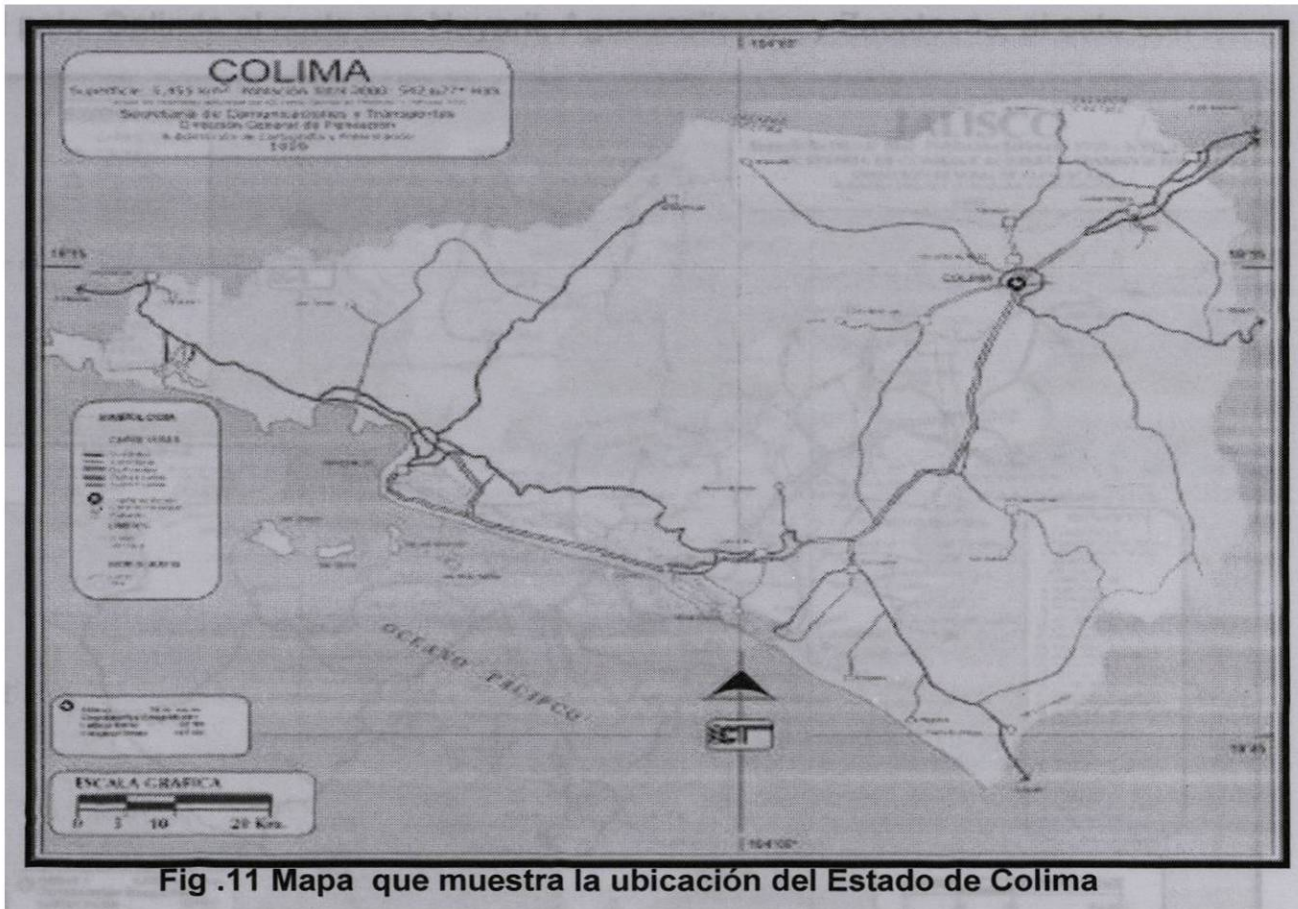
4. HIPOTESIS

La resistencia generada hacia los insecticidas es debida a mecanismos bioquímicos presentes en *Ae. aegypti* reflejado en un alto nivel enzimático como respuesta a la presión ejercida por la aplicación continuada de insecticidas por parte de los programas de control de vectores transmisores de enfermedades llevados a cabo por la secretaría de salud de los estados de Jalisco y Colima.

5. MATERIAL Y METODO

5.1 Área de Estudio:

5.1.1 COLIMA



Está localizado en la parte media de la vertiente del Pacífico, en las laderas australes del Volcán de Colima y en la llanura costera del Océano Pacífico, posee una superficie de 5,191 km², ocupando el 29 lugar, por su extensión territorial en el País Se localiza entre los 18° 37' 10" y 19° 27' 2" de latitud Norte y los 103° 30' 2" y 104° 37' 10" de longitud Oeste del meridiano de Greenwich.

Limita al Oeste, Norte y Este con el estado de Jalisco; al Sureste con el de Michoacán y al Sur con el Océano Pacífico. El estado representa el 0.3% de la superficie del país. Al estado lo constituyen 10 Municipios: y 594 localidades. Las localidades asignadas son Colima, Tecomán, Manzanillo.

5.1.2 JALISCO

El estado de Jalisco se localiza al norte $22^{\circ}45'$, al sur $18^{\circ}55'$ de latitud norte; al este $101^{\circ}28'$, al oeste $105^{\circ}42'$ de longitud oeste. Ocupando el 4.0% de la superficie del país. Colinda al norte con Nayarit, Aguascalientes y Zacatecas; al este con

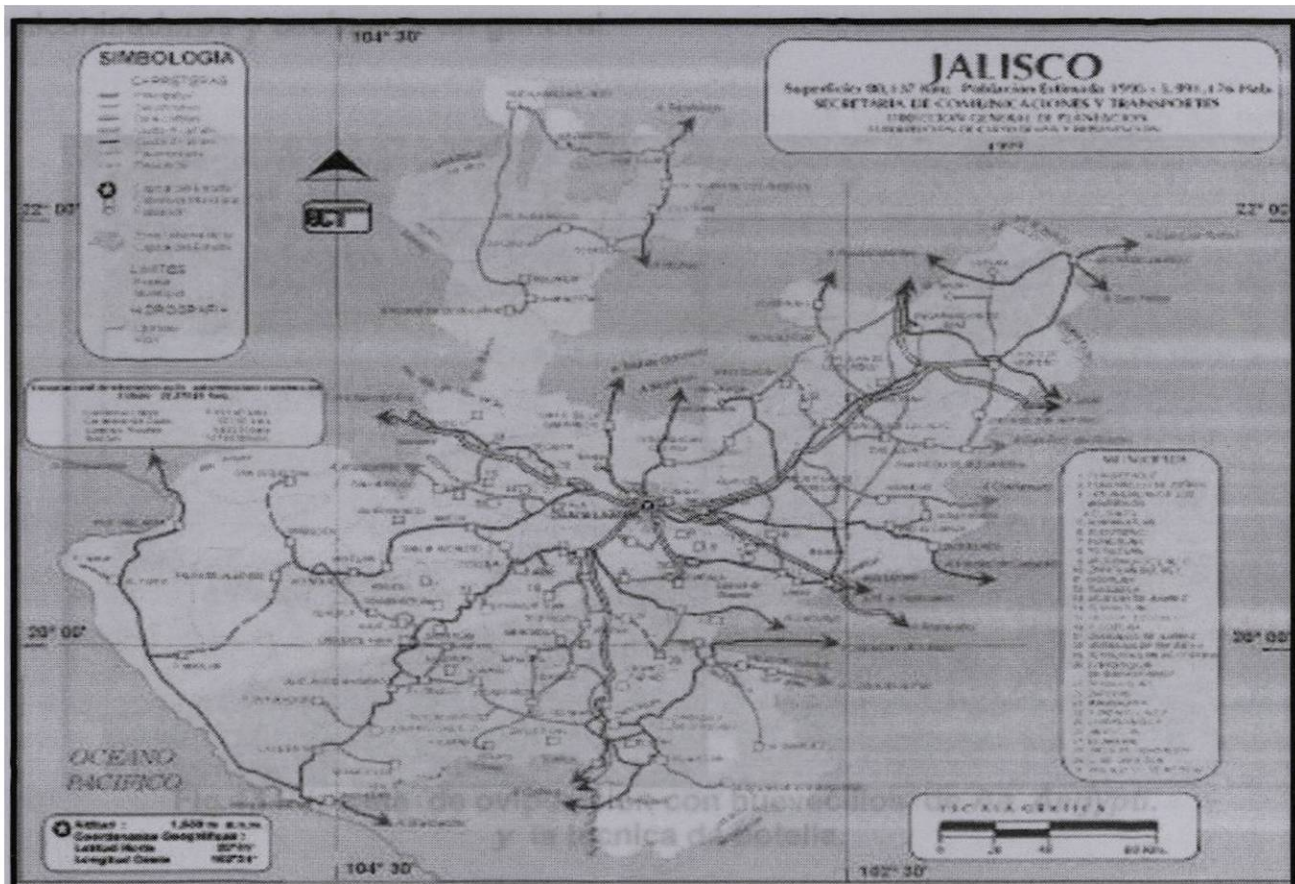


Fig .12 Mapa que muestra la ubicación del Estado de Jalisco

Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato y Michoacán de Ocampo; al sur con Michoacán de Ocampo, Colima y el Océano Pacífico; al oeste con el Océano Pacífico y Nayarit (INEGI, 2003). Las localidades muestreadas son Puerto Vallarta y Tequila.

5.2 OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO

Las colectas se realizaron de las localidades de Tequila y Puerto Vallarta del Estado de Jalisco y de Colima, Tecomán y Manzanillo las cuales corresponden al estado de Colima. Las larvas se obtuvieron de criaderos conocidos donde el vector se desarrolla: tambos de 200 litros, floreros de tumbas de panteón, llantas usadas en vulcanizadoras y cacharros en general.



Fig.13 Papeleta de oviposición con huevecillos de *Ae. Aegypti*. y la técnica de botella.

El material colectado se transporto en bolsas WHIRL-PACK^R resguardados en termos al laboratorio de Entomología Médica de la FCB-UANL para su reproducción en el insectario. Se mantuvo una colonia representativa de *Aedes aegypti* para cada localidad en este estudio 1000 mosquitos en cada una. Las larvas se seleccionaron aquellas que corresponden a la especie de *Ae. aegypti* después se colocaron en charolas plásticas de 35 x 25 cm, y se les vertió alimento balanceado para pez Aquacrece® finamente molida y por ultimo se cubrió con una malla de orificios pequeños para evitar la salida de los mosquitos. La alimentación fue diaria. Las pupas fueron transferidas a vasos de 250 mL de capacidad y colocadas en jaulas de cría de 30 X 30 cm. Los machos se alimentaron con agua 10 % de miel en

algodón impregnado. Se colocaron vasos con agua y papeletas de papel filtro húmedo, como sustrato de oviposición. Se alimento a las hembras de *Ae. aegypti* con sangre humana para la producción de huevecillos. La colonia se mantuvo bajo condiciones de temperatura y humedad controladas. (24±2 °C y 70 % HR).

5.3 ENSAYOS (DETERMINACIÓN DE DOSIS DIAGNOSTICO)

Los adultos se sometieron a pruebas de dosis de diagnóstico, esto se refiere al uso de una dosis única que al ser aplicada a una muestra de insectos y que permite sobrevivir únicamente a los individuos que resisten el límite superior de la DL_{99} , para llevar acabo esto se seguirá la metodología propuesta por la OMS (1981) modificada por Brogdon y McAllister (1998).

Se determino la dosis diagnóstico en µg de i.a. para el insecticida permetrina. Se llevo a cabo bioensayos para la obtención de la dosis diagnostico en adultos para cada localidad. Cada bioensayo consta de 4 dosis con tres repeticiones cada una más un testigo con un total de 20 mosquitos adultos para cada repetición. Se grafico la respuesta en cada una de las concentraciones probadas y se selecciono la dosis diagnóstico como aquella que produzca el 100% de mortalidad en un menor tiempo (basado en tiempo letal). Se corrobora el valor en base al análisis de regresión log-Probit (dosis-respuesta) método de máxima verosimilitud Finney (1971).

5.3.1 Metodología en la preparación de botellas.

1. Seleccionar las botellas Wheaton® de 250 ml limpias y secas, dependiendo del número de dosis a probar por triplicado mas una del control en este caso 13.
2. Etiquetar las botellas con: fecha, localidad dosis y repetición.
3. Agregar 1 ml de Acetona mas la cantidad apropiada del insecticida a probar (permetrina).
4. Agitar la botella para permitir que el insecticida se mezcle con la acetona y que cubra las paredes de la botella, e invertir la botella para asegurarse que quede impregnada la tapa.
5. Remover la tapa y seguir girando la botella hasta que cualquier signo visible de líquido desaparezca.

6. Dejar la botella verticalmente en la oscuridad.
7. Dejar secar la botella 24 horas a una temperatura de 25 °C, de ser mas baja hasta que este completamente seca y no se perciba olor a acetona.
8. Aspirar 20 mosquitos, se introducen en la botella indicada, se empieza a contar a cada minuto el numero de mosquitos muertos hasta completar el 100 % de mortalidad.
9. Rango de dosis que se aplicarán para permetrina: 21.5µg/ml, 43µg/ml, 86µg/ml y 100 µg/ml.

5.3.2 Selección de individuo utilizando Dosis Diagnostico.

Adultos de *Ae. aegypti* se expusieron a la dosis diagnóstico obtenida para permetrina. Utilizando la técnica de botella desarrollada por Brogdon y McAllister 1998.

1. Se expusieron 40 mosquitos por botella. Cuando el 50% murieron, se aspiraron los 20 mosquitos muertos y los 20 vivos de la botella y se congelaron a -70 °C. Se repite lo anterior hasta completar 1000 mosquitos (500 vivos / 500 muertos).
2. Se removió la cabeza y tórax de cada mosquito y se colocó en tubos cónicos de 1.5 ml etiquetados (localidad vivos o muerto), para las pruebas bioquímicas mediante ensayos en microplacas; y el abdomen se utiliza para la extracción de DNA para la amplificación de las secuencias de resistencia. Se asignó una nomenclatura para cada sección y se constituye de:
Loc/678/F/0/0.010/99/0.588/0.564/0.025/0.001/14.
Localidad/ No. de ejemplar/sexo/si vivió o murió al exponerse a la dosis diagnóstico, cero para muerto y 1 para vivo/ valores de absorbancia en las pruebas bioquímicas y finalmente frecuencia génica.
3. Se homogenizó un mosquito en 100 µl de del buffer (KPO4)
4. Se diluyó a 2 ml con 1.9 ml I del buffer cada prueba se hizo por triplicado en microplacas la determinación.



Fig. 14 Homogenización del mosquito cabeza y tórax.

5.4 Enzimas de Resistencia (ensayos en Microplacas Brogdon *et al.* 1984, 1988, 1990, 1997)

Para la determinación del grado de resistencia en base a enzimas se llevo a cabo pruebas en microplacas, para esto la cabeza y tórax de los mosquitos se homogenizaron individualmente en 100 μ l de buffer de fosfato (0.01 M pH 7.2) y se diluyo en 1 ml con el mismo buffer, cada prueba se hizo por triplicado.

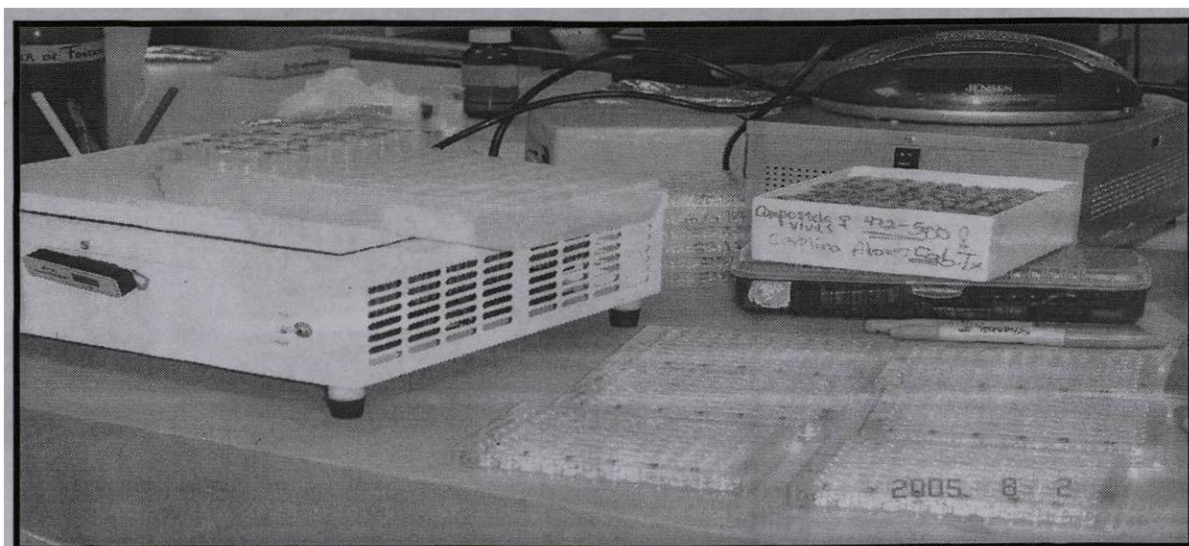


Fig. 15 Llenado de placas con el homogenato.

Las pruebas realizadas son:

1. Alfa y beta esterasas (α y β esterasas)
2. Reacciones de oxidasas para medir los niveles de peroxidasas (FOM).
3. Prueba para acetilcolinesterasa (AChE)
4. La prueba para acetilcolina insensible, la cual determina si se encuentra presente alterado el sitio para acetilcolina (iAChE)
5. Para glutatión S-transferasa , la cual mide los niveles de GST (GST)

5.4.1 α esterasas

1. Homogenizar cada mosquito en buffer de fosfatos
2. Colocar 100 μ l del homogenato del mosquito en cada pocillo.
3. Añadir 100 μ l de α -naphthyl acetato en cada pocillo
4. Incubar a temperatura ambiente por 20 minutos
5. Añadir 100 μ l de Ortho- dianisidina a cada pocillo.
6. Incubar por 4 minutos y se lee utilizando un filtro de 540 nm en el lector de micro placas.

Control positivo: 100 μ l α -naphthyl

Control negativo: 100 μ l Buffer (KPO₄)



5.4.2 β esterasas

La técnica para las esterasas no específica β consiste en:

- 1.- Homogenizar cada mosquito en buffer de fosfatos
- 2.- Colocará 100 μ l del homogenato del mosquito en cada pocillo
- 3.- Agregara 100 μ l β -naphthyl acetato en cada pozo
- 4.- Incubara a temperatura ambiente por 10 min.
- 5.- Agregara 100 μ l de dianisidina en cada pozo
- 6.- Incubara 2 min y leer usando filtro de 540 nanómetros

Control positivo: 100 μ l β -naphthyl

Control negativo: 100 μ l Buffer (KPO_4)

5.4.3 FOM

1. Colocar 100 μ l de homogenato de mosquito en cada pocillo
2. Agregar 200 μ l de TMBZ (3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidine Dihydrochloride)
3. Añadir 25 μ l de H_2O_2 al 3% e incubar por 10 minutos
4. Leer en el lector para microplacas utilizando un filtro de 620 nm.

Control positivo= Citocromo C

Control negativo = Buffer (KPO_4)

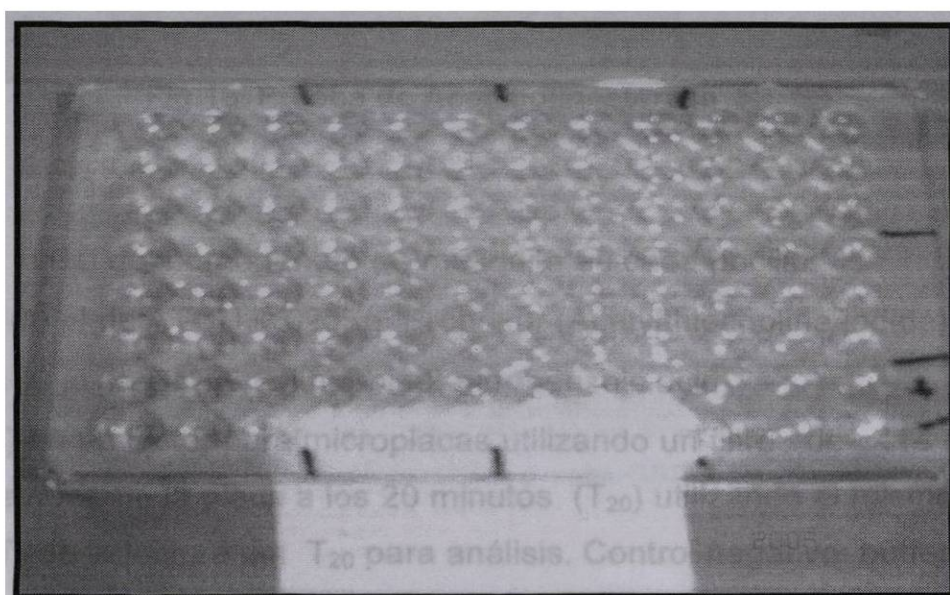


Fig. 17. Prueba enzimatica de Oxidasas

5.4.4 AChE

La técnica de acetilcolinesterasa consiste en:

1. Colocar 100 μ l del homogenato de mosquito en cada pocillo.
2. Añadir 100 μ l de ATCH (Acetylthiocholine iodide)
3. Añadir 100 μ l de DNTB (Dithio-bis-2-nitrobenzoic acid)
4. Leer inmediatamente (T_0) en un lector para microplacas utilizando un filtro de 414 nm.
5. Leer nuevamente la placa a los 20 minutos (T_{20}) utilizando el mismo filtro
6. Restar T_0 de la lectura del T_{20} para análisis.

Control negativo: buffer KPO_4 .

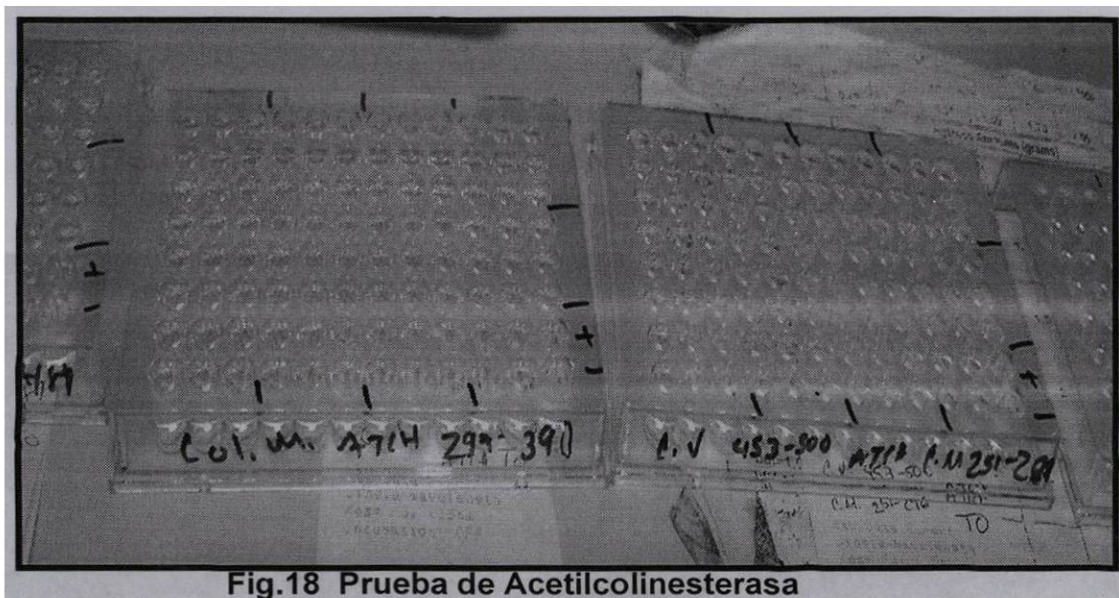


Fig.18 Prueba de Acetilcolinesterasa

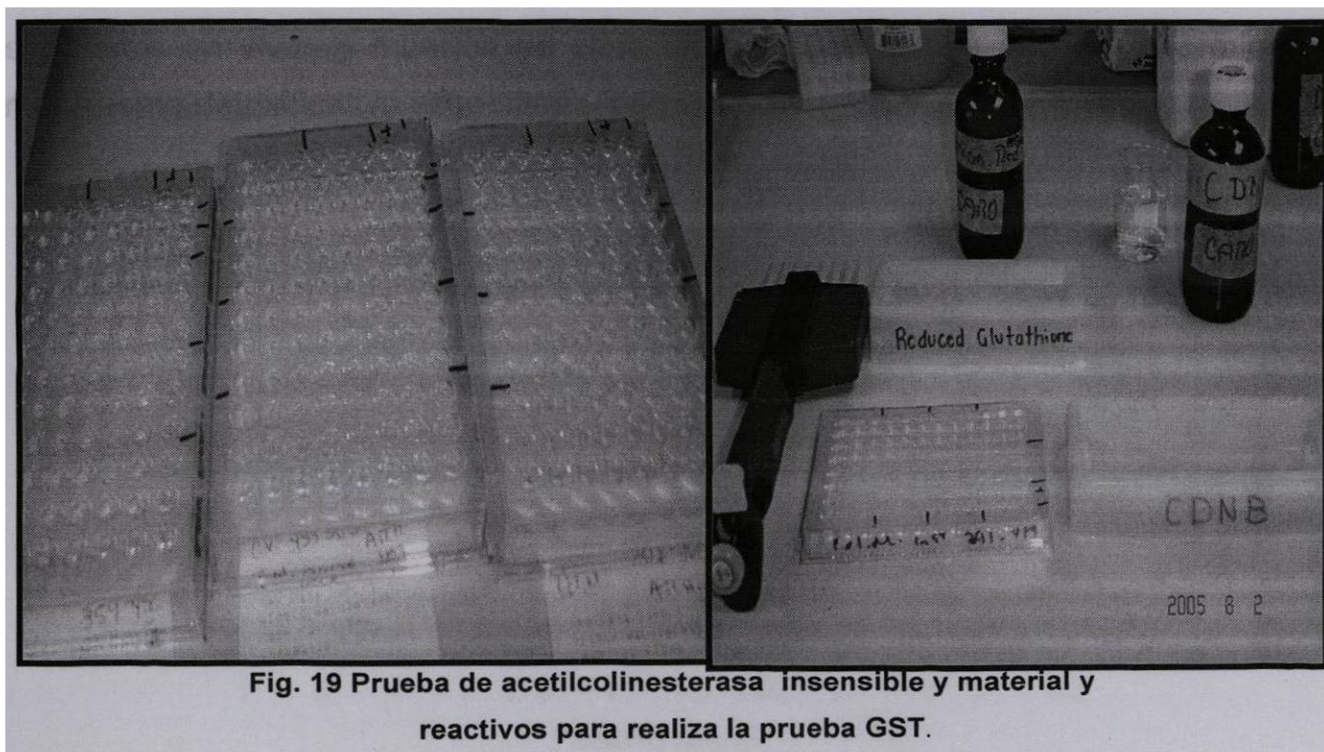
5.4.5 AChE

1. Colocar 100 μ l del homogenato de mosquito en cada pocillo.
2. Añadir 100 μ l de ATCH + 0.025 μ g Propoxur (Acetylthiocholine iodide)
3. Añadir 100 μ l de DNTB (Dithio-bis-2-nitrobenzoic acid)
4. Leer (T_0) en un lector para microplacas utilizando un filtro de 414 nm.
5. Leer nuevamente la placa a los 20 minutos (T_{20}) utilizando el mismo filtro
6. Restar T_0 de la lectura del T_{20} para análisis. Control negativo: buffer KPO_4 .

5.4.6 GST

Se utilizó la siguiente técnica:

1. Colocar 100 μ l del homogenato de mosquito en cada pocillo
2. Añadir 100 μ l de Glutación reducido
3. Añadir 100 μ l de cDNB (1-chloro-2,4'-dinitrobenzene)
4. Leer inmediatamente (T_0) en un lector para microplacas utilizando un filtro de 340 nm.
5. Leer nuevamente la placa a los 10 minutos (T_{10}) utilizando el mismo filtro
6. Restar T_0 de la lectura del T_{10} para análisis.



5.5 Análisis de resultados

Los datos obtenidos de las pruebas realizadas se vaciaron en una hoja de cálculo en la cual se determinó el promedio de las absorbancias por mosquito para transferir estos datos a una nueva hoja de cálculo que ordena los datos en forma ascendente. Aquí se determina el número de individuos expresado en porcentaje de mortalidad en un rango establecido para cada enzima.

Se estableció el umbral de resistencia basados en el máximo valor de absorbancia obtenido para cada enzima en la población susceptible la cepa New Orleans. En base a este valor se determinó la proporción de resistencia en las poblaciones de *Ae. aegypti*. Estudiadas en base a cada mecanismo enzimático.

Se realizaron análisis de varianzas (ANOVA) con una $\alpha=0.05$ y 0.01 para determinar la diferencia entre las poblaciones estudiadas y la diferencia entre los mosquitos separados en vivos y muertos de cada enzima. Con la finalidad de determinar el mecanismo detoxificativo específico a permetrina.

6.-RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Dosis diagnostico de permetrina para la población de Jalisco.

En el Estado de Jalisco se determinó la dosis diagnóstica al graficar el porcentaje de mortalidad contra el tiempo, dando como resultado a la exposición de *Ae. aegypti* a diversas concentraciones (21.5, 43, 86 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de ingrediente activo) del insecticida permetrina, en donde la dosis diagnostico es aquella que mata el 99% de individuos en el menor tiempo, adema de observar que la curvas deben semejar un línea sigmoide en donde existe una distribución normal de la respuesta al toxico. Tomando en cuenta estos factores la dosis óptima para estado de Jalisco es de 100 μg .

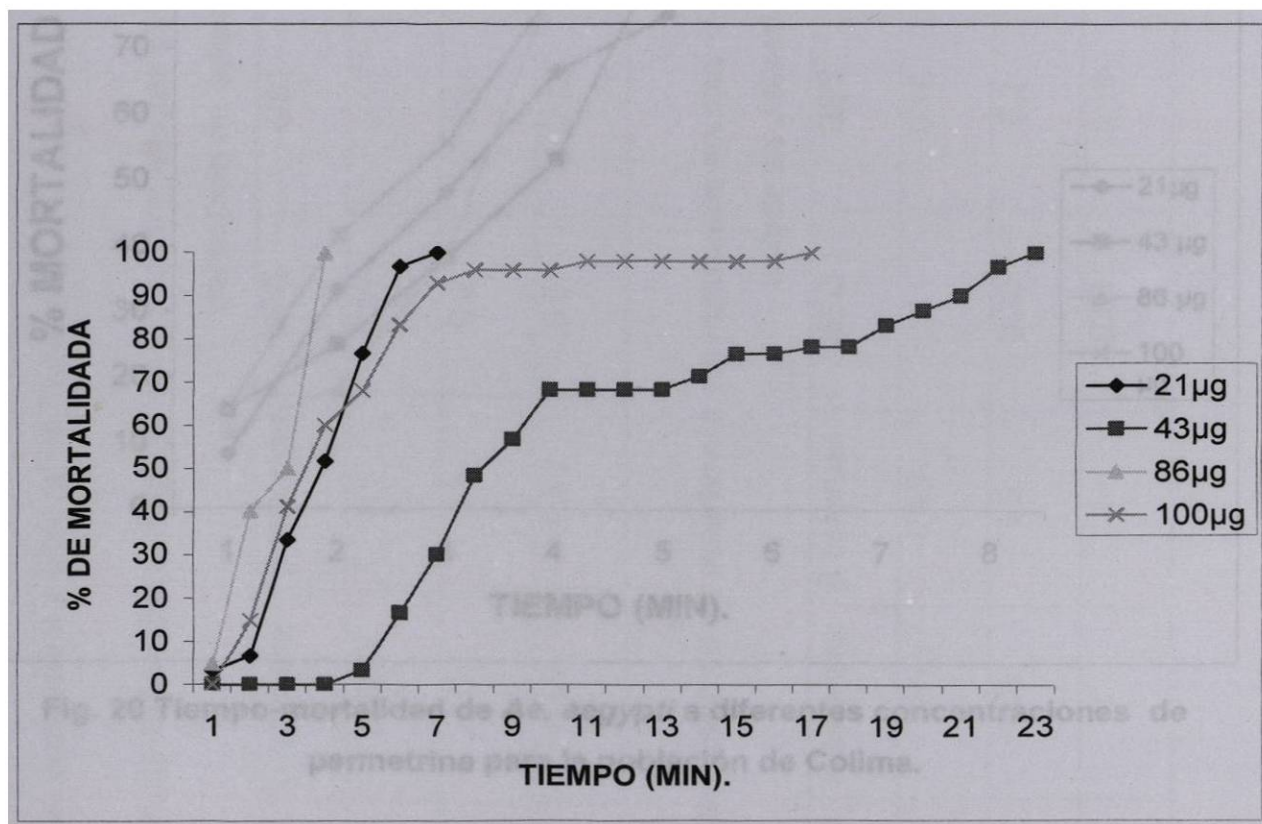


Fig. 20 Tiempo-mortalidad de *Ae. aegypti* a diferentes concentraciones de permetrina para la población de Jalisco.

6.2 Dosis diagnostico de permetrina para la población de Colima

La dosis diagnostico reportada para las poblaciones de Colima con tres localidades sometidas a las concentraciones de 21, 43,86 y 100, siendo la optima de 86 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

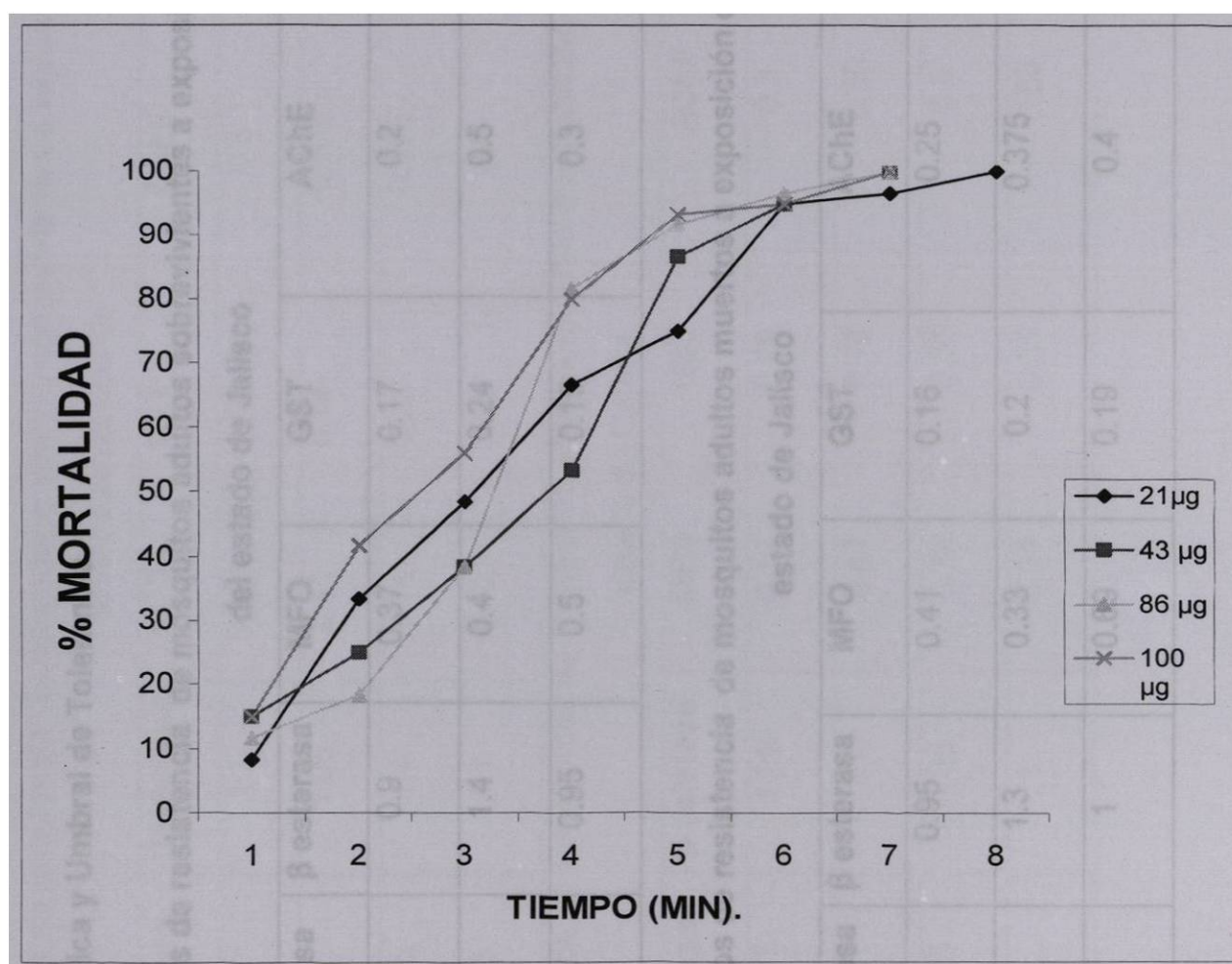


Fig. 20 Tiempo-mortalidad de *Ae. aegypti* a diferentes concentraciones de permetrina para la población de Colima.

6.3 Actividad enzimática y Umbral de Tolerancia

Tabla 1.- Mecanismos de resistencia de mosquitos adultos sobrevivientes a exposición a DD de permetrina del estado de Jalisco

Localidad	α esterasa	β esterasa	MFO	GST	AChE	iAChE
New Orleans	0.85	0.9	0.37	0.17	0.2	.04
Puerto Vallarta	1.3	1.4	0.4	0.24	0.5	0.14
Tequila	0.95	0.95	0.5	0.19	0.3	0.23

Tabla 2.- Mecanismos de resistencia de mosquitos adultos muertos a exposición de DD de permetrina del estado de Jalisco

Localidad	α esterasa	β esterasa	MFO	GST	AChE	iAChE
New Orleans	0.8	0.95	0.41	0.16	0.25	0.03
Puerto Vallarta	1.05	1.3	0.33	0.2	0.375	0.17
Tequila	1	1	0.69	0.19	0.4	0.08

Tabla 3.- Mecanismos de resistencia de mosquitos adultos sobrevivientes a exposición a DD de permetrina del estado de Colima

Localidad	α esterasa	β esterasa	MFO	GST	AChE	iAChE
New Orleans	0.7	1.1	0.180	0.08	0.3	0.02
Colima	0.9	1.05	0.41	0.14	0.275	0.13
Tecoman	1.55	1.4	0.74	0.23	0.375	0.06
Manzanillo	0.95	1.1	0.72	0.19	0.4	0.11

Tabla 4.- Mecanismos de resistencia de mosquitos adultos muertos a exposición a DD de permetrina del estado de Colima

Localidad	α esterasa	β esterasa	MFO	GST	AChE	iAChE
New Orleans	0.75	1.25	0.13	0.09	0.3	0.15
Colima	1	1.1	0.43	0.18	0.25	0.21
Tecoman	1.35	1.35	0.72	0.55	0.6	0.26
Manzanillo	1	1	0.34	0.35	0.55	0.17

Tabla 5.- Proporción de Resistencia (R) de mosquitos adultos sobrevivientes a DD de permetrina del estado de Jalisco.

Localidad	α esterasa	β esterasa	MFO	GST	AChE	iAChE
Puerto Vallarta	32.8%	59.8%	0.2%	0.8%	26.8%	3.6%
Tequila	6.4%	1.6%	9.8%	0.4%	6.4%	18.6%

Tabla 6.- Proporción de Resistencia (R) de mosquitos adultos muertos a DD de permetrina del estado de Jalisco.

Localidad	α esterasa	β esterasa	MFO	GST	AChE	iAChE
Puerto Vallarta	42.8%	27.6%	0%	1.4%	7%	5.6%
Tequila	27%	1.6%	3.6%	0.2 %	6.8%	8.6%

Tabla 7.- Proporción de Resistencia (R) de mosquitos adultos sobrevivientes a DD de permetrina del estado de Colima

Localidad	α esterasa	β esterasa	MFO	GST	AChE	iAChE
Colima	44.8%	0%	38%	11.6%	0%	16.4%
Tecoman	88.2%	15%	40.8%	35 %	2.8%	4%
Manzanillo	41.2%	0%	30.4%	11.6%	0.4%	10.6%

Tabla 8.- Proporción de Resistencia (R) de mosquitos adultos muertos a DD de permetrina del estado de Colima

Localidad	α esterasa	β esterasa	MFO	GST	AChE	iAChE
Colima	37.8%	0%	94.8%	10.8%	0%	8.6%
Tecoman	62%	1.6%	77.2%	10.8%	8.6%	0.8%
Manzanillo	45.8%	0%	73.8%	3.4%	0.6%	0.2%

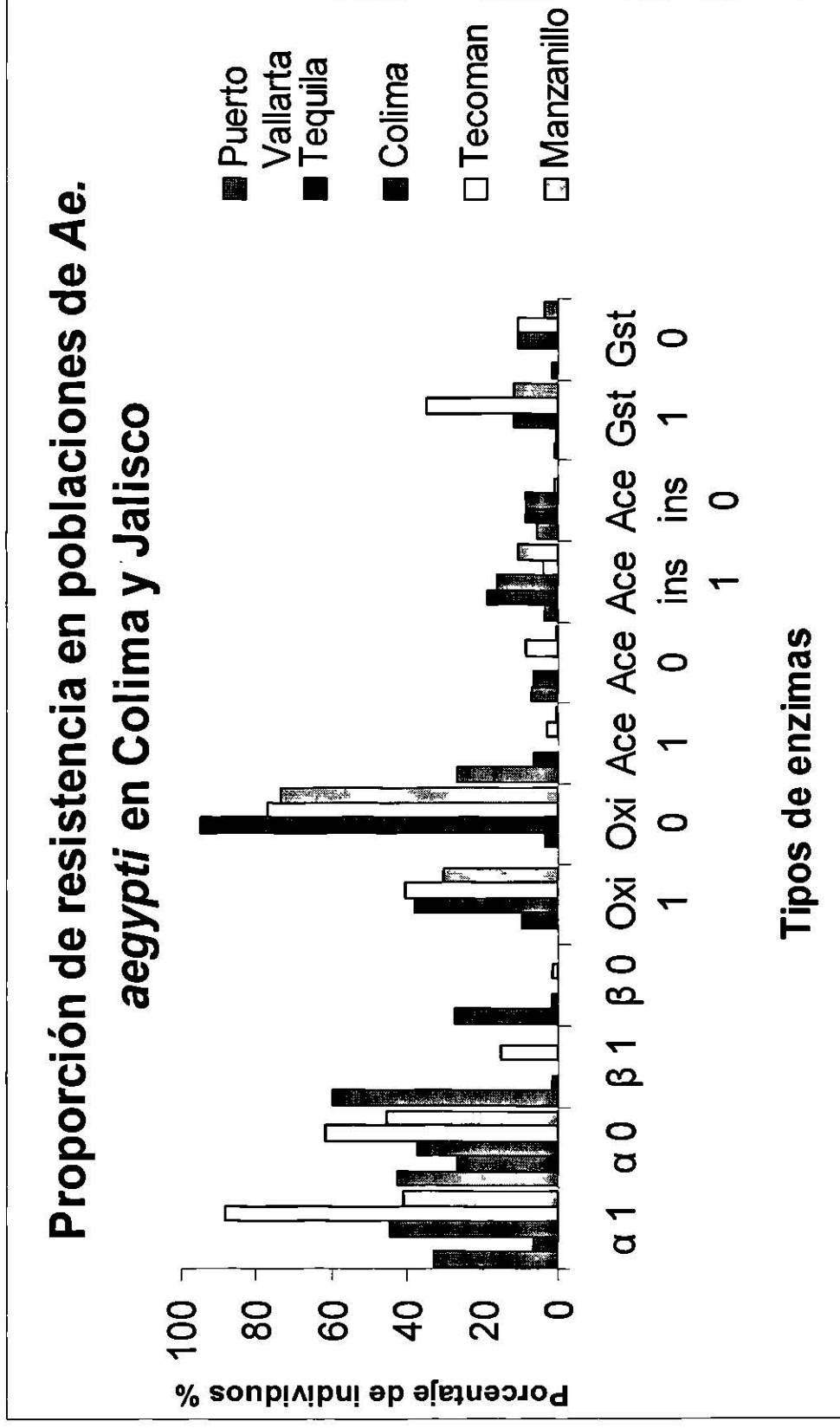


Tabla 9. Valores de absorbancia promedio de las seis enzimas examinadas en poblaciones sobrevivientes y muertas a DD de permetrina en el estado de Jalisco y cepa susceptible New Orleans (NO).

Prueba bioquímica	New Orleans vivos	Puerto Vallarta vivos	Tequila vivos	New Orleans muertos	Puerto Vallarta muertos	Tequila muertos
α esterasa	0.65826	0.77721	0.6685	0.62477	0.7848	0.72359
β esterasa	0.7061	0.9261	0.7216	0.70551	0.88199	0.75326
FOM	0.25369	0.14668	0.19308	0.17203	0.14355	0.21016
AChE	1.47E-02	0.15769	0.11684	7.92E-02	0.1383	0.133
iAChE	-4.8 E02	7.9E-02	1.91 E02	-4.5 E02	-3.5 E-03	-2.9 E-03
GST	1.58 E- 02	3.63 E-02	2.27 E-02	2.4 E-03	2.52 E-02	3.29 E-02

6.4. ANOVA y de comparación de medias de las seis enzimas examinadas en poblaciones muertas a DD de permetrina en dos localidades del estado de Jalisco y cepa susceptible New Orleans (NO) e interpretación de las figuras de distribución de frecuencias de individuos que no sobrevivieron a DD de permetrina.

6.4.1. α esterases en individuos que no sobrevivieron a DD de permetrina.

En la comparación de las media (Tabla No.9), demuestra que entre las poblaciones de Puerto Vallarta, Jalisco y la cepa susceptible si hay diferencia significativa ($p < 0.05$). Al observar la Figura No. 23 nos muestra que la cepa de New Orleans presenta la menor media de 0.62477 por lo que las dos poblaciones sobrepasan el umbral de resistencia. La población de Puerto Vallarta sobrepasa el umbral de resistencia con la mayor media de 0.7848 y una proporción de resistencia de 42.8 %. La población de Tequila también sobrepaso el umbral de resistencia con una media menor de 0.72359 y una proporción de resistencia fue de 27%, pero solo ambas localidades presentando actividad enzimática ya que en la población de vivos la proporción de resistencia es menor.

6.4.2- β esterases en individuos que no sobrevivieron a DD de permetrina.

Al realizar el análisis de varianza en la comparación de medias, la Tabla No 10, nos revela que hay una alta diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la cepa susceptible de New Orleans con una media menor de 0.70551, en relación con la población de Puerto Vallarta con una media mayor de 0.88199, y con la población de Tequila con una media de 0.75326, además entre las dos poblaciones tratadas existe una alta diferencia significativa. En la Figura No. 24 nos muestra que las dos poblaciones sobrepasan el umbral de resistencia siendo la proporción de resistencia mayor la de Puerto. Vallarta con 27.6 % que en comparación con vivos es mayor con un valor de 59.8% lo cual indica que hay resistencia a piretroides. Por el contrario en tequila la proporción es de 1.6 % igual que en la población de vivos por lo tanto nos demuestra que es nula la actividad enzimática en esta localidad.

6.4.3- FOM en individuos que no sobrevivieron a DD de permetrina.

Al comparar la medias entre la población de Puerto Vallarta y Tequila en relación con la cepa de referencia New Orleans presentan diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ellas. Siendo que la media mayor de Tequila con 0.21016, seguida de New Orleans de 0.17203 y por ultimo Puerto Vallarta con una media de 0.14355. Al analizar la Figura No. 25, demuestra que Tequila sobrepaso el umbral de resistencia con una proporción de 3.6% y la población de Puerto Vallarta no rebaso el umbral de tolerancia de la cepa susceptible pero al compararla con la población sobreviviente esa lo rebaso con 0.2 % por lo tanto no hay actividad enzimática para el insecticida piretroide en ambas localidad.

6.4.4- AChE en individuos que no sobrevivieron a DD de permetrina

En la comparación de medias (Tabla 9) nos muestra que la localidad de Puerto Vallarta presento una media de 0.13830 y la población de Tequila de 0.1300 dando como resultado que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ellas pero en relación con la cepa susceptible si hay una diferencia significativa, ($p < 0.05$) ya que presento una media de 7.92 E-02. En la Figura No. 26 nos muestra que las dos poblaciones sobrepasaron el umbral de resistencia comparados con la cepa de New Orleans, con una proporción de 7 % para la localidad de Puerto Vallarta y de 6.8 % para la localidad de Tequila., al compararlas con la población sobreviviente para cada una, nos muestra que sobrepasan el umbral con una resistencia de 6.4% para Tequila la cual es muy parecida y nos confirma que no hay actividad enzimática para el insecticida probado, en cambio la proporción de resistencia para Puerto Vallarta es de 26.8% por lo tanto solo hay actividad enzimática.

6.4.5 iAChE en individuos que no sobrevivieron a DD de permetrina.

La Tabla 9 muestra que en las poblaciones de Puerto Vallarta y Tequila no hay diferencia significativa ($p>0.05$) entre ellas ya que sus medias son de $-3.5 \text{ E-}03$ y $-2.9 \text{ E-}03$ respectivamente, pero en cuanto a la población de New Orleans si existe diferencia significativa ya que presenta una media de $-4.5\text{E-}02$ ($p<0.05$). En cuanto al análisis de la Figura 27 nos muestra que la poblaciones si sobrepasaron el umbral de resistencia, en el caso de Tequila con una proporción mínima de 8.6% en comparación con los individuos que sobrevivieron cuyo valor es de 18.6%, por el contrario la localidad de Puerto Vallarta presento una proporción de resistencia de 5.6% un poco mayor a la población de los individuos que sobrevivieron la cual s de 3.6 % por lo existe actividad enzimática y no existe resistencia en ambas localidades.

6.4.6- GST en individuos que no sobrevivieron a DD de permetrina.

En la comparación de medias en la Tabla 9 nos muestra que las poblaciones son iguales significativamente ($p>0.05$), pero al compararlas con la cepa susceptible nos indica que hay diferencia significativa ($p<0.05$). Las media de New Orleans es de $2.4\text{E-}03$, en Puerto Vallarta es de $2.52\text{E-}02$ y por ultimo Tequila $3.29\text{E-}02$. En la Figura 28 las poblaciones muestran proporciones muy similares ya que ambas sobrepasaron el umbral de resistencia al compararlas con la cepa de New Orleans, con un mínima proporción de 0.2 % en la localidad de Tequila y de 1.4% en la de Puerto Vallarta por lo que no hay resistencia a insecticidas tan solo esta presente la actividad enzimática pero un una menor proporción.

6.5 ANOVA y de comparación de medias de las seis enzimas examinadas en poblaciones sobrevivientes a DD de permetrina en dos localidades del estado de Jalisco y cepa susceptible New Orleans (NO) e interpretación de las figuras de distribución de frecuencias de individuos que sobrevivieron a DD de permetrina.

6.5.1- α esterasas individuos que sobrevivieron a DD de permetrina.

En la comparación de las medias de la Tabla 9, muestra que las medias de la población de Tequila es de 0.66850 y de la cepa de New Orleans es de 0.65826 lo cual nos indica que son iguales significativamente ($p>0.05$) por el contrario en relación a la población de Puerto Vallarta son significativamente diferentes ($p<0.05$) con una media mayor de 0.77721. Al observar la Figura 23 la población de Tequila sobrepasa el umbral de resistencia con una proporción de 6.4 % y en la población de Puerto Vallarta la proporción de resistencia es de 32.8 % en ambas localidades si se compara con la población no sobreviviente es mayor la actividad enzima así es que no existe resistencia.

6.5.2.- β esterasas individuos que sobrevivieron a DD de permetrina.

Al observar la Tabla 9 y comparar medias nos indica que son iguales significativamente ($p>0.05$) las población de New Orleans y Tequila al presentar las medias 0.70611 y 0.7216 respectivamente, en contraste si hay diferencia significativa ($p<0.05$) con la población restante la cual tiene la media mayor de 0.9261. Por lo tanto en la Figura 24 el umbral de resistencia es sobrepasado por la localidad de Puerto Vallarta con una proporción resistencia de 59.8 % siendo mayor en comparación la población no sobreviviente cuyo valor es de 27.6% por lo que hay resistencia a piretroides y en caso de la población de Tequila la proporción de la resistencia es de 1.6% siendo igual a la población no sobreviviente por lo tanto no hay resistencia a piretroides.

6.5.3.- FOM en individuos que sobrevivieron a DD de permetrina.

Al analizar la comparación de medias de la Tabla 9 nos muestra que las medias de las dos poblaciones tratadas y la de referencia presentan diferencia significativa ($p<0.05$), ya que nos muestra que la mayor media es de 0.25369 para la población susceptible, 0.19308 para Tequila y por ultimo 0.14668 en la población de Puerto Vallarta. Al observar la Figura 25, nos revela que umbral de resistencia es

sobrepasado en una proporción de 0.2% siendo muy poco para generar resistencia aunque la actividad de la enzima esta presente. En cuanto a Tequila la proporción de resistencia es de 9.8% moderadamente alta en comparación con la población no sobreviviente la cual es de 3.6%, mostrando que no hay actividad enzimática por lo que no existe resistencia a piretroides en ambas localidades.

6.5.4.- AChE en individuos que sobrevivieron a DD de permetrina.

Comparando las medias de la Tabla 9, nos indica que entre las dos poblaciones y la cepa de New Orleans hay diferencia significativa ($p < 0.05$). Las medias de la cepa susceptible es de $1.47 \text{ E-}02$, y para Puerto Vallarta es de 0.15759 y por ultimo la de Tequila es de 0.11684. Examinando la Figura 26, nos indica que la población de Puerto Vallarta sobrepaso el umbral de resistencia con una proporción mayor de resistencia de 26.8% en comparación con los individuos no sobrevivientes, que fue solo el 7%, al igual que la Tequila con 6.4 % muy similar a la población no sobreviviente la cual mostró una proporción de resistencia de 6.8% Indicando que presentan actividad enzimática.

6.5.5.- iAChE en individuos que sobrevivieron a DD de permetrina.

La Tabla 9, de comparación de medias nos muestra que New Orleans tiene una media de $-4.8 \text{ E-}02$, Puerto Vallarta $7.9 \text{ E-}03$ y Tequila de $1.91 \text{ E-}02$ por lo que existe diferencia significativa ($p < 0.05$). En la Figura 27 la población de Puerto Vallarta sobrepasa el umbral de resistencia con una proporción de 3.6% ligeramente menor a la población no sobreviviente la cual fue 5.6%, y en Tequila la proporción de resistencia es de 18.6% moderadamente mayor a los individuos no sobrevivientes que fue de 8.6%, por lo tanto hay solo existe actividad enzimatica.

6.6.6.- GST en individuos que sobrevivieron a DD de permetrina.

Analizando la Tabla 9, de comparación de medias se observa que la población de Tequila y la cepa susceptible de New Orleans son iguales significativamente ($p>0.05$) entre si, pero diferentes ($p<0.05$) a la otra población. En la Figura No. 28 encontramos que las dos poblaciones sobrepasaron el umbral de resistencia al estar por encima de la cepa susceptible de New Orleans. La proporción de resistencia que mostraron fue la siguiente, Puerto Vallarta con 0.8% y una media de 3.63×10^{-2} así como en Tequila con 0.4% y una media de 2.27×10^{-2} esto nos indica que estas localidades presentan muy poca actividad enzimática y nula resistencia a piretroides.

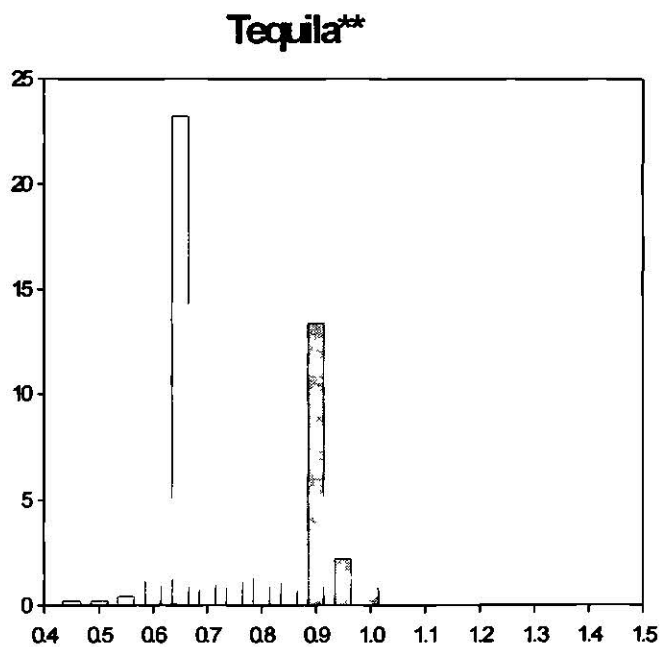
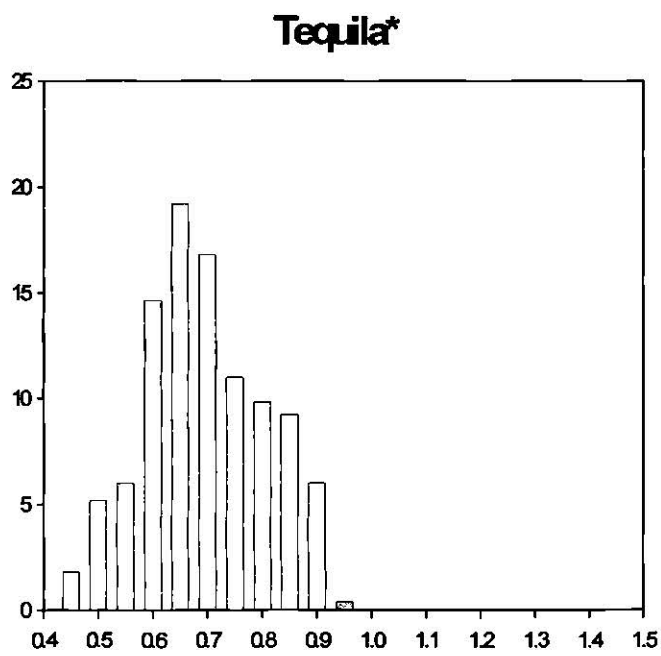
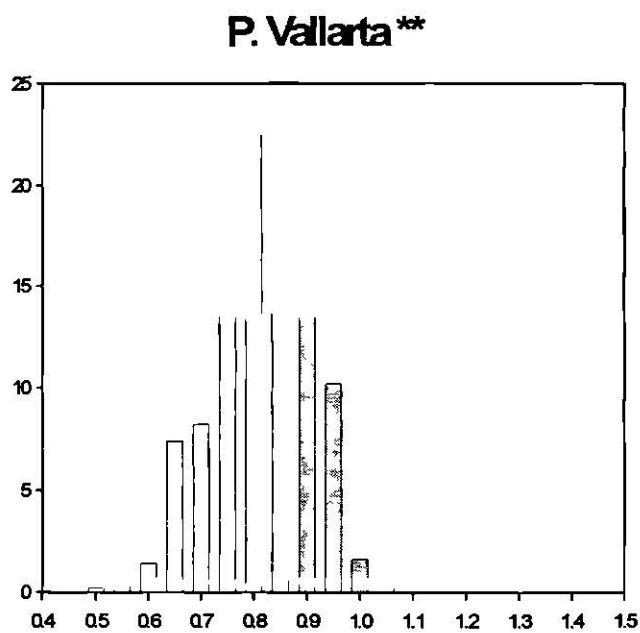
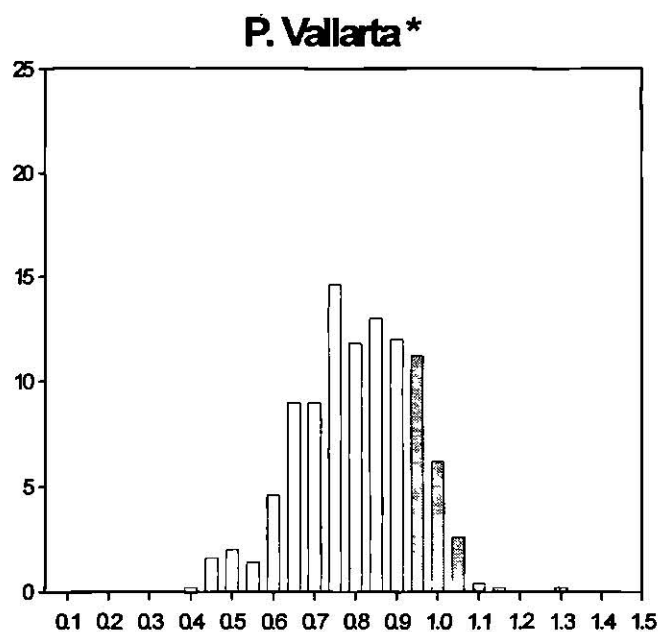


Figura 23.- Distribución de frecuencias de absorbancias para α esterasas en poblaciones sobrevivientes (*) y muertas (**) a DD de permetrina del estado de Jalisco.

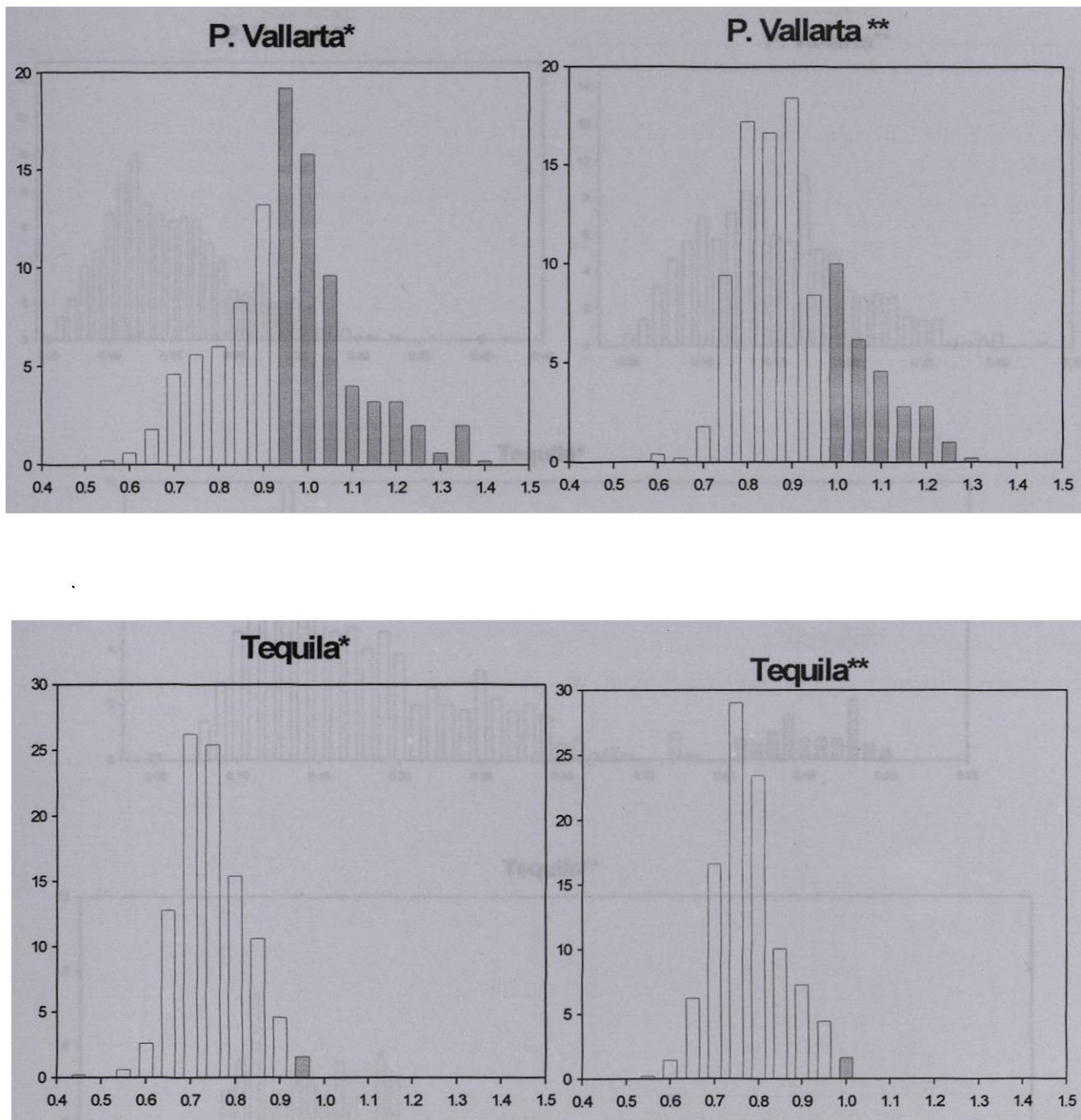


Figura 24- Distribución de frecuencias de absorbancias para β esterasas en poblaciones sobrevivientes (*) y muertas (**) a DD de permetrina del estado de Jalisco.

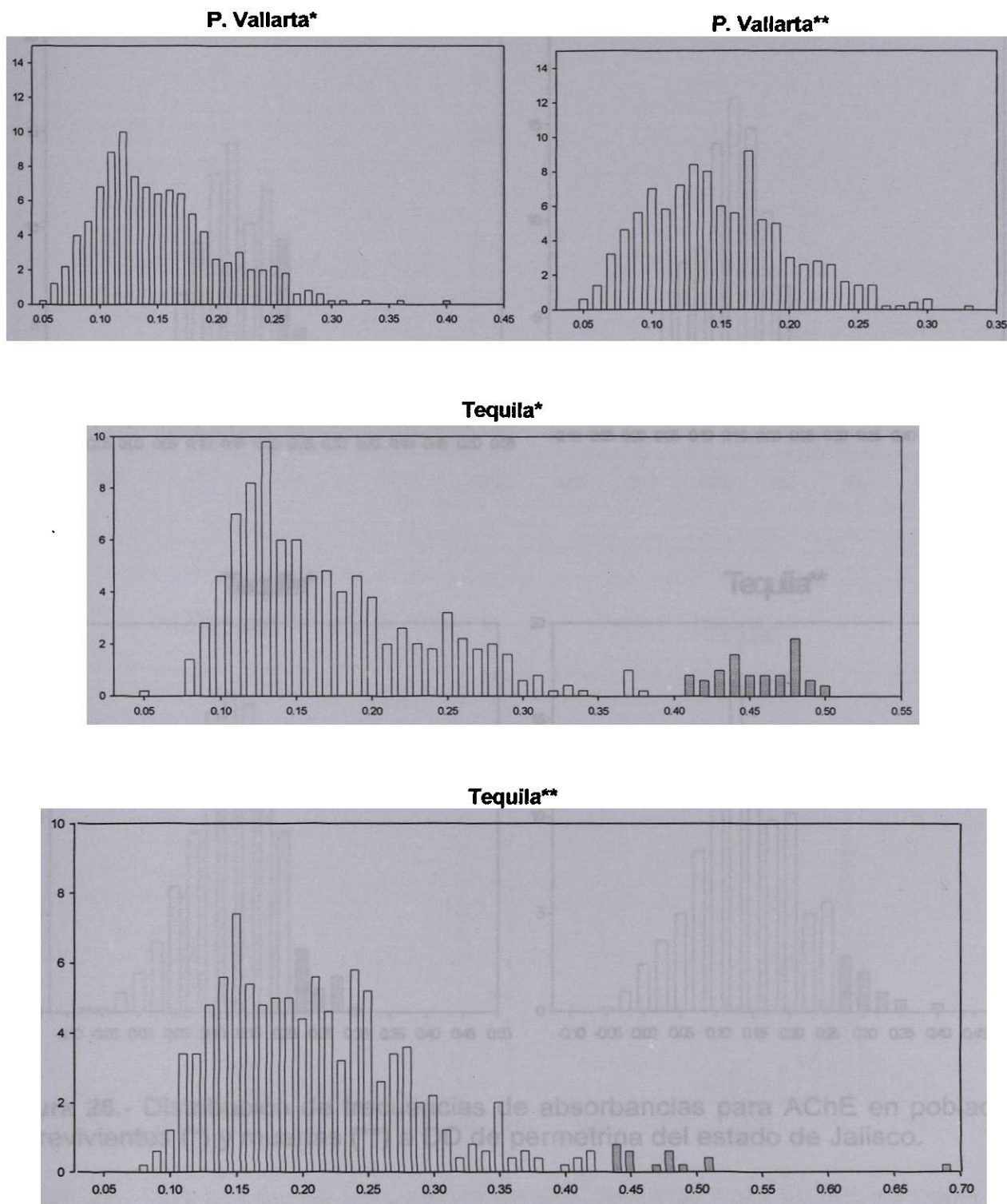
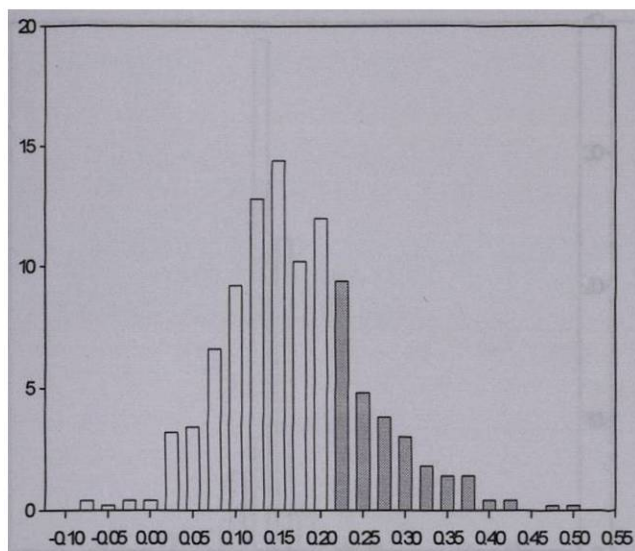
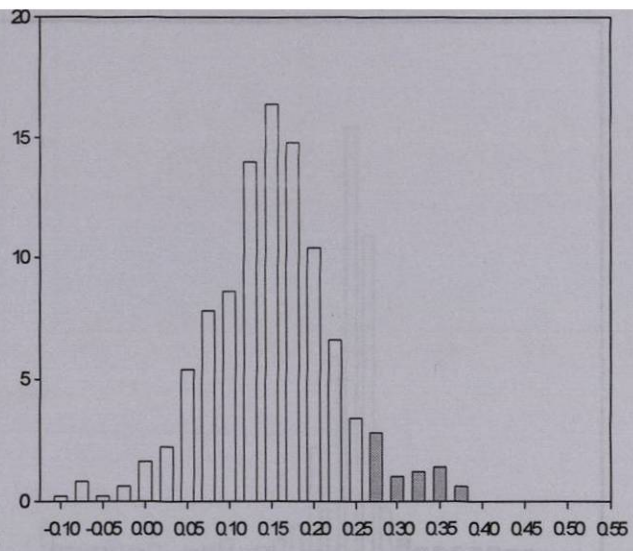


Figura 25.- Distribución de frecuencias de absorbancias para FOM en poblaciones sobrevivientes (*) y muertas (**) a DD de permetrina del estado de Jalisco.

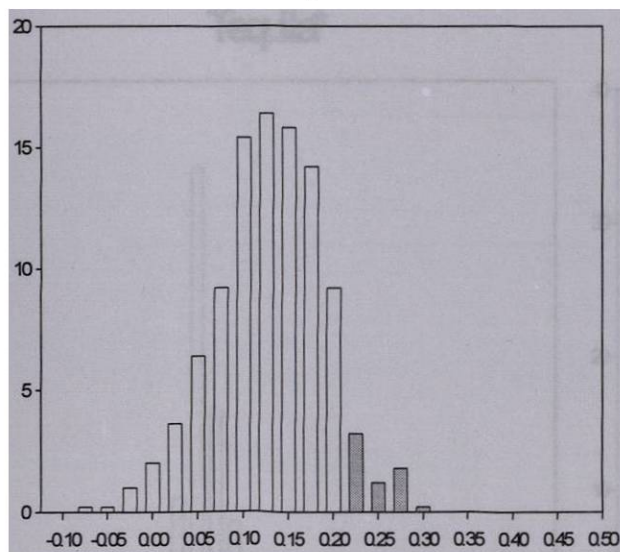
P. Vallarta*



P. Vallarta**



Tequila*



Tequila**

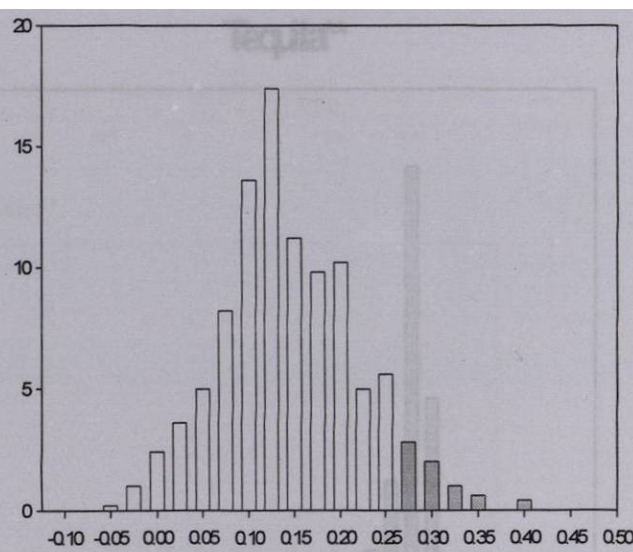


Figura 26.- Distribución de frecuencias de absorbancias para AChE en poblaciones sobrevivientes (*) y muertas (**) a DD de permetrina del estado de Jalisco.

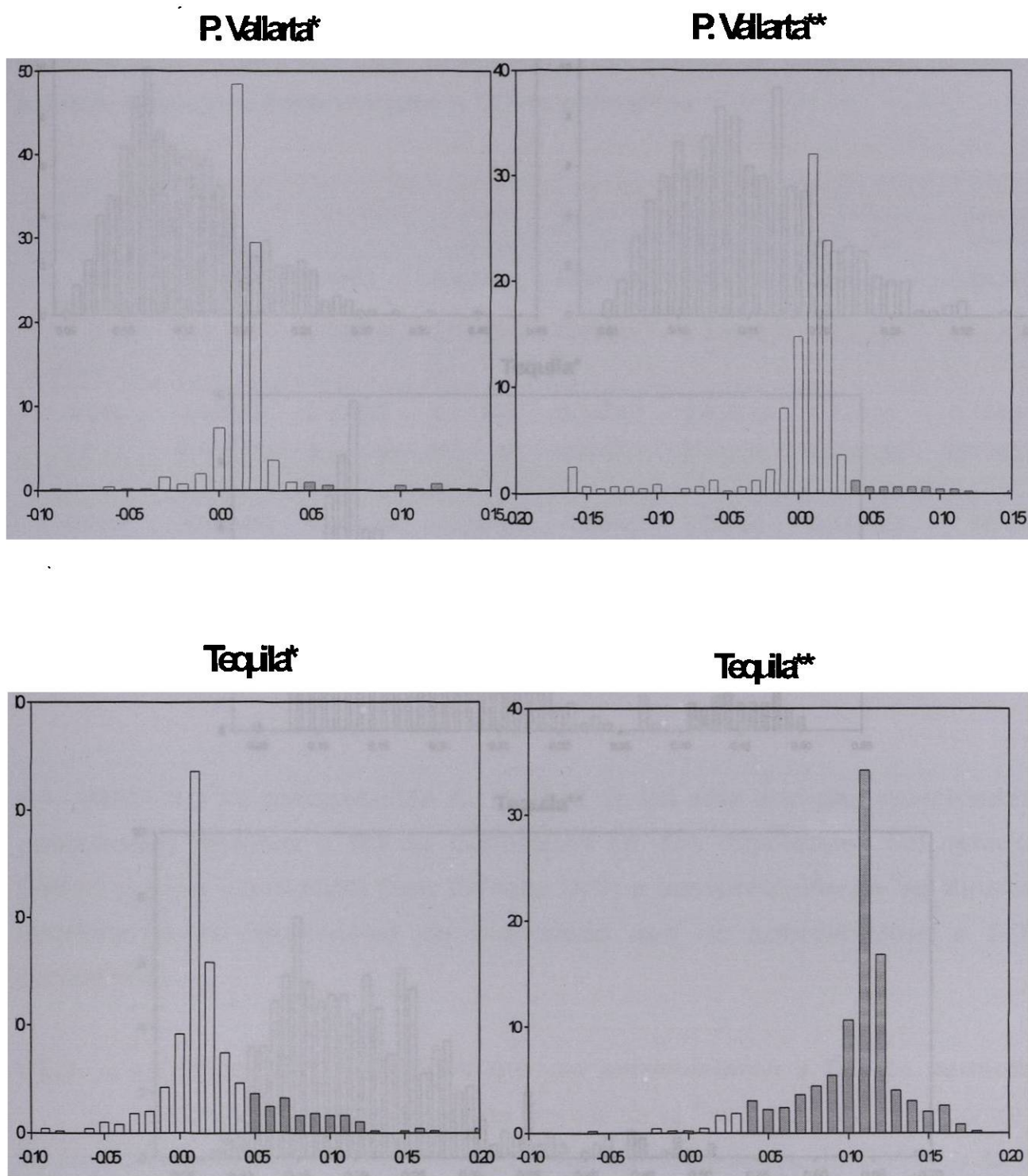


Figura 27.- Distribución de frecuencias de absorbancias para iAChE en poblaciones sobrevivientes (*) y muertas (**) a DD de permetrina del estado de Jalisco.

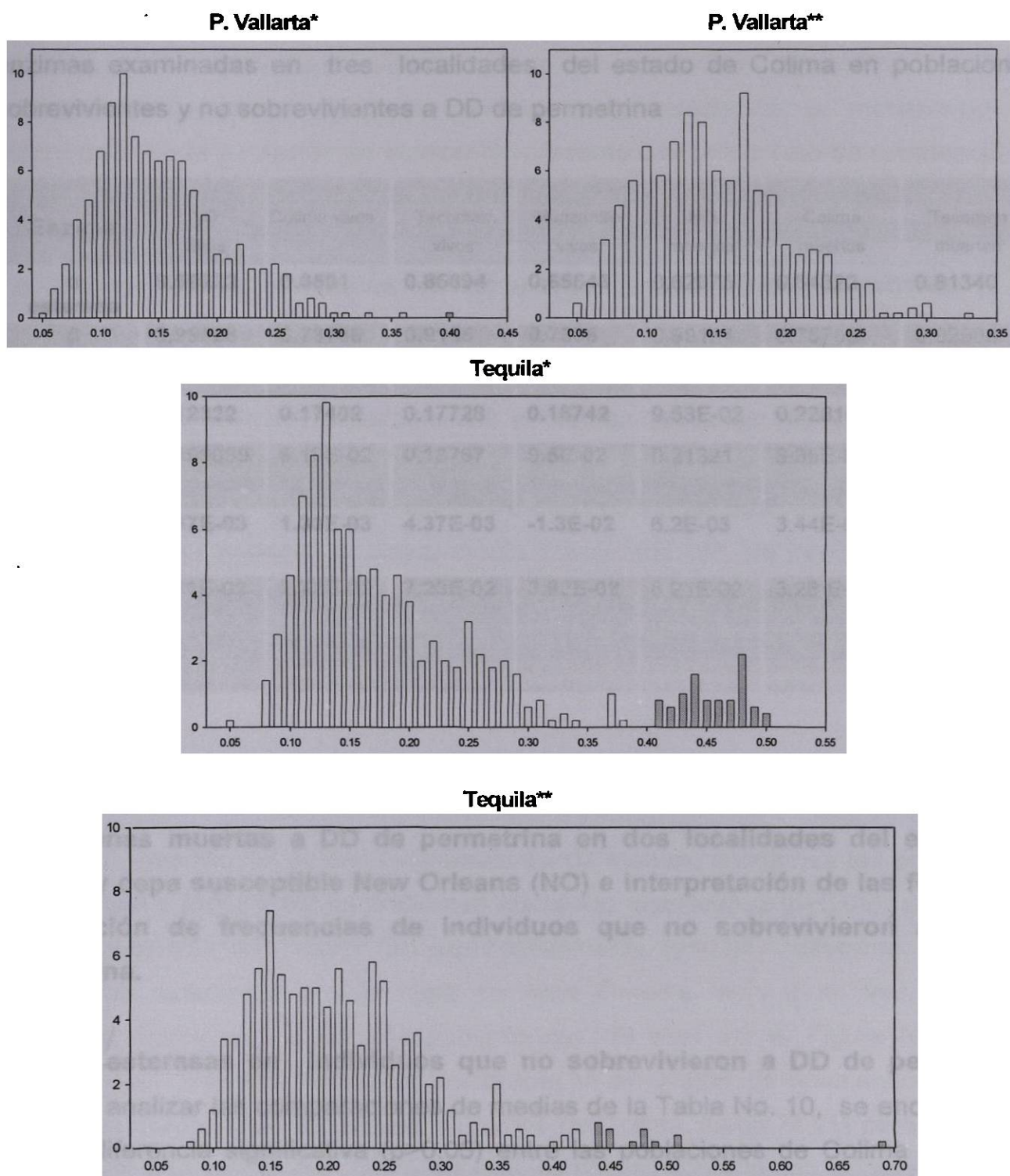


Figura 28.- Distribución de frecuencias de absorbancias para GST en poblaciones sobrevivientes (*) y muertas (**) a DD de permetrina del estado de Jalisco.

Tabla 10. Valores del análisis de ANOVA y de comparación de medias de las seis enzimas examinadas en tres localidades del estado de Colima en poblaciones sobrevivientes y no sobrevivientes a DD de permetrina

Enzima	NO vivos	Colima vivos	Tecoman vivos	Manzanillo vivos	NO muertos	Colima muertos	Tecoman muertos	Manzanillo muertos
α esterasa	0.59232	0.6581	0.86694	0.65543	0.62075	0.64322	0.81340	.67918
β esterasa	0.99358	0.73786	0.9155	0.7305	0.99164	0.75708	0.92508	0.7047
FOM	0.12322	0.17402	0.17728	0.15742	9.53E-02	0.22816	0.1640	.17201
AChE	0.199089	6.18E-02	0.13767	9.5E-02	0.21321	8.35E-02	0.17963	.11389
iAChE	3.67E-03	1.33E-03	4.37E-03	-1.3E-02	6.2E-03	3.44E-02	7.5E-03	3.99E-03
GST	5.81E-02	2.72E-02	7.23E-02	3.92E-02	6.21E-02	3.26 E-02	4.47 E-02	2.88E-02

6.6.- ANOVA y de comparación de medias de las seis enzimas examinadas en poblaciones muertas a DD de permetrina en dos localidades del estado de Colima y cepa susceptible New Orleans (NO) e interpretación de las figuras de distribución de frecuencias de individuos que no sobrevivieron a DD de permetrina.

6.6.1- α -esterasas en individuos que no sobrevivieron a DD de permetrina.

Al analizar las comparaciones de medias de la Tabla No. 10, se encontró que no hay diferencia significativa ($p>0.05$) entre las poblaciones de Colima y la cepa susceptible de New Orleans, en cambio la localidad de Tecomán y de Manzanillo son diferentes significativamente ($p<0.05$) entre ellas y las otras dos poblaciones. Al compararla con la Figura No.29 la población de Tecomán sobrepaso el umbral de resistencia con la mayor media de 0.81340 y una proporción de resistencia de 62%, y la población de Colima también sobrepaso el umbral de resistencia con una media

menor de 0.64322 y una proporción de resistencia fue de 37.8%, en comparación a la población sobreviviente siendo menor la proporción de 88.2% y 44.8% respectivamente, por lo tanto en ambas existe resistencia al mecanismo de estereos. En la población de Manzanillo presento una proporción de resistencia de 45.8% con una media de 0.67918 aunque solo existe actividad enzimática.

6.6.2-β esterasas en individuos que no sobrevivieron a DD de permetrina.

En las comparaciones de medias de la Tabla No.10, se muestra que la poblaciones de Colima y Manzanillo no presentan diferencia significativa ($p>0.05$) entre ellas, mientras que Tecomán y la cepa susceptible son iguales significativamente ($p<0.05$) entre ellas pero diferentes a las otras dos poblaciones. La cepa susceptible presento la mayor media comparada con las tres poblaciones. La Figura No. 30 nos muestra que las poblaciones de Colima y Manzanillo no sobrepasan el umbral de resistencia, y Tecomán apenas lo rebasa con 1.6% por lo tanto no presentan actividad enzimática.

6.6.3- FOM en individuos que no sobrevivieron a DD de permetrina.

La Tabla No. 10 de las comparaciones de medias, indica que las poblaciones de Tecomán y Manzanillo no presentan diferencia significativa ($p>0.05$) entre ellas, pero la población de Colima fue significativamente ($p<0.05$) diferente a las dos poblaciones anteriores y a la cepa de New Orleans, esta a su vez, presenta diferencia significativa a las tres poblaciones. Al observar la Figura No.31, nos muestra que las tres localidades sobrepasan el umbral de resistencia con una proporción mayor de 94.8% para la población de Colima, luego 77.2% para Tecomán y por ultimo Manzanillo con 73.8% aunque los niveles son altos no existe resistencia por que al hacer la comparación con la población de sobrevivientes es menor la proporción de resistencia en las tres localidades.

6.6.4- AChE en individuos que no sobrevivieron a DD de permetrina.

Al analizar las comparaciones de medias de la Tabla No. 10, se encontró que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las tres poblaciones y la cepa susceptible de New Orleans. La Figura No. 32 nos indica que dos poblaciones sobrepasaron el umbral de resistencia, por el contrario la población de Colima no sobrepasó el umbral de resistencia comparados con la cepa susceptible de New Orleans, pero sin obtener un nivel de resistencia a insecticidas piretroides ya que están implicados con los mecanismos enzimáticos. La proporción de resistencia más alta fue la de Tecmán de 8.6%, siguiéndole Manzanillo con una proporción de resistencia de 0.6% y por último Colima que no sobrepasó el umbral de resistencia. La cepa susceptible presentó una media de 0.21321 mayor a las otras tres poblaciones, siguiéndole Tecmán con una media de 0.17963, Manzanillo con una media de 0.11389 y por último la población de Colima media de 8.35×10^{-2} . Al estar la media de New Orleans por encima de las poblaciones nos indica que no existe resistencia a piretroides.

6.6.5- iAChE en individuos que no sobrevivieron a DD de permetrina.

Al analizar la comparación de medias de la Tabla No.10 se encontró que las poblaciones de Tecmán, Manzanillo y New Orleans son iguales significativamente ($p > 0.05$), mientras que la población de Colima presenta diferencia significativa ($p < 0.05$) dos poblaciones y a la cepa susceptible. La Figura No. 33 nos muestra que las medias obtenidas son de Colima con 3.44×10^{-2} , sobrepasando el umbral de resistencia con 8.6%. Al igual que las poblaciones de Tecmán y Manzanillo con 7.5×10^{-3} , 3.99×10^{-3} y una proporción de resistencia de 0.8% y 0.2 respectivamente. Por lo tanto la resistencia no está presente en estas poblaciones.

6.6.6 GST en individuos que no sobrevivieron a DD de permetrina

En la comparación de media en la Tabla No.10, nos muestra que las poblaciones de Colima y Manzanillo son iguales significativamente ($p > 0.05$), pero al compararlas con la otra población y la cepa susceptible nos indica que hay diferencia

significativa ($p < 0.05$). En la Figura 34 las poblaciones muestran proporciones muy similares ya que ambas sobrepasaron el umbral de resistencia al compararlas con la cepa de New Orleans, con un proporción de 10.8 % para Colima, 10.8% en Tecomán y la proporción de Manzanillo es 3.4%, todas menores a las poblaciones sobrevivientes, pero la media de New Orleans es mayor a las tres localidades por lo tanto la actividad enzimática no esta presente.

6.7.- ANOVA y de comparación de medias de las seis enzimas examinadas en poblaciones que sobrevivieron a DD de permetrina en dos localidades del estado de Colima y cepa susceptible New Orleans (NO) e interpretación de las figuras de distribución de frecuencias de individuos que sobrevivieron a DD de permetrina.

6.7.1- α esterasas en individuos que sobrevivieron a DD de permetrina

Al examinar la comparación de medias de la tabla No. 10, se encontró que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las poblaciones de Colima y Manzanillo pero difieren a la otra población y a la cepa susceptible, en cambio la población de Tecomán presento diferencia significativa ($p < 0.05$) a las demás poblaciones e incluso de la cepa susceptible que es también diferente significativamente a las tres poblaciones. La Figura No. 29 nos indica que Tecomán obtuvo la mayor media de 0.86694, continuando con Colima con una media de 0.65810 y en Manzanillo presento una media de 0.65543 y la cepa susceptible New Orleans con la media más baja de 0.59232, por lo que la proporción de resistencia es de 88.2% en Tecomán, 44.8 % en Colima por lo tanto existe una clara resistencia para ambas localidades en cambio para Manzanillo presento una proporción de 41.2% ligeramente menor a la población muerta la cual es 45.8% lo que nos indica que no existe actividad enzimática.

6.7.2.- β esterasas en individuos que sobrevivieron a DD de permetrina

Al analizar la comparación de medias de la Tabla No. 10, se encontró que las poblaciones de Colima y Manzanillo son significativamente iguales ($p>0.05$) pero diferentes a la otra población y a la cepa susceptible, en cambio la población de Tecomán y New Orleans ($p>0.05$) no presentaron diferencia significativa entre ellas. La Figura No. 30 nos muestra que las poblaciones de Colima y Manzanillo no sobrepasan el umbral de resistencia, por lo tanto no presentan actividad enzimática, en cambio la proporción de resistencia más alta fue con Tecomán con 15% esto nos indica que la actividad enzima es muy baja sugiriendo que tan solo esta presente la enzima y no confiere resistencia a nivel poblacional y no como especie la cual no es significativa.

6.7.3.- FOM en individuos que sobrevivieron a DD de permetrina

Examinando la comparación de medias de la Tabla No.10, se observan que son iguales significativamente ($p>0.05$) las poblaciones de Colima y Tecomán, en cambio la población de Manzanillo fue diferente significativamente ($p<0.05$) a las otras dos poblaciones y cepa susceptible y a su vez la de New Orleans diferente a las tres poblaciones. Figura No. 31 nos indica que las tres poblaciones sobrepasaron el umbral de resistencia comparados con la cepa susceptible de New Orleans. La población de Tecomán obtuvo una proporción de resistencia de 40.8%, la población de Colima de 38% y Manzanillo con la menor proporción de resistencia de 30.4% ya que fue menor la proporción de resistencia ante muertos no existe resistencia entre las tres localidades.

6.7.4.- AChE en individuos que sobrevivieron a DD de permetrina

En la Tabla No.10, de comparación de medias nos indica que las tres poblaciones presentan diferencia significativa ($p<0.05$) y la cepa susceptible también es diferente a todas las poblaciones. Al observar la Figura No. 32 encontramos que las poblaciones de Tecomán y Manzanillo sobrepasaron el umbral de resistencia al estar por encima de la cepa susceptible de New Orleans, en cambio la población de Colima no sobrepaso el umbral, por lo tanto no hay actividad enzimática. La proporción de resistencia que obtuvieron fue la siguiente, Tecomán con 2.8%,

Manzanillo con 0.4% y Colima 0%. La media más alta la obtuvo la cepa susceptible con 0.19089 continuando con Tecomán con 0.13767, Manzanillo 9.5 E-02 y por ultimo Colima con una media de 6.18 E -02. Por lo tanto no hay resistencia a piretroides.

6.7.5.- iAChE en individuos que sobrevivieron a DD de permetrina

Al examinar la Tabla No.10, de comparación de medias encontramos que las poblaciones de Colima, Tecoman y la cepa susceptible de New Orleans son iguales significativamente ($p>0.05$) pero diferentes a la población de Manzanillo. La Figura No. 33 nos muestra que las tres poblaciones sobrepasaron el umbral de resistencia con una proporción de resistencias de 16.4% en Colima, mientras que en Tecoman es de 4% y Manzanillo con 10.6%. Demostrando que no es suficiente para generar resistencia ya que la población no sobreviviente se encuentran valores muy similares en cuestión de proporciones.

6.7.6.- GST en individuos que sobrevivieron a DD de permetrina

Analizando la Tabla No.10, de comparación de medias se observa que las tres poblaciones y la cepa susceptible de New Orleans presenta diferencia significativa ($p<0.05$) entres si. Al observar la Figura No. 34 encontramos que las tres poblaciones sobrepasaron el umbral de resistencia al estar por encima de la cepa susceptible de New Orleans con una media de 5.81E-02. La proporción de resistencia que mostraron es la siguiente, Tecoman con 35% y la mayor media de 7.23 E-02, Manzanillo con 11.6% y una media de 3.92 E-02 y Colima con 11.6% y una media de 2.72 E-02. Al ser mayor la media de New Orleans no confiere resistencia al insecticida piretroide en las localidades de Colima y Manzanillo, por el contrario en Tecomán al hacer la comparación con la población no sobreviviente es de 10.8% lo cual nos indica que existe actividad de la enzima mas no es suficiente para conferirle resistencia.

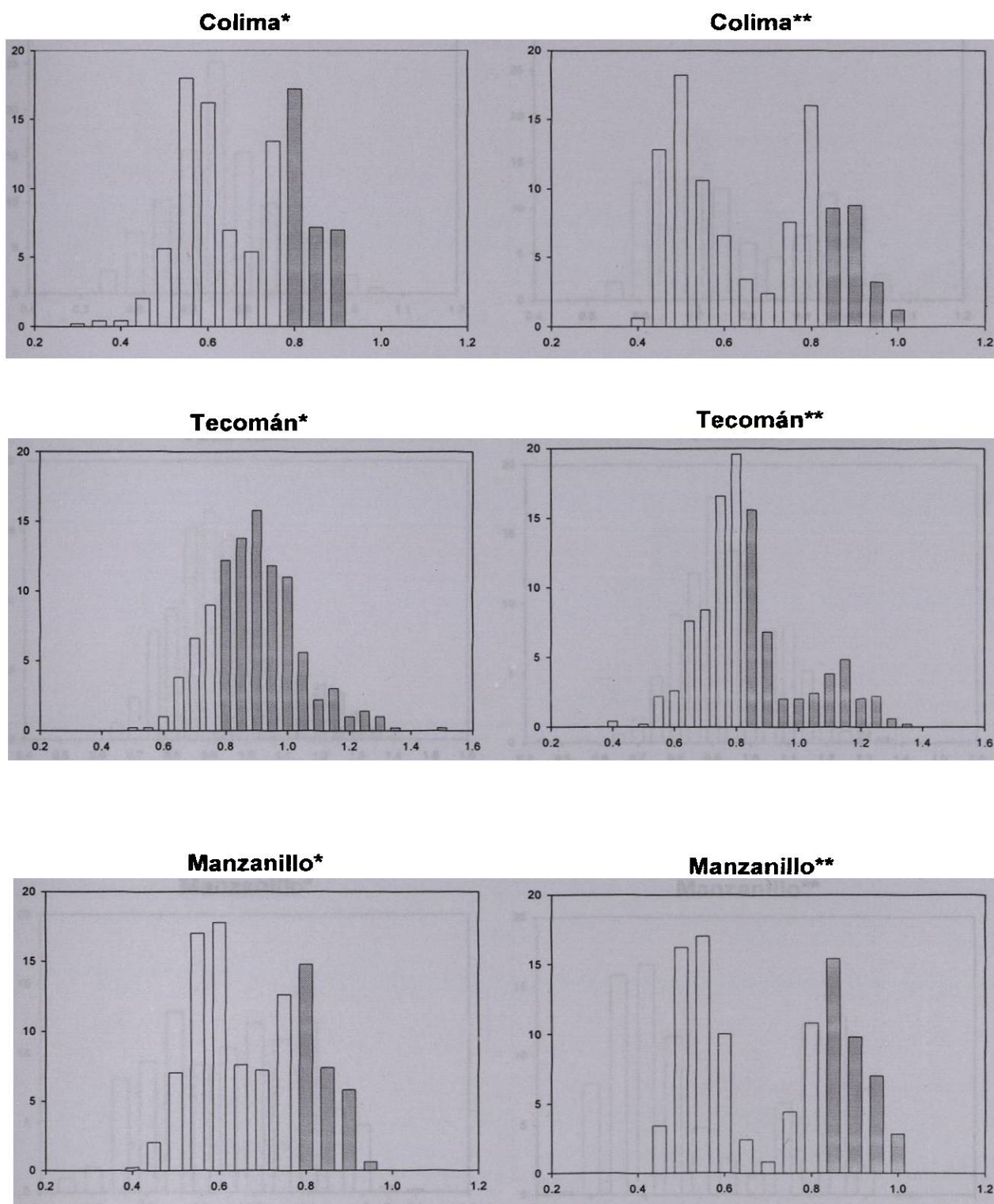


Figura 29.- Distribución de frecuencias de absorbancias para α esterasas en poblaciones sobrevivientes (*) y muertas (**) a DD de permetrina del estado de Colima.

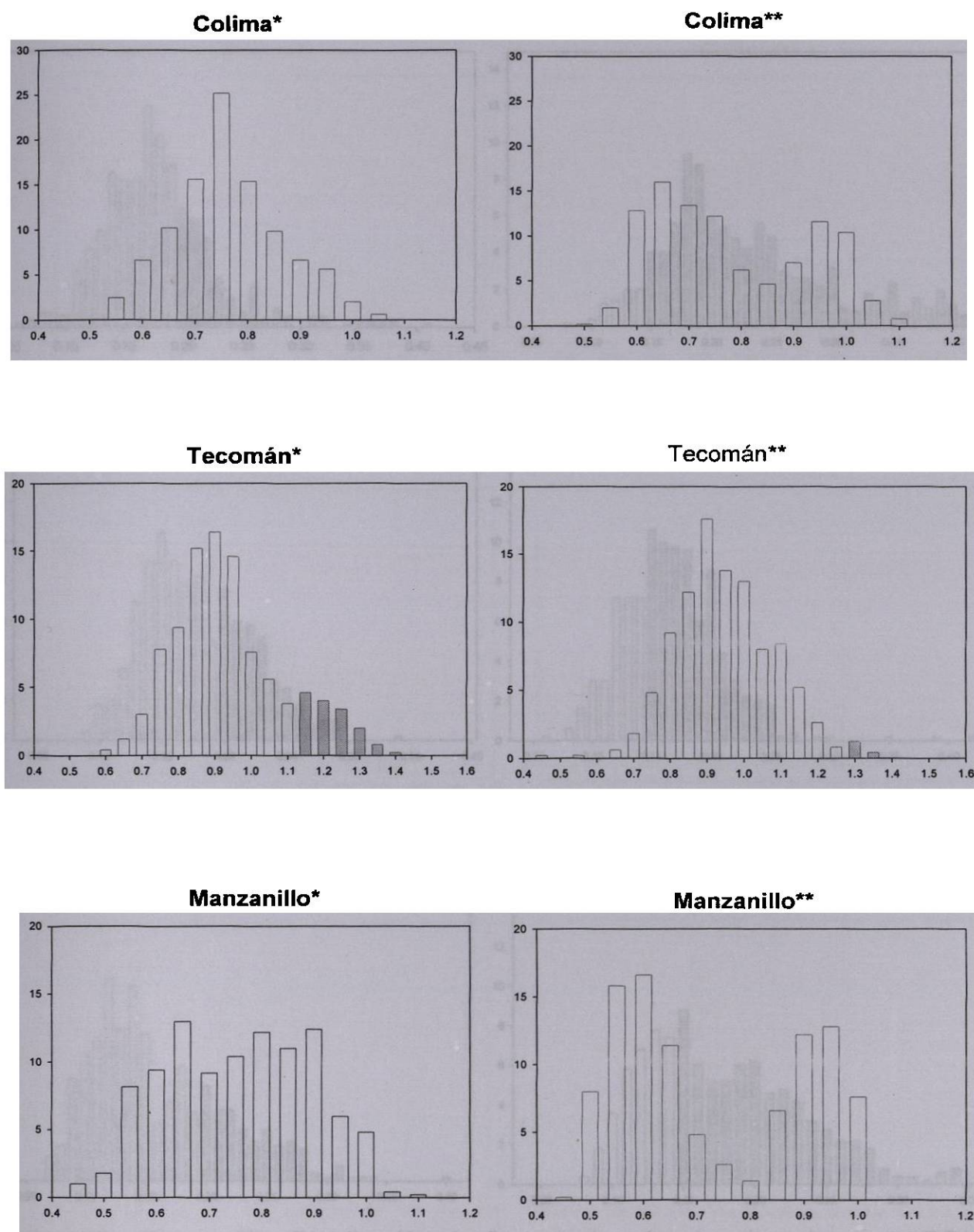
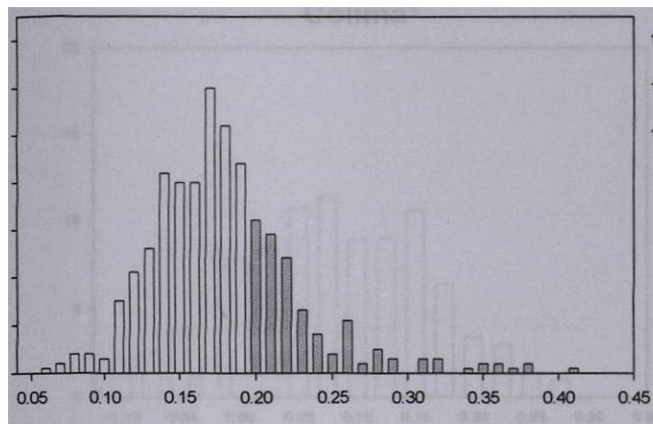
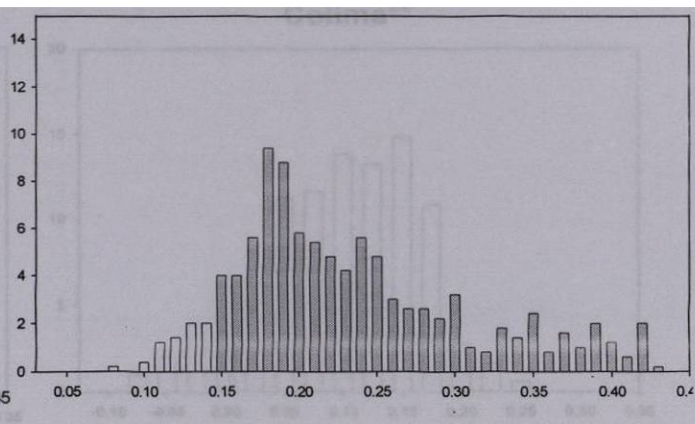


Figura 30.- Figura 29.- Distribución de frecuencias de absorbancias para β esterasas en poblaciones sobrevivientes (*) y muertas (**) a DD de permetrina del estado de Colima.

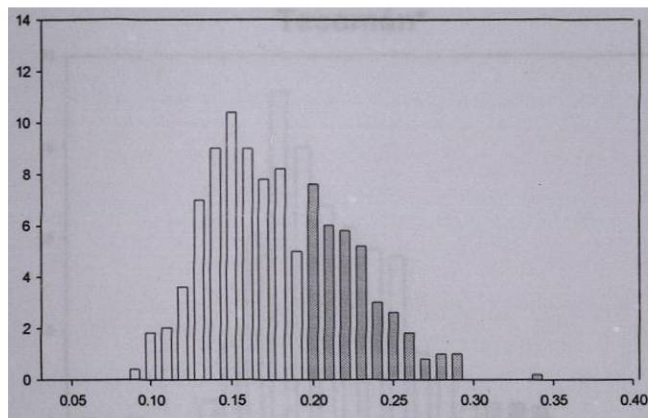
Colima*



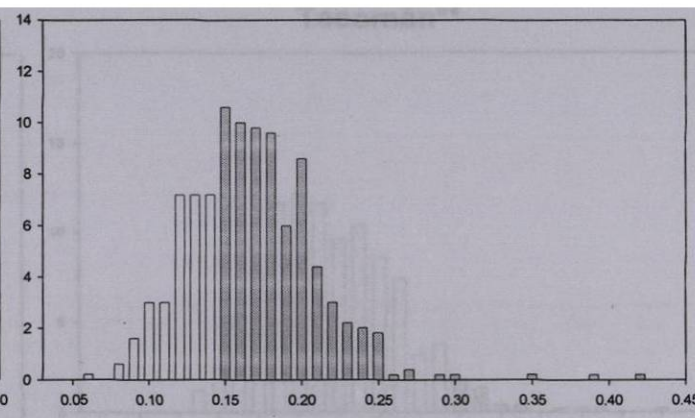
Colima**



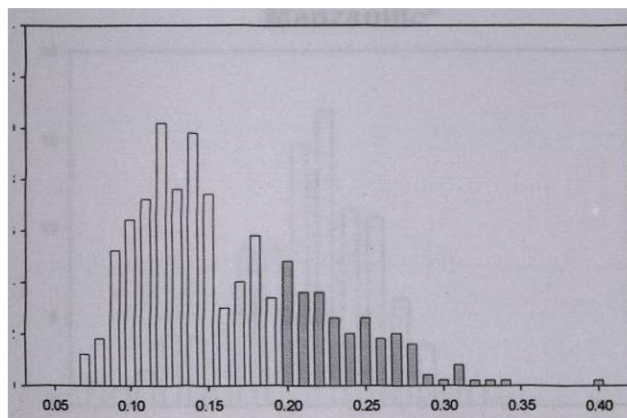
Tecomán*



Tecomán**



Manzanillo*



Manzanillo**

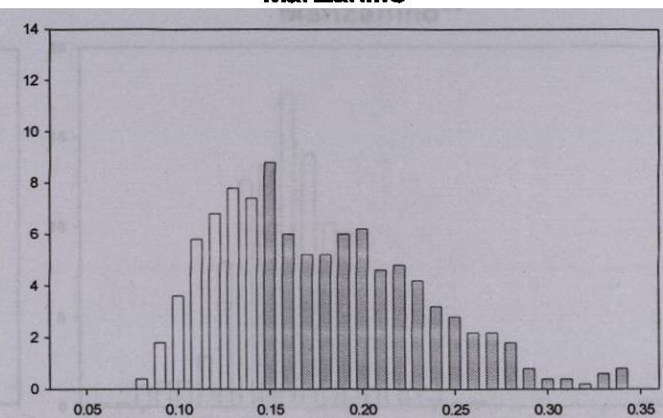


Figura 31.- Figura 29.- Distribución de frecuencias de absorbancias para FOM en poblaciones sobrevivientes (*) y muertas () a DD de permetrina del estado de Colima.**

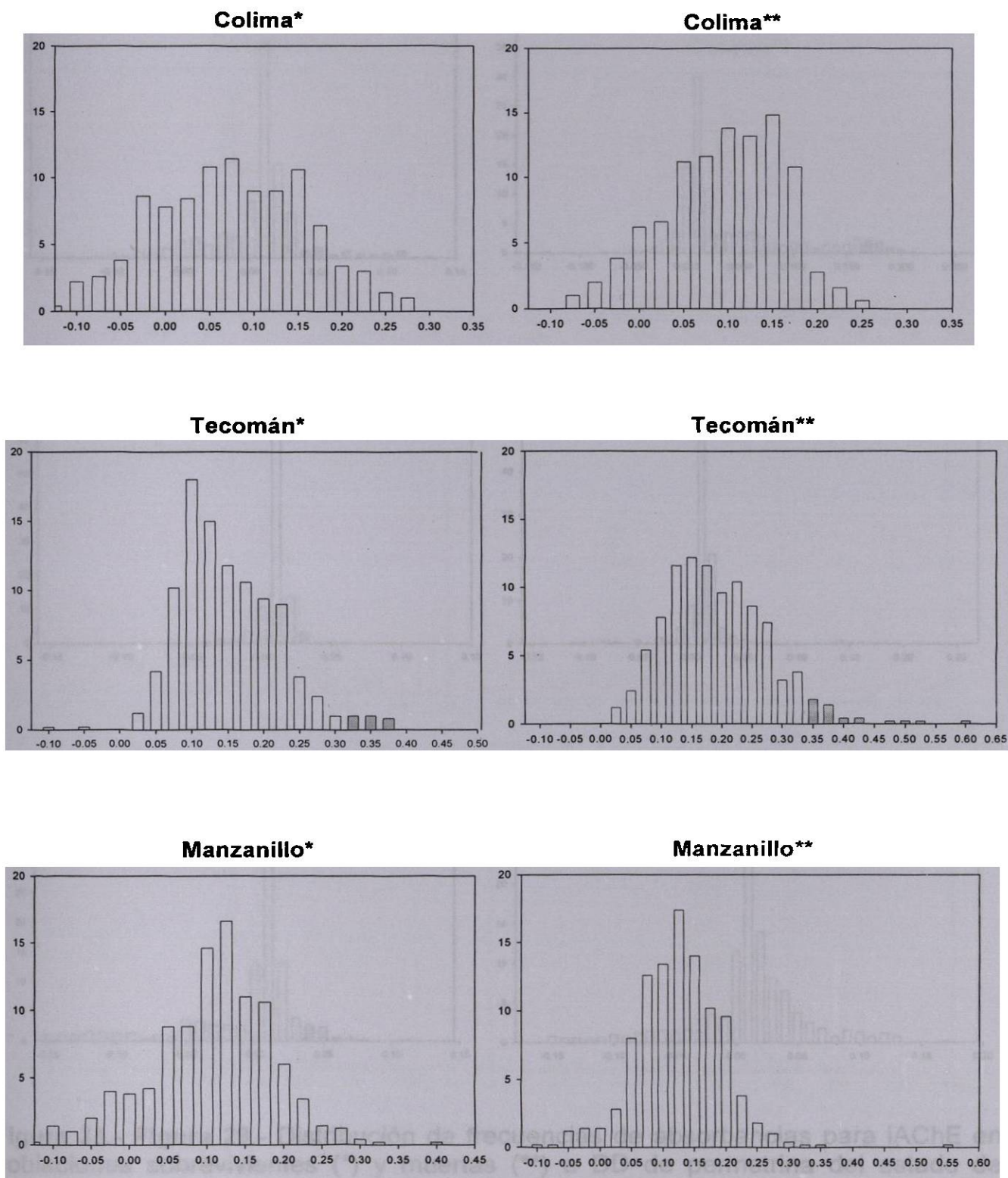


Figura 32.- Figura 29.- Distribución de frecuencias de absorbancias para AChE en poblaciones sobrevivientes (*) y muertas () a DD de permetrina del estado de Colima.**

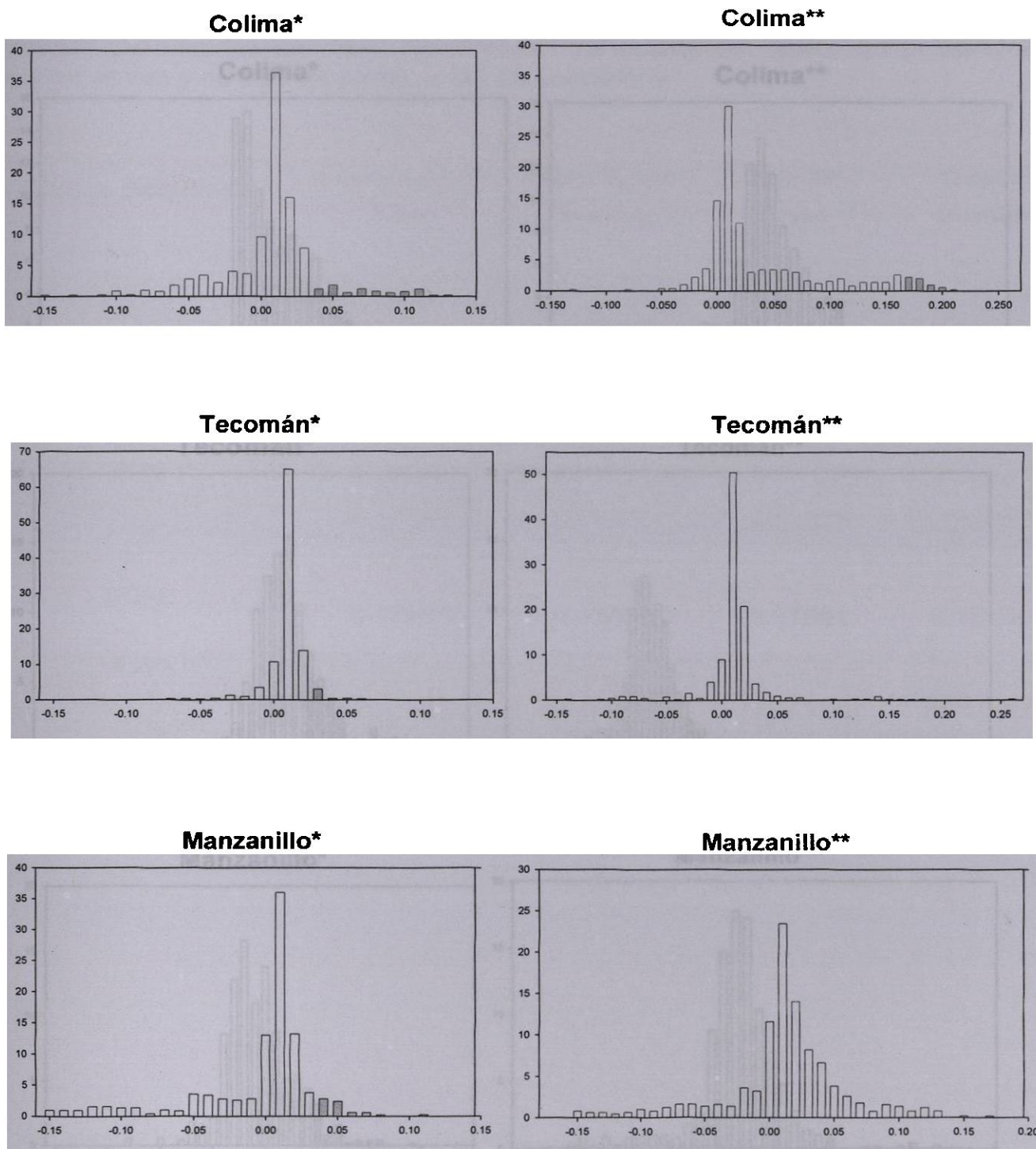


Figura 33.- Figura 29.- Distribución de frecuencias de absorbancias para iAChE en poblaciones sobrevivientes (*) y muertas () a DD de permetrina del estado de Colima.**

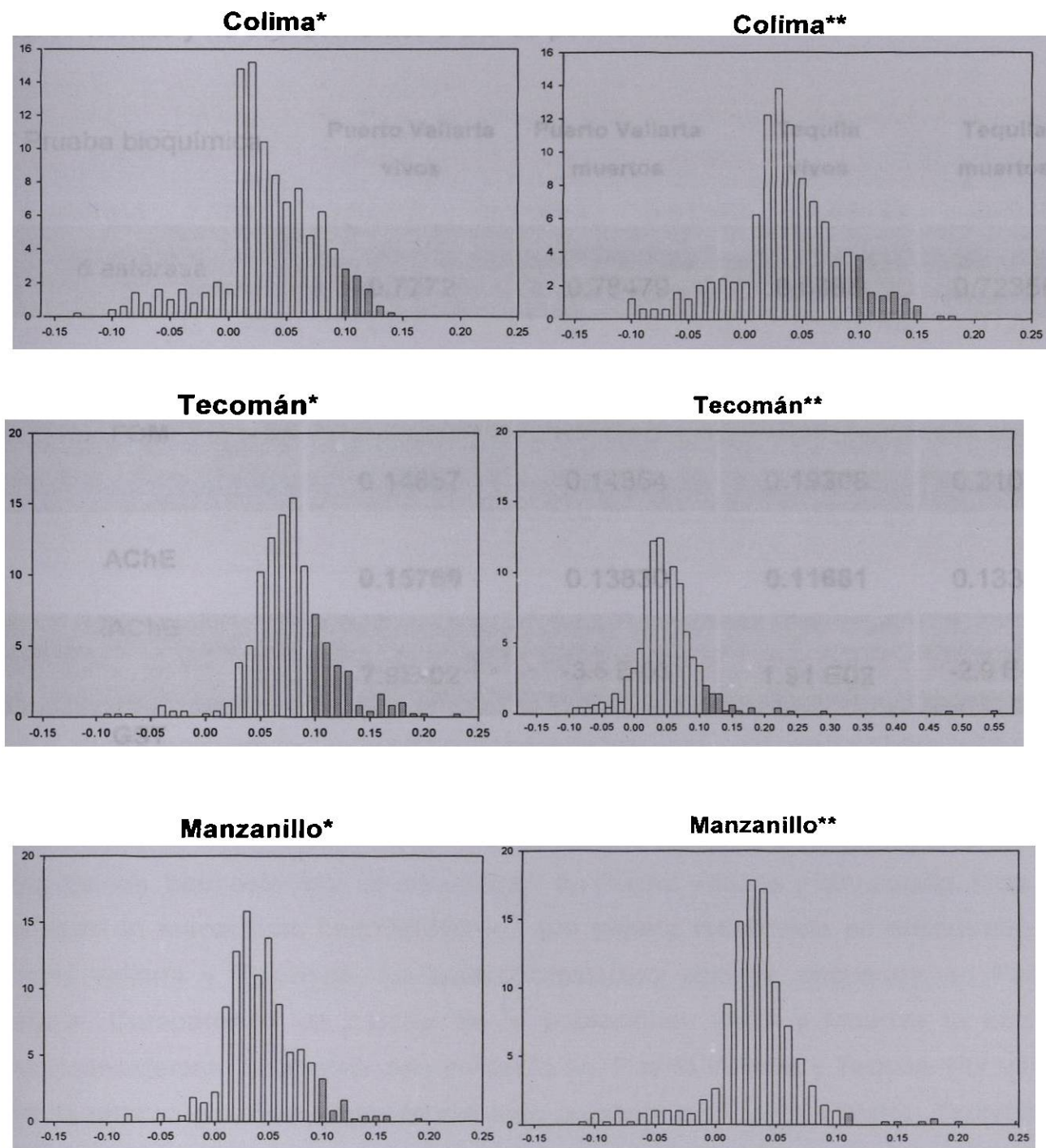


Figura 34.- Figura 29.- Distribución de frecuencias de absorbancias para GST en poblaciones sobrevivientes (*) y muertas (**) a DD de permetrina del estado de Colima.

Tabla 12 - Valores del análisis de ANOVA y de comparación de medias de las seis enzimas examinadas en tres localidades del estado de Jalisco en poblaciones sobrevivientes y no sobrevivientes a DD de permetrina.

Prueba bioquímica	Puerto Vallarta vivos	Puerto Vallarta muertos	Tequila vivos	Tequila muertos
α esterasa	0.7772	0.78479	0.6685	0.72358
β esterasa	0.92614	0.88199	0.72165	0.75327
FOM	0.14667	0.14354	0.19308	0.21017
AChE	0.15769	0.13830	0.11681	0.13300
iAChE	7.9E-02	-3.5 E-03	1.91 E02	-2.9 E-03
GST	3.63 E-02	2.53 E-02	2.26 E-02	3.29 E-02

Tabla 13.- Comparación de Pares Medias y Análisis de Varianza de de seis enzimas en Colima, Tecomán y Manzanillo.

Prueba bioquímica	Colima vivos	Colima muertos	Tecomán vivos	Tecomán muertos	Manzanillo vivos	Manzanillo muertos
α esterasa	0.6581	0.64322	0.86694	0.81340	0.65543	.67918
β esterasa	0.73786	0.75708	0.9155	0.92508	0.7305	0.7047
FOM	0.17402	0.22816	0.17728	0.1640	0.15742	.17201
AChE	6.18E-02	8.35E-02	0.13767	0.17963	9.5E-02	.11389
iAChE	1.33E-03	3.44E-02	4.37E-03	7.5E-03	-1.3E-02	3.99E-03
GST	2.72E-02	3.26 E-02	7.23E-02	4.47 E-02	3.92E-02	2.88E-02

Nota:La diferencia significativa es alta, excepto para Tecomán, en la enzima iAChE

Los mecanismos enzimáticos estudiados que se encuentran presentes cumpliendo su función, la cual es detoxificar agentes extraños son: en el mecanismo de alfa esterasa esta presente en Colima y Tecomán , para los mecanismos beta esterasa se encuentran en Puerto Vallarta y Manzanillo. Para las oxidasas un mecanismo importantísimo que genera resistencia es encontrado en Puerto Vallarta y Tecomán. La acetilcolinesterasa solo se encuentra en Puerto Vallarta. Comparando las medias de la poblaciones vivas y muertas la enzima acetilcolinesterasa insensible esta presente en Puerto Vallarta y Tequila. Por ultimo para la enzima glutatión s-transferasa esta presente en Puerto Vallarta, Tecomán y Manzanillo.

7. – CONCLUSIONES

En el estudio realizado se determinó la dosis diagnóstico para el insecticida permetrina mediante ensayos bioquímicos donde se expusieron a mosquitos de *Ae. aegypti* hembras a diferentes concentraciones partiendo de una línea base. El resultado de dosis diagnóstico de permetrina para las poblaciones de Colima, Tecoman y Manzanillo, Colima fue de 86 µg/ml (86 ppm). Por el contrario, para las poblaciones de Puerto Vallarta y Tequila, Jalisco, la dosis final obtenida fue de 100 µg/ml.

Los resultados demuestran que la enzima α esterasa fue seleccionada por el insecticida en las poblaciones de Colima y Tecomán, Colima de manera significativa. Sin embargo β -esterasas solo se presentó en la población de *Ae. aegypti* de Puerto Vallarta y en menor proporción en Tecomán, Colima. Señalando a estos mecanismos como los principales en la detoxificación de el insecticida permetrina en las poblaciones indicadas.

El resto de los mecanismos enzimáticos, aunque presentes en las poblaciones sobrevivientes a la selección con permetrina, no fueron importantes en la detoxificación del piretroide.

8. LITERATURA CITADA:

1. Armada JA, Trigo JA, 1981. Técnicas de lucha anti aegypti. MINSAP. Editorial Pueblo y educación, La Habana.
2. Bisset J.A., M. M. Rodríguez, C. Díaz y L.A. Soca.1999. Caracterización de la Resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en *Culex quinquefasciatus* del estado de Miranda, Venezuela. Rev. Cubana Med. Trop., 51 (2):89-94.
3. Bisset J.A., M. M. Rodríguez, C. Díaz y L.A. Soca.1998. Estudio de la resistencia en una cepa de *Culex quinquefasciatus*, procedente de Medellín Colombia.. Rev. Cubana Med. Trop., 51 (2):89-94.
4. Bisset JA, MM, Díaz, Ortiz E. Marquetti MC, Hemingway J. 2000.The mechanisms of organophosphate and Carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Cuba. Bull Entomol Res 1990;80:245-50.
5. Bisset. J. A, L. Dieguez, M. M. Rodríguez, C. Díaz, González, R. Vazquez. 1996. Tres combinaciones de esterasas y su relación con la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) de Cuba. Rev. Cubana Med. Trop. 48(1).
6. Bloomquist R. J. 2003. Insecticides: Chemistries and Characteristics. Department of Entomology, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 24061-0319.
7. Boletín de Epidemiología. (2003). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Boletín de Epidemiología. Secretaría de Salud. 62 (16).
8. Brogdon WG, Barber AM. 1990. Microplate assay of Glutathione S. Transferase activity for resistance detection in single -mosquito triturates. Comp Biochem. Physiol. 96: 339-342
9. Brogdon, W. G., and J. C. McAllister. 1998(a). Insecticide resistance and vector control. Emerging Infectious Diseases 4(4): 605-613.
10. - Brogdon, W. G. and J. C. McAllister. 1998(b). Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in bottles. J. Am. Mosq. Control Assoc. In press 1998.
11. Brown, A.W.A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. J. Am. Mosq. Control Assoc.2: 123-140.

12. Cajade, J.L. <http://www.monografias.com/trabajos/dengue.shtml>.
13. Carino, F. A., J.F. Koener, F.W. Plapp and R. Feyereisen. 1994. Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene Cyp6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24: 411-8.
14. Cheikh, H. B. and N. Pasteur. 1993. Resistance to themephos, an organophosphorous insecticide, in *Culex pipiens* from Tunisia, North Africa. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9(3): 335-337pp.
15. Clark, J.M., J.G. Scott, F. Campos and J.R. Bloomquist JR. 1995. Resistance to ivermectins: extent, mechanisms, and management. *Ann. Rev. Entomol.* 40: 1-30.
16. Cohen, M.B., J.F. Koener and R. Feyereisen. 1994. Structure and chromosomal localization of Cyp6A1, a cytochrome P450-encoding gene from the house fly. *Gene.* 146: 267-272.
17. Cygler, M., J.D. Schrag, J.L. Sussman, M. Harel, I. Silman and M.K. Gentry. 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. *Protein Sci.* 2: 366-382.
18. De Vries, D.H. and G.P. Georgiou. 1979. Influence of Temperatura on the Toxicity of Insecticides to Susceptible and Resistent House Flies. *J.Econ. Entomol.* 72:48.
19. Espinoza, G.F; Hernández, S. Rendón, R.R 2003. Interepidemic transmission of dengue in Colima City, Mexico. *Salud pública Méx*, vol.45, no.5, p.365-370. ISSN 0036-3634.
20. Espinoza-Gómez F, Hernández-Suárez CM, Coll-Cárdenas R. Factores que modifican los índices larvarios de *Aedes aegypti* en Colima, México. *Rev Panam Salud Publica* 2001;10:6-12.
21. Ffrench-Constant, R.H., J. Steichen, T.A. Rocheleau, K. Aronstein and R.T. Roush. 1993. A single amino acid substitution in a beta-aminobutyric acid subtype A receptor locus associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 1957-1961.
22. Flores, A E. M. H. Badii Y G. Ponce G. 2001. Resistencia a insecticidas en insectos verctores de enfermedades con énfasis en mosquitos. Universidad Autónoma de Nuevo León, RESPYN, Revista Salud Pública y Nutrición, 2001, Vol. 2, Vol. 4.

23. Fox, I. 1973. Malathión resistance in *Aedes aegypti* from pressure on adults. Mosquito News. Vol. 33(2): 161-164pp.
24. Guedes. L.M. *Aedes aegypti*: Incidencia y comportamiento en el municipio de Jiguaní durante los años 1997-2002. Cuba. Rev Cubana Med Trop. 52(2):173-179.
25. Hayes, J.D. and D. J. Pulford. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 30: 445-600.
26. Hemingway J. and H. Ranson. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Ann. Rev. Entomol. 45: 371-391.
27. Hemingway J. and H. Ranson, Op.cit.
28. Hudson, Parise, Cdc. www.cdc.gov/incidod/dubid/dengue/slideset/spanish/set1/vi/slide05.htm
29. INEGI. 2003. Instituto Nacional de Estadística Geográfica e informática.
30. Instituto Mexicano del Seguro Social, Boletín estadístico anual de mortalidad 1997. México, DF: Instituto Mexicano del Seguro Social, 1998.
31. Lagunes T. A. y J. A. Villanueva (1995). Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados, México. 115-124.
32. Liu, N. and J.G. Scott. 1997. Phenobarbital induction of Cyp6D1 is due to a trans acting factor on autosome 2 in house flies, *Musca domestica*. Insect. Mol. Biol. 6: 77-81.
33. Maitra, S., S.M. Dombroski, L.C. Waters and R. Ganguly. 1996. Three second chromosome-linked clustered Cyp6 genes show differential constitutive and barbital-induced expression in DDT-resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. Gene. 180: 165-71.
34. Mazzarri, M. B. and G. P. Georgiou, 1995. Characterization of resistance to organophospharate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. J. Ame. Mosq. Control Assoc. 11(3): 315-322pp.
35. Miyazaki, M., K. Ohyama, D.Y. Dunlap and F. Matsumura. 1996. Cloning and sequencing of the para-types sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). Mol. Gen. Genet. 252: 61-68.

36. Nhatan MB, Knudsen AB. 1991. *Aedes aegypti* infestation characteristics in several Caribbean countries and implications for integr community-based control. *J Am Mosq Cont Assoc*; 7(3): 400-4.
37. Oakeshott J.G., E.A. van Papenrecht, T.M. Boyce, M.J. Healy and R. J. Russell. 1993. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica*. 90: 239-268.
38. Patil, N.S., K.S. Lole and D. N. Deobagkar. 1996. Adaptive larval thermotolerance and induced cross-tolerance to propoxur insecticides in mosquitoes *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. *Med. Vet. Entomol*. 10: 277-282.
39. Rigau PJG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and Dengue Hemorrhagic fever. *Lancet* 1998; 352: 971-977.
40. Rodríguez MM, Bisset J, Mastrapa L, 1995. Díaz C. Asociación de la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides con los mecanismos de resistencia observados en cepas de *Culex quinquefasciatus* de Ciudad de La Habana. *Rev Cubana Med Trop*; 47:154-160.
41. Rodríguez M.M., J.A. Bisset, C. Diaz y L.A. Soca. 1998. Selección de una cepa de *Culex quinquefasciatus* resistente a lamdacialotrina y su espectro de resistencia cruzada a otros insecticidas. *Rev. Cubana Med. Trp.*, 50(2):129-132.
42. Soderlund, D.M., J.R. Bloomquist, F. Wong, L.L. Payne and D.C. Knipple. 1989. Molecular Neurobiology: Implications for Insecticide Action and Resistance. *Pestic. Sci.* 26:359-374.
43. Stambouliau.D, 1995. *Tropical Medicine and Parasitology*. 4° ed. London, Mosby-Wolfe.
44. Tomita, T., J.G. Scott. 1995. cDNA and deduced protein séquence of Cyp6D1: the putative gene for a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. *Insect. Biochem. Mol. Biol*. 25: 275-283.
45. Tomita, T., N.Liu., F.F. Smith, P. Shridhar and J.G. Scott. 1995. Molecular mechanisms involved in increased expression of a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in the housefly, *Musca domestica*. *Insect. Mol. Biol*. 4: 135-140.

46. Vais, H., M.S. Williamson, C.A. Hick, N. Eldursi, A.L. Devonshire and P.N. Usherwood. 1997. Functional analysis of a rat sodium channel carrying a mutation for insect knock-down resistance (kdr) to pyrethroids. *FEBS Lett.* 413: 427-332.
47. WHO. 1992. Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the expert committee on vector biology and control. In WHO Tech. Rep. Ser. 818: 1-55.
48. Wilkinson, C.F. 1976. Insecticide biochemistry and physiology. New York: Plenum Press, p. 768.
49. Williamson, M.S., D. Martinez-Torres, C.A. Hick and A.L. Devonshire. 1996. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 252: 51-60.
50. Zhou, Z-H., and M.A. Syvanen. 1997. A complex glutathione transferase gene family in the housefly *Musca domestica*. *Mol. Gen. Genet.* 256: 187-194.
51. <http://www.revistavertigo.com/historico/18-8-2002/dengue.html>
52. <http://www.explora.cl/exec/noticia/ficha.e3?id=83>
53. <http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue-cases-2004.htm>
54. <http://www.cenave.gob.mx/dengue/default.asp?id=comunicado01>, 130.
55. <http://www.inegi.gob.mx/geo/default.asp?c=124>
56. http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/epidemiologia/vol10_N7_2002/epidemiologia_dengue2.htm
57. <http://www.cenave.gob.mx/dengue/default.asp?id=43>
58. <http://www.infecto.edu.uy/revisiontemas/tema10/den6290.htm>

9. ANEXOS

Tabla 14.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Alfa esterases de individuos que no sobrevivieron del estado de Jalisco.

Descriptives

Alfa estereasa Muertas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	100	.62477	4.8597E-01	4.86E-03	.61513	.63441	.477	.706
2 P.V.	500	.78480	9.4269E-01	4.22E-03	.77652	.79308	.443	1.011
3 Tq.	500	.72359	.10034	4.49E-03	.71477	.73240	.412	.967
Total	1100	.74243	.10515	3.17E-03	.73621	.74865	.412	1.011

ANOVA

VAR00012

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.460	2	1.230	139.188	.000
Within Groups	9.693	1097	8.836E-03		
Total	12.152	1099			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00012

Tukey HSD

(I) VAR00011	(J) VAR00011	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.16003*	1.03E-02	.000	-.18416	-.13590
	3	-.9882E-02*	1.03E-02	.000	-.12295	-7.46852E-02
2	1	.16003*	1.03E-02	.000	.13590	.18416
	3	6.1214E-02*	5.94E-03	.000	4.7281E-02	7.5147E-02
3	1	9.8818E-02*	1.03E-02	.000	7.4685E-02	.12295
	2	-6.121E-02*	5.94E-03	.000	-7.51471E-02	-4.72809E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 15.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Beta esterases de individuos que no sobrevivieron del estado de Jalisco.

Descriptives

Brta estereasa Muertas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO	100	.70551	5.7696E-03	5.77E-03	.69406	.71696	.556	.794
2 P.V.	500	.88199	.12368	5.53E-03	.87113	.89286	.591	1.264
3 Tq.	500	.75326	8.0924E-03	3.62E-03	.74615	.76037	.523	.993
Total	1100	.80743	.12259	3.70E-03	.80018	.81469	.523	1.264

ANOVA

VAR00014

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.286	2	2.643	258.168	.000
Within Groups	11.231	1097	1.024E-02		
Total	16.517	1099			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00014

Tukey HSD

(I) VAR00013	(J) VAR00013	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.17648*	1.11E-02	.000	-.20246	-.15051
	3	-.4775E-02*	1.11E-02	.000	-7.37233E-02	-2.17687E-02
2	1	.17648*	1.11E-02	.000	.15051	.20246
	3	.12874*	6.40E-03	.000	.11374	.14374
3	1	4.7746E-02*	1.11E-02	.000	2.1769E-02	7.3723E-02
	2	-.12874*	6.40E-03	.000	-.14374	-.11374

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 16.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Oxidasas en individuos que no sobrevivieron del estado de Jalisco.

Descriptives

Oxidasas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	100	.17203	4.5560E-0	4.56E-03	.16299	.18107	.098	.282
2 P.V.	500	.14355	5.1156E-0	2.29E-03	.13906	.14805	.037	.328
3 Tq.	500	.21016	8.2479E-0	3.69E-03	.20291	.21741	.077	.690
Total	1100	.17642	7.3994E-0	2.23E-03	.17204	.18079	.037	.690

ANOVA

VAR00018

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.111	2	.556	124.236	.000
Within Groups	4.906	1097	4.472E-03		
Total	6.017	1099			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00018

Tukey HSD

(I) VAR00017	(J) VAR00017	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	2.8478E-02*	7.33E-03	.000	1.1309E-02	4.5647E-02
	3	-3.813E-02*	7.33E-03	.000	-5.52973E-02	-2.09587E-02
2	1	-2.848E-02*	7.33E-03	.000	-4.56473E-02	-1.13087E-02
	3	-6.661E-02*	4.23E-03	.000	-7.65187E-02	-5.66933E-02
3	1	3.8128E-02*	7.33E-03	.000	2.0959E-02	5.5297E-02
	2	6.6606E-02*	4.23E-03	.000	5.6693E-02	7.6519E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 17.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolinesterasa en individuos que no sobrevivieron del estado de Jalisco.

Descriptives

Acetilcolinesterasa Muertas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	100	7.92E-02	5.3438E-03	5.34E-03	6.8607E-03	8.9813E-03	-.059	.163
2 P.V.	500	.13830	7.5544E-03	3.38E-03	.13166	.14494	-.111	.370
3 Tq.	500	.13300	7.5574E-03	3.38E-03	.12636	.13964	-.058	.398
Total	1100	.13052	7.5575E-03	2.28E-03	.12605	.13499	-.111	.398

ANOVA

VAR00020

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.297	2	.148	27.203	.000
Within Groups	5.980	1097	5.452E-03		
Total	6.277	1099			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00020

Tukey HSD

(I) VAR00019	(J) VAR00019	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-5.909E-02*	8.09E-03	.000	-7.80465E-02	-4.01335E-02
	3	-5.379E-02*	8.09E-03	.000	-7.27425E-02	-3.48295E-02
2	1	5.9090E-02*	8.09E-03	.000	4.0134E-02	7.8046E-02
	3	5.3040E-03	4.67E-03	.492	-5.64052E-03	1.6249E-02
3	1	5.3786E-02*	8.09E-03	.000	3.4830E-02	7.2742E-02
	2	-5.304E-03	4.67E-03	.492	-1.62485E-02	5.6405E-03

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 17.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolinesterasa en individuos que no sobrevivieron del estado de Jalisco.

Descriptives

Acetilcolinesterasa Muertas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	100	7.92E-02	5.3438E-03	5.34E-03	6.8607E-02	8.9813E-02	-.059	.163
2 P.V.	500	.13830	7.5544E-03	3.38E-03	.13166	.14494	-.111	.370
3 Tq.	500	.13300	7.5574E-03	3.38E-03	.12636	.13964	-.058	.398
Total	1100	.13052	7.5575E-03	2.28E-03	.12605	.13499	-.111	.398

ANOVA

VAR00020

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.297	2	.148	27.203	.000
Within Groups	5.980	1097	5.452E-03		
Total	6.277	1099			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00020

Tukey HSD

(I) VAR00019	(J) VAR00019	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-5.909E-02*	8.09E-03	.000	-7.80465E-02	-4.01335E-02
	3	-5.379E-02*	8.09E-03	.000	-7.27425E-02	-3.48295E-02
2	1	5.9090E-02*	8.09E-03	.000	4.0134E-02	7.8046E-02
	3	5.3040E-03	4.67E-03	.492	-5.64052E-03	1.6249E-02
3	1	5.3786E-02*	8.09E-03	.000	3.4830E-02	7.2742E-02
	2	-5.304E-03	4.67E-03	.492	-1.62485E-02	5.6405E-03

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 18.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolinesterasa insensible en individuos que no sobrevivieron del estado de Jalisco.

Descriptives

Acetilcolinesterasa ins. Muertas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	100	-4.5E-02	6.0499E-02	6.05E-03	-5.66944E-02	-3.26856E-02	-.181	.009
2 P.V	500	-3.5E-03	4.4759E-02	2.00E-03	-7.39078E-03	4.7478E-04	-.214	.161
3Tq.	500	-2.9E-03	3.3013E-02	1.48E-03	-5.80274E-03	-1.26063E-03	-.258	.074
Total	1100	-7.0E-03	4.3322E-02	1.31E-03	-9.51659E-03	-4.39068E-03	-.258	.161

ANOVA

VAR00022

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.157	2	7.836E-02	45.103	.000
Within Groups	1.906	1097	1.737E-03		
Total	2.063	1099			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00022

Tukey HSD

(I) VAR00021	(J) VAR00021	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-4.123E-02*	4.57E-03	.000	-5.19334E-02	-3.05306E-02
	3	-4.179E-02*	4.57E-03	.000	-5.24894E-02	-3.10866E-02
2	1	4.1232E-02*	4.57E-03	.000	3.0531E-02	5.1933E-02
	3	-5.560E-04	2.64E-03	.976	-6.73443E-03	5.6224E-03
3	1	4.1788E-02*	4.57E-03	.000	3.1087E-02	5.2489E-02
	2	5.5600E-04	2.64E-03	.976	-5.62243E-03	6.7344E-03

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 19.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Glutation-S-transferasa en individuos que no sobrevivieron del estado de Jalisco.

Descriptives

Glutation S Transferasa

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	100	2.40E-03	5.6075E-03	5.61E-03	-8.72646E-03	1.3526E-02	-.136	.073
2 P.V.	500	2.52E-02	5.9844E-03	2.68E-03	1.9980E-03	3.0496E-02	-.178	.199
3 Tq.	500	3.29E-02	4.6465E-03	2.08E-03	2.8781E-03	3.6947E-02	-.178	.190
Total	1100	2.66E-02	5.4421E-03	1.64E-03	2.3409E-03	2.9848E-02	-.178	.199

ANOVA

VAR00016

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.911E-02	2	3.955E-02	13.664	.000
Within Groups	3.176	1097	2.895E-03		
Total	3.255	1099			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00016

Tukey HSD

(I) VAR00015	(J) VAR00015	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-2.284E-02*	5.89E-03	.000	-3.66517E-02	-9.02428E-03
	3	-3.046E-02*	5.89E-03	.000	-4.42777E-02	-1.66503E-02
2	1	2.2838E-02*	5.89E-03	.000	9.0243E-03	3.6652E-02
	3	-7.626E-03	3.40E-03	.064	-1.56014E-02	3.4935E-04
3	1	3.0464E-02*	5.89E-03	.000	1.6650E-02	4.4278E-02
	2	7.6260E-03	3.40E-03	.064	-3.49352E-04	1.5601E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 20.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Alfa esterases en individuos que sobrevivieron del estado de Jalisco.

Descriptives

Alfa estereasa vivas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO	100	.65826	7.8625E-01	7.86E-03	.64266	.67386	.493	.771
2 P.V.	500	.77721	.13859	6.20E-03	.76503	.78939	.399	1.300
3 Tq.	500	.66850	.11109	4.97E-03	.65874	.67827	.419	.905
Total	1100	.71698	.13385	4.04E-03	.70907	.72490	.399	1.300

ANOVA

Alfa estereasa vivas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.334	2	1.667	111.803	.000
Within Groups	16.354	1097	1.491E-02		
Total	19.688	1099			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00002

Tukey HSD

(I) VAR00001	(J) VAR00001	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.11895*	1.34E-02	.000	-.15030	-8.76022E-02
	3	-1.024E-02	1.34E-02	.724	-4.15918E-02	2.1104E-02
2	1	.11895*	1.34E-02	.000	8.7602E-02	.15030
	3	.10871*	7.72E-03	.000	9.0607E-02	.12680
3	1	1.0244E-02	1.34E-02	.724	-2.11038E-02	4.1592E-02
	2	-.10871*	7.72E-03	.000	-.12680	-9.06073E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 21- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Beta esterasas en individuos que sobrevivieron del estado de Jalisco.

Descriptives

Beta estereasa vivas

	N	Mean	Std. Devia	Std. Err	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO	100	.7061	6.1142E	6.11E-	.6940	.71827	.528	.783
2 P.V.	500	.9261	.1473	6.59E-	.9132	.93910	.541	1.356
3 Tq.	500	.7216	7.7620E	3.47E-	.7148	.72847	.429	.940
Total	1100	.8132	.1535	4.63E-	.8041	.82228	.429	1.356

ANOVA

VAR00004

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.716	2	5.858	452.446	.000
Within Groups	14.204	1097	1.295E-02		
Total	25.920	1099			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00004

Tukey HSD

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) VAR00003	(J) VAR00003				Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.22001*	1.25E-02	.000	-.24923	-.19080
	3	-1.551E-02	1.25E-02	.427	-4.47220E-02	1.3706E-02
2	1	.22001*	1.25E-02	.000	.19080	.24923
	3	.20451*	7.20E-03	.000	.18764	.22137
3	1	1.5508E-02	1.25E-02	.427	-1.37060E-02	4.4722E-02
	2	-.20451*	7.20E-03	.000	-.22137	-.18764

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 22.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Oxidasas en individuos que sobrevivieron del estado de Jalisco.

Descriptives

Oxidasas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO	100	.25369	6.6076E-02	6.61E-03	.24058	.26680	.117	.345
2 P.V.	500	.14668	5.4481E-02	2.44E-03	.14189	.15147	.041	.392
3 Tq.	500	.19308	.10295	4.60E-03	.18404	.20213	.048	.494
Total	1100	.17750	8.7316E-02	2.63E-03	.17233	.18267	.041	.494

ANOVA

VAR00006

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.177	2	.588	89.635	.000
Within Groups	7.202	1097	6.565E-03		
Total	8.379	1099			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00006

Tukey HSD

(I) VAR00006	(J) VAR00006	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	.10701*	8.88E-03	.000	8.6210E-02	.12781
	3	-.0606E-02*	8.88E-03	.000	3.9804E-02	8.1408E-02
2	1	-.10701*	8.88E-03	.000	-.12781	8.62097E-02
	3	-.4641E-02*	5.12E-03	.000	5.84162E-02	8.43958E-02
3	1	-.6061E-02*	8.88E-03	.000	8.14083E-02	8.98037E-02
	2	-.6406E-02*	5.12E-03	.000	3.4396E-02	5.8416E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 23- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolinesterasa en individuos que sobrevivieron del estado de Jalisco.

Descriptives

Acetilcolinesterasa vivas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	100	1.47E-02	5.4382E-0	5.44E-03	3.8694E-0	2.5451E-0	-.101	.086
2 P.V.	500	.15759	8.5069E-0	3.80E-03	.15012	.16506	-.092	.480
3 Tq.	500	.11684	5.9712E-0	2.67E-03	.11160	.12209	-.085	.297
Total	1100	.12607	8.2410E-0	2.48E-03	.12120	.13095	-.101	.480

ANOVA

VAR00008

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.781	2	.890	171.847	.000
Within Groups	5.683	1097	5.181E-03		
Total	7.464	1099			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00008

Tukey HSD

(I) VAR00000	(J) VAR00000	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.14293*	7.88E-03	.000	-.16141	-.12445
	3	-.10218*	7.88E-03	.000	-.12066	8.37027E-02
2	1	.14293*	7.88E-03	.000	.12445	.16141
	3	.0748E-02*	4.55E-03	.000	3.0079E-02	5.1417E-02
3	1	.10218*	7.88E-03	.000	8.3703E-02	.12066
	2	4.075E-02*	4.55E-03	.000	5.14170E-02	8.00790E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 24.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolinesterasa insensible en individuos que sobrevivieron del estado de Jalisco.

Descriptives

Acetilcolinesterasa ins. vivas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 No.	100	-4.8E-02	6.5485E-02	6.55E-03	-6.10537E-02	-3.50663E-02	-.180	.021
2 P.V.	500	7.90E-03	2.5726E-02	1.15E-03	5.6376E-03	1.0158E-02	-.176	.135
3 Tq.	500	1.91E-02	3.8299E-02	1.71E-03	1.5739E-02	2.2469E-02	-.096	.222
Total	1100	7.90E-03	4.1169E-02	1.24E-03	5.4690E-03	1.0340E-02	-.180	.222

ANOVA

VAR00010

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.376	2	.188	138.688	.000
Within Groups	1.487	1097	1.355E-03		
Total	1.863	1099			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00010

Tukey HSD

(I) VAR00009	(J) VAR00009	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-5.596E-02*	4.03E-03	.000	-6.54096E-02	-4.65064E-02
	3	-6.716E-02*	4.03E-03	.000	-7.66156E-02	-5.77124E-02
2	1	5.5958E-02*	4.03E-03	.000	4.6506E-02	6.5410E-02
	3	-1.121E-02*	2.33E-03	.000	-1.66629E-02	-5.74913E-03
3	1	6.7164E-02*	4.03E-03	.000	5.7712E-02	7.6616E-02
	2	1.1206E-02*	2.33E-03	.000	5.7491E-03	1.6663E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 25.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Glutation-S-transferasa en individuos que sobrevivieron en el estado de Jalisco del estado de Jalisco..

Descriptives

Glutation S Transferasa vivas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO	100	1.58E-02	4.8268E-01	4.83E-03	6.1926E-03	2.5347E-02	-.128	.076
2 P.V.	500	3.63E-02	5.1821E-01	2.32E-03	3.1775E-03	4.0881E-02	-.177	.240
3 Tq.	500	2.27E-02	4.9075E-01	2.19E-03	1.8344E-03	2.6968E-02	-.188	.181
Total	1100	2.82E-02	5.0801E-01	1.53E-03	2.5239E-03	3.1250E-02	-.188	.240

ANOVA

VAR00004

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.385E-02	2	3.192E-02	12.632	.000
Within Groups	2.772	1097	2.527E-03		
Total	2.836	1099			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00004

Tukey HSD

(I) VAR00003	(J) VAR00003	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-2.056E-02*	5.51E-03	.001	3.34648E-02	7.65121E-03
	3	-6.886E-03	5.51E-03	.423	1.97928E-02	6.0208E-03
2	1	2.0558E-02*	5.51E-03	.001	7.6512E-03	3.3465E-02
	3	1.3672E-02*	3.18E-03	.000	6.2203E-03	2.1124E-02
3	1	6.8860E-03	5.51E-03	.423	6.02079E-03	1.9793E-02
	2	-1.367E-02*	3.18E-03	.000	2.11237E-02	6.22026E-03

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 26- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Alfa esterases de individuos que no sobrevivieron del estado de Colima.

Descriptives

Alfa etereasa Muertas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	500	.62075	7.3108E-01	3.27E-03	.61433	.62718	.346	.721
2 Col.	500	.64322	.16663	7.45E-03	.62858	.65786	.378	.979
3 Tec.	500	.81340	.16697	7.47E-03	.79873	.82808	.373	1.316
4Manz.	500	.67918	.17034	7.62E-03	.66421	.69414	.408	.990
Total	2000	.68914	.16749	3.75E-03	.68179	.69648	.346	1.316

ANOVA

VAR00036

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.163	3	3.721	165.367	.000
Within Groups	44.913	1996	2.250E-02		
Total	56.076	1999			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00036

Tukey HSD

(I) VAR00035	(J) VAR00035	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-2.247E-02	9.49E-03	.083	-4.68388E-02	1.9068E-03
	3	-.19265*	9.49E-03	.000	-.21702	-.16828
	4	-5.842E-02*	9.49E-03	.000	-8.27968E-02	-3.40512E-02
2	1	2.2466E-02	9.49E-03	.083	-1.90681E-03	4.6839E-02
	3	-.17018*	9.49E-03	.000	-.19456	-.14581
	4	-3.596E-02*	9.49E-03	.001	-6.03308E-02	-1.15852E-02
3	1	.19265*	9.49E-03	.000	.16828	.21702
	2	.17018*	9.49E-03	.000	.14581	.19456
	4	.13423*	9.49E-03	.000	.10985	.15860
4	1	5.8424E-02*	9.49E-03	.000	3.4051E-02	8.2797E-02
	2	3.5958E-02*	9.49E-03	.001	1.1585E-02	6.0331E-02
	3	-.13423*	9.49E-03	.000	-.15860	-.10985

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 27- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Beta esterasas de individuos que no sobrevivieron del estado de Colima.

Descriptives

Beta estereasa Muertas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	500	.99164	5.9553E-01	2.66E-03	.98641	.99687	.905	1.233
2 Col.	500	.75708	.14684	6.57E-03	.74417	.76998	.494	1.090
3 Tec.	500	.92508	.13489	6.03E-03	.91323	.93693	.100	1.334
4Manz.	500	.70470	.17108	7.65E-03	.68966	.71973	.405	.993
Total	2000	.84462	.17876	4.00E-03	.83678	.85246	.100	1.334

ANOVA

VAR00038

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27.665	3	9.222	508.278	.000
Within Groups	36.214	1996	1.814E-02		
Total	63.879	1999			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00038

Tukey HSD

(I) VAR00037	(J) VAR00037	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	.23456*	8.52E-03	.000	.21268	.25645
	3	6.6558E-02*	8.52E-03	.000	4.4672E-02	8.8444E-02
	4	.28694*	8.52E-03	.000	.26506	.30883
2	1	-.23456*	8.52E-03	.000	-.25645	-.21268
	3	-.16800*	8.52E-03	.000	-.18989	-.14612
	4	5.2380E-02*	8.52E-03	.000	3.0494E-02	7.4266E-02
3	1	-6.656E-02*	8.52E-03	.000	-8.84435E-02	-4.46725E-02
	2	.16800*	8.52E-03	.000	.14612	.18989
	4	.22038*	8.52E-03	.000	.19850	.24227
4	1	-.28694*	8.52E-03	.000	-.30883	-.26506
	2	-5.238E-02*	8.52E-03	.000	-7.42655E-02	-3.04945E-02
	3	-.22038*	8.52E-03	.000	-.24227	-.19850

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 28.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Oxidasas en individuos que no sobrevivieron del estado de Colima.

Descriptives

Oxidasas Muertas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	500	9.53E-02	1.6180E-0	7.24E-04	9.3858E-0	9.6702E-0	.059	.125
2 Col.	500	.22816	7.5282E-0	3.37E-03	.22154	.23477	.074	.426
3 Tec.	500	.16400	5.1826E-0	2.32E-03	.15945	.16856	.052	.719
4Manz.	500	.17201	5.4261E-0	2.43E-03	.16724	.17678	.072	.339
Total	2000	.16486	7.1495E-0	1.60E-03	.16173	.16800	.052	.719

ANOVA

VAR00042

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.450	3	1.483	513.274	.000
Within Groups	5.768	1996	2.890E-03		
Total	10.218	1999			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00042

Tukey HSD

(I) VAR00041	(J) VAR00041	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.13288*	3.40E-03	.000	-.14161	-.12414
	3	-6.872E-02*	3.40E-03	.000	-7.74585E-02	-5.99895E-02
	4	-7.673E-02*	3.40E-03	.000	-8.54665E-02	-6.79975E-02
2	1	.13288*	3.40E-03	.000	.12414	.14161
	3	6.4152E-02*	3.40E-03	.000	5.5418E-02	7.2886E-02
	4	5.6144E-02*	3.40E-03	.000	4.7410E-02	6.4878E-02
3	1	6.8724E-02*	3.40E-03	.000	5.9990E-02	7.7458E-02
	2	-6.415E-02*	3.40E-03	.000	-7.28865E-02	-5.54175E-02
	4	-8.008E-03	3.40E-03	.086	-1.67425E-02	7.2646E-04
4	1	7.6732E-02*	3.40E-03	.000	6.7998E-02	8.5466E-02
	2	-5.614E-02*	3.40E-03	.000	-6.48785E-02	-4.74095E-02
	3	8.0080E-03	3.40E-03	.086	-7.26456E-04	1.6742E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 29.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolinesterasa en individuos que no sobrevivieron del estado de Colima.

Descriptives

Acetilcolinesterasa Muertas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 No.	500	.21321	3.9047E-02	1.75E-03	.20978	.21664	.110	.283
2 Col.	500	8.35E-02	6.5931E-02	2.95E-03	7.7737E-02	8.9323E-02	-.092	.247
3 Tec.	500	.17963	8.4638E-02	3.79E-03	.17219	.18706	.001	.578
4 Manz.	500	.11389	6.7447E-02	3.02E-03	.10796	.11981	-.114	.527
Total	2000	.14756	8.3869E-02	1.88E-03	.14389	.15124	-.114	.578

ANOVA

VAR00044

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.286	3	1.762	400.836	.000
Within Groups	8.775	1996	4.396E-03		
Total	14.061	1999			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00044

Tukey HSD

(I) VAR00043	(J) VAR00043	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	.12968*	4.19E-03	.000	.11891	.14046
	3	3.3586E-02*	4.19E-03	.000	2.2813E-02	4.4359E-02
	4	9.9328E-02*	4.19E-03	.000	8.8555E-02	.11010
2	1	-.12968*	4.19E-03	.000	-.14046	-.11891
	3	-9.610E-02*	4.19E-03	.000	-.10687	-8.53251E-02
	4	-3.036E-02*	4.19E-03	.000	-4.11289E-02	-1.95831E-02
3	1	-3.359E-02*	4.19E-03	.000	-4.43589E-02	-2.28131E-02
	2	9.6098E-02*	4.19E-03	.000	8.5325E-02	.10687
	4	6.5742E-02*	4.19E-03	.000	5.4969E-02	7.6515E-02
4	1	-9.933E-02*	4.19E-03	.000	-.11010	-8.85551E-02
	2	3.0356E-02*	4.19E-03	.000	1.9583E-02	4.1129E-02
	3	-6.574E-02*	4.19E-03	.000	-7.65149E-02	-5.49691E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 30.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolinesterasa insensible en individuos que no sobrevivieron del estado de Colima.

Descriptives

Acetilcolinesterasa ins. Muertas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	500	6.20E-03	2.9346E-03	1.31E-03	3.6175E-03	8.7745E-03	-.047	.141
2 Col	500	3.44E-02	5.8070E-03	2.60E-03	2.9286E-03	3.9490E-02	-.234	.206
3 Tec.	500	7.50E-03	3.1551E-03	1.41E-03	4.7237E-03	1.0268E-02	-.147	.253
4Manz	500	3.99E-03	5.6093E-03	2.51E-03	-9.3865E-03	8.9187E-03	-.401	.164
Total	2000	1.30E-02	4.7377E-03	1.06E-03	1.0940E-03	1.5095E-02	-.401	.253

ANOVA

VAR00046

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.308	3	.103	48.971	.000
Within Groups	4.179	1996	2.094E-03		
Total	4.487	1999			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00046

Tukey HSD

(I) VAR00045	(J) VAR00045	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-2.819E-02*	2.89E-03	.000	-3.56268E-02	-2.07572E-02
	3	-1.300E-03	2.89E-03	.970	-8.73477E-03	6.1348E-03
	4	2.2060E-03	2.89E-03	.871	-5.22877E-03	9.6408E-03
2	1	2.8192E-02*	2.89E-03	.000	2.0757E-02	3.5627E-02
	3	2.6892E-02*	2.89E-03	.000	1.9457E-02	3.4327E-02
	4	3.0398E-02*	2.89E-03	.000	2.2963E-02	3.7833E-02
3	1	1.3000E-03	2.89E-03	.970	-6.13477E-03	8.7348E-03
	2	-2.689E-02*	2.89E-03	.000	-3.43268E-02	-1.94572E-02
	4	3.5060E-03	2.89E-03	.620	-3.92877E-03	1.0941E-02
4	1	-2.206E-03	2.89E-03	.871	-9.64077E-03	5.2288E-03
	2	-3.040E-02*	2.89E-03	.000	-3.78328E-02	-2.29632E-02
	3	-3.506E-03	2.89E-03	.620	-1.09408E-02	3.9288E-03

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 31.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Glutation-S-transferasa en individuos que no sobrevivieron del estado de Colima.

Descriptives

Glutation S Transferasa

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1NO.	500	6.21E-02	1.1698E-0	5.23E-04	6.1098E-0	6.3154E-0	.038	.087
2Col.	500	3.26E-02	4.7168E-0	2.11E-03	2.8430E-0	3.6718E-0	-.108	.177
3 Tec.	500	4.47E-02	5.2292E-0	2.34E-03	4.0117E-0	4.9307E-0	-.094	.545
4Manz.	500	2.88E-02	4.0315E-0	1.80E-03	2.5240E-0	3.2324E-0	-.115	.345
Total	2000	4.20E-02	4.2976E-0	9.61E-04	4.0164E-0	4.3933E-0	-.115	.545

ANOVA

VAR00040

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.338	3	.113	67.046	.000
Within Groups	3.354	1996	1.680E-03		
Total	3.692	1999			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00040

Tukey HSD

(I) VAR00039	(J) VAR00039	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	2.9552E-02*	2.59E-03	.000	2.2892E-02	3.6212E-02
	3	1.7414E-02*	2.59E-03	.000	1.0754E-02	2.4074E-02
	4	3.3344E-02*	2.59E-03	.000	2.6684E-02	4.0004E-02
2	1	-2.955E-02*	2.59E-03	.000	-3.62124E-02	-2.28916E-02
	3	-1.214E-02*	2.59E-03	.000	-1.87984E-02	-5.47760E-03
	4	3.7920E-03	2.59E-03	.460	-2.86840E-03	1.0452E-02
3	1	-1.741E-02*	2.59E-03	.000	-2.40744E-02	-1.07536E-02
	2	1.2138E-02*	2.59E-03	.000	5.4776E-03	1.8798E-02
	4	1.5930E-02*	2.59E-03	.000	9.2696E-03	2.2590E-02
4	1	-3.334E-02*	2.59E-03	.000	-4.00044E-02	-2.66836E-02
	2	-3.792E-03	2.59E-03	.460	-1.04524E-02	2.8684E-03
	3	-1.593E-02*	2.59E-03	.000	-2.25904E-02	-9.26960E-03

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 32.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Alfa esterassas en individuos que sobrevivieron del estado de Colima.

Descriptives

Alfa estereasa vivas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1NO.	500	.59232	6.3696E-02	2.85E-03	.58672	.59791	.409	.696
2Col.	500	.65810	.12772	5.71E-03	.64688	.66933	.296	.899
3 Tec.	500	.86694	.14421	6.45E-03	.85427	.87961	.463	1.528
4 Manz.	500	.65543	.12542	5.61E-03	.64441	.66645	.394	.944
Total	2000	.69320	.15800	3.53E-03	.68627	.70013	.296	1.528

ANOVA

VAR00024

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21.511	3	7.170	504.116	.000
Within Groups	28.390	1996	1.422E-02		
Total	49.901	1999			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00024

Tukey HSD

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) VAR00023	(J) VAR00023				Lower Bound	Upper Bound
1	2	-6.579E-02*	7.54E-03	.000	-8.51637E-02	-4.64083E-02
	3	-.27462*	7.54E-03	.000	-.29400	-.25525
	4	-6.311E-02*	7.54E-03	.000	-8.24897E-02	-4.37343E-02
2	1	6.5786E-02*	7.54E-03	.000	4.6408E-02	8.5164E-02
	3	-.20884*	7.54E-03	.000	-.22822	-.18946
	4	2.6740E-03	7.54E-03	.985	-1.67037E-02	2.2052E-02
3	1	.27462*	7.54E-03	.000	.25525	.29400
	2	.20884*	7.54E-03	.000	.18946	.22822
	4	.21151*	7.54E-03	.000	.19213	.23089
4	1	6.3112E-02*	7.54E-03	.000	4.3734E-02	8.2490E-02
	2	-2.674E-03	7.54E-03	.985	-2.20517E-02	1.6704E-02
	3	-.21151*	7.54E-03	.000	-.23089	-.19213

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 33.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Beta estereasa en individuos que sobrevivieron del estado de Colima.

Descriptives

Beta estereasa vivas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	500	.99358	4.2549E-0	1.90E-03	.98984	.99731	.890	1.056
2 Col.	500	.73786	.10228	4.57E-03	.72888	.74685	.513	1.013
3 Tec.	500	.91550	.15330	6.86E-03	.90203	.92897	.579	1.383
4 Manz.	500	.73050	.13851	6.19E-03	.71833	.74267	.320	1.080
Total	2000	.84436	.16320	3.65E-03	.83720	.85152	.320	1.383

ANOVA

VAR00026

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	25.816	3	8.605	626.322	.000
Within Groups	27.424	1996	1.374E-02		
Total	53.240	1999			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00026

Tukey HSD

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) VAR00025	(J) VAR00025				Lower Bound	Upper Bound
1	2	.25571*	7.41E-03	.000	.23667	.27476
	3	7.8074E-02*	7.41E-03	.000	5.9029E-02	9.7119E-02
	4	.26308*	7.41E-03	.000	.24403	.28212
2	1	-.25571*	7.41E-03	.000	-.27476	-.23667
	3	-.17764*	7.41E-03	.000	-.19668	-.15859
	4	7.3640E-03	7.41E-03	.753	-1.16812E-02	2.6409E-02
3	1	-7.807E-02*	7.41E-03	.000	-9.71192E-02	-5.90288E-02
	2	.17764*	7.41E-03	.000	.15859	.19668
	4	.18500*	7.41E-03	.000	.16596	.20405
4	1	-.26308*	7.41E-03	.000	-.28212	-.24403
	2	-7.364E-03	7.41E-03	.753	-2.64092E-02	1.1681E-02
	3	-.18500*	7.41E-03	.000	-.20405	-.16596

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 34.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Oxidasas en individuos que sobrevivieron del estado de Colima.

Descriptives

Oxidasas vivas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	500	.12322	2.4849E-03	1.11E-03	.12104	.12540	.083	.180
2 Col.	500	.17402	4.9736E-03	2.22E-03	.16965	.17839	.059	.407
3 Tec.	500	.17728	5.8100E-03	2.60E-03	.17218	.18238	.082	.734
4 Manz.	500	.15742	6.1666E-03	2.76E-03	.15200	.16284	.062	.711
Total	2000	.15799	5.4985E-03	1.23E-03	.15557	.16040	.059	.734

ANOVA

VAR00030

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.919	3	.306	119.340	.000
Within Groups	5.124	1996	2.567E-03		
Total	6.044	1999			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00030

Tukey HSD

(I) VAR00029	(J) VAR00029	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-5.080E-02*	3.20E-03	.000	-5.90327E-02	-4.25673E-02
	3	-5.406E-02*	3.20E-03	.000	-6.22927E-02	-4.58273E-02
	4	-3.420E-02*	3.20E-03	.000	-4.24347E-02	-2.59693E-02
2	1	5.0800E-02*	3.20E-03	.000	4.2567E-02	5.9033E-02
	3	-3.260E-03	3.20E-03	.739	-1.14927E-02	4.9727E-03
	4	1.6598E-02*	3.20E-03	.000	8.3653E-03	2.4831E-02
3	1	5.4060E-02*	3.20E-03	.000	4.5827E-02	6.2293E-02
	2	3.2600E-03	3.20E-03	.739	-4.97274E-03	1.1493E-02
	4	1.9858E-02*	3.20E-03	.000	1.1625E-02	2.8091E-02
4	1	3.4202E-02*	3.20E-03	.000	2.5969E-02	4.2435E-02
	2	-1.660E-02*	3.20E-03	.000	-2.48307E-02	-8.36526E-03
	3	-1.986E-02*	3.20E-03	.000	-2.80907E-02	-1.16253E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 35- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolinesterasa en individuos que sobrevivieron del estado de Colima.

Descriptives

Acetilcolinesterasa vivas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	500	.19089	3.2992E-0	1.48E-03	.18800	.19379	.118	.275
2 Col.	500	6.18E-02	8.4966E-0	3.80E-03	5.4302E-0	6.9234E-0	-.181	.272
3 Tec.	500	.13767	7.0570E-0	3.16E-03	.13147	.14387	-.217	.374
4 Manz.	500	9.50E-02	7.8705E-0	3.52E-03	8.8071E-0	.10190	-.181	.394
Total	2000	.12133	8.4861E-0	1.90E-03	.11761	.12505	-.217	.394

ANOVA

VAR00032

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.674	3	1.558	319.869	.000
Within Groups	9.722	1996	4.871E-03		
Total	14.395	1999			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00032

Tukey HSD

(I) VAR00031	(J) VAR00031	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	.12913*	4.41E-03	.000	.11779	.14047
	3	5.3228E-02*	4.41E-03	.000	4.1889E-02	6.4567E-02
	4	9.5908E-02*	4.41E-03	.000	8.4569E-02	.10725
2	1	-.12913*	4.41E-03	.000	-.14047	-.11779
	3	-7.590E-02*	4.41E-03	.000	-8.72374E-02	-6.45586E-02
	4	-3.322E-02*	4.41E-03	.000	-4.45574E-02	-2.18786E-02
3	1	-5.323E-02*	4.41E-03	.000	-6.45674E-02	-4.18886E-02
	2	7.5898E-02*	4.41E-03	.000	6.4559E-02	8.7237E-02
	4	4.2680E-02*	4.41E-03	.000	3.1341E-02	5.4019E-02
4	1	-9.591E-02*	4.41E-03	.000	-.10725	-8.45686E-02
	2	3.3218E-02*	4.41E-03	.000	2.1879E-02	4.4557E-02
	3	-4.268E-02*	4.41E-03	.000	-5.40194E-02	-3.13406E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 36.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Acetilcolinesterasa insensible en individuos que sobrevivieron del estado de Colima.

Descriptives

Acetilcolinesterasa ins. Vivas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	500	3.67E-03	6.4219E-0	2.87E-04	3.1017E-0	4.2303E-0	-.047	.016
2 Col.	500	1.33E-03	3.7412E-0	1.67E-03	-1.95921E-0	4.6152E-0	-.279	.123
3 Tec.	500	4.37E-03	1.1649E-0	5.21E-04	3.3465E-0	5.3935E-0	-.076	.052
4Manz.	500	-1.3E-02	4.8817E-0	2.18E-03	-1.68053E-0	-8.22672E-0	-.347	.188
Total	2000	-7.9E-04	3.2180E-0	7.20E-04	-2.19919E-0	6.2319E-0	-.347	.188

ANOVA

VAR00034

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.423E-02	3	3.141E-02	31.731	.000
Within Groups	1.976	1996	9.899E-04		
Total	2.070	1999			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00034

Tukey HSD

(I) VAR00033	(J) VAR00033	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	2.3380E-03	1.99E-03	.643	-2.77408E-03	7.4501E-03
	3	-7.040E-04	1.99E-03	.985	-5.81608E-03	4.4081E-03
	4	1.6182E-02*	1.99E-03	.000	1.1070E-02	2.1294E-02
2	1	-2.338E-03	1.99E-03	.643	-7.45008E-03	2.7741E-03
	3	-3.042E-03	1.99E-03	.420	-8.15408E-03	2.0701E-03
	4	1.3844E-02*	1.99E-03	.000	8.7319E-03	1.8956E-02
3	1	7.0400E-04	1.99E-03	.985	-4.40808E-03	5.8161E-03
	2	3.0420E-03	1.99E-03	.420	-2.07008E-03	8.1541E-03
	4	1.6886E-02*	1.99E-03	.000	1.1774E-02	2.1998E-02
4	1	-1.618E-02*	1.99E-03	.000	-2.12941E-02	-1.10699E-02
	2	-1.384E-02*	1.99E-03	.000	-1.89561E-02	-8.73192E-03
	3	-1.689E-02*	1.99E-03	.000	-2.19981E-02	-1.17739E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Tabla 37.- Comparación de Medias y Análisis de Varianza de Glutation-S-transferasa en individuos que sobrevivieron del estado de Colima.

Descriptives

Glutation S Transferasa

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1 NO.	500	5.81E-02	7.9122E-0	3.54E-04	5.7385E-0	5.8775E-0	.047	.080
2 Col.	500	2.72E-02	4.6952E-0	2.10E-03	2.3103E-0	3.1353E-0	-.183	.138
3 Tec.	500	7.23E-02	3.7199E-0	1.66E-03	6.8998E-0	7.5534E-0	-.092	.223
4 Manz.	500	3.92E-02	3.4147E-0	1.53E-03	3.6196E-0	4.2196E-0	-.088	.189
Total	2000	4.92E-02	3.8743E-0	8.66E-04	4.7494E-0	5.0891E-0	-.183	.223

ANOVA

VAR00028

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.597	3	.199	165.217	.000
Within Groups	2.404	1996	1.204E-03		
Total	3.000	1999			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR00028

Tukey HSD

(I) VAR00027	(J) VAR00027	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	3.0852E-02*	2.19E-03	.000	2.5214E-02	3.6490E-02
	3	-1.419E-02*	2.19E-03	.000	-1.98243E-02	-8.54765E-03
	4	1.8884E-02*	2.19E-03	.000	1.3246E-02	2.4522E-02
2	1	-3.085E-02*	2.19E-03	.000	-3.64903E-02	-2.52137E-02
	3	-4.504E-02*	2.19E-03	.000	-5.06763E-02	-3.93997E-02
	4	-1.197E-02*	2.19E-03	.000	-1.76063E-02	-6.32965E-03
3	1	1.4186E-02*	2.19E-03	.000	8.5477E-03	1.9824E-02
	2	4.5038E-02*	2.19E-03	.000	3.9400E-02	5.0676E-02
	4	3.3070E-02*	2.19E-03	.000	2.7432E-02	3.8708E-02
4	1	-1.888E-02*	2.19E-03	.000	-2.45223E-02	-1.32457E-02
	2	1.1968E-02*	2.19E-03	.000	6.3297E-03	1.7606E-02
	3	-3.307E-02*	2.19E-03	.000	-3.87083E-02	-2.74317E-02

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Preparación de los reactivos para las pruebas bioquímicas

Preparación del mosquito

- 1.- Homogenizar un mosquito (adulto o larva) en 100 μ l de del buffer (KPO4)
- 2.- Diluir a 1 ml con 900 μ l del buffer.

Para incrementar el de número de pruebas: se diluye el homogenato.

- 1.- Remover 500 μ l del homogenato del mosquito y colocarlo en un tubo por separado.
- 2.- Diluir a 1ml. con 500 μ l del buffer a cada tubo.
- 3.- Duplicar el tiempo de aplicación y diluir el control.

Preparación de los buffer

Buffer de fosfato de potasio (KPO4):

Este buffer se utiliza en varias pruebas y se puede almacenar por tiempo indefinido a temperatura ambiente.

Mezclar: 6.6gr de fosfato de potasio difásico
1.7gr de fosfato de potasio monobásico
1000 ml de agua bidestilada.
Ajustar a pH a 7.2

0.25ml del buffer acetato de sodio (NaOAc):

Mezclar: 83ml de acetato de sodio 3M con 900 ml de agua dd

Ajustar a pH a 5 con ácido acético glacial

Ajustar el volumen final a 1 Lts.

Este buffer es usado en los ensayos de oxidasas y puede ser almacenado indefinidamente a temperatura ambiente.

El NaOAc 3M puede prepararse disolviendo 408.1g de NaOAc en 800ml de agua; ajustando el volumen final a 1lt..

Ensayo de esterasas no especificas

Preparar β -naphthyl acetato:

Disolver: 56mg de β -naphthyl acetato

20ml de acetona

Añadir 80 ml de KPO_4

Se puede almacenar a 4°C y antes de usarse se puede colocar a temperatura ambiente.

Preparar dianisidina: inmediatamente antes de que el color se degrade. El color debe ser amarillo pálido. Si el color es ámbar, se debe descartar y preparar nuevo.

Pesar 100mg de 0-dianisidina tetrazotized. Adherir 100 ml de agua dd inmediatamente antes de usar.

Ensayo de esterasas no especificas beta:

1.- Homogenizar mosquitos.....

2.- Colocara 100 μ l del homogenato del mosquito en cada pozo

3.- Agregar 100 μ l β -naphthyl acetato en cada pozo

4.- Incubar a temperatura ambiente por 20 min.

5.- Agregar 100 μ l de dianisidina en cada pozo

6.- Incubar 4 min y leer usando filtro de 540 nanómetros

control positivo: β -naphthyl

control negativo: Buffer (KPO_4)

Glutación S-transferasas: Se emplea para medir el nivel de glutathion S – transferasas. Este se puede mantener bueno por 3 o 4 días a 4°C

Preparar glutación reducido:

Mezclar: 61mg de glutathion reducido

100 ml del buffer de KPO_4

Preparar cDNB: Esté se puede mantener bueno por 3 o 4 días a 4°C

Disolver: 20 mg 1-cloro-2-4'-dinitrobenceno
10 ml Acetona
90 ml del buffer KPO_4

- 1.- Colocar 100 μl del homogenato del mosquito en cada pozo
- 2.- Agregar 100 μl de glutatión reducido
- 3.- Agregar 100 μl cDNB
- 4.- Leer la placa inmediatamente (T_0) a 340 nm
- 5.- Leer la placa a los 5 min (T_5) a 340 nm
- 6.- restar la lectura del T_0 al T_5

Control: va en blanco.

Reacción de oxidasas: Mide los niveles de peroxidasas

Preparar TMBZ: 50 mg 3,3', 5,5'-tetrametil-benzidina
Dihidrócloride* (TMBZ (2HCL) o TMBZ) en
25 ml de metanol

Agregar: 75 ml de 0.25M del buffer acetato de Na^{**}

Se puede almacenar por pocos días y se debe desechar cuando la coloración se torne azul pálido.

- 1.- Colocar 100 μl del homogenato del mosquito en cada pozo
- 2.- Agregar 100 μl de TMBZ
- 3.- Agregar 1 gota (25 μl de peróxido de hidrógeno al 3%)
- 4.- Incubar por 5 min. Leer la micro placa usando el filtro de 620 nm

*TMBZ (2HCl) se debe disolver por pocos minutos, el TMBZ se puede disolver con agua caliente, no aplicar la flama directamente y no agitar fuertemente.

**Es muy importante que el pH del buffer acetato de Na sea exactamente

5. Se debe usar ácido acético para ajustar el pH.

Control positivo = Citocromo C

Control negativo = Buffer (KPO_4)

Ensayo de Acetil colinesterasa

Mide la cantidad de acetil colinesterasa presente. Dura de 3 o 4 días a 4°C.

Preparar ATCH:

Disolver: 75mg de acetilcolina iodide (ATCH) iodizada
10ml de acetona
Agregar: 90ml del buffer KPO_4

Preparar DNTB: Este es bueno por 3 o 4 días a 4°C

13 mg de ácido dithio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB)

100 ml del buffer KPO_4

- 1.- Colocar 100 μ l del homogenato del mosquito en cada pozo
- 2.- Agregar 100 μ l de ATCH en cada pozo
- 3.- Agregar 100 μ l de DNTB en cada pozo
- 4.- Leer la placa inmediatamente (T_0) a 414nm
- 5.- Leer la placa a los 5 min (T_5) a 414nm
- 6.- Restar la lectura del T_0 al T_5

Control negativo: buffer KPO_4 .

Ensayo para acetil colinesterasa insensible: Determinar si está presente la acetil colinesterasa, cuando el color es amarillo pálido, no hay sitios alterados y son homocigotos dominantes; cuando el color es amarillo oscuro existen sitios alterados, son homocigotos recesivos; cuando se encuentra el color intermedio, los individuos son heterocigotos.

Preparar ATCH:

Disolver: 75mg de acetilcolina iodide (ATCH) iodizada
21 mg de propoxur
10ml de acetona
Agregar: 90ml del buffer KPO_4

Este es bueno por 3 o 4 días a 4°C

Preparar DNTB: Este es bueno por 3 o 4 días a 4°C

13mg de ácido dithio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB)
100ml del buffer KPO_4

- 1.- Colocar 100 μl del homogenato del mosquito en cada pozo
- 2.- Agregar 100 μl de ATCH en cada pozo
- 3.- Agregar 100 μl de DNTB en cada pozo
- 4.- Leer la placa inmediatamente (T_0) a 414nm
- 5.- Leer la placa a los 10 min (T_5) a 414nm
- 6.- Restar la lectura del T_0 al T_{10}

Control negativo: buffer KPO_4

Preparación del stock de permetrina 4.3 l/ml (grado técnico + acetona)

Agregar 4.3 μl de permetrina grado técnico + 995.7 μl de acetona. Si se toma 10 μl del stock esta a una concentración final de 43 μg / botella.

