

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

PROGRAMA CENTROAMERICANO DE MAESTRÍA EN ENTOMOLOGÍA

DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS Y SUS
MECANISMOS BIOQUÍMICOS EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* Y *Aedes*
albopictus DEL DISTRITO DE PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ.

POR

ANYI L. TUÑÓN

PANAMÁ, REPUBLICA DE PANAMÁ

2021

DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS Y SUS
MECANISMOS BIOQUÍMICOS EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* Y *Aedes
albopictus* DEL DISTRITO DE PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ.

TESIS

Sometida para optar por el título de Maestro en Ciencias con Énfasis en Entomología

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

El permiso de la publicación y reproducción parcial o total de este documento debe ser
sometido en la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

APROBADO:

_____Asesor

_____Jurado

_____Jurado

DEDICATORIA

Con amor a mi madre María Elizabeth de Tuñon por ser mí apoyo, para alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTOS

A mí querido asesor Dr. Lorenzo Cáceres Carrera, por su dedicación al dirigir esta investigación.

Al Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), por brindarme las instalaciones, materiales y equipos para la realización de la presente investigación.

Al Departamento de Control de Vectores del Ministerio de Salud (MINS), particularmente a los departamentos de Juan Díaz, Pueblo Nuevo, Parque Lefevre y Río Abajo, por su apoyo incondicional en la logística para la colecta de las muestras.

A Damaris Bernal, José Feliz Alfonso y Daniel Osorio, personal del Insectario Abdiel Adames Palma del ICGES, por su ayuda en la cría y mantenimiento de mis colonias de *Aedes*.

A Randy Rodríguez, Dan Martínez, Carlos Nieto, Rolando Torres, Madeline Hernández y Brigitte Henríquez personal del ICGES, por su apoyo durante la realización de mi tesis.

A los doctores José R. Loaiza y Dumas Gálvez, por invertir su tiempo en la revisión del manuscrito final de la tesis.

Agradezco a la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, por brindarme la oportunidad de estudiar con una beca completa.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xiv
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
1.2. Objetivo General	5
1.3. Objetivos Específicos	5
REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
2.1. Distribución Geográfica del <i>Ae. aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i>	7
2.2. Biología, ecología y comportamiento de <i>Ae. aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i>	9
2.3. Importancia sanitaria de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Aedes albopictus</i>	11
2.4. Métodos de control vectorial de poblaciones de <i>Aedes</i>	14
2.5. Clasificación de los insecticidas y sus modos de acción.....	16
2.5.1. Organoclorados.....	17
2.5.2. Piretroides	18
2.5.3. Organofosforados	19
2.6. Cronología de la aplicación de insecticidas contra el mosquito <i>Aedes aegypti</i> en Panamá	20
2.7. Resistencia a insecticidas	23
2.8. Resistencia múltiple y cruzada.....	24
2.9 Mecanismos de resistencia	24
2.9.1. Resistencia por comportamiento.....	24
2.9.2. Resistencia a la penetración.....	25
2.9.3. Resistencia metabólica.....	26
2.9.4. Resistencia sitio insensible	28

2.10. Factores que influyen en el desarrollo de la resistencia a insecticidas.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1. Área de estudio.....	39
3.2. Recolección de mosquitos del genero <i>Aedes</i>	41
3.3. Cría y mantenimiento de las colonias de <i>Ae. aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i>	42
3.4. Bioensayos	43
3.4.1. Pruebas biológicas en larvas	43
3.4.2. Pruebas biológicas en adultos.....	45
3.5. Pruebas Bioquímicas	48
3.5.1. Preparación del macerado de mosquitos.....	48
3.5.2 Determinación de Alfa y Beta-esterasas.....	49
3.5.3 Acetilcolinesterasa sensible e insensible	49
3.5.4 Glutation S-Transferasa	50
3.6. Declaraciones de ética.....	51
3.7. Análisis de datos.....	52
RESULTADOS.....	54
4.1. Bioensayos de susceptibilidad y resistencia en larvas de mosquitos	54
4.2. Bioensayos de susceptibilidad y resistencia en mosquitos adultos	55
4.3. Ensayos bioquímicos.....	57
DISCUSIÓN	63
5.1. Bioensayos de susceptibilidad y/o resistencia en larvas	63
5.2. Bioensayos de susceptibilidad o resistencia en mosquitos adultos	64
5.3. Ensayos bioquímicos.....	68
CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES.....	73
BIBLIOGRAFÍA	75

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cronología de uso de insecticidas por el programa de malaria del departamento de control de vectores de Panamá.....	22
Cuadro 2. Cronología de uso de insecticidas por el programa de dengue del departamento de control d.e vectores de Panamá.....	23
Cuadro 3. Valor de concentración letal media (CL50) y Factor de Resistencia (FR50) para el insecticida temefos en larvas de <i>Ae. aegypti</i> según la localidad de procedencia.....	54
Cuadro 4. Valor de concentración letal media (CL50) y Factor de Resistencia (FR50) para el insecticida temefos en larvas de <i>Ae. albopictus</i> según la localidad de procedencia.....	55
Cuadro 5. Tasas de mortalidad de mosquitos adultos de <i>Ae. aegypti</i> adultos según la localidad de procedencia 24 h después de la exposición a insecticidas.....	56
Cuadro 6. Tasas de mortalidad de mosquitos adultos de <i>Ae. albopictus</i> adultos según la localidad de procedencia 24 h después de la exposición a insecticidas.....	57
Cuadro 7. Porcentaje de individuos de <i>Ae. aegypti</i> con actividad enzimática por encima del umbral de los valores de absorbancia de la cepa de referencia Rockefeller.....	61
Cuadro 8. Porcentaje de individuos de <i>Ae. albopictus</i> con actividad enzimática por encima del umbral de los valores de absorbancia de la cepa de referencia Rockefeller.....	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Nivel de resistencia del <i>Ae. aegypti</i> al temefos, 2006–2015.....	36
Figura 2. Frecuencia de resistencia a los insecticidas en <i>Ae. albopictus</i>	37
Figura 3. Área de estudio: Distrito de Panamá, Provincia de Panamá.....	40
Figura 4. Recolecta de estadios inmaduros de <i>Ae. aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i>	41
Figura 5. Establecimientos de colonias de <i>Ae. aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i>	43
Figura 6. Bioensayos con larvas de <i>Ae. aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i>	45
Figura 7. Impregnación de papeles con insecticidas.....	46
Figura 8. Pasos para realizar la prueba OMS de susceptibilidad a los insecticidas para la concentración discriminante.....	48
Figura 9. Determinación de enzimas detoxificativas.....	51
Figura 10. Perfiles de actividad enzimática en <i>Ae. aegypti</i>	59
Figura 11. Perfiles de actividad enzimática en <i>Ae. albopictus</i>	60

ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterasa
CDNB	1-cloro-2, 4 dinitrobenzeno
CHIK	Chikungunya
COP	Contaminantes orgánicos persistentes
DEN	Dengue
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DTNB	Ácido ditio-bis-2-nitrobenzoico
DO	Densidad óptica
EST	Esterasas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
GABA	Ácido amino butírico
FR	Factor de resistencia
GST	Glutación S-transferasa
ICGES	Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud
IRAC	Insecticide Resistance Action Committee

Kdr	Knock down resistance
KPO₄	Fosfato de potasio
MINSA	Ministerio de salud
OC	Organoclorados
OMS	Organización mundial de la salud
OF	Organofosforados
P450	Citocromo P-450
ULV	Ultra Bajo Volumen
ZIK	Zika

RESUMEN

Los virus dengue, zika y chikungunya se han convertido en importantes problemas de salud pública y tienen un gran impacto económico debido al costo que genera las actividades de control en los países tropicales y subtropicales. Estos arbovirus son transmitidos por dos especies de mosquitos a nivel mundial, el *Aedes aegypti* y el *Aedes albopictus*, los cuales se reproducen y distribuyen en ambientes urbanos. Ante la falta de tratamientos y vacunas eficaces contra estas enfermedades, el uso de insecticidas representa la medida de intervención más utilizada para reducir las poblaciones de mosquitos, sin embargo, su uso intensivo y extensivo ha provocado el desarrollo de la resistencia fisiológica o conductual. El principal objetivo de esta investigación fue evaluar la resistencia a insecticidas y sus mecanismos metabólicos en muestras de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* de cuatro corregimientos del distrito de Panamá, con casos frecuentes de dengue, elevados índices de infestación y aplicaciones de insecticidas. Mediante bioensayos de susceptibilidad y pruebas bioquímicas se evaluó la resistencia a los insecticidas piretroides, carbamatos y organofosforados. En los bioensayos con larvas, se encontró resistencia moderada al temefos en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Parque Lefevre y Pueblo Nuevo, y de *Ae. albopictus* de Parque Lefevre. Los bioensayos con mosquitos adultos mostraron resistencia a los insecticidas organofosforados pirimifosmetil, fenitrotión y malatión, al carbamato propoxur, en dos poblaciones de *Ae. aegypti*. Las poblaciones de *Aedes* fueron totalmente susceptibles a los piretroides. La actividad y frecuencia de esterasas (α EST y β EST) y glutatión s-transferasas fueron significativamente mayores. Se demostró que los mecanismos de acción metabólica juegan un papel importante en la resistencia detectada a los insecticidas organofosforados y carbamatos.

SUMMARY

Dengue, Zika and Chikungunya viruses have become important public health problems and have a great economic impact due to the cost generated by control activities in tropical and subtropical countries. These arboviruses are transmitted by two species of mosquitoes worldwide, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, which reproduce and distribute in urban environments. In the absence of effective treatments and vaccines against these diseases, the use of insecticides represents the most widely used intervention measure to reduce mosquito populations, however, their intensive and extensive use has caused the development of physiological or behavioral resistance. The main objective of this research was to evaluate the resistance to insecticides and their metabolic mechanisms in samples *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* of four districts of the district of Panama, with frequent cases of dengue, high rates of infestation and insecticide applications. Resistance to pyrethroid, carbamates and organophosphorus insecticides was evaluated by susceptibility bioassays and biochemical tests. In bioassays with larvae, moderate resistance to temephos was found in populations *Ae. aegypti* from Parque Lefevre and Pueblo Nuevo, and from Park Lefevre *Ae. albopictus*. Bioassays with adult mosquitoes showed resistance to pyrimiphosmethyl organophosphorus insecticides, fenitrothion and malathion, to propoxur carbamate, in two populations *Ae. aegypti*. *Aedes* populations were totally susceptible to pyrethroids. The activity and frequency of esterases (α EST and β EST) and glutathione s-transferases were significantly higher. It was shown that the mechanisms of metabolic action play an important role in the resistance detected to organophosphorus insecticides and carbamates.

INTRODUCCIÓN

Los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son vectores de varios arbovirus de importancia mundial, incluyendo los virus del dengue (DEN), fiebre amarilla, chikungunya (CHIKV) y zika (ZIKV) (Kraemer et al., 2015; Corbel et al., 2016; Singh et al., 2018). Ambas especies han colonizado exitosamente sitios urbanos en áreas densamente pobladas. Los mosquitos *Aedes* se reproducen prolíficamente y sus estadios inmaduros se desarrollan en el agua, sobre todo en recipientes artificiales, en espacios interiores y exteriores. Sus huevos son resistentes a la desecación lo cual les permite sobrevivir en ambientes inhóspitos y ser transportados por medio del trasiego de mercancías de los humanos (Rossi y Almirón, 2004; Kraemer et al., 2019). Estas características les confieren ventajas adaptativas sobre otras especies de mosquitos, convirtiéndolas en exitosas especies invasoras (Juliano y Lounibos, 2005; Lounibos y Kraemer, 2016).

En Panamá, las enfermedades transmitidas por *Aedes* constituyen un problema de salud pública. Según datos epidemiológicos del Ministerio de Salud (MINSAL), hasta el primer cuatrimestre del 2019 se habían registrado 72,198 casos de dengue desde la primera epidemia en 1993. Además, 1,352 casos confirmados de Zika se han registrados a partir de su primera aparición en Panamá en el 2015, y 394 casos de Chikungunya desde el 2014 (MINSAL, 2019a; 2019b; 2019c).

Debido a que la picada de los mosquitos *Aedes* es el principal modo de transmisión de estos virus, es esencial controlar su densidad mediante la eliminación de hábitats larvales y el uso de insecticidas (Corbel et al., 2016; Rather et al., 2017; Singh et al., 2018).

En Panamá la utilización de insecticidas químicos para el control de enfermedades transmitidas por mosquitos vectores data desde principio del siglo XX durante la construcción del Canal de Panamá, cuando se descubre el uso del ácido carboxílico como larvicida (Darling, 1910). Treinta años más tarde se utilizó por primera vez un insecticida sintético (DDT) para el control de los mosquitos adultos (Lindquist y McDuffie, 1945a).

A partir de 1956 hasta la actualidad las poblaciones de mosquitos adultos transmisores de enfermedades han estado sometidos a una continua presión selectiva de insecticidas (Cáceres et al., 2013). Históricamente, la reducción de las poblaciones de larvas se ha basado en la aplicación del insecticida organofosforado temefos a los hábitats de las larvas (Cáceres, 2013).

La aplicación de insecticidas es uno de los métodos más utilizados para aniquilar a los mosquitos vectores; sin embargo, su uso ha ocasionado resistencia a insecticidas en muchas partes del mundo (Ranson et al., 2010; Moyes et al., 2017). La resistencia a insecticidas es considerada por la Organización mundial de la salud (OMS) como una amenaza importante para el control de las enfermedades transmitidas por los mosquitos y es probable que haya contribuido a la reaparición y propagación de los arbovirus (Corbel et al., 2016).

Entre los mecanismos de resistencia más importantes en los insectos se encuentran el sitio insensible o sitio blanco alterado y la resistencia metabólica (Hemingway y Ranson, 2000; Marcombe et al., 2014). Estos mecanismos, son generalmente inducidos en los organismos durante la exposición a los insecticidas, pueden generar resistencia a la mayoría de los insecticidas disponibles (Hemingway et al., 2004). Los principales mecanismos de resistencia del sitio blanco conocidos en los mosquitos implican: 1) sustituciones de aminoácidos en el canal de sodio dependiente del voltaje que causa un fenotipo de resistencia a los insecticidas piretroides y el organoclorado DDT, conocidos como resistencia “Knock down” (Kdr) (Bregues et al., 2003); y 2) mutaciones en la acetilcolinesterasa que conduce a la insensibilidad de esta enzima a los organofosforados (Raymond et al., 2001). La resistencia basada en el metabolismo implica la transformación de la molécula de insecticida por enzimas y ahora se considera un mecanismo de resistencia clave en insectos (Hemingway et al., 2002 y 2004). Este mecanismo puede ser el resultado de dos genéticas distintas: una mutación de la secuencia de la proteína enzimática llevando a un mejor metabolismo del insecticida y/o una mutación en una región reguladora no codificante que conduce a la sobreproducción de una enzima capaz de metabolizar el insecticida. Hasta ahora solo el segundo mecanismo ha sido claramente asociado con el fenotipo resistente en mosquitos (Marcombe et al., 2009). En el metabolismo de los insecticidas se involucran principalmente tres familias enzimáticas (Hemingway et al., 2004; Ranson y Hemingway, 2005): 1) El citocromo P-450 está implicado en la resistencia para casi todas las clases de insecticidas, principalmente piretroides, organoclorados y reguladores de crecimiento (Bisset, 2002). 2) El glutatión-S-transferasas (GST) que proveen la forma más importante

de resistencia metabólica al DDT a través de la dehidroclorinación; y 3) las esterasas (EST) asociadas como primer mecanismo de resistencia a organofosforados, carbamatos y en menor proporción a piretroides (Badii y Garza, 2007).

La caracterización de los mecanismos bioquímicos en Panamá ha sido documentada en poblaciones de *Aedes aegypti* del corregimiento de la 24 de Diciembre (Cáceres, 2013). De hecho, hay una falta de evidencia con respecto a los mecanismos que están involucrados en la resistencia a los insecticidas en distintas poblaciones de campo de *Ae. aegypti* de diferentes regiones de Panamá. Hasta el momento, no hay estudios publicados que evalúen la susceptibilidad y resistencia a insecticidas y sus mecanismos bioquímicos en poblaciones de *Ae. albopictus* de Panamá. Por ende, la evidencia científica generada en esta investigación permitirá generar un panorama más amplio sobre el estado de la resistencia en las poblaciones de *Aedes* procedentes de sitios seleccionados con casos de arbovirosis, elevados índices de infestación y uso de insecticidas.

OBJETIVOS

1.2. Objetivo General

Determinar el estado de la resistencia a insecticidas y sus mecanismos bioquímicos en poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* procedentes de diferentes localidades del distrito de Panamá.

1.3. Objetivos Específicos

1. Evaluar la resistencia a los insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* del distrito de Panamá a través de bioensayos estandarizados por la OMS.

2. Valorar los niveles enzimáticos de las esterasas, glutatión s-transferasa y acetilcolinesterasa en poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*.

1.4. Importancia práctica

Los resultados de este estudio pueden contribuir en la elaboración, reorientación y fortalecimiento de las estrategias sobre el uso adecuado de los insecticidas por el Departamento de Control de Vectores del MINSA de Panamá.

1.5. Novedad científica

Se aporta por primera vez evidencia científica sobre la resistencia a insecticidas y los mecanismos bioquímicos involucrados en las poblaciones de *Ae. albopictus* de Panamá.

Se aporta nueva evidencia científica sobre el estado de la resistencia a insecticidas en poblaciones de *Ae. aegypti* del distrito de Panamá. Además, se genera evidencia sobre el estado de la resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* que coexisten en las mismas áreas, lo cual nos permite entender cómo estas dos especies de vectores, sometidas a los mismos regímenes de insecticidas responden.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Distribución Geográfica del *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*

El mosquito *Ae. aegypti* es originario del norte de África, a medida que el comercio global aumentó a lo largo de los siglos *Ae. aegypti* se extendió por gran parte del mundo tropical y subtropical (Brown et al., 2014; Gloria-Soria et al., 2016; Powell et al., 2018; Tedjou et al., 2019). Migró al nuevo mundo durante los siglos XV al XVII a bordo de los barcos que transportaban esclavos, posiblemente en múltiples ocasiones (Powell y Tabachnick, 2013; Brown et al., 2014; Powell et al., 2018). La propagación hacia Australia, Asia y el Pacífico ocurrió después de su llegada al nuevo mundo, probablemente en la década de 1890 (Powell y Tabachnick, 2013; Brown et al., 2014; Gómez-García, 2018). Actualmente, el *Ae. aegypti* está dentro de los límites de las latitudes 40°N y 40°S y se encuentra comúnmente hasta los 1,700 metros sobre el nivel del mar (Gómez-García, 2018). El primer informe de *Ae. aegypti* en Panamá se realizó a principios del siglo XX, durante la construcción del Canal de Panamá (Eskildsen et al., 2018). Actualmente está distribuido en todo el país y ha invadido al istmo de Panamá, en por lo menos dos ocasiones, tal vez en diferentes períodos y posiblemente a través de diferentes rutas de introducción (Eskildsen et al., 2018).

Por otro lado, el *Ae. albopictus* se originó en Asia tropical y templada, y ha sido una de las especies de insectos con mayor capacidad de propagación rápida en las últimas dos décadas (Benedict et al., 2007; Kraemer et al., 2015; Tedjou et al., 2019). El *Ae. albopictus* ha invadido los cinco continentes, en gran parte a través del comercio

internacional de neumáticos usados. Su alta velocidad de expansión y colonización le ha permitido llegar a lugares donde el *Ae. aegypti* no existe actualmente (Paupy et al., 2009; Tedjou et al., 2019). *Ae. albopictus* fue reportado por primera vez en América alrededor de 1980 e inició casi simultáneamente una rápida expansión demográfica en África, Oriente Medio y Europa (Paupy et al., 2009). En América la colonización y establecimiento del *Ae. albopictus* se ha confirmado en 19 países (Gomes-Carvalho et al., 2014). En Panamá se colectó por primera vez en 2004, extendiéndose hacia el oeste y se estima que ha invadido más del 60% del país durante los 7 años posteriores a su introducción inicial (Miller y Loaiza, 2015; Eskildsen et al., 2018). La colonización de *Ae. albopictus* está en curso invadiendo el país en diferentes momentos y mediante diferentes rutas de introducción (Futami et al., 2015; Miller y Loaiza, 2015; Eskildsen et al., 2018).

Se espera que ambas especies de *Aedes* continúen expandiéndose más allá de sus distribuciones actuales. La propagación futura para *Ae. aegypti* se concentra principalmente en su área de distribución tropical y en áreas templadas de los Estados Unidos y China, se estima que 159 países reportarán a esta especie en el 2080 (Kraemer et al., 2019). Por el contrario, se espera que *Ae. albopictus* se extienda ampliamente por toda Europa, el norte de los Estados Unidos y las regiones montañosas de América del Sur y África Oriental durante los próximos 30 años y se estima que estará presente en 197 países para el 2080 (Kraemer et al., 2019).

2.2. Biología, ecología y comportamiento de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*

Aedes aegypti y *Ae. albopictus* son especies que en estado adulto poseen hábitos diurnos con períodos de alimentación máxima durante las primeras horas de la mañana y en el atardecer (Reinhold et al., 2018). Las hembras de ambas especies se alimentan de sangre humana, pero *Ae. albopictus* es más oportunista en la selección de fuentes de alimentación sanguínea (mamíferos, aves, reptiles, y anfibios), esta especie tiene la capacidad de colonizar diferentes nichos ecológicos, preferentemente en hábitats vegetados y rurales, y puede sobrevivir a temperaturas templadas (Paupy et al., 2009; Faraji et al., 2014; Sivan et al., 2015; Lounibos y Kraemer, 2016; Smith et al., 2016). Mientras que *Ae. aegypti* tiende a ser más dependiente de la sangre humana y muestra una preferencia por los paisajes urbanos (Harrington et al., 2001; Rey et al., 2006; Scott y Takken, 2012; Sivan et al., 2015)

Los *Aedes* son holometábolos, el ciclo de huevo a adulto se completa entre 7 a 10 días y una vez alcanzada la etapa de adulto pueden vivir alrededor de 45 días (Carneiro et al., 2017; Das et al., 2018; Kweka et al., 2018; Mayilsamy, 2018), son multivoltinas lo que resulta en 5-17 generaciones por año (Gatt et al., 2009). Los factores abióticos como la temperatura, humedad y lluvias desempeñan un papel en influir en la dinámica de la población de larvas y pupas, además son determinantes importantes de las características adultas de ciclo de vida como la longevidad, la fecundidad, el tamaño del cuerpo y número de generaciones (Gatt et al., 2009; Carneiro et al., 2017; Kweka et al., 2018).

Las hembras de *Ae. aegypti* ponen los huevos sobre las superficies húmeda, generalmente en recipientes artificiales, evitando ponerlos directamente en el agua (Rossi y Almirón, 2004; Luz et al., 2008; Dias-Wermelinger et al., 2015). Mientras que *Ae. albopictus* presenta mayor tendencia a depositar sus huevos en recipientes naturales. Sin embargo, puede utilizar recipientes artificiales también (Rossi y Almirón, 2004; Raharimalala et al., 2012). Los huevos de ambas especies son superficialmente similares y tienen la capacidad resistir la desecación durante varios meses en las paredes internas de los contenedores. Las hembras producen un promedio de 100-200 huevos por lote, pero la cantidad de huevos producidos depende de la cantidad de sangre ingerida (Das et al., 2018).

Las larvas se desarrollan preferentemente en agua limpia, pudiendo tolerar ambientes con abundante materia orgánica en descomposición y variaciones menores en el pH y la temperatura, en algunos casos se han encontrado en aguas salobres (Rossi y Almirón, 2004; Ramasamy et al., 2011; Rey y Lounibos, 2015). Las larvas se movilizan activamente en el ambiente acuático serpenteando marcadamente para buscar alimento (microorganismos y detritos orgánicos animales y vegetales) o protegerse de los depredadores (Rossi y Almirón, 2004; Garcia-Sánchez et al., 2017). Existen cuatro estadios larvales de desarrollo, para luego sufrir una metamorfosis completa en el estado de pupa y emerger como mosquito adulto completamente desarrollado cuando las larvas se encuentran en cuarto estadio completamente desarrollado después de 1-2 días (Rossi y Almirón, 2004; Kweka et al., 2018).

El mosquito adulto puede volar en promedio de 200 metros alrededor de sus criaderos (Turell et al., 2005). Los machos buscan a las hembras inmediatamente después de emerger para aparearse guiados por el sonido emitido por las alas de la hembra durante el vuelo (Rossi y Almirón, 2004; Oliva et al., 2014). Los mosquitos *Aedes* demuestran un amplio comportamiento que les permite aparearse en parejas individuales o en agregaciones durante todo el día, aunque se han observado eventos de apareamiento en los picos crepusculares (Oliva et al., 2014). El mosquito macho sujeta el ápice del abdomen de la hembra con su terminalia e inserta su aedeagus en su receptáculo genital. La bursa copulatrix de la hembra se llena de esperma que pasa de inmediato a la espermateca en menos de dos minutos. Una inseminación es suficiente para fecundar todos los huevos que la hembra produzca durante toda su vida (Rossi y Almirón, 2004; Oliva et al., 2014).

2.3. Importancia sanitaria de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

Los mosquitos *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* han recibido una gran atención en todo el mundo, ya que son vectores eficientes de patógenos virales causantes de enfermedades (Dengue, Zika, fiebre amarilla y Chikungunya) en los seres humanos (Leta et al., 2017; Kweka et al., 2018; Powell et al., 2018; Espinal et al., 2019). Estas enfermedades se están convirtiendo cada vez más en un problema de salud mundial, debido a su rápida propagación geográfica (Leta et al., 2017). Aproximadamente, 146 países han reportado múltiples enfermedades arbovirales transmitidas por *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* y 123 reportó la aparición de al menos una de estas enfermedades (Leta et al., 2017).

El impacto económico global de los mosquitos vectores del género *Aedes* y de las enfermedades que transmiten aún se desconoce, pero las pérdidas económicas por el dengue representan el 84% de los costos totales de salud humana asociados a insectos invasores (Bradshaw et al., 2016; Shepard et al., 2016; Roiz et al., 2018). En Panamá el costo total del dengue para el año 2005 se estimó en \$16.9 millones, que comprende los gastos por el manejo de casos y el control de la enfermedad (Armien et al., 2008).

El virus dengue fue identificado por vez primera en 1950 durante una epidemia en Filipinas y Tailandia. Esta enfermedad arboviral es la más común en los seres humanos, con 50 millones de casos anuales en más de 100 países, con incidencia y diseminación cada vez mayores en todo el mundo, causando alrededor de 24 mil defunciones al año, gran parte en niños (Arredondo-García et al., 2016; Ramasamy et al., 2011; OMS, 2019a). En Panamá, el dengue se ha convertido en un problema de salud pública, se han registrado 72,198 casos de dengue desde el inicio de la epidemia 1993 hasta el primer cuatrimestre de 2019 (Cáceres et al., 2013; MINSA, 2019a).

En la infección por dengue se reconocen cuatro fases (fase de incubación, fase febril, la fase crítica (fuga plasmática) y la fase de recuperación (reabsorción de líquidos). La mayoría de los enfermos desarrolla la forma leve o fiebre por dengue clásico, pero algunos desarrollan una patología más agresiva con hemorragia de las mucosas corporales, que puede llevar a la muerte cuando se acompaña del síndrome de choque por

dengue (Arredondo-García et al., 2016; OMS, 2019a). Actualmente, no existe tratamiento alguno contra el dengue, pero la detección y el acceso oportuno a los servicios de salud, disminuye la tasa de mortalidad por debajo del 1% (OMS, 2019a). La prevención y el control del dengue dependen en gran medida de la lucha contra los mosquitos transmisores (OMS, 2019a).

La fiebre Chikungunya es la segunda enfermedad arboviral más ampliamente distribuida a nivel mundial después del dengue. En total, 106 países han informado sobre la transmisión autóctona de la enfermedad (Leta et al., 2017). Esta enfermedad ha afectado a millones de personas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo y para el futuro puede experimentar brotes severos en las regiones templadas debido a la aumentada transmisión por el vector *Ae. albopictus* (Wahid et al., 2017). En Panamá las primeras infecciones por CHIKV se detectaron en mayo de 2014, y hasta la fecha se reportan 394 (Carrera et al., 2017; MINSA, 2019c). Sin embargo, a diferencia de muchos países de las Américas, Panamá presentó pocos casos autóctonos durante este brote (Carrera et al., 2017).

El virus Chikungunya (CHIKV) se caracteriza por la aparición súbita de fiebre generalmente acompañada de dolores articulares, dolores musculares, dolores de cabeza, náuseas, cansancio y erupciones cutáneas. El virus puede causar una enfermedad aguda, subaguda o crónica. La mayoría de los pacientes se recuperan completamente, pero en algunos casos los dolores articulares pueden durar varios meses e incluso años (OMS,

2017). Actualmente no existe un fármaco antiviral específico para prevenir o mitigar la fiebre Chikungunya (Arredondo-García et al., 2016).

El virus del zika (ZIKV) se aisló por vez primera en 1947 de macacos en Uganda, a través de una red de monitoreo de la fiebre amarilla (OMS, 2018). El ZIKV ha causado múltiples epidemias en los últimos años y ha sido reportado en 85 países (Leta et al., 2017). Panamá declaró alerta sanitaria nacional en 2016, confirmándose 1,352 casos desde su aparición en 2015 hasta el 2019 (Méndez-Rio et al., 2015; MINSA, 2019b).

Se estima que cuatro de cada cinco pacientes son asintomáticos. Los síntomas aparecen entre 3 a 12 días después de la picadura del mosquito y los más comunes son fiebre leve, exantema, conjuntivitis no purulenta y artritis (principalmente en pies y manos). Se han descrito complicaciones neurológicas y autoinmunitarias, así como malformaciones congénitas (microcefalia). Es infrecuente que la infección por zika cause la muerte, sin embargo, se han reportado algunas defunciones debido a este virus (Arredondo-García et al., 2016; OMS, 2018).

2.4. Métodos de control vectorial de poblaciones de *Aedes*

Se han implementado diferentes formas de control de los mosquitos vectores con mayor o menor éxito. Las principales estrategias de intervención son las siguientes:

1. Gestión o manejo ambiental: El manejo del hábitat (fuente) intenta reducir los sitios de reproducción de mosquitos mediante la eliminación de posibles sitios de reproducción. Muchos países que enfrentan epidemias regulares intentan hacer cumplir estas medidas

mediante la educación pública o mediante métodos punitivos a través de los sistemas legales, por ejemplo, multas o encarcelamientos (Weeratunga et al., 2017).

2. Biológicos: Estos métodos se basan en la introducción de organismos depredadores, parásitos o competidores de la especie de interés e insecticidas biológicos, que de algún otro modo reducen la población de vectores por ejemplo copéodos o las bacterias *Bacillus thuringiensis var. Israelensis* y *Wolbachia* (Weeratunga et al., 2017).

3. Genéticos: La manipulación genética abarca varias modalidades para el control de los mosquitos vectores. La técnica del insecto estéril implica la creación y liberación de machos estériles en el medio ambiente, reduciendo el potencial reproductivo de la población silvestre, lo que finalmente reduce el tamaño de la población del vector. La esterilidad es inducida tradicionalmente por radiación y últimamente por manipulación genética. Estos métodos causan la muerte de la descendencia del mosquito después del apareamiento. También se están utilizando modificaciones de este sistema, como la liberación de insectos que portan un gen letal dominante (Alphey, 2013; Weeratunga et al., 2017).

4. Reguladores de crecimiento: Dentro del grupo de los insecticidas bioquímicos se encuentran los reguladores del crecimiento de insectos. Estas sustancias son clasificadas como hormonas mímicas o análogas sintéticas de la hormona juvenil, inhibidores del desarrollo, inhibidores de la muda e inhibidores de la síntesis de quitina. La acción fundamental de los reguladores de crecimiento se basa en la interrupción del crecimiento

y desarrollo, inhibiendo la emergencia de adultos y afectando la reproducción del insecto adulto (Berti et al., 2013).

5. Insecticidas químicos: Estos agentes son herramientas que manejan o controlan los insectos significativamente. Este control puede resultar en la muerte del insecto o en impedir que participe en comportamientos que se consideran destructivos (Ghosal, 2018).

Las moléculas de insecticida pueden penetrar en el cuerpo del insecto por una de las siguientes vías (Bisset, 2002):

- Envenenamiento por contacto: el insecticida penetra a través de la cutícula del insecto hasta alcanzar el sitio activo.
- Envenenamiento oral: el insecticida es ingerido y absorbido a través del intestino.
- Fumigaciones: el insecticida penetra al cuerpo del insecto a través de los espiráculos del sistema respiratorio.

2.5. Clasificación de los insecticidas y sus modos de acción

Cuatro clases de insecticidas sintéticos y químicamente diferentes han estado disponibles para aniquilar a los mosquitos: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides (Bisset, 2002; Gupta y Milatovic, 2014). La forma en que un insecticida interfiere con el proceso biológico de la plaga objetivo se llama modo de acción. El modo de acción es la herramienta más importante para garantizar la capacidad de controlar los mosquitos vectores (Gupta y Milatovic, 2014; Ghosal, 2018).

2.5.1. Organoclorados

Los insecticidas organoclorados (hidrocarburos clorados) son compuestos químicos sintéticos de amplio espectro, cuya propiedad más destacada es su alta estabilidad química, muy solubles en grasas e insolubles en agua. Son preparados por un proceso de cloración de varios hidrocarburos. Incluyen a los derivados de los etanos, de los cuales el DDT es el más conocido; los ciclodienos que incluyen al: clordano, aldrin, dieldrin, heptaclor, endrin y toxafeno; y la serie de los hexaclorociclohexanos como el lindano (Zaragoza-Bastida et al., 2016). Estos productos químicos pertenecen a la clase de contaminantes orgánicos persistentes (COP) con alta persistencia en el medio ambiente y actualmente están prohibidos en la mayoría de los países desarrollados (Jayaraj et al., 2016).

Modo de acción: Existen al menos dos mecanismos de acción diferentes para insecticidas organoclorados (Gupta y Milatovic, 2014). Los insecticidas de tipo DDT afectan los nervios periféricos y el cerebro al disminuir el flujo de Na^+ e inhibir el flujo de salida de K^+ , que produce un exceso de K^+ intracelular en la neurona, que despolariza parcialmente la célula. El umbral para otro potencial de acción se reduce, lo que lleva a una despolarización prematura de la neurona. Los hidrocarburos y ciclodienos de arilo, además de los potenciales de acción decrecientes, pueden inhibir la unión postsináptica del ácido amino butírico (Gupta y Milatovic, 2014). Los ciclodienos actúan mediante la inhibición competitiva de la unión del ácido amino butírico, interfiriendo con los canales de cloruro en la membrana nerviosa, interrumpiendo la transferencia de iones y la

transmisión de impulsos entre las células nerviosas (Devine et al., 2008; Gupta y Milatovic, 2014).

2.5.2. Piretroides

Los piretroides y las piretrinas son compuestos orgánicos similares a los aislados de las flores de los piretro (*Chrysanthemum coccineum* y *C. cinerariaefolium*). Las propiedades insecticidas de las piretrinas se derivan de los ésteres cetoalcohólicos de los ácidos crisantémico y piretroico (Davies et al., 2007; Gupta y Milatovic, 2014; Jayaraj et al., 2016). Debido a su alta potencia como insecticidas, su amplio espectro de actividad, su toxicidad relativamente baja en los mamíferos, su falta de persistencia ambiental y su menor resistencia a los insectos, los piretroides han tenido mucho éxito en el pasado reciente y ahora representan más del 25% del mercado mundial de insecticidas (Gupta y Milatovic, 2014).

Los piretroides son de dos tipos: 1) Los piretroides de tipo I son aquellos que carecen del resto α -ciano-3-fenoxibencilo. Incluye los insecticidas piretrina I, aletrina, bioaletrina, tetrametrina, resmetrina, cismetrina, fenotrina y permetrina. 2) Los piretroides de tipo II son aquellos que contienen un resto α -ciano-3-fenoxibencilo. Algunos ejemplos de piretroides de tipo II incluyen la cifenotrina, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, ciflutrina, cihalotrina, flucintrato y esfenvalerato (Gupta y Milatovic, 2014).

Modo de acción: El principal sitio de acción de los piretroides son los canales de sodio de las células. Estos insecticidas retardan la apertura y el cierre de los canales de sodio, lo

que finalmente lleva la sobre-excitación de la célula. Un aumento de sodio resulta en una célula en estado hiper-excitable. La duración del potencial de acción del sodio es mucho más corta para los piretroides de tipo I que para los de tipo II. Mientras que los piretroides de tipo I producen principalmente cargas repetitivas, la despolarización de la membrana celular es el principal mecanismo de acción tóxica ejercida por los piretroides de tipo II. El efecto de los piretroides de tipo I en las membranas nerviosas (canales de sodio) es similar a los producidos por los insecticidas Organoclorados de tipo DDT (Davies et al., 2007; Gupta y Milatovic, 2014).

2.5.3. Organofosforados

Los organofosforados (OF) son ésteres de ácido fosfórico o fosfónico, que inactivan la enzima acetilcolinesterasa (Poirier et al., 2017). Se clasifican en 13 tipos diferentes, como fosfatos, fosfonatos, fosforotioatos y fosforamidatos. Durante el último medio siglo, los insecticidas anti-acetilcolinesterasa (AChE) han ganado gran popularidad en todo el mundo debido a dos factores principales: (1) falta de persistencia de residuos en el medio ambiente y en sistemas de mamíferos, y (2) desarrollo de menor resistencia en insectos en comparación a la clase organoclorada de insecticidas. Actualmente, cientos de OF están disponibles en el mercado para su uso como insecticidas y representan el 50% del uso de insecticidas en todo el mundo (Gupta y Milatovic, 2014).

Modo de acción: tienen una alta afinidad para unirse e inhibir la AChE, una enzima específicamente responsable de la destrucción del neurotransmisor AChE. La inhibición de la AChE por OF conduce a una acumulación excesiva de AChE en la sinapsis del

cerebro y en las uniones neuromusculares, lo que da como resultado una sobreestimulación de los receptores de AChE muscarínicos y nicotínicos (Gupta et al., 2011).

2.5.4 Carbamatos

Los carbamatos son ésteres del ácido carbámico, se desarrollaron en la década de 1950 en respuesta a una búsqueda de insecticidas con actividad anticolinesterasa, pero con mayor especificidad y menor toxicidad en mamíferos que los insecticidas OP. Se usan ampliamente en muchos países donde la agricultura es una importante industria y control de plagas esencial (Vale y Lotti, 2015; Poirier et al., 2017).

Modo de acción: El efecto de los carbamatos es similar a los producidos por los insecticidas organofosforados (Gupta et al., 2011).

2.6. Cronología de la aplicación de insecticidas contra el mosquito *Aedes aegypti* en Panamá

Desde el inicio del programa de control de vectores en 1956, las poblaciones de mosquitos transmisores de enfermedades han estado sometidos a una continua presión selectiva de insecticidas organoclorados (dieldrin y DDT), carbamatos (propoxur y bendiocarb), organofosforados (fenitrotión, malatión, fentión y temefos) y piretroides (deltametrina, lambdacihalotrina y ciflutrina) aplicados en la lucha antivectorial (Cuadro 1 y 2; Cáceres et al., 2013).

A inicios del siglo XX, las medidas para el control de los mosquitos estaban enfocadas en la gestión ambiental para reducir la transmisión de la malaria y fiebre amarilla durante la construcción del Canal de Panamá. Para destruir el hábitat y criaderos de los mosquitos, el Departamento de Sanidad realizó labores de drenaje, pero cuando no lograron drenar los cuerpos de agua estancada, vertieron petróleo y otros aceites, estos fueron los primeros larvicidas utilizados en los trabajos de control (Orenstein, 1911; Gorgas, 1914; Le Prince, 1915; Cáceres, 1999).

En 1910 se descubrió que el ácido carboxílico (larvicida Panamá) era un larvicida y germicida muy eficiente (Darling, 1910; Orenstein, 1911; Darling, 1912). Luego de este descubrimiento el ácido carboxílico fue utilizado de forma extensiva sobre las superficies y a lo largo de los márgenes de los criaderos de mosquitos (Orenstein, 1911). Posteriormente, se utilizó el Verde París en los lagos y ríos pocos profundos y llenos de hierbas. Este larvicida presentó una desventaja, los tiempos favorables para la aplicación fueron pocos y distantes entre sí ya que se debían aplicar durante condiciones ambientales secas (Chamberlain y Curry, 1926). Mediante fumigación, con piretro o azufre los mosquitos dentro de las casas fueron destruidos. Cuando utilizaban piretro, los mosquitos terminaban aturdidos, por lo cual era necesario quemarlos (Gorgas, 1907; Gorgas, 1914; Mason, 1916).

En 1944 se utiliza por primera vez un insecticida sintético (DDT) para el control de los *Anopheles* en Panamá (Lindquist y McDuffie, 1945a). Durante 1944 a 1952 se realizaron

una serie de aplicaciones residuales del insecticida DDT en diferentes áreas de Panamá (Lindquist y McDuffie, 1945a; Lindquist y McDuffie, 1945b; Trapido, 1946; Trapido, 1947; Galindo y Gallardo, 1947). Estas aplicaciones dieron como resultado la implementación del DDT, como medio del control de la malaria en Panamá (Galindo y Gallardo, 1947; Trapido, 1952, Gallardo, 1954). En las áreas donde se rociaba, se logró eliminar el *Ae. aegypti*, por lo que, decidieron adicionar al programa de control de malaria, los pueblos y aldeas donde el *Ae. aegypti* estaba presente (Courtney, 1950; Pinto-Severo, 1955).

Cuadro 1. Cronología de uso de insecticidas por el programa de malaria del departamento de vectores de Panamá.

Programa Malaria	Insecticida	Inicio (año)	Suspensión (año)	Referencia
Organoclorados	Dieldrín	1957	1962	MINSA, 1984
	DDT	1962	1988	Cáceres, 1999
Carbamato	Propoxur	1972	1990	MINSA, 1984; Cáceres, 1999
Organofosforados	Fenitrotión	1982	1996	Cáceres, 1999
Piretroides	Deltametrina	1996	2002	Departamento de control de vectores,
Organofosforados	Fenitrotión	2002	Actualmente	Ministerio de Salud

Cuadro 2. Cronología de uso de insecticidas por el programa dengue del departamento de vectores de Panamá.

Programa Dengue	Insecticida	Inicio (año)	Suspensión (año)	Referencia
Organofosforados	Fenitrotión	1985	1996	Departamento de control de vectores, Ministerio de Salud
	Malatión	1985	1996	
	Temefos	1985	Actualmente	
Piretroides	Ciflutrina	1996	Actualmente	
	Deltametrina	1996	Actualmente	
	Lambdacihalotrina	1996	Actualmente	
Benzoilureas	FLUBEX	2010	Actualmente	

2.7. Resistencia a insecticidas

La resistencia es definida como la habilidad de los mosquitos para tolerar dosis altas de tóxicos e insecticidas, los cuales resultarían letales a la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie (OMS, 1957). Como resultado de las aplicaciones continuas del mismo insecticida, prevalecen los insectos naturalmente resistentes, los cuales se aparean dejando descendencia también resistente y volviéndose predominantes en la población. Así el tratamiento pierde efectividad y debe recurrirse a otro insecticida con diferente modo de acción (IRAC, 2016).

2.8. Resistencia múltiple y cruzada

La resistencia múltiple es la presencia simultánea de varios mecanismos diferentes de resistencia en el mismo organismo. Los distintos mecanismos de resistencia pueden combinarse para aportar resistencia a múltiples clases de plaguicidas (FAO, 2013).

La resistencia cruzada es cuando la resistencia a un insecticida es transferida a otro insecticida aun cuando el insecto no ha estado expuesto a este último producto. La resistencia cruzada se desarrolla más comúnmente con compuestos que tienen el mismo modo de acción y que son con frecuencia, pero no siempre, químicamente relacionados dentro de un mismo grupo químico (FAO, 2013).

2.9 Mecanismos de resistencia

Hay varias formas en que los insectos pueden volverse resistentes a los insecticidas. Los diversos mecanismos que permiten a los insectos resistir la acción de los insecticidas se pueden agrupar en cuatro categorías distintas, incluida la resistencia metabólica, la resistencia del sitio objetivo, penetración reducida y resistencia por comportamiento. De estas cuatro categorías, la resistencia metabólica y la resistencia del sitio objetivo son las más importantes (Liu, 2015). A menudo los insectos exhiben más de uno de estos mecanismos al mismo tiempo (Corbel y N'Guessan, 2013).

2.9.1. Resistencia por comportamiento

Este mecanismo incluye el desarrollo de conductas que llegan a reducir la exposición de los insectos a compuestos tóxicos o que permite a los insectos a sobrevivir en un

ambiente que es nocivo o letal para la mayoría de los individuos de una misma especie (Sparks et. al., 1989; Badii y Garza, 2007; Auteri et al., 2018). Dentro de la resistencia por comportamiento se destacan las siguientes:

Estímulo dependiente: Requiere estimulación sensorial, incluye la “irritabilidad”. Es cuando un insecto es estimulado a dejar un ambiente tóxico inmediatamente cuando entra en contacto con una superficie tratada con un agente químico (Georghiou, 1972).

Estímulo independiente: No requiere estimulación sensorial, incluye la “repelencia”. Es la detección del insecticida y la tendencia a evitarlo antes de ponerse en contacto con él (Georghiou, 1972).

2.9.2. Resistencia a la penetración

Este mecanismo también se conoce como mecanismo físico de resistencia y contempla muchos casos de penetración reducida, aumento de excreción que causa resistencia en los insectos.

La penetración reducida consiste en modificaciones de la cutícula del insecto o en el revestimiento del tracto digestivo que impiden o retrasan la absorción o penetración de los insecticidas en algunas cepas de insectos resistentes. Este mecanismo de resistencia puede soportar una amplia gama de insecticidas (Badii y Garza, 2007; IRAC, 2011).

El aumento de la excreción reduce el efecto tóxico de un insecticida. Un número de insectos dañinos a la agricultura es capaz de ingerir alimentos naturalmente tóxicos o tratados, debido al aumento de los movimientos intestinales (Bisset, 2002).

2.9.3. Resistencia metabólica

La resistencia metabólica es el mecanismo de resistencia comúnmente encontrado en los insectos, y se basa en sistemas enzimáticos que han desarrollado los insectos para desintoxicar el ingrediente activo de los insecticidas (Nauen, 2007; Ugurlu, 2012). Este mecanismo causa resistencia cruzada entre clases de insecticidas y con otras sustancias químicas utilizadas para el control de insectos (Reis-Montella et al., 2012). Los mosquitos resistentes pueden poseer niveles más altos o formas más eficientes de enzimas (Ugurlu, 2012). En el metabolismo de los insecticidas se involucran principalmente tres familias enzimáticas: las Esterasas (α -esterasa y β -esterasa), el sistema Citocromo P-450 monooxigenasas (P450) y las Glutación S-transferasas (Hemingway y Ranson, 2000; Nauen, 2007).

Esterasas

Las esterasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de un grupo éster de una variedad de sustratos (Reis-Montella et al., 2012; Gopalan y Nampoothiri, 2016). La mayoría de las esterasas pertenecen a la familia de genes carboxilesterasa dentro de la proteína del pliegue alfa/beta hidrolasa (Reis-Montella et al., 2012). La resistencia metabólica derivada de las esterasas es un problema importante en las poblaciones de vectores, una

amplia gama de insecticidas contiene enlaces éster y, por lo tanto, son susceptibles a la hidrólisis. Estas enzimas se han correlacionado con la resistencia a los insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides (Badii y Garza, 2007; Reis-Montella et al., 2012).

El sistema Citocromo P-450 monooxigenasas

Las monooxigenasas dependientes del citocromo P450 son una importante y diversa familia de enzimas hidrófobas que están involucradas en el metabolismo de numerosos compuestos endógenos y exógenos (Hemingway et al., 2004). El citocromo P-450 está implicado como el factor principal en muchos casos de resistencia metabólica a carbamatos y también detoxifican organofosforados, piretroides y DDT entre otros (Bisset, 2002).

Glutación S-transferasas

La GST son enzimas multifuncionales diméricas que desempeñan un papel en la desintoxicación de una amplia gama de xenobióticos. Estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del glutatión reducido (GSH) en los centros electrofílicos de los compuestos lipofílicos (Hemingway et al., 2004). Se han reportado múltiples formas de estas enzimas para los mosquitos y se clasifican de acuerdo con la reacción que catalizan como alquil, aril y epoxitransferasas. Las GST son importantes en la detoxificación de organofosforados y proveen la forma más importante de resistencia metabólica al DDT a través de la dehidroclorinación (Badii y Garza, 2007).

2.9.4. Resistencia sitio insensible

El segundo mecanismo de resistencia más común encontrado en los insectos es la resistencia del sitio objetivo. La insensibilidad del sitio de objetivo resulta de la modificación estructural o mutación de genes que codifican proteínas diana que interactúan con insecticidas (Badii y Garza, 2007; Liu, 2015). Los sitios objetivos son la acetilcolinesterasa, receptores GABA y los canales de sodio (IRAC, 2011).

Acetilcolinesterasa alterada

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima clave del sistema colinérgico porque regula el nivel de acetilcolina y termina los impulsos nerviosos al catalizar la hidrólisis de la acetilcolina. Esta inhibición conduce a una acumulación de acetilcolina en las sinapsis que a su vez deja los receptores de acetilcolina permanentemente abiertos, lo que resulta en la muerte del insecto (Fournier, 2005). La AchE modificada es menos eficiente al hidrolizar su sustrato que una enzima normal. Este mecanismo produce un amplio espectro de resistencia a la mayoría de los OF y carbamatos (Badii y Garza, 2007).

Receptores GABA (ácido amino butírico)

GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio tanto en insectos como en mamíferos y sirve como agonista para abrir el canal de cloro transmembrana pentamérico. El receptor GABA, como el receptor de tipo para el neurotransmisor γ -ácido aminobutírico, es el sitio objetivo para el ciclodieno insecticidas, tales como dieldrin, y fenilpirazoles, tales como fipronil (Liu, 2015). La unión de GABA al receptor provoca la activación rápida de un canal de ión selectivo de cloruro integral (Hemingway et al., 2004).

Alteración de los canales de sodio

Las modificaciones en la estructura del canal de sodio, en forma de mutaciones puntuales o sustituciones resultantes de polimorfismos de un solo nucleótido, conducen a una insensibilidad al DDT y piretroides en los canales de sodio del sistema nervioso a través de una reducción o eliminación de la afinidad de unión del insecticida para proteínas (Liu, 2015). Esto también, quizás de manera indirecta, altera las propiedades de activación del canal de sodio, disminuyendo los efectos tóxicos de los insecticidas y dando como resultado una resistencia a los insecticidas. El término resistencia “Knock down” se usa para describir casos de resistencia al DDT y a los insecticidas piretroides en insectos y otros artrópodos debido a la reducida sensibilidad de los canales de sodio al sitio objetivo (Badii y Garza, 2007; Liu, 2015).

2.10. Factores que influyen en el desarrollo de la resistencia a insecticidas

Los factores que afectan el desarrollo de la resistencia pueden agruparse en tres categorías: operacionales, biológicos y la composición genética. A pesar de que no es posible predecir con precisión el desarrollo de la resistencia a un compuesto en particular, sí es posible valorar el riesgo en general al evaluar estos factores (IRAC, 2011; FAO, 2013).

Factores operacionales

Frecuencia de aplicación: La frecuencia con la que se usa un insecticida es uno de los factores más importantes que influyen en el desarrollo de resistencia. Con cada

uso, se da una ventaja a los insectos resistentes dentro de una población (Bisset, 2002; IRAC, 2011).

Dosificación y persistencia del efecto: El período de tiempo que un insecticida permanece efectivo, también llamado persistencia, depende de la química física del insecticida, el tipo de formulación y la tasa de aplicación. Los productos que proporcionan un efecto persistente proporcionan una presión de selección continua de manera similar a los tratamientos múltiples (IRAC, 2011).

□ **Factores biológicos**

Tasa de reproducción: Es probable que los insectos que tienen un ciclo de vida corto y altas tasas de reproducción desarrollen resistencia más rápidamente que las especies que tienen una tasa de reproducción más baja, ya que cualquier gen de resistencia puede propagarse rápidamente por la población. Los mosquitos tienen un historial de resistencia a los insecticidas y se caracterizan por un ciclo de vida relativamente corto, una alta fecundidad y las hembras ponen varios cientos de huevos durante su vida reproductiva (Bisset, 2002; IRAC, 2011).

Aislamiento de la población: Con los vectores de enfermedades, el objetivo a menudo es eliminar a toda o la mayoría de la población, sin embargo, cuanto mayor es la presión de selección que se ejerce sobre una población, se podría perder la susceptibilidad más rápidamente. La inmigración de individuos que poseen genes

susceptibles de áreas no tratadas diluirá y competirá beneficiosamente con los genes de resistencia en la población general (IRAC, 2011).

□ **Factores genéticos**

Ocurrencia de genes de resistencia: Para seleccionar la resistencia en una población, al menos algunos de los individuos deben tener un gen de resistencia. El grado de resistencia y la velocidad a la que se desarrolla en la población dependen de la efectividad de los genes. En general, cuanto mayor es la frecuencia del gen de resistencia, más rápida se puede seleccionar la resistencia.

Número de mecanismos de resistencia: Existen varios mecanismos que permiten a los insectos sobrevivir a la exposición de sustancias tóxicas, y la resistencia puede desarrollarse más fácilmente cuando un organismo tiene más de uno de estos mecanismos. En los insectos en particular, hay muchos casos que pueden usar más de un mecanismo para desarrollar resistencia, a pesar de que un mecanismo puede ser más pronunciado que los otros.

Frecuencia de genes: La frecuencia de genes (a menudo también denominada frecuencia de alelos) es la proporción de todas las copias de un gen que se compone de una variante de gen particular (o alelo). La frecuencia del alelo de resistencia tiene un efecto significativo en el desarrollo de resistencia. En la mayoría de los casos, la frecuencia de individuos homocigóticos que son resistentes a un nuevo pesticida es muy baja, mientras que la frecuencia de individuos heterocigotos puede ser mayor.

2.11. Resistencia en poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*

La resistencia en *Aedes* a las cuatro clases principales de insecticidas se está detectando a nivel mundial (Figuras 1 y 2). Se ha observado resistencia a organoclorados, carbamatos, pero principalmente a piretroides y organofosforados, con algunos mecanismos de resistencia bien establecidos en poblaciones distintas y de allí la importancia de la vigilancia de la resistencia (Moyes et al., 2017; Rodrigues de Sá et al., 2019). A escala continental, los estudios publicados sobre la susceptibilidad o resistencia a los insecticidas de los vectores del dengue provienen mayormente de Asia, América del Sur, mientras que hay muy pocos de Europa y África (Ranson et al., 2010; Moyes et al., 2017).

Por ejemplo en poblaciones de *Ae. aegypti* de África la resistencia al DDT es generalizada y se ha reportado en Cabo Verde, Senegal, Costa de Marfil, Ghana, Nigeria, Camerún, República Africana, Gabon, Sudan (Moyes et al., 2017; Weetman et al., 2018). La resistencia a los piretroides (principalmente a la permetrina y deltametrina) parece ser más esporádica, pero hay informes confirmatorios sobre esta resistencia en *Ae. aegypti* de África occidental, central y oriental continental. Los organofosforados (malatión o fenitrotión) se han probado con menos frecuencia, pero solo en Madeira y Sudán se ha confirmado la resistencia. Todos los estudios en África occidental que usaron carbamatos como el propoxur informaron que existe resistencia (Weetman et al., 2018). Igualmente, pruebas más recientes en Camerún detectaron resistencia al insecticida bendiocarb (Moyes et al., 2017; Weetman et al., 2018).

En Asia, sobre todo en el sur y sudeste, el grado de resistencia a los piretroides en poblaciones de *Ae. aegypti* es muy variable. Por ejemplo, se ha notificado resistencia en Camboya (permetrina, deltametrina), Indonesia (permetrina, deltametrina, lambda-cihalotrina, cipermetrina y d-aletrina), Laos (permetrina), Malasia (permetrina, lambda-cihalotrina), Filipinas (permetrina, deltametrina, lambda-cihalotrina, cipermetrina y d-aletrina), Singapur (permetrina, cipermetrina, deltametrina), Tailandia (deltametrina, permetrina, dieldrina, bioaletrina, bioresmetrina o alfacpermetrina), Timor-Leste (permetrina, resmetrina, lambda-cihalotrina), Vietnam (d-aletrina) (Amelia-yap et al., 2018). La resistencia al temefos parece ser muy variable en el sur y el sudeste de Asia (Figura 1; Moyes et al., 2017).

En América Latina y el Caribe, varias poblaciones de *Ae. aegypti* han mostrado niveles elevados de resistencia a los OP, carbamatos y piretroides (Manjarres-Suárez y Olivero-Verbel, 2013). En países como Puerto Rico, República Dominicana, Cuba, Guayana Francesa, Brasil y Colombia, entre otros, se ha registrado el desarrollo de resistencia del *Ae. aegypti* a insecticidas como el temefos y los piretroides (Manjarres-Suárez y Olivero-Verbel, 2013; Moyes et al., 2017). En Panamá, se han publicado pocos trabajos sobre el comportamiento de la resistencia a insecticidas en *Ae. aegypti*. El primer estudio sobre este tema se llevó a cabo en 1975 para determinar la eficacia del malatión grado técnico 95% aplicado con equipo ultra bajo volumen (ULV), en donde se registró un 100% de mortalidad (Echevers et al., 1975). Por otro lado, se ha demostrado la susceptibilidad en

larvas y adultos de mosquitos a 12 y 9 insecticidas, respetivamente (Bisset et al., 2003; Rodríguez, 2008; Cáceres, 2013; Cáceres et al., 2013).

En contraste con *Ae. aegypti*, hay menos datos disponibles de resistencia y/o susceptibilidad a los insecticidas en poblaciones de *Ae. albopictus* (Figura 2) (Ranson et al., 2010; Marcombe et al., 2014; Moyes et al., 2017). Para el continente africano la resistencia al DDT, piretroides (permetrina y deltametrina), carbamatos (bendiocarb) y organofosforados se ha informado en Camerún y la República Centroafricana. Para el temefos no han detectado un nivel problemático de resistencia (Weetman et al., 2018). En Europa específicamente en España, Grecia e Italia se han detectado poblaciones de *Ae. albopictus* resistentes a los piretroides y al temefos (Vontas et al., 2012).

En el continente asiático existe evidencia de que las poblaciones de *Ae. albopictus* son resistentes a las 4 clases principales de insecticidas neurotóxicos (Moyes et al., 2017; Kamgang et al., 2017; Li et al., 2018). Se ha reportado resistencia al DDT, dieldrin y fentión en varias poblaciones del sudeste asiático e India (Marcombe et al., 2014). Los adultos de *Ae. albopictus* de Sri Lanka, Laos, China han mostrado elevados niveles de resistencia a los insecticidas como el DDT (Vontas et al., 2012; Kamgang et al., 2017; Li et al., 2018; Tangena et al., 2018); deltametrina en China (Kamgang et al., 2017; Li et al., 2018); y al temefos en larvas de Malasia y Laos (Vontas et al., 2012; Tangena et al., 2018).

En América son pocos estudios que evalúan la resistencia y/o susceptibilidad a insecticidas en *Ae. albopictus*. Las poblaciones de *Ae. albopictus* de EE. UU. son ampliamente susceptibles a los larvicidas y adulticidas disponibles actualmente y solo se ha reportado resistencia al malatión (Florida, Texas, Illinois, Nueva Jersey), deltametrina (Alabama) y DDT (Florida, Nueva Jersey) (Marcombe et al., 2014). Hasta el momento, no hay estudios publicados en Centroamérica sobre los perfiles de susceptibilidad y/o resistencia a los insecticidas en poblaciones de *Ae. albopictus*. Los casos registrados de resistencia en América del sur provienen de Venezuela, en donde se ha informado resistencia al fenitrotión, malatión, lambdacihalotrina y susceptibilidad al DDT y Brasil de las poblaciones del Estado de Paraná y Santa Catarina, las cuales mostraron supervivencia contra el temefos (Somariva-Prophiro et al., 2011; Molina de Fernández et al., 2016).

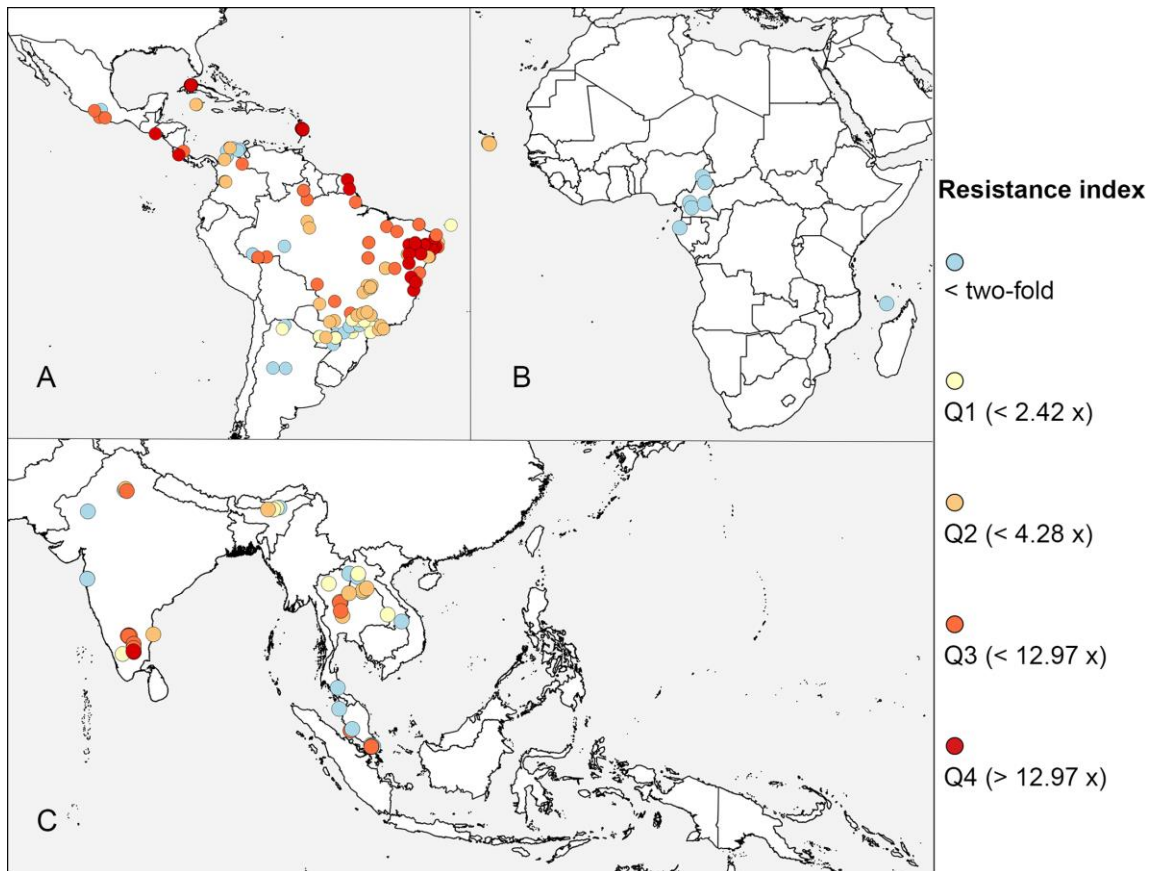


Figura 1. Nivel de resistencia del *Ae. aegypti* al temefos, 2006–2015 según Moyes et al., (2017). Proporción de la concentración letal requerida para matar la mitad de la muestra (valor LC 50) obtenida por cada estudio con respecto al valor obtenido para la cepa susceptible a Rockefeller en todos los estudios. El mapa se amplía a las 3 regiones con datos. (A) América; (B) África; (C) Asia.

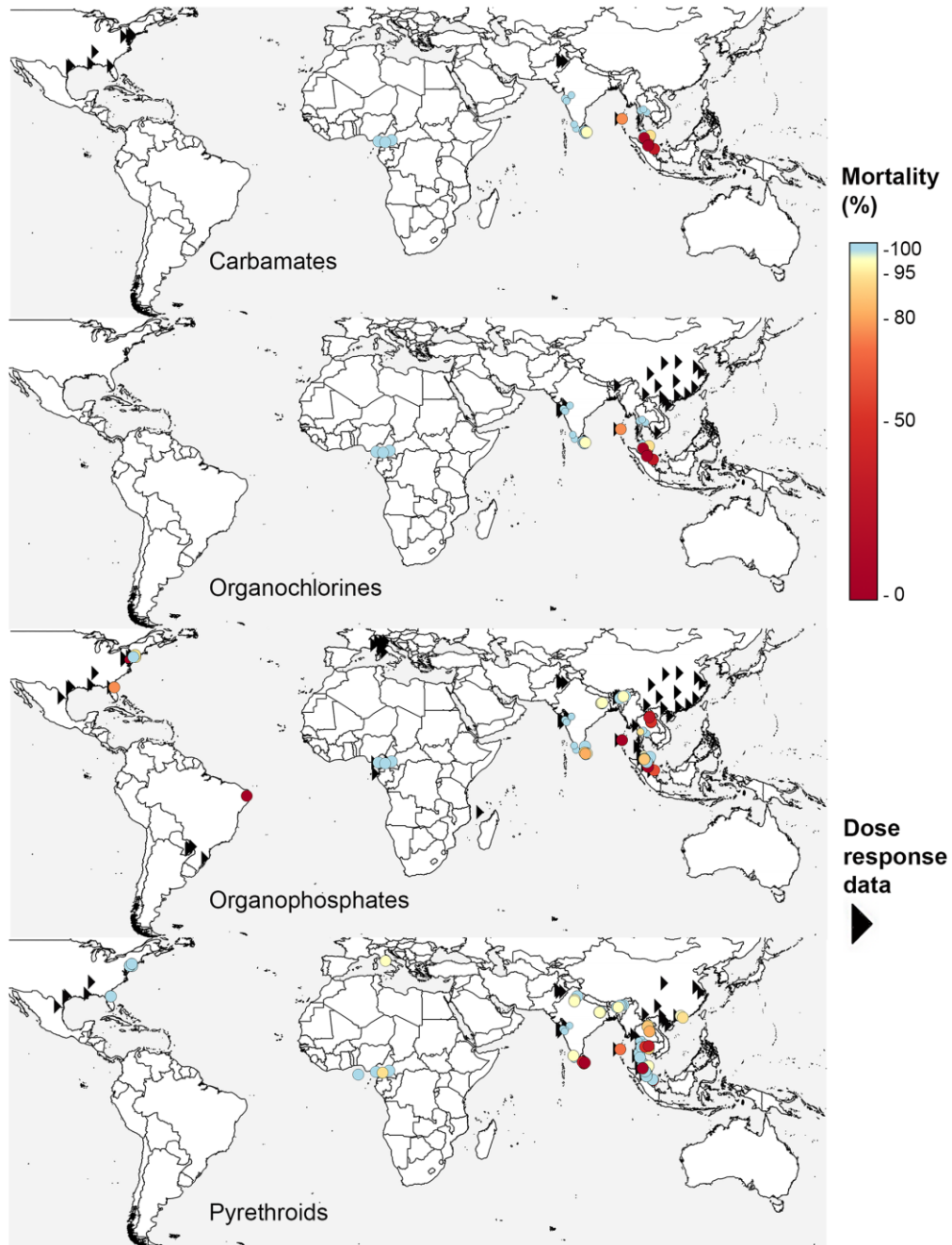


Figura 2. Frecuencia de resistencia a los insecticidas en *Ae. albopictus* según Moyes et al., (2017). Las ubicaciones de poblaciones de *Ae. albopictus* utilizadas en bioensayos de susceptibilidad (círculos) y dosis-respuesta (triángulos) para cada una de las 4 clases principales de insecticida neurotóxico. Se incluyen bioensayos de adultos y larvas. Los

valores de mortalidad para 2006–2015 se denotan por círculos más grandes y los años hasta 2005 se denotan por círculos más pequeños.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

Se colectaron mosquitos (larvas) en 15 viviendas escogidas de manera aleatoria de cuatro corregimientos del distrito de Panamá (Figura 3). Estos corregimientos fueron seleccionados con base a información epidemiológica (casos de dengue, altos niveles de infestación y uso frecuente de insecticidas) proporcionada por el programa del control del *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* del Ministerio de Salud de Panamá. A continuación, se presenta información sobre los cuatro corregimientos muestreados.

Parque Lefevre: La localidad de Panamá Viejo (9°0'43.90524" N y 79°29'4.0272" O) comprende un paisaje de tipo urbano con una población estimada de 37,136 habitantes, 379 casos de dengue e índice de infestación promedio de 2.4 durante el periodo 2014-2018 (INEC, 2010).

Pueblo Nuevo: La localidad de La Pulida (9°1'2.69148" N y 79°30'13.8726" O) comprende un paisaje de tipo urbano con una población estimada de 18,161 habitantes, 181 casos de dengue e índice de infestación promedio de 3.36 durante el periodo 2014-2018 (INEC, 2010).

Juan Díaz: La localidad de Ciudad Radial (9°3'30.32" N y 79° 26'38.89" O) comprende un paisaje de tipo urbano con una población estimada de 88,165 habitantes, 628 casos de dengue e índice de infestación promedio de 3.12 durante el periodo 2014-2018 (INEC, 2010).

Rio Abajo: La localidad de Rio Abajo ($9^{\circ}1'3.9.7992''$ N y $79^{\circ}29'51.01656''$ O) comprende un paisaje de tipo urbano con una población estimada de 28,714 habitantes, 227 casos de dengue e índice de infestación promedio de 1.58 durante el periodo 2014-2018 (INEC, 2010).

Como control de susceptibilidad se empleó la cepa Rockefeller, esta cepa fue establecida durante los años 30 del siglo 20 en el CDC de Puerto Rico, y es sensible a los insecticidas evaluados.



Figura 3. Área de estudio: Provincia de Panamá, Distrito de Panamá. Muestra los cuatro corregimientos y sitios de recolección de los mosquitos.

3.2. Recolección de mosquitos del genero *Aedes*

Se realizaron búsquedas activas de las fases inmaduras (larvas y pupas) de mosquitos *Aedes* en criaderos localizados fuera y dentro de las viviendas (Figura 4). Las colectas fueron realizadas entre las 8:00 am y 13:00 pm, desde septiembre hasta octubre de 2018. Los mosquitos colectados fueron transportados en bolsas whirl-pak, debidamente codificados, al insectario Abdiel Adames Palma del ICGES para el establecimiento de las colonias de *Aedes*.



Figura 4. Recolección de estadios inmaduros de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. A-E. Criaderos activos localizados. F. Material colectado.

3.3. Cría y mantenimiento de las colonias de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*

Las larvas se criaron en bandejas plásticas de 35 x 35 cm, con agua libre de cloro y marcadas con el nombre de cada localidad/corregimiento (Figura 5A). Las larvas fueron alimentadas diariamente con 1 gramo (gr) de TetraMin® (alimento para peces) pulverizado hasta que alcanzaran el estadio de pupa. Durante el estadio de pupa se identificaron a nivel de especie mediante la clave de Bangs y Focks (2006). Posteriormente las pupas fueron separadas por especie en envases individuales y colocadas dentro de jaulas (30x30x30 cm), hasta que emergieron los adultos. Los mosquitos macho se alimentaron con solución azucarada al 10% (algodones impregnado) y las hembras se alimentaron cada tercer día con sangre de Cobayo (*Cavia porcellus*) mediante alimentación artificial (Figura 5D-E). Dentro de las jaulas se colocaron envases de plástico con agua y tiras de papel manila (Codificadas con el nombre de la colonia, especie, fecha y número de generación) como sustrato para la oviposición, las cuales se dejaron de 2 a 3 días. Cuando se contó con un número suficiente de posturas para el experimento, las tiras de papel se sumergieron en bandejas con agua para obtener el material a ser evaluado correspondiente a los bioensayos. Las colonias de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* se mantuvieron, a una temperatura $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y $70\% \pm 2$ de humedad relativa con un fotoperiodo de 12 horas (Figura 5).

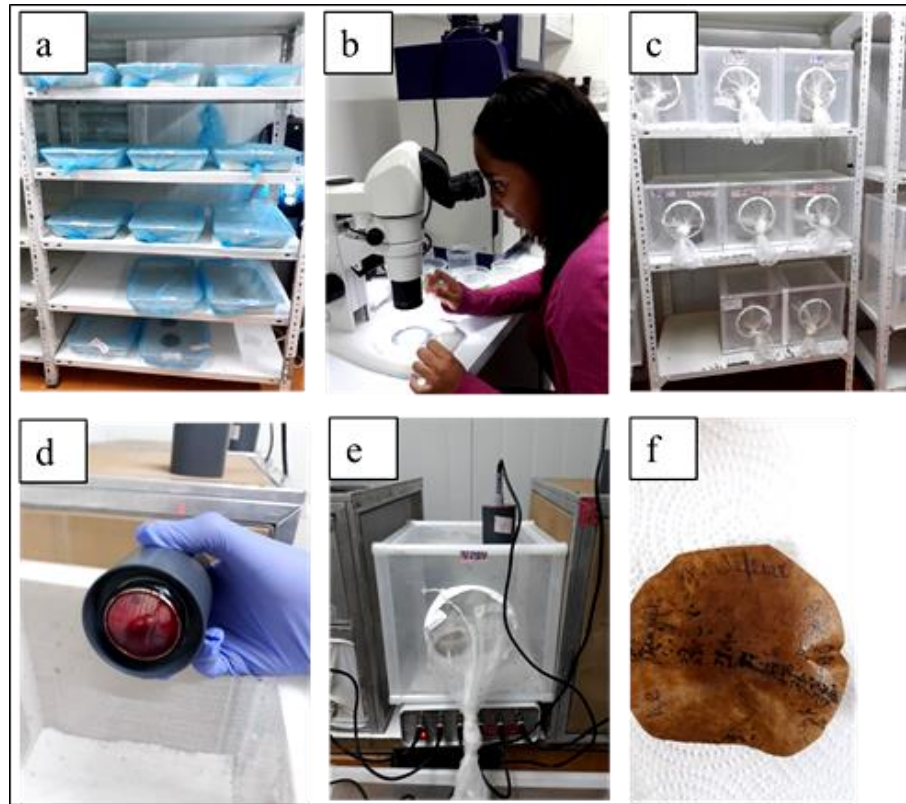


Figura 5. Establecimientos de colonias de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. A. Cría de larvas. B. Identificación. C. Cría de adultos. D, E. Alimentación. F. Posturas.

3.4. Bioensayos

3.4.1. Pruebas biológicas en larvas

Con la generación F1 de cada una de las poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* se realizaron ensayos de susceptibilidad, siguiendo la metodología estandarizada por la OMS (OMS, 1981a; OMS, 2005). Para establecer el rango de concentraciones requeridas, fue necesario exponer las larvas en un primer ensayo, a un amplio rango de

concentraciones de temefos (12 concentraciones: 1, 5, 10, 50, 0.1, 0.5, 0.01, 0.05, 0.001, 0.005, 0.0001, 0.0005 ppm) para averiguar el rango de actividad del insecticida. Después de determinar la mortalidad de las larvas en este rango de concentraciones, se seleccionaron 6 concentraciones (0.05, 0.025, 0.013, 0.006, 0.003, 0.001 ppm), las cuales causaban mortalidad entre el 10 y 90% de las larvas expuestas al larvicida.

El temefos fue evaluado a través de 16 réplicas por concentración y cada una con 25 larvas de III estadio tardío (400 larvas por concentración de insecticida). Estas larvas fueron colocadas en envases de plástico que contenían 200 ml de agua reposada y posteriormente se añadió la solución de insecticida a la concentración deseada (Figura 6). La lectura de la mortalidad se realizó a las 24 horas. Se utilizaron dos grupos de control: uno con agua (control negativo) y el otro con la concentración de insecticida por evaluar en la cepa sensible Rockefeller (control positivo). El criterio de mortalidad usado fue inmovilidad de las larvas o movimiento no ascendente y reducción en el tamaño. Los bioensayos se realizaron a una temperatura promedio de 26-28 °C y un fotoperiodo de 12 horas de luz, seguido por 12 horas de obscuridad.



Figura 6. Bioensayos con larvas de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*.

3.4.2. Pruebas biológicas en adultos

Se prepararon las soluciones de los insecticidas deltametrina (0.1%/), lambdacihalotrina (0.1%), fenitrothion (1.0%), malatión (0.8%), clorpirifos (1.0%), pirimifosmetil (0.25%) y propoxur (0.1%) para impregnar los papeles. El papel que se utilizó es el Whatmann No.1, con una superficie a tratar de 180 cm² (12 x 15 cm) quedando impregnado con 2000 µl de la mezcla de insecticida (Figura 7). Los controles consistieron en papeles impregnados con los solventes utilizados para cada grupo químico, correspondientes a aceite de silicona en el caso de los insecticidas piretroides y aceite de oliva en el caso de los insecticidas organofosforados y carbamatos. Los papeles impregnados fueron conservados a temperatura de 4 °C. Cada papel estaba debidamente rotulado con la fecha de preparación y tipo de insecticida. Estos no se utilizaron más de cinco veces, para asegurar su eficacia.

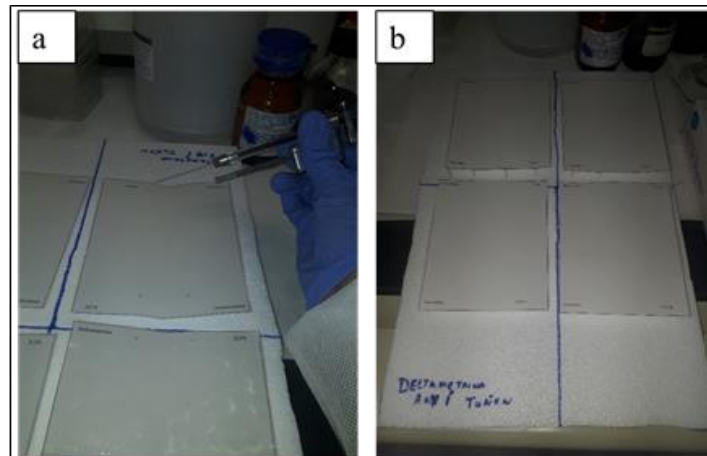


Figura 7. Impregnación de papeles con insecticidas. A. Proceso de impregnación. B. Papeles con insecticidas.

El nivel de resistencia a los insecticidas se determinó mediante las pruebas de susceptibilidad para mosquitos adultos, siguiendo las normas para mosquitos adultos de la OMS, (OMS, 1981b), con muestras de hembras adultas de la primera generación (F1) de las cepas de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* bajo estudio.

Se introdujo una hoja de papel blanco limpio (12 × 15 cm), enrollada en forma de cilindro, en los tubos de mantenimiento, sujetadas con un clip de alambre. Después se fijó la unidad corrediza al otro extremo de cada tubo. Luego se introdujo 25 hembras de 2 a 4 días de emergidas previamente alimentadas con sangre de *Cavia porcellus* (cobayo) por cada tubo, haciéndolas pasar de la jaula a los tubos de mantenimiento mediante un aspirador a través del orificio de llenado de la unidad corrediza. Una vez transferidos los mosquitos, se cerró la unidad corrediza y se dejaron los tubos de mantenimiento en posición vertical durante 1 hora (Figura 8).

Transcurrido este tiempo, se extrajo todo mosquito que estuviese moribundo (es decir, sea incapaz de volar) o muerto. Para el tubo control se introdujo un papel impregnado de aceite. Tras sujetar el papel con un clip de cobre, se cerró el tubo con el tapón de rosca. Para la preparación de los cuatro tubos de exposición se introdujo una hoja de papel impregnado de insecticida, de tal modo que la etiqueta del papel fue visible desde el exterior. Después se fijó el papel contra la pared del tubo sujetándolo con un clip de alambre de cobre y se cerró el tubo con el tapón de rosca. Se enroscan los tubos de exposición vacíos a las unidades corredizas, y con la unidad corrediza abierta se sopla suavemente para hacer pasar los mosquitos de los tubos de mantenimiento a los de exposición. Una vez todos los mosquitos se introdujeron en los tubos de exposición, se cerró la unidad corrediza y se separaron los tubos de mantenimiento y de exposición (Figura 8). Se dejaron los tubos de exposición, con los mosquitos dentro, en posición vertical con el extremo mallado hacia arriba durante 1 hora (durante los cuales se registró el número de mosquitos derribados a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos). Después del tiempo de exposición de 1 hora, se devolvieron los mosquitos a los tubos de mantenimiento (Figura 8). Se separaron las unidades corredizas de los tubos de exposición. En el extremo mallado de los tubos de mantenimiento se colocó una almohadilla de algodón empapada de agua azucarada al 10%. El porcentaje de mortalidad se registró a las 24 horas (Figura 8). Cada bioensayo se repitió cuatro veces. Los bioensayos se realizaron en condiciones de temperatura (27 ± 2 °C) y 70 % de humedad.

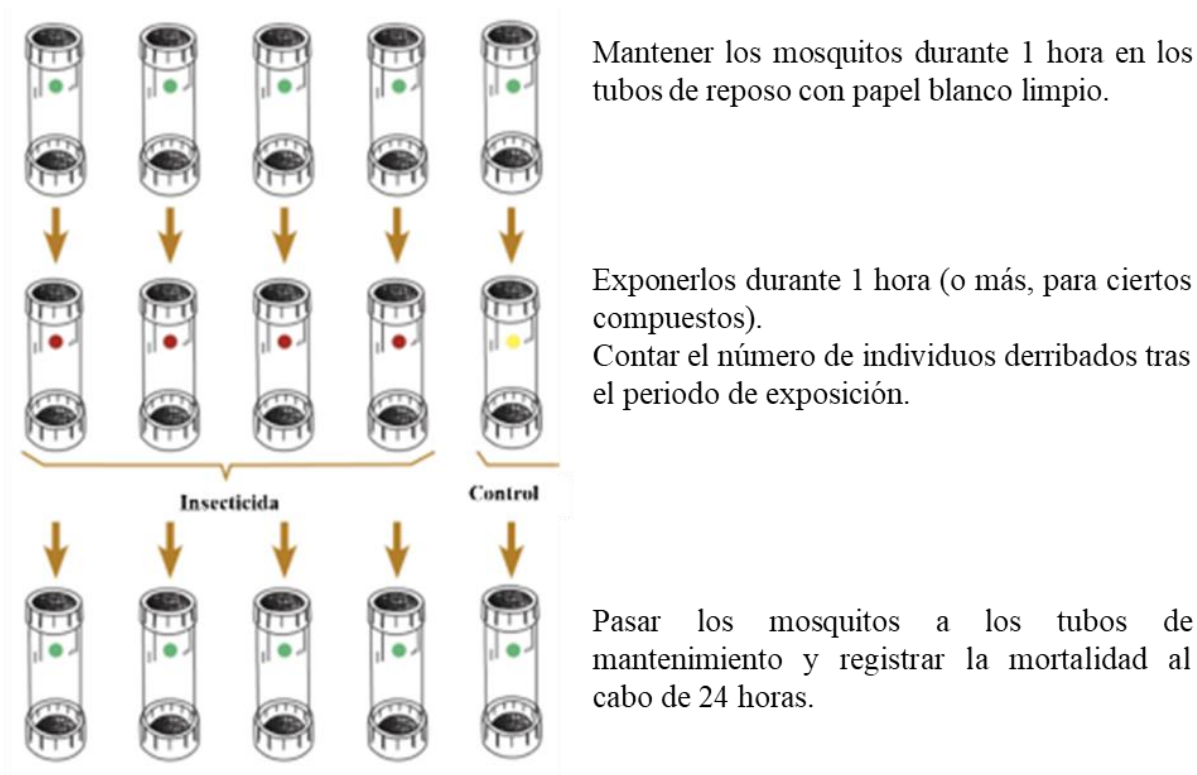


Figura 8 Pasos para realizar la prueba OMS de susceptibilidad a los insecticidas para la concentración discriminante.

3.5. Pruebas Bioquímicas

3.5.1. Preparación del macerado de mosquitos

Se utilizaron 30 larvas (F1) por cada colonia de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* bajo estudio y la cepa de referencia Rockefeller. Se colocó una larva de cuarto estadio temprano por tubo de microcentrífuga de 2ml. Cada larva fue homogenizada en 200 μ l de buffer fosfato (KPO₄) 0.01 M pH 7.2 y se completó el volumen de cada tubo de microcentrífuga a 1800 μ l con tampón fosfato (Figura 9A).

De los 2000 μl de homogenados preparados, tomé 100 μl los cuales fueron transferidos en pozos de placas de microtitulación por triplicado para cada enzima. Este procedimiento se realizó sobre una placa fría. En los seis últimos pocillos de la placa de microtitulación se colocaron los controles (3 positivos y 3 negativos).

3.5.2 Determinación de Alfa y Beta-esterasas

Se mezclaron 100 μl del homogenado de larva con 100 μl de alfa naphthyl acetato (para alfa-esterasas) y beta naphthyl acetato (para beta-esterasas). Se dejó transcurrir la reacción por 20 min, seguido se añadió 100 μl de Dianisidina. Se incubó a temperatura ambiente por 4 minutos, luego se leyó la densidad óptica (DO) a 540 nm. Como controles positivos se utilizaron alfa y beta naphthyl y agua como control negativo (Figura 9C).

3.5.3 Acetilcolinesterasa sensible e insensible

Se prepararon dos placas, una para la determinación de la actividad AchE normal y otra para la actividad AchE modificada (inhibida con propoxur). En ambas placas se adicionaron 100 μl del homogenado de cada larva más 100 μl de DTNB (ácido ditio-bis-2-nitrobenzoico) y 100 μl de AchE (para la AchE normal), 100 μl de AchE insensible (para la AchE modificada). Inmediatamente (tiempo 0) se realizó la lectura de la DO a 414 nm y luego de 20 min (tiempo 20) de incubación a temperatura ambiente se volvió a leer la DO. Se utilizó KPO_4 como control positivo y agua como control negativo. Los resultados de la acetilcolinesterasa se expresan como el porcentaje de actividad restante después de la adición del inhibidor.

3.5.4 Glutation S-Transferasa

En cada pocillo de la placa se añadieron 100 μ l del homogenado de larva más 100 μ L de glutatión reducido y 100 μ l de CDNB (1-cloro-2, 4 dinitrobenzeno) (Figura 9B). Se leyó inmediatamente (tiempo 0) la DO a 340 nm y se dejó transcurrir la reacción por 10 min (Tiempo 10) y se volvió a leer DO a 340 nm. Se utilizó KPO_4 como control positivo y agua como control negativo. Las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro para lectores de microplacas (TECAN, Sunrise TM) con Magellan versión 7.0. software (Figura 9D).

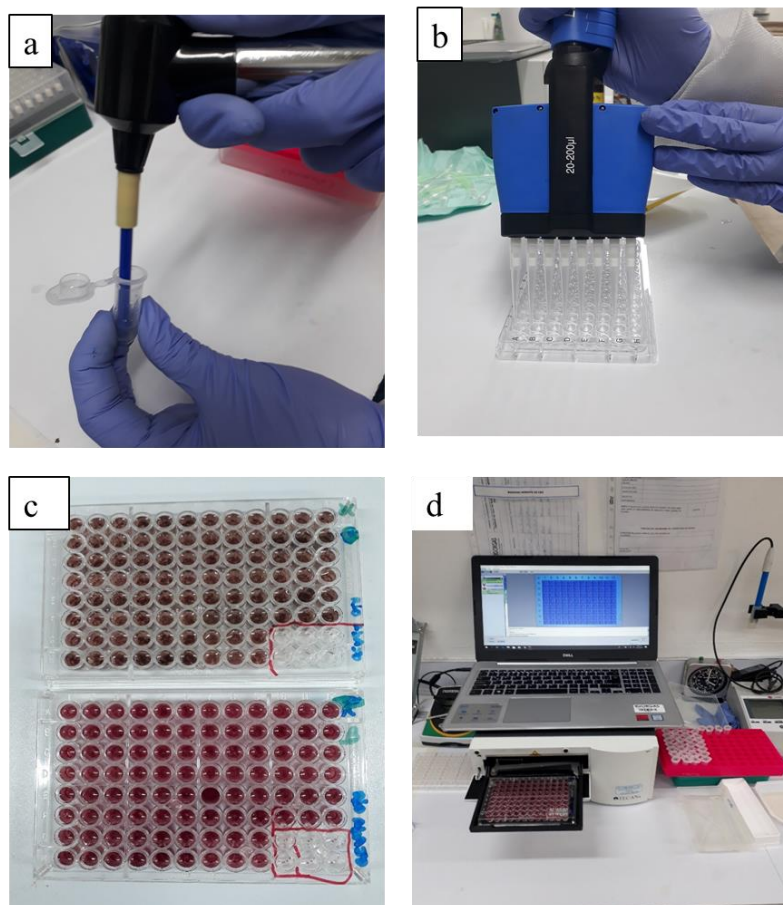


Figura 9. Determinación de enzimas detoxificativas. A. Preparación del macerado de mosquitos. B. Carga de reactivos. C. Cuantificación de Alfa y Beta-esterasas en las microplacas . D. Lectura de absorbancia

3.6. Declaraciones de ética

Se obtuvo el permiso de los propietarios de casas/terrenos privados antes de la recolección de las etapas inmaduras del mosquito. El estudio no involucró ninguna especie en peligro y protegida. El uso de cobayos para alimentar los mosquitos con sangre fue autorizado por el ICGES.

3.7. Análisis de datos

3.7.1. Pruebas biológicas en larvas

Para determinar el factor de resistencia (FR) en las pruebas biológicas en larvas, se utilizó el programa XLSTAT para obtener la concentración letal 50 (CL₅₀). A partir de estos datos, se calculó el factor de resistencia 50 (FR₅₀) de la cepa de campo con relación a la línea de susceptibilidad de la cepa de referencia (Rockefeller), mediante la siguiente fórmula:

$$FR_{50} = CL_{50} \text{ cepa de campo} / CL_{50} \text{ cepa susceptible (Rockefeller)}.$$

Se utilizaron los criterios de resistencia a insecticidas propuestos por la OMS (2016): FR $50 \leq 5$ Susceptible; FR 50 entre 5 y 10 Resistencia moderada; FR $50 > 10$ Resistente

3.7.2. Pruebas biológicas en adultos

Los resultados de mortalidad a las 24 horas permitieron determinar la susceptibilidad de *A. aegypti* y *Ae. albopictus* a los insecticidas probados, considerando los siguientes criterios de interpretación de las pruebas de susceptibilidad de la OMS (2016):

- Mortalidad entre 98–100%: se indica susceptibilidad
- Mortalidad inferior al 98%: resistencia sugerida. Se necesitan más pruebas para verificar.
- Mortalidad inferior al 90%: resistencia confirmada

3.7.3. Pruebas bioquímicas

Se determinó estadísticamente si los datos de las poblaciones cumplían una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk, al no cumplirse estos criterios, se analizó la información mediante pruebas no paramétricas. Para determinar si las diferencias entre la media de la actividad enzimática de las poblaciones de campo fueron comparadas con los promedios por enzima evaluada de la cepa de referencia Rockefeller utilizando pruebas de Mann-Whitney. Para los cálculos se utilizó el programa R Core Team (2013). Se asumió significancia estadística en $P < 0.05$.

Se determinó un umbral de resistencia para evaluar cuantos ejemplares de la población superaron este umbral. El umbral corresponde al máximo valor promedio de las absorbancias para cada enzima de la cepa Rockefeller. La actividad de cada enzima se clasificó como no alterada, alterado y altamente alterado cuando los porcentajes de la población se encontraron de 0-15%, 15-50% y >50% respectivamente (Valle et al., 2006; Montella et al., 2007).

RESULTADOS

4.1. Bioensayos de susceptibilidad y resistencia en larvas de mosquitos

Los ensayos biológicos con larvas de mosquitos *Aedes* y el insecticida temefos arrojaron que las poblaciones de *Ae. aegypti* procedentes de Parque Lefevre (FR: 7.24) y Pueblo Nuevo (FR: 6.21), y las poblaciones de *Ae. albopictus* de Parque Lefevre (FR: 6), mostraron niveles de resistencia moderada. El resto de las poblaciones de ambas especies de *Aedes* resultaron susceptibles al temefos (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Valor de concentración letal media (CL50) y del factor de resistencia (FR50) de larvas de *Ae. aegypti* para el insecticida temefos, según la población de procedencia.

Población	Numero de larvas	CL 50 Ppm	FR50
Rockefeller	2400	0.006	-----
Parque Lefevre	2400	0.037	7.24
Pueblo Nuevo	2400	0.037	6.21
Río Abajo	2400	0.018	2.95
Juan Díaz	2400	0.012	2.05

CL=Concentración letal; CL95%=Intervalo de confianza 95%; FR=Factor de resistencia:
FR50 ≤ 5 Susceptible; FR50 entre 5 y 10 Resistencia moderada; FR50 > 10 Resistente;
ppm=Partes por millón.

Cuadro 4. Valor de concentración letal media (CL50) y del factor de resistencia (FR50) de larvas de *Ae. albopictus* para el insecticida temefos, según la población de procedencia.

Población	Numero de larvas	CL 50 Ppm	FR50
Rockefeller	2400	0.006	-----
Parque Lefevre	2400	0.036	6
Pueblo Nuevo	2400	0.010	1.69
Río Abajo	2400	0.012	2.05
Juan Díaz	2400	0.018	3

CL=Concentración letal; CL95%=Intervalo de confianza 95%; FR=Factor de resistencia: FR50 ≤ 5 Susceptible; FR50 entre 5 y 10 Resistencia moderada; FR50 > 10 Resistente; ppm=Partes por millón.

4.2. Bioensayos de susceptibilidad y resistencia en mosquitos adultos

Todas las poblaciones y especies de *Aedes* evaluadas registraron sensibilidad a los insecticidas piretroides con tasas de mortalidad del 100%. Las poblaciones de *Ae. albopictus* resultaron completamente susceptible al carbamato (Propoxur), mientras que las poblaciones de *Ae. aegypti* de Parque Lefevre y Pueblo Nuevo mostraron resistencia a este insecticida (Cuadro 5). En dos poblaciones de la especie *Ae. aegypti* se observó un nivel de resistencia elevado al pirimifosmetil con tasas de mortalidad de entre 50 y 52.3%, respectivamente, y bajo nivel de resistencia al fenitrotión y malatión (Cuadro 5). La tasa de mortalidad de los controles fue de 0%. Por otro lado, los bioensayos con

fenitrotión, malatión, clorpirifos, y pirimifosmetil demostraron que todas las poblaciones de *Ae. albopictus* de nuestro estudio son susceptibles a este insecticida (Cuadro 6).

Cuadro 5. Tasa de mortalidad de mosquitos adultos de la especie *Ae. aegypti*, según la localidad de procedencia, 24 h después de la exposición a los insecticidas.

Insecticida		% de mortalidad			
		Parque Lefevre	Pueblo Nuevo	Río Abajo	Juan Díaz
Piretroides	Lambdacihalotrina	100 (S)	100 (S)	100 (S)	100 (S)
	Deltametrina	100 (S)	100 (S)	100 (S)	100 (S)
Carbamato	Propoxur	84 (R)	86.3(R)	100 (S)	100 (S)
Organofosforados	Fenitrotión	93(R)	91.3(R)	99.5 (S)	100 (S)
	Malatión	91.5(R)	98.8 (S)	100 (S)	100 (S)
	Clorpirifos	100 (S)	100 (S)	99.5 (S)	100 (S)
	Pirimifosmetil	50 (R)	52.3(R)	100 (S)	100 (S)

Cada porcentaje corresponde al promedio de cuatro repeticiones, cada una con cuatro réplicas. Número de mosquitos expuesto 400 por insecticida para cada localidad. S=susceptible; R=resistente.

Cuadro 6. Tasas de mortalidad de mosquitos adultos de la especie *Ae. albopictus*, según la localidad de procedencia, 24 h después de la exposición a los insecticidas.

Insecticida		% de mortalidad			
		Parque Lefevre	Pueblo Nuevo	Río Abajo	Juan Díaz
Piretroides	Lambdacihalotrina	100 (S)	100 (S)	100 (S)	100 (S)
	Deltametrina	100 (S)	100 (S)	100 (S)	100 (S)
Carbamato	Propoxur	100 (S)	100 (S)	100 (S)	100 (S)
Organofosforados	Fenitrotión	99.8 (S)	100 (S)	100 (S)	100 (S)
	Malatión	100 (S)	100 (S)	100 (S)	100 (S)
	Clorpirifos	100 (S)	100 (S)	100 (S)	100 (S)
	Pirimifosmetil	100 (S)	100 (S)	100 (S)	100 (S)

Cada porcentaje corresponde al promedio de cuatro repeticiones, cada una con cuatro réplicas. Número de mosquitos expuesto 400 por insecticida para cada localidad. S=susceptible; R=resistente.

4.3. Ensayos bioquímicos

Alfa y Beta-esterasas

Con relación a la cepa de referencia Rockefeller, las poblaciones de *Ae. aegypti* de Parque Lefevre ($U = 667$, $p < 0.0002$) y Pueblo Nuevo ($U = 647$, $p < 0.0001$) y la población de *Ae. albopictus* de Parque Lefevre ($U = 301$, $p < 0.02812$) mostraron niveles de actividades de la α -esterasa significativamente más altos. Encontrando el 26.7%,

53.3% y 26.7% respectivamente de los individuos por encima del umbral de la cepa de referencia (Figuras 10A y 11A; Cuadros 7 y 8).

En comparación con la cepa Rockefeller la actividad enzimática de la β -esterasa fue significativamente mayor en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Parque Lefevre (U = 613, p <0.0001) y Pueblo Nuevo (U = 650.50, p <0.0001) y la población de *Ae. albopictus* de Parque Lefevre (U = 640, p <0.0001), encontrando el 26.7%, 53.3 % y 56.7% de los individuos ubicados por encima del umbral de la cepa de referencia (Figuras 10B y 11B; Cuadros 7 y 8).

El resto de las poblaciones de *Aedes* no mostraron niveles de alteración de las actividades de la Alfa y Beta-esterasas en comparación con la cepa Rockefeller (Figuras 10A, 10B, 11A y 11B; Cuadros 7 y 8).

Glutación S-transferasa

En comparación con la cepa Rockefeller la actividad enzimática de la glutación-S-transferasa fue significativamente mayor en las poblaciones de *Ae. aegypti* de Parque Lefevre (U = 564, P <0.0001) y Pueblo Nuevo (U = 764, P <0.0256), correlacionándose con valores superiores al umbral de la cepa de referencia en 43.3% y 26.7%, respectivamente (Figura 10C; Cuadro 7 y 8).

El resto de las poblaciones de *Aedes* no mostraron niveles de alteración de las actividades de glutación-S-transferasa en comparación con la cepa Rockefeller (Figuras 10C y 11C; Cuadros 7 y 8).

AchE insensible

No se encontró ninguna alteración de la AchE insensible en las poblaciones de *Aedes* evaluadas (Figuras 10D y 11D; Cuadros 7 y 8).

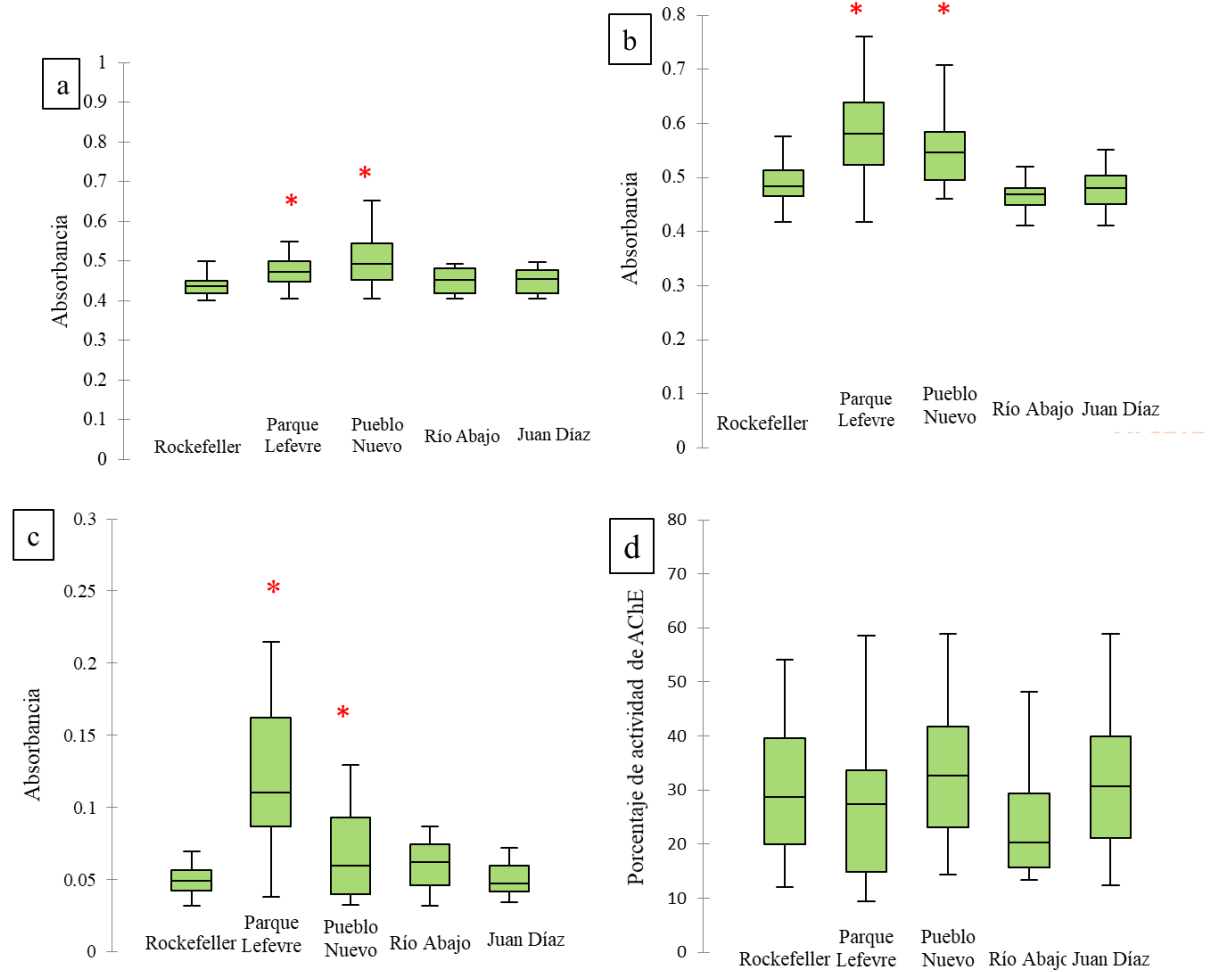


Figura 10. Perfiles de actividad enzimática en *Ae. aegypti*. A. α -esterasas. B. y β -esterasas. C. Glutathione S-transferasas. D. Acetilcolinesterasa. Los asteriscos indican un

aumento significativo en las poblaciones silvestres en comparación con los valores de cepa susceptible Rockefeller ($P < 0.05$, pruebas de Mann-Whitney).

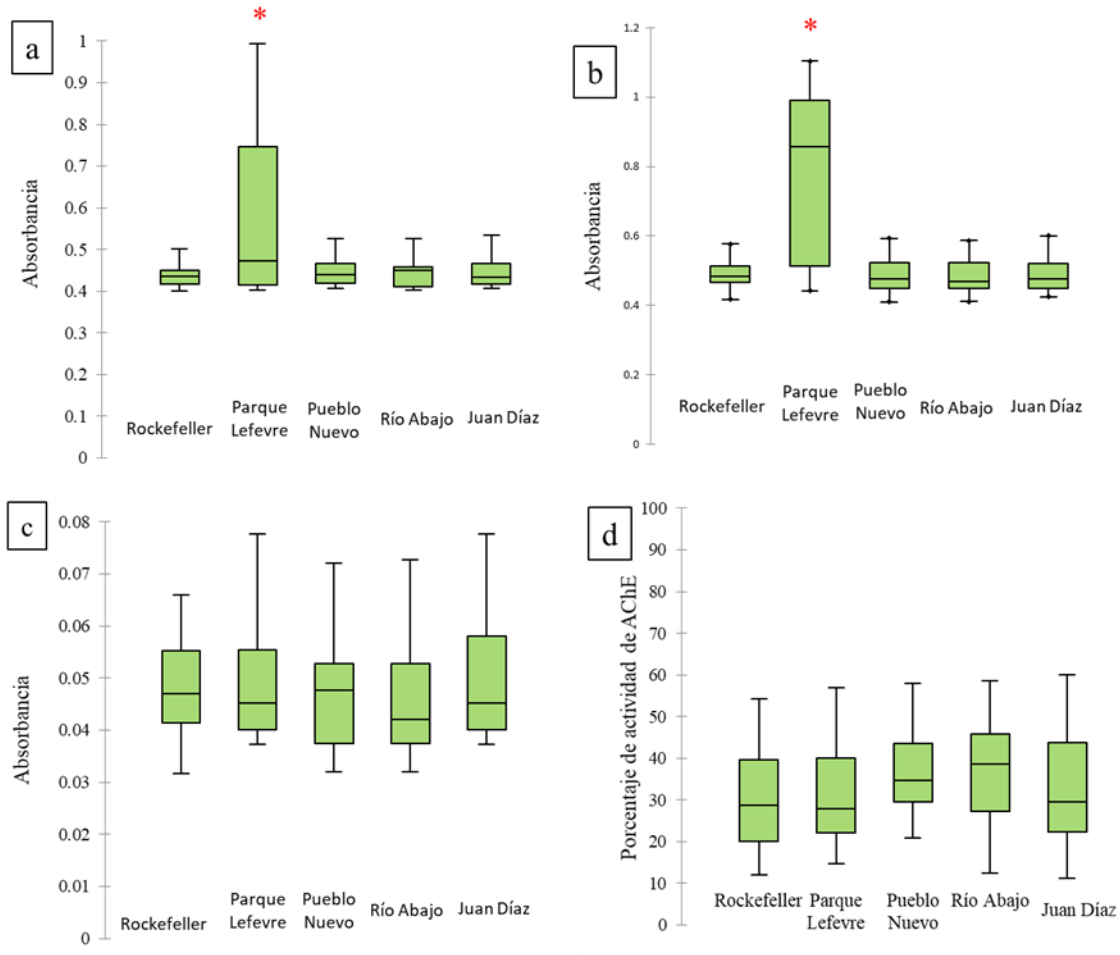


Figura 11. Perfiles de actividad enzimática en *Ae. albopictus*. A. α -esterasas. B. y β -esterasas. C. Glutathion S-transferasas. D. Acetilcolinesterasa. Los asteriscos indican un

aumento significativo en las poblaciones silvestres en comparación con los valores de cepa susceptible Rockefeller ($P < 0.05$, pruebas de Mann-Whitney).

Cuadro 7. Porcentaje de individuos de *Ae. aegypti* con actividad enzimática por encima del umbral de los valores de absorbancia de la cepa de referencia Rockefeller.

Población	α - esterasas	β - esterasas	GST	AChE
Parque lefevre	26.7	53.3	43.3	4.6
Pueblo Nuevo	43.3	26.7	26.7	3.3
Río Abajo	6.6	3.3	10	0
Juan Díaz	3.3	3.3	3.3	3.3

N=30 por enzima evaluada en cada población a excepción de la AChE (N=27).

0-15	No alterado
15-50	Alterado
50-100	Altamente alterado

Cuadro 8. Porcentaje de individuos de *Ae. albopictus* con actividad enzimática por encima del umbral de los valores de absorbancia de la cepa de referencia Rockefeller.

Población	α- esterasas	β- esterasas	GST	AchE
Parque lefevre	26.7	56.7	7.4	11.5
Pueblo Nuevo	13.3	6.7	3.7	7.6
Río Abajo	6.7	3.3	0	0
Juan Díaz	13.3	10	11.1	13.33

N=30 por enzima evaluada en cada población a excepción de la AChE (N=27).

0-15	No alterado
15-50	Alterado
50-100	Altamente alterado

DISCUSIÓN

5.1. Bioensayos de susceptibilidad y/o resistencia en larvas

En el estudio actual, evaluamos la resistencia al temefos de cuatro poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, que mostraron diferentes patrones de resistencia. Los bioensayos larvales con temefos indicaron resistencia moderada en las muestras de *Ae. aegypti* de Parque Lefevre y Pueblo Nuevo y *Ae. albopictus* de Parque Lefevre. Estos resultados concuerdan con un estudio previo en 2007, que identificó alta resistencia al temefos en las poblaciones de *Ae. aegypti* de la 24 de Diciembre (Panamá), con altos índices de infestación a pesar de la medidas de control (Rodríguez et al., 2007; Cáceres, 2013). Posiblemente la resistencia observada a este insecticida se puede deber a la presión ejercida por temefos en estos sitios al existir un registro histórico de alta densidad de formas inmaduras del vector. Desde 1985 el temefos es un larvicida adoptado por los servicios de salud pública para el control de *Ae. aegypti* en Panamá y durante el período 2014-2019 fue el larvicida más utilizado en el área de estudio. El uso de temefos para el control químico de larvas de mosquitos por largos periodos de tiempo constituye un proceso de selección de individuos resistentes, por lo cual es inminente el aumento de niveles de resistencia a este larvicida (Ferreira et al., 2016). Los resultados de este estudio son similares a los obtenidos en países de Latinoamérica donde el temefos es usado comúnmente para el control larvario de *Ae. aegypti* en Cuba (Bisset et al., 2004), México (Cruz-Gallardo et al., 2014), El Salvador (Bisset et al., 2009; Lazcano et al., 2009), Costa Rica (Bisset et al., 2013; Calderón Arguedas et al., 2018), Colombia (Ocampo et al.,

2011, Santacoloma et al., 2012, Grisales et al., 2013), Venezuela (Bisset et al., 2001), Bolivia (Biber et al., 2006), Brasil (Araújo et al., 2013, Gambarra et al., 2013, Bellinato et al., 2016, Garcia et al., 2018), Argentina (Llinas et al., 2010) y Trinidad (Polson et al. 2011).

5.2. Bioensayos de susceptibilidad o resistencia en mosquitos adultos

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los insecticidas piretroides mostraron que ambas especies de *Aedes* son susceptibles a la deltametrina y lambdacihalotrina, en las cuatro localidades evaluadas. Dos estudios similares se han realizado en poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de 10 sitios con altos índices de infestación y presencia de casos de dengue en Panamá, resultando en más del 97% de mortalidad frente a lambdacihalotrina y deltametrina, excepto por la resistencia moderada en larvas a deltametrina, documentada en Chitre, en Azuero (Bisset et al., 2003; Cáceres, 2013; Cáceres et al., 2013). Estudios previos informan susceptibilidad del *Ae. albopictus* a los piretroides (deltametrina y lambdacihalotrina) en todo el mundo (Sharma et al., 2004; Chan et al., 2011; Chuaycharoensuk et al., 2011; Vontas et al., 2012; Chen et al., 2013; Marcombe et al., 2014; Kushwah et al., 2015; Junaid et al., 2017; Moyes et al., 2017). Estos resultados sugieren que las poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* evaluadas son susceptibles a estos dos insecticidas, por lo tanto, estos insecticidas pueden seguir siendo utilizados en el área de estudio, mediante la rotación con otros insecticidas a fin de prevenir, el desarrollo futuro de resistencia en las poblaciones de insectos vectores de Panamá.

Las poblaciones de *Ae. aegypti* de Parque Lefevre y Pueblo nuevo presentaron elevados niveles de resistencia al carbamato propoxur. El uso de este insecticida contra los mosquitos del *Aedes* es limitado, de hecho, el programa de control de vectores discontinuó su aplicación en el país desde 1990. Estos resultados difieren de los publicados por Cáceres et al. (2013), quienes reportaron el 98% de eficacia de este insecticida para ocho poblaciones de *Ae. aegypti* a nivel nacional. Posiblemente la resistencia observada a este insecticida se deba a la exposición accidental al propoxur (herramientas de control de plagas en el hogar) o al fenómeno de resistencia cruzada a otros insecticidas. La resistencia cruzada entre los carbamatos y organofosforados se ha reportado en poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de la India (Bharati y Saha, 2018).

Los individuos de las colonias de *Ae. aegypti* proveniente de Parque Lefevre y Pueblo Nuevo mostraron un bajo nivel de resistencia al fenitrotión, pero un elevado grado de resistencia al pirimifosmetil. Por otro lado, los individuos de *Ae. aegypti* colectados en Parque Lefevre mostraron niveles bajos de resistencia al malatión.

Estudios previos en los barrios Victoriano Lorenzo, Río Abajo y la 24 de Diciembre han reportado grados altos de resistencia al pirimifosmetil en *Ae. aegypti* (Bisset et al., 2003; Rodríguez et al., 2007; Cáceres, 2013). La resistencia a pirimifosmetil observada en las cepas evaluadas no responde al uso por los programas de control de *Aedes*, ya que son

insecticidas poco utilizados por salud pública. El pirimifosmetil se utiliza fundamentalmente para el control de plagas de granos almacenados (Cáceres, 2013). Estos resultados sugieren un tipo de resistencia cruzada entre el pirimifosmetil y el temefós, y apoyan los resultados de estudios realizados anteriormente en Cuba y Colombia donde existen algunos reportes de dicha resistencia entre estos dos organofosforados (Rodríguez et al., 1999; Conde et al., 2015). Nuestros resultados destacan la importancia de monitorear la susceptibilidad de las poblaciones de vectores a un amplio espectro de insecticidas, ya que las presiones selectivas para la resistencia a los insecticidas pueden no siempre originarse en intervenciones de salud pública (Pinto et al., 2019).

Estudios similares han indicado que el temefos ha conferido resistencia cruzada a los organofosforados. Rodríguez et al. (2002) observaron que el temefos causó resistencia cruzada al malatión y fenitrotión en poblaciones de *Ae. aegypti* de Cuba. Además de esto, la resistencia cruzada entre el temefos y el organofosforado malatión fue comprobada en condiciones controladas de laboratorio (Melo-Santos et al., 2009). Estudios de resistencia cruzada en poblaciones de *Ae. aegypti* de la India mostraron un grado variado de resistencia cruzada entre el fenitrotión, clorpirifos, y malatión, lo cual es compatible con nuestras observaciones (Tikar et al., 2009).

A pesar de que *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* coexisten en las mismas áreas de estudio desde el 2004, fueron colectadas en los mismos criaderos y están sometidas a los mismos regímenes de insecticidas, respondieron de manera diferente en el perfil de resistencia a

los insecticidas organofosforados y carbamatos en las poblaciones de Parque Lefevre y Pueblo Nuevo con registro de resistencia en *Ae. aegypti* mientras que *Ae. albopictus* en su mayoría es totalmente susceptible a excepción de la resistencia moderada observada para el temefos en la población de Parque Lefevre. Son relativamente pocos los registros hasta el presente a nivel mundial sobre la detección de la resistencia en poblaciones de *Ae. albopictus*, en comparación con trabajos realizados con poblaciones de *Ae. aegypti*, posiblemente debido a la exposición reducida de esta especie más exofílica a los insecticidas, particularmente a aquellos que se dirigen a la etapa adulta (Chen et al., 2005; Vontas et al., 2012; Moyes et al., 2017).

Estos resultados llegan a coincidir en cuanto a las diferencias en el grado de resistencia entre *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* en trabajos previos en Panamá. Un estudio llevado a cabo para evaluar mutaciones kdr, fue posible detectar mutaciones kdr en *Ae. aegypti* mientras que para *Ae. albopictus* no se detectó. Los investigadores sugirieron que las poblaciones de *Ae. albopictus* en Panamá son relativamente recientes en comparación con *Ae. aegypti*, por lo tanto, el control químico con insecticidas no ha ejercido presión sobre las poblaciones de este vector (Murcia et al., 2019).

Es conocido que la resistencia se ha manifestado lentamente en algunas especies y más rápidamente en otras. Aún en la misma especie, bajo ciertas condiciones, la resistencia se desarrolla rápidamente, mientras que bajo otras situaciones la resistencia evoluciona lentamente o no se manifiesta. Esto ocurre en especies diferentes y en las mismas

especies sometidas a distintas intensidades de aplicación de insecticidas (Georghiou et al., 1973).

5.3. Ensayos bioquímicos

La evaluación de la resistencia metabólica se logró con pruebas bioquímicas que cuantificaron la actividad de las principales clases de enzimas desintoxicantes. El análisis de las actividades de enzimas de desintoxicación indicó la presencia de resistencia metabólica. Se encontró alta actividad enzimática de las esterasas en dos poblaciones de *Ae. aegypti* (Parque Lefevre y Pueblo Nuevo) y una de *Ae. albopictus* (Pueblo Nuevo), con asociación clara con resistencia a los organofosforados temefos, fenitrotión, malatión, pirimifosmetil y al carbamato propoxur. Las esterasas no se alteraron en las poblaciones de Río Abajo y Juan Díaz, lo que era consistente con su susceptibilidad a todos los insecticidas evaluados. Además, se observaron cambios en la actividad enzimática de la GST en dos de las poblaciones de *Ae. aegypti* evaluadas, indicando que la GST también están involucrada en la resistencia observada a los organofosforados. En Panamá el incremento de las esterasas y GST, se evidenció previamente en la localidad de la 24 de Diciembre y se asoció con la resistencia al temefos y pirimifosmetil (Cáceres, 2013).

En los mosquitos (Diptera: Culicidae), las esterasas elevadas es el mecanismo principal para la resistencia a los insecticidas organofosforados (Saelim et al., 2005). Muchos informes han indicado que la resistencia a los organofosforados se atribuye a la alteración de las esterasas. En América Latina, las poblaciones de *Ae. aegypti* de Cuba presentaron

alta resistencia a temefos y fenitrotión, se atribuyó a la elevada frecuencia las enzimas glutation-S-transferasa (GST) y esterasas (Bisset et al., 2001; Rodriguez et al., 2004). Poblaciones de *Ae. aegypti* en Brasil, con los niveles más altos de actividad alfa y beta esterasas, fueron aquellas que mostraron relaciones de resistencia más altas a los organofosforados (Macoris et al., 2003). Estudios recientes en Brasil asociaron a las α -esterasas con los patrones de resistencia elevados para temefos (Araújo; 2019). Afirmaciones similares se han hecho en las poblaciones de *Ae. aegypti* de México (López et al., 2014), Venezuela (Mazarri y Georghiou 1995), Peru (Vargas et al., 2006; Bisset et al., 2007), Trinidad (Vaughan et al. 1998). Las esterasas también han sido reportadas, en la resistencia a los organofosforados, en poblaciones de *Ae. aegypti* Asia y en *Ae. albopictus* de Europa y los Estados Unidos (Saelim et al., 2005; Montella et al. 2007; Moyes et al., 2017).

Las pruebas bioquímicas confirman que la resistencia observada al carbamato propoxur y los organofosforados pirimifosmetil, fenitrotión y malatión en Parque Lefevre y Pueblo Nuevo, podrían ser el resultado de la resistencia cruzada debido a una elevada actividad de las esterasas, la cual confiere resistencia entre estos insecticidas. Los organofosforados y los carbamatos tienen los mismos modos de acción (Saelim et al., 2005; Reis-Montella et al., 2012; Bharati y Saha, 2018). La resistencia a uno generalmente denota resistencia en el otro (Magaret y George, 1999; Saelim et al., 2005; Bharati y Saha, 2018).

A través de este estudio se ha logrado detectar que las EST y GST juegan un papel importante en el desarrollo de la resistencia observada a los organofosforados y carbamatos. Se encontraron asociaciones significativas entre los fenotipos de resistencia a los insecticidas a nivel de población y la actividad alterada de las enzimas desintoxicantes. La baja frecuencia de la actividad de la AChE en el presente estudio mostró que este mecanismo no estaba involucrado.

CONCLUSIONES

Todas las poblaciones de *Ae. aegypti* y de *Ae. albopictus* evaluadas resultaron susceptibles a los insecticidas piretroides deltametrina y lambdacihalotrina. Por lo tanto, estos insecticidas pueden seguir siendo utilizados, mediante la rotación con otros insecticidas a fin de prevenir, el desarrollo futuro de resistencia en las poblaciones de insectos vectores.

Dos poblaciones de *Ae. aegypti* mostraron resistencia al carbamato propoxur, identificando además resistencia cruzada entre carbamatos y organofosforados. Esto ocurre a pesar de que el propoxur fue discontinuado en Panamá hace aproximadamente 30 años.

Las poblaciones de *Ae. aegypti* de Parque Lefevre y Pueblo Nuevo registraron elevados niveles de resistencia al organofosforado pirimifosmetil, moderada al temefos y baja a los insecticidas fenitrotión y malatión. La población de *Ae. albopictus* proveniente de Parque Lefevre registró niveles de resistencia moderada al temefos.

Los mecanismos de acción metabólica de EST y GST jugaron un papel importante en la resistencia a insecticidas en poblaciones evaluadas, no así la AChE. Se asoció la EST, como principal mecanismo de resistencia a los organofosforados temefos, fenitrotión,

malatión y pirimifosmetil y al carbamato propoxur en las poblaciones de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* evaluadas.

Estos resultados constituyen una referencia para el inicio de estudios en áreas con bajos casos de dengue, niveles de infestación y poco uso de insecticidas dada la propensión de estas especies de *Aedes* a invadir y establecerse en cualquier área del país, donde pueden intercambiar alelos que confieren resistencia a los insecticidas.

La detección temprana de la resistencia permite establecer medidas de manejo antes de perder el control. Es necesario comprender qué insecticidas alternativos serían más efectivos para el control de *Ae. aegypti* y *Ae. Albopictus* y cómo la resistencia que ya se ha detectado se puede manejar de manera efectiva en Panamá.

RECOMENDACIONES

Estos resultados constituyen una referencia para el inicio de estudios en áreas con bajos casos de dengue, niveles de infestación y poco uso de insecticidas, dada la propensión de estas especies de *Aedes* a invadir y establecerse en cualquier área del país, donde pueden intercambiar alelos que confieren resistencia a los insecticidas. La detección temprana de la resistencia permite establecer medidas de manejo antes de perder el control.

Es necesario comprender qué insecticidas alternativos serían más efectivos para el control de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Los resultados de este estudio destacan la importancia de monitorear la susceptibilidad de las poblaciones de vectores a un amplio espectro de insecticidas, ya que las presiones selectivas para la resistencia a los insecticidas pueden no siempre originarse en intervenciones de salud pública.

El hallazgo de resistencia moderada al temefos demandan que el Ministerio de Salud realicen un manejo eficaz de este insecticida mediante la utilización moderada o suspender el uso del este larvicida e implementar otras alternativas de control larval como *Bacillus thuringiensis var israelensis*, los reguladores de crecimiento (IGR) Diflubenzuron y Piriproxifen o reevaluar las estrategias de control mediante rotación de insecticidas o mezclas de los mismos, con el fin de con la posibilidad de reducir los niveles de resistencia.

Dado que la resistencia metabólica no es el único mecanismo que confiere resistencia a los piretroides, se debe estudiar el papel del mecanismo de resistencia knock down resistance.

Implementar un programa permanente de vigilancia y monitoreo de la resistencia en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* a los insecticidas en uso y alternos por parte del Departamento de Control de Vectores del MINSA. Es importante, mantener la colaboración con centros de investigación, con el objetivo de realizar estudios para conocer el estado de la resistencia, sus mecanismos bioquímicos y genéticos en poblaciones de *Aedes*.

BIBLIOGRAFÍA

- ALPHEY, L., MCKEMEY, A., NIMMO, D., NEIRA OVIEDO, M., LACROIX, R. y MATZEN, K. 2013. Genetic control of *Aedes* mosquitoes. *Pathogens and Global Health*. 107(4): 170–9
- AMELIA-YAP, Z.H., CHEN, C.D., SOFIAN-AZIRUN, M. y LOW, V.L. 2018. Pyrethroid resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southeast Asia: present situation and prospects for management. *Parasit Vectors*. 11(1): 332. doi: 10.1186/s13071-018-2899-0
- ARAÚJO, A.P., ARAUJO DINIZ, D.F., HELVECIO, E., DE BARROS, R.A., DE OLIVEIRA, C.M., AYRES, C.F., DE MELO-SANTOS, M.A., REGIS, L.N. y SILVA-FILHA, H. 2013. The susceptibility of *Aedes aegypti* populations displaying temephos resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis*: a basis for management. *Parasit. Vectors*. 6: 297
- ARAÚJO, A.P., PAIVA, M.H.S., CABRAL, A.M., CAVALCANTI, A.E.H.D., PESSOA L.F.F., DINIZ, D.F.A., HELVECIO, E., DA SILVA, E.V.G., DA SILVA, N.M., ANASTÁCIO, D.B., PONTES, C., NUNES, V., DE SOUZA, M.F.M., MAGALHÃES, F.J.R., DE MELO SANTOS, A.V. y AYRES, C.F.J. 2019. Screening *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations from Pernambuco, Brazil for Resistance to Temephos, Diflubenzuron, and Cypermethrin and Characterization of Potential Resistance Mechanisms. *J Insect Sci*. 19(3). pii: 16. doi: 10.1093/jisesa/iez054
- ARMIEN, B., SUAYA, J.A., QUIROZ, E., SAH, B.K., BAYARD, V., MARCHENA, L., CAMPOS, C. y SHEPARD, D.S. 2008. Clinical characteristics and national economic cost of the 2005 dengue epidemic in Panama. *Am J Trop Med Hyg* 79: 364–371
- ARREDONDO-GARCÍA, J.L., MÉNDEZ-HERRERA, A. y MEDINA-CORTINA, H. 2016. Arbovirus en Latinoamérica. *Acta Pediatr Mex*. 37(2): 111-131
- AUTERI, M., LA RUSSA, F., BLANDA, V. y TORINA, A. 2018. Insecticide Resistance Associated with *kdr* Mutations in *Aedes albopictus*: An Update on Worldwide Evidences. *BioMed Research International*. ID 3098575 <https://doi.org/10.1155/2018/3098575>
- BADII, M.H. y GARZA, V. 2007. Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. *CULCYT*, 4(18): 9-25
- BANGS, M.J. y FOCKS, D.A. 2006. Abridged Pupa Identification Key to the Common Container Breeding Mosquitoes in Urban Southeast Asia. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 22(3): 565-572
- BELLINATO, D.F., VIANA-MEDEIROS, P.F., ARAÚJO, S.C., MARTINS, A. J.J., LIMA, B. y Valle, D. 2016. Resistance status to the insecticides temephos, deltamethrin, and diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* populations. *Biomed Res. Int*. 8603263
- BENEDICT, M.Q., LEVINE, R.S., HAWLEY, W.A. y LOUNIBO, L.P. 2007. Spread of the Tiger: Global Risk of Invasion by the Mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 7(1): 76–85

- BERTI, J.A., MANZO, D., RAMOS, M. y GUERRA, L.A. 2013. Eficacia y actividad residual del regulador de crecimiento pyriproxyfen sobre larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio. *Bol Malariol Salud Amb.* 53:56–64.
- BHARATI, M. y SAHA, D. 2018. Multiple insecticide resistance mechanisms in primary dengue vector, *Aedes aegypti* (Linn.) from dengue endemic districts of sub-Himalayan West Bengal, India. *PLoS One.* 10:13(9):e0203207. doi: 10.1371/journal.pone.0203207. eCollection 2018
- BIBER, P.A., DUEÑAS, J.R., ALMEIDA, F.L., GARDENAL, C.N. y ALMIRÓN, W.R. 2006. Laboratory evaluation of susceptibility of natural subpopulations of *Aedes aegypti* larvae to temephos. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22: 408–411
- BISSET J.A. 2002. Uso correcto de insecticidas: Control de la resistencia. *Revista Cubana Medicina Tropical* 54 (3): 202-219.
- BISSET, J.A., MARÍN, R., RODRÍGUEZ, M.M., SEVERSON, D.W., RICARDO, Y., FRENCH, L., DÍAZ, M. y PÉREZ, O. 2013. Insecticide resistance in two *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strains from Costa Rica. *J. Med. Entomol.* 50: 352–361
- BISSET, J.A., RODRÍGUEZ, M.M., DARJANIVA, M., DÍAZ, C. y SOCA, L.A. 2001. Esterasas elevadas como mecanismo de Resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Aedes aegypti*. *Rev Cubana Med Trop.* 53(1): 37-43
- BISSET, J.A., RODRIGUEZ, M.M. y CACERES, L. 2003. Levels of resistance to insecticides and their mechanisms in 2 strains of *Aedes aegypti* from Panamá. *Rev Cubana Med Trop.* 55: 191-5
- BISSET, J.A., RODRÍGUEZ, M.M., SAN MARTÍN, J.L., ROMERO J.E. y MONTOYA, R. 2009. Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de *Aedes aegypti* de El Salvador. *Revista Panamericana Salud Pública.* 26: 229-34. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892009000900007>
- BISSET, J.A., RODRÍGUEZ, M.M., FRENCH, L., SEVERSON, D.W., GUTIÉRREZ G., HURTADO, D. y FUENTES, I. 2014. Resistencia a los insecticidas y mecanismos metabólicos involucrados en las etapas larvianas y adultas de cepas de referencia resistentes a los insecticidas de Cuba de *Aedes aegypti*. *Journal de la American Mosquito Control Association.* 30(4): 298-304
- BISSET, J.A., RODRÍGUEZ, M.M., RICARDO, Y., RANSON, H., PÉREZ, O., MOYA, M. y VÁZQUEZ, A. 2011. Temephos resistance and esterase activity in the mosquito *Aedes aegypti* in Havana, Cuba increased dramatically between 2006 and 2008. *Med Vet Entomol.* (3): 233-9. doi: 10.1111/j.1365-2915.2011.00959.x
- BRADSHAW, C.J., LEROY, B., BELLARD, C., ROIZ, D., ALBERT, C., FOURNIER, A., BARBET-MASSIN, M., SALLES, J.M., SIMARD, F. y COURCHAMP, F. 2016. Massive yet grossly underestimated global costs of invasive insects. *Nature Communications.* 4: 7:12986. doi: 10.1038/ncomms12986
- BRENGUES, C., HAWKES, N., CHANDRE, F., MCCARROLL, L. y DUCHON, S. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology.* 17: 87–94
- BROWN, J.E., EVANS, B.R., ZHENG, W., OBAS, V., BARRERA-MARTINEZ, L., EGIZI, A., ZHAO, H., CACCONE, A. y POWELL, J.P. 2014. Human impacts have

- shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution* (N. Y). 68, 514–25
- CÁCERES, L. 2013. Determinación de la Resistencia a Insecticidas y sus Mecanismos en Poblaciones de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) en Algunos Países América Central. Tesis de Doctorado. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Cuba. 118 págs.
- CÁCERES, L., ROVIRA, J., GARCÍA, A., TORRES, R. y., DE LA CRUZ, M. 2013. Determinación de la sensibilidad a insecticidas organofosforados, carbamato y piretroides en poblaciones de *Aedes aegypti* Linneaus, 1762 (Díptera: Culicidae) de Panamá. *Biomédica*. 33: 70-81
- CALDERÓN-ARGUEDAS, O., VARGAS, K. y TROYO RODRÍGUEZ, A. 2018. Resistencia a insecticidas en cepas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de tres distritos de la Región Pacífico Central de Costa Rica. *Rev Cubana Med Trop*. 70(3): 1-7
- CARNEIRO, M.A., ALVES, B.D., GEHRKE, F.S., DOMINGUES, J.N., SÁ, N., PAIXÃO, S., FIGUEIREDO, J., FERREIRA, A., ALMEIDA, C., MACHI, A., SAVÓIA, E., NASCIMENTO, V. y FONSECA, F. 2017. Environmental factors can influence dengue reported cases. *Rev Assoc Med Bras*. 63(11): 957-961. doi: 10.1590/1806-9282.63.11.957
- CARRERA, J.P., DÍAZ, Y., DENIS, B., BARAHONA DE MOSCA, I., RODRIGUEZ, D., CEDEÑO, I., ARAUZ, D., GONZÁLEZ, P., CERESO, L., MORENO, L., GARCÍA, L., SÁENZ, L., ATENCIO, M.A., ROJAS-FERMIN, E., VIZCAINO, F., PEREZ, N., MORENO, B., LÓPEZ-VERGÈS, S., VALDERRAMA, A. y ARMIÉN, B. 2017. Unusual pattern of chikungunya virus epidemic in the Americas, the Panamanian experience. *PLoS Negl Trop Dis* 11(2): e0005338.doi:10.1371/ journal.pntd.0005338
- CHAMBERLAIN, P. y CURRY, D.P. 1926. Report of the Health Department of the Canal for the Calendar Year 1925 (Canal Zone: Panama Canal Press, 1926), 32pags.
- CHAN, H.H., MUSTAFA, F.W. y ZAIRI, J. 2011. Assessing the susceptibility status of *Aedes albopictus* on Penang Island using two different assays. *Tropical Biomedicine* 28: 464-470
- CHEE, D.C., VAN, L.L., KOON, W.L., HAN, L.L., WASI, A.N., CHONG, C.H., ABDUL, A.A. y MOHD, S.S. 2013. First Report on Adulticide Susceptibility Status of *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, and *Culex vishnui* from a Pig Farm in Tanjung Sepat, Selangor, Malaysia," *Journal of the American Mosquito Control Association* 29(3), 243-250. <https://doi.org/10.2987/12-6287R.1>
- CHEN, C.D., NAZNI, W.A., LEE, H.L. y SOFIAN-AZIRUN, M. 2005. Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to temephos in four study sites in Kuala Lumpur City Center and Selangor State, Malaysia. *Trop Biomed*. 22(2):207-16
- CHUAYCHAROENSUK, T., JUNTARAJUMNONG, W., BOONYUAN, W., BANGS, M.J. y AKRATANAKUL, T. 2011. Frequency of pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Journal of Vector Ecology* 36: 204-212
- CONDE, M., ORJUELA, L.I., CASTELLANOS, C.A., HERRERA-VARELA, M., LICASTRO, S. y QUIÑONES, M.L. 2015. Insecticide susceptibility evaluation in

- Aedes aegypti* populations of Caldas, Colombia, in 2007 and 2011. *Biomédica*. 35:43-52. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2367>
- CORBEL, V., ACHEE, N.L., CHANDRE, F., COULIBALY, M.B., DUSFOUR, I., FONSECA, D., GRIECO, J., JUNTARAJUMNONG, W., LENHART, A., MARTINS, A.J., MOYES, C., NG, L.C., PINTO, J. RAGHAVENDRA, K., VATANDOOST, H., VONTAS, J., WEETMAN, D., FOUQUE, F., VELAYUDHAN, R y JEAN-PHILIPPE, D. 2016. Tracking insecticide resistance in mosquito vectors of arboviruses: the Worldwide Insecticide resistance Network (WIN). *PLoS Negl Trop Dis*.10: e0005054. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005054> PMID: 27906961
- CORBEL, V. y N'GUESSAN, R. 2013. Distribution, Mechanisms, Impact and Management of Insecticide Resistance in Malaria Vectors: A Pragmatic Review, *Anopheles* mosquitoes. New insights into malaria vectors, Sylvie Manguin, IntechOpen, DOI: 10.5772/56117
- CORTE, R., DANTAS, V.A., DOLABELLA, S.S, y MARTEIS, L.S. 2018. Variation in temephos resistance in field populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the State of Sergipe, Northeast Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51(3), 284-290. <https://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0449-2017>
- COURTNEY, K. 1950. Report on the Recent Outbreak of Jungle Yellow Fever in Panama *American Journal of Public Health and the Nation's Health* 40(4) 417-426 <https://doi.org/10.2105/AJPH.404.417>
- CRUZ-GALLARDO, C.M., RODRÍGUEZ-PÉREZ, C. y OCAÑA-ZURITA, F.J. 2014. Susceptibilidad y resistencia a insecticida en mosquito transmisor del dengue. *Salud en Tabasco*. 20(2): 54-59
- DARLING, S.T. 1910. Studies in relation to malaria. Mt. Hope, C.Z; I.C.C. Press. 42 págs.
- DARLING, S.T. 1912. A Mosquito Larvacide-Disinfectant and the Methods of its Standardization. *American Jour. of Pub. Health*. 89-93
- DAS, B., GHOSAL, S. y MOHANT, S. 2018. *Aedes*: What Do We Know about Them and What Can They Transmit. *Vectors and Vector-Borne Zoonotic Diseases*, Sara Savić, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.81363.
- DAVIES, T.G.E., FIELD, L.M., USHERWOOD, P.N.R y WILLIAMSON, M.S. 2007. Critical Review DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channel. *IUBMB Life*, 59(3): 151–162
- DEVINE, G.J., DOMINIQUE, E., ELENA, O. y MICHAEL, J.F. 2008. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Rev. perú. med. exp. salud pública*, Lima. 25(1): 74-100
- DIAS-WERMELINGER, E., PACHECO FERREIRA, A., WILSON DE CARVALHO, R., ANSELMO DA SILVA, A. y VILLANOVA BENIGNO. 2015. *Aedes aegypti* eggs oviposited on water surface collected from field ovitraps in Nova Iguaçu City, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48(6): 770-772. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0087-2015S>
- DUTARY, B.E., ROZETTE, J.E. y CAMPOS, C., 1989. Current situation of the *Aedes aegypti* mosquito in the metropolitan area of Panama city. *Rev Med Panama* 14: 67–78.

- ECHEVERS, G. LIMA, M., MIRANDA, F.R. y CALHEIROS, L.B. 1975. Nebulización terrestre con malatión a volumen ultrarreducido (ULV) en Panamá. *Bull Pan Am Health Org.* 78: 405-12
- ESKILDSEN, G.A., ROVIRA, J.R., SMITH, O., MILLER, M.J., BENNETT, K.L., MCMILLAN, W.O. y LOAIZA, J. 2018. Maternal invasion history of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* into the Isthmus of Panamá: implications for the control of emergent viral disease agents. *PLoS Negl Trop Dis* 8(8): e3037. doi:10.1371/journal.pntd.0003037
- ESPINAL, M.A., ANDRUS, J.K., JAUREGUI, B., WATERMAN, S.H., MORENS, D.M., SANTOS, J.I., HORSTICK, O., FRANCIS, L.A. y OLSON, D. 2019. Emerging and Reemerging *Aedes*. Transmitted Arbovirus Infections in the Region of the Americas: Implications for Health Policy. *Am J Public Health.* 109(3): 387-392. doi: 10.2105/AJPH.2018.304849.
- FARAJI, A., EGIZI, A., FONSECA, D.M., UNLU, I., CREPEAU, T., HEALY, S.P. y GAUGLER, R. 2014. Comparative Host Feeding Patterns of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Urban and Suburban Northeastern USA and Implications for Disease Transmission. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(8): e3037. doi: 10.1371/journal.pntd.0003037
- FLORES, A.E., PONCE, G., SILVA, B.G., GUTIERREZ, S.M., BOBADILLA, C., LOPEZ, B., MERCADO, R. y BLACK, W.C. 2013. Wide spread cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Veracruz state Mexico. *J Econ Entomol.* 106 (2):959-69. doi: 10.1603/ec12284. PMID: 23786088; PMCID: PMC3980443.
- FOURNIER, D. 2005. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chem Biol Interact.* 15: 257-61
- FUTAMI, K., VALDERRAMA, A., BALDI, M., MINAKAWA, N., RODRIGUEZ, R.M y CHAVES L.F. 2015. New and common haplotypes shape genetic diversity in asian tiger mosquito populations from Costa Rica and Panama *Journal of Economic Entomology* 108(2) 761-768 <https://doi.org/10.1093/jee/touO28>
- GALLARDO, M.C. 1954. Plan para la erradicación del paludismo en Panamá. *Bulletin de la oficina Sanitaria Panamericana.* 59 págs.
- GALINDO, P. y GALLARDO, M. 1947. Nota preliminar sobre el riesgo residual de DDT en casas para el control de la malaria, *Boletín Higiene y Sanidad.* 51 págs.
- GAMBARRA, W.P., MARTINS, W.F., DE LUCENA FILHO, M.L., DE ALBUQUERQUE, I.M., APOLINÁRIO, O.K. y BESERRA, E.B. 2013. Spatial distribution and esterase activity in populations of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) resistant to temephos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 46: 178–184
- GARCIA, G.A., DAVID, M.R., MARTINS, A., MACIEL-DE-FREITAS, R., LINSS, J.G.B., ARAÚJO, S.C., LIMA, B.P. y VALLE, D. 2018. The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. *PLoS Negl Trop Dis* 12(2): e0006227. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006227>
- GARCIA-SÁNCHEZ, D.C., PINILLA, G.A. y QUINTERO, J. 2017. Ecological characterization of *Aedes aegypti* larval habitats (Diptera: Culicidae) in artificial

- water containers in Girardot, Colombia. *Journal of Vector Ecology*. 42(2): 289-297. doi: 10.1111/jvec.12269
- GATT, P., DEEMING, J.C. y SCHAFFNER, F. 2009. First record of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Malta. *European Mosquito Bulletin*. (27): 56-64
- GEORGHIOU, GP. 1972. The evolution of resistance to pesticides. *Ann Rev Ecol Syst*. 3:133-68
- GEORGHIOU, G.P., BREELAND, S.D. y ARINATNAM, V. 1973. Seasonal escalation of organophosphorous and carbamate resistance in *Anopheles albimanus* by agricultural spray. *Wld. Hlth Org. VBC/IRG/74.26*
- GLORIA-SORIA, A., AYALA, D., BHEECARRY, A., CALDERON-ARGUEDAS, O., CHADEE, D.D., CHIAPPERO, M., COETZEE, M., ELAHEE, K.B., FERNANDEZ-SALAS, I., KAMAL, H.A., BASILE KAMGANG, B., M. KHATER, E.I., KRAEMER, L.D., KRAEMER, V., LOPEZ-SOLIS, A., LUTOMIAH, J., MARTINS, A., MICIELI, M.V., PAUPY, C., PONLAWAT, A., RAHOLA, N., RASHEED, S.B., RICHARDSON, J.B., SALEH, A.A., SANCHEZ-CASAS, R.M., SEIXAS, G., SOUSA, C.A., TABACHNICK, W.J., TROYO, A. y POWELL, J.R. 2016. Global genetic diversity of *Aedes aegypti*. *Mol. Ecol*. 25, 5377–539
- GOKHALE, M.D, JACOB, P.G. y MOURYA, D.T. 2000. Estado de susceptibilidad al virus del dengue y a los insecticidas de los mosquitos *Aedes aegypti* de la aldea de Belagola, distrito de Mandya, estado de Karnataka: durante las investigaciones posteriores a la epidemia.
- GOMES-CARVALHO, R., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. y BRAGA, I.A. 2014. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the America. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 109(6): 787-796
- GÓMEZ-GARCIA, G.F. 2018. *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae) and its importance for human health. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 70(1): 55-70
- GHOSAL, A. 2018. Mode of Action of Insecticides. *AkiNik Publications, India Toll Free (India)*. 128 págs.
- GOPALAN, N. y NAMPOOTHIRI, K.M. 2016. Biotechnological Production of Enzymes Using Agro-Industrial Wastes: Economic Considerations, Commercialization Potential, and Future Prospects. *Elsevier Inc*. 18 págs.
- GORGAS, W.C., 1907. Sanitary work on the Isthmus of Panama during the last three years. *New York: William Wood y Company*. 15 págs.
- GORGAS, W.C. 1914. Anti-mosquito Work at Panama. *The Royal Society of Medicine*. 31-42
- GRISALES, N., POUPARDIN, R., GOMEZ, S., FONSECA-GONZALEZ, I., RANSON, H. y LENHART, A. 2013. Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Colombia compromises dengue vector control. *Plos Negl. Trop. Dis*. 7: e2438.
- GUPTA, R.C., Malik, J.K. y MILATOVIC, D. 2011. Organophosphate and Carbamate Pesticides. In book: *Reproductive and Developmental Toxicology*. 471-486
- GUPTA, R.C. y MILATOVIC, D. 2014. *Insecticides*. Elsevier Inc. All rights reserved. ISBN: 978-0-12-404630-6 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00023-3> 389

- HARRINGTON, L.C., EDMAN, J.D. y SCOTT, T.W. 2001. Why Do Female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Feed Preferentially and Frequently on Human Blood. *Journal of Medical Entomology*, 38(3): 411-422
- HEMINGWAY, J y RANSON, H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol.* 45: 371-91
- HEMINGWAY, J., FIELD, L. y VONTAS, J. 2002. An overview of insecticide resistance. *Science.* 298: 96-97
- HEMINGWAY, J., HAWKES, N., MC CARROLL, L. y RANSON, H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitos. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 34: 653-65
- INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (IRAC). 2011. Prevention and Management of Insecticide Resistance in Vectors of Public Health Importance Insecticide Resistance Action Committee [https //doi org/10 1039/b3O850Ip](https://doi.org/10.1039/b3O850Ip)
- INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (IRAC). 2016. Clasificación del modo de acción de los insecticidas y acaricidas IRAC. 18págs.
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y CENSO – PANAMÁ (INEC. 2010. XI Censo de población y VII DE Vivienda. Disponible en: <http://WWW.estadisticas.contraloria.gob.pa/Resultados2010/Tabulados.aspx>
- JAYARAJ, R., MEGHA, P. y SREEDEV, P. 2016. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip Toxicol.* 9 (3-4): 90-100. doi: 10.1515/intox-2016-0012
- JULIANO, S.A. y LOUNIBOS, L.P. 2005. Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. *Ecol Lett.* 8(5): 558–574.
- JUNAID, R., ABU, H.A., HAMDAN, A., INTAN, H.ISHAK., ADANAN, C.R., y HAMISU, A.M. 2017 "Adulticidal Susceptibility Evaluation of *Aedes albopictus* Using New Diagnostic Doses in Penang Island, Malaysia," *Journal of the American Mosquito Control Association* 33(3), 200-208.<https://doi.org/10.2987/16-6607R.1>
- KAMGANG, B., YOUNGANG, A.P. TCHOUPPO, M., RIVERON, J.M. y WONDJI, C. 2017. Temporal distribution and insecticide resistance profile of two major arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Yaoundé, the capital city of Cameroon. *Parasites y Vectors.* 10: 469
- KUSHWAH, R.B., MALLICK, P.K., RAVIKUMAR, H., DEV, V., KAPOOR, N., ADAK, T.P. y SINGH OP. 2015. Status of DDT and pyrethroid resistance in Indian *Aedes albopictus* and absence of knockdown resistance (kdr) mutation. *J Vector Borne Dis.* 52(1):95-8.
- KWEKA, E.J., BARAKA, V., MATHIAS, L., MWANG'ONDE, B., BARAKA, G., LYARUU, L. y MAHAND, A.M. 2018. Ecology of *Aedes* Mosquitoes, the Major Vectors of Arboviruses in Human Population. *IntechOpen.* 1-16
- KRAEMER, M.U.G., SINKA, M.E., DUDA, K.A., MYLNE, A.Q.N., SHEARER, F.M., BARKER, C.M., MOORE, C.G., CARVAIHO, R.G., COELHO, G.E., BORTEL, W.V., HENDRICKX, G.S., CHAFFNER, F., ELYAZAR, R. F., TENG, J.H., BRADY,. O.J., MESSINA, J.P., PIGOTT, D.M., SCOTT, T.W., SMITH, D.L., WRNT, G.R.W., GOLDMG, N. y HAY, S. 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *eLife* 4 1-18 [https //doiorg/107554/eLifeO8347](https://doi.org/107554/eLifeO8347)

- KRAEMER, M.U.G., REINER, R.C., BRADY, O.J., MESSINA, J.P., GILBERT, M., PIGOTT, M.D., Y.I., JOHNSON, K., EARL, L., MARCZAK, L.B., SHIRUDE, S., WEAVER, N.D., BISANZIO, D., PERKINS, T.A., LAI, S., LU, X., JONES, P., COELHO, G.E., CARVALHO, R.G., BORTEL, W.V., MARSBOOM, C., HENDRICKX, G., SCHAFFNER, F., MOORE, C.G., NAX, H.H., BENGTSSON, L., WETTER, E., TATEM, A.J., BROWNSTEIN, J.S., SMITH, D.L., LAMBRECHTS, L., CAUCHEMEZ, S., LINARD, C., FARIA, N.F., PYBUS, O.P., SCOTT, T.W., LIU, Q., YU, H. WILLIAMWINT, C.R., HAY, S.I. y GOLDING, N. 2019. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nature Microbiology*. (4): 854–863
- LAZCANO, J.A., RODRÍGUEZ, M.M., SAN MARTÍN, J.L., ROMERO, J.E. y R. MONTOYA. 2009. Assessing the insecticide resistance of an *Aedes aegypti* strain in El Salvador. *Rev. Panam. Salud Publica*. 26: 229–234
- LE PRINCE, J.A.A. 1915. Control of Malaria: Oiling as an Antimosquito Measure. *Public Health Reports*. 30 (9): 599-608
- LETA, S., BEYENE, T.J., DE CLERCQ, E.M., AMENU, K., KRAEMER, M.U.G. y REVIE, C.W. 2018. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Int J Infect*. 67: 25-35. doi: 10.1016/j.ijid.2017.11.026.
- LLINÁS, G.A., SECCACINI, E., GARDENAL, C.N. y LICASTRO, S. 2010. Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 105: 113-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S007402762010000100019>
- LINDQUIST, A.W. y MCDUFFIE W.C. 1945a. DDT residual spray tests in Panama. *J Econ Entomol*. 38: 608
- LINDQUIST, A.W. y MCDUFFIE W.C. 1945b. DDT-oil sprays applied from an airplane to control *Anopheles* and *Mansonia* mosquitoes. *J Econ Entomol*. 38: 545-8
- LOUNIBOS, L.P. y KRAEMER, L.D. 2016. Invasiveness of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and Vectorial Capacity for Chikungunya Virus. *The Journal of Infectious Diseases*. 214 (Suppl 5)
- LI, Y., XU, J., ZHONG, D., ZHANG, H., YANG, W., ZHOU, G., SU, X., WU, Y., WU, K., CAI, S., YAN, G. y CHEN, X.G. 2018. Evidence for multiple-insecticide resistance in urban *Aedes albopictus* populations in southern China. *Parasit Vectors*. 11(1): 4. doi: 10.1186/s13071-017-2581-y
- LIU, N. 2015. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annu. Rev. Entomol*. 60: 537–59
- LUZ, C., TAI, M.H., SANTOS, A.H. Y SILVA, H.H. 2008. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 103(2): 214-215
- MANJARRES-SUÁREZ, A. y OLIVERO-VERBEL, J. 2013. Control Químico de *Aedes aegypti*: Una Perspectiva Histórica. *Rev. costarric. salud pública*. 22: 68-75
- MACORIS, M.L.G., ANDRIGHETTI, M.T., TAKAKU, L., GLASSER, C.M., GARBELOTO, V.C. y BRACCO, J.E. 2003. Resistance of *Aedes aegypti* from the state of Sao Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 703-708

- MARCOMBE, S., CARRON, A., DARRIET, F., ETIENNE, M. y AGNEW, P. 2009. Reduced efficacy of pyrethroid space sprays for dengue control in an area of Martinique with pyrethroid resistance. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 80: 745-51
- MARCOMBE, S., FARAJOLLAHI, A., HEALY, S., CLARK, G. y FONSECA, D. 2014. Insecticide Resistance Status of United States Populations of *Aedes albopictus* and Mechanisms Involved. *PLoS ONE*. 9 (7): e101992
- MASON, C.F. 1916. Sanitation in the Panama Canal Zone. Mount Hope, C.Z.; Panama Canal. 33págs.
- MAYILSAMY, M. 2018. Extremely Long Viability of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Eggs Stored Under Normal Room Condition. *Journal of Medical Entomology*. 56(3): 878–880. doi: 10.1093/jme/tjy232
- MAZARRI, M.B. y GEORGHIOU, P. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc*. 11: 315-22
- MELO-SANTOS, M.A., VARJAL-MELO, J.J., ARAÚJO, A.P., GOMES, T.C., PAIVA, M.H., REGIS, L.N. 2009. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Trop*. 113: 180-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j>
- MENDEZ-RIOS, J.D., LÓPEZ-VERGÈS, S., SUAREZ, J., MORENO, B., LÓPEZ-VERGÈS, S., MÉNDEZ DUTARY, D.E., ESTRYPEAUT, D., GONZÁLEZ-SANTAMARÍA, J., VILLAREAL, G., VALDERRAMA, A., CÁCERES, L. y SOSA, N. 2015. Zika en Panamá y Latinoamérica: Aspectos clínicos y moleculares de una problemática emergente. *Academia Panameña de Medicina y Cirugía* 35(3): 11–20
- MILLER, M.J. y LOAIZA, J.R. 2015. Geographic Expansion of the Invasive Mosquito *Aedes albopictus* across Panama implications for control of dengue and Chikungunya viruses. *PLoS Negl Trop Dis*. Public Library of Science. 9: e0003383. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd>.
- MINISTERIO DE SALUD (MINSAL).1984. Necesidades prioritarias para el control de enfermedades tropicales en Panamá. 48 págs.
- MINISTERIO DE SALUD DE PANAMÁ (MINSAL). 2019a. Boletín epidemiológico No 2: Dengue. Departamento de Vigilancia epidemiológica. Disponible en: <http://www.minsa.gob.pa>
- MINISTERIO DE SALUD DE PANAMÁ (MINSAL). 2019b. Boletín epidemiológico No 1: Zika. Departamento de Vigilancia epidemiológica. Disponible en: <http://www.minsa.gob.pa>
- MINISTERIO DE SALUD DE PANAMÁ (MINSAL). 2019c. Boletín epidemiológico No 1: Chikungunya. Departamento de Vigilancia epidemiológica. Disponible en: <http://www.minsa.gob.pa>
- MOLINA DE FERNÁNDEZ, D., BASTIDAS BELTRÁN, D., MOLINA, N., FIGUEROA, L. NAVARRO, J.C., GUERRA, A., GONZÁLEZ RIVAS, J., SÁNCHEZ, V. y RAMÍREZ, R. 2016. Estudio preliminar sobre el comportamiento de *Aedes albopictus* de la region central de Venezuela a insecticidas químicos. *Bol Mal Salud Amb*. 56 (1): 30-42.

- MONTELLA, I.R., MARTINS, A.J., VIANA-MEDEIROS, P.F., LIMA, J.B., BRAGA, I.A. y VALLE, D. 2007. Insecticide resistance mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *Am J Trop Med Hyg.* 77(3): 467-77
- MORALES, D., PONCE, P., VARSOVIA-CEVALLOS, P.E., VACA, D. y QUEZADA, W. 2019. Resistance Status of *Aedes aegypti* to Deltamethrin, Malathion, and Temephos in Ecuador. *Journal of the American Mosquito Control Association*: June 2019, Vol. 35, No. 2, pp. 113-122.
- MOYES, K.L., VONTAS, J., MARTINS, A.J., LEE CHING, N.G., KOOU, S.Y., DUSFOUR, I., RAGHAVENDRA, K., PINTO, J., CORBEL, V., DAVID, J.P y WEETMAN, D. 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis* 11(7): e0005625. [https://doi.org/ 10.1371/journal.pntd.0005625](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005625)
- MURCIA, O., HENRÍQUEZ, B., CASTRO, A., KOO, S., YOUNG, J., MÁRQUEZ, R., PÉREZ, D., CÁCERES, L. y VALDERRAMA, A. 2019. Presence of the point mutations Val1016Gly in the voltage-gated sodium channel detected in a single mosquito from Panama. *Parasit. Vectors.* 12: 62
- NAUEN, R. 2007. Perspective Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Manag Sci.* 63: 628–633
- OCAMPO, C., SALAZAR, M., MINA, N., MCALLISTER, J. y BROGDON, W. 2011. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Trop.* 118: 37-44. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.01.007](http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.01.007)
- OLIVA, C.F., DAMIENS, D. y BENEDICT, M.Q. 2014. Male reproductive biology of *Aedes* mosquitoes. *Acta Trop.* 132: 12-9. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.11.021
- ORENSTEIN, A.J. 1911. Sanitary Inspection of the Canal Zone. *Amer. Jour. Pub. Health.* 146-155
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO). 2013. Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas. 61 Pags.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 1957. Seventh report Expert Committee on insecticides WHO Tech Report Ser.125: 37.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 1981a. Instrucciones para determinar la susceptibilidad o resistencia de mosquito larvas a los insecticidas. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69615/1/WHO_VBC_81.807_eng.pdf
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 1981b. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides. Establishment of the baseline. WHO/VBC/81.805, Geneva. 6 págs.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 2005. Directrices para las pruebas de laboratorio y de campo de los larvicidas de mosquitos. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69101/1/WHO_CDS_WHOPES_GCDPP_2005.13.pdf
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 2016. Monitoring and managing insecticide resistance in *Aedes* mosquito populations. 13 págs.

- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 2017. Nota descriptiva Chikungunya. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 2018. Enfermedad por el virus de Zika. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 2019. Nota descriptiva Dengue. Disponible en: <http://www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs117/es/>
- PAUPY, C., DELATTE, H., BAGNY, L., CORBEL, V. y FONTENILLE, D. 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect.* 11 (14-15): 1177-85. doi: 10.1016/j.micinf.2009.05.005.
- PINTO-SEVERO, O. 1955. La campaña de erradicación del *Aedes aegypti* en las Américas su organización, evolución y resultados hasta diciembre de 1954. Boletín de la oficina sanitaria panamericana. Bol Oficina Sanit Panam. 45 (5)
- PINTO J, PALOMINO M, MENDOZA-URIBE L, SINTI C, LIEBMAN KA, LENHART A. 2019. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in three populations of *Aedes aegypti* from Peru. *Parasit Vectors.* 12: 494
- POIRIER, L., BRUN, L., JACQUET, P., LEPOLARD, C., ARMSTRONG, N., TORRE, C., DAUDÉ, D., GHIGO, E. y CHABRIÈRE, E. 2017. Enzymatic degradation of organophosphorus insecticides decreases toxicity in planarians and enhances survival. *Scientific Report.* 7: 15194
- POLSON, K.A., BROGDON, W.G., RAWLINS, S.C. y CHADEE, D.D. 2011. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Trop.* 117: 31–38.
- POWELL, J.R., GLORIA-SORIA, A. y KOTSAKIOZI, P. 2018. Recent History of *Aedes aegypti*: Vector Genomics and Epidemiology Records. *BioScience.* 68(11): 854–860. <https://doi.org/10.1093/biosci/biy119>.
- POWELL, J.R. y TABACHNICK, W.J. 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 108(I): 11-17
- R CORE TEAM. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>
- RAHARIMALALA, F.N., RAVAOMANARIVO, L.H., RAVELONANDRO, P., RAFARASOA, L.S., ZOUACHE, K., TRAN-VAN, V., MOUSSON, L., FAILLOUX, A.B., HELLARD, E., MORO, C.V., RALISOA, B.O. y MAVINGUI, P. 2012. Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar. *Parasit Vectors.* 20: 55-56. doi: 10.1186/1756-3305-5-56
- RAMASAMY, R., SURENDRAN, S.N., JUDE, P.J., DHARSHINI, S. y VINOBABA, M. 2011. Larval development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in peri-urban brackish water and its implications for transmission of arboviral diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 5(11): e1369. doi:10.1371/journal.pntd.0001369
- RANSON, H. y HEMINGWAY, J. 2005. Mosquito glutathione transferases. *Methods in Enzymology.* 401: 226–41
- RANSON, H., BURHANI, J., LUMJUAN, N. y BLACK, W. 2010. Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA.net.* 1: 1-12

- RATHER, I.A., KUMAR, S., BAJPAI, V.K., LIM, J. y PAR, Y.H. 2017. Prevention and Control Strategies to Counter ZIKA Epidemic. *Front Microbiol.* 8: 305. doi: 10.3389/fmicb.2017.00305
- RAYMOND, M., BERTICAT, C., WEILL, M., PASTEUR, N. y CHEVILLON, C. 2001. Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation. *Genetica.* 113: 287-96
- REINHOLD J.M, LAZZARI C.R, LAHONDÈRE C. 2018. Effects of the Environmental Temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquitoes: A Review. *Insects.* 9(4):158. doi:10.3390/insects9040158
- REIS-MONTELLA, I., SCHAMA, R. y VALLE, D. 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 107(4): 437-449
- REY, J.R y LOUNIBOS, P. 2015. Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y la transmisión de enfermedades. *Biomédica* 35: 177-85 doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2514>
- REY, J.R., NISHIMURA, N., WAGNER, B., BRAKS, M., O'CONNELL, S.M. y LOUNIBO, L.P. 2006. Habitat Segregation of Mosquito Arbovirus Vectors in South Florida. *J Med Entomol.* 43(6): 1134-1141
- ROIZ, D., WILSON, A.L., SCOTT, T.W., FONSECA, D.M., JOURDAIN, F., MÜLLER, P., VELAYUDHAN, R. y CORBEL, V. 2018. Integrated *Aedes* management for the control of *Aedes* -borne diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 12(12): e0006845. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006845>
- Rodríguez, M.M., Bisset, J.A., Milá, L.H., Calvo, E., Díaz, C. y Soca L.A. 1999. Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 51:83-8
- RODRIGUEZ, M.M., BISSET J.A, RUIZ, M. y SOCA, A. 2002. Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *J Med Entomol.* 39: 882-8
- RODRÍGUEZ, M.M., BISSET, J.A y FERNÁNDEZ, D. 2007. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from some Latin American countries. *J Am Mosq Control Assoc.* 2007; 23: 420-9
- RODRÍGUEZ, M. 2008. Estudio de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae). (Tesis Doctoral). La Habana: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri. Cuba. 119 págs.
- RODRIGUES, DE SÁ, E.L., MELO-RODOVALHO, C., PINTO RIBEIRO DE SOUSA, N., RODRIGUES DE SÁ, I.L., FERNANDES BELLINATO, D., DOS SANTOS DIAS, L., CARRARA DA SILVAL, L., MARTINS, A.J. y PEREIRA LIMA, J.B. 2019. Evaluation of insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations connected by roads and rivers: the case of Tocantins state in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 114: e180318
- ROSSI, G. y ALMIRÓN, W. 2004. Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina. *Serie Enfermedades Transmisibles, Monografía.* 54 págs.
- SAELIM, V., BROGDON, W.G., ROJANAPREMSUK, J., SUVANNADABA, S., PANDII, W., JONES, J.W. Y SITHIPRASASNA, R. 2005. et al. Bottle and biochemical assays

- on temephos resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health*. 36: 417-25.
- SCOTT, T.W. y TAKKEN, W. 2012. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends Parasitol*. 28(3): 114-21. doi: 10.1016/j.pt.2012.01.001
- SANTACOLOMA, L., CHAVES, B. y BROCHERO, H.L. 2012. Susceptibility of natural populations of dengue vector to insecticides in Colombia. *Biomedica*. 32: 333–343
- SHARMA, S.N., SAXENA, V. K. y LAL. S. 2004. Study on susceptibility status in aquatic and adult stages of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* against insecticides at international airports of South India. *J Commun Dis* 36:177–181
- SHEPARD, D., UNDURRAGA, E.A., HALASA, Y. A. y STANAWAY, J.D. 2016. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *Lancet Infect Dis*. 2016 16(8): 935-41. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00146-8
- SINGH, R.K., DHAMA, K., KHANDIA, R., MUNJAL, A., KARTHIK, K., TIWARI, R., CHAKRABORTY, S., MALIK, Y.S y BUENO-MARÍ, R. 2018. Prevention and Control Strategies to Counter Zika Virus, a Special Focus on Intervention Approaches against Vector Mosquitoes—Current Updates. *Microbiol*. 9: 87. doi: 10.3389/fmicb.2018.00087
- SIVAN, A., SHRIRAM, A.N., SUNISH, I.P y VIDHYA, P.T. 2015. Host-feeding pattern of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in heterogeneous landscapes of South Andaman, Andaman and Nicobar Islands, India. *Parasitol Res*. 114: 3539–3546 DOI 10.1007/s00436-015-4634-5
- SMITH, L.B., KASAI S. y SCOTT, J.G. 2016. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pestic Biochem Physiol*. 133: 1-12. doi: 10.1016/j.pestbp.2016.03.005
- SOMARIVA-PROPHIRO, J., SANTOS SILVA, O., DUQUE LUNA, J.E., PICCOLI, C.F., KANIS, LA., y NAVARRO DA SILVA, M.A. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 44(3): 300-305
- SPARKS, T.C., LOCKWOOD, J.A., BYFORD, R.L., GRAVES, J.B. y LEONARD, B.R. 1989. The role of behavior in insecticide resistance. *Pestic Sci*. 26:383-99.
- TANGENA, J.A., MARCOMBE, S., THAMMAVONG, P., CHONEPHETSARATH, S., SOMPHONG, B., SAYTENG, K., GRANDADAM, M., SUTHERLAND, I.W, LINDSAY, S.W. y BREY P.T. 2018. Bionomics and insecticide resistance of the arboviral vector *Aedes albopictus* in northern Lao PDR. *PLoS ONE* 13(10): e0206387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206387>
- TEDJOU, A.N., KAMGANI, B., YOUNGANG, A.P., NJIOKOU, F y WONDJI, C.S. 2019. Update on the geographical distribution and prevalence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), two major arbovirus vectors in Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis* 13(3): e0007137. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007137>
- TIKAR, S.N., KUMAR, A., PRASAD, G.B.K.S., y PRAKASH, S. 2009. Temephos-induced resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance studies to certain insecticides from India. *Parasitology Research*, 105(1), 57–63. doi:10.1007/s00436-009-1362-8

- TRAPIDO, H. 1946. The residual of dwellings with DDT in the control of malaria Transmission in Panama, with special reference to *Anopheles albimanus*. Am J Trop Med Hyg 26: 383-415
- TRAPIDO, H. 1947. DDT residual spray control of sandflies in Panama. J Econ Entomol 40: 472-475
- TRAPIDO, H. 1952. Modified response of *Anopheles albimanus* to DDT residual hose spraying in Panama. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 1(5): 853-861.
- TURELL, M.J., DOHM, D.J., SARDELIS, M.R., OGUINN, M.L., ANDREADIS, T.G y BLOW, J.A. 2005. An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus. J Med Entomol. 42(1):57-62.
- UGURLU, S. 2012. Insecticide Resistance, Insecticides - Advances in Integrated Pest Management, Farzana Perveen, IntechOpen, DOI: 10.5772/28086.
- VONTAS, J., KIOULOS, E., PAVLIDI, N., MOROU, E., DELLA TORRE, A. y RANSON, H., 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. Pest. Biochem. Physiol. 104: 126-131
- VALLE, D., MONTELLA, I.R., RIBEIRO, R.A., MEDEIROS, P.F.V., MARTINS-JR, A.J., LIMA, J.B.P. 2006. Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. Fundação Oswaldo Cruz and Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Rio de Janeiro and Distrito Federal.
- VAUGHAN, A., CHADEE, D.D. y FFRENCH-CONSTAN, R. 1998. Biochemical monitoring of organophosphorus and carbamate insecticide resistance in *Aedes aegypti* mosquitoes from Trinidad. Med Vet Entomol. 12: 318-2
- WAHID, B., ALI, A., RAFIQUE, S. y IDREES, M. 2017. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. Int J Infect Dis. 58: 69-76. doi: 10.1016/j.ijid.2017.03.006
- WEERATUNGA, P., RODRIGO, C., FERNANDO, S.D., RAJAPAKSE, S. 2017. Control methods for *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. Cochrane Database of Systematic Reviews. 8: CD012759. DOI: 10.1002/14651858.CD012759
- WEETMAN, D., KAMGANG, B., BADOLO, A., MOYES, C.L., SHEARER, F.M., COULIBALY, M., PINTO, J., LAMBRECHTS, L. y MCCALL, P.J. 2018. *Aedes* Mosquitoes and *Aedes* -Borne Arboviruses in Africa: Current and Future Threats. Int J Environ Res Public Health. 15(2). pii: E220. doi: 10.3390/ijerph15020220
- WAHID, B., ALI, A., RAFIQUE, S. y IDREES, M. 2017. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. Int J Infect Dis. 58: 69-76. doi: 10.1016/j.ijid.2017.03.006.
- ZARAGOZA-BASTIDA, A., VALLADARES-CARRANZA, B., ORTEGA-SANTANA, C., ZAMORA-ESPINOSA, J., VELÁZQUEZ-ORDOÑEZ, V. y APARICIO-BURGOS, J. 2016. Repercusiones del uso de los organoclorados sobre el ambiente y salud pública. AbanicoVet. 6 (1): 43-55