



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES VAL1016ILE Y PHE1534CYS DEL
GEN VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNEL, EN LAS POBLACIONES DE
AEDES AEGYPTI DEL ECUADOR



AUTORES

LUIS FELIPE PERALTA CALVOPIÑA

WASHINGTON BOLÍVAR ROMERO VÁSQUEZ

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES VAL1016ILE Y PHE1534CYS DEL GEN
VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNEL, EN LAS POBLACIONES DE *Aedes*
Aegypti DEL ECUADOR.

Trabajo de titulación presentado en conformidad a los requisitos establecidos para
optar por el título de Ingeniero en Biotecnología

Profesor Guía

M.Sc. María Gabriela Granja Bastidas

Autores

Luis Felipe Peralta Calvopiña

Washington Bolívar Romero Vásquez

Año

2017

DECLARACIÓN PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con los estudiantes, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

María Gabriela Granja Bastidas

Master en Bioquímica, Biología molecular y Biomedicina: especialidad en
patología molecular.

CC: 1712995149

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Andrea Paola Cordero Arroyo

Máster en Células Madre y Medicina Regenerativa

CC: 1714669825

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente a los estudiantes para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”

Varsovia Cevallos Viteri

Doctora en Entomología y Nematología

CC: 1706633193

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

“Declaramos que este trabajo es original, de nuestra autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Luis Felipe Peralta Calvopiña

CC: 1722219555

Washington Bolívar Romero Vásquez

CC: 10025072322

AGRADECIMIENTOS

Gracias primeramente a Dios.
Gracias a nuestros queridos padres.
Gracias a mi compañero y amigo.

Gracias al personal CIREV-INSPI.
Gracias a la Dra. Varsovia Cevallos.

Gracias a la vida por este triunfo.

DEDICATORIA

A nuestras familias, en especial
a nuestros padres y a Dios.

RESUMEN

El control del mosquito vector *Aedes aegypti* sigue siendo el método más eficiente para proteger a los humanos de los virus (Zika, Chikungunya, Dengue, fiebre amarilla y malaria) del cual el mosquito es vector. Se evaluó a mosquitos *Aedes aegypti* pertenecientes a seis localidades (Huaquillas, Arenillas, Machala, Pasaje, Santa Rosa y El Guabo) de la provincia de El Oro, Ecuador. Este estudio se lo realizó tomando en cuenta las pautas de la CDC para la parte correspondiente a los bioensayos y se utilizaron cebadores específicos basados los estudios realizados dentro de Latino América. El objetivo de este trabajo fue de identificar y verificar la ausencia o presencia de la mutación Phe1534Cys y la mutación Val1016Ile en las poblaciones analizadas. Para ello en el insectario del Centro de Investigación y Referencia de Vectores del INSPI, se obtuvo la F2 de cada una de las localidades, posteriormente se realizaron bioensayos con una concentración de 10 ppm de deltametrina diluida en etanol absoluto, los mosquitos considerados como vivos se almacenaron en etanol al 70 % y se seleccionaron 12 mosquitos de cada una de las localidades para su posterior análisis molecular (extracción de ADN y amplificación de la región mutante) donde se determinó que las mutaciones si se encuentran presentes en las localidades estudiadas. Obteniendo la presencia de la mutación Val1016Ile en un 98% de los mosquitos analizados y alrededor del 96% para la mutación Phe1534Cys.

ABSTRACT

The control of the mosquito vector *Aedes aegypti* remains as the most efficient method to protect humans from the viruses it transmits (Zika, chikungunya, Dengue, yellow fever and malaria) of which the mosquito is a vector. *Aedes aegypti* mosquitoes from 6 localities (Huaquillas, Arenillas, Machala, Pasaje, Santa Rosa and El Guabo) from the province of El Oro Ecuador were evaluated. This study was carried out taking into account the guidelines of the CDC for the part that corresponded to the bioassays also specific primers were used based on the studies realized in Latino America. The objective of this work was to identify and verify the presence or absence of the Phe1534Cys mutation and the Val1016Ile mutation in the populations analyzed. To do this, F2 was obtained from the mosquitoes captured in the field from each of the localities. Bioassays were then carried out with a concentration of 10 ppm of deltamethrin diluted in absolute ethanol, the mosquitoes that were considered alive were stored in 70% ethanol and only 12 mosquitoes were selected for each of the localities, for further to be evaluated molecularly (ADN extraction and amplification of the mutant region) as result of this analysis we were able to determined that the mutations where present in the localities which were studied. We obtained a 98% of presence for Val1016Ile mutation and 96% for Phe1534Cys mutation.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema	1
1.3. Objetivo General	3
1.4. Objetivos Específicos	3
1.5. Justificación.....	4
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1. <i>Aedes aegypti</i>	6
2.1.1. Generalidades	6
2.1.2. Ambiente y desarrollo	7
2.1.3. Ciclo de vida del mosquito.....	8
2.1.3.1. El huevo	9
2.1.3.2. Larva	10
2.1.3.3. Pupa.....	11
2.1.3.4. Adulto.....	12
2.1.4. <i>Aedes aegypti</i> en el Ecuador.....	14
2.1.5. Cantones representativos de la Provincia de El Oro	15
2.2. Enfermedades relacionadas a <i>Aedes aegypti</i>	17
2.2.1. Generalidades	17
2.3. Métodos de control.....	18
2.3.1. Generalidades	18

2.3.2. Control químico.....	19
2.3.3. Control del mosquito <i>A. aegypti</i> en el Ecuador.....	19
2.4. Insecticidas	20
2.4.1. Generalidades	20
2.4.2. Piretroides	21
2.4.2.1. Historia y evolución	21
2.4.2.2. Mecanismo de acción de los piretroides	23
2.4.2.3. Piretroides en el Ecuador	24
2.5. Mecanismos de resistencia a insecticidas	24
2.5.1. Generalidades	24
2.5.2. <i>Aedes aegypti</i>	26
2.5.2.1. Canal de sodio dependiente de voltaje	27
2.5.2.2. Mutaciones kdr.....	28
2.5.2.3. Mutaciones kdr reportadas en las Américas	30
2.6. Técnicas de identificación de resistencia a insecticidas	31
2.6.1. Generalidades	31
2.6.2. Bioensayo.....	31
2.6.3. Análisis molecular.....	32
3. DISEÑO DE PLAN EXPERIMENTAL.....	35
4. PROCEDIMIENTOS	37
4.1. Determinación de la población y la muestra	37
4.1.1. Muestra para bioensayos	38
4.1.2. Muestra para Análisis molecular.....	39

4.2.	Materiales y métodos para la obtención de datos.....	39
4.2.1.	Mantenimiento del mosquito <i>Aedes aegypti</i>	39
4.2.2.	Bioensayo	43
4.2.2.1.	Manejo de las botellas	43
4.2.2.2.	Introducción de los mosquitos a las botellas impregnadas	44
4.2.2.3.	Ensayo biológico	44
4.2.3.	Pruebas moleculares para detección de mutaciones	45
4.2.3.1.	Extracción de ADN	45
4.2.3.2.	Cuantificación de ADN (pureza)	46
4.2.3.3.	Amplificación de mutaciones Phe1534Cys y Val1016Ile	47
4.2.3.4.	Amplificación de mutaciones Phe1534Cys y Val1016Ile	48
4.2.3.4.1.	Detección de la mutación Phe1534Cys	48
4.2.3.4.2.	Amplificación de la mutación Val1016Ile	49
4.2.3.5.	Amplificación Phe1534Cys y Val1016Ile mediante Direct PCR ..	51
4.2.3.5.1.	Detección de la mutación Phe1534Cys	51
4.2.3.5.2.	Amplificación de la mutación Val1016Ile	53
4.2.3.6.	Nested PCR amplicon 350 pb	54
4.2.4.	Revelado en gel de agarosa al 2 %	54
4.2.4.1.	Procedimiento	55
4.2.5.	Purificación de ADN a partir de gel	55
4.3.	Evaluación estadística para los resultados	57
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
5.1.	Evaluación estadística de los resultados	60

5.1.1.	Evaluación estadística para resultados de Bioensayos.....	60
5.1.1.1.	Evaluación estadística entre tratamientos.....	60
5.1.1.2.	Evaluación estadística entre localidades	62
5.1.1.3.	Evaluación estadística entre Sexo	63
5.1.1.3.1.	Evaluación estadística por sexo intra localidades.....	65
5.1.2.	Evaluación estadística del análisis genotípico.....	67
5.1.2.1.	Evaluación estadística según sexo para cada localidad	70
5.1.2.1.1.	Mutación Phe1534Cys.....	70
5.1.2.1.2.	Mutación Val1016Ile	71
5.2.	Resultados de mortalidad obtenidos del bioensayo.....	72
5.3.	Resultado del análisis molecular	76
5.3.1.	Análisis de mutación Phe1534Ile.....	77
5.3.1.1.	Huaquillas	80
5.3.1.2.	Arenillas	81
5.3.1.3.	El Guabo	82
5.3.1.4.	Machala.....	84
5.3.1.5.	Santa Rosa	85
5.3.1.6.	Pasaje	87
5.3.2.	Análisis de la mutación Val1016Ile	88
5.3.2.1.	Arenillas	90
5.3.2.2.	Machala.....	90
5.3.2.3.	El Guabo	91
5.3.2.4.	Santa Rosa	91
5.3.2.5.	Huaquillas	92

5.3.2.6. Pasaje	93
5.4. Resultados de secuenciación	93
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	95
6.1. Conclusiones.....	95
6.2. Recomendaciones.....	966
REFERENCIAS.....	98
ANEXOS	112

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Los mosquitos son una gran amenaza en la salud humana, debido a su capacidad para transmitir enfermedades infecciosas, como ejemplo se tiene el caso del paludismo o la fiebre amarilla reportada en el año 1802 en Haití. Varios autores concuerdan al decir que tanto América tropical, Asia y África representan las zonas a nivel mundial con una mayor cantidad de enfermedades infecciosas transmitidas por mosquitos (Sánchez, 2011, pp. 26-64).

Las enfermedades infecciosas transmitidas por mosquitos vectores representan el 17% del total de enfermedades infecciosas descritas. Varias de estas enfermedades pueden no ser mortales para la persona o población que se encuentra expuesta, como es el caso del dengue clásico, dengue hemorrágico y filariasis. Por otro lado, existen enfermedades infecciosas como la encefalitis que pueden generar lesiones cerebrales, daños degenerativos y hasta la muerte de la persona (De María, 1820, pp. 11-47 y Russell, et al, 2003, pp. 1786-1789). Dentro del Ecuador las enfermedades transmitidas por vectores con mayor relevancia en la salud son, en orden jerárquico, el Dengue, Chikungunya y el Zika. Se le ha dado mucha importancia a esta última enfermedad a pesar debido al cuadro clínico que esta genera además se ha demostrado que puede ser transmitido no solo por el mosquito sino también por la persona afectada, actuando como un vector más de tal virus (Centro Nacional para Epidemias Infecciosas Emergentes y Zoonóticas , 2016, p.1).

1.2. Planteamiento del problema

Debido al cambio climático, las inundaciones son mucho más recurrentes promoviendo el desarrollo de los mosquitos vectores. Lo que en países subdesarrollados representa un incremento en el número de casos de enfermedades transmitidas por mosquitos vectores (Atlas, 2000, pp.5-10). Ante

esta situación algunas alternativas tomadas por la población son el uso de repelentes, vestir con prendas de color blanco, ya que aleja a los mosquitos, así como colocar mallas en sus hogares tanto en ventanas como en puertas para evitar el paso de los mosquitos al interior. (Batra, Mitral y Adak, 2005, pp 119-116).

González del Valle (1865, p.15) indica que cada país debe invertir en generar una solución en cuanto a salud pública, donde se establezcan normas y lineamientos que garanticen la salud y bienestar de la población. La necesidad de tomar medidas correctivas con el fin de proteger la salud de los ecuatorianos, se ha incrementado en los últimos años, esto tomando en cuenta que el país, presenta condiciones favorables para el desarrollo del mosquito específicamente en la zona costera y amazónica, así como un alto porcentaje de asentamientos ilegales donde los pobladores no cuentan con servicios básicos tales como agua potable, alcantarillado, luz, entre otros. El Gobierno Nacional de la República del Ecuador en el año 1990, posterior a la re infestación del mosquito *Aedes aegypti* conjuntamente con el primer nuevo brote de Dengue; a través del Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores Artrópodos (SNEM), inició las jornadas de erradicación de poblaciones del mosquito vector, para lo cual se han realizado fumigaciones, campañas de concientización para la población, entrega de toldos impregnados con insecticidas y en la actualidad el país se han incursionando en el empleo del control biológico del mosquito. No obstante, el uso de insecticidas para el control del vector sigue siendo ampliamente usado y resulta la solución más viable tal y como lo menciona Hernández (2000, pp 32-38) y Schaper (1998. pp 119-125).

Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades por sus siglas en inglés [CDC] (2015, p. 2), existen limitantes a la hora de controlar el desarrollo del mosquito vector mediante químicos insecticidas tanto larvicidas como adulticidas, esto debido a varios mecanismos de resistencia que los mismos han generado a lo largo de los años como método de supervivencia. Como menciona Álvarez, et al, (2014, p.3) la resistencia hacia un insecticida “es una característica heredable

que proporciona un incremento a la tolerancia a un pesticida, o un grupo de pesticidas, de tal manera que el individuo sobrevive a una concentración del insecticida que normalmente sería letal para la especie”. La resistencia es el resultado directo que se obtiene a partir de una presión de selección debido al empleo reiterado y constante en cuanto a concentraciones del insecticida, dicha resistencia es una característica genética heredable cuya frecuencia aumenta si la presión selectiva continúa. Por ello, se han llevado a cabo bioensayos sobre el vector donde se ha podido determinar la posible existencia de mecanismos de resistencia involucrados (Kushwah et al., 2015, pp 1-2).

Uno de los mecanismos de resistencia más relevantes son las mutaciones puntuales dentro del genoma del mosquito que disminuyen o anulan el efecto de los insecticidas sobre el insecto (Kushwah et al., 2015, pp 1- 7).

Este tipo de mutaciones son conocidas como Knock Down Resistance, por sus siglas en inglés *kdr* y se dan en el gen del canal de sodio del mosquito, tales mutaciones han sido ya determinadas en varias poblaciones del mosquito *Aedes aegypti* (Kushwah et al., 2015, p 9). Linss, et al (2014, p.1) y Harris, et al (2010, p.2) resaltan a las mutaciones Val1016Ile y Phe1534Cys, como las únicas que están relacionadas directamente con la resistencia a piretroides en América tropical.

1.3. Objetivo General

Identificar las mutaciones Val1016Ile y Phe1534Cys del gen Voltage-gated sodium channel en poblaciones de *Aedes aegypti* del Ecuador

1.4. Objetivos Especificos

- a) Asociar poblaciones del mosquito *Aedes aegypti* según su grado de susceptibilidad al insecticida (Piretroide).

- b) Determinar la presencia o ausencia del fenotipo mutante en las poblaciones del mosquito *Aedes aegypti* en el Ecuador.
- c) Analizar molecularmente poblaciones de mosquito con posible genotipo mutante, en busca de mutaciones puntuales.

1.5. Justificación

Lo que pretende determinar este proyecto es si el empleo intensivo del insecticida deltametrina o DDT en labores de fumigación generó en las poblaciones del insecto una presión selectiva la cual obligó a los mosquitos a adquirir cualidades especiales. Mediante la relación de las mutaciones Val1016Ile y Phe1534Cys con la resistencia a insecticidas piretroides como la deltametrina, se podrá establecer y controlar de mejor manera el desarrollo de las poblaciones del mosquito dentro de las zonas muestreadas en la provincia de El Oro. Además servirá como punto de partida para futuras investigaciones en provincias como Guayas, Manabí y Esmeraldas, que son mayormente afectadas por enfermedades transmitidas por el mosquito.

En la actualidad el único medio de control hacia el vector es el uso de insecticidas y larvicidas esto se debe a que no existe una vacuna para hacer frente a estas enfermedades tropicales (CDC, 2011, pp.52-59).

Además en países vecinos como Colombia, Venezuela y Brasil han reportado poblaciones de mosquitos *Aedes aegypti* que presentan mutaciones asociadas a *Knockdown resistance* (Atencia et al., 2016). Estos sucesos reportados en dichos países, en cuanto a la presencia de mosquitos resistentes a insecticidas (piretroides) pone en riesgo la salud de los ecuatorianos.

La probabilidad de encontrar poblaciones de mosquito resistente a piretroides es alta debido a que, en el país, no existe un adecuado grado de control en cuanto a cantidades que se debe usar del insecticida para fumigar (Bisset, 2002, p. 202).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. *Aedes aegypti*

2.1.1. Generalidades

A finales del siglo XIX se descubrió que ciertas especies de insectos eran capaces de transmitir enfermedades, a parte de los artrópodos y de los caracoles de agua dulce, de los cuales ya se tenía conocimiento previo (Rozendaal, 1997, p. 1). Desde entonces, se han generado varios estudios sobre una gran variedad de mosquitos entre ellos *Aedes aegypti*, debido a que posee la facultad de transmitir enfermedades como el dengue y la fiebre amarilla (Rickard, 1960, p. 10). *Aedes aegypti* encaja perfectamente como un insecto vector, esto se debe a que posee el potencial de propagar patógenos a otros organismos vivos, causando así afecciones graves e incluso la muerte al huésped (el hombre).

Los vectores en su mayoría son hematófagos y pueden transmitir enfermedades infecciosas directa o indirectamente al hombre o de animales a personas (zoonosis). De hecho, las enfermedades transmitidas por vectores representan más del 17% del total de las enfermedades infecciosas a nivel mundial. (Organización Mundial de la Salud, 2016).

Aedes aegypti es un mosquito que pertenece a la familia de los culícidos, es de tamaño pequeño, y presenta un patrón blanco y negro a lo largo de su cuerpo (Evans, 2014, p. 3). Además, tiene la capacidad de picar a cualquier hora del día, pero la actividad se intensifica al amanecer y antes de caer la noche por el periodo de alimentación. Durante este lapso de tiempo aumenta el riesgo de que una persona pueda adquirir alguno de los virus del cual el mosquito es vector (González, Quiñones, Lenhart y Brogdon. 2011, pp. 430-432).

Debido a que se encuentra distribuido ampliamente a nivel mundial específicamente en las regiones tropicales y subtropicales y a su vez es el responsable de transmitir el virus del Zika, Dengue, Chikungunya y fiebre amarilla,

constituye uno de los problemas prioritarios en salud de países que se encuentran dentro de estas regiones geográficas (Bhatt et al, 2013, pp. 504-506; Kraemer et al, 2015, pp. 1-18 y Salvatella, 1996, p. 29).

2.1.2. Ambiente y desarrollo

A medida que el ser humano ha ocupado la tierra ha invadido hábitats, lo que ha llevado a la extinción de especies autóctonas o que las mismas se adapten a vivir conjuntamente con nosotros. Cuando esto ocurre con los insectos que requieren una fuente de sangre (hematófagos), estos evolucionan con una preferencia a la fuente de alimento que se encuentra en mayor disponibilidad (sangre humana). Un gran número de los insectos vectores han evolucionado de dicha manera reproduciéndose cerca de asentamientos humanos y alimentándose de sangre humana (Powell y Tabachnick, 2013, pp. 11-17). A lo largo de los años *Aedes aegypti* se ha adaptado o se ha domesticado asombrosamente para poder sobrevivir cerca de los humanos, siendo su alimentación casi exclusivamente de los mismos (Ooi, Goh y Gubler, 2006, pp. 887-893).

El mosquito se encuentra dentro de las zonas tropicales y sub-tropicales del planeta, ubicadas por lo general entre los 35° de latitud norte y 35° de latitud sur tal como se muestra en la Figura 1. Dentro del rango mencionado existen zonas en las cuales no se presentan las condiciones óptimas para el desarrollo del mosquito, ya que requiere de temperaturas de entre los 25 a 30°C. Esta temperatura es habitual en la mayoría de países con altura de entre 0 a 1200 m.s.n.m. En el Ecuador el mosquito *Aedes aegypti* hasta el año 1986, se lo encontraba hasta un máximo de 1000 m.s.n.m (Nelson, 1986, pp. 2-16). En la actualidad en países vecinos como Colombia y Bolivia, se han encontrado mosquitos *Aedes aegypti* a alturas de 2200 y 2600 m.s.n.m respectivamente, lo que puede deberse a varios factores como cambios en el fenotipo producto de mutaciones generadas por presión selectiva o por modificaciones en el clima debido al calentamiento global (Vezzani y Carbajo, 2008, p. 66-74).

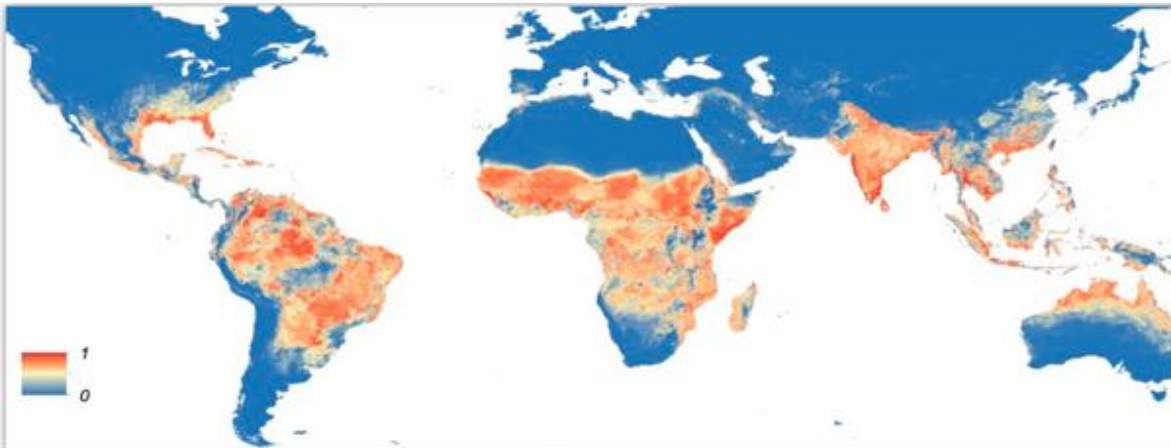


Figura 1. Mapa global de la distribución prevista de *Ae. aegypti*. Se representa la probabilidad de ocurrencia (de 0 a 1 azul rojo).

Tomado de Kraemer et al, 2015, p. 9.

El mismo ser humano se ha encargado de crear y facilitar lugares propicios para que el mosquito pueda continuar con su ciclo de vida sin ningún problema. Esto se debe a que en las zonas rurales donde carecen de servicios básicos especialmente agua y alcantarillado, las personas tienden a almacenar el agua dentro de contenedores y si estos no son sellados adecuadamente se transforman en sitios óptimos para ovopositar. También los depósitos de agua, que se encuentran en construcciones u objetos, como botellas, floreros, neumáticos y piletas, se transforman en criaderos artificiales para el desarrollo de las larvas aumentando la densidad poblacional del mosquito en dichos sectores (Ooi, Goh y Gubler, 2006, pp. 887-893; Mangudo, Aparicio y Gleise, 2015, p 679 y Chareonviriyaphap, et al., 2003, p. 529).

2.1.3. Ciclo de vida del mosquito

El ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti*, consta de 4 fases: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 2).

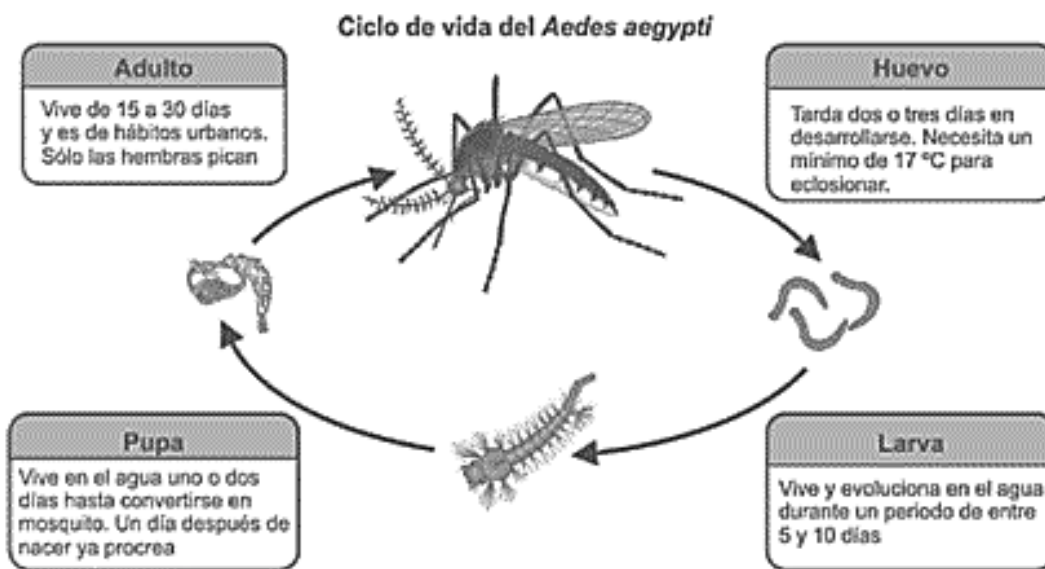


Figura 2. Ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti*.

Tomado de Arboledas, 2009, p. 178.

El ciclo de vida de *Aedes aegypti* inicia con la eclosión del huevo, tras lo cual ocurre el primer estadio larvario el cual es seguido por tres cambios, que con llevan a la segunda, tercera y cuarta etapa o estadio de la larva antes de pasar a la fase de pupa y finalmente al estado adulto del mosquito, en el cual puede mantenerse con vida hasta los 50 días. Para terminar con el ciclo de vida es necesaria la cópula y la alimentación de la hembra con sangre para poder ovopositar, reiniciándose el ciclo de esta manera (Rickard, 1960, p 54).

2.1.3.1. El huevo

Los huevos del mosquito *Aedes aegypti* son de aproximadamente 1 mm de longitud, con una forma de un ovalo alargado (Figura 3). La hembra ovopositora prefiere la postura de los huevos en lugares oscuros y al borde del nivel del agua en paredes rígidas. Los huevos pueden ser fecundados durante la postura y su desarrollo embrionario se completa cerca de las 48 horas o más dependiendo del

ambiente (húmedo y cálido) y en casos de temperaturas bajas dicho tiempo puede prolongarse hasta 5 días. Posteriormente al desarrollo embrionario los huevos del mosquito son capaces de resistir periodos de desecación bastante largos, lo que indica un problema en cuanto al control de las poblaciones del mosquito. La eclosión del huevo se da mediante la acción bacteriana generada por el contacto del huevo con el agua, pudiendo eclosionar desde los 15 minutos hasta tres días después de haber sido expuesto al agua (Nelson, 1986, p. 4).



Figura 3. Huevos de *Aedes aegypti*.

Tomado de National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), 2015, p. 2.

2.1.3.2. Larva

La larva es el producto de la eclosión del huevo. Esta es una de las fases acuáticas del mosquito donde la larva busca únicamente alimentarse de material orgánico presente en su lugar de desarrollo. La eclosión del huevo da lugar al primer estadio larval, donde tras uno o dos días de alimentarse y crecer ocurre una muda pasando así al segundo estadio larval, en esta etapa empieza el crecimiento del tórax y abdomen, ocurriendo dos mudas más que dan lugar al tercero y cuarto estadio (Nelson, 1986, p. 5).

Los primeros tres estadios larvarios se desarrollan mucho más rápido en relación al cuarto estadio, después del cuarto estadio el mosquito entra a la fase pupal.

Las larvas de *Aedes*, se distinguen fácilmente del resto de larvas (culícidos) debido a que su sifón es más corto, además su posición en reposo dentro del agua es quedar suspendidas de una manera casi vertical (Figura 4) y su movimiento para nadar es único a manera de serpiente (Nelson, 1986, p. 5).



Figura 4. Larvas de *Aedes aegypti* en estado de reposo.

Tomado de NECZID, 2015, p. 2.

El estadio larvario es muy sensible a cambios de luz bruscos y por lo general se desplazan en grupos dentro del contenedor donde se desarrollan.

El desarrollo de la larva desde la eclosión del huevo hasta su fase pupal en condiciones óptimas debería darse en alrededor de 5 días, pero existen factores como temperatura, alimento y número de larvas por contenedor que determinan el tiempo en el que la larva se desarrollará (Nelson, 1986, p. 5; Center for Disease Control and Prevention, 1979, p.10).

2.1.3.3. Pupa

Esta fase a diferencia de la fase larvaria, no necesita de alimentación y su función principal es dar paso al estado adulto del mosquito mediante la metamorfosis. El

estadio de pupa dura entre dos y tres días. Debido a la flotabilidad de las pupas es mucho más sencillo para el mosquito el cambio de una fase acuática a una fase terrestre (Figura 5) (Gualdron, 2007, p. 11).



Figura 5. Pupas de *Aedes aegypti* en estado de reposo.

Tomado de NCZID, 2015, p. 2.

2.1.3.4. Adulto

Esta es la fase reproductora del insecto generada luego de emerger de la exuvia de la pupa (Figura 6), el mismo es incapaz de volar por varias horas ya que necesita que su exoesqueleto y sus alas se endurezcan (Gualdron, 2007, p. 11).



Figura 6. Adulto *Aedes aegypti* emergiendo de la exuvia.

Tomado de NCZID, 2015, p. 2.

Dentro de las 24 horas de emergencia de la exuvia, ambos sexos son capaces de aparearse y de esta manera la hembra buscará fuentes de sangre con el fin de proveer a los huevos una fuente de proteínas para su desarrollo. Dicha alimentación generará un lote de hasta 100 huevos por hembra, ocurriendo en alimentaciones escasas una producción de huevos baja o en algunos casos nula. La postura de los huevos tras la alimentación sanguínea es de 3 días en condiciones óptimas; pasado este tiempo la hembra estará lista para alimentarse con sangre nuevamente. A diferencia del desarrollo larvario en agua turbia, contaminada que contenga material orgánico para su alimentación; la hembra prefiere ovopositar en agua limpia, clara y transparente (Gualdron, 2007, p. 11).

Los mosquitos *A. aegypti* adultos son oscuros con bandas blancas situadas a lo largo de toda su estructura. Los machos se distinguen de las hembras debido a las antenas plumosas y palpos más largos en machos y antenas sin plumas y palpos más cortos en hembras; por lo general las hembras son más grandes en tamaño en relación del macho (Figura 7) (Gualdron, 2007, p. 12 y Nelson, 1986, pp. 7-10 y Center for Disease Control, 1979, pp. 14-17).

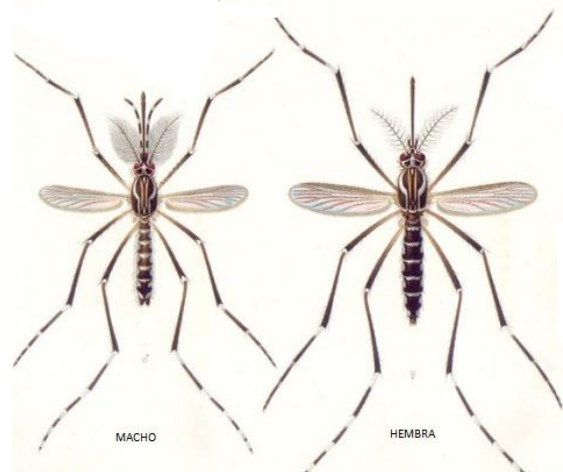


Figura 7. Adulto macho y hembra *Aedes aegypti*.

Tomado de American Mosquito Control, 2015.

Otra diferencia radica en el rango de vuelo ya que la hembra es capaz de volar hasta 50 m durante toda su vida en relación al macho que se estima vuela dos terceras partes de la distancia mencionada para las hembras (Nelson, 1986, p. 6).

Se ha demostrado que los mosquitos dentro de su hábitat natural sobreviven como máximo un par de semanas en relación de los mosquitos mantenidos dentro de laboratorio, los cuales sobreviven varios meses en dichas condiciones (Nelson, 1986, p. 6).

2.1.4. *Aedes aegypti* en el Ecuador

Según la Organización Mundial de la salud para 1958 el Ecuador era uno de los países a los cuales se les fue otorgado un certificado, emitido por la misma institución, donde se reconocía al país como libre del vector del dengue y fiebre amarilla, en este caso el mosquito *Aedes aegypti* (Real, et al., 2012, p.2).

Posterior a esto se tomaron varias precauciones recomendadas por la Organización Panamericana de Salud (OPS), con el fin de evitar el retorno de poblaciones del mosquito como tal y las enfermedades que este transmitía. A pesar de los esfuerzos realizados, para el año 1975 se da una nueva infestación del mosquito, la cual es reportada en el año 1988 y consecuentemente el primer caso de Dengue serotipo 2, genotipo americano se da en el año 1990 en Guayaquil (Real, et al., 2012, p.2).

La distribución del mosquito *Aedes aegypti* dentro del Ecuador para el año 2016, según datos tomados por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), se encuentran representados en la Figura 8. Alrededor del 75% del país tiene *Aedes aegypti* y presenta climas favorables para su desarrollo. Además, se puede determinar que las zonas con mayor presencia del insecto vector son las provincias de la zona costera del país, resaltando a la provincia del Guayas, El Oro y Esmeraldas.

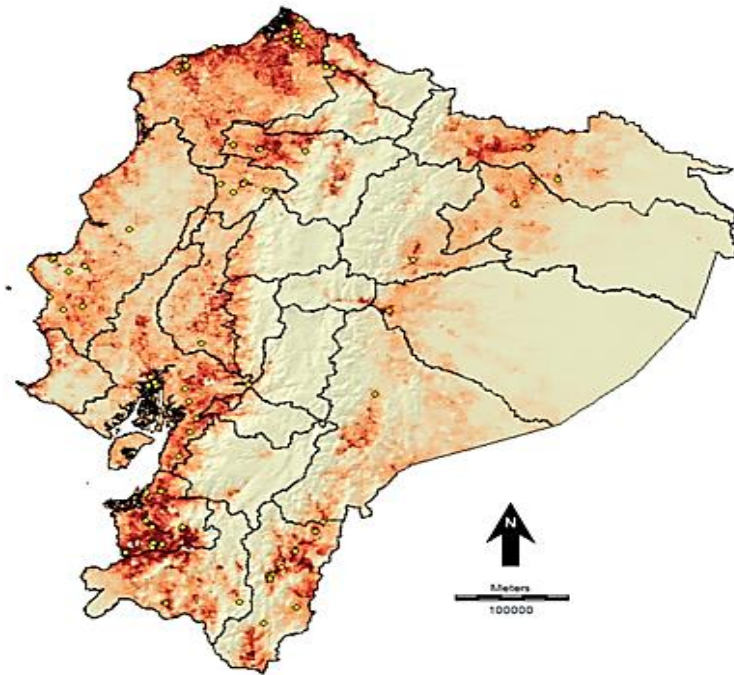


Figura 8. Distribución del mosquito *Aedes aegypti* en el Ecuador.
Tomado de INSPI, 2016.

2.1.5. Cantones representativos de la Provincia de El Oro

El Oro es una provincia que se encuentra en el país Ecuador. Se ubica en la zona litoral del mismo. Cuenta con una extensión de 6.188 km² y el número de habitantes es de 643.316. La provincia de El Oro tiene un rango de altitud que oscila entre los 100 y 1000 m.s.n.m (MSP, 2015).

El clima de la provincia es muy variado dependiendo de la cantidad de precipitación que se genere en cada uno de los sectores. Por ejemplo; una de las zonas costeras en época de verano se encuentra seca mientras que la zona montañosa presenta lluvias. La temperatura varía de acuerdo a la altitud, la cual genera un contraste debido a que en la zona costera la temperatura va desde unos 25°C a 35°C, y en el altiplano de 10°C a 18°C (MSP, 2015).

Esta provincia se encuentra dividida en 14 cantones de los cuales, según el Gobierno Autónomo Descentralizado Provincial de El Oro, los más habitados son: Machala, Arenillas, Santa Rosa, Huaquillas, El Guabo y Pasaje (MSP, 2015).

Machala: es el cantón y ciudad de El Oro con mayor cantidad de habitantes, siendo estos un total de 345.972. En la actualidad se encuentran ocupando un área total de 338 km² de la provincia. Tiene un clima cálido-tropical, influenciado por la corriente fría de Humbolt y la presencia de la corriente cálida del Niño que en ocasiones varia. Su temperatura promedio es variable de 18° a 34° C.

Arenillas: es un cantón que presenta una población de 26.844 habitantes, ocupando un espacio de 803 km². Tiene un clima cálido-tropical, con temperaturas entre 24° a 30 °C.

Santa Rosa: es uno de los seis cantones con mayor cantidad de habitantes, siendo estos un total de 69.036, ocupando un espacio de 889 km² a una altura de 8 m.s.n.m. Presenta un clima cálido tropical, con temperaturas entre 26° y 30°C

Huaquillas: es un cantón de la Provincia del Oro ubicada en la frontera con Perú, tiene una población de 48.285 habitantes ocupando un total de 72 km² a una altura de 7 m.s.n.m. Presenta un clima cálido-tropical, con temperaturas de entre 26° y 32°C.

El Guabo: este cantón presenta una población total de 50.009 habitantes, ocupando un espacio de 603 km² a una altura de 9 m.s.n.m. Presenta un clima cálido-tropical, con temperaturas entre 24° y 29°C.

Pasaje: este cantón presenta una población total de 72.806 habitantes, ocupando un espacio de 804 km² a una altura de 18 m.s.n.m. Presenta un clima cálido-tropical, con temperaturas entre 18° y 28°C.

En general, todos los cantones mencionados anteriormente además de ser los más poblados de la provincia de El Oro, presentan temperaturas óptimas para el desarrollo del mosquito *Aedes aegypti* (MSP, 2015).

2.2. Enfermedades relacionadas a *Aedes aegypti*

2.2.1. Generalidades

El mosquito *Aedes aegypti* ha sido conocido durante varias décadas como el mosquito responsable de la transmisión del virus de la fiebre amarilla y el virus del dengue. Desde su descubrimiento en 1900 donde se identificó al mismo como el vector del virus de la fiebre amarilla, su estudio se ha vuelto de alta importancia a nivel mundial y en especial en zonas con clima tropical y sub tropical. Tanto la fiebre amarilla como el dengue tienen su origen en África y se cree que llegaron a las Américas dentro de las embarcaciones que contenían esclavos cerca de los años 1500 (Schliessmann, 1965, pp. 460-465)

Recientemente se ha identificado que la fiebre amarilla y el dengue no son los únicos virus que pueden ser transmitidos por el mosquito *A. aegypti*. A lo largo de los años se han esparcido no solo nuevas enfermedades sino nuevas variantes de enfermedades existentes, como son los 4 serotipos de dengue que pueden encontrarse en la actualidad, generando cuadros clínicos mucho más letales y provocando una mayor afección al ser humano. Por otro lado, dentro de las nuevas enfermedades se encuentran el chikungunya y el zika (Oster, et al., 2016, p.120).

Por otro lado el Ecuador no es ajeno a las enfermedades mencionadas, siendo el dengue la enfermedad con mayor incidencia en el país, seguido de chikungunya y últimamente el zika. Tomando en cuenta la enfermedad del dengue únicamente como ejemplo. Mediante la información provista por el Ministerio de Salud Pública sobre dicha enfermedad, según los boletines emitidos por la institución, existe un enorme aumento en el número de casos reportados (MSP, 2016). Lo que indica

que los mecanismos de control del mosquito no son los óptimos y de esta manera no permiten la disminución de enfermos, lo cual se relaciona de igual manera con todas las enfermedades que el mosquito transmite o pueda transmitir.

De igual manera basándose en datos presentados por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador, dichas enfermedades son de mayor importancia en provincias como El Oro, Guayas, Esmeraldas y Manabí, esto debido a que son provincias con mayor número de casos reportados de las enfermedades mencionadas (MSP, 2016).

2.3. Métodos de control

2.3.1. Generalidades

Los métodos utilizados para el control del vector pueden ir desde el uso de insecticidas y larvicidas (métodos químicos) hasta el control biológico. El cual consiste en el uso de organismos que actúan como enemigos naturales sobre las larvas de *Aedes aegypti* como lo menciona Hernández, Garcia (2000, pp 32-38) y Schaper (1998. pp 119-125). Actualmente ciertos países como Brasil, Malasia y las Islas Caimán específicamente en la isla Gran Caimán han optado por el uso de mosquitos machos *Aedes aegypti* genéticamente modificados los cuales son portadores de un gen letal, este gen al ser transmitido a la descendencia genera la muerte del mismo antes de alcanzar la adultez, lo que conlleva a una reducción en la población (Garro y Méndez, 2016, pp. 3-4). Sin embargo, el uso de insecticidas para el control del vector sigue siendo ampliamente preferido. Los insecticidas más utilizados pertenecen al grupo de los piretroides y esto se debe a que han demostrado ser superiores a todos los demás insecticidas empleados en los diferentes programas de control de vectores. También debido a la baja toxicidad que estos representan para los mamíferos, la baja actividad residual en la naturaleza y su rápida acción de derribo del vector (Kushwah et al., 2015, pp 1-7).

El éxito del control del vector mediante el uso de insecticidas se basa en el conocimiento de la situación de resistencia del insecto a los distintos insecticidas que se utilizan (Kushwah et al., 2015, pp 1-2).

2.3.2. Control químico

Existen diferentes tipos de insecticidas que son utilizados para controlar tanto larvas y mosquitos adultos de *Aedes aegypti*. En la actualidad en las campañas de control larvario del mosquito a nivel mundial se utiliza el larvicida temefos. El amplio uso de este larvicida se debe a que se encuentra autorizado por la OPS/OMS. Esta técnica se la conoce como control focal, y los larvicidas son aplicados en los recipientes que se utilizan para almacenar agua que posteriormente servirán para el consumo humano (Suarez y Verbel, 2013, p 1). Los larvicidas que se emplean en los depósitos de acopio de agua deben contar con las siguientes condiciones para su uso: baja toxicidad para otras especies, específicamente para el ser humano y no deben de alterar de forma significativa el sabor, olor o color del líquido vital almacenado (OMS, 2016).

Para el control de los mosquitos adultos se utiliza adulticidas que deben estar aprobados por la OPS/OMS. Para su aplicación se utiliza la técnica de rociamiento a pequeña escala (intradomiciliaria), como también fumigaciones a gran escala utilizando máquinas montadas en vehículos que realizan rozamiento por manzanas o máquinas portátiles. Esta técnica se la recomienda en caso de epidemias y de este modo lograr la eliminación de poblaciones de mosquitos presentes en el área tratada, lo cual permite reducir rápidamente la circulación del virus en la comunidad (Suarez y Verbel, 2013, p 1), (OPS, 2016).

2.3.3. Control del mosquito *A. aegypti* en el Ecuador

El uso de químicos para el control del vector es ampliamente utilizado en el país. Para el control de larvas *Aedes aegypti* se utiliza con mayor frecuencia el larvicida

“temefos” (Ministerio de salud pública del Ecuador MSP, 2016), y para el control del mosquito adulto el insecticida piretroide “deltametrina” y el organofosforado “malatión”, la aplicación de ambos insecticidas se realiza mediante aspersores como lo indica la OMS.

En el Ecuador el uso de control biológico del vector se encuentra en proceso de desarrollo, con el uso del biolarvicida “Bactivec”, el cual emplea el *Bacillus thuringiensis israelensis* (Ministerio de salud pública del Ecuador MSP, 2016). La aplicación inicial será llevada a cabo por parte del personal capacitado para el uso del mismo. El tratamiento consiste en la aplicación del producto en los contenedores de almacenamiento de agua que son vulnerables a la ovoposición del vector y que posteriormente serán utilizadas para consumo o uso en el hogar. Después del primer tratamiento por parte del personal encargado este proceso deberá ser continuado por los moradores quienes serán previamente capacitados, orientados y supervisados por parte de las personas encargadas (Ministerio de salud pública del Ecuador MSP, 2016).

2.4. Insecticidas

2.4.1. Generalidades

Se llaman insecticidas a todas las sustancias o mezcla de sustancias que son utilizadas para prevenir o controlar plagas, los cuales son considerados dañinos para las actividades del hombre como agricultura, ganadería e incluso que genere malestar en la población como son los insectos vectores de enfermedades (Tuzimski. 2016, p 11).

El ser humano ha hecho uso de las sustancias químicas para combatir plagas desde tiempos inmemorables. El primer pesticida del que se tiene registro data del siglo XV siendo el azufre como lo indica Tuzimski (2016, pp. 11-13) y Matsumura (1975, pp 45-46) en cada uno de sus libros respectivamente.

El dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) fue el primer compuesto orgánico sintetizado en el año 1874 por el científico alemán Othmar Zeidler donde su uso como insecticida en el año 1939 revolucionó el modo de controlar plagas transformándose en el insecticida más utilizado en todo el mundo gracias a su actividad, persistencia, insolubilidad, costo de producción y facilidad de aplicación. En esa época el DDT gozaba de una reputación envidiable sobre todo porque se lo empleaba ampliamente para el control de insectos vectores de enfermedades entre ellos *A. aegypti* (Tuzimski. 2016, p. 11).

El uso del DDT fue restringido debido a las complicaciones causadas al medio ambiente y a la salud pública. Después de la aparición del DDT surgió una ola de elaboración de insecticidas como fueron los organofosforados, carbonatos y por último los piretroides (Tuzimski. 2016, pp 11-13), (Matsumura 1975, pp 45-46).

Los insecticidas se diferencian por su modo de acción (Sternersen, 2004, pp 213-228). El cual es otorgado por las moléculas que se encuentran conformando o forman parte de su composición química.

A partir de la molécula de la cual se encuentran conformados se los clasifica en cuatro grandes grupos piretroides, organofosforados, organoclorados y carbonados (Tuzimski. 2016, pp 12-14).

2.4.2. Piretroides

2.4.2.1. *Historia y evolución*

El piretro es uno de los insecticidas más antiguos y utilizados por el hombre (Agency for toxic substances and disease registry, 2003). Este insecticida natural proveniente de la flor del crisantemo y se encuentra formado por seis ésteres, siendo estos los componentes activos del insecticida y son conocidos como piretrinas (Schleier, 2011).

Las piretrinas se clasifican en tipo I y II. Las moléculas del grupo de las piretrinas tipo I, son ésteres del ácido crisantémico y las del grupo piretrinas tipo II, son ésteres del ácido pirétrico.

Las piretrinas presentan algunas desventajas en cuanto al tiempo de acción debido a que se degradan rápidamente en el ambiente, son fotosensibles. Además son poco solubles en agua (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2003). Para poder corregir estos inconvenientes el hombre ha desarrollado los piretroides que son moléculas sintéticas con estructuras muy similares a la de las piretrinas (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2003). A lo largo de los años se ha modificado la estructura de los piretroides, pero se ha mantenido los componentes básicos de las piretrinas como son el ácido crisantémico unido a un alcohol aromático a través de un enlace éster (Schleier, 2011).

Según Schleiner (2011, pp. 69-80) e Isern (2002), debido a que los piretroides son de carácter sintético, estos han presentado un proceso de evolución en cuanto a su estabilidad y efecto como insecticida. A continuación, se muestra su clasificación por generación:

Piretroides de primera generación: se generaron en la década de los 40 al 60. Aletrinas y sus isómeros, Partrina, Dimetrina, Benatrina, Tetrametrina, etc (Isern, 2002).

Piretroides de segunda generación: obtenidos en la década de los 70. Los japoneses reemplazaron los metilos de la cadena lateral del carbono 3 del ciclopropano por cloro, obteniéndose el primer piretroide totalmente fotoestable: la permetrina. En esta generación se encuentran también cipermetrina, deltametrina y fenvalerato (Isern, 2002).

Piretroides de tercera generación: obtenidos en la década de los 70 y 80 por la empresa Sumitomo. Logró añadir cualidades como foto estabilidad, poca volatilidad, fuerte acción letal, y se eliminó los halógenos, por considerarlos como un componente altamente recalcitrante. De este modo se obtuvo el cifenotrin (Isern, 2002).

Gammon, Brown, y Casida en su estudio llevado a cabo en 1981 clasificaron a los piretroides en dos tipos, basándose en la presencia o ausencia del grupo α -ciano en su molécula. Esta clasificación también se da por el tipo de acción del piretroide y los síntomas que genera el envenenamiento tal como lo indican Bradberry en el año 2005, Dong en el año 2014, Du et al., en el 2008, Forshaw y Ray en el año 2000, Pan American Health Organization (PAOH) en el año 2015 y Schleider en el año 2011.

2.4.2.2. *Mecanismo de acción de los piretroides*

Los piretroides al igual que el DDT, actúan a nivel del sistema nervioso del insecto alterando el funcionamiento del canal de sodio de la membrana nerviosa, lo que causa alteraciones en la transmisión del impulso y posteriormente la muerte (Du et al., 2013, pp. 1-8).

Específicamente los piretroides actúan uniéndose a las subunidades de los canales de sodio que se encuentran en el sistema nervioso de los insectos, permitiendo a que estos se mantengan abiertos. Este cambio en el canal ocasiona la despolarización persistente de la membrana plasmática lo que produce hiperexcitabilidad, generando parálisis y muerte del individuo, este fenómeno se conoce como *knockdown*.

En *Aedes aegypti*, las mutaciones que se dan en el gen codificante para los canales pueden generar una alteración en la conformación del sitio diana donde el

piretroide tiende a unirse, este cambio conlleva a que se genere resistencia a estas sustancias (Linns, et al., 2014, p 1).

2.4.2.3. *Piretroides en el Ecuador*

En el Ecuador se crea en el año 1967 el Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores Artrópodos (SNEM), con el fin de fortalecer el control de la malaria y del mosquito *Aedes Aegypti*, el SNEM se centró en los usos de insecticidas residuales siguiendo esquemas de control de rociamiento intra-domiciliario. (MSP, 2015). Durante esos años se hizo uso de DDT con el fin de disminuir los casos de fiebre amarilla pero debido que el DDT se lo clasificó como un compuesto altamente tóxico y perjudicial para la salud, en el año 2004 se prohibió plenamente su uso.

El piretroide “deltametrina” es el principal insecticida empleado en nuestro país para el control de *Aedes aegypti*. Se aplicaron fumigaciones intradomiciliarias especialmente en provincias costeras del país como El Oro, Guayas y Esmeraldas. El empleo de piretroides en el Ecuador no ha sido únicamente para el control del mosquito *A.aegypti*, sino que también se ha empleado en la agricultura para el control de insectos como: polillas de la papa, pulgones, moscas barrenadores en cultivos de haba, chinches en cultivos de maracuyá y ciruelo, entre otras, donde dichas fumigaciones se han realizado mediante piretroides como: alfametrina, lambdacyhalotrina, cipermetrina, deltametrina y fenvalerato (Rogg, 2000, pp.209-450).

2.5. Mecanismos de resistencia a insecticidas

2.5.1. Generalidades

A medida que el hombre ha intentado tomar control del ambiente en el cual se desarrolla, se ha ingeniado maneras o métodos para combatir distintas plagas que lo han afectado ya sea en cuanto la producción agrícola de alimentos como en la

salud de la población. Para poder controlar estas plagas se ha utilizado empíricamente sustancias orgánicas conocidas como “insecticidas” los cuales pueden ser de origen natural o sintético (Matsumura 1975, pp 45-46), Tuzimski. 2016, p 11). A medida que el hombre ha dado mayor uso a los insecticidas, ha incrementado la necesidad de obtener un compuesto con mejor acción para combatir vectores portadores de enfermedades y que a su vez no generen daños en la salud de animales y del medio ambiente (Mallet, 1989, p. 167). Sin embargo, la utilidad de los mismos se ha visto limitada a medida que transcurre el tiempo de uso, esto debido a la presión selectiva generada por los insecticidas y que se encuentra desarrollando mecanismos de resistencia.

La resistencia según la FAO (1979) es definida como “la capacidad desarrollada por una población determinada de insectos, la cual no se ve afectada por la aplicación de insecticidas”, lo que implica que un insecto o conjunto desarrolla la habilidad complementaria y hereditaria que les otorga tanto fisiológicamente como etológicamente la capacidad para bloquear la acción de un insecticida. Esto puede darse por mecanismos metabólicos o no metabólicos. Permitiendo al insecto sobrevivir cuando este se encuentra expuesto a dosis que para otros sería letal (Brattsen, 1990, pp. 25-40).

Existen diferentes tipos de resistencia como la resistencia cruzada: es el fenómeno por el cual, al someter una población a un insecticida, genera resistencia indirecta a otro que tiene el mismo modo de acción afectando por lo menos un mecanismo de resistencia común (Ponce, et al, 2006). Un claro ejemplo se observa con el DDT y los piretroides, esto se debe a que ambos insecticidas tienen como mecanismo de acción interferir en el sistema nervioso del insecto. Es por ello que poblaciones que han sido expuestas a DDT durante años pueden desarrollar rápidamente resistencia a piretroides.

La resistencia cruzada negativa: ocurre cuando una población que a lo largo del tiempo desarrollo o adquirió resistencia a un insecticida y este retorna a la

susceptibilidad cercana a la original, por causa del uso de otro insecticida con modo de acción distinto al que se utilizaba previamente (Figuroa et al., 2006, p. 1).

Otro tipo de resistencia es la múltiple, la cual indica que las poblaciones del mosquito han generado resistencia a varios insecticidas, a los cuales pudo o no haber sido expuesto. Poseyendo de esta manera varios mecanismos de resistencia actuando al mismo tiempo (Ponce et al., 2006).

Actualmente la capacidad de resistencia a insecticidas es un problema que afecta a los programas establecidos de control de vectores, esto se debe a que se encuentra presente en géneros de mosquitos de alta relevancia médica entre los cuales se sitúa *Aedes aegypti* (Figuroa et al., 2006, pp. 39-47). Por ende, la aplicación de piretroides como insecticidas requiere un monitoreo constante de las poblaciones del insecto blanco con el fin de determinar una posible resistencia y tomar medidas correctivas (Helmuth, 2000, p. 181).

2.5.2. *Aedes aegypti*

Para *Aedes aegypti* se han descrito dos tipos de mecanismos de resistencia: la primera es resistencia metabólica y la segunda es la insensibilidad en el sitio de acción (Rodríguez, Lazcano, Zavala y Carmen, 2012, pp. 16-17). El primer mecanismo se basa en el incremento en la actividad enzimática, específicamente de las enzimas esterasas, monooxigenasas y de la glutatión- S- transferasa (Chang, Hung, Chang, Wun y Daid, 2012). El segundo mecanismo se encuentra asociado a un polimorfismo en la secuencia del gen responsable de la expresión de las proteínas de membrana en el canal de sodio (Chang et al., 2012). La mutación que se genera en el gen da como resultado la sustitución de aminoácidos individuales en el canal de sodio generando insensibilidad hacia los insecticidas. Este tipo de resistencia se la conoce como *knockdown resistance* (*kdr*, por sus siglas en inglés) o resistencia al derribo (Du et al., 2013).

2.5.2.1. Canal de sodio dependiente de voltaje (Voltage-Gated sodium channel)

El canal de sodio dependiente de voltaje es un poro presente dentro de la membrana donde su función principal es permitir el flujo de una manera altamente selectiva a los iones de sodio. Este canal permite a los animales detectar estímulos tanto internos como externos, permitiendo al mismo reaccionar con velocidad y coordinación frente a dichos estímulos. El funcionamiento del canal de sodio genera cambios en la carga de la membrana (positiva o negativa) y de esta manera transmite el impulso eléctrico de una neurona mediante el flujo de iones sodio. La apertura y cierre del canal se da por los procesos de activación e inactivación respectivamente (Dong et al., 2014, pp 1-17).

El ciclo de funcionamiento del canal empieza con la activación o apertura del canal que se da con la despolarización de la membrana permitiendo el ingreso de iones sodio, posterior a la despolarización ocurre la inactivación del canal y su repolarización de la membrana lo cual permite la desactivación del canal, con lo cual la membrana entra en reposo lista para realizar nuevamente el ciclo (Figura 9).

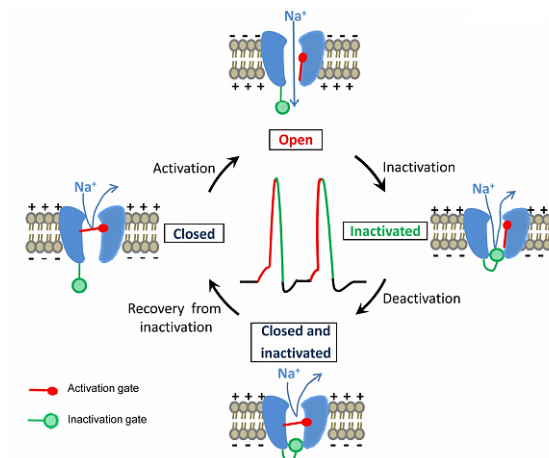


Figura 9. Ciclo de funcionamiento del canal de sodio.

Tomado de Davies et al., 2007, p. 97.

La estructura del canal comprende cuatro dominios homólogos (I - IV) conformados por 6 hélices transmembrana conocidos como “segmentos transmembrana” (S1 a S6). Cada uno de los segmentos cumplen una función distinta dentro del canal de sodio. Por un lado, los segmentos S1 al S4 actúan como módulos de detección del voltaje y los segmentos S5 y S6 se unen para formar un poro central el cual es el conductor de los iones. Los segmentos 4 y 5 son los encargados de enviar la señal de apertura y cierre del canal, siendo el segmento 6 el que facilita esta acción (Figura 10).

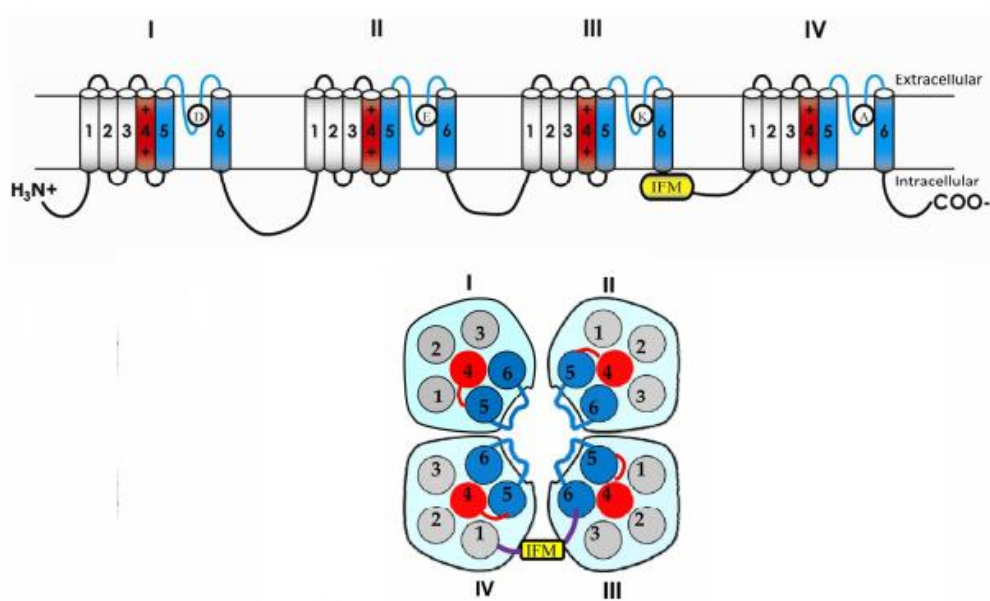


Figura 10. – Estructura del canal de sodio.

Tomado de Davies et al., 2007, p. 99.

2.5.2.2. Mutaciones *kdr*

Han sido detectadas una serie de mutaciones en diferentes órdenes de insectos las cuales tienen un efecto en la susceptibilidad o resistencia, hacia los piretroides. Este mecanismo es conocido como *knockdown resistance* o mutaciones *kdr*, las cuales son ocasionadas por el cambio de aminoácidos en la proteína del canal de

sodio y de esta manera dan lugar a cambios conformacionales en todo el canal sin perder el funcionamiento adecuado de su papel fisiológico. De esta manera el mosquito adquiere un mecanismo que le ayuda a evitar la acción del insecticida, haciendo en este caso que la molécula del insecticida no sea reconocida por el canal de sodio (O'Reilly, et al., 2014, p 2), (Du et al., 2013).

Las mutaciones *kdr* pueden darse dentro de cualquier segmento de los cuatro dominios que conforman la proteína (Figura 10). Siendo la posición en la que se presente la mutación un determinante en el grado de resistencia al piretroide (tipo I o tipo II).

El estudio del mecanismo de *kdr* en las últimas dos décadas ha generado el conocimiento de más de 50 mutaciones existentes en el canal de sodio las cuales se encuentran asociadas a la resistencia hacia los piretroides. Muchas de estas mutaciones pueden ser detectadas en varias especies mientras que otras son propias de una sola especie. Aun así, falta por investigar el mecanismo de acción de muchas de estas mutaciones. La primera mutación *kdr* reportada fue la L1014F en el segmento 6 de la subunidad II, en esta posición se han encontrado algunas variantes en especies relacionadas con resistencia a piretroides a nivel mundial. De esta manera se han reportado varias mutaciones en el canal de sodio como V410 (M / A / G / L) en IS6, M918 (T / L / V) en el enlazador que conecta S4 y S5 en el dominio II, T929 (I / C / N / V) en IIS5, I1011M / V y V1016G / I en IIS6, L1014F, L1014H y L1014S, I1011M V1016G en IIS6, reducen la sensibilidad del canal hacia los insecticidas. Si existe la presencia de varias de estas mutaciones se las conoce como súper *kdr* debido a que otorga una mayor resistencia a los piretroides ya sean de tipo I o de tipo II. También existen mutaciones de las cuales se desconoce su acción por ello siguen en investigación (Dong et al., 2014, pp 13-14), (O'Reilly et al., 2014, p 2), (Wulliardari et al., 2015, pp 1-2).

En *Aedes aegypti* las mutaciones confirmadas que otorgan resistencia a piretroides han sido S989P, I1011M, 1016G / I y F1534C (Sayono et al., 2016, p 1).

2.5.2.3. Mutaciones *kdr* reportadas en las Américas

En la actualidad se ha observado que ambas sustituciones Val1016Ile y Phe1534Cys se encuentran asociadas a la resistencia al piretroide “Permetrina” (Harris, 2010, p. 280).

El aumento en la frecuencia alélica de la mutación Val1016Ile es generado mediante la exposición de poblaciones de mosquito *A. aegypti* al piretroide deltametrina (García et al, 2009, p. 608) (Saavedra, K., 2007, p. 790).

La mutación Phe1534Cys también fue encontrada en las poblaciones analizadas por García (2009) con el uso de deltametrina. Ambas mutaciones según Harris (2010) y aseverado por Linss (2014), se encuentran ampliamente distribuidas dentro de América Latina y el Caribe. Sin embargo, Stenhouse, et al., (2013) en su investigación para determinar si la mutación Phe1534Cys se encuentra involucrada en la resistencia a deltametrina determinó que los mosquitos que presentaban la mutación en homocigosis morían al cabo de una hora al ser expuestos a la deltametrina por ello asumió que es posible que si se encuentra en homocigosis no otorgue resistencia a deltametrina. A pesar de esto, y debido a la alta frecuencia de la mutación en individuos resistentes el mismo autor declara que estos datos proporcionan una fuerte evidencia de que la mutación si contribuye a la resistencia para el piretroide deltametrina.

Las mutaciones Val1016Ile y Phe1534Cys se encuentran en el segmento 6 del dominio II y III y en los exones 21 y 31 respectivamente de la secuencia codificante del gen (*para*). (Linns, et al., 2014, pp 1-2; Chang, 2009, p 1; Harris, 2010, p.5).

En el Ecuador no existe un estudio de la distribución de mutaciones *kdr* presentes en las poblaciones de *Aedes aegypti*.

2.6. Técnicas de identificación de poblaciones *Aedes aegypti* resistentes a insecticidas

2.6.1. Generalidades

Desde el primer registro de resistencia a insecticidas tipo *kdr* en el año 1975, los estudios tanto fenotípicos y genotípicos se ha vuelto cada vez mucho más importantes con el fin de conocer la o las mutaciones que se encuentran directamente relacionadas con esta resistencia (Soderlund y Bloomquist, 1990, pp. 58-96).

Los bioensayos se han diseñado con el fin de conocer en si un tipo de insecticida se encuentra siendo útil para el control del desarrollo de una población de insectos. Con el fin de relacionar la resistencia a algún tipo de cambio en el insecto a nivel molecular se han combinado herramientas de biología molecular al bioensayo.

2.6.2. Bioensayo

Se lo ha planteado como un método previo para comprobar la efectividad de un insecticida en controlar las poblaciones del insecto a analizar. Este método fue propuesto por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, 2007, p.4).

Los bioensayos pueden ser realizados mediante el empleo de botellas o papeles impregnados con el insecticida a una concentración conocida o a evaluar. Cabe mencionar que el protocolo de la botella recomendado por la CDC, según Valderrama (2008, pp. 1-11), resulta una técnica mucho más sensible y sencilla de emplear a relación de la técnica del papel impregnado con insecticida. Los datos

obtenidos de su investigación en la evaluación de dosis y tiempos diagnósticos para la cepa susceptible (Rockefeller) de *Aedes aegypti*, son muy similares mediante el empleo de las dos técnicas mencionadas.

La identificación de dosis y tiempos de diagnóstico son dos variables muy importantes determinadas mediante el bioensayo ya que permiten generar un contraste entre poblaciones de insectos susceptibles y a evaluar y de esta manera conocer si la población presenta un grado de resistencia al insecticida. Por lo general las poblaciones susceptibles Rockefeller y Nueva Orleans son empleadas en el caso del mosquito *Aedes aegypti* debido a que estas poblaciones son mantenidas en el laboratorio y no presentan ningún tipo de mutación y jamás han sido expuestas a ningún tipo de insecticida (CDC, 2007).

2.6.3. Análisis molecular

Para relacionar la resistencia determinada mediante el bioensayo a algún tipo de cambio genotípico del insecto, se han empleado técnicas que permitan básicamente analizar el genoma, como también el metabolismo del insecto en cuanto a cómo el insecto reacciona frente a la molécula del insecticida. Una de las técnicas aplicadas con el fin de determinar la presencia o ausencia de mutaciones *kdr* ya identificadas y de secuencia conocida es la Reacción en Cadena de la Polimerasa por sus siglas en inglés PCR. Esta técnica permite mediante el empleo de oligonucleótidos (primers) previamente diseñados, amplificar una secuencia conocida de ADN (Harris, 2010, p.5). Además, Harris, J., en el año 2010 en su estudio de evaluación de las mutaciones Val1016Ile y Phe1534Cys, para determinar la presencia de la mutación Phe1534Cys usó los primers que se detallan en la Figura 11, los cuales le permitieron determinar homocigocis y heterocigosis de la mutación donde el genotipo salvaje o wild type tiene un peso de 231 pb y el genotipo mutante un peso de 163 pb.

Sequences of primers used for partial amplification of the <i>Aedes aegypti</i> sodium channel gene in the current study			
Region amplified	Primer name	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
Exon 31	AaEx31P	TCGCGGGAGGTAAGTTATTG	350
	AaEx31Q	GTTGATGTGCGATGGAAATG	
	AaEx31wt	CCICTACITTTGTTCTTCATCATCTT	231
	AaEx31mut	GCGTGAAGAACGACCCGC	163

Figura 11. Secuencias de primers usados para amplificación del exón 31 y tamaño de producto para cada par de primers.

Tomado Harris, 2010, p.5.

Para la amplificación de la mutación Val1016Ile. Saavedra en el 2007 utilizó el juego de primer representados en la Figura 12 obteniendo como resultado un producto de alrededor de 80 pb.

(5'-GCGGGCAGGGCGGGCGGGGGCGGGGCC [allele-specific primer 1]-3' or 5'-GCGGGC [allele-specific primer 2]-3').

Figura 12. Secuencias de primers usados para amplificación de la mutación Val1016Ile.

Tomado de Saavedra, 2007, p.710.

Otra técnica empleada que además de permitir conocer secuencias conocidas, indica secuencias nuevas y de esta manera determinar nuevas mutaciones que se relacionen a una resistencia es la “secuenciación” de un fragmento de ADN donde se conoce se encuentra el gen responsable de generar una afinidad hacia el insecticida (Chang, 2009, p. 273).

Para el caso de la secuenciación de ADN es necesario el análisis mediante herramientas bioinformáticas que permitan comparar secuencias y de esta manera determinar cambios en el genoma

Para poder realizar cualquiera de estas técnicas moleculares mencionadas es necesario la obtención del material genético es decir obtener los ácidos nucleicos o proteínas del individuo a analizar, en el caso de las mutaciones *kdr*, es necesario la obtención del ADN genómico presente en el mosquito (Linns, 2015, p.11).

3. DISEÑO DE PLAN EXPERIMENTAL

Los tratamientos consistieron en el empleo de mosquitos *Aedes aegypti* hembras y machos (Tabla 1) de cada una de las seis localidades (Tabla 2) de la provincia de El Oro. Como control se empleó mosquitos *Aedes aegypti* de la cepa susceptible “Rockefeller”. Todos los mosquitos mencionados fueron expuestos a una solución del piretroide “deltametrina” a 10 ppm. Todo el material biológico (mosquitos), fue provisto por el INSPI- CIREV con el fin de cumplir parte del objetivo de estudio “*Determinar los focos y el nivel de resistencia de los estadios adultos e inmaduros de Ae. aegypti a los pesticidas utilizados en el Ecuador*”, planteado en el proyecto “Sistema Nacional de Alerta Temprana para el control del Vector de Dengue y Fiebre Amarilla (Fase I)”, el cual tiene financiamiento del SENECYT bajo el código: PIC-12-INH-002.

Tabla 1.

Factor: Sexo y sus dos niveles

Sexo	
1	2
Macho	Hembra

Tabla 2.

Factor: Localidad y sus seis niveles

Localidad					
1	2	3	4	5	6
Arenillas	Huaquillas	El Guabo	Machala	Santa Rosa	Pasaje

Obteniendo un total de 12 tratamientos con 2 repeticiones cada uno (Figura 13).

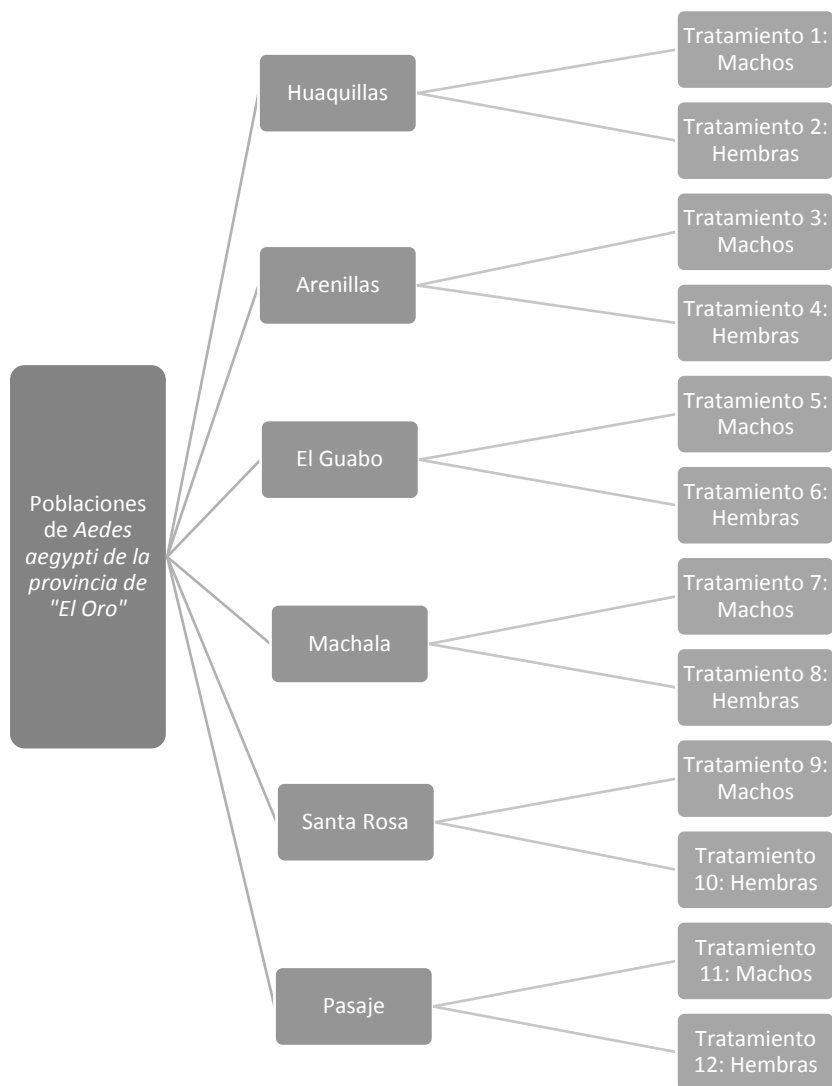


Figura 13. Tratamientos y repeticiones.

4. PROCEDIMIENTOS

4.1. Determinación de la población y la muestra

Las poblaciones a analizar fueron mosquitos *Aedes aegypti* de seis cantones de la provincia de El Oro (Arenillas, Huaquillas, Machala, El Guabo, Santa Rosa y Pasaje), cantones los cuales se encuentran representados en la Figura 14. Todo el material biológico (mosquitos), fue provisto por el INSPI- CIREV con el fin de cumplir parte del objetivo de estudio “*Determinar los focos y el nivel de resistencia de los estadios adultos e inmaduros de Ae. aegypti a los pesticidas utilizados en el Ecuador*”, planteado en el proyecto “*Sistema Nacional de Alerta Temprana para el control del Vector de Dengue y Fiebre Amarilla (Fase I)*”, el cual tiene financiamiento del SENECYT bajo el código: PIC-12-INH-002.



Figura 14.- Mapa de la provincia de El Oro.

Tomado de Mapas Ecuador, s.f.

4.1.1. Muestra para bioensayos

Para los bioensayos, a partir de un “n” provisto de 70 mosquitos compuesto por 35 machos y 35 hembras para cada tratamiento. Se realizaron dos repeticiones siendo un “n” de 210 por localidad. Lo planteado por la CDC, p.9 en su manual llamado “Instrucciones para la evaluación de la resistencia a insecticidas en vectores mediante el ensayo biológico de la botella de los CDC”, sugiere que el “N” para cada bioensayo debería ser de al menos 100 mosquitos con el fin de obtener datos 100% confiables. Por ende al emplear una menor cantidad de mosquitos a la mencionada, se procedió mediante el despeje del margen de error (e) de la ecuación 1, determinar el porcentaje de confiabilidad de los datos obtenidos mediante cada bioensayo obteniendo la ecuación 2.

$$n = \frac{N * Z^2 * p * (1 - p)}{(N - 1) * e^2 + Z^2 * p(1 - P)}$$

Ecuación 1.- Calculo de n muestral mediante heterogeneidad de la muestra. Tomado de “Determinación de tamaño muestral mediante el uso de árboles de decisión” presentado por Valdivieso, C., et al, (2011)

$$e = \sqrt{\frac{(N - n) * (Z^2 * p * (1 - p))}{n * (N - 1)}}$$

Ecuación 2.- Despeje de la fórmula 1 para el cálculo del margen de error.

En la fórmula 2, para calcular el margen de error, se tomó 100 mosquitos como el tamaño de la población “N”, de igual manera se tomó como valor del “n” muestral al número mosquitos provisto que fue de 70. La heterogeneidad de la muestra (p) es de un 50% debido al empleo de 35 mosquitos machos y 35 hembras siendo el valor de “p” de 0.5. A una confiabilidad de 95%, la desviación del valor medio (Z^2) es de 1.96^2 . Basándose en los datos mencionados se obtuvo un margen de error para los bioensayos de 6.4479%.

4.1.2. Muestra para Análisis molecular.

Se emplearon muestras de mosquitos considerados “Vivos” después del análisis fenotípico (bioensayo) para cada localidad. Sin embargo, debido a la alta variabilidad en cuanto al porcentaje de mosquitos vivos entre cada localidad, se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia. Se tomó en cuenta a la localidad con menos mosquitos vivos la cual fue Pasaje con un “N” de 13 donde 9 fueron hembras y 4 machos, de dicha localidad se tomó un “n” de 12 mosquitos, 8 hembras y 4 machos. De las 5 localidades restantes se tomó un número homogéneo de 6 machos y 6 hembras con el fin de obtener un “n” de 12 y de esta manera mantener homogéneo el “n” entre localidades.

4.2. Materiales y métodos para la obtención de datos

4.2.1. Mantenimiento del mosquito *Aedes aegypti*

Las muestras de larvas y mosquitos adultos de *Aedes aegypti* colectados en la provincia de El Oro de las localidades: Huaquillas, Arenillas, Santa Rosa, El Guabo, Pasaje y Machala, fueron provistas por el Centro de Investigación y Referencia en Vectores (CIREV) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI).

Las larvas colectadas fueron clasificadas dentro del insectario, según su localidad y estadio larvario. Se colocó dentro de un contenedor plástico de capacidad de 4 litros, alrededor de 500 larvas por cada litro de agua en reposo (Pavon, J, 2015, p.16).

El mantenimiento de las larvas se realizó controlando 4 factores importantes: alimentación, limpieza, temperatura y fotoperíodo.

Para la alimentación se empleó comida de pez cuya composición se indica en la tabla 3. Se pesó en la balanza analítica 0.4 mg de alimento por cada larva. Una

vez pesado el alimento, se maceraba y mezclaba con agua destilada hasta el punto de obtener una masa que era sumergida en el fondo del contenedor plástico. El proceso de alimentación se realizó 3 veces a la semana (Pavon, J, 2015, p.16).

Tabla 3.

Composición del alimento utilizado en la alimentación de larvas.

Componente	Porcentaje
Proteínas	30%
Grasa	5%
Fibra	4%

Con el fin de evitar cambios de pH en el agua debido a la presencia de desechos producidos por las larvas, el agua fue renovada 3 veces a la semana. El agua contaminada era hervida previa a ser desechada y de esta manera evitar la fuga de larvas vivas o cualquier otra contaminación hacia el medio ambiente. Por otro lado, como método para garantizar un buen desarrollo de las larvas, estas eran mantenidas a 28°C mediante el empleo de un calentador eléctrico que era sumergido en el contenedor plástico. Además las larvas se mantuvieron con fotoperíodos de 12 horas (Pavon, J, 2015, p.19).

Una vez que las larvas entraron en la fase de pupa fueron colocadas dentro de contenedores plásticos de 80mL con agua reposada. Dicho contenedor fue colocado dentro de la jaula de mosquitos adultos con el fin de que el mosquito adulto emerja. Las pupas no necesitan alimentación y la limpieza del agua se realizó 3 veces a la semana debido a la acumulación de exuvias en la superficie del contenedor.

Los mosquitos adultos se mantuvieron dentro de jaulas de 30cm x 30cm (Figura 15). Los adultos tuvieron fotoperíodos de 12 horas a una temperatura media de entre 28 °C a 32 °C.



Figura 15. Jaula de 30cm x 30cm para mosquitos adultos.

Los mosquitos adultos machos y hembras fueron alimentados con una solución de sacarosa al 10 %. Adicionalmente las hembras con el fin de obtener huevos F2 dentro del laboratorio, fueron alimentadas con sangre de cobayo por un período de 45 min por 3 días a la semana.

Para la recolección de huevos se empleó papel cromatográfico humedecido en agua destilada colocado sobre un contenedor plástico oscuro, dicho papel fue renovado cada 72 horas con el fin de garantizar una cantidad razonable de huevos F2 a ser almacenados (Figura 16).



Figura 16. Recolección de huevos en papel cromatográfico.

El papel que contenía los huevos se mantuvo en la incubadora por 72 horas a 27°C previo a su almacenaje, garantizando de esta manera que se culmine el desarrollo del huevo para que el mismo sea viable (Pavon, J, 2015, p.13).

Una vez obtenida una cantidad razonable de huevos para cada una de las 6 localidades, los huevos almacenados fueron sumergidos en agua en reposo durante 72 horas a una temperatura de 27 °C con el fin de obtener larvas F2 de 1er estadio. Se sumergieron alrededor de 500 huevos por cada litro de agua en reposo.

Las larvas fueron contabilizadas y mantenidas hasta que alcanzaron su fase adulta, donde una vez alcanzada su fase adulta estos eran separados por sexo (hembras y machos) con el fin de ser sometidos a los bioensayos.

4.2.2. Bioensayo

El bioensayo consistió en el uso de la metodología de las botellas de vidrio impregnadas con insecticida, propuesta por el Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC).

El material biológico empleado fueron mosquitos adultos F2 machos y hembras de las seis localidades, que se encontraban en edades de 3 a 8 días de emergidos, alimentados únicamente con una solución de sacarosa al 10 %.

La solución de deltametrina de 10 ppm se tomó debido a que dicha concentración es la dosis letal planteada por la CDC. Esta solución se obtuvo mediante la dilución de deltametrina de grado técnico (2.5 %) en etanol absoluto.

El bioensayo consistió básicamente en colocar una cantidad homogénea de mosquitos machos y hembras dentro de botellas de 250mL impregnadas con una solución de deltametrina de 10 ppm, tomando en cuenta de no colocar más de 25 mosquitos por botella. Todo el procedimiento se llevó a cabo siguiendo los métodos de seguridad recomendados para la manipulación del insecticida.

4.2.2.1. Manejo de las botellas

Previo a la impregnación de las botellas con el insecticida, las mismas fueron lavadas, enjuagadas, etiquetadas y secadas dentro de la estufa.

Para el proceso de impregnación, dentro de cada botella se colocó 1mL de deltametrina a 10 ppm en cada botella, a excepción de la botella control, ya que esta era solamente impregnada con 1mL de etanol de grado técnico como lo menciona el manual del CDC.

Para que la distribución del insecticida dentro de las botellas de 250mL fuese lo más homogéneo posible, se agitó las botellas con movimientos circulares

observando que la distribución de la solución del insecticida recubriera totalmente todo el cuerpo de la botella desde el fondo hasta el borde y el interior de las tapas. Este proceso se lo realizó hasta que no existiesen señales visibles de la solución y las botellas se encuentren totalmente secas.

4.2.2.2. *Introducción de los mosquitos a las botellas impregnadas*

Los mosquitos fueron aspirados mediante un aspirador y transferidos a un contenedor (transportador), tratando siempre de transferir una cantidad homogénea de machos y hembras. Este paso permitió determinar el número de mosquitos a emplear por bioensayo, clasificar mosquitos machos y hembras y permitir al mosquito encontrarse en reposo previo a ser expuesto al insecticida, garantizando que el mismo no esté aturdido pudiendo afectar los resultados del bioensayo. Se transfirieron los mosquitos del contenedor directamente a las botellas impregnadas.

4.2.2.3. *Ensayo biológico*

Seguido a la transferencia de los mosquitos a las botellas, las mismas fueron registradas en el tiempo “0” de exposición al insecticida.

Posteriormente se procedió a registrar el número de mosquitos que se encontraban vivos o muertos (Knock down). Los mosquitos fueron considerados “muertos” o “Knock down” en caso de no haber podido mantenerse de pie o volar cuando se hacía rotar lentamente las botellas de prueba (Brogdon y Mcallister, 1998). El registro se realizó en períodos de 15 minutos hasta que la totalidad de mosquitos habían muerto, o hasta que se cumplieran las 2 horas como lo indica el manual del CDC.

Al finalizar las 2 horas se separaron los mosquitos muertos de los que sobrevivieron, considerando a los mismos como mosquitos “Vivos”.

Cada uno de los mosquitos tanto muertos como sobrevivientes fueron colocados mediante el empleo de pinzas quirúrgicas estériles, dentro de tubos eppendorf de 1.5mL con etanol al 70 % para su posterior almacenamiento a 4 °C, esto con la finalidad de preservar las muestras para su posterior análisis molecular.

4.2.3. Pruebas moleculares para detección de mutaciones (Phe1534Cys y Val1016Ile)

4.2.3.1. *Extracción de ADN*

La extracción de ADN de los mosquitos considerados sobrevivientes en los bioensayos, se realizó mediante el kit Qiagen Blood and Tissue (Qiagen, Hilden) Se colocó al mosquito entero en un tubo eppendorf de 1.5mL conjuntamente con 180uL de buffer ATL, el mosquito era macerado dentro del tubo mediante el empleo de un pistilo plástico estéril y un homogeneizador eléctrico. Seguido se añadió 20uL de proteinasa K y se mezcló mediante la ayuda del vortex. Luego las muestras fueron incubadas a 56 °C con agitación durante 16 horas. Transcurrido este tiempo se añadió a cada una de las muestras 200uL de buffer AL y 200uL de etanol absoluto. Esta solución fue llevada a columnas (DNeasy mini spin column) con tubos colectores de 2mL y se centrifugó por 1 minuto a 11000 rpm, después se descartó el tubo y la columna fue colocada dentro de otro tubo adicionando 500uL de buffer AW1. Se centrifugó nuevamente por 1 minuto a 8000 rpm. Luego el contenido del tubo se descartó y se adicionó 500uL de buffer AW2 a la columna. Se centrifugó por 12 min a 8000 rpm, el último paso mencionado se realizó una vez más. Se descartó el contenido del tubo y se adicionó 500uL de etanol al 100%. Se centrifugó nuevamente por 12 min a 8000 rpm y luego se descartó el contenido del tubo. Se incubó por 10 min a temperatura ambiente dejando la tapa de la columna abierta. Se colocó la columna dentro de un tubo eppendorf estéril de 1.5mL y se adicionaron 50uL de buffer de elución (Elution Buffer - AE). Se dejó incubar por 2 min a temperatura ambiente. Por último se centrifugó la columna con el tubo a 8000 rpm por un minuto, este proceso se realizó una vez más. Se obtuvo

un total de 100uL de ADN, el mismo fue que rotulado y almacenado a -20 °C. Este proceso se llevó a cabo únicamente con 24 muestras siendo estas 12 de Huaquillas y 12 de Pasaje entre mosquitos machos y hembras “Vivos”. Las muestras de las 4 localidades faltantes fueron analizadas usando un kit distinto.

4.2.3.2. Cuantificación de ADN (pureza)

Para la cuantificación de ADN se utilizó el NanoDrop programado para medir las longitudes de onda de 260 y 280nm. Para ello se colocó 2uL de ADN en el NanoDrop solo se realizó la cuantificación de las primeras extracciones como se muestra a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4.

Cuantificación de ADN para muestras de mosquitos.

Muestra	A260/A280	ng/uL
CR1	2,155	123,1
CR2	2,17	153,2
CR3	1,505	84,15
CR4	2,165	153,35
CR5	2,185	99,55
CR6	2,175	166,05
2,2L	1,165	39,2
2,3L	1,545	49
2,4L	1,505	39,7
2,5L	1,36	58,9
2,6L	2,17	45,3
2,7L	2,14	71,35
1,2L	2,095	27,1
1,3L	2,105	53,3
1,4L	2,14	67,35
1,5L	2,16	82,8
1,6L	2,145	23,1
1,7L	2,155	40,05
CN1	2,14	51,35
CN2	2,15	74,65
CN3	2,13	97,9
CN4	2,075	91,6
CN5	2,11	55,1
CN6	2,075	34,95

Nota. CR= Cepa Rockefeller; 2.2L a 2.7L= Larvas A. *Aegypti* de Huaquillas; 1.2L a 1.7L=Larvas A. *Aegypti* de Arenillas; CN= Cepa Nueva Orleans.

4.2.3.3. Amplificación de mutaciones *Phe1534Cys* y *Val1016Ile*

Para amplificar las mutaciones *Phe1534Cys* y *Val1016Ile* se empleó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa "PCR", por sus siglas en inglés.

Para la amplificación de ambas mutaciones se emplearon primers de concentraciones y secuencias mostradas en la tabla 5.

Además para la amplificación mediante PCR convencional, se empleó Gotaq Green Master Mix de Promega U.S.A.

Tabla 5.

Secuencias y concentración de primers empleados en la detección de las mutaciones

Mutación	Primer	Secuencia	Concentración (uM)
Phe1534Cys	Forward AaEx31p	5'- TCGCGGGAGGTAAGTTATTG-3'	10
	Reverse AaEx31q	5'- GTTGATGTGCGATGGAAATG-3'	10
	Reverse AaEx31 Mut	5'- GCGTGAAGAACGACCCGC-3'	10
	Forward AaEx31 Wt	5'- CCTCTACTTTGTGTTCTTTCTCATCTT- 3'	10
	Forward Ile1016	5'- GCGGGCACAAATTCCACCCGCACTGA- 3'	10
Val1016Ile	Reverse Val1016	5'- GGATGAACCGAAATTGGACAAAGC-3'	10

4.2.3.4. Amplificación de mutaciones *Phe1534Cys* y *Val1016Ile* mediante PCR convencional

4.2.3.4.1. Detección de la mutación *Phe1534Cys* mediante PCR convencional

Se rotularon tubos de PCR con el fin de amplificar tanto parte del segmento 6 del dominio 2 del canal de sodio (350pb), como el fragmento wild type (231pb) y el fragmento mutante (163pb), para machos y hembras sobrevivientes de las localidades de Pasaje y Huaquillas.

Una vez rotulados los tubos se prepararon los Master Mix tomando en cuenta el número de reacciones necesarias, los reactivos y sus concentraciones (tablas 6, 7 y 8).

Tabla 6.

Concentraciones y reactivos para master mix *Phe1534Cys* (Amplicón 350pb) con Gotaq master mix.

Reactivos	Ci	Concentración final	1Rx
H2O			5,5 uL
Primer F AaEx31p	10 uM	0.5 uL	1 uL
Primer R AaEx31q	10 uM	0.5 uL	1uL
GoTaq master mix	10X	12.5 uL	12,5 uL
Volumen final			20 uL

Tabla 7.

Concentraciones y reactivos para master mix *Phe1534Cys* (Fragmento Wild Type 231pb) con Gotaq maxter mix.

Reactivos	Ci	Concentración final	1Rx
H2O			5.5uL
Primer F Wild Type	10µM	0.5uL	1uL
Primer R AaEx31q	10µM	0.5uL	1uL
Gotaq	10X	12,5uL	12.5uL
Volumen final			20uL

Tabla 8.

Concentraciones y reactivos para master mix Phe1534Cys (Fragmento Mutante 163pb) con Gotaq

Reactivos	Ci	Concentración final	1Rx
H2O			5.5 uL
Primer F AaEx31p	10µM	0.5uL	1uL
Primer R Mut	10µM	0.5uL	1uL
Gotaq master mix	10X	12.5uL	12.5uL
Volumen final			20uL

Se dispensó 20uL de la solución en cada tubo de PCR, 5uL de la muestra de ADN. Se colocó en el termociclador con el programa correspondiente a la mutación (tabla 9).

Tabla 9.

Número de ciclos, temperatura y tiempo necesarios para la PCR (*Phe1534Cys*) con Gotaq

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo (segundos)
1	94 °C	540
40	94 °C	30
	60 °C	40
	72 °C	45
1	72 °C	600
1	4 °C	600

4.2.3.4.2. Amplificación de la mutación Val1016Ile mediante PCR convencional

Se rotularon los tubos de PCR con el fin de amplificar el fragmento mutante (78 pb), para machos y hembras sobrevivientes de las localidades de Pasaje y Huaquillas.

Una vez rotulados los tubos se prepararon los Master Mix tomando en cuenta el número de reacciones necesarias, los reactivos y sus concentraciones (tabla 10).

Tabla 10.

Concentraciones y reactivos para master mix Val1016Ile (Fragmento Mut 78 pb) con Gotaq

Reactivos	Ci	Concentración final	1Rx
H2O			5.5µL
Primer F Ile1016	10µM	5µL	1µL
Primer R Val1016	10µM	5µL	1µL
Gotaq master mix	10X		12.5µL
Volumen final			25uL

Se dispensó 20uL de la solución en cada tubo de PCR, y 5uL de la muestra de ADN. Se colocó en el termociclador con el programa correspondiente a la mutación (tabla 11).

Tabla 11.

Número de ciclos, temperatura y tiempo necesarios para la PCR (*Val1016Ile*) con Gotaq

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo (segundos)
1	95 °C	540
40	94 °C	30
	62 °C	40
	72 °C	45
1	72 °C	600
1	4 °C	600

4.2.3.5. *Amplificación de mutaciones Phe1534Cys y Val1016Ile mediante Direct PCR*

Se cortó el mosquito a analizar por la mitad mediante una hoja de bisturí estéril y pinzas quirúrgicas estériles y se colocó cada mitad dentro de un tubo eppendorf estéril de 1.5mL. Posteriormente se realizó una dilución de la mitad del mosquito tanto de machos y hembras sobrevivientes de las localidades de Santa Rosa, El Guabo, Machala y Arenillas. Para lo cual se utilizó el kit “Thermo Scientific Phire Animal Tissue Direct PCR”.

Se añadió dentro de un tubo de PCR estéril 20uL del buffer de dilución conjuntamente con la mitad del mosquito. Después se añadió 0.5uL de ADN Release Additive y se mezcló con la ayuda del vortex. Se centrifugó por 30 segundos asegurándose que la muestra esté completamente sumergida en la solución. Una vez centrifugado, se incubó las muestras a temperatura ambiente por 4 minutos y luego se incubó por 3 minutos a 98°C en el termociclador. Seguido se centrifugó durante 30 segundos y se colocó el sobrenadante en un tubo eppendorf estéril de 1.5mL. Se almacenó a -20 °C.

4.2.3.5.1. *Detección de la mutación Phe1534Cys mediante Direct PCR con protocolo de dilución*

Se rotularon los tubos de PCR con el fin de amplificar el fragmento wild type (210 pb) y el fragmento mutante (163 pb), para machos y hembras sobrevivientes de las localidades de El Guabo, Santa Rosa, Arenillas y Machala.

Una vez rotulados los tubos se prepararon los Master Mix tomando en cuenta el número de reacciones necesarias, los reactivos y sus concentraciones (tablas 12 y 13).

Tabla 12.

Concentraciones y reactivos para master mix Phe1534Cys (Fragmento Wild Type 210 pb)

Reactivos	Ci	Concentración final	1Rx
H2O			6uL
2X Phire Animal Tissue PCR Buffer		1X	12.5uL
Primer F Wild Type	10μM	0.5μM	2.5uL
Primer R AaEx31q	10μM	0.5μM	2.5uL
Phire Hot Start II ADN Polymerase	0.5uL		0.5uL
Volumen final			24uL

Tabla 13.

Concentraciones y reactivos para master mix Phe1534Cys (Fragmento Mut 163 pb)

Reactivos	Ci	Concentración final	1Rx
H2O			6uL
2X Phire Animal Tissue PCR Buffer		1X	12.5uL
Primer F AeEx31p	10μM	0.5μM	2.5uL
Primer R Mut	10μM	0.5μM	2.5uL
Phire Hot Start II ADN Polymerase			0.5uL
Volumen final			24uL

Se dispensó 24uL de la solución en cada tubo de PCR y 1uL del extracto del protocolo de dilución. Se colocó en el termociclador con el programa correspondiente a la mutación (tabla 14).

Tabla 14.

Número de ciclos, temperatura y tiempo necesarios para la PCR (*Phe1534Cys*)

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo (segundos)
1	98°C	300
40	98°C	5
	60°C	5
	72°C	20
1	72°C	60
1	4°C	60

4.2.3.5.2. Amplificación de la mutación Val1016Ile mediante Direct PCR con protocolo de dilución

Se rotularon tubos de PCR con el fin de amplificar el fragmento mutante (78 pb), para machos y hembras sobrevivientes de las localidades de El Guabo, Santa Rosa, Arenillas y Machala.

Una vez rotulados los tubos se prepararon los Master Mix tomando en cuenta el número de reacciones necesarias, los reactivos y sus concentraciones (tabla 15).

Tabla 15.

Concentraciones y reactivos para master mix Val1016Ile (Fragmento 78 pb)

Reactivos	Ci	Concentración final	1Rx
H2O			6uL
2X Phire Animal Tissue PCR Buffer	12.5uL	1X	12.5uL
Primer F Ile1016	10µM	0.5µM	2.5uL
Primer R Val1016	10µM	0.5µM	2.5uL
Phire Hot Start II ADN Polymerase			0.5uL
Volumen final			24uL

Se dispensó 24uL de la solución en cada tubo de PCR y 1uL del extracto del protocolo de dilución. Se colocó en el termociclador con el programa correspondiente a la mutación, (tabla 16).

Tabla 16.

Número de ciclos, temperatura y tiempo necesarios para la PCR (*Val1016Ile*)

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo (segundos)
1	98°C	300
40	98°C	5
	60°C	5
	72°C	20
1	72°C	60
1	4°C	60

4.2.3.6. *Nested PCR amplicon 350 pb - fragmento Mut 163 pb y wild type 231 pb mediante Gotaq*

La Nested PCR se realizó usando 5uL del producto de PCR del amplicon de 350pb. Donde, para el fragmento mutante de 163pb se utilizó las concentraciones de reactivos descritas en la tabla 8. Para el fragmento wild type de 231pb se utilizó las concentraciones de los reactivos descritos en la tabla 7. Se llevó al termociclador con el programa descrito en la tabla 9.

4.2.4. Revelado en gel de agarosa al 2 %

Se preparó la solución amortiguador o Buffer TAE 1X para lo cual se partió del Buffer TAE 10X y se disolvió en agua destilada hasta obtener el volumen y concentración requerida.

También se preparó el marcador molecular de 10, 50 y 100pb ladder, para lo cual se mezcló en un tubo estéril el marcador molecular correspondiente con blue juice (tinte) a una relación de 1:5. (Es decir 5uL de tinte o blue juice por cada 1uL de marcador molecular).

4.2.4.1. *Procedimiento*

Para la elaboración del gel de agarosa al 2 %, se procedió a pesar la agarosa tomando en cuenta la relación entre porcentaje y volumen del diluyente en este caso buffer TAE 1X. La agarosa se diluyó en el buffer, calentándolo dentro del microondas por alrededor de 2 minutos, con constante agitación. Esto se realizó hasta el punto de no observar ninguna molécula presente dentro de la solución.

Una vez diluida la agarosa se colocó 0.035uL de Syber Safer por cada mL de solución. Se homogeneizó la solución suavemente. Posteriormente, se vertió la solución dentro de la cámara del gel y en el caso de que existieran burbujas, las mismas fueron retiradas hacia los lados de la cámara mediante el empleo de una punta de pipeta estéril.

Una vez gelificada la solución, se sumergió la misma dentro de la cámara de electroforesis que contenía buffer TAE 1X, tomando en cuenta que el buffer cubra totalmente la superficie del gel.

Se cargó los pocillos del gel con los productos de PCR y el marcador molecular (10, 50 y 100 pb ladder). Se procedió a conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder ajustando el tiempo y el voltaje según la talla de fragmento a observar. Una vez culminado el tiempo, se foto documentó el gel.

4.2.5. Purificación de ADN a partir de gel

Para purificar el ADN del Gel, se utilizó el kit “PureLink Quick Gel Extraction” (Invitrogen, Sao Paulo).

Se procedió a pesar y rotular los tubos eppendorf de 1.5mL estériles. Con ayuda de un transiluminador UV y una hoja de bisturí estéril, se procedió a cortar el fragmento del gel que contenía el ADN. Una vez cortado el pedazo del gel y colocado dentro del tubo eppendorf se volvió a pesar el tubo con el fin de obtener el peso en mg del gel que contiene el fragmento de ADN a extraer.

Tomando en cuenta la tabla 17 se calculó el volumen necesario del buffer L3

Tabla 17.

Volumen a emplear de Buffer L3 según porcentaje de gel, volumen de tubo y peso del gel.

Gel	Tubo	Buffer L3 Volumen
≤ 2 % agarosa	1.7mL	3:1 (Ej: 1.2mL Buffer L3: 400mg de gel)
>2 % agarosa	5mL	6:1 (Ej: 2.4mL Buffer L3: 400mg de gel)

Una vez colocado el volumen requerido de Buffer L3, la muestra se incubó a 50 °C a baño maría por 10 min, con agitación cada 3 minutos. Transcurrido este tiempo, se mantuvo a la misma temperatura por 5 minutos más sin agitación. Posteriormente, se transfirió el contenido del tubo a una columna y tubo de extracción estériles. El contenido de la columna se centrifugó a 13.000 x g por un minuto. Después se desechó el tubo y el contenido. La columna se colocó dentro de un tubo nuevo y se adicionaron 500uL de buffer de lavado (W1) y nuevamente se centrifugó a 13.000 x g por un minuto. Pasado este tiempo se descartó el contenido del tubo y nuevamente se centrifugó a 13.000 x g por un minuto. Se descartó el contenido conjuntamente con el tubo y se colocó la columna dentro de un tubo eppendorf de 1.5mL estéril. Se añadió 50uL del buffer de elución dentro de la columna y se incubó por 1 min a temperatura ambiente. Una vez incubado, se procedió a centrifugar por última vez a 13.000 x g por un minuto y el contenido del tubo se rotuló y se almacenó a -20 °C.

Se tomó al azar muestras de producto de PCR y se purificó dicho ADN del gel que mostraba la presencia de las mutaciones en los mosquitos analizados, dichas muestras fueron enviadas a secuenciar a “Promega Corporation”. Posterior a esto el producto de secuenciación se analizó mediante el programa bioinformático “Geneious”. Las muestras analizadas dentro del programa para la mutación fueron las que presentaron una alta calidad de producto de secuenciación con el fin de obtener resultados mucho más específicos y de esta manera reducir cualquier error que se pueda presentar al momento de realizar el alineamiento. Los resultados obtenidos se presentan basándose en el decreto 905 artículo 2, expuesto en el Anexo 1.

La investigación que se realiza no tiene fines de bio-prospección por lo que no aplica a contrato de acceso a recursos genéticos.

4.3. Evaluación estadística para los resultados

La evaluación estadística de los resultados se basó específicamente en 2 partes. En primer lugar, se evaluaron los resultados obtenidos para el análisis fenotípico de los mosquitos de cada localidad. Este análisis se realizó con el fin de determinar variabilidad de los datos entre y dentro de cada tratamiento, siendo evaluadas también las repeticiones de cada tratamiento. Para todos estos análisis se consideró como variables de agrupación los factores planteados en el diseño experimental que en este caso fueron localidad y sexo.

Como segundo punto se evaluaron los resultados obtenidos del análisis molecular en cuanto a presencia, porcentaje de homocigocis MUT y Wild Type para la mutación Phe1534Cys y el porcentaje de presencia de la mutación Val1016Ile. De esta manera determinar una posible diferencia sobre la presencia de las mutaciones en cuanto al sexo del mosquito y su localidad.

Toda la información obtenida tanto del análisis fenotípico como molecular, fue clasificada utilizando "IBM SPSS Statistics Base". Específicamente se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

Con el fin de determinar la existencia de diferencias estadísticas, se utilizará la prueba chi cuadrado con un p estadístico de 0.05.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Basado en la metodología planteada para el cuidado y mantenimiento de larvas del mosquito *Aedes aegypti*, se obtuvo un total de 210 mosquitos F2 para cada una de las seis localidades o cantones de la provincia de El Oro.

Los 210 mosquitos de cada localidad, fueron evaluados mediante bioensayos con el insecticida piretroide “deltametrina 10 ppm” tomando en cuenta un tiempo de exposición de 2 horas, donde posterior a este tiempo los mosquitos que aun podían volar o pararse eran considerados como “Vivos”.

El porcentaje de mosquitos machos y hembras sometidos a la dosis diagnostica del piretroide, además del porcentaje de mosquitos empleados para el control de cada bioensayo se encuentra representado en la Figura 17.

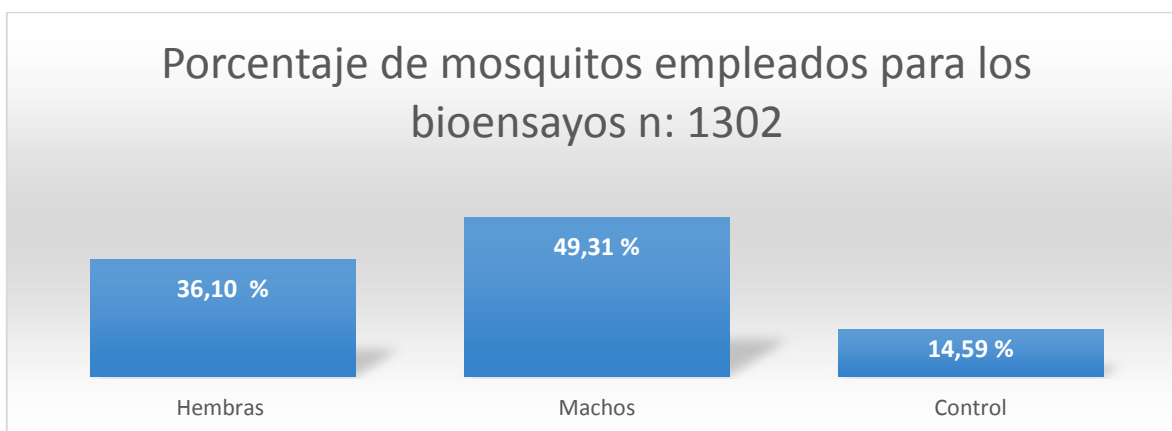


Figura 17. Porcentaje de mosquitos machos y hembras sometidos a dosis diagnostica.

Se puede observar un mayor porcentaje de mosquitos machos los cuales fueron empleados dentro de los bioensayos, esto es debido a que según Pavon (2015, p.15), por lo general dentro del laboratorio se obtiene una hembra por cada tres machos adultos. Además de que las condiciones de crianza de las larvas no fueron variadas con el fin de obtener una mayor cantidad de hembras en fase

pupal. Según Barrera (2006, p. 489), al variar varios factores como temperaturas y concentraciones de material orgánico se propicia a obtener una mayor cantidad de mosquitos hembra.

5.1. Evaluación estadística de los resultados

5.1.1. Evaluación estadística para resultados de Bioensayos.

5.1.1.1. *Evaluación estadística entre tratamientos*

Mediante la figura 18. De los 12 tratamientos usados para los bioensayos. Se determinó una posible diferencia entre los mismos al compararlos respecto a la variable “vivos”. El valor de la media de cada tratamiento se encuentra muy similar a excepción de los tratamientos 5 y 6.

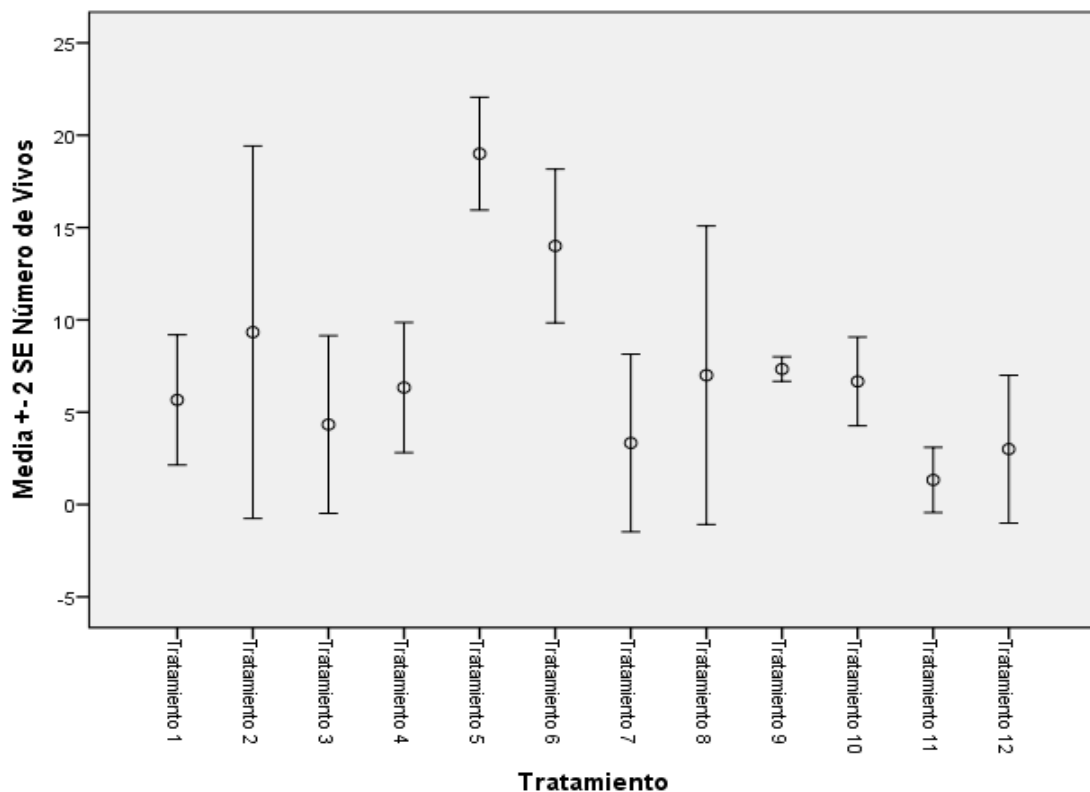


Figura 18. Barras de error y valores de media para cada tratamiento.

Con el fin de determinar la existencia de diferencias entre tratamientos, al medir la variable “vivos” se aplicó la prueba de Kruskal Wallis. Se obtuvo un valor de “ χ^2 ” de 18,997, y un valor de “p” de 0,061 (tabla 19). Al contrastar el valor de “p” obtenido con el valor de “p” determinado (0,05) se determinó que no existe diferencias significativas entre tratamientos, lo cual es aseverado por el valor de “ χ^2 ” calculado de 18,997. Este valor se encuentra dentro de la zona de aceptación de la hipótesis nula por ende se define que no existen diferencias significativas entre tratamientos. (Tablas 18 y 19)

Tabla 18.

Rango promedio de mosquitos vivos para cada tratamiento

	Tratamiento	N	Rango promedio
Número de Vivos	Tratamiento 1	3	17.50
	Tratamiento 2	3	20.67
	Tratamiento 3	3	14.50
	Tratamiento 4	3	19.17
	Tratamiento 5	3	34.33
	Tratamiento 6	3	30.67
	Tratamiento 7	3	11.33
	Tratamiento 8	3	17.50
	Tratamiento 9	3	20.83
	Tratamiento 10	3	19.00
	Tratamiento 11	3	6.33
	Tratamiento 12	3	10.17
	Total	36	

Tabla 19.

Valores estadísticos de χ^2 y “p” obtenido mediante la prueba de Kruskal Wallis

Estadísticos de prueba	
Número de Vivos	
Chi-cuadrado	18.997
GI	11
“p”	0.061

5.1.1.2. Evaluación estadística entre localidades

En el análisis por localidad, mediante el gráfico de barras de error (Figura 19) se observó claramente una diferencia, ya que los valores de media se encuentran muy dispersos para las localidades de Pasaje y El Guabo, donde el número de mosquitos vivos fue el menor y el mayor respectivamente. En las otras 4 localidades sus medias se encuentran en similares. Los promedios de mosquitos “vivos” por localidad se presentan en la tabla 20.

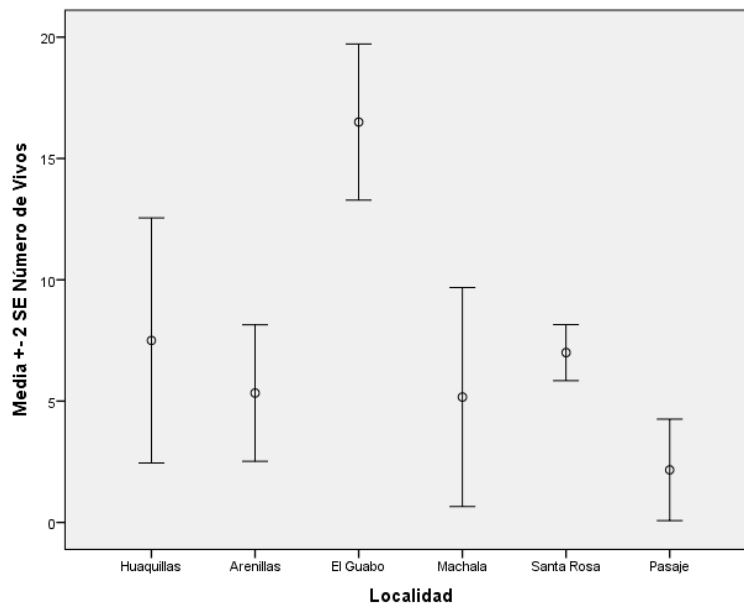


Figura 20. Barras de error y valores de media para cada localidad.

Con el fin de aseverar lo mencionado mediante valores estadísticos, se evaluó usando la prueba de Kruskal Wallis con un valor “p” de 0,05 y un total de 5 grados de libertad. Se obtuvo el valor de “ χ^2 ” crítico de 11.07. Tomando en cuenta que el valor “ χ^2 ” calculado de 17.615 (tabla 21) se encuentra dentro de la zona de aprobación de la hipótesis nula. Se determinó que existen diferencias significativas entre tratamientos. Al considerar que el valor “p” calculado fue de 0,003 (tabla 21) y es menor de 0,05 se corrobora lo mencionado.

Tabla 20.

Valores de Rango promedio de mosquitos vivos por localidad

	Localidad	N	Rango promedio
Número de Vivos	Huaquillas	6	19.08
	Arenillas	6	16.83
	El Guabo	6	32.50
	Machala	6	14.42
	Santa Rosa	6	19.92
	Pasaje	6	8.25
	Total	36	

Tabla 21.

Valores estadísticos para la prueba de Kruskal Wallis.

Estadísticos de prueba	
Número de Vivos	
Chi-cuadrado	17.615
gl	5
“p”	0.003

5.1.1.3. Evaluación estadística entre Sexo

Al comparar los valores de media del total de mosquitos vivos para todas las localidades se puede observar mediante las barras de error (Figura 21), que no existen diferencias significativas en cuanto al número de mosquitos vivos hembras

y machos. Por lo que se determinó que el factor “Sexo” no influye en cuanto al nivel de resistencia al insecticida. Los valores promedios de mosquitos “vivos” por localidad se presentan en la tabla 22.

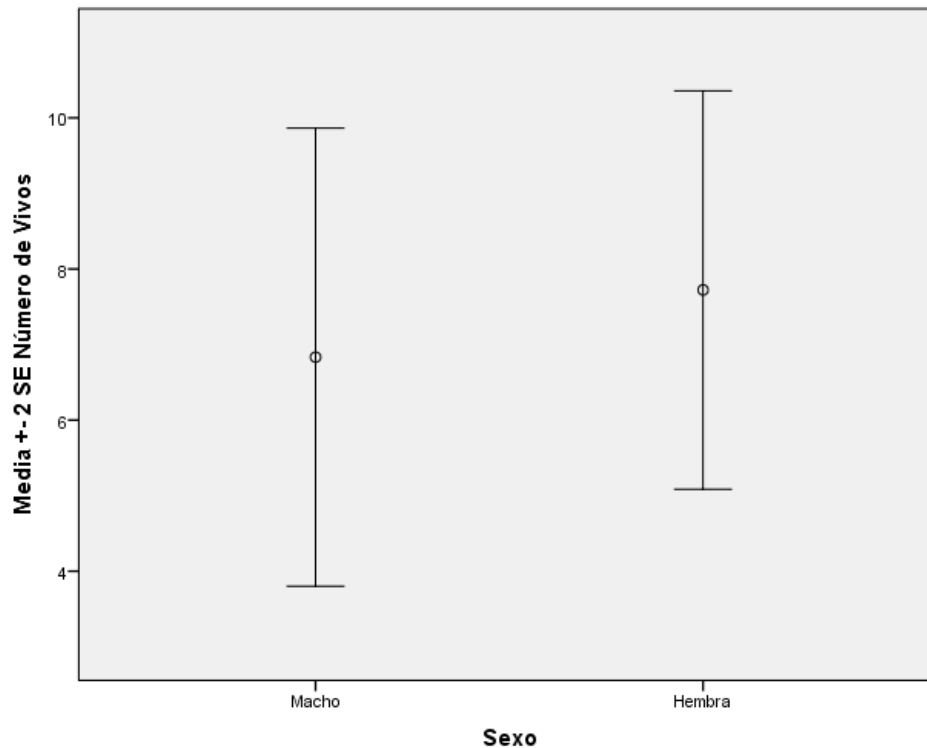


Figura 21. Barras de error y valores de media para el factor “Sexo”.

Se utilizó la prueba de Kruskal Wallis para corroborar los valores obtenidos. Se obtuvo el valor de “ χ^2 ” crítico de 3.84 usando el valor de “ p ” de 0.05 y 1 grado de libertad. El valor de “ χ^2 ” de 0.346 obtenido de la prueba es menor al valor crítico, de igual manera el valor de “ p ” calculado de 0.557 es mayor a 0.05 (tabla 23). Con estos valores se puede determinar que no existen diferencias significativas entre los mosquitos vivos machos y hembras.

Tabla 22.

Valores de Rango promedio de mosquitos vivos por sexo

	Sexo	N	Rango promedio
Número de Vivos	Macho	18	17.47
	Hembra	18	19.53
	Total	36	

Tabla 23.

Valores estadísticos para la prueba de Kruskal Wallis.

Estadísticos de prueba	
Número de Vivos	
Chi-cuadrado	0.346
gl	1
“p”	0.557

5.1.1.3.1. *Evaluación estadística por sexo intra localidades*

La existencia de diferencias entre número de mosquitos vivos dependiendo del sexo dentro de cada localidad, se evaluó mediante la prueba Kruskal Wallis. Para cada una de las localidades se obtuvo valores de rango promedio (Tabla 24). Además se obtuvieron valores estadísticos “ χ^2 ” y “p” para cada localidad (Tabla 25).

Tabla 24.

Valores de Rango promedio de mosquitos vivos por sexo según cada localidad

	Sexo	N	Rango promedio
Huaquillas	Macho	3	3.33
	Hembra	3	3.67
	Total	6	
Arenillas	Macho	3	3.00
	Hembra	3	4.00
	Total	6	
El Guabo	Macho	3	4.67
	Hembra	3	2.33
	Total	6	
Machala	Macho	3	3.17
	Hembra	3	3.83
	Total	6	
Santa Rosa	Macho	3	4.00
	Hembra	3	3.00
	Total	6	
Pasaje	Macho	3	3.00
	Hembra	3	4.00
	Total	6	

Tabla 25.

Valores estadísticos para la prueba de Kruskal Wallis en cada localidad.

Estadísticos de prueba						
Localidad	Huaquillas	Arenillas	El Guabo	Machala	Santa Rosa	Pasaje
Variable	Número de Vivos	Número de Vivos	Número de Vivos	Número de Vivos	Número de Vivos	Número de Vivos
Chi-cuadrado	0,048	0,455	2,333	0,196	0,441	0,484
GI	1	1	1	1	1	1
“p”	0,827	0,500	0,127	0,658	0,507	0,487

Tomando en cuenta el valor de “ χ^2 ” crítico calculado de 3,84 para todas las localidades con 1 grado de libertad y un “p” de 0,05, mediante la prueba de Kruskal Wallis se puede determinar que todos los valores se encuentran dentro de la zona de aceptación de la hipótesis nula. Además los valores de “p” de todas las localidades son mayores a 0,05; por ende no existen diferencias significativas entre machos y hembras dentro de cada localidad en cuanto al número de mosquitos vivos. Lo que implica que la resistencia al insecticida piretroide mediante mutaciones *kdr*, se presenta independientemente del sexo. Adicionalmente los niveles de resistencia son los mismos en machos que en hembras.

5.1.2. Evaluación estadística para resultados obtenidos en análisis genotípico.

La evaluación estadística para los resultados producto del análisis genotípico, se realizó con el fin de conocer si existen diferencias en cuanto a la cantidad de mosquitos “Vivos” machos y hembras que presentan las mutaciones (Phe1534Ile y Val1016Ile). Se generó un análisis estadístico Kruskal Wallis, donde mediante los gráficos de barras de error tanto para la mutación Phe1534Cys (Figura 22) y Val1016Ile (Figura 23), se puede determinar que no existen diferencias

significativas al comparar valores de medias. Lo que a su vez implica que la presencia de ambas mutaciones se da en todos los mosquitos analizados sin importar la localidad y el sexo.

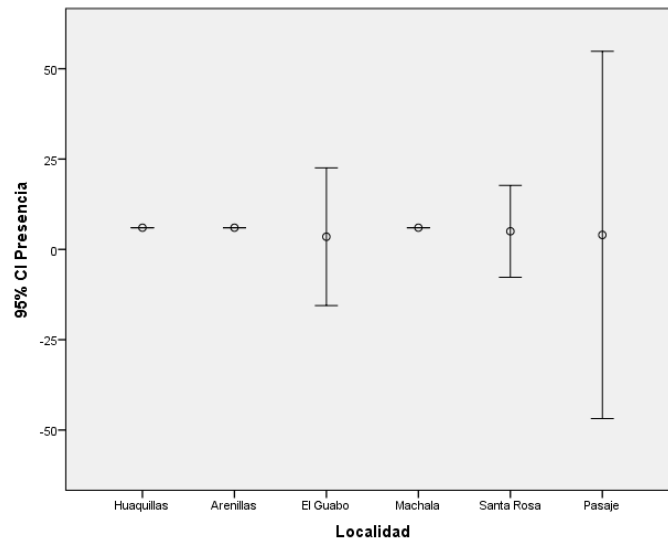


Figura 22. Presencia de la mutación Phe1534Cys entre machos y hembras de cada localidad

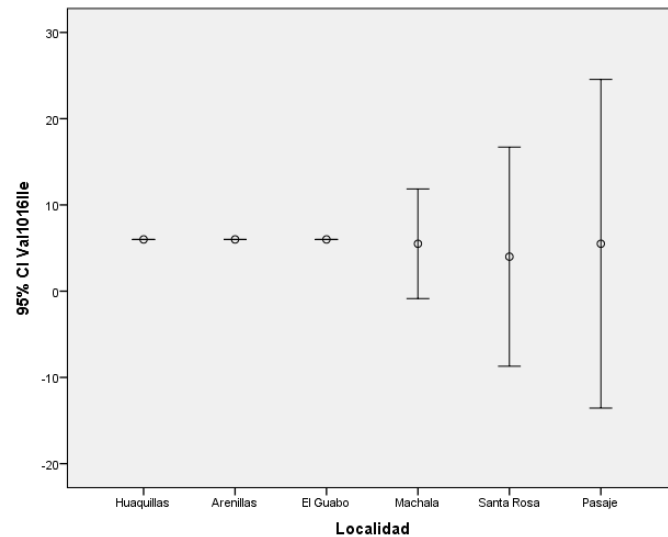


Figura 23. Presencia de la mutación Val1016Ile entre machos y hembras de cada localidad

Con los valores estadísticos obtenidos con un valor de “ p ” de 0.05 y 5 grados de libertad, se determinó un valor de “ χ^2 ” crítico de 11.07, donde mediante el contraste con el valor de “ χ^2 ” calculado de 3.826 y 4.924 para las mutaciones Phe1534Cys y Val1016Ile respectivamente (Tabla 30 y 31). Los valores se encuentran en la zona de aceptación de la hipótesis nula y por ende no se encuentran diferencias significativas entre localidades. A pesar de lo mencionado existen localidades como “El Guabo”, donde la mitad de las hembras analizadas molecularmente no presentan la mutación Phe1534Cys y son homocigotos para el tipo Wild Type.

Tabla 30.

Valores de Rango promedio de presencia de las mutaciones (Phe1534Ile y Val1016Ile) por localidad.

	Localidad	N	Rango promedio
Phe1534Cys	Huaquillas	2	8.00
	Arenillas	2	8.00
	El Guabo	2	3.00
	Machala	2	8.00
	Santa Rosa	2	5.50
	Pasaje	2	6.50
	Total	12	
	Val1016Ile	Huaquillas	2
Arenillas		2	8.00
El Guabo		2	8.00
Machala		2	5.75
Santa Rosa		2	2.25
Pasaje		2	7.00
Total		12	

Tabla 31.

Valores estadísticos para la prueba de Kruskal Wallis.

Estadísticos de prueba		
	Phe1534Cys	Val1016Ile
Chi-cuadrado	3.826	4.924
gl	5	5
“p”	0.575	0.425

5.1.2.1. *Evaluación estadística según sexo para cada localidad, de resultados obtenidos en análisis genotípico*

Esta evaluación se realizó con el fin de conocer la variabilidad en los datos en cuanto a la presencia de las mutaciones según el sexo dentro de cada localidad.

5.1.2.1.1. *Mutación Phe1534Cys*

Se obtuvo un valor de “ χ^2 ” crítico de 3.84 tomando en cuenta el valor de “p” de 0.05 y 1 grado de libertad. Se comparó con los valores de “ χ^2 ” calculado para cada una de las localidades en función del sexo (Tabla 32). Según el análisis ninguna localidad presenta diferencias significativas; a pesar de que en la localidad de El Guabo esta mutación se encuentra presente en la mitad de las hembras analizadas y en los machos se encuentra presente en su mayoría. El resultado obtenido indica que no existen diferencias significativas dentro de cada localidad en cuanto al sexo, por ende dicha mutación no se encuentra ligada al sexo. Sin embargo, dicha información se necesita confirmar con un “n” más sustentable, ya que la ausencia de la mutación en varios individuos puede deberse a que la muestra se haya degradado, entre otros factores.

Tabla 32.

Valores estadísticos para la prueba de Kruskal Wallis.

Estadísticos de prueba ^{a,b}						
Localidad	Huaquillas	Arenillas	El Guabo	Machala	Santa Rosa	Pasaje
Mutación	Phe1534Cys					
Chi-cuadrado	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000	1.000
gl	1	1	1	1	1	1
“p”	1.000	1.000	0.317	1.000	0.317	0.317

5.1.2.1.2. Mutación Val1016Ile

Se obtuvo un valor de “ χ^2 ” crítico de 3.84, tomando en cuenta el valor de “p” de 0.05 y 1 grado de libertad. Se comparó el “ χ^2 ” calculado para cada una de las localidades en función del sexo, donde según el análisis ninguna localidad presenta diferencias significativas (Tabla 33). A pesar de que en la localidad de “Santa Rosa” la mutación Val1016Ile se encuentra presente en la mitad de los individuos machos analizados y en las hembras se encuentra presente en su mayoría, el estadístico indica que no existen diferencias significativas dentro de cada localidad en cuanto al sexo. Por ende dicha mutación no se encuentra ligada al sexo, sin embargo, se necesita confirmar, al igual con un “n” más sustentable, ya que la ausencia de la mutación en varios individuos pudo deberse a que la muestra se haya degradado, entre otros factores. Cabe recalcar que la mutación Val1016Ile es mucho más predominante en todos los individuos analizados de todas las localidades en relación a la mutación Phe1534Cys.

Tabla 33.

Valores estadísticos para la prueba de Kruskal Wallis.

Estadísticos de prueba						
Localidad	Huaquillas	Arenillas	El Guabo	Machala	Santa Rosa	Pasaje
Mutación	Val1016Ile					
Chi-cuadrado	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000
gl	1	1	1	1	1	1
"p"	1.000	1.000	1.000	0.317	0.317	0.317

5.2. Resultados de mortalidad obtenidos del bioensayo

El porcentaje de mortalidad es bajo para la localidad de El Guabo con respecto a las otras 5 localidades. Por otro lado, las 4 localidades (Arenillas, Huaquillas, Machala y Santa Rosa) presentan un porcentaje próximo al 80 %, mientras que la localidad de "Pasaje" presenta un alto porcentaje de mortalidad con respecto a las demás localidades que fueron sometidas al bioensayo. Además la cepa susceptible "Rockefeller", presentó una mortalidad del 100% en 15 minutos de haber sido expuesto al piretroide "deltametrina" a la dosis constante 10 ppm (Figura 24).

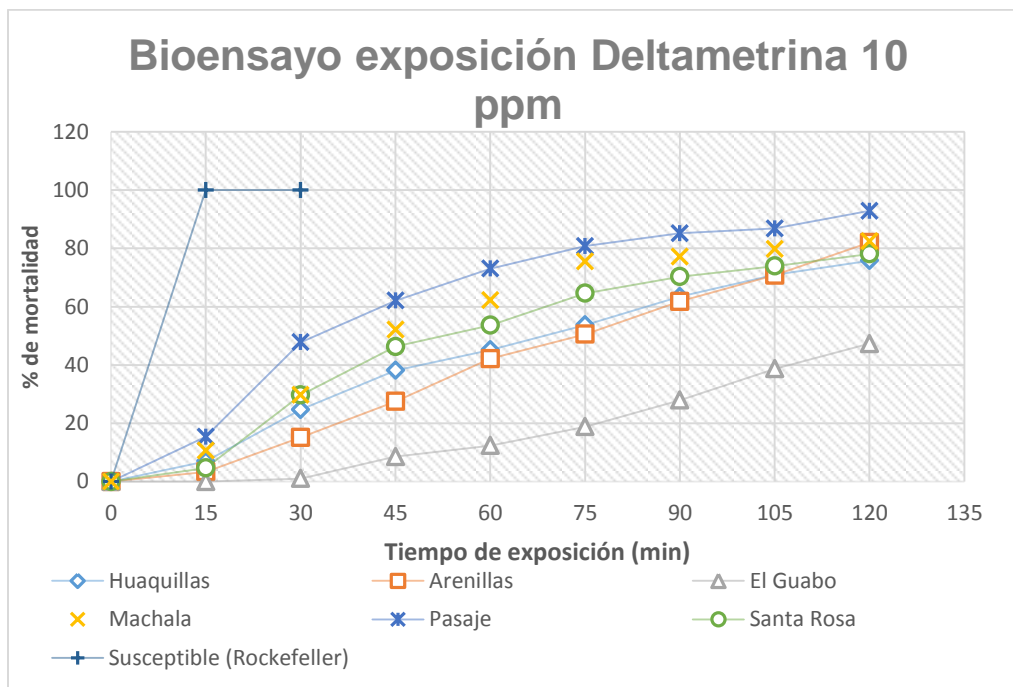


Figura 24. Porcentaje de mortalidad de las localidades Huaquillas, Machala, Arenillas, Pasaje, El Guabo, Santa Rosa y de la sepa susceptible Rockefeller.

Los análisis informáticos de las localidades: Arenillas, Huaquillas, Santa Rosa y Machala, no demostraron diferencias significativas al evaluar la cantidad de mosquitos sobrevivientes, es decir el rango de mosquitos vivos es similar en las cuatro localidades por ende el porcentaje de mortalidad es similar. Por otro lado, la localidad de “El Guabo” a comparación con las otras localidades, presenta una mayor cantidad de mosquitos sobrevivientes lo que permitió que se presente una diferencia significativa entre los datos. La mayor presencia de individuos vivos puede deberse a una alta presión selectiva, no solamente por el uso de piretroides en la actualidad sino también a un alto empleo del insecticida DDT.

El alto empleo de insecticidas dentro de esta zona puede deberse a que en su mayoría existe una alta producción agrícola lo que por ende conlleva a fumigaciones constantes con el fin de mantener el nivel productivo de los cultivos. Basándose en lo que indica Reyes (2004), un mayor empleo de insecticidas como el DDT se dio en zonas del Ecuador donde existió una gran cantidad de

producción de Cacao. Posterior a la prohibición de su uso en el año 1989, este insecticida fue reemplazado por piretroides (Dávila y Espinoza, 2004). El cantón “El Guabo” es uno de los mayores productores de Cacao y Banano dentro de la Provincia de El Oro (Pineda, 2011. p.14), lo que pudo generar una mayor exposición al insecticida DDT de los mosquitos *Aedes aegypti* a lo largo de los años y produciendo una resistencia cruzada en la actualidad hacia los piretroides empleados para el control de dicha plaga.

La diferencia estadística entre las seis localidades se puede deber a que a pesar de que la localidad de “Pasaje”, conjuntamente con “El Guabo”, son los mayores productores de Cacao y Banano de la provincia de El Oro (Lima, 2009), la localidad de “Pasaje” presento un bajo número de mosquitos vivos.

Al tomar en cuenta la alta dependencia de ambos cantones sobre las actividades agrícolas, se supondría que ambas localidades presenten un alto porcentaje de individuos vivos, es decir resistentes al piretroide. Sin embargo, este resultado no se obtuvo al momento de realizar los bioensayos y debido a que en todas las repeticiones realizadas de cada tratamiento en ambas localidades, se obtuvo resultados similares, se descarta una mala manipulación al momento de llevar a cabo los bioensayos y en el manejo de las muestras (mosquitos). Una de las razones de gran impacto que explique la alta y la baja cantidad de mosquitos sobrevivientes en la localidad de El Guabo y Pasaje respectivamente, radica en el análisis molecular de los mosquitos, ya que no es posible justificar mediante bibliografía un alto empleo de insecticidas como el DDT y piretroides del tipo II específicamente dentro de ambos cantones. En el caso de haberse determinado una mayor cantidad de empleo de dichos insecticidas en el cantón “El Guabo” en relación a “Pasaje” se atribuiría la mayor cantidad de mosquitos vivos al alto empleo de dichos insecticidas.

Únicamente mediante la información encontrada y disponible es posible inferir la presencia de resistencia a insecticidas en las poblaciones del mosquito *Aedes aegypti*. En el año 1988 en nuestro país se optó por usar malatión con el fin de

disminuir los casos de dengue, debido a que se demostró que el DDT al ser empleado desde el año 1957 ya no cumplía la función de control del vector (ESPOL, 2004, p.15).

El porcentaje de mosquitos que sobrevivieron al tiempo de exposición de 2 horas al insecticida se encuentra representado en el Figura 25. La sobrevivencia en los machos es de un 19.16 % de un total de 642 mosquitos machos y el porcentaje de sobrevivencia de las hembras es de 30.43 % de un total de 470 mosquitos hembras.

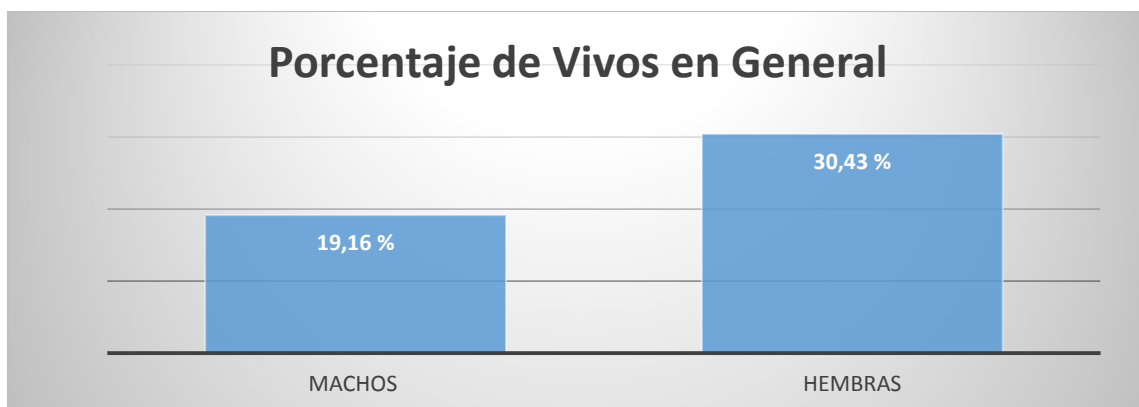


Figura 25. Porcentaje de mosquitos machos y hembras vivos de todas las localidades.

Mediante el análisis estadístico se determinó que no existe diferencia en cuanto al número de mosquitos vivos machos y hembras. Esto fue corroborado por el valor $p= 0.557$ el cual es mayor a 0.05 dando a entender que el sexo del mosquito no afecta a los resultados obtenidos. La mutación *kdr* no se encuentra ligada al sexo como algunos tipos de resistencia como menciona la CDC (Brogdon y Chan, 1998, p 24).

A partir del bioensayo realizado se obtuvieron diferentes cantidades de individuos vivos por cada localidad, lo cual se encuentra representado en la Figura 26.

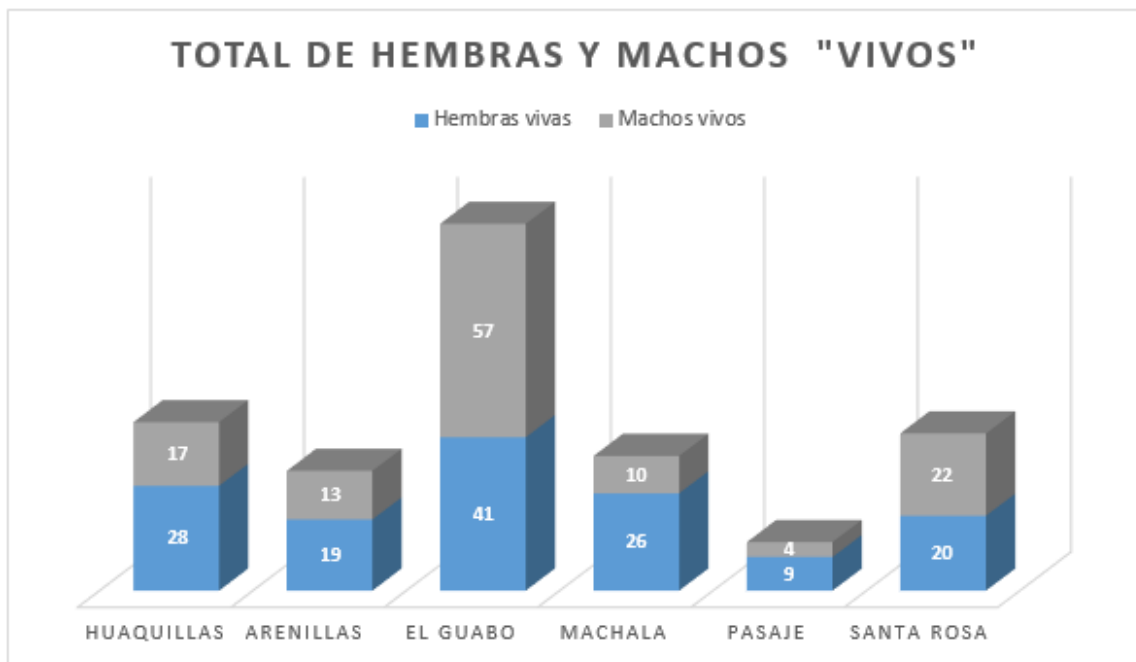


Figura 26.- Número de individuos vivos por localidad y sexo.

De igual manera el análisis estadístico se realizó entre el número de mosquitos vivos dentro de cada una de las localidades para poder corroborar lo anteriormente expuesto. Se obtuvo valores de " p " para cada una de las localidades siendo estos 0.827 para Huaquillas, 0.5 para Arenillas, 0.127 en El Guabo, 0.658 para Machala, 0.507 Santa Rosa y Pasaje 0.487. Los valores de " p " mencionados al ser mayores al valor de " p " crítico de 0.05 determinaron que el sexo no influye en ninguna de las localidades analizadas.

5.3. Resultado del análisis molecular

Según menciona Saavedra (2007) y Kawada et al., (2014) los resultados deseados que relacionarían concretamente las mutaciones Phe1534Cys y Val1016Ile, dentro de las poblaciones de mosquitos *Aedes aegypti*, consta de hallar la mutación Phe1534Cys en heterocigocis y en presencia de la mutación Val1016Ile, resultados que fueron obtenidos únicamente para las localidades de Huaquillas y Arenillas.

5.3.1. Análisis de mutación Phe1534Ile

Para el análisis de la presencia o ausencia de la mutación Phe1534Cys se tomaron 12 mosquitos “vivos” *Aedes aegypti* de cada localidad, los cuales procedían del bioensayo con el piretroide deltametrina a 10 ppm.

Basándose en el Figura 26 las localidades de Huaquillas y Arenillas son las únicas que presentaron los resultados que relacionan la resistencia al insecticida con la mutación, ya que las mismas presentan la mutación en un 100 % en heterocigosis.

Las mutaciones evaluadas han sido relacionadas con la resistencia a insecticidas empleados hace varias décadas dentro de nuestro país, como es el caso del DDT (Kawada et al., 2016). Este insecticida tiene el mismo efecto y por ende el mismo sitio blanco al igual que los piretroides, sobre el mosquito *Aedes aegypti*.

Kawada et al., (2014) indica que al encontrarse la mutación Phe1534Cys en homocigosis el mosquito es mucho más susceptible al insecticida que cuando la mutación se encuentra en heterocigosis. Basándose en lo mencionado, los resultados para la localidad de El Guabo (Figura 27) mostraron un 16,66 % de heterocigosis que serían los resultados deseados. Esta localidad es la única en presentar el fenotipo Wild Type en homocigosis lo que indicaría la ausencia de la mutación en esta localidad. Para Pasaje el 100 % de las hembras presentaron la mutación Phe1534Ile en homocigosis.

El análisis molecular indica un porcentaje alto de homocigosis para la mutación en ambas localidades, lo que implicaría una susceptibilidad alta al insecticida por parte de los mosquitos. En este caso uno de los factores importantes a analizar según Saavedra (2007), es la sobreexpresión de los genes que codifican para la proteína “Tripsina”, ya que se ha observado que al someter al mosquito al insecticida (piretroide) se genera dicha sobreexpresión. Lo que produce una enorme cantidad de eventos de recombinación, pudiendo de este modo encontrar las mutaciones que generan resistencia *kdr*, tanto en homocigosis como en heterocigosis. Por ende, de esta manera en un mosquito que presentaba una

mutación *kdr* en homocigocis y lo hacía más susceptible, podría encontrarse en la progenie en heterocigocis haciéndolo del insecto susceptible, resistente y viceversa.

El haber mantenido a los mosquitos obtenidos del muestreo de campo dentro del laboratorio, con el fin de obtener muestras para el desarrollo del bioensayo, pudo influir en los resultados debido a la recombinación que pudo haberse presentado en mayor cantidad en la progenie obtenida en el laboratorio para la localidad de El Guabo y Pasaje.

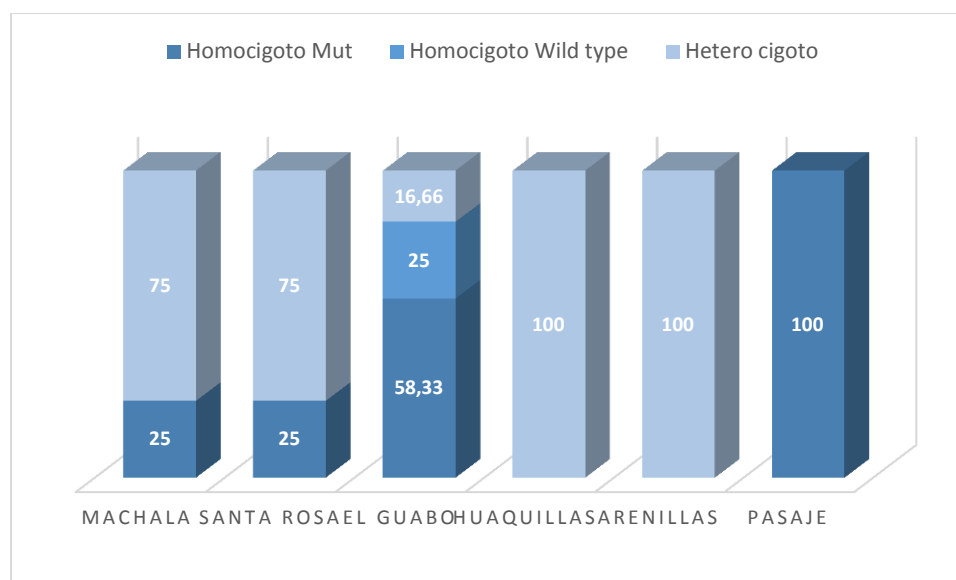


Figura 27. Análisis de homocigocis y heterocigocis para la mutación Phe1534Cys de las localidades analizadas

Los resultados de la localidad de Santa Rosa y Machala según la Figura 26, no se ajustan a los esperados en el análisis molecular en cuanto a la presencia de la mutación. Las dos localidades mencionadas presentan un similar número de mosquitos vivos obtenidos mediante los bioensayos, lo que indicaría que la presencia de las mutaciones analizadas se daría en manera similar a las localidades de Arenillas y Huaquillas. Dichos resultados no se obtuvieron ya que tanto la localidad de Machala como Santa Rosa presentaron la mutación en homocigocis en un 25 % siendo el esperado de un 0 %.

La presencia en homocigocis de la mutación indicaría al igual que en los mosquitos de las localidades de El Guabo y Pasaje, que existe un mecanismo alterno que se encuentra generando una mayor resistencia al insecticida aparte de la mutación. Estos mosquitos pudieron haber sobrevivido debido a que en estudios recientes se menciona que la mutación Phe1534Cys se encuentra acompañada comúnmente con otras mutaciones que en conjunto otorgan resistencia al DTT y piretroides en cierto grado. (Kawada et al., 2016, pp 1-7; Dusfour et al., 2015, p 11; Du et al., 2013, pp 1785–1790). También pudo darse debido a que no se realizó la evaluación previa de la dosis específica en la cual la localidad es susceptible como lo menciona el CDC. Sin embargo, el sesgo de error es mínimo como lo confirma el mismo CDC ya que en el manual para evaluación de resistencia presentan tablas con valores de concentraciones de distintos insecticidas para cada especie y región en la cual se realiza el bioensayo (Brogdon y Chan, S/N, p 7).

Otro aspecto a considerar con el fin de aseverar lo mencionado sobre un mecanismo alterno de resistencia, se basa en el análisis de una muestra representativa por ejemplo: para la localidad El Guabo, la muestra tomada no lo fue, ya que existieron alrededor de 90 mosquitos sobrevivientes y la muestra analizada fue únicamente de 12 mosquitos por lo que existe una alta posibilidad de que la mutación se encuentre en su mayoría en heterocigosis otorgando resistencia al insecticida dentro de la localidad mencionada. Por otro lado, en Pasaje sobrevivieron alrededor del 7% del total de mosquitos entre machos y hembras sometidos al bioensayo. Además fue la única de las 6 localidades de la cual se pudo analizar un “n” representativo que fue de 12 mosquitos de un total de 13 entre machos y hembras considerados “vivos” posterior al bioensayo. Los resultados obtenidos para esta localidad son más valederos y acertados, por lo tanto la mayor susceptibilidad vendría relacionada con el alto porcentaje de homocigocis de la mutación Phe1534Cys. Navarro et al., (2003, p.186), explica que para un análisis entre estratos es necesario el empleo de un método

probabilístico obteniendo un número de muestra representativo para cada estrato, dicho muestreo es conocido como “Muestreo por estratos”.

La ausencia de la mutación Phe1534Cys como la homocigocis de la misma puede deberse a que se ha reportado en Latino América tanto como en las Islas Caimán (Saavedra *et al.*, 2007), países vecinos como Colombia, Venezuela y Brasil (Linns, *et al.*, 2014, p 1-12), que la mutación Phe1534Cys otorga resistencia a los piretroides de tipo I como la “permetrina” (Kawada *et al.*, pp 1-8). Dicha mutación dentro del estudio realizado se la encuentra de una manera irregular, pudiendo de esta manera inferir una relación no tan directa con la resistencia al insecticida empleado en los bioensayos que en este caso fue “deltametrina”, el cual es un piretroide del tipo II. El haber empleado este insecticida en los bioensayos pudo no haber generado una presión selectiva hacia los mosquitos con la presencia de la mutación sin embargo, se pudo determinar la presencia de la mutación, debido a una resistencia cruzada.

En las figuras 27- 41, se indican los resultados obtenidos para la mutación Phe1534Cys, para cada una de las localidades

5.3.1.1. *Huaquillas*

En las Figuras 28 y 29 se visualiza los amplicones correspondientes al fragmento analizado de 350 pb, el fragmento Wild type de 231 pb y el Fragmento Mutante de 163 pb de la localidad de Huaquillas.



Figura 28. Electroforesis del fragmento Wild type Phe1534Cys.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb.
- b) Carril 2-7: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- c) Carril 8: Marcador de peso molecular 100 pb.
- d) Carril 9-14: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 100 pb.

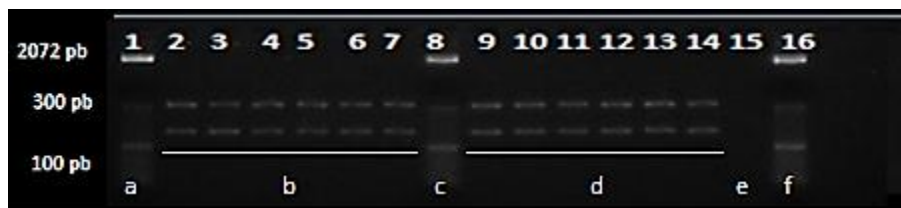


Figura 29. Electroforesis del fragmento mutante Phe1534Cys.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb.
- b) Carril 2-7: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- c) Carril 8: Marcador de peso molecular 100 pb.
- d) Carril 9-14: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 100 pb.

5.3.1.2. Arenillas

En las Figuras 30 y 31, se visualiza los amplicones correspondientes al fragmento Wild type (231 pb) y el fragmento Mutante (163 pb) de la localidad de Arenillas

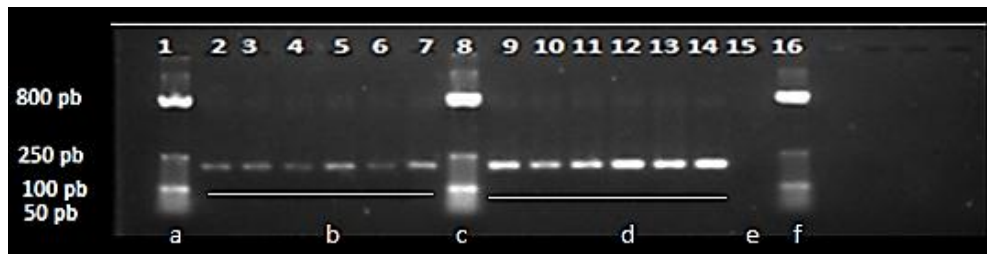


Figura 30. Electroforesis del fragmento Wild type Phe1534Cys.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 50 pb.
- b) Carril 2-7: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- c) Carril 8: Marcador de peso molecular 50 pb.
- d) Carril 9-14: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 50 pb.

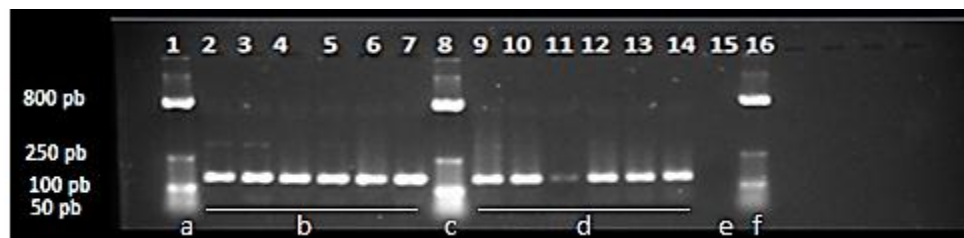


Figura 31. Electroforesis del fragmento Mutante Phe1534Cys.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 50 pb.
- b) Carril 2-7: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- c) Carril 8: Marcador de peso molecular 50 pb.
- d) Carril 9-14: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 50 pb.

5.3.1.3. El Guabo

En las Figuras 32, 33 y 34 se visualiza los amplicones correspondientes al fragmento Wild type (231 pb) y al fragmento mutante (163 pb) de la localidad de El Guabo.

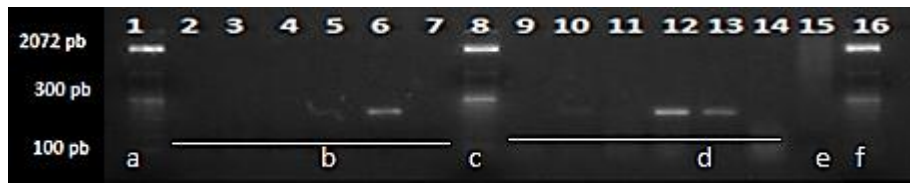


Figura 32. Electroforesis del fragmento Wild type Phe1534Cys.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb.
- b) Carril 2-7: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- c) Carril 8: Marcador de peso molecular 100 pb.
- d) Carril 9-14: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 100pb.

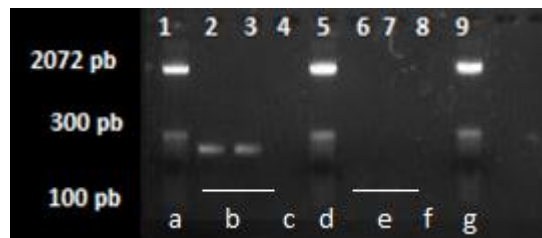


Figura 33. Electroforesis del fragmento mutante Phe1534Cys y Wild type.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb.
- b) Carril 2-3: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- c) Carril 4: Control negativo
- d) Carril 5: Marcador de peso molecular 100 pb.
- e) Carril 6-7: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- f) Carril 8: Control negativo.
- g) Carril 9: Marcador de peso molecular 100pb.

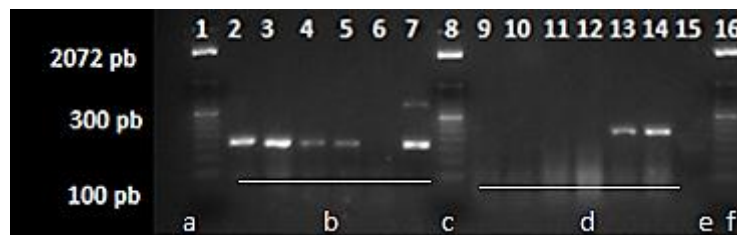


Figura 34. Electroforesis del fragmento Wild type Phe1534Cys.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb.
- b) Carril 2-7: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- c) Carril 8: Marcador de peso molecular 100 pb.
- d) Carril 9-14: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 100pb.

5.3.1.4. Machala

En las Figuras 35 y 36 se visualiza los amplicones correspondientes al fragmento Wild type (231 pb) y al fragmento Mutante (163 pb) de la localidad de Machala.

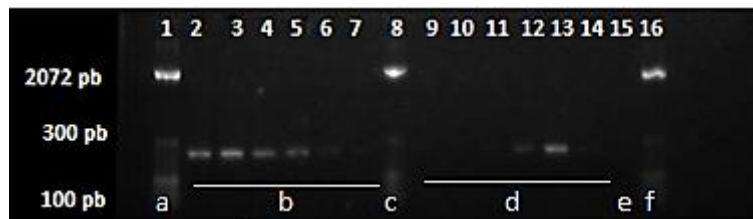


Figura 35. Electroforesis del fragmento Wild type Phe1534Cys.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb.
- b) Carril 2-7: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- c) Carril 8: Marcador de peso molecular 100 pb.
- d) Carril 9-14: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 100pb.

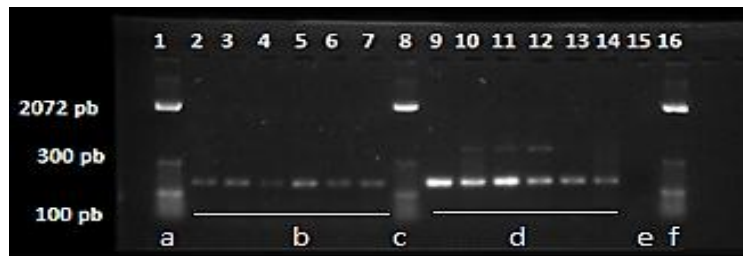


Figura 36. Electroforesis del fragmento Mut Phe1534Cys.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb.
- b) Carril 2-7: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- c) Carril 8: Marcador de peso molecular 100 pb.
- d) Carril 9-14: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 100 pb.

5.3.1.5. Santa Rosa

En las Figuras 37, 38, 39 y 40 se visualiza los amplicones correspondientes al fragmento Wild Type (231 pb) y Mutante (163 pb) de la localidad de Santa Rosa.

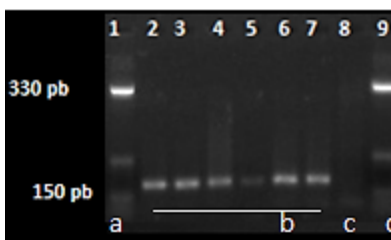


Figura 37. Electroforesis del fragmento Mutante Phe1534Cys.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 10 pb.
- b) Carril 2-7: Muestras de ADN pertenecientes a Machos *Aedes aegypti*.
- c) Carril 8: Control negativo.
- d) Carril 9: Marcador de peso molecular 10pb.

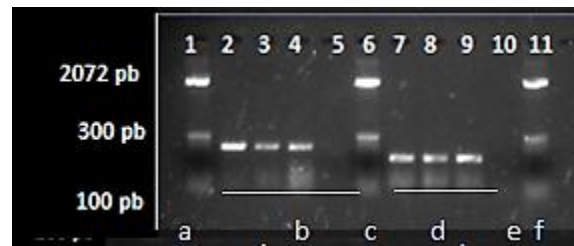


Figura 38. Electroforesis del fragmento Wild type y Mutante Phe1534Cys.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb.
- b) Carril 2-5: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- c) Carril 6: Marcador de peso molecular 100 pb.
- d) Carril 7-9: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- e) Carril 10: Control negativo.
- f) Carril 11: Marcador de peso molecular 100 pb.

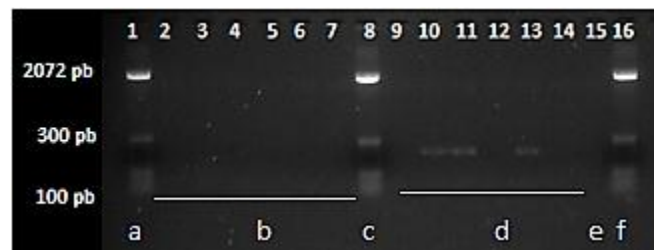


Figura 39. Electroforesis del fragmento Wild type Phe1534Cys.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb.
- b) Carril 2-7: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- c) Carril 8: Marcador de peso molecular 100 pb.
- d) Carril 9-14: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.

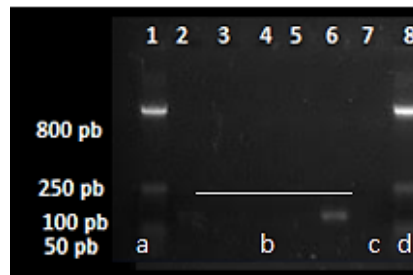


Figura 40. Electroforesis del fragmento mutante Phe1534Cys.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 50 pb.
- b) Carril 2-6: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- c) Carril 7: Control negativo.
- d) Carril 8: Marcador de peso molecular 50 pb.

5.3.1.6. Pasaje

En las Figuras 41 y 42, se visualiza los amplicones correspondientes al fragmento Wild type (231 pb) y Mutante (163 pb) de la localidad de Pasaje.

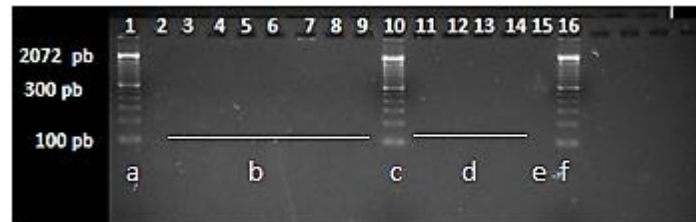


Figura 41. Electroforesis del fragmento Wild type Phe1534Cys.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb.
- b) Carril 2-9: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- c) Carril 10: Marcador de peso molecular 100 pb.
- d) Carril 11-14: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 100 pb.

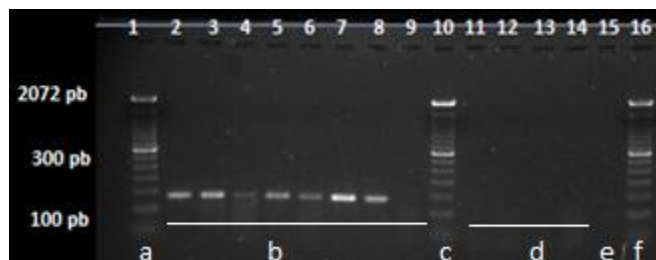


Figura 42. Electroforesis del fragmento Mutante Phe1534Cys.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb.
- b) Carril 2-9: Muestras de ADN pertenecientes a Hembras *Aedes aegypti*.
- c) Carril 10: Marcador de peso molecular 100 pb.
- d) Carril 11-14: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 100 pb.

5.3.2. Análisis de la mutación Val1016Ile

Se utilizó el mismo ADN de los individuos que fueron analizados en la identificación de la mutación Phe1534Cys en las localidades de Arenillas, Machala, El Guabo, Santa Rosa, Huaquillas y Pasaje.

Se confirmó la presencia de la mutación Val1016Ile en el 100 % de las localidades de El Guabo, Pasaje, Arenillas y Huaquillas tanto para los machos y hembras analizados (Figura 43). En la localidad de Machala se identificó la presencia de un 100 % en los machos analizados, mientras que las hembras un 83.3 %. Para la localidad de Santa Rosa se identificó un 50 % de presencia en machos y un 83.3 % para hembras. Como indica Kawada et al., (2014) la presencia de la mutación Val1016Ile en las poblaciones de mosquitos *Aedes aegypti* da a entender que la población de mosquitos presenta una resistencia hacia los piretroides. La mutación Val1016Ile a diferencia de la mutación Phe1534Cys; se encuentra reportada en otorgar resistencia a los piretroides de tipo II como la deltametrina (Álvarez et al., 2014, pp 58-67). La ausencia de la mutación en el 16.7 % de las hembras de Machala y en el 66.7 % de Santa Rosa, indica que existe un

mecanismo o una mutación *kdr* que se encuentra otorgando la resistencia al insecticida.

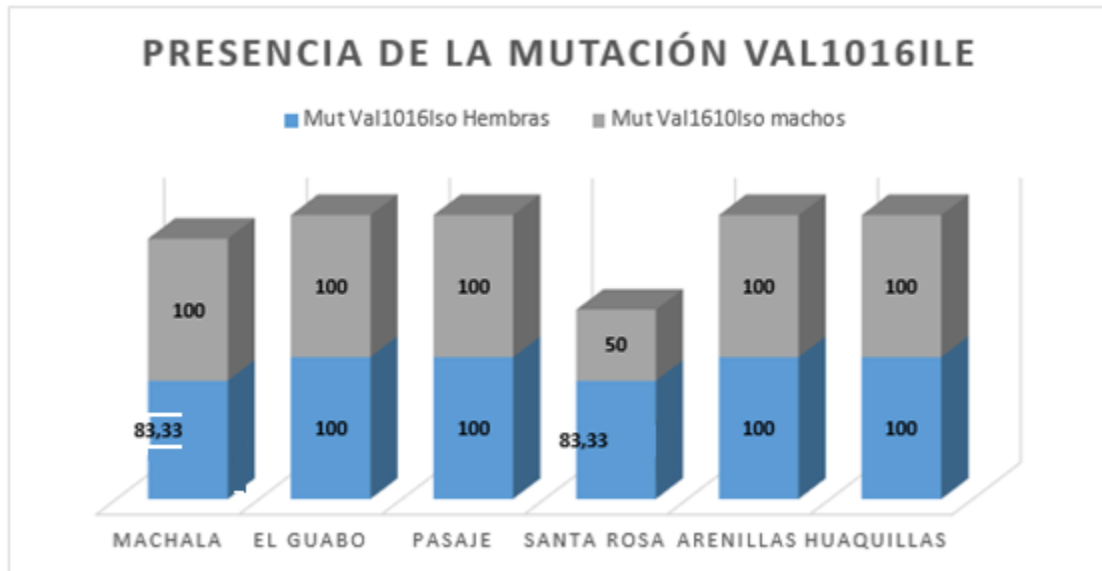


Figura 43. Diagrama de barras representando el porcentaje total de la presencia o ausencia de la mutación Val1016Ile en las localidades analizadas.

Los resultados obtenidos del análisis molecular para la mutación Val1016Ile se encuentran en la Figura 44 - 49.

5.3.2.1. Arenillas

En la Figura 44, se visualiza el fragmento Val1016Ile que corresponde a un peso molecular de 78pb de la localidad de Arenillas.

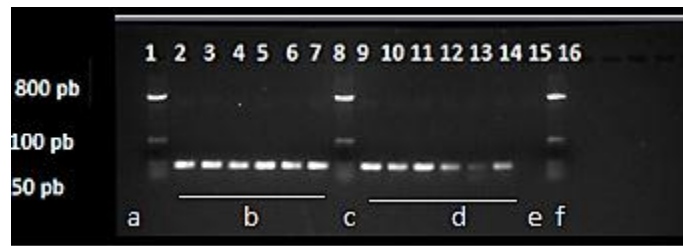


Figura 44. Electroforesis del fragmento Val1016Ile.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 50 pb.
- b) Carril 2-7: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- c) Carril 8: Marcador de peso molecular 50 pb.
- d) Carril 9-14: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 50 pb.

5.3.2.2. Machala

En la Figura 45 se visualiza el fragmento Val1016Ile que corresponde a un peso molecular de 78pb de la localidad de Machala.

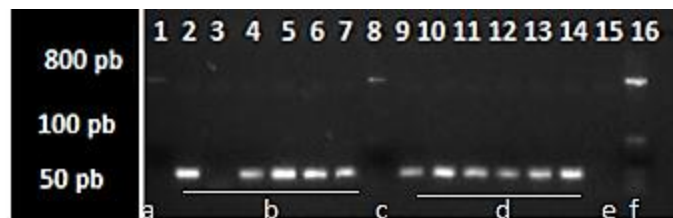


Figura 45. Electroforesis del fragmento Val1016Ile.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 50 pb.
- b) Carril 2-7: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- c) Carril 8: Marcador de peso molecular 50 pb.
- d) Carril 9-14: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 50pb.

5.3.2.3. *El Guabo*

En la Figura 46 a continuación se observa el fragmento Val1016Ile que corresponde a un peso molecular de 78 pb de la localidad de El Guabo.

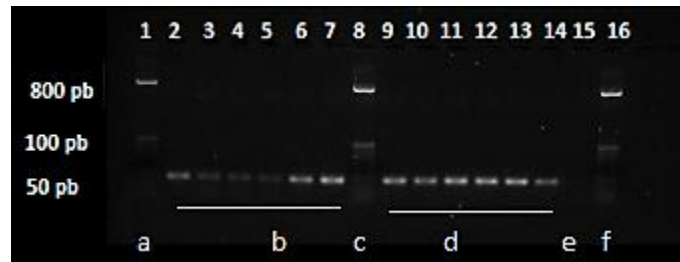


Figura 46. Electroforesis del fragmento Val1016Ile.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 50 pb.
- b) Carril 2-7: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- c) Carril 8: Marcador de peso molecular 50 pb.
- d) Carril 9-14: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 50 pb.

5.3.2.4. *Santa Rosa*

En la Figura 47, se observa el fragmento Val1016Ile que corresponde a un peso molecular de 78 pb de la localidad de Santa Rosa.

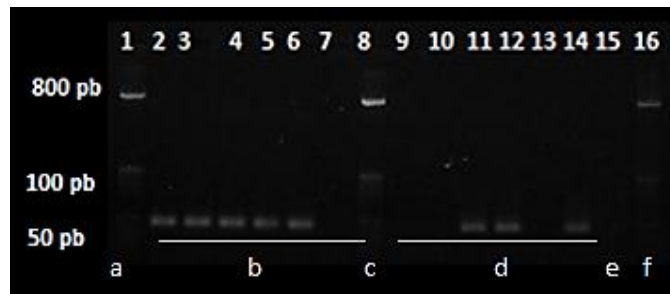


Figura 47. Electroforesis del fragmento Val1016Ile.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 50 pb.
- b) Carril 2-7: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- c) Carril 8: Marcador de peso molecular 50 pb.
- d) Carril 9-14: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 50 pb.

5.3.2.5. Huaquillas

En la Figura 48, se observa el fragmento de la mutación Val1016Ile que corresponde a un peso molecular de 78pb de la localidad de Huaquillas.

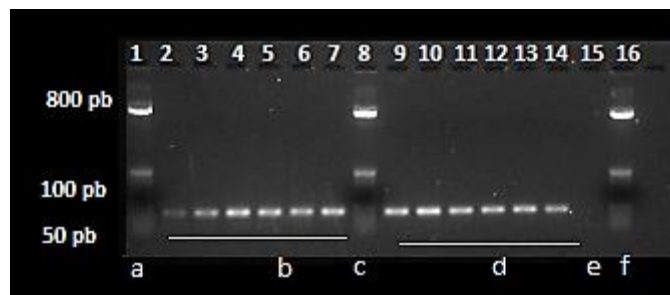


Figura 48. Electroforesis del fragmento Val1016Ile.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 50 pb.
- b) Carril 2-7: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- c) Carril 8: Marcador de peso molecular 50 pb.
- d) Carril 9-14: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 50pb.

5.3.2.6. Pasaje

En la Figura 49, se visualiza los amplicones correspondientes al fragmento Val1016Ile que corresponde a un peso molecular de 78pb de la localidad de Pasaje.

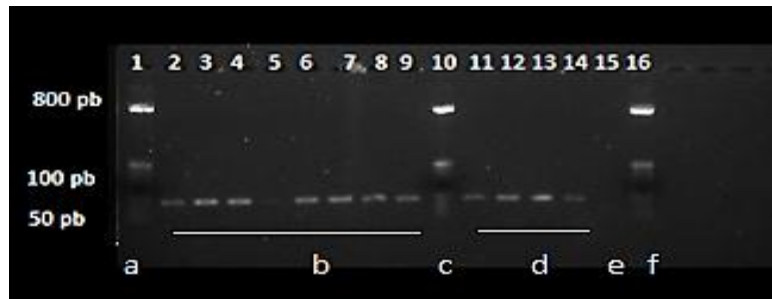


Figura 49.- Electroforesis del fragmento Val1016Ile.

- a) Carril 1: Marcador de peso molecular 50 pb.
- b) Carril 2-9: Muestras de ADN pertenecientes a hembras *Aedes aegypti*.
- c) Carril 10: Marcador de peso molecular 50 pb.
- d) Carril 11-14: Muestras de ADN pertenecientes a machos *Aedes aegypti*.
- e) Carril 15: Control negativo.
- f) Carril 16: Marcador de peso molecular 50pb.

5.4. Resultados de secuenciación

En la mutación Phe1534Cys al alinear los fragmentos “Mut” mediante Blast en el programa bioinformático “Genious 9.1.5” (Figura 50), se determinó que la secuencia obtenida en el presente trabajo, efectivamente se encuentra reportada dentro del NCBI por Kawada, *et al*, (2016) en su publicación “*Discovery of Point Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel from African Aedes aegypti Populations: Potential Phylogenetic Reasons for Gene Introgression*” con el número de accesión LC050217 la secuencia.

Bit-Score ▼	E Value	Grade	Hit start	Hit end	Name	Description	Sequence Le...	%GC	Topol
183.939	3.69e-43	100.0%	106	8	LC050217	Aedes aegypti VSCIII56 gene for voltage-gated s...99		43.4%	linear
183.939	3.69e-43	100.0%	141	43	KM677298	Aedes aegypti isolate RJ98-5 voltage gated sodiu...99		43.4%	linear
183.939	3.69e-43	100.0%	139	41	Aedes aegypti VSCIII56 gene for voltage-gated sodium channel, domain III, partial cds, country: Ghana, note: F1534C_DIII				
183.939	3.69e-43	100.0%	224	126	KM677279	Aedes aegypti isolate RJ3-68 voltage gated sodiu...99		43.4%	linear
183.939	3.69e-43	100.0%	224	126	KM677278	Aedes aegypti isolate RJ3-63 voltage gated sodiu...99		43.4%	linear
183.939	3.69e-43	100.0%	224	126	KM677276	Aedes aegypti isolate RJ3-82 voltage gated sodiu...99		43.4%	linear
183.939	3.69e-43	100.0%	224	126	KM677273	Aedes aegypti isolate RJ36-76 voltage gated sodi...99		43.4%	linear
183.939	3.69e-43	100.0%	224	126	KM677272	Aedes aegypti isolate RJ36-75 voltage gated sodi...99		43.4%	linear
183.939	3.69e-43	100.0%	224	126	KM677268	Aedes aegypti isolate RJ32-59 voltage gated sodi...99		43.4%	linear

Figura 50. Producto de alineamiento mediante Blast, de la secuencia Mut obtenida en el presente trabajo para la mutación Phe1534Cys.

Para la mutación Val1016Ile se realizó el mismo procedimiento, con el inconveniente de que los productos de secuenciación obtenidos resultaron de una calidad muy baja por lo que el índice de error al generar un alineamiento con dichas secuencias sería muy alto. Consecuentemente no se presenta el resultado producto de la secuenciación para la mutación Val1016Ile.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

La resistencia fenotípica al insecticida deltametrina en los mosquitos estudiados se evidenció mediante los porcentajes de mortalidad arrojados por el bioensayo, siendo del 75% para las localidades de Huaquillas, Arenillas, Santa Rosa y Machala, ~50% en el Guabo y ~90% en Pasaje.

El estudio a nivel genotípico frente al insecticida deltametrina, reveló la presencia de la mutación Val1016Ile en alrededor del 98% en los mosquitos. Esto demuestra la relación existente entre el mecanismo molecular de resistencia del canal de sodio dependiente del voltaje de *Aedes aegypti* con el fenotipo observado.

El estudio de resistencia a nivel genotípico frente al insecticida deltametrina en los mosquitos analizados después del bioensayo, reveló la presencia de la sustitución Phe1534Cys en el 96% de la población estudiada, siendo el 50% homocigotos para la mutación y el restante heterocigotos, lo que insinúa la existencia de otros mecanismos moleculares de resistencia a nivel genotípico, además de los estudiados.

La presencia de la mutación Phe1534Cys revela una resistencia cruzada asociada al uso prolongado de DDT y que en la actualidad estaría generando resistencia a insecticidas piretroides del tipo II como la Permetrina.

El sexo del mosquito no presenta una asociación directa con la resistencia *kdr*, por lo cual es posible emplear como material biológico a ambos sexos en análisis fenotípicos (bioensayos) para futuras investigaciones con respecto a este tipo de resistencia.

La identificación de mutaciones *kdr* conjuntamente con análisis de resistencia a insecticidas permite dentro del país, informar para la toma de decisiones en cuanto

al control del mosquito con el fin de evitar, no solamente un amplio desarrollo del vector, sino disminuir el riesgo que presenta la población ecuatoriana en cuanto a la transmisión de enfermedades como el Dengue, Chikungunya y recientemente el Zika.

El haber identificado las mutaciones Val1016Ile y Phe1534Cys del gen Voltage-gated sodium channel en poblaciones de *Aedes aegypti* nos permite tener una idea de cómo el uso de piretroides y DDT para el control del mosquito han permitido que los mismos se adapten y puedan resistir a la dosis empleada para su control. Además de que el uso no controlado de insecticidas piretroides sugiere un aumento progresivo de la resistencia por parte del insecto hacia dichos compuestos.

6.2. Recomendaciones

Para evitar problemas en cuanto al análisis de las mutaciones se recomienda realizar los bioensayos con mosquitos colectados del campo tal y como lo menciona la CDC.

Con el fin de reducir el margen de error obtenido en el análisis estadístico se recomienda emplear un número de muestra mayor al utilizado, como también de controlar de una manera más estricta factores como: tiempo de vida del mosquito, alimentación, temperatura en la que se desarrolle el bioensayo, tiempo de impregnación y secado del insecticida dentro de la botella; que pueden intervenir en la obtención de los resultados.

Se recomienda realizar cuantificación con el fin de conocer la calidad de ADN obtenido producto del empleo del protocolo de extracción de ADN, de igual manera generar un protocolo que garantice la calidad de la muestra obtenida producto del empleo del protocolo de dilución empleado para el kit de PCR Direct.

Se recomienda realizar un seguimiento de las poblaciones del mosquito en cuanto a su resistencia al insecticida previo al empleo de una dosis específica del o los insecticidas.

Para poder identificar otras mutaciones que puedan otorgar resistencia, se debería realizar un análisis molecular del segmento VI del dominio II y III del canal de sodio en la búsqueda de mutaciones que generen resistencia a insecticidas ya que cualquier mutación que se genere dentro de ambos dominios tiene relación directa a la resistencia al piretroide.

Se recomienda realizar el análisis molecular en los mosquitos considerados muertos en el bioensayo, donde en caso de encontrar ambas mutaciones dentro de los mosquitos considerados “vivos” y “muertos”, se estaría atribuyendo enormemente la resistencia a otro mecanismo a parte de las mutaciones estudiadas o a otra mutación *kdr* que aún no se encuentre identificada.

REFERENCIAS

- Agency for Toxic Substance & Disease Register. (2003). *Toxicological Profile for Pyrethrins and Pyrethroids*. Recuperado el 18 de Enero del 2016 de: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/TP.asp?id=787&tid=153>
- Álvarez, L., Ponce, G., Oviedo, M., Briceño, A y Flores, A., (2014). Mecanismos relacionados con la resistencia al derribo “kdr” a la deltametrina en *Aedes aegypti* del occidente de Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud ambiental*. (1), 58-67. Recuperado el 18 de Enero del 2016 de: <http://www.scielo.org/ve/pdf/bmsa/v54n1/art07.pdf>
- Arboleda, S., Jaramillo, N y Peterson, T. (2009). *Mapping environmental dimensions of dengue fever transmission risk in the aburra Valley*. Colombia, J. (6). 3040-3055. Recuperado el 15 de Febrero del 2016 de: <http://www.mdpi.com/1660-4601/6/12/3040>
- Atencia. M., Pérez. M., Jaramillo. M., Caldera. S., Cochero. S y Bejarano. E. (2016). *Primer reporte de la mutación F1534C, asociada con resistencia cruzada a DDT y piretroides, en Aedes aegypti de Colombia*. *Biomédica*. 36(3).
- Atlas, R. (2000). *Many faces, many microbes*. (1.ª ed.). Recuperado el 6 de Marzo del 2016 de https://books.google.com.ec/books/about/Many_Faces_Many_Microbes.html?id=zpxzmKr-be0C&redir_esc=y
- Barón, F y Téllez, F. (S/N). *Intervalos de confianza*. Recuperado el 25 de Noviembre del 2016 de <https://www.bioestadistica.uma.es/baron/apuntes/ficheros/cap02.pdf>.
- Barrera, R., Amador, M y Clark, G. (2006). *Ecological Factors Influencing Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) Productivity in Artificial Containers in Salinas, Puerto Rico*. *J. Med. Entomol.* 43(3). 484-496. Recuperado el 8 de Diciembre de: https://www.researchgate.net/profile/Roberto_Barrera/publication/7044323_

Ecological_factors_influencing_Aedes_aegypti_(Diptera_Culicidae)_productivity_in_artificial_containers_in_Salinas_Puerto_Rico/links/0deec51bb375ac1022000000.pdf

- Batra, C., Mitral, P. y Adak, T. (2005). *Control of aedes aegypti breeding in desert coolers and tires by use of Bacillus thuringiensis var. Israelensis formulation*. Journal of the American Mosquito Control Association. 16(4), 321-323. Recuperado el 6 de Mayo del 2016 de <http://europemc.org/abstract/med/11198918>
- Bisset, J. (2002). *Uso correcto de insecticidas: control de insecticidas*. Rev Cubana Medicina Tropical. 54(3). Recuperado el 6 de Mayo del 2016 de: http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol54_3_02/mtr05302.pdf
- Bhatt, S., Gething, P., Brady, O., Messina, J., Farlow, A., Moyes, C., Drake, J., Browstein, J., Hoen, A., Sankoh, O., Myer, M., George, O., Jaenisch, T., Wint, G., Simmons, C., Scott, T., Farrar, J y Hay, S. (2013). *The global distribution and burden of dengue*, Nature. (496). 504-507. Recuperado el 19 de Marzo del 2016 de: <http://www.nature.com/nature/journal/v496/n7446/full/nature12060.html>
- Brattsten, L. (1990). *Resistente mechanisms to carbamate and organophosphate insecticide*. In: *Managing resistance to agrochemicals*. W. K. Moberg (eds.), American Chemical Society. 24-60.
- Brogdon, W y Chan, A. (S/N). *Guideline for Evaluating Insecticide Resistance in Vectors Using the CDC Bottle Bioassay*. Center for Disease Control and Prevention. Recuperado el 11 de Febrero del 2016 de: https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/ir_manual/ir_cdc_bioassay_en.pdf
- Brogdon, W y McAllister, J. (1998). *Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles*. Journal of the American Mosquito Control Association. 14 (2). 159-164.

- Centers for Disease Control and Prevention. (1979). *Vector topic*. Public health service. Recuperado el 30 de Junio del 2016 de: <https://www.archives.gov/research/guide-fed-records/groups/442.html>
- Centers for Disease Control and Prevention, (2007). Instrucciones para la Evaluación de la Resistencia a Insecticida en Vectores mediante del Ensayo Biológico de la Botella de los CDC. Recuperado el 25 de Abril del 2016 de: https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/ir_manual/ir_cdc_bioassay_es.pdf
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2011). *Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas*. OPS. Recuperado el 5 de Julio del 2016 de: http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/CHIKV_Spanish.pdf
- Centers for Disease Control (CDC). (2015). *Aedes aegypti life cycle*. Recuperado el 13 de Abril del 2016 de: <http://www.cdc.gov/zika/pdfs/mosquitolifecycle.pdf>
- Centro Nacional para Epidemias Infecciosas Emergentes y Zoonóticas [NCEZID]. (2015). Recuperado el 13 de Abril del 2016 de: <http://www.cdc.gov/ncezid/dvbd/about.html>
- Centro Nacional para Epidemias Infecciosas Emergentes y Zoonóticas [NCEZID]. (2016). Recuperado el 13 de Abril del 2016 de <http://espanol.cdc.gov/enes/zika/transmission/>
- Chang, C., Shen, W., Wang, T., Lin, Y., Hsu, E y Dai, S. (2009). *A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in Aedes aegypti*. 39(4). 272-8.
- Chang, C., Hung, X., Chang, P., Wun, H y Daid, S. (2012). *Inheritance and stability of sodium channel mutations associated with permethrin knockdown resistance in Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104, (2), 136–142. Recuperado el 25 de Noviembre del 2015 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048357512000909>.

- Chareonviriyaphap, T., Akratanakul, P., Nettanomsak, S y Huntamai, S. (2003). *Larval habitats and distribution patterns of Aedes aegypti (linnaeus) and Aedes albopictus (skuse), in thailand*, 34(3), 529-535, Recuperado el 29 de Junio del 2016 de http://www.tn.mahidol.ac.th/seameo/2003_34_3/09-3080.pdf
- Davies, T., Field, L., Usherwood, P y Williamson, M. (2007). *DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels*. 59(3). 151-62.
- Dávila, S y Espinoza, N. (2004). *Comunicación personal, Servicio Ecuatoriano de Erradicación de la Malaria (SNEM)*.
- Decreto ejecutivo 905*. (2011). Dado en el Palacio Nacional, en la ciudad de San Francisco de Quito a, 3 de octubre de 2011.
- De Maria, A. (1820). *Tratado teórico- práctico del Tiphus a calórico*. (1.ª ed.). Recuperado el 18 de Agosto del 2016 de <https://books.google.com.ec/books?id=gMesUIHvNf8C&pg=PA14&lpg=PA14&dq=tratado+te>
- Dirección nacional de vigilancia epidemiológica (MSP), (2013), *Boletín epidemiológico n°1 sobre el Dengue*, Recuperado el 30 de Junio del 2016 de: <http://instituciones.msp.gob.ec/images/Documentos/Ministerio/EPIDEMIOLOGIA/gaceta2013/gaceta1.pdf>
- Dirección nacional de vigilancia epidemiológica (MSP), (2016), *Boletín epidemiológico n°1 sobre el Zika*, Recuperado el 30 de Junio del 2016 de: <http://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2015/12/GACETA-ZIKA-SEM19.pdf>
- Dirección nacional de vigilancia epidemiológica (MSP), (2016), *Boletín epidemiológico n°18 sobre Chikungunya*, Recuperado el 30 de Junio del 2016 de: <http://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2014/09/Gaceta-Chikungunya-SE18.pdf>
- Dirección nacional de vigilancia epidemiológica, (2016), *Boletín epidemiológico n°4 sobre el Zika*, Recuperado el 30 de Junio del 2016 de:

- <http://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2015/12/BOLETIN-NO.-4-ZIKA-1.pdf>
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, A., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., Silver, K y Zhorov, B. (2014). *Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance*. Volume 50, July, Pages 1–17
- Dusfour, I., Zorrilla, P., Guidez, A., Issaly, J., Girod, R., Laurent, G., Robello, C y Strode, C. (2015). *Deltamethrin Resistance Mechanisms in Aedes aegypti Populations from Three French Overseas Territories Worldwide*. PLoS Negl Trop Dis 9(11).
- Du, Y., Nomura, Y., Satar, G., Zhaonong, G., Nauen, R., He, S., Zhorov, B y Dong, K. (2013). *Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel*. PNAS Journal. 110(29). 11785-11790. Recuperado el 11 de Agosto del 2016 de: https://www.jstor.org/stable/42712480?seq=1#page_scan_tab_contents
- ESPOL, (2004). *Inventario de plaguicidas COPs en el Ecuador*. Proyecto GEF. Recuperado el 16 de Marzo del 2016 de: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/16314/1/Inventario%20de%20Plaguicidas%20COPs%20en%20el%20Ecuador.pdf>
- Evans, R. (2014). *European Centre for Disease Prevention and Control*. PMC Europe. 29(9).
- FAO. (1979). *Recommended methods for the detection and measurement of the resistance of agricultural pests to pesticides*. FAO Plant Protection Bull. (27). 29-32.
- Figuroa, L., Marín, M., Pinto, E y Molina, D. (2006). *Mecanismos de resistencia a insecticidas organosintéticos en una población de Anopheles aquasalis Curry (Diptera: Culicidae) del estado Aragua*. Boletín de Malariología y Salud Ambiental, 46(1), 39-47. Recuperado el 29 de Agosto del 2016 de: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482006000100005&lng=es&tlng=es.

- Forshaw, P., Ray, D. (2000). *Pyrethroid insecticides: poisoning syndromes, synergies, and therapy*. Journal of toxicology, 38(2). Recuperado el 25 de Julio del 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10778904>
- Gammon, D., Brown, W y Casida, J. (1981). *Two clases of pyrethroid action in the cockroach*. Pestic. Biochem. Physion. 15. 181-191.
- Garcia, P., Flores, A., Fernandez, I., Saavedra, K., Reyes, G y Lozano, S. (2009). *Recent Rapid Rise of Permethrin Knock Down Resistance Allele in Aedes aegypti in Mexico*. PLoS Neg Trop Dis. 3(10). 531. Recuperado el 14 de Septiembre del 2016 de: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000531>
- Garro, G y Méndez, L. (2016). *Mosquitos genéticamente modificados para combatir el dengue*. Recuperado el 30 de Mayo del 2016 de http://revistas.tec.ac.cr/index.php/investiga_tec/article/viewFile/2495/2284.
- González del Valle. (1865). *Programa de lecciones de patología externa para el curso académico de 1865*. (1.ª ed.). Recuperado el 18 de Agosto del 2016 de http://bvs.sld.cu/revistas/aci/vol12_4_04/aci05404.htm
- González, F., Quiñones, M., Lenhart, A y Brogdon, W. (2011). *Insecticide resistance status of Aedes aegypti (L.) from Colombia*. Pest Management Science. 67(4). 430-7.
- Gualdron, L. (2007). *Manual de vigilancia entomológica de Dengue, Chagas y Leishmaniasis*. Santander: Unidad básica de entomología
- Harris, A., Rajatileka, S y Ranson, H. (2010). *Pyrethroid Resistance in Aedes aegypti from Grand Cayman*. Am.J.Trop.Med.Hyg. 83(2). 277-284
- Helmuth, W. (2000). *Manual de entomología agrícola de ecuador*. Recuperado el 15 de Mayo del 2016 de: <http://www.stodomingo.ute.edu.ec/content/101684-29-3-2-13-2/Manual%20Entomologia%20Agricola%20del%20Ecuador.PDF>.
- Hernández, F., Chavarría, F y García, J. (2000). *Aedes, dengue y la posibilidad de un enfoque diferente de lucha*. Revista Costarricense de Salud Pública. 9(16). Recuperado el 3 de Junio del 2016 de:

http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292000000100004

- Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), (2016). *Sistema nacional de vigilancia y alerta temprana para el control del vector de dengue y fiebre amarilla (fase 1)*. Recuperado el 17 de Abril del 2016 de: http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/cirev/?page_id=66
- Isern, M. (2002). *La química de los pesticidas y su metodología analítica*. Recuperado el 2 de Junio del 2016 de: <http://www.ucel.edu.ar/upload/libros/ISERN,%20S.%20Quimica%20de%20los%20pesticidas%20y%20su%20metodologia%20analitica.pdf>
- Kawada, H., Thaung, S., Kawashima, E y Maung, Y. (2014). *Co-occurrence of Point Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel of Pyrethroid-Resistant Aedes aegypti Populations in Myanmar*. PLoS Negl Trop Dis 8(7): e3032.
- Kawada, H., Higa, Y., Futami, K., Muranami, Y., Kawashima, E., Osei, J y Minakawa, N. (2016). *Discovery of Point Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel from African Aedes aegypti Populations: Potential Phylogenetic Reasons for Gene Introgression*. PLoS Neglected Tropical Diseases, 10(6), e0004780. Recuperado el 13 de Noviembre del 2016 de: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004780>
- Kraemer, M., Sinka, M., Duda, K., Mylne, A., Shearer, F., Barker, C., Moore, C., Carvalho, R., Coelho, G., Bortel, V., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, E., Teng, H., Brady, O., Messina, J., Pigott, D., Scott, T., Smith, D., Wint, G., Golding, N y Hay, S. (2015). *The global distribution of the arbovirus vectors Aedes aegypti and Ae. Albopictus*. Elifescience. (12). 1-18.
- Kroegger, A., Mancheno, M., Pesse, K. (1995). *Métodos para mejorar el control de la malaria en Ecuador y Colombia*. Cayambe, Ecuador: Abya-Yala. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 53(4). 313-323.
- Kushwah, R., Dykes, C., Kapoor, N., Adak, T y Singh, O. (2015). *Pyrethroid-Resistance and Presence of Two Knockdown Resistance (kdr) Mutations,*

- F1534C and a Novel Mutation T1520I, in Indian Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis. 9(1).
- La Provincia de El Oro, (2011), *Cantones*, Recuperado el 22 de Abril del 2016 de: <http://laprovinciadeloro.blogspot.com/2011/08/cantones.html>
- Lima, K, (2009), *Ciudad de Pasaje*, Recuperado el 19 de Septiembre del 2016 de: <http://kerlyta1991.blogspot.com/>
- Linns, J., Brito, L., Garcia, G., Araki, A., Bruno, R., Lima, J., Valle, D y Martins, A. (2014). *Distribution and dissemination of the Val 1016Ile and Phe1534Cys kdr mutations in Aedes aegypti Brazilian natural populations*. Parasites & Vectors. 7(25) 141-159. Recuperado el 12 de Diciembre del 2015 de: <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/25>
- Mallet, J. (1989). *The evolution of insecticide resistance: Have the insects won?* 4(11). 165-169.
- Mangudo C., Aparicio J y Gleiser R. (2015). *Tree holes as larval habitats for Aedes aegypti in urban, suburban and forest habitats in a dengue affected area*. 105(6), 679-84. Recuperado el 28 de Marzo del 2016 de: <https://www.cambridge.org/core/journals/bulletin-of-entomological-research/article/div-classtitletree-holes-as-larval-habitats-for-span-classitalicaedes-aegyptispan-in-urban-suburban-and-forest-habitats-in-a-dengue-affected-areadiv/1D24EF4EFD0AAC0A5F4C4DFEA09CA25C>.
- Matsumura, F. (1975). *Toxicology of insecticides*. Plenum Press, New York. [SCI]
- Ministerio de Salud Pública [MSP]. (2004). *Manual para la referencia y contrarreferencia de pacientes y usuarios*. (1.ª ed). Recuperado el 1 de Abril del 2016 de https://books.google.com.ec/books/about/Manual_para_la_referencia_y_contrarrefer.html?hl=es&id=zmiJHAAACAAJ
- Ministerio de Salud Pública [MSP]. (2015). *Servicio nacional de control de enfermedades transmitidas por vectores artrópodos*. (1.ª ed). Recuperado el 19 de Septiembre del 2016 de

https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/sigobito/tareas_seguinto/1756/instructivo_26_de_enero_2015.pdf

Ministerio de salud pública del Ecuador (MSP), (2016). *Ecuador en alerta para prevenir el contagio del dengue*. Recuperado el 30 de Marzo del 2016 de: <http://www.salud.gob.ec/estrategia-nacional-de-control-del-dengue/>

Ministerio de salud pública del Ecuador (MSP), (2016). *Ecuador y Cuba ampliarán exitoso proyecto de control del dengue*. Recuperado el 3 de Abril del 2016 de: <http://www.salud.gob.ec/ecuador-y-cuba-ampliaran-exitoso-proyecto-de-control-del-dengue/>

Ministerio de salud pública del Ecuador (MSP), (2016). *Plan de contingencia y emergencia etapa invernal Cantón Pasaje*. Recuperado el 25 de Octubre del 2016 de: <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiMidullbbSAhUI42MKHb-KAm4QFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.enosecuador.com%2Fplanes-de-contingencia-enos%2Fcategory%2F16-planes-de-contingencia-el-oro%3Fdownload%3D92%3Ael-oro-pasaje&usg=AFQjCNEsJ07PQ7ifnn8cZxtOluWbQU4srQ&sig2=m50DPESP EwGwt4geYP4pJA>

Ministerio de salud pública del Ecuador (MSP), (2016). *Plan de contingencia y emergencia etapa invernal Cantón El Guabo*. Recuperado de: https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwitocGblbbSAhVP-2MKHe3UDRoQFggYMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.enosecuador.com%2Fplanes-de-contingencia-enos%2Fcategory%2F16-planes-de-contingencia-el-oro%3Fdownload%3D92%3Ael-oro-pasaje&usg=AFQjCNEsJ07PQ7ifnn8cZxtOluWbQU4srQ&sig2=kGK4G7w_0EnJGvRA_6KfAA&bvm=bv.148441817,d.cGc

Navarro, J., Gómez, J., García, F y Pina, E. (2003). *Matemáticas*, Editorial MAD. Recuperado el 16 de Noviembre del 2016

- de:<https://books.google.com.ec/books?id=mw3kdsZA6pQC&pg=PA186&dq=muestreo+por+estratos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjmndXxkqvQAhVB4CYKHfp2CfEQ6AEIGzAA#v=onepage&q&f=false>
- Nelson, M. (1986). *Aedes aegypti Biología y Ecología*. Washington D.C.: PAHO. Recuperado el 2 de Marzo del 2016 de: <http://iris.paho.org/xmLui/handle/123456789/28513>
- Ooi, E., Goh, K., y Gubler, D. (2006). *Dengue Prevention and 35 Years of Vector Control in Singapore. Emerging Infectious Diseases*, 12(6), 887–893.
- Organización mundial de la salud (WHO) (2016). *Control químico*. Recuperado el 25 de Mayo del 2016 de: http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/chemical_control/es/
- Organización panamericana de la salud (PAHO) (2016). *Control vectorial del Aedes aegypti mediante rociado espacial*. Recuperado el 7 de Junio del 2016 de: http://www.paho.org/par/index.php?option=com_content&view=article&id=443:control-vectorial-aedes-aegypti-mediante-rociado-espacial&Itemid=258.
- O'Reilly, A., Khambay, B., Williamson, M., Field, L., Wallace, B & Davies, T. (2006). *Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel*. *Biochemical Journal*, 396(2), 255–263.
- Oster, A, et al. (2016). *Directrices provisionales para la prevención del contagio del virus del Zika por transmisión sexual*. *CDC*. 65(5), 120-121.
- Pavon, J. (2015). *Guía para la instalación y mantenimiento del insectario de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. Recuperado el 14 de Mayo del 2016 de: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/GuiaInstalacionMantenimientoInsectarioAedesAegypti.pdf>
- Pineda, L. (2011). *La producción de banano en la provincia de El Oro*. Recuperado el 19 de Noviembre del 2016 de: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1199/1/TESIS%20PRODUCCION%20DE%20BANANO%20EN%20LA%20PROVINCIA%20DE%20EL%20ORO%202009-2010.pdf>

- Ponce, G., Cantú, P., Flores, A., Badii, M., Zapata, M., López, B y Fernández, I. (2006). *Modo de acción de los insecticidas*. Volumen 7 No. 4
- Powell, J., Tabachnick, W. (2013). *History of domestication and spread of Aedes aegypti- A Review*. Scielo. (108). 11-17. Recuperado el 19 de Agosto del 2016 de: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762013000900011
- Real, J., Álava, A y Mosquera, C. (2012). *Epidemia de dengue hemorrágico en el Ecuador*. Revista de medicina tropical. 42(1), pp. 11-34.
- Reyes, V. (2004). *Comunicación personal, Servicio Ecuatoriano de Erradicación de la Malaria (SNEM)*.
- Rickard, C. (1960). *Aedes Aegypti (L.), the Yellow Fever Mosquito*. Its life history, bionomics, and structure. Science. (133), 1473-1474. Recuperado el 11 de Junio del 2016 de: <http://science.sciencemag.org/content/133/3463/1473.2>
- Rodríguez, M., Bisset, L., Zavala, M y Carmen, M. (2012). *Niveles de Susceptibilidad a Temefos y Eficacia de Pyriproxifeno para el control de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Guayaquil - Ecuador*. Recuperado el 4 de Agosto del 2016 de: <http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/8/7>
- Rodríguez, M., Pérez, A., Howard, F y Reyes, F. (2016). *Biological Control of Dengue Vectors*. Recuperado el 8 de Mayo del 2016 de <http://cdn.intechweb.org/pdfs/29608.pdf>
- Rogg, H. (2000). *Manual de entomología agrícola del Ecuador*. Recuperado 28 de Febrero del 2016 de: <http://www.stodomingo.ute.edu.ec/content/101684-29-3-2-13-2/Manual%20Entomologia%20Agricola%20del%20Ecuador.PDF>
- Rozendaal, J. (1997). *Vector Control. World Health Organization Geneva*. Recuperado el 22 de Junio de: http://www.who.int/whopes/resources/vector_rozendaal/en/
- Russel, T., Brown, M., Purdie, D., Ryan, P., y Kyan, D. (2003). *Efficacy of VectoBac (Bacillus thuringiensis variety israelensis) Formulations for Mosquito Control in Australia*. Journal of economic entomology. 96(2),

- 1786-1789. Recuperado el 18 de Agosto del 2016 de: <https://academic.oup.com/jee/article-abstract/96/6/1786/2217899/Efficacy-of-VectoBac-Bacillus-thuringiensis?redirectedFrom=fulltext>
- Saavedra, K., Urdaneta, L., Rajatileka, S., Moulton, M., Flores, A., Fernandez, I., Bisset, J., Rodriguez, M., McCall, P., Donnelly, M., Ranson, H., Hemingway, J y Black, W. (2007). *A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*. 16(6). 785-789.
- Salvatella, R. (1996). *Aedes aegypti, Aedes albopictus (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay*. Sindicato Médico del Uruguay. Recuperado el 8 de Agosto del 2016 de: <http://www.bvsde.paho.org/bvsasv/fulltext/aede.pdf>
- Sanchez, J. (2011). *Las enfermedades infecciones en la historia humana*. (1.ª ed.). Recuperado 17 de Abril del 2016 de https://books.google.com.ec/books?id=wShbTJCnj8cC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Sayono, S., Hidayati, A., Fahri, S., Sumanto, D., Dharmana, E., Hadisaputro, S., Asih, P y Sysfruddin, D. (2016). *Distribution of Voltage-Gated Sodium Channel (Nav) Alleles among the Aedes aegypti Populations In Central Java Province and Its Association with Resistance to Pyrethroid Insecticides*. *PLoS ONE* 11(3): e0150577.
- Soderlund, D y Bloomquist, J. (1990). *Molecular mechanism of insecticide resistance*. (ed). Pp. 58-96.
- Schaper, Stefan, Hernández, Francisco, & Soto, Lisbeth. (1998). *La lucha contra el dengue: control biológico de larvas de Aedes aegypti empleando Mesocyclops thermocyclopoides (Crustácea)*. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 19(1-2), 119-125. Recuperado el 26 de Abril del 2016 de: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29481998000100011&lng=en&tlng=es.

- Schleier, J. (2011). *Pyrethrins and Pyrethroid Insecticides*. RSC Green Chemistry. (11).
- Schliessmann, D. (1965). *Aedes aegypti eradication program of the united states-progress report 1965*. Recuperado el 25 de Abril del 2016 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1227178/pdf/amjphnation00071-0078.pdf>
- Stenhouse, S., Plernsub, S., Yanola, J., Lumjuan, N., Dantrakool, A., Choochote, W y Somboon, P. (2013). *Detection of the V1016G mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) by allele-specific PCR assay, and its distribution and effect on deltamethrin resistance in Thailand*. *Parasites & Vectors*. 6(253). Recuperado el 19 de Noviembre del 2016 de: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-6-253>.
- Sternersen, J. (2004). *Chemical Pesticides Mode of action and toxicology*. (1.ª ed). Recuperado 29 de Marzo del 2016 de: https://books.google.com.ec/books?id=WjReuSXxl4YC&pg=PA256&lpg=PA256&dq=stenersen+aedes+aegypti&source=bl&ots=INBik2v9J7&sig=TZ71bgHmFYsZ1dtuX5bMFmGLim8&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi7yMaWj_vPAhUDNz4KHcJECOcQ6AEILjAD#v=onepage&q=stenersen%20aedes%20aegypti&f=false
- Suarez, M., Verbel, A. (2013). *Chemical control of Aedes aegypti: a historical perspective*. *Costarricense de Salud Pública*, 22(1), 68-75. Recuperado el 30 de Noviembre del 2016 de: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292013000100012&lng=en&tlng=en.
- Tuzimski, T., Soczewinski, E. (2016). *Correlation of retention parameters of pesticides in normal and reversed phase systems and their utilization for the separation of a mixture of 14 triazines and urea herbicides by means of two-dimensional thin-layer chromatography*. *J. Chromat. A*. 961:277-283.

- Valderrama, E., González, R y Jaramillo, G. (2008). *Evaluación de la susceptibilidad de Aedes aegypti (L) diptera: culicidae a un insecticida organofosforado y un piretroide en cuatro poblaciones del valle del Cauca, mediante dos tipos de bioensayos*. Boletín del museo de entomología de la universidad del valle 9(2): 1-11.
- Valdivieso, C., Valdivieso, R y Valdivieso, O. (2011). *Determinación del tamaño muestral mediante el uso de árboles de decisión*. Recuperado el 15 de Marzo del 2016 de: <ftp://ftp.repec.org/opt/ReDIF/RePEc/iad/wpaper/0311.pdf>
- Vezzani, D y Carbajo, A. (2008). *Aedes aegypti, Aedes albopictus, and dengue in Argentina: Current knowledge and future directions*. Mem Inst Oswaldo Cruz. (103). 66-74. Recuperado el 14 de Noviembre del 2016 de: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762008000100010
- Wuliandari, J., Lee, S., White, V., Tantowijoyo, W., Hoffmann, A y Endersby-Harshman, N. (2015). *Association between Three Mutations, F1565C, V1023G and S996P, in the Voltage-Sensitive Sodium Channel Gene and Knockdown Resistance in Aedes aegypti from Yogyakarta, Indonesia*. *Insects*. 6(3). 658–685.

ANEXOS

Anexo 1.- Los resultados de secuenciación son presentados basándose en el decreto ejecutivo 905 que tienen como objeto *“El establecimiento de las normas complementarias para la aplicación de la Decisión 391 de la Comunidad Andina, relativa al Régimen Común sobre Acceso a los Recursos genéticos en todo el territorio nacional, así como también: 1. Promover la conservación y uso sostenible de la diversidad biológica y de los recursos biológicos, garantizando la estabilidad de ecosistemas y los derechos de la naturaleza para el buen vivir; 2. Determinar las autoridades encargadas de la inscripción de solicitudes, el registro público de las mismas y el control de los expedientes respecto a los Contratos Marco y Contratos de Acceso a Recursos genéticos; 3. Prever y asegurar condiciones para una participación justa y equitativa en los beneficios derivados del acceso a los recursos genéticos; 4. Asegurar el acceso y transferencia de tecnologías apropiadas para la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica o que utilicen recursos genéticos y no causen daños al medio ambiente; 5. Promover la consolidación y desarrollo de capacidades científicas, tecnológicas y técnicas a nivel local y nacional, a partir de los recursos genéticos que contribuyan a la realización del Buen Vivir, la satisfacción de las necesidades básicas, la conservación del patrimonio natural y cultural e impulse la diversificación productiva del país.”* (Decreto ejecutivo 905, 2011).

Dentro del cual se detalla en el Artículo 2 que *“Este Reglamento es aplicable a los recursos genéticos de los cuales el Estado ecuatoriano es País de origen, a sus productos derivados, a sus componentes intangibles asociadas y a los recursos genéticos de las especies migratorias que por causas naturales se encuentren en su territorio.”* (Decreto ejecutivo 905, 2011).

