

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA

“EFECTO DE COMBINACIONES DE *Gliocladium virens* E INSECTICIDAS QUÍMICOS SOBRE *Aedes aegypti* VECTOR DE DENGUE Y CHIKUNGUNYA”

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

Presenta:

MVZ. VIRIDIANA RODAS CRUZ

Generación 2014-2016

Directora de tesis:

Dra. Rosa Patricia Penilla Navarro

Asesores:

Dr. José Luis Torres Estrada

MC. Luis Alberto Cisneros Vázquez

Tapachula, Chiapas

Agosto 2016

I. Resumen

Introducción: El control de *Aedes aegypti*, vector del dengue, chikungunya y Zika en México se basa principalmente en la aplicación de insecticidas. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos ha inducido el desarrollo de resistencia en los mosquitos, efectos adversos a la salud humana y al ambiente. Es por eso que es necesaria la búsqueda de nuevas opciones más amigables al ambiente y que ayuden a optimizar el uso de los productos químicos. En este sentido, la aplicación de combinaciones de hongos entomopatógenos e insecticidas para lograr efectos sinérgicos podría ser una opción. En el presente estudio se evaluó el efecto que causa el uso combinado de hongos entomopatógenos con un insecticida organofosforado, sobre *Ae. aegypti*. **Materiales y Métodos:** Se realizaron bioensayos de susceptibilidad según metodología de la OMS (1981) con mosquitos hembra de la cepa susceptible New Orleans y una cepa resistente a malatión los cuales fueron expuestos a papeletas impregnadas con combinaciones del insecticida malatión y el hongo entomopatógenos *Gliocladium virens*. En cada bioensayo se determinó la mortalidad, el efecto sinergista, la supervivencia y la tasa de infección para cada cepa. **Resultados:** El uso combinado del hongo y el insecticida en la cepa resistente a malatión mostró un efecto sinergista, mientras que en la cepa susceptible mostró un efecto aditivo. Sin embargo, el desempeño del hongo por sí solo durante un periodo de exposición de 24 h mostró la mejor reducción de las tasas de supervivencia $S_{50}=13$ días. En este estudio las mortalidades causadas en todos los tratamientos de manera combinada o independiente tuvieron un rango entre 1.11-16.6% a los siete días post exposición. **Conclusión:** Pese a que se observó un efecto sinergista, las mortalidades fueron bajas en todos los tratamientos, por lo que el hongo *G. virens* en combinación con el insecticida malatión no resultan idóneos como estrategia de control debido a la baja letalidad que tienen en conjunto.

Palabras clave: Hongos entomopatógenos, *Aedes aegypti*, insecticidas, dengue, fiebre chikungunya y Zika.

Abstract

Introduction: The control of *Aedes aegypti*, vector of dengue, chikungunya and Zika in Mexico is mainly based on the application of insecticides. However, their indiscriminate use has led to the development of resistance in mosquitoes, adverse effects on human health and the environment. That is why the search for new and friendlier options to the environment is necessary in helping to optimize the use of chemicals. Therefore, the application of combinations of entomopathogenic fungi and insecticides to achieve synergistic effects could be an option. In the present study the effect caused by the combined use of entomopathogenic fungi with an organophosphorus insecticide on *Ae. aegypti* were assessed. **Materials and methods:** susceptibility bioassays were performed according to WHO methodology (1981) with female mosquitoes of the susceptible strain New Orleans and a malathion resistant strain using papers impregnated with insecticide and *Gliocladium virens* entomopathogenic fungus combinations. In each bioassay mortality, synergistic effect, survival and the rate of infection for each strain was determined. **Results:** The combined use of fungus and insecticide showed a synergistic effect in the malathion resistant mosquito strain, while in the susceptible strain an additive effect was observed. Nevertheless the performance of the fungus alone for a period of 24 h exposure, showed a greater reduction in the survival rates, $S_{50} = 13$ days. Mortalities in all treatments combined with the insecticide or not, ranged, 1.11-16.6% mortality within seven days post exposure. **Conclusion:** Since a low synergistic effect was observed in all treatments, the fungus *G. virens* combined with malathion insecticide resulted to be not a suitable option as a control strategy.

Keywords: Entomopathogenic fungi, *Aedes aegypti*, insecticides, dengue, chikungunya fever and Zika.

II. Introducción

Los virus del dengue, chikungunya y Zika son un problema de salud pública y son transmitidos principalmente por la picadura del mosquito hembra *Aedes aegypti* (Quintos *et al.*, 1954; Robinson, 1955; Dick *et al.*, 1952).

La prevalencia, incidencia y morbilidad de estas arbovirosis varían entre ellas, por ejemplo, se calcula que a nivel mundial más de 3900 millones de personas en más de 128 países corren el riesgo de contraer dengue y actualmente en las Américas se reportan 320,062 casos confirmados (OMS, 2015; OPSa, 2016), mientras que chikungunya y Zika recientemente se introdujeron a las Américas causando 34,172 y 89,502 casos confirmados respectivamente en el presente año (OPsb, 2016; OPSc, 2016). El interés actual por controlar al Zika es debido a que se ha relacionado con características clínicas que incluyen microcefalia, deformidades oculares, síndrome de Guillain-Barre aunado con la transmisión vectorial, la exposición a través de transfusiones sanguíneas y transmisión por contacto sexual (Demir y Kilic, 2016).

Actualmente, no existe tratamiento específico contra estas enfermedades. En el caso del dengue, recientemente se aprobó en varios países el uso de la primera vacuna contra los cuatro serotipos del virus. Algunos estudios han analizado la eficacia y seguridad de esta vacuna, y en México la eficacia estimada fue de 31%, lo que sugiere una eficacia subóptima para el contexto epidemiológico en el país (Hernández-Ávila *et al.*, 2016). Hoy en día, el único método para limitar la transmisión del virus de dengue, chikungunya y Zika consiste en controlar las poblaciones de mosquitos vectores y/o evitar el contacto hombre vector (OPS, 2014).

En México, el control de *Ae. aegypti* está basado principalmente en el empleo de insecticidas; para el control larvario se utilizan principalmente organofosforados como el temefos granulado, aplicado en recipientes que contienen agua, mientras que para el control de adultos se utilizan insecticidas piretroides y organofosforados como la permetrina y el malatión, mediante técnicas de rociado espacial (CENAPRECE, 2016). No obstante, esto no es suficiente para reducir las poblaciones de mosquitos y disminuir la incidencia de estas enfermedades, por lo que conjuntamente se emplean otras estrategias para reducir los criaderos de este vector mediante programas de saneamiento ambiental (NOM-032-2014).

El uso intensivo y extensivo de los insecticidas ha provocado una presión de selección que ha favorecido el desarrollo y la aparición de resistencia a los diversos grupos en países de América como México, Brasil, Argentina, Cuba, entre otros (Maestre–Serrano *et al.*, 2014). Ante el incremento de la aparición de resistencia a insecticidas por parte de los mosquitos, se evalúa el uso de combinaciones de insecticidas y hongos entomopatógenos como una estrategia para reducir las cantidades de insecticidas, disminuir la probabilidad de aparición de resistencia y mejorar las estrategias de control (Paula *et al.*, 2011).

Los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes de control biológico, ya que constituyen un grupo con más de 750 especies que al dispersarse en el ambiente provocan infecciones en las poblaciones de insectos (Pucheta *et al.*, 2006). *Lagenidium giganteum* ha sido el único hongo entomopatógeno que se comercializa a nivel mundial como agente de control para larvas de mosquitos, y su uso se limita a lugares con temperaturas menores a 30°C (Kerwin *et al.*, 1994). Por ello, se recomienda el uso de cepas nativas, no necesariamente por el hecho de ser una estrategia ecológicamente segura (para evitar algún desequilibrio ecológico), sino más bien porque las cepas nativas son persistentes y específicas, mientras que las cepas foráneas necesitan adaptarse al medio y eso hace que pierdan su virulencia y persistencia (Villalobos, 1992; Castillo, 2006).

Por lo anterior Vázquez-Martínez *et al.* (2007) aislaron cepas nativas en el estado Chiapas, de las cuales *Gliocladium virens* 297 fue descrita como patógena en fases larvarias y adultas de *Ae. aegypti* (Molina-Tovar *et al.*, 2013).

Una estrategia para mejorar la eficacia de los insecticidas es combinarlos con hongos entomopatógenos. Xu *et al.* (2002), mencionaron que la aplicación combinada de insecticidas químicos y hongos entomopatógenos ha demostrado su eficacia para el control de plagas, y puede tomar ventajas de ambos ya que se logra reducir el uso de insecticidas y desacelerar el desarrollo de resistencia. Por su parte Quintela *et al.* (1998), mencionan que los insecticidas tienen la capacidad de aumentar el estrés y alterar el comportamiento del insecto que puede conducir a un mejor desempeño de entomopatógenos.

Al respecto, Santos *et al.* (2007) demostraron que la combinación sub-letal de insecticida imidacloprid (IMI, 10 ppm) con el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* cepa CG24 a 1×10^7 conidias/mL aumentó la eficiencia de ambos métodos de control de *Atta sexdens rubropilosa*. De igual manera Paula *et al.* (2011), demostraron que los hongos entomopatógenos pueden ser herramientas útiles para reducir las poblaciones de *Ae. aegypti*. Ellos evaluaron la eficiencia del hongo *Metarhizium anisopliae* (1×10^9 conidias/mL) combinado con el insecticida imidacloprid (IMI 0.1 ppm) contra adultos *Ae. aegypti*, y encontraron que la supervivencia en el tratamiento con el hongo fue de 26.6% y con el sinergismo entre *M. anisopliae* e IMI fue de 11.1%, reduciendo significativamente la supervivencia de *Ae. aegypti* en condiciones de campo simuladas.

La estrategia para combinar hongos con insecticidas parece ser un idea viable, sin embargo, es necesario que haya compatibilidad entre el hongo y el insecticida a utilizar debido a que los insecticidas pueden generar un efecto adverso sobre los hongos. En ese sentido, Mendoza-Ledesma (2014) demostró la compatibilidad de la cepa nativa *G. virens* 297 (1×10^6 conidias/mL) con el insecticida organofosforado malatión a las dosis (0.84%, 0.85% y 0.88%), por lo que este hongo puede ser un candidato para combinarse con malatión para el control de poblaciones de *Ae. aegypti*.

III. Hipótesis

La combinación del hongo entomopatógeno *G. virens* con el insecticida químico malatión (organofosforado) sobre fases adultas de *Ae. aegypti*, será más eficaz como control que el uso de manera individual de cada uno de ellos.

IV. Objetivo general

Evaluar el efecto del hongo entomopatógeno *G. virens cepa 297* combinado con el insecticida químico malatión (organofosforado) sobre fases adultas de *Ae. aegypti*.

4.1 Objetivos específicos

- Determinar la mortalidad causada por combinaciones del hongo entomopatógeno *G. virens* 297 con el insecticida químico malatión sobre poblaciones susceptibles y resistentes de *Ae. aegypti*.
- Identificar efectos sinérgicos de combinaciones del hongo entomopatógeno *G. virens* 297 con el insecticida químico malatión.
- Calcular la mediana del tiempo supervivencia de mosquitos hembras de *Ae. aegypti* (susceptibles y resistentes) expuestos a combinaciones de *G. virens* 297 con el insecticida químico malatión sobre poblaciones susceptibles y resistentes de *Ae. aegypti*.
- Estimar la tasa infección causada por combinaciones del hongo entomopatógeno *G. virens* 297 con el insecticida químico malatión sobre poblaciones susceptibles y resistentes de *Ae. aegypti*.

V. Materiales y métodos

5.1 Cepa de hongo

Se utilizó *G. virens* 297 proporcionada por el cepario del laboratorio de Patógenos y Vectores del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP), y que ha sido mantenida en medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (ADS, BectonDickinson®) y en refrigeración desde el año 2007.

Reactivación del hongo sobre insecto. Se lavaron y desinfectaron mosquitos *Ae. aegypti* proporcionados por el Insectario del Laboratorio de Insecticidas del CRISP. Una vez secos los mosquitos, se depositaron en una caja de Petri que contenía medio ADS y se inocularon tópicamente con alícuotas de la suspensión de conidias. Por último, después que el hongo desarrolló la infección sobre el hospedero (cinco días), se tomaron muestras del micelio y se sembraron en placas de Petri con medio ADS las cuales se mantuvieron a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% HR

con fotoperiodo de 12:12 h L:O. Con los hongos reactivados se prepararon suspensiones de conidias en Tween 80 al 0.01%, de 2×10^{10} conidias/mL y con una viabilidad mayor a 90%. El hongo *G. virens* reactivado se inoculó en placas de Petri sobre papel celofán (Dennis y Webster, 1971) y se incubaron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, 70% HR y fotoperiodo de 12:12 h luz/oscuridad en una cámara ambiental (Thermo Scientific, incubator818[®]) durante un periodo de 17 días hasta la esporulación. Posteriormente se prepararon suspensiones de conidias en Tween 80 al 0.01%, de 2×10^{10} conidias/mL y con una viabilidad mayor a 90%.

Suspensión de conidias. Las conidias se colectaron extrayéndolas del papel celofán con la ayuda de un bisturí y con una espátula fueron transferidas a un matraz que contenía 200 mL de solución Tween 80 al 0.01%. La suspensión se mezcló en un sonicador de baño de agua (Branson, ultrasoniccleaner[®]) a 28°C por 15 min, alternando con agitaciones manuales cada cinco minutos.

Concentración de conidias. Se realizaron conteos de muestras de 20 μL de una dilución de la suspensión madre en la cámara de Neübauer (Cañedo y Ames, 2004) y se realizó el conteo observando en el microscopio con el objetivo de 40x, (las conidias se leyeron en los extremos superiores, extremos inferiores y el del centro). El recuento se realizó por cuadruplicado, obteniendo un resultado promedio de conidias y sustituyendo en la siguiente fórmula:

$$\text{Conc. conidias (conidias/mL)} = (\text{prom. de conteo}) \times (\text{factor de dilución}) \times (250,000)$$

Viabilidad de conidias (porcentaje de germinación). Para determinar la viabilidad de la suspensión de conidias se tomaron alícuotas de 5 μL de una suspensión de conidias con una concentración de 10^6 conidias/mL y se depositaron en diferentes puntos de placas Petri con medio ADS. Las placas se incubaron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta observar el crecimiento del tubo germinativo en las conidias utilizando el objetivo 40x (microscopio Motic[®] B3 professional series). Se contó el número de conidias germinadas (aquellas cuyo tubo germinativo fue dos veces mayor al diámetro de la conidia), el número de conidias no germinadas y el total de conidias (Cañedo y Ames, 2004).

Por cada aislamiento se revisaron cuatro muestras. La viabilidad fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad} = (\text{conidias germinadas} / \text{total de conidias}) \times 100$$

5.2 Insecticida

Se utilizó el insecticida del grupo de los organofosforados Malathion1000[®] (malatión 88.70%, HPA, Productos de Higiene y Protección Ambiental, S.A. de C.V.), En los bioensayos se usó el insecticida al 0.84%, que fue una de las dosis de compatibilidad de *G. virens* y el insecticida malatión determinada por Mendoza-Ledesma (2014).

5.3 Mosquitos

Se utilizaron hembras adultas de *Ae. aegypti* susceptibles de la cepa New Orleans, y de la cepa resistente a malatión, con 2-3 días de emergidas y alimentadas únicamente con una solución de agua azucarada al 5%, las cuales fueron proporcionadas por el Insectario del Laboratorio de Insecticidas del CRISP.

5.4 Bioensayos

5.4.1 Efectos de concentraciones subletales de malatión a diferentes tiempos de exposición

La compatibilidad del hongo entomopatógeno *G. virens* y el insecticida químico fue estudiada previamente por Mendoza-Ledesma (2014) quien determinó las CL₁₅, CL₂₅ y CL₅₀ (0.84%, 0.85% y 0.88 %, respectivamente) de malatión en la colonia susceptible New Orleans, y además determinó que estas concentraciones son compatibles con el hongo *G. virens*. Con la finalidad de evaluar el efecto del insecticida químico malatión en la supervivencia de mosquitos de la cepa susceptible New Orleans y la cepa resistente a malatión, se abrió una ventana biológica a diferentes concentraciones de malatión (0.82%, 0.84%, 0.85%, 0.86% y 0.88%) y diferentes tiempos de exposición (1, 3, 6, 9 y 12 h).

Para ello se impregnó papel filtro Whatman número 2 (12x15 cm) y por cada papeleta se utilizó 1.1 mL de Malathion1000[®] diluido en agua a una concentración de 0.82%, 0.84%, 0.85%, 0.86% y 0.88%. Las superficies tratadas se dejaron secar por 24 h antes del experimento.

Posteriormente los mosquitos fueron expuestos a las papeletas impregnadas con el insecticida en tubos según la metodología de la OMS (1981) a las concentraciones antes mencionadas por tiempos de 1, 3, 6, 9 y 12 h y se monitoreó la mortalidad a las 24 h.

En ninguna de las dos cepas se observó mortalidad después de una hora de exposición en todas las concentraciones evaluadas, mientras que después de tres horas de exposición la mortalidad en la cepa susceptible aumentó significativamente y en el caso de la cepa resistente la mortalidad se observó a partir de las seis horas de exposición. Por lo tanto, los tiempos de exposición de más de una hora para la cepa susceptible y tres horas para la cepa resistente se evitaron en los experimentos posteriores. También se determinó que de las dosis subletales de malatión determinadas por Mendoza-Ledesma se utilizaría la menor (0.84%) ya que la supervivencia se vio afectada dependiendo de la concentración de insecticida la cual se correlacionó negativamente con la supervivencia.

Partiendo de lo anterior se realizaron dos bioensayos de susceptibilidad con mosquitos hembra de *Ae. aegypti*, los cuales consistieron en evaluar la combinación de *G. virens* y el insecticida organofosforado malatión al 0.84%, sobre mosquitos susceptibles cepa New Orleans y en la cepa resistente a malatión. En cada bioensayo se evaluaron diferentes esquemas de tratamientos los cuales dependieron de los tiempos de exposición a los que pudieron ser sometidos las diferentes cepas de mosquitos.

5.4.2 Evaluación de la combinación de *G. virens* e insecticida malatión en la cepa susceptible New Orleans y la cepa resistente a malatión

Para realizar estos experimentos, los mosquitos fueron expuestos a las papeletas impregnadas con el insecticida en tubos según la metodología de la OMS. Se prepararon papeletas, cortando rectángulos 12x15 cm de papel filtro Whatman #2. Se utilizó 1.1 mL de Malathion1000[®] diluido en agua a una concentración de 0.84% por cada papeleta. La impregnación se realizó

empleando jeringas de 3 mL (perfektum®). Para cada tratamiento fúngico, las papeletas fueron impregnadas con 2.5 mL de una suspensión de conidias a una concentración de 2×10^{10} conidias/mL (Mnyone *et al.*, 2009) con una viabilidad de 90%; la impregnación se realizó empleando jeringas de 3 mL (BD Plastipak®). Las superficies tratadas se dejaron secar por 24 h antes del experimento, posteriormente las papeletas fueron colocadas dentro de los tubos de plástico de exposición. Se expusieron grupos de 15 mosquitos adultos hembra de 2-3 d de edad a los diferentes tratamientos y tiempos según los esquemas de las **Tablas 1 y 2**. Pasado el tiempo de exposición fueron transferidos a vasos de plástico de 8 oz y mantenidos en una cámara ambiental a 27°C, 70% HR y fotoperiodo de 12:12 h luz/oscuridad. Todos los mosquitos fueron alimentados con una solución de sacarosa al 5% impregnada en algodón y colocados sobre la malla de las tapas de los tubos de susceptibilidad.

Se registró la mortalidad a la hora de ser expuestos y cada 24 h se realizaron observaciones y se tomaron los registros. Los mosquitos muertos fueron removidos diariamente, lavados con solución de hipoclorito de sodio al 1% por 20 s, y luego enjuagados dos veces en agua tridestilada estéril por 20 s. Cada mosquito muerto se colocó de manera individual en una caja de Petri que contenía papel filtro y algodón humedecido con agua tridestilada estéril, recubierta con papel aluminio para formar una cámara húmeda para estimular el crecimiento y esporulación del hongo.

Todos los tratamientos tuvieron cuatro repeticiones y fueron replicados tres veces en diferentes periodos de tiempo, en los cuales se evaluó la mortalidad causada por cada tratamiento, la supervivencia y el desarrollo de infección fúngica en los mosquitos muertos y expuestos a hongos.

5.5 Análisis estadístico

Se evaluaron dos esquemas de combinaciones de *G. virens* y malatión, uno donde se aplicaron de manera simultánea y la otra de manera alternada, además del tiempo de exposición. Por lo que, para el análisis, las comparaciones se realizaron de acuerdo al tipo de combinación y tiempo de exposición. Para los análisis se utilizaron los programas estadísticos SPSS versión 22.0 para Windows, GraphPad Prism versión 6 e InfoStat versión 2016.

Se midieron tres variables en las dos colonias de mosquitos:

1) Mortalidad: Se calculó el porcentaje de mortalidad en cada tratamiento a los siete días post exposición, posteriormente a los datos de mortalidad se sometieron a pruebas de normalidad y homeosticidad para determinar si se cumplían los supuestos de las pruebas paramétricas. De tal forma que para observar diferencias entre las mortalidades causadas por los tratamientos se realizó el test no paramétrico Kruskal–Wallis, finalmente para determinar diferencias entre tratamientos, se compararon los rangos medios de cada tratamiento.

H_0 = Las medianas de mortalidad son iguales entre tratamientos

H_1 = Las medianas de la mortalidad no son iguales entre tratamientos

Se analizó el sinergismo entre *G. virens* y malatión mediante comparaciones entre las mortalidades causadas por las combinaciones de ambos agentes (mortalidad observada) y con la suma de las mortalidades inducidas por cada agente por separado (mortalidad esperada). La mortalidad esperada se calculó mediante la fórmula $Me=M_h+M_i (1-M_i/100)$, donde M_h y M_i son las mortalidades causadas por el hongo y el insecticida de manera individual respectivamente.

Se calculó el valor de X^2 con los datos observados y esperados, $X^2=(M_{obs}-M_{esp})^2/M_{esp}$, el valor de X^2 se comparó con la de tablas a 1 grado de libertad ($p=0.05$). Si el valor de X^2 calculada excedió el de tablas hay sospecha de un efecto no aditivo. Si el valor de la diferencia entre $M_{obs}-M_{esp}$ fue un valor positivo o negativo y la interacción fue significativa es considerada sinergista o antagonista respectivamente (Morales-Rodríguez y Peck, 2009; Koppenhofer y Kaya, 1998).

2) Supervivencia: El tiempo de supervivencia mediana de cada tratamiento se calculó mediante el método de Kaplan Meier y las curvas de supervivencia se compararon con Log-Rank test con un nivel de significancia de 0.05.

3) Esporulaci3n: Se realiz3 un an3lisis de varianza, con los datos de la variable esporulaci3n de los mosquitos susceptibles New Orleans y las comparaciones entre tratamientos se realiz3 con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05, mientras que para la colonia de mosquitos resistentes a malati3n se realiz3 la prueba de Kruskal-Wallis y para determinar cu3les tratamientos eran diferentes entre s3, se compararon los rangos medios de cada tratamiento.

5.6 Consideraciones 3ticas

El presente proyecto fue revisado y aprobado por la Comisi3n de 3tica del INSP con la clave **C.I. 1344, No. 1304.**

VI. Resultados

Las dos cepas de mosquitos evaluadas, tuvieron porcentajes de mortalidades diferentes a los siete d3as a partir de los diferentes tiempos de exposici3n con los diferentes tratamientos. Las mortalidades m3s altas observadas en los mosquitos susceptibles New Orleans fueron causadas por las combinaciones tanto simult3neas (*G. virens*/malati3n 1 h de exposici3n) y alternadas (*G. virens* 24 h exposici3n- malati3n 1 h de exposici3n) con el 6.71 y 6.67% respectivamente (**Tabla 3 y 4**), aunque no se demostr3 una diferencia estad3sticamente significativa con las mortalidades de los mosquitos expuestos a malati3n/*G. virens*, ya sea alternada o simult3neamente donde se obtuvo una mortalidad del 3.89% para ambos casos. Por otro lado, en los mosquitos resistentes a malati3n la exposici3n alterna de *G. virens* 24 h- malati3n 1 h y la simult3nea *G. virens*/malati3n 1 h produjeron las mismas cifras de mortalidad o ligeramente superiores (6.67%, 8.89%, respectivamente, **tablas 7 y 5**) que los mosquitos susceptibles. Sin embargo, la mortalidad significativamente m3s alta fue de 16.11% ($H=22.1$, $P=<0.0001$), causada por la acci3n individual de *G. virens* tras 24 h de exposici3n (**Tabla 7**). En los mosquitos resistentes que fueron expuestos 3 h no se encontr3 diferencia significativa en las mortalidades cuando se expusieron a la combinaci3n *G. virens*/malati3n (4.45%) y cada uno de ellos por separado (malati3n 3.89%, *G. virens* 4.45%) $p>0.05$ (**Tabla 6**).

Sinergismo

En los mosquitos susceptibles los dos esquemas de exposición de *G. virens* y malatión causaron efectos aditivos, mientras que con los mosquitos resistentes a malatión la combinación simultánea con 1 h de exposición demostró un efecto sinergista. Mientras que cuando se expuso durante 24 h con *G. virens*, ya sea antes o después del malatión, dieron un efecto antagónico (**Tablas 8 y 9**).

Supervivencia

El hongo nativo *G. virens* afectó el tiempo de supervivencia mediana en ambas cepas de mosquitos, causando un rango de supervivencia mediana de 13 a 29 d (**Figura 1**). Los mosquitos expuestos 24 h a *G. virens* resultaron con una supervivencia menor a cuando fueron expuestos durante 1 y 3 h ($p<0.05$, **Figura 1A y B**). Además, *G. virens* demostró ser más patógeno para mosquitos resistentes ($S_{50}=13$ d) que cuando los mosquitos son susceptibles a insecticidas ($S_{50}=23.5$ d, **Figura 1C**).

Por otro lado, las aplicaciones simultáneas de malatión/*G. virens* y *G. virens*/malatión (con 1 h de exposición) redujeron significativamente ($p<0.05$) a 20-21 y 16 d la supervivencia de los mosquitos susceptibles y resistentes a malatión, respectivamente comparado a cuando se aplicaron cada agente por separado (29-31 y 21 d, respectivamente) (**Figura 2A, B y C**). Mientras que con 3 h de exposición no hubo diferencia significativa a cuando se expusieron a la combinación simultánea por 1 h o a cada agente por separado (**Figura 2C**).

Finalmente, las combinaciones alternadas de *G. virens*-malatión y malatión-*G. virens* causaron tiempos de supervivencia mediana (S_{50}) que fueron de 16 a 24 d en ambas cepas de mosquitos, sin embargo, en la colonia susceptible New Orleans *G. virens* causó el mismo efecto que la combinación malatión-*G. virens* ($p>0.05$) y mayor que *G. virens*-malatión ($p<0.05$), mientras que la supervivencia en la cepa resistente a malatión fue más afectada por *G. virens* que por ambas combinaciones alternadas ($P<0.05$) de *G. virens* y malatión (**Figura 3A y B**). También se observó que la supervivencia de los mosquitos resistentes a insecticidas fue más afectada que la de los mosquitos susceptibles por la acción de las combinaciones alternadas de *G. virens* y malatión ($P<0.0001$, **Figura 3C y D**).

Esporulación

La esporulación en ambas colonias fue ligeramente variada, los mosquitos susceptibles presentaron una media con un rango de esporulación del 87% al 95.83%, mientras que los mosquitos resistentes del 93.33% al 100% (mediana). La esporulación del hongo en los mosquitos fue significativamente afectada en ambas colonias de mosquitos cuando se aplicó de manera alternada *G. virens* (24 h)-malatión (1 h), causando esporulaciones del 89.58% (\pm 5.9) comparada con *G. virens* (24 h) 95.83% (\pm 4.8) en la colonia susceptible, y con la misma combinación y expuesta en forma viceversa causando esporulaciones del 93.3% comparada con *G. virens* (24 h) 100% en los mosquitos resistentes a malatión ($p < 0.05$) (**Tablas 10 y 11**).

VII. Discusión

Este es el primer estudio en donde se combina una cepa nativa de *G. virens* con el insecticida organofosforado malatión, con la finalidad de incrementar el efecto que cada uno de estos agentes ejerce por sí sólo en disminuir la supervivencia de *Ae. aegypti*. La mortalidad de los mosquitos se determinó a los siete días de haber sido expuestos durante 1, 3 o 24 h a los tratamientos encontrando que en la cepa de mosquitos susceptible New Orleans las mortalidades causadas por las combinaciones de exposición simultánea (*G. virens*/malatión 1h de exposición) y alternada (*G. virens* 24 h de exposición-malatión 1 h de exposición) fueron las más elevadas con el 6.71 y 6.67% respectivamente. Mientras que en la cepa resistente a malatión la mortalidad más alta (16.11%) se obtuvo en los tratamientos donde los mosquitos se expusieron únicamente al hongo durante 24 h. Esto difiere con los resultados presentados por Paula *et al.* (2011), quienes mencionan que las mortalidades observadas a los siete días debidas a la infección por el hongo solo (*M. anisopliae* 1×10^9 conidias/mL) y hongo combinado con el insecticida imidacloprid expuestos durante 12 h tuvieron una reducción de la supervivencia de 23.3% y 7.77%, respectivamente. Lo que demuestra que *G. virens* es menos efectiva en reducir la supervivencia de los mosquitos que *M. anisopliae* siete días post exposición. Sin embargo, la tasa de mortalidad observada en este estudio es mayor a lo reportado por Molina-Tovar *et al.* (2013), quien describe a esta misma cepa (*G. virens* 297) como patógena de larvas y adultos de *Ae. aegypti* cepa New Orleans, causando 26% de mortalidad en larvas a las 24 h y 8.75% de mortalidad en adultos después de que los mosquitos estuvieron expuestos a *G. virens* durante 16 d. Mientras que en el presente estudio a los 16 d la

mortalidad fue de 15.83% con la diferencia de que los mosquitos se expusieron a *G. virens* durante 24 h. Por su parte Castillo-Rivera *et al.* (2013) mencionan que *G. virens* causó el 100% de mortalidad sobre larvas de *Anopheles albimanus* a las 120 h (cinco días aproximadamente) con concentraciones de $1,83 \times 10^7$ conidias/mL y $3,66 \times 10^7$ conidias/mL, con conidias en arroz tamizado (polvo) y de conidias obtenidas del cultivo de arroz mediante dilución en Tween respectivamente, muy similar a lo reportado por Rodríguez (2008), quien expuso larvas de *An. albimanus* a *G. virens* teniendo un 100% de mortalidad a las 96 h (cuatro días), a una concentración de $4,6 \times 10^7$ conidias/mL. Por lo anterior *G. virens* 297 afecta de mejor manera a poblaciones larvarias de *Aedes* y *Anopheles* mientras que para controlar a poblaciones de adultos necesita más tiempo para producir infecciones. Esto pudiera deberse a que el mecanismo de penetración del hongo en larvas es a través de la boca (alimentación), y en menor proporción a través de espiráculos y cutícula, mientras que en los adultos las únicas vías de ingresar son a través de la cutícula y espiráculos y eso retarde la infección de *G. virens* 297. Otro factor sería también que la actividad biológica del patógeno demostrada para una especie puede no ser efectiva contra otra especie resultando ésta muy variable y difícil de predecir (Service, 1983). Estos resultados evidencian que la patogenicidad de la cepa de *G. virens* es muy variable y tiene una relación directa con la especie del insecto hospedero.

En este estudio *G. virens* en combinación con el insecticida malatión sobre mosquitos *Ae. aegypti* hembras de la cepa resistente a malatión mostró tener un efecto sinergista, mientras que en la cepa susceptible New Orleans el efecto de combinar estos elementos solo produjo un efecto aditivo, hecho que nos permite deducir que las cepas resistentes a insecticidas podrían ser más susceptibles a la infección por hongos. En estudios realizados con *An. gambiae* se ha observado que mosquitos resistentes a piretroides son más susceptibles a la infección por hongos en comparación con las cepas susceptibles (Howard *et al.*, 2010). Un estudio realizado en langostas (*Locusta migratoria*) utilizando el insecticida clorantraniliprol y el hongo *M. anisopliae*, sugieren que ésta mayor susceptibilidad observada en cepas resistentes puede deberse a que la combinación de hongos e insecticidas supera las defensas del huésped, debido a que ambos compuestos tienen un modo de acción similar ya que en este caso ambos actúan sobre los niveles de calcio en las células de los insectos (Jia *et al.*, 2016). Sin embargo, en otro estudio se evaluó la susceptibilidad fúngica de cepas de mosquitos resistentes y susceptibles a

insecticidas y no se encontraron diferencias en la susceptibilidad fúngica (Farenhorst *et al.*, 2009).

El hongo *G. virens* cepa nativa causó una supervivencia mediana (S_{50}) de 13 a 29 d considerando ambas colonias de mosquitos. Los mosquitos con la menor supervivencia fueron la cepa resistente a malatión expuestos al hongo solo durante 24 h. *G. virens* por si sola demostró ser más patógena para la cepa resistente a malatión ($S_{50}=13$ d) en comparación con la cepa susceptible New Orleans ($S_{50}=23.5$ d). Las exposiciones simultáneas de 1 h de malatión/*G. virens*, *G. virens*/malatión en la cepa susceptible y *G. virens*/malatión en la cepa resistente redujeron significativamente de 29, 31 y 21 a 20, 21 y 16 d la supervivencia de ambas colonias respecto a cuándo se aplicaron de manera independiente. Esto difiere con los datos reportados por Paula *et al.* (2011) quienes reportaron S_{50} de dos días utilizando *M. anisopliae* combinado con imidacloprid y una S_{50} de tres días para el hongo de manera individual en tratamientos con 12 h de exposición a una concentración de 1×10^9 conidios/mL. Esta diferencia puede deberse a la virulencia que tiene cada una de las cepas utilizadas en los diferentes estudios.

Para que la infección de los hongos tenga lugar, diversos factores bióticos y abióticos tienen una enorme influencia y solo se lleva a cabo cuando la interacción ocurre bajo condiciones óptimas (Hajek y Leger, 1994). Sin olvidar también que el origen de la cepa del patógeno y del huésped están estrechamente relacionados con su capacidad infectiva y ésta se relaciona con los nutrientes presentes en los insectos, así como de múltiples factores que en conjunto funcionan como inductores para la activación de receptores presentes en el patógeno que les permite llevar a cabo el proceso infectivo en los insectos (Hajek, 1997). En este estudio la esporulación varió moderadamente dependiendo de la cepa de mosquitos, la cepa susceptible tuvo un rango de esporulación de 87% a 95.83% mientras que en la cepa resistente la esporulación fue de 93.33 a 100%, esto es similar a lo reportado por Scholte *et al.* (2007) quienes utilizando *M. anisopliae* sobre *Ae. aegypti* observaron esporulación en mosquitos hembras (93.5%) y machos (85%) teniendo un promedio de $89.3 \pm 2.2\%$ de esporulación. Sin embargo, Molina-Tovar *et al.* (2013) reportan un 100% de esporulación de *G. virens* sobre *Ae. aegypti* con una concentración de conidias igual a la usada en este estudio. Las diferencias entre estas tasas pueden deberse a los tiempos de exposición a los que se sometieron los

mosquitos, en este estudio el tiempo máximo de exposición fue de 24 h mientras que Molina-Tovar *et al.* (2013) expusieron por un periodo de 16 d lo que probablemente dio lugar a una mayor tasa de infección. Los resultados muestran tasas de infección altas por lo que podemos deducir que el hongo si está infectando a los mosquitos, pero el proceso infectivo que desencadena no es lo suficientemente letal para disminuir las tasas de supervivencia en ninguna de las dos cepas evaluadas.

Diversos estudios demostraron que el uso de hongos entomopatógenos puede ser efectivo en el control de la malaria ya que reducen significativamente la capacidad vectorial, esto debido a que el periodo de incubación extrínseca del patógeno es de 9-14 d en *Plasmodium sp.*, y es más largo que el promedio de vida del mosquito y por lo tanto las estrategias que reducen la supervivencia del vector pueden ser altamente eficaces (Fahrenhorst *et al.*, 2009; Scholte *et al.*, 2007). Sin embargo, para el caso de control del dengue, el panorama cambia ya que se requiere que el hongo ya sea solo o combinado con insecticidas logre disminuir la supervivencia en un periodo menor a 4-10 d, que es el tiempo que dura el desarrollo extrínseco del virus, razón por la cual se debe poner énfasis en el uso de cepas nativas altamente virulentas capaces de matar al 100% de la población en el lapso no mayor a siete días (Paula *et al.*, 2008).

El hongo entomopatógeno *G. virens* en este estudio fue reactivado previamente en mosquitos *Ae. aegypti* y tuvo una viabilidad promedio de 95% a las 11 h, y la concentración utilizada que es la más alta que se ha comprobado, puede causar infección 2×10^{10} conidias/mL por encima de la cual no hay más reducciones en la supervivencia según estudios realizados con *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Mnyone *et al.*, 2011). Sin embargo, los efectos observados en este estudio sugieren que el hongo a pesar de tener una buena viabilidad y una concentración de conidias altamente infectivas no tiene la virulencia suficiente para enfermar a *Ae. aegypti*. Diversos factores como la temperatura, humedad relativa, tipo de suelo, el origen de la cepa del patógeno y del hospedero, están estrechamente relacionados con su capacidad infectiva (Hajek, 1997), también es necesario tener en cuenta que cultivos sucesivos en medios artificiales pueden resultar en una atenuación o pérdida de la virulencia (Cañedo y Ames, 2004). La pérdida de la virulencia depende del aislamiento y especie del patógeno, pero frecuentemente se puede recuperar con el pase del hongo a través del hospedante apropiado

(Fargues y Roberts, 1983). El uso de concentraciones altas de conidias es importante ya que se sabe que concentraciones bajas de conidias y tiempos de exposición cortos pueden dar lugar a dosis infectivas muy bajas y que fácilmente pueden ser contrarrestadas por el sistema inmune del huésped (Bogus *et al.*, 2007). Así mismo, la concentración de conidias se correlaciona con la tasa de mortalidad, a mayor concentración existe una mayor mortalidad (Mnyone *et al.*, 2009). También, es importante la búsqueda continua de cepas en campo, en especial aquellas que se obtienen de insectos micosados ya que se ha reportado que pueden llegar a tener un 42% de efectividad, mientras que las muestras obtenidas de fuentes como el suelo y agua de donde son colectados los insectos solo tiene una efectividad del 7% (Elosegui *et al.*, 2006).

VIII. Conclusiones

El sinergismo entre *G. virens* y el insecticida químico malatión solo se observó en la cepa resistente a malatión, por lo que ésta pudiera ser una herramienta efectiva en poblaciones de mosquitos *Ae. aegypti* en las cuales se presenta el fenómeno de resistencia a organofosforados como el malatión. Sin embargo y pese a que se observó un efecto sinergista en este estudio, las mortalidades causadas en todos los tratamientos de manera combinada o independiente fueron bajas, con una mortalidad máxima de 16.6% a los siete días obtenida después de exponer al hongo de manera independiente por un periodo de 24 h, razón por lo cual el hongo *G. viren* en combinación con el insecticida malatión no resulta idóneo como estrategia de control de *Ae. aegypti* debido a la baja letalidad que presenta esta cepa nativa de hongo sobre este vector.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que financió el presente estudio a través del proyecto FOSISS-2015-1-262172 código 858-7158, “Ovitrapas letales con sustratos impregnados de hongos entomopatógenos e insecticidas para la vigilancia entomológica y control de *Aedes aegypti* vector de Dengue y Chikungunya en México” cuyo responsable técnico es el Dr. José Luis Torres Estrada.

IX. Referencias

- Bogus, M. I., Kedra, E., Bania, J., Szczepanik, M., Czygier, M., Jablonski, P., Pasztaleniec A., Samborski, J., Mazgajska, J., Polanowski, A. 2007. Different defense strategies of *Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella*, and *Calliphora vicina* against fungal infection. *J Insect Physiol.* 53(9), pp. 909-922.
- Cañedo, V., Ames, T. 2004. Manual de Laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa. Primera edición (CIP). Lima, Perú. pp 40-44.
- Castillo-Rivera, I., Gálvez-Coutiño, O. R., Vázquez Martínez, M. G., Torres Estrada, J. L. 2013. Control de calidad en la producción del hongo *Gliocladium virens*, patógeno de *Anopheles albimanus* (Wiedemann 1820), vector del paludismo en México. *Interciencia.* 38:387-391
- Castillo, Z. S. 2006. Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control del salivazo (*Aeneolamia spp.* Y *Prosapia spp.*) en: pastizales de *Brachiaria decumbens* en el Peten, Guatemala. Tesis de Maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza Tropical. Research and Higher Education Center. Turrialba, Costa Rica.
- Centro Nacional de programas Preventivos y Control de Enfermedades [CENAPRECE]. 2016. Lista actualizada de Productos recomendados por el CENAPRECE para el Combate de insectos vectores de enfermedades a partir de 2016. Recuperado de http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/ListaActualizada ProductoRecomendadosCENAPRECE2016_1.pdf. Fecha de consulta 16 de febrero de 2016.
- Demir, T., Kilic, S. 2016. Zika virus: a new arboviral public health problem. *Folia Microbiol.* pp 1-5.
- Dennis, C., Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57: 25-39.
- Dick, G. W., Kitchen, S. F., Haddow, A. J. 1952. Zika virus isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 46:509-20

- Elosegui, O., Jiménez, J., Carr, A. 2006. Aislamiento, identificación y caracterización morfológica de aislados nativos de hongos mitospóricos con potencialidad para el control de especies de insectos plaga. *Fitosanidad*.10:265- 272.
- Farenhorst, M., Mouatcho, J. C., Kikankie, C. K., Brooke, B. D., Hunt, R. H., Thomas, M. B., Coetzee, M. 2009. Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *P Natl Acad Sci USA*. 106(41), 17443–17447.
- Fargues, J. F. and P. H. Roberts, 1983. Effect of passing through scarabeid hosts on the virulence and host specificity of two strains of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Can J of Microbiol* 29,576-583
- Hajek, A. E., St. Leger, R. J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insects host. *Annu Rev Entomol*. 39: 293-322.
- Hajek, A. E. 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Adv. Microb. Ecol*. 15:193-249.
- Hernández-Ávila, M., Lazcano-Ponce, E., Hernández-Ávila, J. E., Alpuche-Aranda, C. M., Rodríguez-López, M. H., García-García, L., Madrid-Marina, V., Gatell-Ramírez, H., Lanz-Mendoza, H., Martínez-Barnette, J., Díaz-Ortega, J. L., Ángeles-Llerenas, A., Barrientos-Gutiérrez, T., Bautista-Arredondo, S., Santos-Preciado, J. I. 2016. Análisis de la evidencia sobre eficacia y seguridad de la vacuna de dengue CYD-TDV y su potencial registro e implementación en el Programa de Vacunación Universal de México. *Salud Pública Méx*. 58(1), 71-83.
- Howard, A. F., Koenraadt, C. J., Farenhorst, M., Knols, B. G., Takken, W. 2010. Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Malar J*. 9, 168.
- Jia, M., Cao, G., Li, Y., Tu, X., Wang, G., Nong, X., Zhang, Z. 2016. Biochemical basis of synergism between pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and insecticide chlorantraniliprole in *Locusta migratoria* (Meyen). *Sci Rep*. 6, 28424.

- Kerwin, J. L., Dritz, D. A., Washino, R. K. 1994. Pilot scale production and application in wildlife ponds of *Coelomomyces giganteum* (Oomycetes:Lagenidiales). *J Am Mosq Control Assoc.* 10: 451-455.
- Koppenhofer, A. M., Kaya, H. K. (1998). Synergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: a novel approach to white grub (Coleoptera: Scarabaeidae) control in turfgrass. *J. Econ. Entomol.* 91: 618-623
- Maestre-Serrano, R., Gómez-Camargo, D., Ponce-García, G., Flores, A. E. (2014). Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. *Pestic Biochem Physiol.* 116:63-73.
- Mendoza-Ledesma, M. N. 2014. Compatibilidad de hongos entomopatógenos e insecticidas organofosforados para el control de *Aedes aegypti* [Díptera: Culicidae] (Tesis de Maestría). Centro Regional de Investigación en Salud Pública, México.
- Mnyone, L. L., Kirbi, M. J., Lwetoijera, D. W., Mpingwa, M. W., Knols, B. G. J., Takken, W., Russell, T. L. 2009. Infection of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effects of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. *Malar J.* 8:309.
- Mnyone, L. L., Kirby, M. J., Mpingwa, M. W., Lwetoijera, D. W., Knols, B. G. J., Takken, W., Russell, T. L. 2011. Infection of *Anopheles gambiae* mosquitoes with entomopathogenic fungi: effect of host age and blood-feeding status. *Parasitol Res.* 108(2), 317–322.
- Molina-Tovar, L., Mejía-Martínez, D., Cisneros-Vázquez, L. A., Vazquez-Martinez, M. G. 2013. Infección de Mosquitos *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vectores del dengue por hongos entomopatógenos. 446-451
- Morales-Rodriguez, A., Peck, D. C. 2009. Synergies between biological and neonicotinoid insecticides for the curative control of the white grubs *Amphimallon majale* and *Popillia japonica*. *Biol Control.* 51: 169-180.
- NOM-032-SSA2-2014 Norma Oficial Mexicana para la Vigilancia Epidemiológica, Prevención y Control de las Enfermedades Transmitidas por Vector 2014.

- Organización Mundial de la Salud (OMS). 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphorus and carbamate insecticides. Establishment of the base-line. Geneva.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015. Dengue y Dengue hemorrágico. Nota descriptiva N°117. Febrero de 2015. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/> Fecha de consulta 20 de abril 2015.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2014. Enfermedades virales. Chikungunya. Información General. 30 de Junio de 2014. Recuperado de [.http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=8303&Itemid=40023&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=8303&Itemid=40023&lang=es). Fecha de consulta 13 de junio de 2015.
- Organización Panamericana de la salud (OPSa). 2016. Dengue. Número de casos reportados en las Américas. 15 de Julio 2016. Recuperado de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=35568&Itemid=270. Fecha de consulta 19 de Julio de 2016.
- Organización Panamericana de la salud (OPSb). 2016. Chikungunya. Número de casos reportados en las Américas. 7 de Julio 2016. Recuperado de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=&gid=35338&lang=es. Fecha de consulta 11 de Julio de 2016.
- Organización Panamericana de la salud (OPSc). 2016. Zika. Número de casos reportados en las Américas.: 28 de Julio 2016. Recuperado de http://ais.paho.org/hip/viz/ed_zika_cases.asp. Fecha de consulta 31 de Julio de 2016.
- Paula, A., Carolino, A., Paula, C., Samuels, R. 2011. The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae). *Parasit vector*. 25;4:8
- Paula A, Brito E, Pereira C, Carrera M, Samuels R. 2008. La susceptibilidad de adultos de *Aedes aegypti*(Diptera: Culicidae) a la infección por *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* : perspectivas para el control del vector del dengue. *Biocont Sci Tech*. 18: 1017-1025.
- Pucheta, D., Flores-Macías, A., Rodríguez-Navarro, S., de la Torre, M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, vol. 31, núm.12, diciembre, pp. 856-860.

- Quintela, E. D., McCoy, C. W. 1997. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. *Environ Entomol.* 26: 1173-1182
- Quintos, F. N., Lim, L. E., Juliano, L., Reyes, A., Lacson, P. 1954. Hemorrhagic fever observed among children in the Philippines. *Philipp J Pediatr* 3:1–19..
- Robinson M.C. 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*49(1):28-32.
- Rodríguez, A. (2008). Patogenicidad de Diferentes Cepas de Hongos sobre Mosquitos *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: culicidae) Vectores del Paludismo. Tesis. Universidad Autónoma de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, México. 93 pp.
- Santos, A. V., Oliveira, B. L., Samuels, R. I. 2007. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of Imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Forel (Hymenoptera: Formicidae)*. *Mycopathologia.* 163:233-240.
- Service, M. W. 1983. Biological Control of mosquitoes, has it a future? *Mosq News.* 43:113-120.
- Scholte, E., Takken, W., Knols, B. 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Trop.* 102:151-158.
- Vázquez-Martínez, M. G., Cirerol-Cruz, B. E., Torres-Estrada, J. L., López Rodríguez, M. H. 2014. Potential for entomopathogenic fungi to control *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of Chagas disease in México. *Rev Soc Bras Med Trop.* 47(6), 716-722.
- Vázquez-Martínez, M. G., Rodríguez, A., Rodríguez, M. 2007. Aislamiento de cepas nativas de hongos asociados insectos vectores de enfermedades. XII Congreso de investigación en Salud Pública. Cuernavaca Morelos, México. pp. 209.
- Villalobos, F. J. 1992. The potential of entomopathogens for the control of white grub pests of corn in México. In: T. A. Jackson & T. R. Glare (Eds). *Use of pathogens in scarab pest management.* Intercept. England. pp. 253-260.

WHO. 2012. Recommended insecticides for space spraying against mosquitoes. Disponible en;
[http://www.who.int/whopes/Insecticidesfor space spraying](http://www.who.int/whopes/Insecticidesfor%20space%20spraying).

Xu, S. T., Ying, S. H., Feng, M. G. 2002. Biological compatibility of ten commercial pesticides with
Beauveria bassiana conidia. Acta Phytophylacica Sinica. 29:158-162.

X. Anexos

Lista de tablas

Tabla 1.- Esquema de los tratamientos del hongo entomopatógeno *G. virens* y el insecticida organofosforado malatión evaluados sobre mosquitos *Ae. aegypti* susceptibles (cepa New Orleans).

Tratamientos	<i>G. virens</i> + malatión (0.84%)	Tiempo de exposición
T1 Simultáneo 1	Hongo + Insecticida	1 h
T2 Simultáneo 2	Insecticida + Hongo	1 h
T3 Alternado 1	Hongo - Insecticida	24 h + 1 h
T4 Alternado 2	Insecticida - Hongo	1 h + 24 h
T5 Biológico 1	Hongo	1 h
T6 Biológico 2	Hongo	24 h
T7 Químico	Insecticida	1 h
T8 Testigo Bio	Tween 80 al 0.01%	24 h
T9 Testigo Qui	Agua	1 h

Tabla 2.- Esquema de los tratamientos del hongo entomopatógeno *G.virens* y el insecticida organofosforado malatión evaluados sobre mosquitos *Ae. aegypti* resistentes a malatión.

Tratamientos	<i>G. virens</i> + malatión (0.84%)	Tiempo de exposición
T1 Simultáneo 1	Hongo + Insecticida	1 h
T2 Simultáneo 2	Insecticida + Hongo	3 h
T3 Alternado 1	Hongo - Insecticida	24 h + 1 h
T4 Alternado 2	Insecticida - Hongo	1 h + 24 h
T5 Biológico 1	Hongo	1 h
T6 Biológico 1	Hongo	3 h
T7 Biológico 2	Hongo	24 h
T8 Químico	Insecticida	1 h
T9 Químico	Insecticida	3 h
T10 Testigo Bio	Tween 80 al 0.01%	24 h
T11 Testigo Qui	Agua	1 h

Tabla 3.- Porcentajes de mortalidad (medias y medianas) de los mosquitos susceptibles New Orleans a los 7 días post-exposición a tratamientos con el hongo entomopatógeno *Gliocladium virens* y el insecticida malatión (aplicaciones simultáneas y de manera independiente).

Tratamiento	N	% mortalidad (medias)	D.E.	Medianas	H	P	Ranks
Tween (24 h)	12	1.11	2.6	0	7.31	0.0269	29.42 ^A
<i>G. virens</i> (1 h)	12	1.11	2.6	0			29.42 ^A
Agua (1 h)	12	1.11	2.6	0			29.42 ^A
Malatión (1 h)	12	3.33	4.49	0			38.63 ^{AB}
Malatión/ <i>G.virens</i> (1 h)	12	3.89	5.29	0			39.71 ^{AB}
<i>G. virens</i> /malatión (1 h)	12	6.71	4.92	6.67			52.42 ^B

Tratamientos con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Tabla 4.- Porcentajes de mortalidad (medias y medianas) de los mosquitos susceptibles New Orleans a los 7 días post-exposición a tratamientos con el hongo entomopatógeno *Gliocladium virens* y el insecticida malatión (aplicación alternada y de manera independiente)

Tratamiento	N	% mortalidad (medias)	D.E.	Medianas	H	P	Ranks
Agua (1 h)	12	1.11	2.6	0	8.1	0.0431	29.33 ^A
Tween (24 h)	12	1.11	2.6	0			29.33 ^A
<i>G. virens</i> (24 h)	12	2.22	4.34	0			33.04 ^{AB}
Malatión (1 h)	12	3.33	4.49	0			38.38 ^{AB}
Malatión (1 h)- <i>G. virens</i> (24 h)	12	3.89	5.29	0			39.42 ^{AB}
<i>G. virens</i> (24 h)-malatión (1 h)	12	6.67	5.68	6.67			49.50 ^B

Tratamientos con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Tabla 5.- Porcentajes de mortalidad (medias y medianas) de los mosquitos resistentes a malatión a los 7 días post-exposición a tratamientos con el hongo entomopatógeno *Gliocladium virens* y el insecticida malatión (aplicación simultánea durante 1hr de exposición).

Tratamiento	N	% mortalidad (medias)	D.E.	Medianas	H	P	Ranks
Tween (24 h)	12	0	0	0	26.51	<0.0001	20.50 ^A
<i>G. virens</i> (1 h)	12	0.56	1.93	0			22.79 ^{AB}
Agua (1 h)	12	0.56	1.93	0			22.79 ^{AB}
Malatión (1 h)	12	3.89	4.46	3.34			35.08 ^B
<i>G. virens</i> /malatión (1 h)	12	8.89	3.32	6.67			51.33 ^C

Tratamientos con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Tabla 6.- Porcentajes de mortalidad (medias y medianas) de los mosquitos resistentes a malatión a los 7 días post-exposición a tratamientos con el hongo entomopatógeno *Gliocladium virens* y el insecticida malatión (aplicación simultánea durante 3hr de exposición).

Tratamiento	N	% mortalidad (medias)	D.E.	Medianas	H	P	Ranks
Tween (24h)	12	0	0	0	9.27	0.0077	21.00 ^A
Agua (3h)	12	0.56	1.93	0			23.29 ^{AB}
Malatión (3h)	12	3.89	4.46	3.34			35.54 ^B
Malatión/ <i>G.virens</i> (3h)	12	4.45	5.19	3.34			36.63 ^B
<i>G. virens</i> (3h)	12	4.45	5.19	3.34			36.63 ^B

Tratamientos con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Tabla 7.- Porcentajes de mortalidad (medias y medianas) de los mosquitos resistentes a malatión a los 7 días post-exposición a tratamientos con el hongo entomopatógeno *Gliocladium virens* y el insecticida malatión (aplicación alternada).

Tratamiento	N	% mortalidad (medias)	D.E.	Medianas	H	P	Ranks
Tween (24 h)	12	0	0	0	22.1	<0.0001	22.00 ^A
Agua (1 h)	12	0.56	1.93	0			24.33 ^{AB}
Malatión (1 h)	12	3.89	4.46	3.34			36.88 ^{AB}
Malatión (1 h)- <i>G. virens</i> (24 h)	12	5.00	5.77	3.34			38.63 ^{AB}
<i>G. virens</i> (24 h)-malatión (1 h)	12	6.67	8.99	3.34			39.88 ^B
<i>G. virens</i> (24 h)	12	16.11	10.03	16.67			57.29 ^C

Tratamientos con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Tabla 8.- Evaluación de sinergismo en los mosquitos susceptibles New Orleans.

Exposición	Observados	Esperados	X²	Efecto
<i>G. virens</i> /malatión (1 h)	6.71	4.37	1.24871762	Aditivo
Malatión/ <i>G. virens</i> (1 h)	3.89	4.37	0.05294302	Aditivo
<i>G. virens</i> (24 h)-malatión (1 h)	6.67	5.56	0.22040450	Aditivo
Malatión (1 h)- <i>G. virens</i> (24 h)	3.89	5.56	0.50220162	Aditivo

Tabla 9.-Evaluación de sinergismo en los mosquitos resistentes a malatión.

Exposición	Observados	Esperados*	X²	Efecto
<i>G. virens</i> /malatión (1 h)	8.89	4.41	4.55111111	Sinergismo
Malatión/ <i>G. virens</i> (3 h)	4.44	8.11	1.66077682	Aditivo
<i>G. virens</i> (24 h)-malatión (1 h)	6.67	19.22	8.19471904	Antagonismo
Malatión (1 h)- <i>G. virens</i> (24 h)	5.00	19.22	10.5207284	Antagonismo

* $Me = M_h + M_i (1 - M_i / 100)$

X² tablas=3.8415

Tabla 10.- Porcentajes de esporulación en los diferentes tratamientos con hongo sobre los mosquitos susceptibles New Orleans.

Exposición	% esporulación
<i>G. virens</i> /malatión (1 h)	87.02
Malatión/ <i>G. virens</i> (1 h)	90.42
<i>G. virens</i> (24 h)-malatión (1 h)	89.58*
Malatión (1 h)- <i>G. virens</i> (24 h)	90.83
<i>G. virens</i> (1 h)	92.08
<i>G. virens</i> (24 h)	95.83*

F=4.55, GL=5,
P=0.0010

*Diferencia Tukey=0.05

Tabla 11.- Porcentaje de esporulación en los diferentes tratamientos con hongo sobre los mosquitos resistentes a malatión.

Exposición	% esporulación
<i>G. virens</i> /malatión (1 h)	93.33
<i>G. virens</i> (24 h)-malatión (1 h)	93.33*
Malatión/ <i>G. virens</i> (3 h)	93.33
Malatión (1 h)- <i>G. virens</i> (24 h)	93.3*
<i>G. virens</i> (1 h)	93.33
<i>G. virens</i> (3 h)	100.00
<i>G. virens</i> (24 h)	100.00*

*Esporulación diferente ($p < 0.05$)

H=13.60, g. l=6 p=0.0146

Lista de Figuras

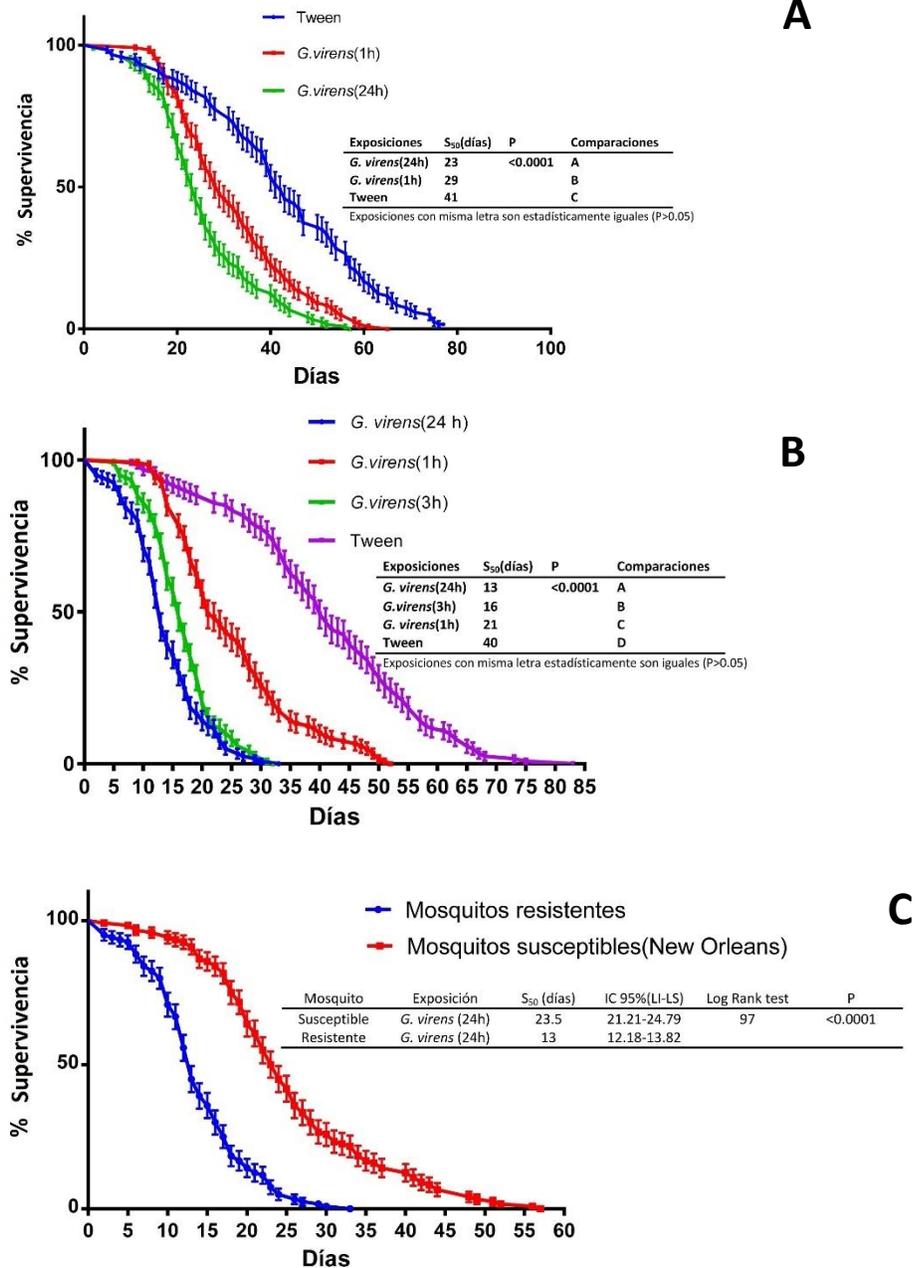


Figura 1.- Curvas de supervivencia y tiempo de supervivencia mediana (S_{50}) de los mosquitos expuestos a *G. virens*. **A)** Curvas de supervivencia y S_{50} de los mosquitos susceptibles New Orleans expuestos 1 y 24 h a *G. virens*. **B)** Curvas de supervivencia y S_{50} de los mosquitos susceptibles New Orleans expuestos 1, 3 y 24 h a *G. virens*. **C)** Curvas de supervivencia y S_{50} de los mosquitos susceptibles New Orleans y resistentes a malatión expuestos 24 h a *G. virens*.

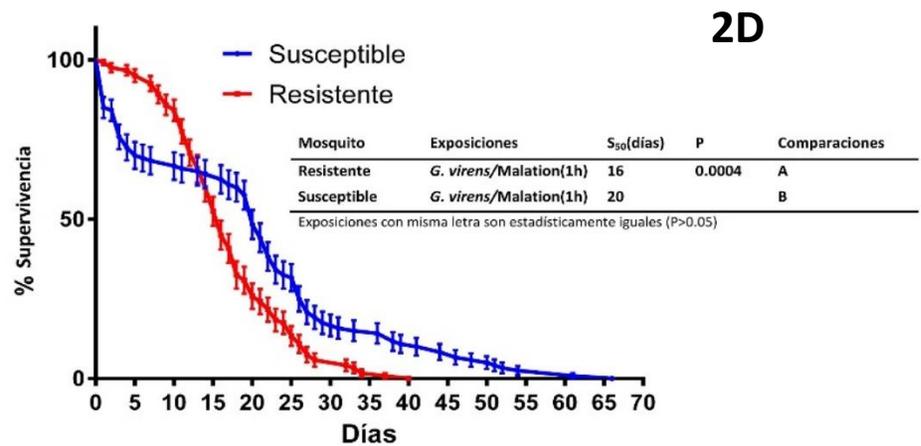
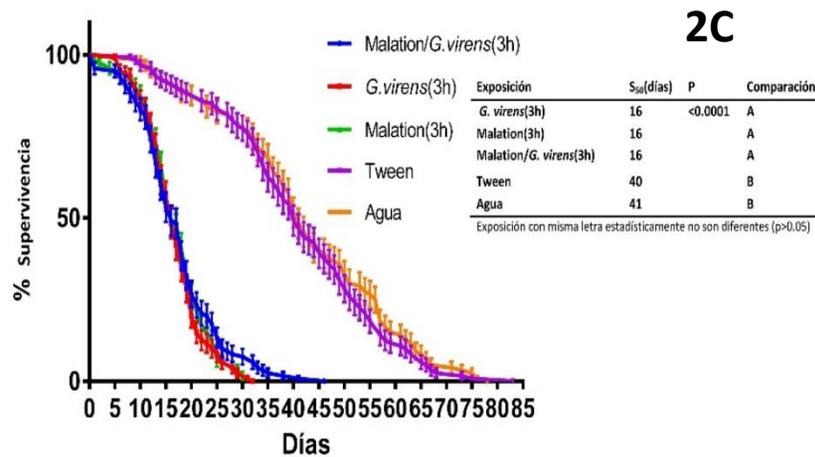
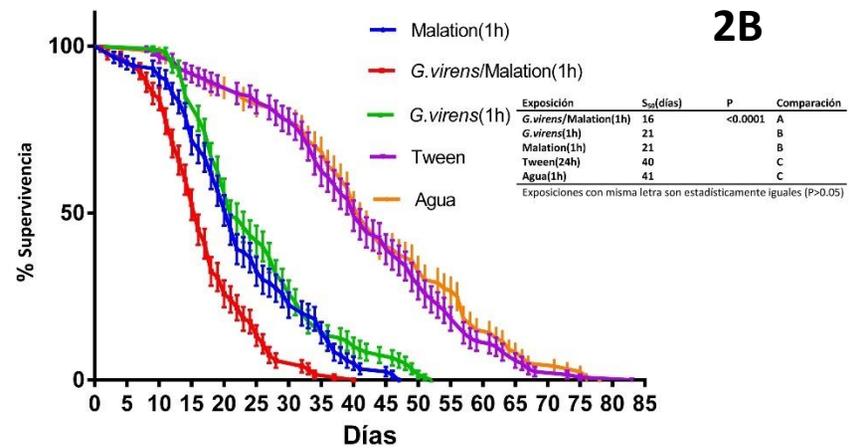
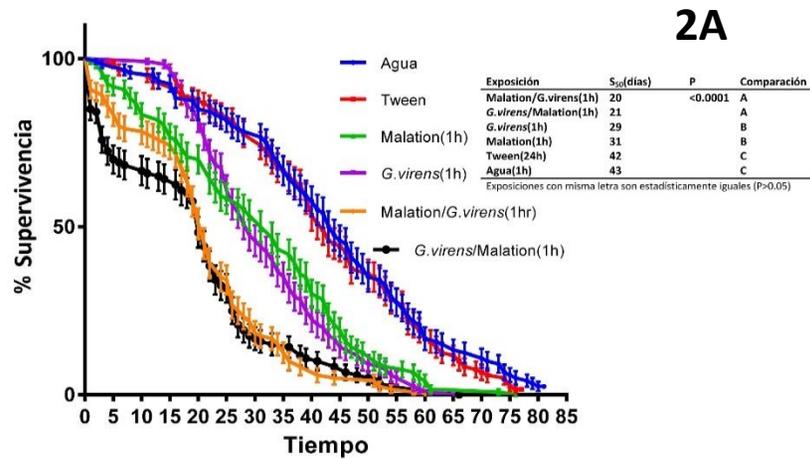


Figura 2.- Curvas de supervivencia y tiempo de supervivencia mediana (S₅₀) de mosquitos expuestos a combinaciones simultaneas de *G. virens* y malatión. **2A)** Colonia de mosquitos susceptibles a insecticidas New Orleans, expuestos durante 1 h a dos esquemas de combinaciones de *G. virens* y malatión. **2B)** Colonia de los mosquitos resistentes a malatión, expuestos durante 1 h a la combinación de *G. virens* y malatión. **2C)** Colonia de los mosquitos resistentes a malatión, expuestos durante 3 h a combinación malatión y *G. virens*. **2D)** Colonias de mosquitos susceptibles y resistentes a insecticidas, expuestos durante 1 h a combinaciones *G. virens* y malatión.

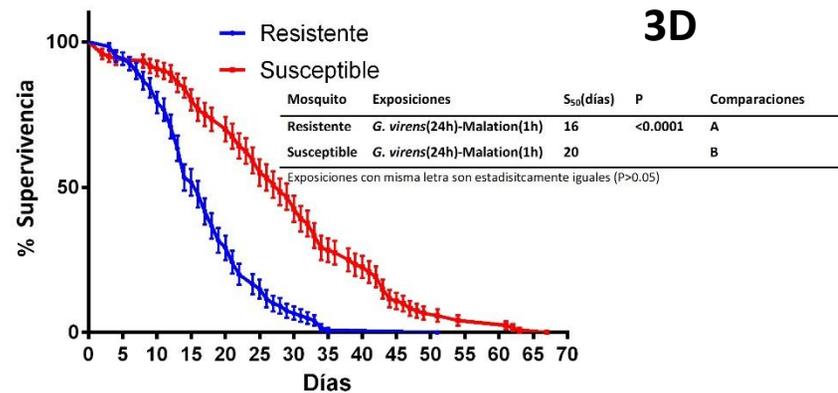
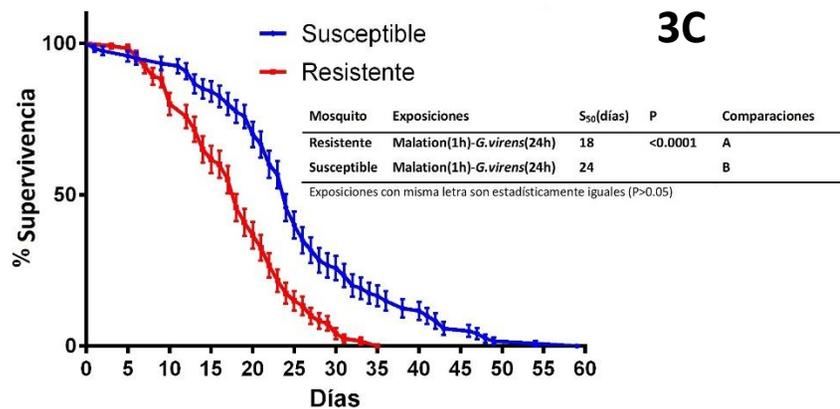
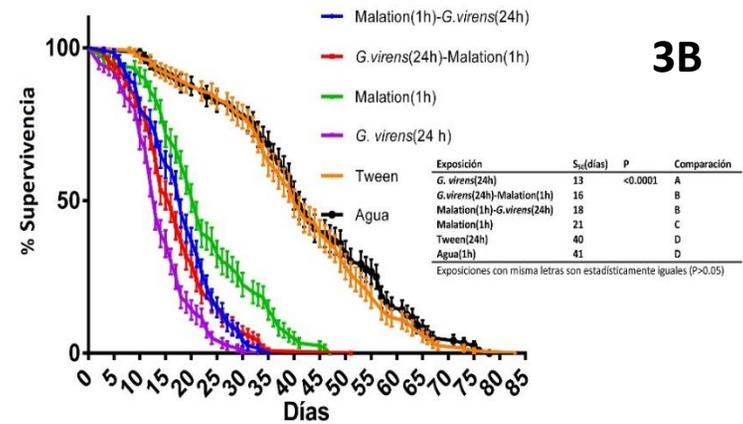
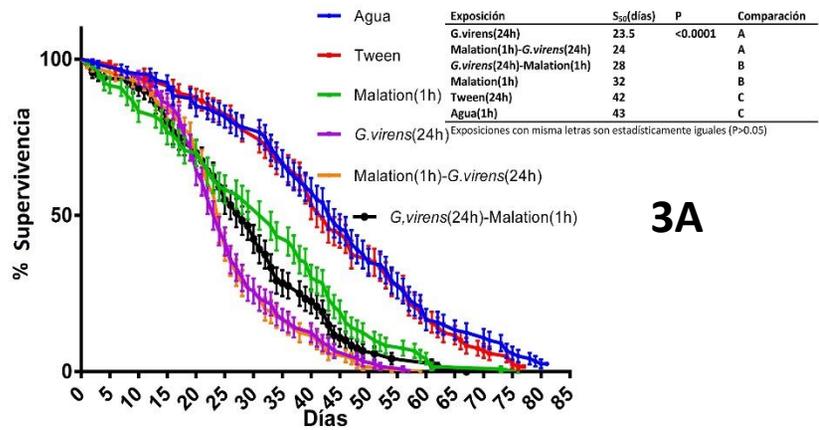
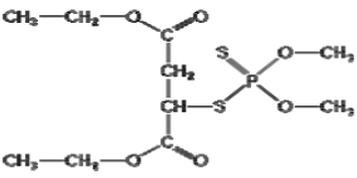
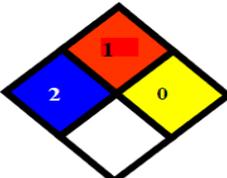


Figura 3.- Curvas de supervivencia y tiempo de supervivencia mediana (S_{50}) de mosquitos expuestos a combinaciones alternadas de *G. virens* y malatión. **3A)** Mosquitos susceptibles New Orleans expuestos de manera alternada a *G. virens* y malatión durante 1 y 24 h, respectivamente y de manera inversa. **3B)** Mosquitos resistentes a malatión expuestos de manera alternada a *G. virens* y malatión durante 1 y 24 h, respectivamente y de manera inversa. **3C)** Mosquitos susceptibles y resistentes a malatión, expuestos durante 1 h a malatión y después a *G. virens* durante 24 h. **3D)** Mosquitos susceptibles y resistentes a malatión, expuestos a *G. virens* durante 24 h y después a malatión durante 1 h.

Ficha técnica del insecticida químico malatión

MALATIÓN

DATOS DE IDENTIFICACIÓN	
Nombre químico (IUPAC): dietil (dimetoxitiofosforil) succinato o S-1,2-bis(etoxicarbonil)etil O,O-dimetil fosforoditioato	No. CAS: 121-75-5
Estructura química: 	Fórmula química: C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂ Peso molecular: 330.36
Tipo de plaguicida: Insecticida	Clasificación: Organofosforado
PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS	
<p>Líquido incoloro en estado puro o líquido color café oscuro a amarillo, con olor parecido al zorrillo. Su punto de fusión es a los 2.9 °C. Su densidad relativa es de 1.23 a 25 °C/4 °C. Su solubilidad en agua es de 145 ppm a 20 °C. Es miscible con alcoholes, ésteres, cetonas, éteres, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos aromáticos alquilados y aceites vegetales. Su solubilidad en hidrocarburos parafínicos es limitada. Es muy soluble en etil éter y soluble en etanol y acetona. Su solubilidad en etanol, etil éter y en benceno es > 10%. Su presión de vapor es de 1.78x10⁻⁴ mm Hg a 25 °C. Su constante de la ley de Henry es de 4.9x10⁻⁹ atm·m³/mol a 25 °C. Esta sustancia se descompone al calentarse o al arder, produciendo gases tóxicos que incluyen a los óxidos de fósforo y óxidos de azufre. Reacciona violentamente con oxidantes fuertes. Ataca al acero y a algunos otros metales, algunos plásticos y al caucho.</p>	
PELIGROSIDAD	
	<p>Salud (Azul): 2 - Una exposición intensa o continua (pero no crónica) podría causar incapacidad temporal o posibles lesiones residuales, a menos de que se proporcione un rápido tratamiento médico.</p> <p>Inflamabilidad (Rojo): 1 - Debe ser precalentada para que ocurra el incendio.</p> <p>Riesgo de Explosión (Amarillo): 0 - Normalmente estable, incluso bajo condiciones de incendio y no es reactiva con el agua.</p>
DESTINO EN EL AMBIENTE	
<p>Persistencia: Ligeramente persistente (hasta 1 semana)</p> <p>En la atmósfera puede presentarse únicamente como vapor, el cual es eliminado rápidamente al reaccionar con radicales hidroxilo (vida media de 5 horas) o por fotólisis directa (vida media de 1.3 días). En suelos es poco persistente. Su vida media en los sistemas terrestres varía de 1 a 25 días. En este medio la velocidad de su degradación depende del contenido de materia orgánica y del grado de adsorción a las partículas. La afinidad de este compuesto por el suelo varía de muy baja a moderada y puede constituir un riesgo de contaminación para las aguas subterráneas en sitios donde las condiciones no favorezcan su degradación. Tanto en agua como en suelo la degradación ocurre por una combinación de procesos biológicos y reacciones no biológicas mediadas por el agua (hidrólisis). Su vida media en agua de río es de 1 semana, pero en estanques con menor movimiento se prolonga entre 2.5 y 6 semanas. Al aumentar la salinidad del agua se incrementa su eliminación, generando ácidos mono y dicarboxílicos como principales productos de degradación. La unión a sólidos suspendidos y sedimentos, así como la volatilización no constituyen destinos ambientales importantes para este plaguicida. Debido a su baja persistencia no se espera que se bioconcentre en los organismos. La mayor parte del Malatión que llega a entrar en el cuerpo de los animales es metabolizado y eliminado casi por completo en 24 horas. Cuando es absorbido por las plantas se localiza en las partes que contienen más agua, lo cual facilita su metabolismo.</p>	
TOXICIDAD PARA LOS ORGANISMOS Y EL MEDIO AMBIENTE	
<p>Tipo toxicológico: IV</p> <p>Este compuesto muestra una toxicidad cambiante en diferentes grupos de organismos: en zooplancton y moluscos varía desde prácticamente nula hasta extremadamente alta, en peces y crustáceos de ligera a extremadamente alta, en anélidos, nemátodos y gusanos planos de ligera a moderada, en anfibios e insectos de moderada a extremadamente alta y en ganado (vacas y borregos) de moderada a alta. Es ligeramente tóxico para equinodermos, moderadamente tóxico para aves y altamente tóxico para abejas y organismos de comunidades bentónicas marinas. En embriones de peces expuestos a este plaguicida se han observado malformaciones del esqueleto (curvatura lateral de la espina dorsal), disminución de su supervivencia y anomalías en el sistema circulatorio y en el desarrollo de los ojos. Asimismo, en ostras puede disminuir su crecimiento. El Malatión es considerado un potencial disruptor endocrino que puede afectar a la glándula tiroidea y el desarrollo de oocitos en peces.</p>	