Instituto Nacional de Salud Pública
Escuela de Salud Pública de México
Centro Regional de Investigación en Salud Pública

Variación de Hidrocarburos Cuticulares en *Aedes aegypti* de Acuerdo a su Estado Reproductivo

Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias de la Salud con Área de Concentración en Enfermedades Transmitidas por Vector

SAMANTHA DAVINIA RUÍZ AGUIRRE

Generación 2014-2016

Director de Tesis: Dr. Armando Ulloa García

Asesor: Dr. Leopoldo C. Cruz López

Tapachula, Chiapas **Agosto 2016**

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a mis padres la señora Dolores Aguirre Díaz Barriga y el señor Mario Ruiz Salgado por brindarme siempre su apoyo de forma incondicional en cada proyecto que he realizado, al Doctor Armando Ulloa García, al Doctor Leopoldo C. Cruz López, al M.C. Gabriel Fuentes Maldonado, al Doctor Ildefonso Fernández Salas, al Doctor Julio C. Rojas León, al señor José Muñoz Reyes y al señor Eufronio Díaz Espinosa por su apoyo en la creación de este trabajo.

Agradezco a todo el equipo del laboratorio de Ecología Química de Ecosur, especialmente a la Ingeniera María Guadalupe Meneses Arias por su apoyo durante mi entrenamiento en el laboratorio y al M.C. David Alavez Rosas por su guía y apoyo durante mi estancia en el laboratorio, sin ustedes no habría sido posible el trabajo de laboratorio.

Agradezco a mis profesores y mis compañeros de maestría por todas sus enseñanzas.

Agradezco a las familias Fuentes Guillen y a la familia Mejía Luna por su amistad y apoyo incondicional**.**

Índice

Introducción 1

Marco Teórico 3

Antecedentes 4

Justificación 5

Hipótesis 6

Objetivo General 6

Objetivos Específicos 6

Material y Métodos 7

Resultados 11

- Perfil de hidrocarburos cuticulares en hembras y machos de *Aedes aegypti* 11
- Variación de hidrocarburos cuticulares en hembras copuladas 22
- Variación de hidrocarburos cuticulares en hembras grávidas 23
- Variación de hidrocarburos cuticulares en hembras paridas 24
- Variación de hidrocarburos cuticulares en hembras grávidas y paridas 25
- Variacion del hidrocarburo cuticular pentacosano en hembras copuladas, grávidas y paridas 27
- Variación de hidrocarburos cuticulares en machos copulados 29

Discusión 30

Conclusiones 34

Bibliografía 35

Introducción

Aedes aegypti está implicado en la transmisión de los virus de dengue, Chikungunya y Zika. El dengue es una enfermedad ampliamente distribuida a nivel mundial, se estima que más de 3 billones de personas viven en regiones endémicas[1] y México es un país hiperendémico con transmisión en 28 de los 32 estados por el vector *Ae. aegypti*[2]. Por otro lado, la transmisión de otras enfermedades emergentes en el país transmitidas por el mismo vector, ocasionó los primeros casos de infección por el virus Chikungunya a finales del año 2014, en el estado de Chiapas[3], mientras que los casos de transmisión autóctona de Zika se detectaron en noviembre del año 2015[4]; todo esto ha generado serios problemas de salud pública en el país relacionados con el aumento de las poblaciones de *Ae. aegypti*. El mosquito *Ae. aegypti* se encuentra en áreas urbanas, donde la transmisión de las enfermedades ocurre por la ingesta de sangre, que permite a las hembras completar la maduración de sus huevos y ovipositar 3 o 4 días después[5]. Seguido de la ingesta de sangre infectada por alguno de estos virus, es necesario que cursen el periodo de incubación extrínseco, el cual solo ocurre en las hembras más longevas, para poder ser transmitidos al ser humano[6]; por lo tanto, la edad del vector *Ae. aegypti* y su estado reproductivo, representan 2 factores importantes en la transmisión efectiva de las arbovirosis.

En mosquitos, se reconocen 3 edades basadas en los cambios fisiológicos de las hembras: nulíparas, grávidas y paridas[7]. En cada una de ellas se establece un estatus reproductivo, donde las nulíparas se caracterizan por no tener actividad sexual, las grávidas por tener actividad sexual y alimentación sanguínea, y las paridas, por su actividad sexual, alimentación sanguínea y la puesta de huevos, esto último como expresión final del ciclo gonotrófico, lo que le da el estatus de riesgo de transmisión de enfermedades, debido a que ésta edad se considera la más longeva[8]. Por ello, la determinación de la edad de las hembras de mosquito se realiza mediante diferentes métodos, entre los que destacan las técnicas de Polovodova (1941) y Detinova (1945), basadas en la identificación de cambios morfológicos de los ovarios[9], usados como criterios

para identificar la edad fisiológica de las hembras. Sin embargo, existe un método más reciente para la determinación de la edad en los insectos basado en el perfil de hidrocarburos cuticulares. Los hidrocarburos cuticulares protegen a los insectos de la desecación, de la entrada de microorganismos dañinos[10] y pueden variar en relación a la edad, estatus reproductivo, estatus alimenticio, entre otros factores[11]. Dichos compuestos se han utilizado para la determinación de la edad de *Ae. aegypti*[12], por lo tanto, es de gran interés investigar si los hidrocarburos cuticulares también pueden estimar el estatus reproductivo en poblaciones de mosquitos *Ae. aegypti.*

Marco Teórico

Las enfermedades transmitidas por el vector *Ae. aegypti* se distribuyeron a zonas tropicales y subtropicales de Latinoamérica, debido a la introducción del mosquito proveniente de África[13]. En México, las poblaciones de ésta especie varían de acuerdo a la altitud, encontrándose poblaciones abundantes a una altitud de 0 a 1300 msnm, moderadamente abundantes de 1300 a 1700 msnm, y muy escasos de 1700 a 2150 mnsm[14], lo cual indica que *Ae. aegypti* se localiza en la mayoría de los estados del territorio nacional; lo anterior representa un problema de salud pública, por lo que es necesario contar con técnicas más novedosas y eficientes en la evaluación entomológica y en la evaluación del riesgo de transmisión de las enfermedades transmitidas por el vector; por ello, la estimación del estatus reproductivo de *Ae. aegypti* mediante la variación del perfil de hidrocarburos cuticulares, abre la posibilidad de identificar poblaciones con mayor riesgo de transmisión de enfermedades.

La primera descripción de los hidrocarburos cuticulares, como los compuestos más abundantes de los lípidos cuticulares de los insectos, fue realizada en 1934 por Chinball y colaboradores[15]. Los hidrocarburos cuticulares además de poseer funciones protectoras[16], también tienen funciones de señalización química[17], lo cual podría indicar que en *Ae. aegypti,* el estatus reproductivo puede ser comunicado por señales químicas a otros miembros de su especie mediante la variación del perfil de hidrocarburos cuticulares, ya que estos compuestos son sintetizados en las células denominadas oenocitos, indicando que su producción es dirigida por el genotipo de los insectos[18]. Esto puede ser aprovechado como una herramienta para la identificación de poblaciones de *Ae. aegypti* que implican un riesgo de transmisión de enfermedades, debido a que la principal característica de dichas poblaciones, es la ingesta de sangre, la cual da inicio al ciclo gonotrófico. Por lo tanto, si la sangre ingerida está infectada con alguna arbovirosis, la hembra puede transmitir dicha arbovirosis cada vez que vuelva a alimentarse de una fuente sanguínea[19].

Antecedentes

Varios estudios han señalado la variación de los hidrocarburos cuticulares en diferentes especies de dípteros de acuerdo al incremento de edad y a su estado reproductivo. En el caso de la especie *Calliphora vomitoria,* se encontró un incremento en la síntesis de los hidrocarburos monometil-alcanos 24 horas después de haber eclosionado[20]. Similarmente, en otros estudios, se demostró la existencia de variaciones en el perfil de hidrocarburos cuticulares de hembras y machos de *Drosophila melanogaster* conforme al incremento de la edad y al estatus reproductivo[21,22]. Por otro lado, un estudio realizado en EUA, donde se usaron hembras de *Musca domestica* colectadas en campo, demostró la existencia de la variación del hidrocarburo cuticular 9-tricosano en hembras copuladas respecto hembras vírgenes[23], así mismo, en *Anopheles stephensi*, se observó una disminución de los hidrocarburos cuticulares nonacosano y hentriacotano conforme al incremento de la edad[24], mientras que poblaciones de hembras y machos de *Culex quinquefasciatus,* mostraron un incremento del hidrocarburo nonacosano en relación a la edad[25]. Otro estudio demostró que en hembras apareadas de 5 días de edad de *Anopheles gambiae*, los hidrocarburos heneicosano y tricosano disminuyeron en comparación con hembras de la misma edad no apareadas; mientras que en hembras copuladas de *Ae. aegypti,* se observó un incremento de los hidrocarburos cuticulares heptadecano y pentacosano en comparación con hembras vírgenes de la misma edad[26]. Finalmente, en hembras de *Ochlerotatus vigilax* y *Anopheles farauti,* se presentó un incremento del hidrocarburo cuticular heptadecano asociado a la edad[27].

Justificación

La edad del vector *Ae. aegypti* y su estado fisiológico representan 2 factores importantes en la transmisión efectiva de las arbovirosis. Se reconocen 3 edades basadas en los cambios fisiológicos de las hembras mosquito: nulíparas, grávidas y paridas. En cada una de ellas se establece un estatus reproductivo, donde las nulíparas se caracterizan por no tener actividad sexual, las grávidas con actividad sexual y alimentación sanguínea, y las paridas por tener actividad sexual, alimentación sanguínea y la puesta de huevos como expresión final del ciclo gonotrófico y condición de riesgo para la transmisión de enfermedades, debido a que se considera la más longeva. Basado en la biología de esta especie, se han tenido evidencias de la variación del perfil de hidrocarburos cuticulares en hembras copuladas, sin embargo, no se tiene información sobre variaciones en machos copulados y en hembras grávidas y paridas. Por lo tanto, determinar las variaciones de hidrocarburos cuticulares en los diferentes estados reproductivos permitirá contar con técnicas de mayor precisión en la identificación de poblaciones con mayor riesgo epidemiológico. Para ello se propone la siguiente pregunta científica: ¿Existe variación en la composición de los hidrocarburos cuticulares para cada estado reproductivo en machos y hembras de *Ae. aegypti*?

Hipótesis

Los estados reproductivos de *Aedes aegypti* demuestran variación en los perfiles de hidrocarburos cuticulares específicos para cada uno de los estados.

Objetivo General

Determinar la variación de hidrocarburos cuticulares de hembras y machos de *Aedes aegypti.*

Objetivos Específicos

a) Determinar los perfiles de hidrocarburos cuticulares presentes en cada uno de los estados reproductivos de hembras *Aedes aegypti.*

b) Determinar los perfiles de hidrocarburos cuticulares presentes en cada uno de los estados reproductivos de machos *Aedes aegypti.*

c) Establecer si existe un hidrocarburo cuticular específico para cada uno de los estados reproductivos tanto en machos y hembras.

Material y Métodos

Se obtuvo un lote de huevos de *Ae. aegypti* generación F1 de poblaciones silvestres, proporcionado por el insectario del Centro Regional de Investigación en Salud Pública. Los huevos fueron puestos a eclosionar en agua purificada dentro de charolas de plástico de 70 x 46 cm, con una profundidad de 9 cm, a una temperatura ambiente de 28 ºC, 80% de humedad relativa y un fotoperiodo de 14:10 horas (luz: oscuridad). La densidad de las larvas recién eclosionadas fue distribuida a 250 individuos por litro de agua purificada en charolas de 30 x 50 cm bajo las mismas condiciones ambientales, además, se alimentaron con alimento esterilizado y tamizado para ratón de la marca Harlan, proporcionando 3 alimentaciones al día hasta el proceso de pupación. Tras la obtención de pupas, estas se colectaron y se separaron por tamaño, de acuerdo a la técnica modificada de Polestork y colaboradores[26], donde las pupas de mayor tamaño generalmente corresponden a la emergencia de hembras y las pupas de menor tamaño generan machos. Posteriormente, las pupas ya clasificadas, se colocaron en recipientes plásticos tapados con mallas mosquiteras, y una vez que emergieron los adultos, se les proporcionó alimentación con solución de sacarosa al 10% hasta que fueron procesados.

Clasificación de los estados reproductivos de hembras y machos *Aedes aegypti*

Para el análisis de los hidrocarburos cuticulares, los machos se clasificaron en 4 estados reproductivos correspondientes a machos vírgenes de 8 horas de edad, machos vírgenes de 3 días de edad, machos copulados de 5 días de edad, y finalmente un control de machos vírgenes de 5 días de edad. Las hembras se clasificaron en 5 estados reproductivos correspondientes a hembras vírgenes de 8 horas de edad, hembras vírgenes de 3 días de edad, hembras copuladas de 5 días de edad, hembras grávidas de 7 días de edad, hembras paridas de 10 días de edad y 3 controles correspondientes a hembras vírgenes de 5, 7 y 10 días de edad, respectivamente. Las hembras y machos adultos seleccionados para los estados reproductivos de copulados y las hembras adultas seleccionadas para los estados reproductivos de grávidas y paridas, se confinaron en jaulas

entomológicas de aluminio de 30 x 30 x 30 cm, desde el primer día de emergencia, a una densidad máxima de 1000 mosquitos por jaula y se llevaron a las diferentes edades antes de realizar la extracción de sus hidrocarburos cuticulares. En el caso de las hembras, estas fueron confinadas con machos a una densidad de 1 hembra por cada 2 machos, mientras que los machos utilizados para copular a las hembras fueron descartados del análisis químico. Además, para establecer el estado reproductivo de gravidez, se realizó la identificación del estadio 3 de Christopher en hembras de 6 días de edad, a través de la prueba de Polovodova[28], tomando una muestra aleatoria del 20% del total de hembras previamente copuladas. Para obtener machos copulados, estos fueron confinados con hembras a una densidad de 1 macho por cada 2 hembras, dichas hembras también fueron descartadas del análisis químico.

Para obtener hembras grávidas y paridas, se suministró una alimentación sanguínea utilizando sangre de conejo, la cual se administró al quinto día de edad en hembras destinadas al estado reproductivo de grávidas, y al quinto y séptimo día de edad de las hembras destinadas a ovipositar. Las hembras destinadas para el estado reproductivo de paridas se acondicionaron de forma individual dentro de recipientes plásticos tapados con mallas mosquiteras, con capacidad de 250 ml. Dentro de cada recipiente plástico se colocó papel filtro de 12 cm de largo y 4 cm de ancho, cubriendo las paredes del recipiente a una distancia de medio centímetro por arriba de la superficie de 50 ml de agua purificada, posteriormente se introdujo una hembra dentro de cada recipiente. Solo las hembras con evidencia de oviposición, dentro de un periodo de 10 horas tras colocarlas en los recipientes, fueron seleccionadas para la extracción de los hidrocarburos cuticulares.

Finalmente, la obtención de hembras vírgenes de 8 horas, 3, 5, 7 y 10 días de edad y machos vírgenes de 8 horas, 3 y 5 días de edad, se realizó confinando por separado a hembras y machos recién emergidos en jaulas entomológicas de 30 x 30 x 30 cm a una densidad máxima de 1000 mosquitos por jaula, además, se les suministró únicamente solución de sacarosa al 10% hasta que fueron procesados en las diferentes edades.

Procesamiento de muestras

La preparación de las muestras para la extracción de hidrocarburos se realizó utilizando 100 mosquitos por muestra, previamente insensibilizados mediante refrigeración a una temperatura de 2 ºC, hasta completar un total de 10 muestras por cada estado reproductivo de hembras y machos. Los 100 mosquitos por muestra fueron sumergidos en 1 ml de hexano grado HPLC, como disolvente de extracción, durante 5 minutos[26] en viales de 2 ml de capacidad. Posterior a los 5 minutos, cada extracto fue pipeteado del vial y evaporado mediante una corriente de Nitrógeno hasta obtener una concentración de 50 µl del extracto. Previamente a la extracción, el hexano fue analizado mediante cromatografía de gases para identificar y descartar impurezas que pudieran interferir con la identificación de los compuestos de la extracción.

Análisis químico

Se realizó el análisis químico de las muestras en un cromatógrafo de gases marca Varian, modelo CP-3800 acoplado a un espectrómetro de masas marca Varian Saturn 2200. La temperatura inicial del horno del cromatógrafo se mantuvo a 50 ºC durante 2 minutos, posteriormente, la temperatura incrementó 15 ºC por minuto durante 10 minutos hasta alcanzar 280 ºC de temperatura. La temperatura del inyector fue de 250 ºC y se inyecto 2 µl del extracto, previamente concentrado, mediante el método de inyección “splitless”, utilizando como gas acarreador Helio. Posteriormente, se identificaron los compuestos comparando los espectros de masa de los picos de cada cromatograma con los espectros de masa de la biblioteca NIST y con una mezcla de hidrocarburos estándar marca Sigma-Aldrich, de la cual se inyecto 1µl al cromatógrafo; además, se obtuvo el índice de retención (IR) para cada uno de los compuestos, los cuales se compararon con los reportados por varios autores[29]. Una vez conocida la identidad química de los hidrocarburos cuticulares, se calculó el área bajo la curva de cada hidrocarburo cuticular obteniendo el promedio de las cantidades relativas expresadas en porcentaje para cada compuesto.

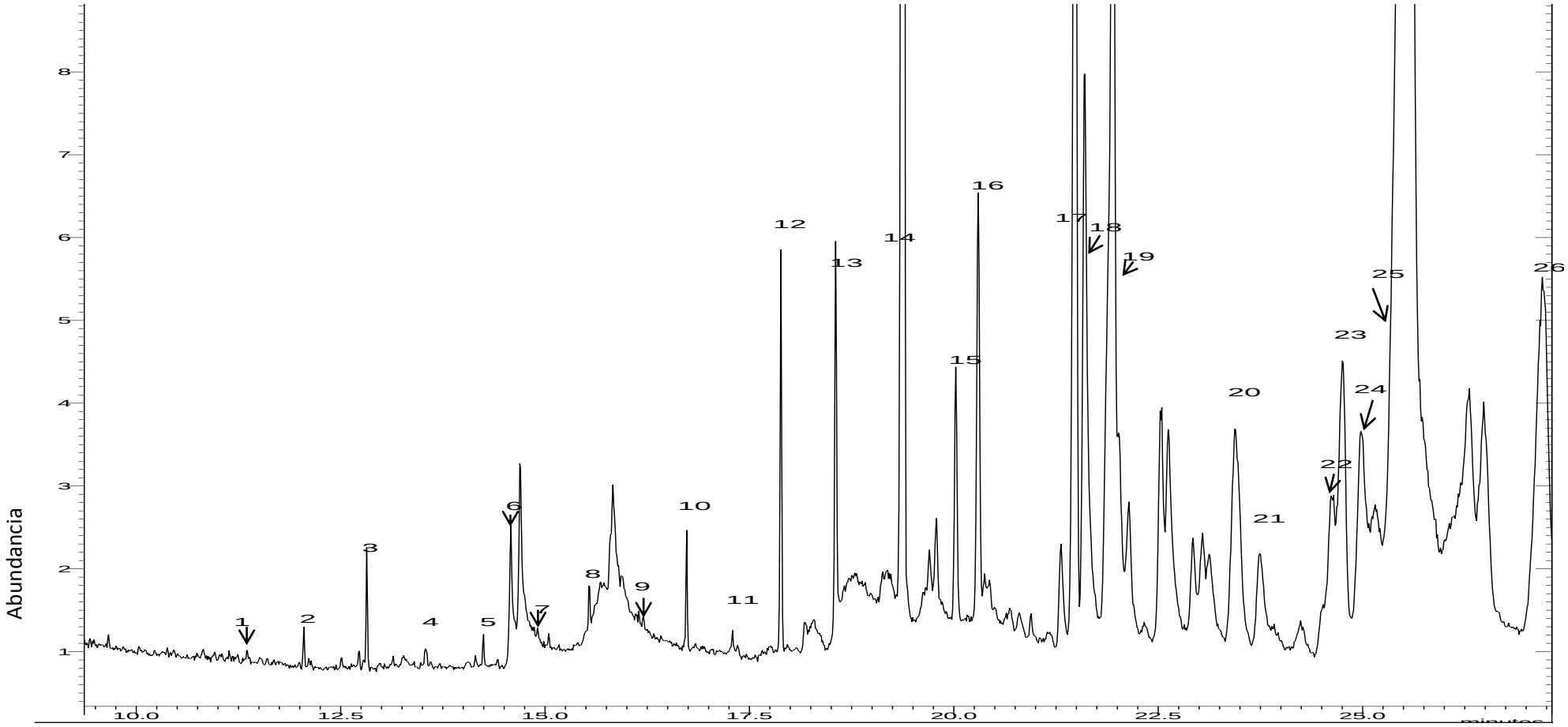
Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, los datos de las cantidades relativas fueron transformados a arcoseno de la raíz cuadrada[30] y analizados mediante el modelo estadístico de análisis multivariado de la varianza (MANOVA)[31], comparando las múltiples medias a través de la diferencia mínima significativa de Fisher. Para dicho análisis se utilizó el programa estadístico Statview versión 5.

Resultados

Perfil de hidrocarburos cuticulares en hembras y machos de *Aedes aegypti*

El análisis químico de las muestras de *Ae. aegypti* mostró la presencia de 26 hidrocarburos cuticulares en todos los estados reproductivos de hembras y machos, los cuales corresponden a alcanos simples (17), alcanos ramificados (4), alquenos (4) y dienos (1) (Figura 1 y 2, Cuadro 1). Los cuadros 2 y 3 reportan la cantidad relativa porcentual promedio de cada hidrocarburo cuticular y sus variaciones entre los distintitos estados reproductivos derivadas del análisis multivariado (MANOVA) de hembras y machos *Ae. aegypti*, donde se aprecia que, en todos los estados reproductivos de ambos sexos, los compuestos heptacosano y los compuestos coeluidos 13-,15-metil hentriacontano fueron los más abundantes (Fig. 5 y 6). Además, en hembras, 14 hidrocarburos cuticulares mostraron diferencias estadísticamente significativas de su cantidad relativa porcentual promedio en los estados reproductivos de hembras copuladas de 5 días de edad, grávidas de 7 días de edad y paridas de 10 días de edad en relación con sus controles vírgenes de 5, 7 y 10 días de edad, respectivamente, mientras que en machos, solamente se observó un compuesto con variación estadísticamente significativa de su cantidad relativa porcentual promedio entre el estado reproductivo de machos copulados de 5 días de edad y su control vírgenes de 5 días de edad. Los cuadros 4-13, muestran las variaciones estadísticamente significativas de los hidrocarburos cuticulares de hembras y machos en relación con sus controles y las variaciones en relación con vírgenes de 8 horas y 3 días de edad, extraídos del análisis multivariado.



Tiempo de retención

Figura 1. Perfil de hidrocarburos cuticulares de hembras *Aedes aegypti*. Los números de los picos corresponden a los números en el Cuadro 1.

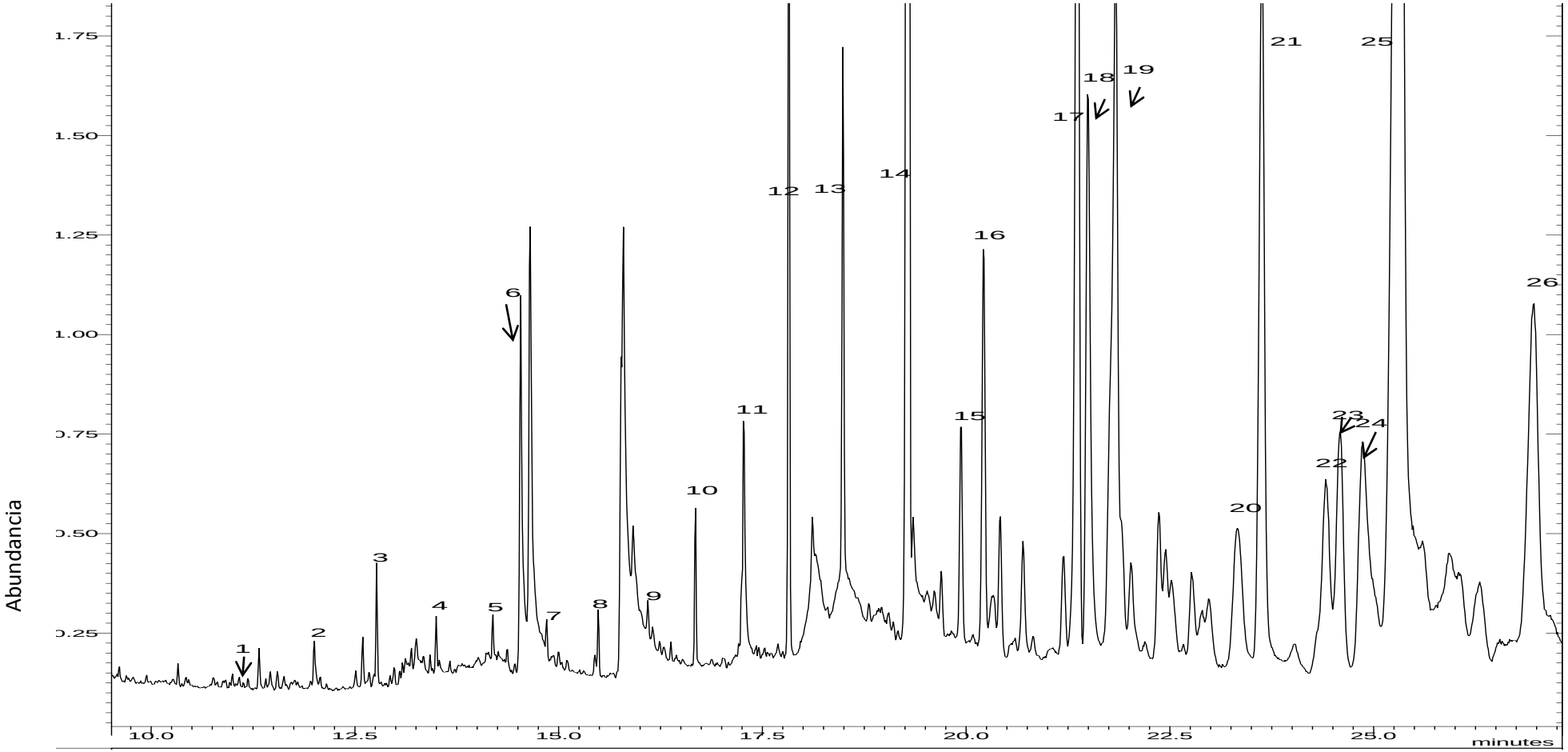


Figura 2. Perfil de hidrocarburos cuticulares de machos *Aedes aegypti*. Los números de los picos corresponden a los números en el Cuadro 1.

Cuadro1. Hidrocarburos cuticulares en hembras y machos de *Aedes aegypti.*

	Hembras		Machos		Compuesto
Pico	TR	IR	TR	IR	
1	11,2	1500	11,2	1500	Pentadecano
2	12,0	1600	12,0	1600	Hexadecano
3	12,8	1700	12,8	1700	Heptadecano
4	13,5	1800	13,5	1800	Octadecano
5	14,2	1900	14,2	1900	Nonadecano
6	14,5	1949	14,5	1949	8-Heptadeceno*
7	14,8	2000	14,8	2000	Eicosano
8	15,5	2100	15,5	2100	Heneicosano
9	16,1	2200	16,1	2200	Docosano
10	16,7	2300	16,7	2300	Tricosano
11	17,2	2400	17,2	2400	Tetracosano
12	17,8	2500	17,8	2500	Pentacosano
13	18,5	2600	18,5	2600	Hexacosano
14	19,3	2700	19,3	2700	Heptacosano
15	20,0	2773	19,9	2769	3-metil Heptacosano
16	20,2	2800	20,2	2800	Octacosano
17	21,4	2900	21,4	2900	Nonacosano
18	21,5	2904	21,5	2904	1-Eicoseno*
19	21,8	2927	21,8	2925	13-,15-metil Nonacosano
20	23,4	3024	23,3	3022	13-metil Triacontano
21	23,6	3038	23,6	3037	1,19-Eicosadieno*
22	24,5	3086	24,4	3081	1-Hexacoseno*
23	24,7	3100	24,8	3100	Hentriacontano
24	25,0	3108	24,9	3103	9-Hexacoseno*
25	25,3	3122	25,3	3120	13-,15-metil Hentriacontano
26	27,1	3200	27.1	3200	Dotriacontano

TR:Tiempo de retención (min); IR: Índice de retención. Los compuestos indicados con * fueron tentativamente identificados en base a la biblioteca NIST, los otros compuestos fueron identificados mediante comparación con un estándar de hidrocarburos.

Perfil de hidrocarburos cuticulares de hembras y machos *Aedes aegypti*

En las figuras 3 y 4 se muestran los perfiles de hidrocarburos cuticulares de cada uno de los estados reproductivos de hembras y machos de *Ae. aegypti*

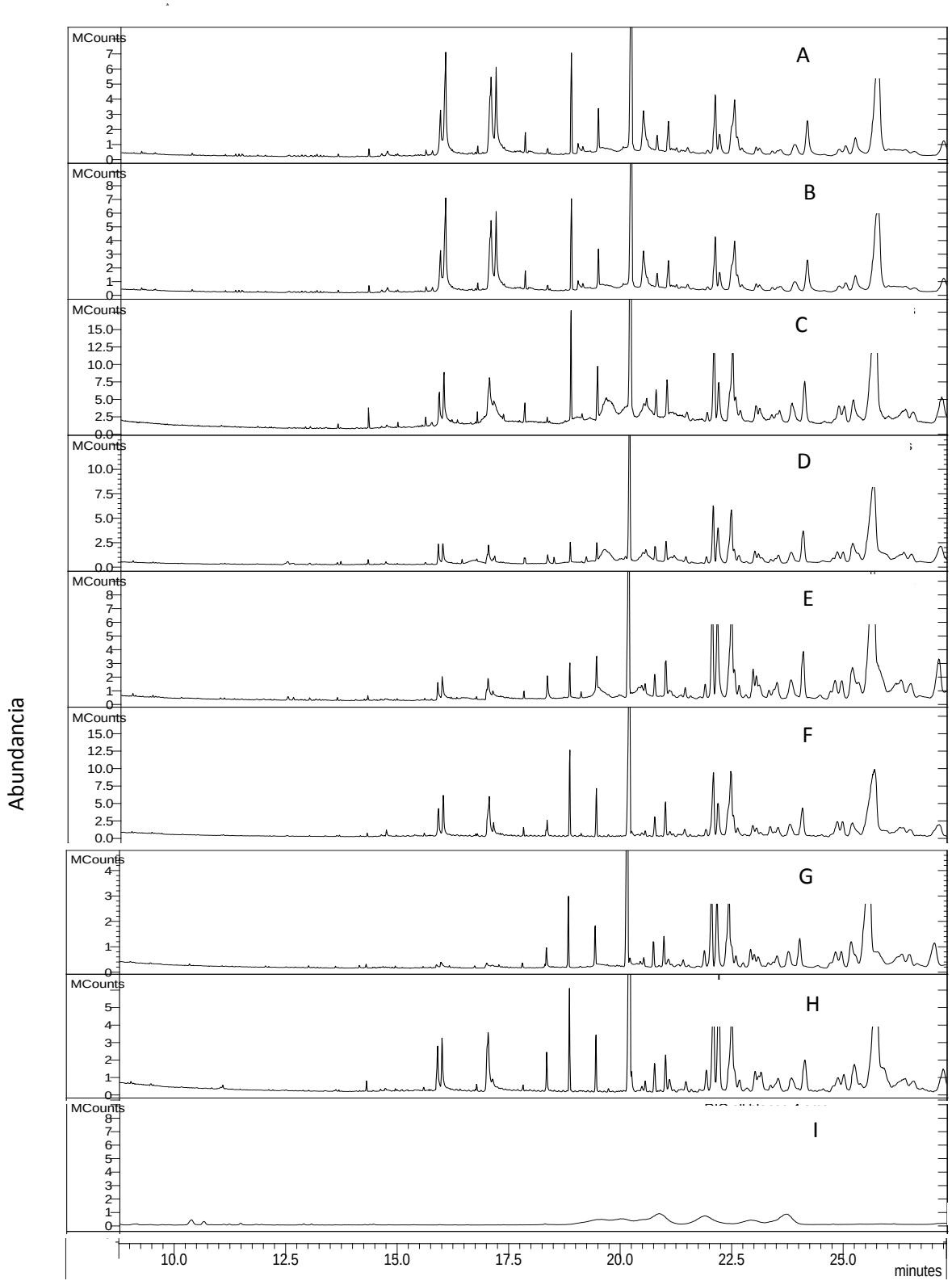


Figura 3. Perfil de hidrocarburos cuticulares de hembras *Ae. aegypti*: A) Vírgenes de 8 horas de edad; B) Vírgenes con 3 días de edad; C) Copuladas de 5 días de edad, D) Grávidas de 7 días de edad, E) Paridas de 10 días de edad y sus respectivos controles: F) Vírgenes de 5 días de edad; G) Vírgenes de 7 días de edad y H) Vírgenes de 10 días de edad; I) Control hexano

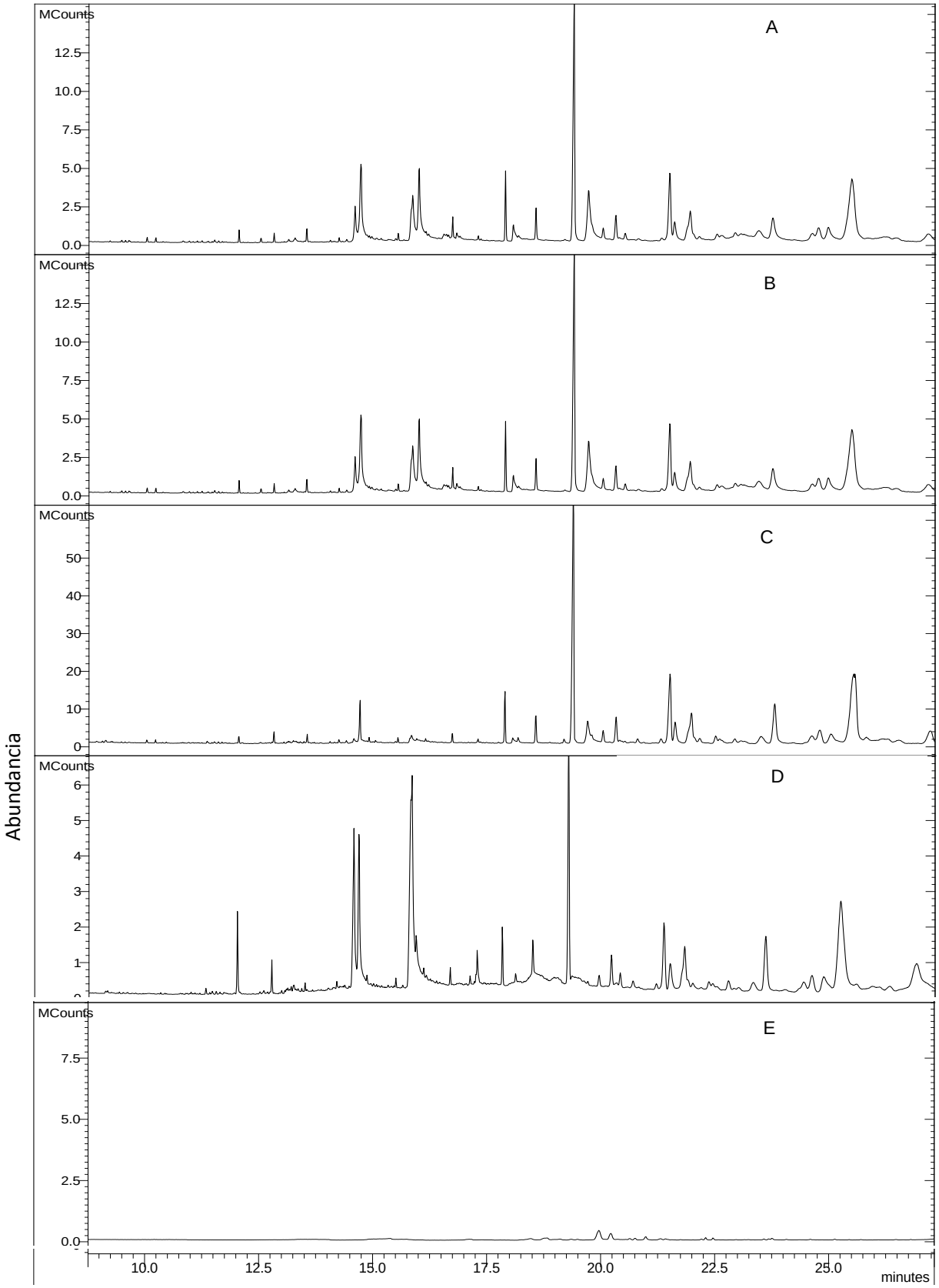


Figura 4.- Perfil de hidrocarburos cuticulares de machos *Ae. aegypti*: A) Vírgenes de 8 horas de edad; B) Vírgenes de 3 días de edad; C) Copulados de 5 días de edad; D) Control vírgenes de 5 días de edad; E) Control hexano.

Cuadro 2. Cantidad relativa porcentual promedio, error estándar y análisis multivariado de la varianza de hembras *Aedes aegypti.*

Pico	Compuesto	V8	V3	Cop5	ConV5	Gra 7	ConV 7	Par 10	ConV10
1	Pentadecano	0,01 ± 0,01^{a}	0,06 ± 0,02^{a}	0,01 ± 0,01^{a}	0,00 ± 0,00^{a}	0,02 ± 0,01^{a}	0,00 ± 0,00^{a}	0,03 ± 0,01^{b}	0,01 ± 0,00^{a}
2	Hexadecano	0,15 ± 0,02^{ab}	0,29 ± 0,10^{ab}	0,19 ± 0,05^{a}	0,07 ± 0,01^{bc}	0,12 ± 0,04^{bc}	0,06 ± 0,01^{c}	0,10 ± 0,01^{ab}	0,06 ± 0,01^{bc}
3	Heptadecano	0,47 ± 0,05^{ab}	0,51 ± 0,10^{ab}	0,45 ± 0,08^{a}	0,28 ± 0,05^{c}	0,36 ± 0,09^{bc}	0,19 ± 0,03^{c}	0,18 ± 0,03^{c}	0,18 ± 0,03^{bc}
4	Octadecano	0,25 ± 0,03^{a}	1,53 ± 0,84^{ab}	0,42 ± 0,15^{a}	0,13 ± 0,05^{ab}	0,10 ± 0,04^{b}	0,08 ± 0,01^{b}	0,10 ± 0,02^{b}	0,06 ± 0,01^{b}
5	Nonadecano	0,35 ± 0,03^{a}	0,38 ± 0,08^{ab}	1,36 ± 0,87^{a}	0,20 ± 0,03^{ab}	1,24 ± 1,05^{b}	0,16 ± 0,02^{b}	0,13 ± 0,04^{b}	0,09 ± 0,01^{b}
6	8-heptadeceno	3,96 ± 1,13^{ab}	2,32 ± 0,74^{a}	2,68 ± 0,41^{b}	2,56 ± 0,28^{b}	2,00 ± 1,01^{a}	1,23 ± 0,35^{a}	0,79 ± 0,32^{a}	2,74 ± 0,75^{b}
7	Eicosano	0,07 ± 0,02^{ab}	0,11 ± 0,02^{ab}	0,24 ± 0,12^{a}	0,09 ± 0,04^{ab}	0,10 ± 0,04^{ab}	0,14 ± 0,03^{ab}	0,12 ± 0,02^{a}	0,03 ± 0,01^{b}
8	Heneicosano	0,70 ± 0,19^{a}	1,26 ± 0,76^{ab}	0,38 ± 0,10 ^{b}	0,23 ± 0,04^{bc}	0,19 ± 0,06^{c}	0,12 ± 0,02^{c}	0,16 ± 0,05^{c}	0,09 ± 0,01^{c}
9	Docosano	0,28 ± 0,08^{a}	0,21 ± 0,05^{ab}	0,21 ± 0,07^{ab}	0,19 ± 0,03^{ab}	0,07 ± 0,03^{a}	0,26 ± 0,04 ^{b}	0,14 ± 0,03^{a}	0,54 ± 0,32^{b}
10	Tricosano	1,91 ± 0,52^{a}	1,88 ± 0,56^{bc}	0,78 ± 0,16^{b}	0,58 ± 0,09^{b}	1,70 ± 1,31^{b}	0,44 ± 0,05^{bc}	0,21 ± 0,02^{c}	0,44 ± 0,10^{bc}
11	Tetracosano	1,26 ± 0,29^{ab}	0,64 ± 0,22^{ab}	0,51 ± 0,17^{a}	1,14 ± 0,28^{ab}	0,45 ± 0,13^{a}	0,42 ± 0,13^{a}	0,80 ± 0,13^{a}	2,07 ± 0,72^{b}
12	Pentacosano	4,60 ± 0,46^{ab}	5,40 ± 0,51^{ab}	5,65 ± 0,93^{a}	4,01 ± 0,42^{b}	1,27 ± 0,18^{c}	4,17 ± 0,25^{ab}	1,39 ± 0,27^{c}	3,64 ± 0,41^{b}

V8=hembras vírgenes de 8 horas de edad; V3=hembras vírgenes de 3 días de edad; Cop5=hembras copuladas de 5 días de edad; ConV5=hembras controles vírgenes de 5 días de edad; Gra7=hembras grávidas de 7 días de edad; ConV7=hembras controles vírgenes de 7 días de edad; Par10=hembras paridas de 10 días de edad; ConV10= hembras controles vírgenes de 10 días de edad

Cuadro 2. Cantidad relativa porcentual promedio, error estándar y análisis multivariado de la varianza de hembras *Aedes aegypti.*

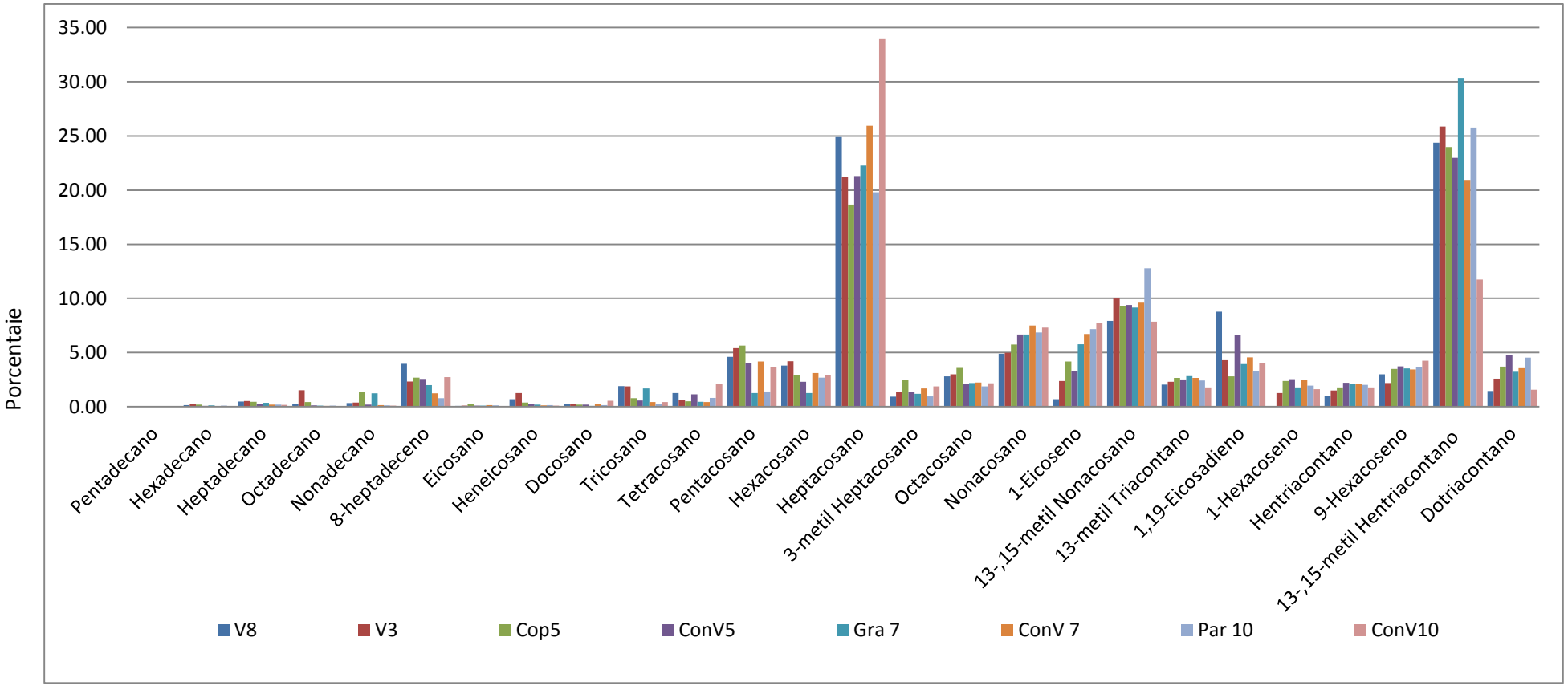
Pico	Compuesto	V8	V3	Cop5	ConV5	Gra 7	ConV 7	Par 10	ConV10
13	Hexacosano	3,80 ± 0,49^{a}	4,21 ± 0,84^{b}	2,95 ± 0,70^{b}	2,30 ± 0,18^{b}	1,26 ± 0,09^{b}	3,12 ± 0,32^{a}	2,70 ± 0,99^{b}	2,95 ± 0,71^{b}
14	Heptacosano	24,90 ± 1,47^{ac}	21,19 ± 2,67^{b}	18,66 ± 2,01^{bc}	21,30 ± 1,14^{ab}	22,26 ± 2,54^{bc}	25,94 ± 1,11^{a}	19,80 ± 1,60^{bc}	34,01 ± 5,10^{ac}
15	3-metil Heptacosano	0,94 ± 0,28^{ab}	1,37 ± 0,12^{ab}	2,47 ± 0,93^{a}	1,37 ± 0,08^{ab}	1,19 ± 0,09^{ab}	1,70 ± 0,07^{a}	0,95 ± 0,07^{b}	1,89 ± 0,30^{a}
16	Octacosano	2,80 ± 0,22^{a}	3,00 ± 0,62^{b}	3,59 ± 1,35^{ab}	2,13 ± 0,13^{ab}	2,17 ± 0,33^{ab}	2,24 ± 0,16^{ab}	1,87 ± 0,14^{b}	2,15 ± 0,37^{b}
17	Nonacosano	4,90 ± 0,36^{ab}	4,99 ± 0,42^{a}	5,75 ± 0,92^{ab}	6,68 ± 0,33^{ab}	6,67 ± 0,37^{b}	7,50 ± 0,37^{ab}	6,85 ± 0,67^{ab}	7,30 ± 0,58^{b}
18	1-Eicoseno	0,69 ± 0,15^{a}	2,37 0,45^{b}	4,19 ± 0,91^{bc}	3,32 ± 0,23^{b}	5,77 ± 0,34^{cd}	6,72 ± 0,32^{cde}	7,17 ± 0,68^{de}	7,75 ± 0,61^{e}
19	13-,15-metil Nonacosano	7,93 ± 0,84^{a}	10,00 ± 1,02^{a}	9,31 ± 1,21^{a}	9,39 ± 0,57^{a}	9,17 ± 0,53^{a}	9,61 ± 0,62^{a}	12,78 ± 3,58^{a}	7,86 ± 0,65^{a}
20	13-metil Triacontano	2,05 ± 0,21^{a}	2,31 ± 0,30^{ab}	2,66 ± 0,40^{ab}	2,53 ± 0,13^{ab}	2,84 ± 0,21^{b}	2,66 ± 0,23^{ab}	2,41 ± 0,19^{a}	1,79 ± 0,18^{a}
21	1,19-Eicosadieno	8,79 ± 1,10^{a}	4,30 ± 0,50^{ab}	2,80 ± 0,49^{b}	6,63 ± 0,50^{a}	3,95 ± 0,57^{b}	4,55 ± 0,28^{ab}	3,33 ± 0,21^{b}	4,07 ± 0,51^{ab}
22	1-Hexacoseno	0,00 ± 0.00 ^{a}	1,25 ± 0,24^{bc}	2,39 ± 0,52^{bc}	2,55 ± 0,18^{b}	1,79 ± 0,27^{c}	2,47 ± 0,18^{bc}	1,96 ± 0,16^{bc}	1,60 ± 0,20^{bc}
23	Hentriacontano	1,01 ± 0,18^{a}	1,50 ± 0,13^{ac}	1,78 ± 0,29^{ab}	2,22 ± 0,12^{bc}	2,14 ± 0,24^{b}	2,11 ± 0,14^{bc}	2,02 ± 0,18^{bc}	1,77 ± 0,25^{ab}
24	9-Hexacoseno	3,00 ± 0,73^{a}	2,17 ± 0,54^{ab}	3,49 ± 0,55^{abc}	3,72 ± 0,19^{bc}	3,53 ± 0,41^{bc}	3,45 ± 0,39^{abc}	3,68 ± 0,35^{bc}	4,25 ± 0,48^{c}
25	13-,15-metil Hentriacontano	24,39 ± 2,02^{abc}	25,88 ± 3,32^{a}	23,98 ± 3,05^{abc}	22,99 ± 2,27^{abc}	30,36 ± 2,25^{a}	20,93 ± 2,11^{b}	25,79 ± 2,35^{ab}	11,74 ± 1,54^{c}
26	Dotriacontano	1,44 ± 0,42^{a}	2,59 ± 0,66^{bc}	3,70 ± 0,51^{b}	4,75 ± 0,39^{b}	3,24 ± 0,52^{bc}	3,56 ± 0,33^{b}	4,53 ± 0,42^{b}	1,58 ± 0,28^{ac}

V8=hembras vírgenes de 8 horas de edad; V3=hembras vírgenes de 3 días de edad; Cop5=hembras copuladas de 5 días de edad; ConV5=hembras controles vírgenes de 5 días de edad; Gra7=hembras grávidas de 7 días de edad; ConV7=hembras controles vírgenes de 7 días de edad; Par10=hembras paridas de 10 días de edad; ConV10= hembras controles vírgenes de 10 días de edad.

Cuadro 3. Cantidad relativa porcentual promedio, error estándar y análisis multivariado de la varianza de machos *Aedes aegypti.*

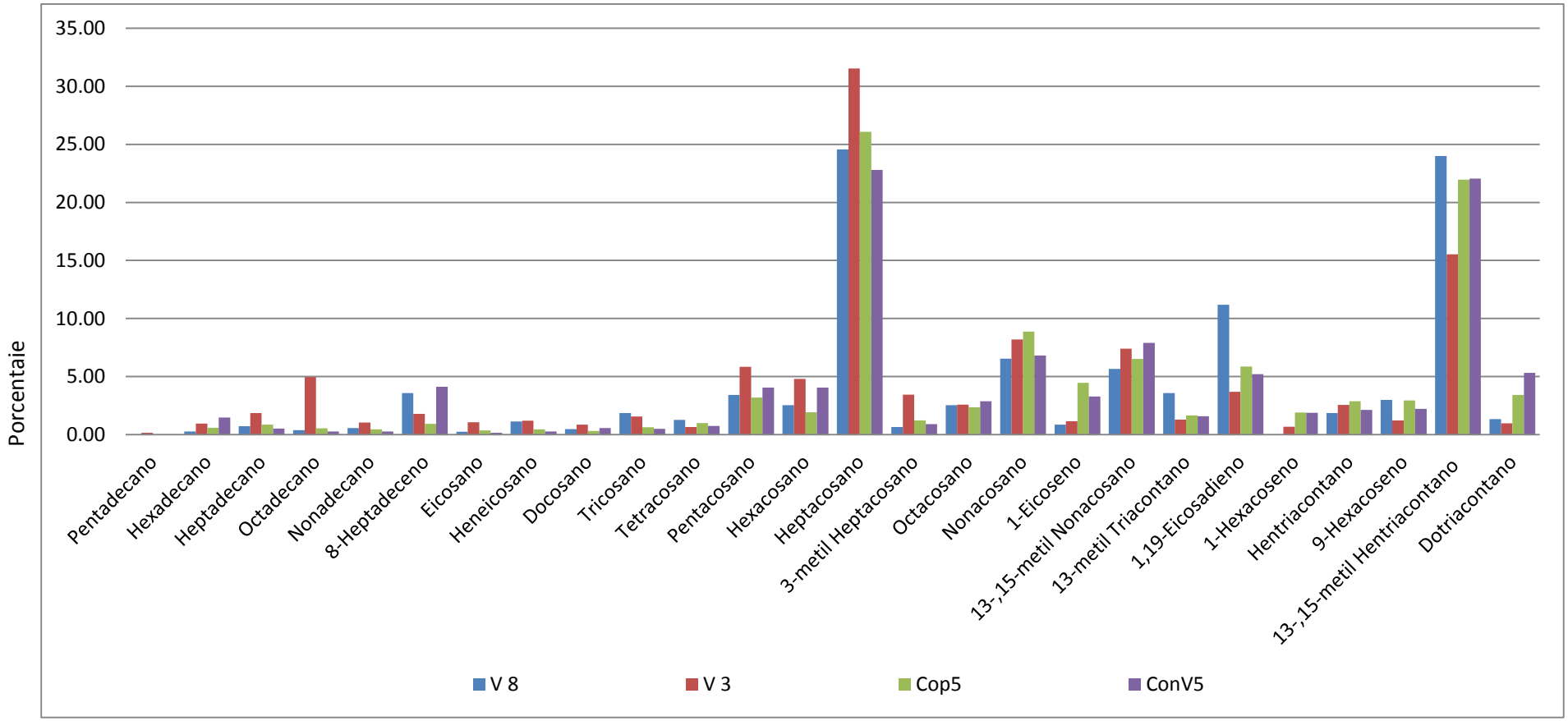
Pico	Compuesto	V 8	V 3	Cop5	ConV5
1	Pentadecano	0,01 ± 0,01^{a}	0,16 ± 0,05^{b}	0,02 ± 0,02^{a}	0,003 ± 0,00^{a}
2	Hexadecano	0,27 ± 0,03^{a}	0,95 ± 0,17^{a}	0,59 ± 0,18^{a}	1,46 ± 0,70^{a}
3	Heptadecano	0,72 ± 0,11^{a}	1,85 ± 0,42^{a}	0,87 ± 0,19^{a}	0,53 ± 0,12^{a}
4	Octadecano	0,37 ± 0,12^{a}	4,96 ± 2,25^{b}	0,54 ± 0,11^{a}	0,26 ± 0,03^{a}
5	Nonadecano	0,56 ± 0,09^{a}	1,04 ± 0,21^{a}	0,45 ± 0,15^{a}	0,26 ± 0,02^{a}
6	8-Heptadeceno	3,57 ± 1,42^{a}	1,79 ± 0,35^{a}	0,92 ± 0,23^{a}	4,11± 1,84^{a}
7	Eicosano	0,24 ± 0,08^{a}	1,06 ± 0,32^{a}	0,36 ± 0,14^{a}	0,15 ± 0,03^{a}
8	Heneicosano	1,13 ± 0,24^{a}	1,19 ± 0,28^{a}	0,45 ± 0,15^{b}	0,27 ± 0,04^{b}
9	Docosano	0,46 ± 0,10^{a}	0,87 ± 0,22^{a}	0,32 ± 0,15^{a}	0,56 ± 0,17^{a}
10	Tricosano	1,85 ± 0,19^{a}	1,55 ± 0,24^{a}	0,64 ± 0,10^{b}	0,50 ± 0,04^{b}
11	Tetracosano	1,25 ± 0,43^{a}	0,65 ± 0,14^{a}	0,98 ± 0,23^{a}	0,75 ± 0,19^{a}
12	Pentacosano	3,42 ± 0,32^{a}	5,85 ± 0,57^{b}	3,18 ± 0,20^{a}	4,04 ± 0,43^{ab}
13	Hexacosano	2,54 ± 0,40^{a}	4,80 ± 1,25^{a}	1,93 ± 0,10^{a}	4,04 ± 0,91^{a}
14	Heptacosano	24,57 ± 1,93^{a}	31,54 ± 2,31^{a}	26,09 ± 1,62^{a}	22,79 ± 1,30^{a}
15	3-metil Heptacosano	0,65 ± 0,03^{a}	3,45 ± 1,48^{b}	1,21 ± 0,12^{b}	0,91 ± 0,09^{b}
16	Octacosano	2,53 ± 0,20^{a}	2,57 ± 0,22^{a}	2,34 ± 0,14^{a}	2,87 ± 0,43^{a}
17	Nonacosano	6,53 ± 0,32^{a}	8,20 ± 0,96^{b}	8,86 ± 0,28^{bc}	6,80 ± 0,40^{ac}
18	1-Eicoseno	0,85 ± 0,18^{a}	1,16 ± 0,30^{a}	4,45 ± 0,47^{b}	3,28 ± 0,37^{b}
19	13-,15-metil Nonacosano	5,65 ± 0,69^{ac}	7,40 ± 1,39^{a}	6,52 ± 0,25^{bc}	7,89 ± 0,29^{b}
20	13-metil Triacontano	3,57 ± 0,71^{a}	1,28 ± 0,39^{bc}	1,64 ± 0,17^{bc}	1,59 ± 0,18^{c}
21	1,19-Eicosadieno	11,19 ± 0,67^{a}	3,69 ± 0,59^{b}	5,86 ± 0,54^{c}	5,20 ± 0,27^{c}
22	1-Hexacoseno	0,00 ± 0,00^{a}	0,67 ± 0,29^{b}	1,91 ± 0,35^{c}	1,88 ± 0,14^{c}
23	Hentriacontano	1,85 ± 0,17 ^{a}	2,56 ± 0,31^{ab}	2,88 ± 0,25^{b}	2,12 ± 0,15^{a}
24	9-Hexacoseno	2,99 ± 0,76^{a}	1,21 ± 0,54^{a}	2,94 ± 0,68^{a}	2,21 ± 0,42^{a}
25	13-,15-metil Hentriacontano	24,00 ± 2,09^{a}	15,53 ± 2,03^{b}	21,96 ± 1,57^{a}	22,06 ± 1,93^{a}
26	Dotriacontano	1,33 ± 0,14^{a}	0,97 ± 0,29^{a}	3,41 ± 0,40 ^{b}	5,31± 0,96^{b}

V8=machos vírgenes de 8 horas de edad; V3=machos vírgenes de 3 días de edad; ConV5= machos controles vírgenes de 5 días de edad; Cop5= machos copulados de 5 días de edad.



V8=hembras vírgenes de 8 horas de edad; V3=hembras vírgenes de 3 días de edad; HCop5=hembras copuladas de 5 días de edad; ConV5=hembras controles vírgenes de 5 días de edad; Gra7=hembras grávidas de 7 días de edad; ConV7=hembras controles vírgenes de 7 días de edad; Par10=hembras paridas de 10 días de edad; ConV10= hembras controles vírgenes de 10 días de edad.

Fig. 5 Cantidad relativa porcentual promedio por estado reproductivo en hembras de *Aedes aegypti*.



V8=machos vírgenes de 8 horas de edad; V3=machos vírgenes de 3 días de edad; ConV5= machos controles vírgenes de 5 días de edad; Cop5= machos copulados de 5 días de edad.

Fig. 6 Cantidad relativa porcentual promedio por estado reproductivo en machos de *Aedes aegypti.*

Variación de hidrocarburos cuticulares en hembras copuladas

El cuadro 4 muestra las cantidades relativas porcentuales promedio de los hidrocarburos cuticulares del estado reproductivo de hembras copuladas de 5 días de edad que fueron estadísticamente diferentes de sus controles vírgenes de 5 días de edad. Las diferencias se aprecian para los compuestos hexadecano (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 2.54; g.l. = 7,39; *P* = 0.01) y heptadecano (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 5.02; g.l. = 7,39; *P* = 0.01), los cuales presentaron un aumento estadísticamente significativo de su cantidad relativa porcentual promedio en hembras copuladas, en comparación con sus respectivos controles; en ambos compuestos, se observó un restablecimiento de la cantidad relativa porcentual promedio de hembras copuladas a los niveles de hembras vírgenes de 8 horas y 3 días de edad. Por último, 1,19-eicosadieno disminuyó significativamente su cantidad relativa porcentual promedio respecto su control (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 2.29; g.l. = 7,39; *P* = 0.02) y vírgenes de 8 horas de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 2.29; g.l. = 7,39; *P* = 0.03), aunque su disminución no fue significativa en relación con vírgenes de 3 días de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 2.29; g.l. = 7,39; *P* = 0.36).

Cuadro 4. Variación de la cantidad relativa porcentual promedio de hembras copuladas de 5 días de edad y vírgenes de 8 hrs, 3 y 5 días de edad.

Estado reproductivo	V8	V3	Cop5	ConV5
Hexadecano	$0,15 \pm 0,02^{ab}$	$0,29 \pm 0,10^{ab}$	$0,19 \pm 0,05^{a}$	$0,07 \pm 0,01^{b}$
Heptadecano	$0,47 \pm 0,05^{a}$	$0,51 \pm 0,10^{a}$	$0,45 \pm 0,08^{a}$	$0,28 \pm 0,05^{b}$
1,19-Eicosadieno	$8,79 \pm 1,10^{a}$	$4,30 \pm 0,50^{ab}$	$2,80 \pm 0,49^{b}$	$6,63 \pm 0,50^{a}$

V8=hembras vírgenes de 8 horas de edad; V3=hembras vírgenes de 3 días de edad; Cop5=hembras copuladas de 5 días de edad; ConV5=hembras controles vírgenes de 5 días de edad.

Variación de hidrocarburos cuticulares en hembras grávidas

En el cuadro 5 se observan los hidrocarburos que mostraron diferencias estadísticamente significativas de su cantidad relativa porcentual promedio en hembras grávidas de 7 días de edad, en relación con sus controles vírgenes de 7 días de edad. Tales hidrocarburos fueron hexacosano, el cual mostró un descenso significativo de su cantidad relativa porcentual promedio respecto su control (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 2.67; g.l. = 7,39; *P* = 0.01) y hembras vírgenes de 8 horas de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 2.67; g.l. = 7,39; *P* = 0.0003), mientras que su descenso no fue significativo en relación con hembras vírgenes de 3 días de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 2.67; g.l. = 7,39; *P* = 0.25). Finalmente heptacosano, también tuvo un descenso de la cantidad relativa porcentual promedio respecto su control (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 2.18; g.l. = 7,39; *P* = 0.04), restableciendo su cantidad relativa porcentual promedio a un nivel muy similar al de hembras vírgenes de 3 días de edad, aunque su descenso en relación con vírgenes de 8 horas de edad no fue estadísticamente significativo (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 2.67; g.l. = 7,39; *P* = 0.08).

Cuadro 5. Variación de la cantidad relativa porcentual promedio de hembras grávidas de 7 días de edad y vírgenes de 8 hrs, 3 y 7 días de edad.

Estado reproductivo	V8	V3	Gra 7	ConV 7
Hexacosano	$3,80 \pm 0,49^{a}$	$4,21 \pm 0,84^{b}$	$1,26 \pm 0,09^{b}$	$3,12 \pm 0,32^{a}$
Heptacosano	$24,90 \pm 1,47^{ac}$	$21,19 \pm 2,67^{b}$	$22,26 \pm 2,54^{bc}$	$25,94 \pm 1,11^{a}$

V8=hembras vírgenes de 8 horas de edad; V3=hembras vírgenes de 3 días de edad; Gra7=hembras grávidas de 7 días de edad; ConV7=hembras controles vírgenes de 7 días de edad.

Variación de hidrocarburos cuticulares en hembras paridas

Los hidrocarburos cuticulares con diferencias en la cantidad relativa porcentual promedio entre hembras paridas de 10 días de edad y los controles vírgenes de 10 días de edad corresponden a pentadecano, con un aumento en la cantidad relativa porcentual promedio en hembras paridas respecto su control (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 3.31; g.l. = 7,39; *P* = 0.01) y vírgenes de 8 horas de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 3.31; g.l. = 7,39; *P* = 0.002), además, de un descenso significativo en relación con hembras vírgenes de 3 días de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 3.31; g.l. = 7,39; *P* = 0.005); sin embargo, 8-heptadeceno, disminuyó su cantidad relativa porcentual promedio en hembras copuladas en relación con su control (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 3.46; g.l. = 7,39; *P* = 0.003), aunque su disminución no fue significativa respecto a hembras vírgenes de 8 horas (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 3.46; g.l. = 7,39; *P* = 0.26) y 3 días de edad (F = 3.46; g.l. = 7,39; *P* = 0.53). Por otra lado, eicosano aumentó su cantidad relativa porcentual promedio en hembras paridas respecto su control (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 3.17; g.l. = 7,39; *P* = 0.04), restableciendo su cantidad relativa a un nivel similar al de hembras vírgenes de 3 días de edad, sin mostrar un aumento significativo en relación con hembras de 8 horas de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 3.17; g.l. = 7,39; *P* = 0.42), mientras que tetracosano mostró una disminución de su cantidad relativa porcentual promedio en hembras paridas respecto su control (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 1.90; g.l. = 7,39; *P* = 0.04), alcanzando una cantidad relativa similar a la de hembras vírgenes de 8 horas y 3 días de edad. Misma tendencia se observó para 3-metil heptacosano, al disminuir significativamente su cantidad relativa porcentual promedio en hembras copuladas en relación con su control (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 1.37; g.l. = 7,39; *P* = 0.02), restableciendo su cantidad relativa a un nivel similar al de hembras vírgenes de 8 horas y 3 días de edad. Finalmente dotriacontano mostró un aumento significativo de su cantidad relativa porcentual promedio en hembras paridas respecto su control (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 5.48; g.l. = 7,39; *P* = 0.02) y hembras vírgenes de 8 horas de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 5.48; g.l. = 7,39; *P* <0.0001), sin tener un aumento significativo en relación con hembras vírgenes de 3 días

de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 5.48; g.l. = 7,39; *P* = 0.06) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Variación de la cantidad relativa porcentual promedio de hembras paridas de 10 días de edad y vírgenes de 8 hrs, 3 y 10 días de edad.

Estado reproductivo	V8	V3	Par10	ConV10
Pentadecano	0,01± 0,01^{a}	0,06 ± 0,02^{a}	0,03 ± 0,01^{b}	0,01 ± 0,00^{a}
8-Heptadeceno	3,96 ± 1,13^{ab}	2,32 ± 0,74^{a}	0,79 ± 0,32^{a}	2,74 ± 0,75^{b}
Eicosano	0,07 ± 0,02^{ab}	0,11 ± 0,02^{ab}	0,12 ± 0,02^{a}	0,03 ± 0,01^{b}
Tetracosano	1,26 ± 0,29^{ab}	0,64 ± 0,22^{ab}	0,80 ± 0,13^{a}	2,07 ± 0,72^{b}
3-metil Heptacosano	0,94 ± 0,28^{ab}	1,37 ± 0,12^{ab}	0,95 ± 0,07^{b}	1,89 ± 0,30^{a}
Dotriacontano	1,44 ± 0,42^{a}	2,59 ± 0,66^{bc}	4,53 ± 0,42^{b}	1,58 ± 0,28^{ac}

V8=hembras vírgenes de 8 horas de edad; V3=hembras vírgenes de 3 días de edad; Par10=hembras paridas de 10 días de edad; ConV10= hembras controles vírgenes de 10 días de edad.

Variación de hidrocarburos cuticulares en hembras grávidas y paridas

Dentro del análisis estadístico se observaron 2 hidrocarburos cuticulares que variaron su cantidad relativa porcentual promedio tanto en hembras grávidas de 7 días de edad, como en hembras paridas de 10 días de edad respecto sus controles vírgenes de 7 y 10 días de edad, respectivamente. Los cuadros 7 y 8 muestran dichas variaciones para los hidrocarburos docosano, el cual tuvo un descenso estadísticamente significativo de su cantidad relativa porcentual promedio en hembras paridas en comparación con su control (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 1.77; g.l. = 7,39; *P* = 0.02), aunque no hubo evidencia de una disminución estadísticamente significativa en relación con hembras vírgenes de 8 horas (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 1.77; g.l. = 7,39; *P* = 0.45) y 3 días de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 1.77; g.l. = 7,39; *P* = 0.14). De igual forma, en hembras paridas, disminuyó significativamente su cantidad relativa porcentual promedio en relación con su control (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 1.77; g.l. = 7,39; *P* = 0.04), sin disminuir significativamente en comparación con hembras

vírgenes de 8 horas (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 1.77; g.l. = 7,39; *P* = 0.65) y 3 días de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 1.77; g.l. = 7,39; *P* = 0.68). En el caso de 13-,15-metil hentriacontano, el compuesto presentó un aumento de la cantidad relativa porcentual promedio en hembras grávidas en relación con su control (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 2.87; g.l. = 7,39; *P* = 0.006), sin mostrar un aumento significativo en relación con vírgenes de 8 horas (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 2.87; g.l. = 7,39; *P* = 0.26) y 3 días de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 2.87; g.l. = 7,39; *P* = 0.60), mientras que en hembras paridas aumentó significativamente su cantidad relativa porcentual promedio respecto su control (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 1.77; g.l. = 7,39; *P* = 0.01), restableciéndose cercanamente a los niveles de las cantidades relativas porcentuales promedio de hembras vírgenes de 8 horas y 3 días de edad.

Cuadro 7. Variación de la cantidad relativa porcentual promedio de hembras grávidas de 7 días de edad y vírgenes de 8 hrs, 3 y 7 días de edad.

Estado reproductivo	V8	V3	Gra7	ConV 7
Docosano	$0,28 \pm 0,08^{a}$	$0,21 \pm 0,05^{ab}$	$0,07 \pm 0,03^{a}$	$0,26 \pm 0,04^{b}$
13-,15-metil Hentriacontano	$24,39 \pm 2,02^{ab}$	$25,88 \pm 3,32^{a}$	$30,36 \pm 2,25^{a}$	$20,93 \pm 2,11^{b}$

V8=hembras vírgenes de 8 horas de edad; V3=hembras vírgenes de 3 días de edad; Gra7=hembras grávidas de 7 días de edad; ConV7=hembras controles vírgenes de 7 días de edad.

Cuadro 8. Variación de la cantidad relativa porcentual promedio de hembras paridas de 10 días de edad y vírgenes de 8 hrs, 3 y 10 días de edad.

Estado reproductivo	V8	V3	Par 10	ConV10
Docosano	$0,28 \pm 0,08^{a}$	$0,21 \pm 0,05^{ab}$	$0,14 \pm 0,03^{a}$	$0,54 \pm 0,32^{b}$
13-,15-metil hentriacontano	$24,39 \pm 2,02^{ab}$	$25,88 \pm 3,32^{a}$	$25,79 \pm 2,35^{a}$	$11,74 \pm 1,54^{b}$

V8=hembras vírgenes de 8 horas de edad; V3=hembras vírgenes de 3 días de edad; Par10=hembras paridas de 10 días de edad; ConV10= hembras controles vírgenes de 10 días de edad.

Variacion del hidrocarburo cuticular pentacosano en hembras copuladas, grávidas y paridas

El análisis estadistico mostró las variaciones significativas de la cantidad relativa porcentual promedio del hidrocarburo pentacosano en relación con sus controles, en los estados reproductivos de hembras copuladas, grávidas y paridas. En el estado reproductivo de hembras copuladas de 5 días de edad se observó un incremento significativo de su cantidad relativa porcentual promedio en relación con su control vírgenes de 5 días de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 14.89; g.l. = 7,39; *P* = 0.03), restableciendo su cantidad relativa al nivel de hembras vírgenes de 8 horas y 3 días de edad (Cuadro 9), mientras que tuvo un descenso significativo de su cantidad relativa porcentual promedio en hembras grávidas de 7 días de edad en relación con su control vírgenes de 7 días de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 14.89; g.l. = 7,39; *P* <0,0001) y en relación con hembras vírgenes de 8 horas (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 14.89; g.l. = 7,39; *P* <0,0001) y 3 días de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 14.89; g.l. = 7,39; *P* <0,0001) (Cuadro10). Misma tendencia se observó en el estado de hembras paridas de 10 días de edad, donde disminuyó su cantidad relativa porcentual promedio respecto su control vírgenes de 10 días de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 14.89; g.l. = 7,39; *P* = 0.0005) y hembras vírgenes de 8 horas (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 14.89; g.l. = 7,39; *P* <0,0001) y 3 días de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 14.89; g.l. = 7,39; *P* <0,0001) (Cuadro 11). Tales variaciones observadas en los distintos estados reproductivos, reflejan una disminución de la cantidad relativa porcentual promedio muy significativa de los estados reproductivos de hembras grávidas respecto hembras copuladas (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 14.89; g.l. = 7,39; *P* <0,0001) y hembras paridas respecto hembras copuladas (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 14.89; g.l. = 7,39; *P* <0,0001) (Cuadro 12).

Cuadro 9. Variación de la cantidad relativa porcentual promedio de hembras copuladas de 5 días de edad y vírgenes de 8 hrs, 3 y 5 días de edad.

Estado reproductivo	V8	V3	Cop5	ConV5
Pentacosano	$4,60 \pm 0,46^{ab}$	$5,40 \pm 0,51^{ab}$	$5,65 \pm 0,93^{a}$	$4,01 \pm 0,42^{b}$

V8=hembras vírgenes de 8 horas de edad; V3=hembras vírgenes de 3 días de edad; Cop5=hembras copuladas de 5 días de edad; ConV5=hembras controles vírgenes de 5 días de edad.

Cuadro10. Variación de la cantidad relativa porcentual promedio de hembras grávidas de 7 días de edad y vírgenes de 8 hrs, 3 y 7 días de edad.

Estado reproductivo	V8	V3	Gra7	ConV 7
Pentacosano	$4,60 \pm 0,46^{a}$	$5,40 \pm 0,51^{a}$	$1,27 \pm 0,18^{b}$	$4,17 \pm 0,25^{a}$

V8=hembras vírgenes de 8 horas de edad; V3=hembras vírgenes de 3 días de edad; Gra7=hembras grávidas de 7 días de edad; ConV7=hembras controles vírgenes de 7 días de edad;

Cuadro 11. Variación de la cantidad relativa porcentual promedio de hembras paridas de 10 días de edad y vírgenes de 8 hrs, 3 y 10 días de edad.

Estado reproductivo	V8	V3	Par 10	ConV10
Pentacosano	$4,60 \pm 0,46^{ac}$	$5,40 \pm 0,51^{ac}$	$1,39 \pm 0,27^{b}$	$3,64 \pm 0,41^{c}$

V8=hembras vírgenes de 8 horas de edad; V3=hembras vírgenes de 3 días de edad; Par10=hembras paridas de 10 días de edad; ConV10= hembras controles vírgenes de 10 días de edad.

Cuadro 12. Variación de la cantidad relativa porcentual promedio de hembras copuladas de 5 días de edad, grávidas de 7 días de edad, paridas de 10 días de edad y vírgenes de 8 hrs y 3 días de edad.

Estado reproductivo	V8	V3	Cop5	Gra7	Par 10
Pentacosano	$4,60 \pm 0,46^{a}$	$5,40 \pm 0,51^{a}$	$5,65 \pm 0,93^{a}$	$1,27 \pm 0,18^{b}$	$1,39 \pm 0,27^{b}$

V8=hembras vírgenes de 8 horas de edad; V3=hembras vírgenes de 3 días de edad; Cop5=hembras copuladas de 5 días de edad; Gra7=hembras grávidas de 7 días de edad; Par10=hembras paridas de 10 días de edad;

Variación de hidrocarburos cuticulares en machos copulados

En machos de *Ae. aegypti*, se observó solamente para un hidrocarburo, de los 26 analizados, variación estadisticamente significativa de su cantidad relativa porcentual promedio entre machos copulados de 5 días de edad y su control vírgenes de 5 días de edad, el cual corresponde a hentriacontano, que mostró un aumento significativo de su cantidad relativa porcentual promedio respecto su control (Wilks´Lambda = 1.42E-6; F = 22.45; g.l. = 3,21; *P* = 0.02) y vírgenes de 8 horas de edad (Wilks´Lambda = 3.26E-9; F = 14.89; g.l. = 7,39; *P* = 0.006), restableciedo su cantidad relativa al nivel de machos vírgenes de 3 días de edad (Cuadro 13).

Cuadro 13. Variación de la cantidad relativa porcentual promedio de machos copulados de 5 días de edad y vírgenes de 8 hrs, 3 y 5 días de edad.

Compuesto	V 8	V 3	Cop5	ConV5
Hentriacontano	$1,85 \pm 0,17^{a}$	$2,56 \pm 0,31^{ab}$	$2,88 \pm 0,25^{b}$	$2,12 \pm 0,15^{a}$

V8=machos vírgenes de 8 horas de edad; V3=machos vírgenes de 3 días de edad; ConV5= machos controles vírgenes de 5 días de edad; Cop5= machos copulados de 5 días de edad.

Discusión

La variación de los hidrocarburos cuticulares en hembras debido a la cópula, se ha observado en diferentes dípteros como *Drosophila melanogaster*[32], *Aedes aegypti* y *Anopheles gambiae*[26]. En el presente estudio los hidrocarburos cuticulares hexadecano, heptadecano y pentacosano incrementaron su cantidad relativa de forma significativa en hembras copuladas de 5 días de edad respecto sus controles vírgenes de 5 días de edad. El incremento restableció las cantidades relativas promedio de dichos hidrocarburos, similar a las cantidades relativas promedio que presentan hembras vírgenes de 8 horas de edad, por el contrario, 1,19-eiocosadieno disminuyo significativamente su cantidad relativa en hembras copuladas de 5 días de edad respecto su control vírgenes de 5 días de edad. Puede ser que la variación de los hidrocarburos cuticulares en el estado reproductivo de cópula se relacione con la disminución del atractivo de las hembras, tal como sucede con hembras de *Drosophila melanogaster,* que tras la cópula, aumentan la cantidad del hidrocarburo cuticular 7-tricoseno, el cual disminuye el cortejo de los machos[32]. Por otro lado, el restablecimiento de las cantidades relativas de los hidrocarburos cuticulares hexadecano, heptadecano y pentacosano, similar a las cantidades relativas de hembras vírgenes de 8 horas de edad, quizá está relacionado con la inhibición de la receptividad de nuevas inseminaciones de hembras copuladas, ya que dicho restablecimiento, puede ser un reflejo de los acontecimientos fisiológicos que ocurren en las hembras copuladas, que les permite estar en condiciones fisiológicas similares a las de hembras con pocas horas de emergencia, las cuales no son receptivas a la inseminación durante las primeras 30 horas de edad[33]. No solamente la variación del hidrocarburo cuticular 7-tricoseno en *Drosophila melanogaster*, regula la actividad copular de las hembras; la acción de los péptidos Acp70A y Dup99B, que transfiere el macho en el semen, reducen la receptividad de las hembras[34]. Situación análoga ocurre en *Ae. aegypti* con los péptidos de la sustancia matrona, la cual reduce la receptividad de las hembras ante nuevas cópulas[35]. Esto podría sugerir que en *Ae. aegypti* la acción de dicha sustancia va acompañada de la variación de los hidrocarburos cuticulares para regular la actividad copular y las inseminaciones. Puede ser que la inducción de la

monogamia en hembras *Ae.aegypti*, sea una actividad compleja que necesite diversos mecanismos, dado que en hembras *Ae.aegypti* existe cierto grado de poliandria durante las primeras 20 horas tras el primer apareamiento[36,37]. En hembras *Ae.aegypti,* la variación de los hidrocarburos cuticulares después de la cópula, puede ser un mecanismo que ayude a inhibir la poliandria, la cual ya no se presenta después del primer ciclo gonotrófico[38]. Finalmente, en machos copulados de 5 días de edad *Ae. aegypti*, se observó la variación significativa del hidrocarburo cuticular hentriacontano respecto su control vírgenes de 5 días de edad, dicho hidrocarburo cuticular, pese a su incremento en machos copulados, presentó una cantidad relativa porcentual promedio por debajo de los hidrocarburos más abundantes en todos los estados reproductivos; lo cual pone en duda su función como un semioquímico dirigido a las hembras, debido a que, en dípteros, los hidrocarburos cuticulares más abundantes funcionan como feromonas sexuales[39]; además, la variación de los hidrocarburos cuticulares en machos, no tiene efecto sobre el comportamiento de las hembras[40,41], por lo tanto, puede ser que la variación del hidrocarburo cuticular hentriacontano se relacione con la disminución de las secreciones en las vesículas seminales y la glándula accesoria[42].

Por otro lado, en hembras grávidas de 7 días de edad de *Ae.aegypti*, se registraron variaciones de los hidrocarburos cuticulares docosano, pentacosano, hexacosano, heptacosano y 13-,15-metil hentriacontano respecto sus controles vírgenes de 7 días de edad. Se asume que dichas variaciones ocurrieron durante la actividad ovárica, la cual en mosquitos anautógenos, comienza con la producción de la hormona juvenil en la corpora allata, con la función de madura a los oocitos para que incorporen vitelogenina, proteína asociada al desarrollo embrionario, cuya síntesis durante la vitelogénesis, es estimulada por la hormona 20-hidroxiecdisona secretada por los ovarios[43]. Esta correlación entre la variación de hidrocarburos cuticulares y la actividad ovárica, se ha observado en varios insectos como la avispa *Poliestes dominulus,* cuyo perfil de hidrocarburos cuticulares varía de acuerdo al grado de actividad ovárica, a la variación en el tamaño de la corpora allata y a los títulos elevados de la hormona juvenil[44,45], mientras que la ovogénesis en las hormigas *Diacamma ceylonense y Gnamptogenys striatula* induce variación en el perfil de hidrocarburos

cuticulares[46,47]. Por otra parte, la hormiga *Dinoponera quadriceps* presenta mayor proporción del hidrocarburo 9-hentriaconteno en hembras con mayor actividad ovárica[48] ,además, en hormigas, se ha observado un perfil de hidrocarburos cuticulares más abundante en hembras con mayor presencia de vitelogenina y oocitos maduros[49], finalmente en dípteros como *Musca domestica,* la producción del hidrocarburo (Z)-9-tricoseno, coincide con el comienzo de la vitelogénesis[50], mientras que en *Calliphora vomitoria* la variación del perfil de hidrocarburos cuticulares se asocia con títulos elevados de la hormona juvenil III y 20-hidroxiecdisona[51]. Lo anterior parece indicar que todo acontecimiento ovárico tiene como consecuencia la variación de los hidrocarburos cuticulares, ya que se ha observado que en hembras de *Calliphora vomitoria*, 72 horas después de ser ovariectomizadas, su perfil de hidrocarburos cuticulares varia cualitativa y cuantitativamente[52] y en hembras ovariectomizadas *de Musca domestica,* el hidrocarburo cuticular (Z)-9-tricoseno, sintetizado durante la vitelogénesis, no se produce[49]. Por otro lado, los hidrocarburos cuticulares heptacosano y pentacosano, en conjunto, han sido implicados como posibles feromonas sexuales en dípteros[53], además, heptacosano fue el compuesto más abundante en todos los estados reproductivos y es señalado como el más abundante en previos estudios de *Ae. aegypti* [26,54] y en otros Aedinos[10,55, 56], así como en el díptero *Dermatobia* hominis[57]; por lo tanto, quizá en *Ae. Aegypti,* la mayor abundancia de éste hidrocarburo cuticular y su variación en este estado reproductivo, tenga una función semioquímica. Por último, en el estado reproductivo de hembras paridas de 10 días de edad, se observó el mayor número de hidrocarburos que variaron en comparación con sus controles vírgenes de 10 días de edad. Los hidrocarburos que variaron significativamente su cantidad relativa porcentual promedio en hembras paridas de 10 días de edad respecto sus controles vírgenes de 10 días de edad fueron pentadecano, 8-heptadeceno, eicosano, docosano, tetracosano, pentacosano, 3-metil heptacosano, 13-,15-metil hentriacontano y dotriacontano.

Diversos estudios han señalado que la oviposición es inducida por la ingesta de sangre, la transferencia de las sustancias de la glándula accesoria y la sustancia matrona del macho y por el estímulo nervioso propioceptor del ovipositor[58-62], por lo tanto, esta mayor variación en el perfil de hidrocarburos cuticulares en

hembras paridas, puede estar relacionada a una actividad fisiológica compleja necesaria para la oviposición.

La mayor variación en el perfil de hidrocarburos cuticulares ocurrida al finalizar un ciclo reproductivo se ha observado en la hormiga *Linepithema humile*, cuyo perfil de hidrocarburos cuticulares en hembras paridas, es completamente diferente al de hembras nulíparas[63], mientras que la abeja *Bombus ipnorum* presenta mayor concentración de sus hidrocarburos cuticulares alcanos y alquenos en hembras que han ovipositado[64]. Lo anterior señala que, en *Ae. aegypti*, el perfil de hidrocarburos cuticulares en hembras paridas, puede ser un reflejo de su fertilidad, es decir, el éxito reproductivo en hembras *Ae. aegypti* quizá se refleja mediante la mayor variación del perfil de hidrocarburos cuticulares.

Pentacosano: hidrocarburo cuticular específico de los distintos estados reproductivos en hembras.

El hidrocarburo pentacosano cobra mucha relevancia debido a que varía de forma significativa entre el estado reproductivo de hembras copuladas de 5 días de edad (mayor concentración) y los estados reproductivos de hembras grávidas de 7 días de edad y paridas de 10 días de edad, lo cual sugiere que a través de la variación de éste hidrocarburo, se pude discriminar entre poblaciones de hembras copuladas y hembras grávidas o poblaciones de hembras copuladas y hembras paridas, además, al comparar la cantidad relativa porcentual promedio de los estados reproductivos de hembras grávidas de 7 días de edad y paridas de 10 días de edad con las cantidad porcentual promedio de todas las hembras vírgenes de 8 horas, 3, 5, 7 y 10 días de edad, se observó que para ambos estados, su cantidad relativa porcentual promedio fue significativamente menor en relación con la cantidad relativa porcentual promedio de hembras vírgenes de las diferentes edades. Lo anterior podría señalar que la variación del hidrocarburo cuticular pentacosano, también puede discriminar entre hembras longevas que están a punto de terminar un ciclo gonotrófico, o que han finalizado un ciclo gonotrófico y hembras nulíparas de diferentes edades. Dicho compuesto quizá tiene funciones semioquímicas en *Ae. Aegypti* relacionadas con el estatus

reproductivo, ya que otros estudios lo señalan como una feromona sexual [53,65]. Por otro lado, en previos estudios de *Aedes aegypti*, pentacosano se ha empleado para determinar la edad [66,67].

Conclusiones

El presente estudio señala una posible relación entre los acontecimientos fisiológicos que ocurren a lo largo del proceso reproductivo de *Ae. aegypti* y la variación del perfil de hidrocarburos cuticulares. Se observó que el perfil de hidrocarburos cuticulares con mayor variación corresponde al perfil de hembras paridas, lo cual sugiere que es posible identificar de forma precisa a hembras que representan un riesgo para la salud pública mediante el perfil de hidrocarburos cuticulares.

Por último, identificar el hidrocarburo cuticular pentacosano como un compuesto que discrimina entre los estados reproductivos que forman parte del ciclo gonotrófico, abre la posibilidad de investigar si dicho hidrocarburo tiene alguna función semioquímica en el mosquito *Ae. aegypti*, que pueda ser utilizada para fines de control.

Bibliografía

1. Rodriguez-Roche R, Gould EA. Understanding the dengue viruses and progress towards their Control. *BioMed* Research International. 2013; 2013:1-20.

2. Undurraga EA, Betancourt-Cravioto M, Ramos-Castañeda J, et al. Economic and disease burden of dengue in Mexico. Carvalho MS, ed. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2015; 9(3):e0003547.

3. Kautz TF, Díaz-González EE, Erasmus JH, et al. Chikungunya virus as cause of febrile illness outbreak, Chiapas, Mexico, 2014. Emerging Infectious Diseases. 2015; 21(11):2070-2073.

4. Fellner C. Zika Virus: Anatomy of a global health crisis. Pharmacy and Therapeutics. 2016; 41(4):242-253.

5. Sylvester G, Gandini M, Maciel-de-Freitas R. Age-dependent effects of oral infection with dengue virus on *Aedes aegypti* (Diptera Culicidae) feeding behaviour, survival, oviposition, success and fecundity PLoS One. 2013; 8(3): e59933.

6. Joy TK, Jeffrey Gutierrez EH, Ernst K, Walker KR, Carriere Y, Torabi M, Riehle MA. Aging fiield collected *Aedes aegypti* to determine their capacity for dengue transmission in the Southwestern United States. PLoS One. 2012; 7(10): e46946.

7. Detinova TS. Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of Malaria. Geneva: World Health Organization. 1962; 47: 48-94.

8. Hayes EJ, Wall R. Age-grading adult insects: a review of techniques. Physiological Entomology. 1999; 24: 1-10.

9. Beklemishev WN, Detinova TS, Polovodova VP. Determination of physiological age in anophelines and of age distribution in anopheline populations in the USSR. Bulletin of the World Health Organization. 1959; *21*(2): 223–232

10. Kruger EL, Pappas CD .Geographic variation of cuticular hydrocarbons among fourteen populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology. 1993; 30(3): 544-548.

11. Kather R, and Martin S J. Cuticular hydrocarbon profiles as a taxonomic tool: advantages, limitations and technical aspects. Physiological Entomology. 2012; 37: 25–32.

12. Desena ML, Edman JD, Clark JM, Symington SB, Scott TW. *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) age determination by cuticular hydrocarbon analysis of female legs. Journal of Medical Entomology. 1999; *36*(6): 824-830

13. Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, Moore CG, *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus,* Elife. 2015; 4: e08347

14. Lozano-Fuentes S, Hayden MH, Welsh-Rodriguez C, Ochoa-Martinez C, Tapia-Santos B, Kobylinsk KC, Eisen L. The dengue virus mosquito vector *Aedes aegypti* at high elevation in México. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2012; 87(5): 902–909.

15. Chinball AC, Piper SH, Pollard A, Williams EF, Sahai PN. The constitution of the priary alcohols fatty acids and paraffins present in plant and insects waxes. Biochemitry Journal. 1934; 28: 2189-2208.

16. Nation JL. Insect physiology and biochemistry 2nd edition. Boca Raton: CRC Press.

17. Nelson DR, Carlson DA. Cuticular hydrocarbons of the tsetse flies *Glossina morsitans, G. austeni*, and *G. pallidipes*. Insect Biochemestry. 1986; 16:403-416.

18. Carlson DA, Service MW. Identification of mosquitoes of *Anopheles gambiae* spicies complex A and B by anlysis of cuticular hydrocarbons. Science 1980; 207:1089-1091.

19. Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. BMC Microbiology 2007; 7(9):1471-2180-7-9.

20. Trabalon M, Campan M, Clément JL, Thon B, Lange C, Lefevre J. Changes in cuticular hydrocarbon composition in relation to age and sexual behavior in the female *Calliphora vomitoria* (Diptera). Behaviour Process. 1988; 17(2):107-15.

21. Kuo TH, Yew JY, Fedina TY, Dreisewerd K, Dierick HA, & Pletcher SD. Aging modulates cuticular hydrocarbons and sexual attractivenes in *Drosophila melanogaster*. The Journal of Experimental Biology. 2012; 215(5):814–821

22. Everaerts C, Farine JP, Cobb M, Ferveur JF. Drosophila Cuticular hydrocarbons revisited: mating status alters cuticular profiles. PLoS One. 2010; 5(3): e9607

23. Butler SM, Moon RD, Hinkle NC, Millar JG, Mcelfresh JS, Mullens BA. Characterization of age and cuticular hydrocarbon variation in mating pairs of house fly, *Musca domestica*, collected in the field. Medical and Veterinary Entomology. 2009; 23: 426–442.

24. Brei B, Edman JD, Gerade B, Clark JM. Relative Abundance of two cuticular hydrocarbons indicates whether a mosquito is old enough to transmit Malaria. Parasites. Journal of Medical Entomology 2004; 1(4): 807-809.

25. Chen, CS, Mulla MS, March RB, Chaney JD. Cuticular hydrocarbon patterns in *Culex quinquefasciatus* as influenced by age, sex, and geography. Bulletin of the Society for Vector Ecology 1990; 15: 129-139.

26. Polerstock AR, Eigenbrode SD, Klowden MJ. Mating alters the cuticular hydrocarbons of female *Anopheles gambiae* sensu stricto and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology 2002; 39(3):545-552.

27. Hugo LE, Kay BH, Eaglesham GK, Holling N, Ryan PA. Investigation of cuticular hydrocarbons for determining the age and survivorship of australasian mosquitoes. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2006;74(3):462-74.

28. MondeTB. Application de la methode de Polovodova a la determination de lage physiologique des Aedes Diptera Culicidae vecteurs de fievre jaune. Annales de la Societe Entomologique de France. 1993; 291: 61-76.

29. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th edition. Carol Stream: Allured Pub Corp, 2007.

30. Zar JH. Bioestatistical analysis. 4th edition, Englewood Cliffs, N. J. : Prentice-Hall 1999.

31. Johnson, DE. Métodos multivariados aplicados al análisis de datos. México,D.F. : Internacional Thompson Editores 2000.

32. Scott D. Sexual mimicry regulates the attractiveness of mated Drosophila melanogaster females. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1986; 83(21):8429-8433.

33. Gwadz, RW, Craig GB. Sexual receptivity in females *Aedes aegypti*. Mosquitoe News. 1968; 28:586–593.

34. Chapman T, Davies SJ. Functions and analysis of the seminal fluid proteins of male *Drosophila melanogaster* fruit flies. Peptides 2004; 25:1477–90.

35. Gwadz RW. Neuro-hormonal regulation of sexual receptivity in female *Aedes aegypti*. Journal of Insect Physiology. 1972; 18: 259–266.

36. Degner EC, Harrington LC. Polyandry depends on postmating time interval in the dengue vector *Aedes aegypti*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2016;94(4):780-785.

37. Richardson JB, Jameson SB, Gloria-Soria A, Wesson DM, Powell J. Evidence of limited polyandry in a natural population of *Aedes aegypti*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2015; 93(1):189-193.

38. Helinski MEH, Valerio L, Facchinelli L, Scott TW, Ramsey J, Harrington LC. evidence of polyandry for *Aedes aegypti* in semifield enclosures. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2012; 86(4):635-641.

39. Antony C, Jallon J. The chemical basis for sex recognition in *Drosophila melanogaster*. Journal of Insect Physiology. 1982; 28:873–880.

40. Scott D, Shields A, Straker M, Dalrymple H, Dhillon PK, Harbinder S. Variation in the male pheromones and mating success of wild caught *Drosophila melanogaster*. Demuth Journal, ed. PLoS One. 2011; 6(8): e23645.

41. Chenoweth SF, Blows, MW. Contrasting mutual sexual selection on homologous signal traits in *Drosophila serrata.* The American Naturalist. 2005; 165:281–289

42. Dapples CC, Foster WA, Lea AO. (Ultrastructure of the accessory gland of the male mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). International Journal of Insect Morphology and Embryology. 1974; 3: 279–291.

43. Clements AN. The biology of mosquitoes. Volume 1, Development, nutrition and reproduction. Wallingford, UK: CABI 2000

44. Bonavita-Cougourdan A, Théraulaz G, Bagnères AG, Roux M, Pratte, M., Provost E, Clément JL. Cuticular hydrocarbons, social organisation and ovarian development in a polistine wasp: *Polistes dominulus*. Comparative Biochemistry and Physiology. 1991;100B:667–680.

45. Sledge MF, Trinca I, Massolo A, Boscaro F, Turillazzi S. Variation in cuticular hydrocarbon signatures, hormonal correlates and establishment of reproductive dominance in a polistine wasp. Journal of Insect Physiology. 2004; 50:73–83

46. Cuvillier-Hot V, Cobb M, Malosse C, Peeters C. Sex, age and ovarian activity affect cuticular hydrocarbons in *Diacamma ceylonense*, a queenless ant. Journal of Insect Physiology. 2001; 47:485–493.

47. Lommelen E, Johnson CA, Drijfhout, FP, Billen J, Wenseleers, T, Gobin B. Cuticular hydrocarbons provide reliable cues of fertility in the

ant *Gnamptogenys striatula.* Journal of Chemical Ecology. 2006; 32: 2023–2034.

48. Monnin T, Malosse C, Peeters C. Solid-phase microextraction and cuticular Hydrocarbon differences related to Reproductive activity in queenless ant *Dinoponera quadriceps*. Journal of Chemical Ecology. 1998; 24: 473–490.

49. Cuvillier-Hot V, Lenoir A, Crewe R, Malosse C, Peeters C. Fertility signalling and reproductive skew in queenless ants. Animal Behaviour. 2004 Nov 30; 68(5):1209-19.

50. Dillwith JW, Adams TS, Blomquist, GJ. Correlation of housefly sex pheromone production with ovarian development. Journal of Insect Physiology. 1983; 29: 377–386.

51. Trabalon M, Campan M, Porcheron P, Clement JL, Baehr JC, et al. Relationships among hormonal changes, cuticular hydrocarbons, and attractiveness during the first gonadotropic cycle of the female *Calliphora vomitoria* (Diptera). General and Comparative Endocrinology. 1990; 80: 216–222

52. Trabalon M, Campan M, Hartmann N, Baehr JC, Porcheron P, Clément JL. Effects of allatectomy and ovariectomy on cuticular hydrocarbons in *Calliphora vomitoria* (Diptera). Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 1994; 25(4):363-73.

53. Simmons LW, Alcock J, Reeder A. The role of cuticular hydrocarbons in male attraction and repulsion by female Dawson's burrowing bee, *Amegilla dawsoni*. Animal Behaviour. 2003; 66(4):677-85.

54. Horne GL, Priestman AA. The chemical characterization of the epicuticular hydrocarbons of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Bulletin of Entomological Research. 2002; 92(04):287-94.

55. Kruger EL, Pappas CD, Howard RW. Cuticular hydrocarbon geographic variation among seven North American populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology. 1991; 28(6):859-64

56. Pappas CD, Bricker BJ, Christen JA, Rumbaugh SA. Cuticular hydrocarbons of *Aedes hendersoni* cockerell and *A. triseriatus* (SAY). Journal of Chemical Ecology. 1994; 20(5):1121-36.

57. Gomes CC, Trigo JR, Eiras ÁE. Sex pheromone of the american warble fly, *Dermatobia hominis*: The role of cuticular hydrocarbons. Journal of Chemical Ecology. 2008; 34(5):636-46.

58. Klowden MJ, Blackmer JL. Humoral control of pre-oviposition behaviour in the mosquito, *Aedes aegypti*. Journal of Insect Physiology. 1987; 33(10):689-92.

59. Klowden MJ. Influence of the ovaries and fat body on the initiation and termination of pre-oviposition behavior in the mosquito, *Aedes aegypti.* Journal of Insect Physiology. 1989; 35(7):567-70.

60. Yeh C, Klowden MJ. Effects of male accessory gland substances on the pre-oviposition behaviour of *Aedes aegypti* mosquitoes. Journal of Insect Physiology. 1990; 36(11):799-803.

61. Hiss EA, Fuchs MS. The effect of matrone on oviposition in the mosquito, *Aedes aegypti*. Journal of Insect Physiology. 1972; 18(11):2217-27.

62. Rossignol PA, McIver SB. Fine structure and role in behavior of sensilla on the terminalia of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Journal of Morphology. 1977; 151(3):419-37.

63. Biseau JC, Passera L, Daloze D, Aron S. Ovarian activity correlates with extreme changes in cuticular hydrocarbon profile in the highly

polygynous ant, Linepithema humile. Journal of Insect Physiology. 2004; 50(7):585-93

64. Ayasse M, Marlovits T, Tengoe J, Taghizadeh T, Francke W. Are there pheromonal dominance signals in the bumblebee Bombus hypnorum L (Hymenoptera, Apidae)? Apidologie, Springer Verlag, 1995; 26 (3):163-180.

65. Savarit F, Sureau G, Cobb M, Ferveur JF. Genetic elimination of known pheromones reveals the fundamental chemical bases of mating and isolation in Drosophila. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999; 96(16):9015-20.

66. Desena ML, Clark JM, Edman JD, Symington SB, Scott TW, Clark GG, Peters TM. Potential for aging female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by gas chromatographic analysis of cuticular hydrocarbons, including a field evaluation. Journal of Medical Entomology. 1999; 36(6):811-23.

67. Gerade BB, Lee SH, Scott TW, Edman JD, Harrington LC, Kitthawee S, Jones JW, Clark JM. Field validation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) age estimation by analysis of cuticular hydrocarbons. Journal of Medical Entomology. 2004; 41(2):231-8.